

گزینش مورفولوژیکی و مولکولی ژن(های) اعاده کننده باروری در جمعیت های در حال تفکیک برنج

مصطفی عیدی کهنکی*^۱، غفار کیانی^۱ و قربانعلی نعمت زاده^۲

*۱- نویسنده مسوول: دانش آموخته ی گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (mos.eidi.k@gmail.com)

۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۶

چکیده

تلفیق روش های کلاسیک اصلاح نبات و گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی، سرعت تولید لاین های جدید اصلاحی را افزایش خواهد داد. محدودیت ارقام مناسب اعاده کننده باروری، تعداد کم لاین های موثر و سازگار و پایه محدود ژنتیکی آن ها، از مشکلات اساسی در تولید برنج هیبرید به شمار می رود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و گزینش بوته های دارای ژن های اعاده کننده باروری در جمعیت های در حال تفکیک برنج (*Oryza sativa* L.) انجام شد. بر این اساس، مطالعه ژنوم هسته ای لاین های گزینش شده، همراه با بررسی های مولکولی جهت شناخت لاین های اعاده کننده باروری در دو جمعیت حاصل از تلاقی های متقارب (نعمت × پژوهش // IR58110 × پژوهش) و (نعمت × پژوهش // IR60819 × پژوهش) و دو جمعیت حاصل از (IR60819 × پژوهش و IR58110 × پژوهش) طی دو سال نشان داد که لاین های R5، R7، R9، R28، R45 و R28 با انجام آزمون های باروری دانه گرده و خوشه در مجموع دارای باروری بیش از ۷۵ درصد بودند. با بررسی های مولکولی انجام شده بر روی لاین ها و ژنوتیپ های گزینش شده، چهار نشانگر SSR همبسته با ژن های *Rf* شامل: RM1، RM3148، RM171 و RM258 الگوی باندی مناسبی را از نظر ژن های اعاده کننده باروری ارائه نمودند به طوری که لاین های R3، R5، R7، R9، R18، R25، R27، R28، R29 و R45 در نسل F₄ حداقل برای دو نشانگر الگوی باندی، مشابه شاهد اعاده کننده باروری (IR50) را نشان دادند. با تلفیق نتایج حاصل، لاین های R5، R7، R9، R28 و R45 به عنوان لاین های دارای پتانسیل مناسب جهت اعاده کردن باروری شناسایی شدند که با بررسی های بیشتر در نسل های آینده می توانند به عنوان لاین های مطلوب اعاده کننده باروری در فرآیند تولید برنج هیبرید مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه ها: برنج، گزینش، ژن(های) اعاده کننده باروری، نشانگر مولکولی

مقدمه

اصلاح مولکولی باید به همراه صفات مورفولوژیکی مناسب و هتروزیس قوی باشد تا نتایج مطلوبی حاصل شود (زو^۱، ۲۰۰۱). در مطالعه ای که به منظور بررسی نشانگرهای کلیدی موثر در هتروزیس حاصل از هیبرید F₁ برنج ژاپونیکا به انجام رسید برخی از نشانگرهای SSR و RAPD همبستگی معنی داری با ژن های موثر در هتروزیس نشان دادند لذا هتروزیس مشاهده شده در

بهبود مورفولوژیکی گیاه و استفاده از هتروزیس^۱ از روش های مؤثری هستند که تا کنون برای افزایش پتانسیل عملکرد محصولات زراعی از طریق اصلاح نبات شناخته شده است (باقری، ۱۳۸۸). اصلاح صفات مورفولوژیکی به تنهایی پتانسیل بسیار محدودی دارد و اگر هم منحصراً از هتروزیس استفاده گردد، نتایج نامطلوبی خواهد داشت لذا هر روش اصلاحی مانند

آنجایی که مبنای انتخاب در برنامه های اصلاح نبات، بررسی صفت یا صفات مورد نظر می باشد، با استفاده از نشانگرهای مولکولی می توان مسیر اصلاح را کوتاه تر و دقیق تر نمود. انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS)^۸، روشی است که ژن یا ژن های مورد نظر را می توان بر اساس پیوستگی که با یک نشانگر ژنتیکی دارند تشخیص داده و انتخاب نمود (قره یاضی، ۱۳۷۶). استفاده از انتخاب به کمک نشانگرها نسبت به اصلاح سنتی صرفه جویی در هزینه ها را در بر دارد (استروم برگ و همکاران^۹، ۱۹۹۴) در این انتخاب گزینش بر پایه ژنوتیپ نشانگر (نه بر پایه فنوتیپ آن) که به ژن مورد نظر همبستگی داشته انجام می گیرد (دودلی^{۱۰}، ۱۹۹۷). باقری (۱۳۸۸) گزارش نمودند که همبستگی نشانگر RM490 با ژن اعاده کننده باروری در جمعیت مورد نقشه یابی که شامل ۳۶ گیاه عقیم هموزیگوس و ۱۰۰ گیاه انتخاب شده بطور تصادفی از جمعیت F₂ بود نشان داد که این نشانگر جهت استفاده در برنامه انتخاب به کمک نشانگر برای لاین اعاده کننده باروری در سیستم CMS-WA امید بخش بود.

اخیراً تحقیقات اصلاحگران در زمینه نشانگرهای مولکولی و کاربرد آن ها در اصلاح نبات با انجام پژوهش های متعدد در این رابطه، منجر به پیشرفت های قابل توجهی در این زمینه شده است. زیرا از یک سو تولید سریعتر لاین های اعاده کننده باروری را فراهم ساخته و از سوی دیگر باعث کاهش هزینه های بالای مراحل اصلاحی می گردد (دنگ و همکاران^{۱۱}، ۲۰۰۶). با استفاده صحیح از نشانگرها اولاً نیازی به آزمون نتایج نسل های مختلف تلاقی برگشتی^{۱۲} نیست و ثانیاً می توان بوته های حاوی ژن های اعاده کننده باروری را در مراحل اولیه رشدی تشخیص داده و بقیه را حذف نمود.

نسل F₁ می تواند با انتخاب موثر آلل های همبسته با این پدیده بهبود یابد (چو و همکاران^۱، ۲۰۰۴) از آنجا که تکنولوژی تولید برنج هیبرید افزایش عملکردی معادل ۲۰-۱۵ درصد بیشتر از بهترین لاین های خالص نیمه پاکوتاه داشته (ویرمانی و همکاران^۲، ۲۰۰۵؛ ویرمانی، ۱۹۹۶) لذا به عنوان یکی از گزینه های امیدبخش اصلاح برنج به منظور افزایش تولید در واحد سطح مورد توجه قرار گرفته است (شیبا و همکاران^۳، ۲۰۰۵). در رابطه با تولید برنج هیبرید دو سیستم به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته اند. یکی سیستم سه لاین که در آن از نرعقیمی سیتوپلاسمی^۴ (CMS) بهره برده می شود و دیگری سیستم دو لاین^۵ (EGMS) که در آن از نرعقیمی سیتوپلاسمی حساس به محیط استفاده می گردد (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳). سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی به طور گسترده به منظور تولید هیبرید تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است (نعمت زاده و کیانی^۶، ۲۰۱۰). اما استفاده از این سیستم به منظور بهره برداری از هتروزیس در محصولات دانه ای تنها وقتی می تواند مورد استفاده واقع شود که لاین های برگرداننده باروری مطلوب موجود و در دسترس باشند (نعمت زاده و ستاری، ۱۳۸۱). از طرفی محدودیت ارقام مناسب اعاده کننده باروری، تعداد کم لاین های موثر و سازگار و پایه محدود ژنتیکی آن ها، همواره از مشکلات اساسی تولید برنج هیبرید بوده است. در این رابطه، باید باروری دانه گرده یا خوشه و یا هر دوی آن ها نیز به عنوان شاخصی برای شناسایی بوته های اعاده کننده باروری مورد استفاده قرار گیرد (یومادوی و همکاران^۷، ۲۰۱۲) و ژنوتیپ هایی که باروری دانه گرده و خوشه بالایی داشته باشند پتانسیل لازم جهت اعاده کردن باروری را دارند. از

1- Cho *et al.*2- Virmani *et al.*3- Sheeba *et al.*

4- Cytoplasmic male sterility

5- Environment Sensitive Genetic male sterility

6- Nematzadeh & Kiani

7- Umadevi *et al.*

8 Marker Assisted Selection

9- Stromberg *et al.*

10 Dudley

11- Deng *et al.*

12- Back cross

جاده خزرآباد در ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه شمالی و ۵۳ درجه و ۱۳ دقیقه شرقی، طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ اجرا گردید. مواد اصلاحی مورد استفاده در این تحقیق متشکل از چهار جمعیت در نسل F₄ بوده است که دو جمعیت آن حاصل تلاقی متقارب (نعمت × پژوهش // IR58110 × پژوهش) و (نعمت × پژوهش // IR60819 × پژوهش) و دو جمعیت دیگر از تلاقی‌های (IR60819 × پژوهش و IR58110 × پژوهش) بوجود آمد. در این تلاقی‌ها IR60819 و IR58110 از ارقام اعاده‌کننده و پژوهش نیز دارای خصوصیات مطلوب به منظور اصلاح برای قابلیت اعاده‌کننده باروری به پایه‌های نرعیتم سیتوپلاسمی (CMS) می‌باشد (نعمت‌زاده و کیانی، ۲۰۱۰). رقم نعمت (لاین ۲۸-۱۲) نیز از ارقام پرمحصول و با کیفیت مطلوب محسوب می‌گردد (نعمت‌زاده و همکاران، ۱۳۷۶). خزانه‌گیری در فروردین و نشاء‌کاری در اردیبهشت ماه در مرحله ۴-۵ برگی و همچنین سایر عملیات زراعی از قبیل آبیاری، مبارزه با آفات، و کودپاشی مطابق معمول انجام گردید. سپس در اواسط مرحله گلدهی، عمل انتخاب در نسل F₄ انجام و در هر جمعیت ژنوتیپ‌های برتر بر اساس خصوصیات ظاهری موردنظر برای بوته‌های اعاده‌کننده باروری نظیر ارتفاع، تعداد پنجه، طول خوشه مورد گزینش قرار گرفته که از شماره R1 تا R53 نامگذاری شدند. در مرحله گلدهی به منظور مطالعه ژنوم هسته‌ای ژنوتیپ‌های برتر انتخابی از نظر ژن‌های اعاده-کننده باروری در نسل‌های در حال تفکیک، دورگ-گیری این ژنوتیپ‌های انتخابی (به عنوان والد پدری) با دو لاین نرعیتم سیتوپلاسمی ندا و نعمت (به عنوان والد مادری) انجام و همچنین از لاین IR50 به عنوان شاهد اعاده‌کننده باروری استفاده شد. در این آزمایش، از میان ۴۵ تلاقی انجام شده در نهایت پس از خزانه‌گیری و نشاکاری تعداد ۳۰ هیبرید F₁ در مزرعه مستقر گردید. در مرحله بعد به منظور بررسی وضعیت عقیمی و یا باروری نتاج حاصل از تست کراس، دانه‌گرده این گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت که طی آن از بوته‌های

ریزماهورها^۱ یا توالی تکرار شونده (SSR) توالی-های نوکلئوتیدی تکراری بوده که به لحاظ فراوانی در ژنوم، ماهیت هم‌بارزی، چندشکلی بالا، مکان اختصاصی بودن و توزیع یکنواخت در سراسر ژنوم امروزه بسیار مورد توجه اصلاحگران قرار گرفته است (نانداکومار و همکاران^۲، ۲۰۰۴؛ کورزون^۳، ۲۰۰۲). از طرف دیگر سطح بالای تنوع آللی قدرت جداسازی بالا، این نشانگرها را برای شناسایی و آزمون خلوص ژنتیکی بذور هیبرید ایده‌آل ساخته است (رانجیکار و همکاران^۴، ۲۰۰۲؛ مک‌کوچ و همکاران^۵، ۲۰۰۲؛ سینگ و همکاران^۶، ۲۰۰۴). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی مقاومت به بلاست در برنج به انجام رسید انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR نشان داد که چهار نشانگر RM413، RM5961، RM1233 و RM8225 ارتباط معنی‌داری با فنوتیپ مقاومت به بلاست در برنج نشان دادند (اشکانی و همکاران^۷، ۲۰۱۲). هدف از اجرای این پژوهش شناسایی و گزینش بوته‌های دارای ژن‌های اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های در حال تفکیک برنج و استفاده از انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS) به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های دارای ژن‌های مذکور می‌باشد که طی آن ارزیابی باروری نتاج حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های انتخابی با لاین‌های CMS نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان وابسته به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری واقع در کیلومتر ۹

- 1- Microsatellite or Simple Sequence Repeat
- 2- Nandakumr *et al.*
- 3- Korzun
- 4- Ranjekar *et al.*
- 5- McCouch *et al.*
- 6- Singh *et al.*
- 7 Ashkani *et al.*

بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی-مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت ۱۰ میکرومولار، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار و ۱ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۵۰ نانوگرم بود. برنامه حرارتی شامل یک چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۴ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و نهایتاً ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد و در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه تفکیک شدند. سپس رنگ‌آمیزی به وسیله محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میکرولیتر) انجام و عکسبرداری با استفاده از دستگاه Gel document در زیر نور UV صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

اطلاع از فاصله ژنتیکی و ریخته ارثی ارقام و لاین-های موجود در جوامع گیاهی مورد بررسی، اهمیت زیادی در برنامه‌های اصلاح‌نیات دارد و در انتخاب درست والدین به اصلاحگر کمک می‌کند (زالی، ۱۳۷۳؛ موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج^۶، ۱۹۹۳) نتایج حاصل از آمار توصیفی صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های انتخابی جمعیت‌های مورد بررسی در جدول ۲ نشان می‌دهند که از بین صفات مورفولوژیکی بررسی شده، عملکرد دانه، تعداد پنجه بارور و تعداد کل دانه به ترتیب با ضرایب تغییرات ۳۲/۱۲، ۲۵/۶۰ و ۲۲/۱۵ درصد بیشترین تنوع فنوتیپی را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین محدوده تغییرات ارتفاع ژنوتیپ‌ها بین ۱۰۰ تا ۱۵۹ سانتیمتر بوده است لذا ژنوتیپ‌ها با میانگین ۱۱۵/۷۰ سانتی‌متر دارای ارتفاع نیمه پابلند بوده است. در لاین‌های اعاده‌کننده باروری، ارتفاع بوته نقش مهمی را در

انتخاب شده، خوشه‌هایی که در مراحل اولیه خروج از غلاف و قبل از گلدهی بودند، انتخاب و جهت آزمون، یک گلچه از هر یک از بخش‌های بالا، وسط و پائین خوشه برداشته شد سپس دانه‌های گرده جداسازی و روی لام با محلول یدید یدور پتاسیم (I₂-KI) تیمار شدند به این ترتیب که پس از رنگ‌آمیزی، دانه‌های گرده‌ای که دارای شکل کروی و رنگ‌پذیری کامل (مشکی) بودند به عنوان بارور و آندسته از دانه‌های گرده که بی‌رنگ بودند به عنوان عقیم در نظر گرفته شدند (گویندا راج و ویرمانی^۱، ۲۰۰۰) در نهایت در زیر میکروسکوپ درصد دانه‌های گرده عقیم در محدوده قابل رؤیت میکروسکوپ به صورت تکرار دار مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون باروری دانه گرده و خوشه هیبریدهای F₁ آندسته از ژنوتیپ‌های انتخابی که باروری دانه گرده و دانه بندی خوشه‌های آن‌ها مطلوب بود به منظور شناسایی و تایید حضور ژن-های اعاده‌کننده باروری با نشانگرهای SSR مورد مطالعه قرار گرفتند. استخراج DNA نمونه‌های برگی با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (دلاپورتا و همکاران^۲، ۱۹۸۳). انجام و کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش الکتروفورز^۳ ژل آگارز و اسپکتروفتومتری^۴ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی ژن‌های اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های در حال تفکیک برنج، هشت جفت نشانگر SSR (نعمت‌زاده و کیانی، ۲۰۱۰؛ باقری، ۱۳۸۸) مورد استفاده قرار گرفت که مشخصات این آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)^۵ در حجم ۲۵ میکرولیتر به ازای هر نمونه در نظر گرفته شد که شامل ۱۸/۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر

1- Govinda raj & Virmani

2- Dellaporta et al.

3- Electrophoresis

4-Spectrophotometer

5 -Polymerase Chain Reaction

6- IEE, Rice Alamance

دانه گرده به عنوان اعاده‌کننده باروری (R لاین) شناسایی گردید. در ادامه ارزیابی مولکولی این لاین‌ها از طریق نشانگرهای SSR انجام شد که از میان این نشانگرهای مطالعه شده، چهار نشانگر RM171، RM1، RM3148 و RM258 الگوی بانندی مناسبی را ارائه نمودند.

قطعات DNA پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نشانگر RM258 همبسته با ژن *Rf4* واقع بر روی کروموزوم شماره ۱۰ برنج برای لاین‌های اعاده‌کننده باروری (R) بانندی به طول ۱۵۵ جفت باز و برای بقیه لاین‌ها (غیر اعاده‌کننده باروری) بانندی به طول ۱۷۰ جفت باز را نشان دادند. به طوری که لاین‌های R3، R5، R18، R19، R24 و R28 بانندی مشابه شاهد اعاده‌کننده باروری (IR50) و سایر لاین‌ها بانندی متفاوت نشان دادند (شکل ۱).

در همین رابطه جیان و همکاران^۲ (۲۰۰۳) به منظور نقشه‌یابی مولکولی ژن‌های اعاده‌کننده باروری در نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA لاین‌های اعاده‌کننده برنج باسماتی، جمعیت F₂ حاصل از تلاقی IR58025A × PRR-78 را مورد مطالعه قرار دادند و نشانگر RM258 را به عنوان یکی از نشانگرهای پیوسته با ژن‌های اعاده‌کننده باروری در فاصله ۹/۵ سانتی مورگان از این ژن‌ها شناسایی نمودند. هوانگ و همکاران^۳ (۲۰۰۲) نیز با استفاده از نشانگر RM258 آلل‌های بین ۱۵۰-۲۰۰ جفت بازی را برای لاین‌های بارور و غیربارور گزارش نمودند که مطابق با نتایج حاضر می‌باشد. همچنین میثرا و همکاران^۴ (۲۰۰۳) با نشانگر RM258 برای لاین اعاده‌کننده باروری قطعه بانندی به طول ۱۲۵ جفت باز و برای لاین غیراعاده‌کننده باروری بانندی به اندازه ۱۳۰ جفت باز را گزارش کرده‌اند.

پراکنش مناسب دانه‌های گرده برای لاین‌های نرعقیم دارد. در نتیجه در انتخاب لاین‌های برتر جهت گزینش لاین‌های اعاده‌کننده باروری، به منظور توزیع مناسب دانه‌های گرده بایستی ژنوتیپ‌های پابلندتر از لاین نرعقیم را انتخاب نمود. (ویرمانی، ۱۹۹۴). لذا با گزینش ژنوتیپ‌هایی با ارتفاع مناسب و تلاقی دادن آن‌ها با لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی، می‌توان نسبت به یافتن نتایج با عملکرد بهتر و کیفیت بالاتر اقدام نمود.

همانطوریکه گزارش شده است در صورتی که یک لاین پدری در ژنوم هسته‌ای خود دارای ژن‌های غالب تجدیدکننده باروری موسوم به *Rf* باشد و با یک نرعقیم تلاقی پیدا کند هیبرید حاصله بارور خواهد بود (فارسی و باقری، ۱۳۸۸). آزمون باروری دانه گرده و خوشه هیبریدهای حاصل از تلاقی‌های انجام شده نشان داد که از میان ۳۰ هیبرید مستقر در مزرعه تحقیقاتی، ۱۲ هیبرید دارای باروری گرده و خوشه نسبتاً مطلوبی بودند. که نام و درصد باروری دانه گرده و خوشه این تلاقی‌ها در جدول ۳ آمده است.

در اصلاح‌نات کلاسیک از تلاقی آزمون^۱ ارقام با لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و ارزیابی نتاج F₁ این تلاقی‌ها از حیث باروری دانه گرده و خوشه استفاده می‌گردد و لاین‌هایی که نتاج آن‌ها باروری خوشه و دانه گرده بالایی نشان دهند به عنوان اعاده‌کننده باروری بالقوه در نظر گرفته می‌شوند. نتایج حاصل از آزمون باروری هیبریدها، نشان داد که لاین‌های R5، R7، R9، R18، R28 و R45 دارای پتانسیل لازم جهت اعاده کردن باروری بودند این در حالی است که با آزمایش باروری هیبریدهای مربوطه از طریق کنترل باروری خوشه، لاین‌های R7، R9، R27، R29 و R45 و با باروری بالای ۷۵ درصد به عنوان لاین اعاده‌کننده باروری شناسایی شدند. R7، R28 و R45 برای لاین نرعقیم سیتوپلاسمی نعمت A و لاین‌های R5، R9 و R18 برای لاین نرعقیم ندا A، از طریق آزمون باروری

2- Gyan et al.

3- Huang et al.

4- Mishra et al.

1- Test cross

عیدی کهنکی و همکاران: گزینش مورفولوژیکی و مولکولی ژن های اعداد کنند...

جدول ۱- آغازگرهای SSR مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نشانه‌ها	موقعیت کروموزومی	اندازه باند	توالی رفت	توالی برگشت	توالی تکرار شونده
RM171	۱۰	۳۲۸	aacgcgaggacacgtacttac	acgagatacgtacgccttg	(GATG) ₅
RM228	۱۰	۱۵۴	ctggccattagtccttg	gcttgccgctctgcttac	(CA) ₆ (GA) ₃₆
RM258	۱۰	۱۴۸	tgctgtatgtagctgcacc	tggcctttaaagctgtcgc	(GA) ₂₁ (GGA) ₃
RM271	۱۰	۱۰۱	tcagatctacaattccatcc	tcggtgagacctagagagcc	(GA) ₁₅
RM151	۱	۱۹۷	ggctgctcatcagctgcatgcg	tcggcagtggtagagttgatctgc	(TA) ₂₃
RM490	۱	۱۰۱	atctgcacactgcaaacacc	agcaagcagtgctttcagag	(CT) ₁₃
RM1	۱	۱۱۳	gcgaaaacacaatgcaaaaa	gcgttggttgacactgac	(GA) ₂₆
RM3148	۱	۱۶۶	gactattgctcgacaccttg	ttgtctgcttggtatttgc	(CA) ₂₀

جدول ۲- دامنه تغییرات، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات صفات اندازه گیری شده در ژنوتیپ‌های انتخابی حاصل از جمعیت‌های مورد مطالعه در برنج

صفت	محدوده تغییرات	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
ارتفاع گیاه (سانتی متر)	۱۰۰-۱۵۹	۱۱۵/۷۰	۱۲/۳۰	۱۰/۶۳
طول خوشه (سانتی متر)	۲۱/۶-۳۵	۲۷/۸۷	۲/۶۵	۹/۵۰
تعداد پنجه بارور	۸-۲۳	۱۴/۱۰	۳/۶۱	۲۵/۶۰
تعداد کل دانه	۶۹-۱۷۳	۱۱۲/۸۶	۲۵/۰۰	۲۲/۱۵
تعداد دانه پر	۵۸-۱۴۳	۹۵/۵۸	۱۹/۵۷	۲۰/۴۷
طول دانه (میلی متر)	۹/۱۹-۱۲/۶	۱۰/۷۹	۰/۶۷	۶/۲۰
قطر دانه (میلی متر)	۱/۸۹-۲/۹۴	۲/۳۰	۰/۱۷	۷/۳۹
وزن هزاردانه (گرم)	۱۸-۳۶	۲۷/۱۰	۳/۳۸	۱۲/۴۷
عملکرد دانه (گرم)	۱۱/۹-۷۰/۴	۳۱/۶۶	۱۰/۱۷	۳۲/۱۲

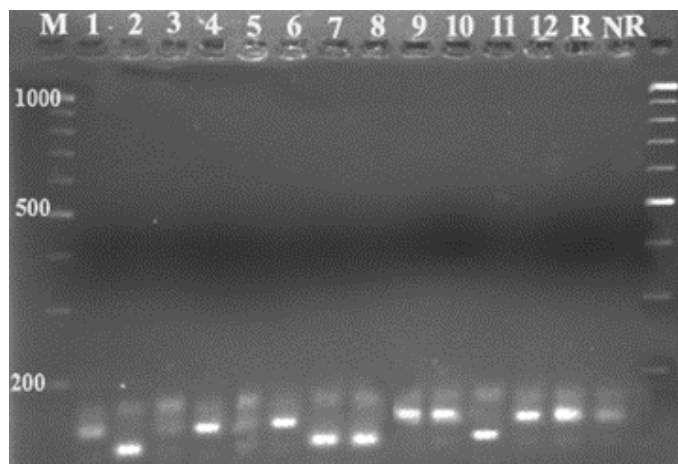
با بررسی‌های انجام شده روی نشانگرهای استفاده شده لاین‌های R3، R5، R7، R9، R18، R25، R27، R28، R29 و R45 حداقل برای دو نشانگر الگوی بانندی، مشابه شاهد اعاده‌کننده باروری (IR50) را نشان دادند. با تلفیق نتایج حاصل از آزمون-های باروری گرده و باروری خوشه و همچنین بررسی-های مولکولی با نشانگرهای بکار برده شده می‌توان لاین‌های R5، R7، R9، R28 و R45 را به عنوان لاین‌های دارای پتانسیل مناسب جهت اعاده‌کردن

نشانگر RM3148 همبسته با ژن *Rf3* واقع بر روی کروموزوم شماره ۱ برنج برای لاین‌های اعاده‌کننده باروری قطعه بانندی به طول ۱۷۰ جفت باز و برای بقیه لاین‌ها بانندی به طول ۱۵۵ جفت باز را نشان داد (شکل ۲) که با نتایج بدست آمده از تحقیقات نعمت‌زاده و کیانی (۲۰۱۰) همخوانی دارد. با توجه به اطلاعاتی که در سایت <http://www.gramene.org> ارائه شده است آلل موثر برای صفت اعاده‌کننده باروری با توجه به این نشانگر آلل ۱۶۶ جفت بازی گزارش شده است.

باروری در نظر گرفت. مشخصات زراعی این لاین‌ها در جدول ۴ آمده است. با توجه به نقش مهم ارتفاع بوته در پراکنش مناسب دانه‌های گرده برای لاین‌های نرعیم این لاین‌ها با داشتن ارتفاع مناسب می‌توانند در فرآیند تولید هیبرید موثر واقع شوند لاین‌های مذکور از نظر سایر صفات نظیر طول خوشه، تعداد پنجه، تعداد دانه وضعیت مطلوبی دارند و با بررسی‌های بیشتر در نسل‌های آینده می‌توانند به عنوان لاین‌های مطلوب اعاده‌کننده باروری در فرآیند تولید برنج هیبرید مورد استفاده قرار گیرند.

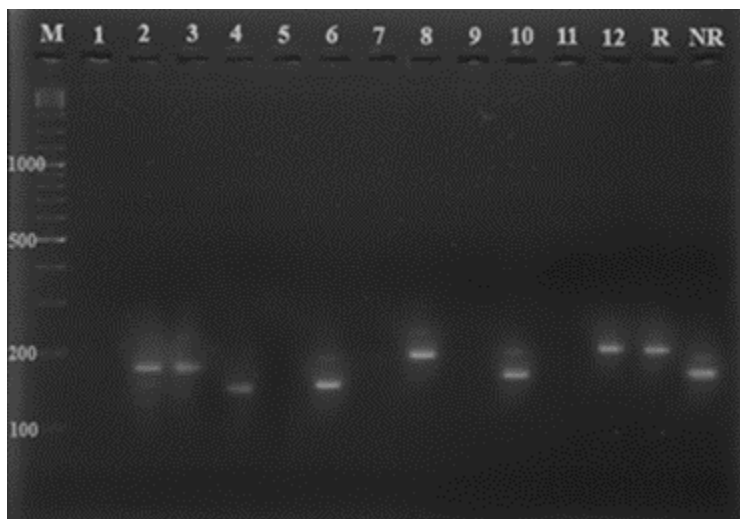
جدول ۳- بررسی هیبریدهای F₁ از نظر باروری دانه گرده و خوشه

ردیف	تلاقی	باروری دانه گرده (%)	باروری خوشه (%)	ردیف	تلاقی	باروری دانه گرده (%)	باروری خوشه (%)
۱	نعمت R3/ A	۳۸/۲	۵۴	۷	نعمت R29/ A	۳۴/۴	۸۴/۴
۲	نعمت R7/ A	۸۷/۷	۸۷/۶	۸	نعمت R45/ A	۸۹/۱	۸۳/۶
۳	ندا R9/ A	۸۳/۲	۸۶/۳	۹	ندا R5/ A	۸۳/۴	۸۵
۴	نعمت R19/ A	۳۶	۷۹	۱۰	ندا R18/ A	۸۲/۸۸	۶۲/۶
۵	نعمت R25/ A	۴۳/۵	۶۶	۱۱	نعمت R27/ A	۵۳/۱۵	۸۲/۵
۶	ندا R24/ A	۵۱/۵	۲۱/۳	۱۲	نعمت R28/ A	۷۸/۵	۷۳/۲



شکل ۱- الگوی بانندی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر RM258 روی ژل آگارز ۲ درصد M، R و NR به ترتیب نشان دهنده مارکر وزنی 100bp، شاهد اعاده‌کننده باروری و شاهد غیراعاده‌کننده باروری می‌باشند و اعداد ۱ تا ۱۲ به ترتیب شامل R3:1، R7:2، R9:3، R19:4، R25:5، R24:6، R29:7، R45:8، R5:9، R18:10، R27:11 و R28:12 می‌باشند.

عیدی کهنکی و همکاران: گزینش مورفولوژیکی و مولکولی ژن های اعاد کنند...



شکل ۲- الگوی بانندی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر RM3148 روی ژل آگارز ۲ درصد M و R و N به ترتیب نشان دهنده مارکر وزنی 100bp، شاهد اعاده کننده باروری و شاهد غیراعاده کننده باروری می باشند و اعداد ۱ تا ۱۲ به ترتیب شامل R3:1, R7:2, R9:3, R19:4, R25:5, R24:6, R29:7, R45:8, R5:9, R18:10, R27:11 و R28:12 می باشند.

جدول ۴- مشخصات زراعی لاین های اعاده کننده باروری

لاین	ارتفاع (سانتی متر)	طول خوشه (سانتی متر)	تعداد پنجه	تعداد دانه	تعداد دانه پر	طول دانه (میلی متر)	عرض دانه (میلی متر)	عملکرد (گرم / بوته)
R5	۱۰۹/۵	۳۰	۲۲	۱۵۷	۸۴	۱۰/۲۸	۲/۶۹	۳۱/۲
R7	۱۲۶	۳۲	۷	۲۸۴	۱۸۰	۱۰/۷۳	۲/۷۲	۲۲/۶۹
R9	۱۳۸/۵	۳۶	۷	۳۰۲	۲۲۲	۹/۳۴	۲/۶۸	۱۸/۳
R28	۱۲۴	۲۹/۷	۲۲	۱۳۴	۱۱۴	۹/۳۴	۲/۴۲	۳۶/۷
R45	۱۰۸	۲۹/۳	۱۷	۱۴۶	۱۳۵	۱۰/۱۶	۲/۷۷	۱۵/۶

منابع

۱. باقری ن. (۱۳۸۸). تجزیه ژنتیکی و مکان یابی مولکولی ژن (های) برگرداننده باروری برای نرعی می سیتوپلاسمی نوع WA در برنج. پایان نامه دکتری اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی ساری. دانشگاه مازندران، ۱۴۸ ص.
۲. زالی ع. (۱۳۷۳). میزان بهره وری از کلکسیون ها در به نژادی گیاهان. مقالات کلیدی سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. تبریز ۱۲ تا ۱۷ شهریور، صص: ۱۳۵ - ۱۴۳.
۳. عیدی کهنکی م. (۱۳۹۲). گزینش فنوتیپی و مولکولی ژن (های) اعاده کننده باروری در جمعیت های در حال تفکیک برنج، پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۸۲ ص.

۴. فارسی م و باقری ع. (۱۳۸۸). اصول اصلاح نباتات، انتشارات دانشگاهی مشهد، چاپ پنجم، ۳۶۸ ص.
۵. قره یاضی، ب. ۱۳۷۶. کاربرد نشانگرهای دی. ان. آ. در اصلاح نباتات. دانشگاه صنعتی اصفهان. چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات، صص: ۱۶۲-۲۰۰.
۶. نعمت زاده ق.ع. و ستاری.م. (۱۳۸۱). مطالعه ژنوم هسته ای برخی از ارقام پرمحصول برنج در کنترل باروری، برای تولید بذر هیبرید برنج (*Oryza sativa* L.). مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۴(۲): ۲۱۳-۲۱۹.
۷. نعمت زاده ق.ع، عارفی ح، امانی ر و مانی ر. ۱۳۷۶. معرفی رقم جدید برنج نعمت (لاین ۲۸-۱۲-D2) با عملکرد برتر و کیفیت مطلوب، مجله علوم کشاورزی ایران، ۲۸ (۴): ۷۹-۸۵.
8. Ashkani, S., Rafii, M.Y., Rusli, I., Sariah, M., Abdullah, S.N.A., Rahim, H.A., and Latif, M.A. 2012. SSRs for marker-assisted selection for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(1): 79-86.
9. Cho, Y.I., Park, C.W., Kwon, S.W., Chin, J.H., Ji, H.S., Park, K.J., and Koh, H.J. 2004. Key DNA markers for predicting heterosis in F1 hybrids of japonica rice. *Breeding Science*, 54(4): 389-397.
10. Dellaporta, Stephen L., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983: "A plant DNA miniprep: version II." *Plant molecular biology reporter* 1(4): 19-21.
11. Deng, Q., Wang, Sh., Zheng, A., Zhang, H., and Ping, L. 2006. Breeding Rice Restorer Lines with High Resistance to Bacterial Blight by Using Molecular Marker-Assisted Selection. *Journal of Rice Science*, 13(1): 22-28.
12. Dudley, J.W. 1997. Quantitative genetics and plant breeding. *Advances in Agronomy*, 59: 1-23.
13. Govinda raj, K., Virmani, S.S. 2000. Allelism test for restorer genes of 6 promising IR lines. International Rice Research Institute, Po Box 933, Manila, Philippines, 3: 23-24.
14. Gyan, P.M., Singh, R.K., Mohapatra, T., Singh, A.K., Prabhu, K.V., Zaman, F.U., and Sharma, R.K. 2003. Molecular Mapping of a Gene for Fertility Restoration of Wild Abortive (WA) Cytoplasmic Male Sterility using a Basmati Rice Restorer Line. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, pp: 37-42
15. Huang, Q.Y., He, Q.Y., Jin, R., Huang, H., and Zhui, Y. 2002. Tagging of restorer genes for rice HL-type CMS using microsatellite markers. *Gramene. Rice Genetics Newsletters*, 16: 75-77.
16. IEEI Rice Alamance. 1993. International Rice Research Institute, 142 p.
17. Korzun, V. 2002. Use of molecular markers in cereal breeding, *Molecular and Cellular Biology Lett*, 7: 811-820.

18. McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Fu, M., Walton, B., Li, R., Maghirang, Z., Xing, X., 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.
19. Mishra, G., Singh, R.K., Mohapatra, T., Singh, A.K., Prabhu, K.V., Zaman, F.U., and Sharma, R.K. 2003. Molecular mapping of a gene for fertility resoration of wild abortive cytoplasmic male sterility using a Basmati rice restorer line. Plant Biochemistry & Biotechnology, 12: 37-42.
20. Nandakumr, N, Singh, A., Sharma, K., Mohapara, R.K., Prabhu, T.K.V., and FU. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of geneticpurity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers, Euphytica, 136: 257-264.
21. Nematzadeh, G.h.A., and Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for Watype cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. African Journal of Biotechnology, 9(38): 6273-6277.
22. Ranjekar, P.K., Davierwala, A.P., and Gupta, V.S. 2002. DNA markers and heterosis. In: Jain, S.M., Brar D.S., and Ahloowalia, B.S. (eds), Molecular Techniques In Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, The Nertherlands, pp: 161-201.
23. Sheeba, N.K., Viraktamath, B.C., Sivaramakrishnan, S., Gangashetti, M.G., Khera, P., and Sundaram, R.M. 2009. Validation of molecular markers linked to fertility restorer gene(s) for WA-CMS lines of rice. Euphytica, 167: 217-227.
24. Singh, R.K, Sharma, R.K, Singh, A.K, Singh, V.P, Tiwari, S.P., and Mohapatra, T. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice, Euphytica, 135: 135–143.
25. Stromberg, L.D., Dudley, J.W., and Rufener, G.K. 1994. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. Crop Science, 34(5), 1221-1225.
26. Umadevi, M., Manonmani, S., Pushpam, R., Robin, S., Rajeswari, S., and Thiyagarajan, K. 2012. Suitability of maintainers and restorers for CMS lines in rice. Madras Agricultural Journal, 99 (4/6): 171-173.
27. Virmani, S.S. 1994. Heterosis and Hybrid rice breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 22, Springer –Verlag, Berlin, 63: 373-380.
28. Virmani, S.S., 1996. Hybrid rice. Advances in Agronomy, 57: 377-462.
29. Virmani, S.S., Sun, Z.X., Mou, T.M., Jauhar Ali, A., and Mao, C.X. 2003. Two line Hybrid Rice Breeding Manual. International Rice Research Institute, Los Banos Philippines, 95 p.