شناسایی لاین های بازگرداننده باروری با استفاده از نشانگرهای STS در ارقام مختلف برنج ایران

آ. یزدان پناه[۱]، ن. ع. بابائیان جلودار[۲]، ق. نعمت زاده[۲]، ن. ع. باقری[۳] و ر. طالبی[۴]

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۱۱

چکیده

دو نشانگر STS شامل RG140/*EcoR*I همبسته با ژن Rf_3 روی کروموزوم شماره ۱ و S10019/*Fnud*II همبسته با ژن Rf_4 روی کروموزوم شماره ۱۰ در شصت لاین و رقم برنج به منظور شناسایی لاین های بازگرداننده باروری و استفاده از آنها در تهیه برنج هیبرید، در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد ۲۷ لاین در جایگاه ژنی RG140 و ۳ لاین در جایگاه ژنی S10019 حامل آلل های بازگرداننده باروری بودند. ۲۰ لاین در هر دو جایگاه ژنی حامل آلل مورد نظر تشخیص داده شدند که آزمون فنوتیپی آنها نیز نشاندهنده قابلیت بازگرداندن باروری آنها بود، به طوری که این دو نشانگر بیش از ۸۵٪ باروری داشتند. بنابراین این دو نشانگر برای تشخیص ژن مورد نظر مفید بوده و وجود هر دو جایگاه ژنی برای اعاده کنندگی باروری ضروری است.

واژه های کلیدی: اعاده کننده باروری، برنج، نشانگرهای **STS**

پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ساری
۳- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ساری
۴- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

مقدمه

تقاضا برای مصرف برنج در کشور به علت افزایش جمعیت، رو به افزایش می باشد. تامین کمبود برنج از طریق ارقام بومی که عموماً عملکرد پایینی دارند امکان پذیر نمی باشد. تکنولوژی برنج هیبرید در افزایش عملکرد برنج در چین و سایر مناطق موفقیت آمیز بوده است. بنابراین ارقام برنج هیبرید برای حصول عملکرد بیشتر و گامی موثر جهت کاهش واردات برنج بسیار کاربردی می باشند (۱۵).

در برنج سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی سه لاینی (بازگرداننده باروری (R)، نرعقیم (A) و نگهدارنده (B)) برای تولید بذور هیبرید از سال ۱۹۷۵ در چین به کار گرفته شده است (۱۵). از میان انواع نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) در برنج تیپ WA تقریباً ۹۰٪ برنج هیبرید کشور چین را شامل می گردند و توارث ژن بازگرداننده باروری برای تیپ WA به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵). ژنهای بازگرداننده باروری در ژنوم هسته ای می توانند باروری را به گیاهان نرعقیم برگردانند (۱۰). یکی از موارد مهم در تولید هیبرید پیدا کردن لاین R مناسب با قدرت ترکیب پذیری بالا می باشد که از طریق انتخاب به کمک نشانگر در مقایسه با سایر روش های اصلاحی لاین R سریعتر شناسایی می شود (۱).

در میان نشانگرها، نقاط نشانمند از توالی (STS) که از توالی یابی انتهایی قطعات ژنومی cDNA بیان کننده چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) بدست می آیند، ناحیه ای منحصر به فرد و با توالی مشخص را در ژنوم شناسایی می نمایند. نظر به اینکه توالی آغازگرهای STS نسبتاً طویل می باشد با قابلیت اعتماد بیشتری لوکوس مربوطه را شناسایی می کنند (۷). بررسی توارث ژنهای بازگرداننده باروری نشان می دهد که این صفت می تواند تک ژنی (۳، ۴، ۷ و ۱۸) دو ژنی (۲، ۶، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۲۰ و ۲۱) یا چند ژنی (۱۶) بوده باشد. مطالعات باراج و همکاران (۲)، نشان می دهد که این صفت توسط دو ژن غالب کنترل می شود که آنها ژنهای بازگرداننده باروری یعنی *Rf-wa-1* و *Rf-wa-2* را به ترتیب روی کروموزوم ۷ و ۱۰ شناسایی کردند و دریافتند که قدرت بازگردانندگی *Rf-wa-1* بیشتر از *Rf-wa-2* می باشد (۲). ژانگ و همکاران (۲۲)، ژن Rf_3 را با استفاده از نشانگرهای RFLP روی کروموزوم ۱ نقشه یابی کردند. یائو و همکاران (۱۹)، نشان دادند که دو ژن Rf_3 و Rf_4 برای سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA به ترتیب روی کروموزوم های ۱ و ۱۰ قرار داشته و Rf_4 تاثیر بیشتری نسبت به Rf_3 دارد. جینگ و همکاران (۹) دو ژن اعاده کننده باروری را در سیستم نرعقیمی WA با استفاده از نشانگرهای SSLP روی کروموزم ۱۰ نقشه یابی کردند. ایکی کاوا و همکاران (۸) نیز این ژن را با استفاده از نشانگرهای RAPD و RFLP شناسایی کردند. گوین و همکاران (۱۳)، در ادامه مطالعات قبلی روی ژن Rf_3 واقع روی کروموزم شماره ۱، آغازگر اختصاصی RG140 را گزارش کردند. با توجه

به نیاز به شناسایی ژن های بازگرداننده باروری در ارقام برنج، مطالعه حاضر با استفاده از نشانگرهای اختصاصی STS اجرا گردید.

مواد و روشها

مواد ژنتیکی مورد استفاده از ۶۰ لاین و رقم مختلف برنج تهیه گردید. بذور پس از خزانه گیری با در نظر گرفتن فاصله ۲۵ سانتی متر و به صورت ردیفی کشت شدند. مراحل کاشت و داشت شامل وجین، کودپاشی و مبارزه با آفات و بیماریها طبق عرف منطقه صورت گرفت. استخراج DNA از برگهای جوان و سالم جمع آوری شده از هر گیاه براساس روش پیشنهادی کلارک انجام شد (۵). کمیت و کیفیت DNA های حاصله با روش اسپکتروفتومتری و DNA استاندارد فاژ λ تعیین شد. دو هفته پس از گلدهی، درصد باروری دانه گرده با شمارش دانه ها و رنگ آمیزی یدید پتاسیم و در زمان رسیدگی کامل درصد باروری خوشه از همه ارقام مورد مطالعه تعیین گردید و نسبت باروری و عقیمی تک تک ارقام بررسی شد.

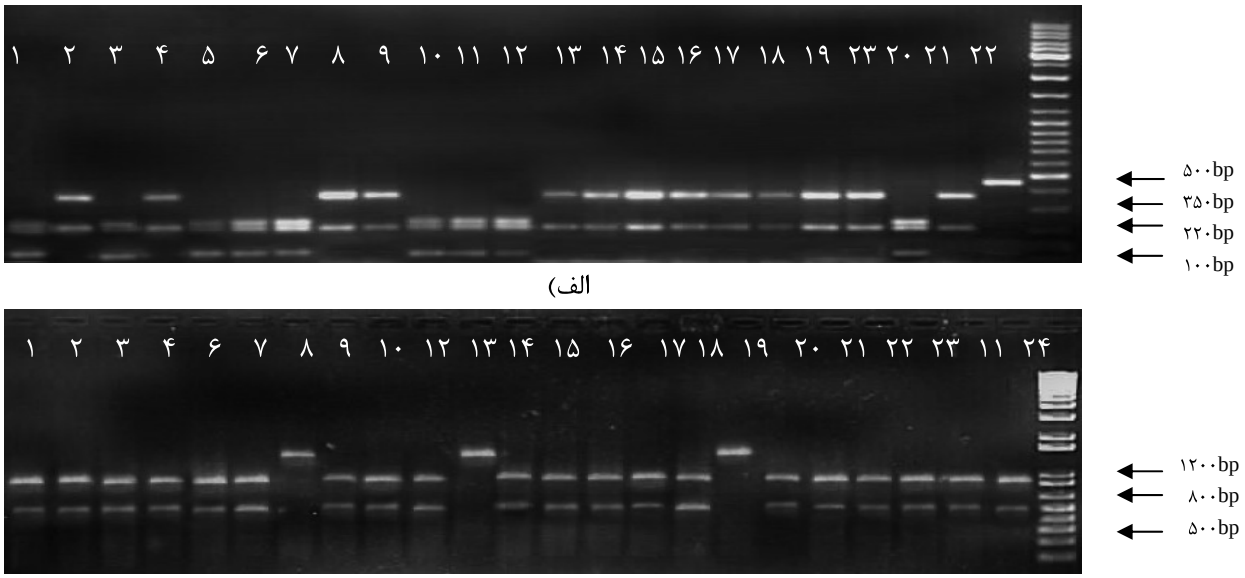
جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) از دو جفت آغازگر اختصاصی RG140 پیوسته با ژن Rf_3 و S10019 پیوسته با ژن f_4 استفاده شد (۱۳ و ۲۲)، شامل ۵۰ نانوگرم از هر نمونه DNA، ۰/۶ میلی مولار از توالی های مستقیم و برگشتی هر نشانگر، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ و ۱ واحد از آنزیم تک پلیمرازکه در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردیدند. پس از استفاده از آنزیمهای محدودگر *EcoR*I برای RG140 و *Fnud*Π برای S10019 طی۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، پلی مورفیسم مناسبی بین ارقام بارور و غیر بارور دیده شد. محصولات واکنش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز ۱/۵-۱ درصد تفکیک شده و در نهایت رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. الگوهای نواری حاصل به صورت وجود یا عدم وجود باندها مشخص شدند.

نتایج و بحث

این دو جفت نشانگر STS الگوی باندی مناسبی را برای ۶۰ لاین و رقم برنج مورد مطالعه ایجاد کردند، طوری که بعد از انجام PCR با نشانگر S10019 قطعات DNA برای همهنمونه ها قطعات ۶۰۰ جفت باز و پس از هضم آنزیمی با *Fnud*Π برای R لاین ها قطعات ۱۵۰ جفت باز و ۲۲۰ جفت باز و برای لاینهای نگهدارنده و CMS ها قطعات ۲۲۰ جفت باز و ۳۵۰ جفت باز را به طور واضح و مشخص نشان داده اند (شکل ۱- الف)، همچنین پس از واکنش زنجیره ای پلیمراز با نشانگر RG140 قطعات مونومورف حدود ۱۷۰۰ جفت باز برای همه نمونه ها مشاهده گردید که پس از هضم آنزیمی با *EcoR*I برای لاینهای اعاده کننده باروری (R) قطعات ۶۰۰ جفت باز و ۸۰۰ جفت باز و برای لاینهای نگهدارنده و CMS قطعات باندی ۱۲۰۰ جفت باز دیده شدند که پلی مورفیسم قابل تشخیص است (شکل ۱- ب). این نتایج با نتایج گوین و همکاران (۱۳)، مطابقت داشته و می توان گفت شناسایی ژن های بازگرداننده باروری در

ارقام برنج با استفاده از این دو نشانگر مولکولی در زمان کوتاه تری امکان پذیر است. خاطر نشان می شود برای تایید کامل این موضوع درصد باروری دانه گرده و خوشه معین شده، در کنار نتایج فنوتیپی و مزرعه ای مقایسه های لازم انجام شد، نتایج آزمایشات نشان داد، در صورت وجود ژن مربوطه در هر دو جایگاه، گیاه دارای باروری بالای ۸۵٪ بوده (جدول ۱)، لذا پیشنهاد می گردد برای انتخاب این ژن به کمک نشانگر بهتر است از هر دوی این نشانگرها استفاده گردد، چنانچه در این نتایج ۲۰ لاین کاملاً بارور بودند و هر دو ژن Rf_3 و Rf_4 را دارا بودند. همچنین ۲۷ لاین ورقم فقط دارای ژن Rf_3 و ۳ لاین و رقم دارای ژن Rf_4 شناسایی شدند، که در آزمایشات مزرعه ای این ارقام حالت نیمه بارور داشته و یا باروری بین (۸۵-۳۵٪) را نشان داده اند (جدول ۱). در ضمن این نتایج تاییدی بر نظریه محققینی مانند یائو و دیگران می باشند که عقیده بر موثرتر بودن اثر Rf_4 نسبت به Rf_3 داشته اند (۱۲). ولی بنا به نظر محققانی مانند تان و همکاران (۱۴) و یائو و همکاران (۱۹) که ابراز داشتند وجود تنها یکی از این ژنها قابلیت باروری را اعاده خواهد کرد، باید اشاره شود که هر چند براساس نتایج تحقیق حاضر در بعضی موارد وجود یک ژن برای اعاده باروری کفایت می کند ولی نتایج نشان داده است که در بعضی موارد با وجود فقط یک ژن اعاده کنندگی در گیاه هیچ باروری مشاهده نخواهد شد (جدول ۱).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با استفاده از این دو نشانگر مولکولی نیازی به آزمایش نتاج نسلهای مختلف بک کراس نبوده و با تشخیص در مراحل اولیه رشدی می توان بوته های حاوی ژن Rf را به خوبی تشخیص داده و برای انتخاب لاین R مناسب در تولید برنج هیبرید بهتر است از پایه ای که در هر دو جایگاه دارای این ژن است استفاده گردد.



شکل ۱- پروفایل ژل الکتروفورز با استفاده از نشانگرهای S10019 هضم شده با آنزیم FnudII (الف) RG140 هضم شده با آنزیم EcoRI (ب) لیست ارقام مندرج در شکل فوق عبارتند از: ۱- حسنی، ۲-IRRI2، ۳-دیلمانی، ۴-IRRI1، ۵- شستک محمدی، ۶- سنگ طارم، ۷- نوک سیاه، ۸ - فجر، ۹- ساحل، ۱۰- عنبربو، ۱۱- طارم محلی، ۱۲- IR749R، ۱۳- آمل۳، ۱۴- ندا، ۱۵- ندا، ۱۶- نعمت، ۱۷- سپیدرود، ۱۸- آمل۲، ۱۹- کیفی ۶۹، ۲۰- IR50، ۲۱- دشت، ۲۲- موتانت موسی طارم و ۲۳- موتانت طارم.

جدول ۱- درصد باروری دانه گرده در ارقام و لاین های مورد مطالعه برنج

ردیف	نام لاین یارقم	درصد باروری	ردیف	نام لاین یا رقم	درصد باروری	ردیف	نام لاین یا رقم	درصد باروری
۱	حسنی	٪۵۸ /۶	۲۱	دشت	٪۴۷/۳	۴۱	قصر الدشتی	٪۵۰/۱
۲	IRRI-2	٪۸۴/۴	۲۲	موتانت	٪۳۵/۲	۴۲	لاین ۱	٪۴۰
۳	دیلملنی	٪۸۵/۵	۲۳	موتانت طارم	٪۶۲/۶	۴۳	لاین ۲	٪۴۹/۲
۴	IRRI-1	٪۷۵/۳	۲۴	IN-03-911	٪۸۵	۴۴	لاین ۳	٪۳۵
۵	شستک محمدی	٪۴۵	۲۵	گرده	٪۳۰/۵	۴۵	لاین ۴	٪۷۰
۶	سنگ طارم	٪۸۶/۸	۲۶	IR-29R	٪۸۱	۴۶	لاین ۵	٪۷۸/۳
۷	نوک سیاه	٪۸۵/۲	۲۷	IR-131R	٪۸۹/۹	۴۷	لاین ۶	٪۶۵/۵
۸	فجر	٪۶۴/۳	۲۸	IR-19R	٪۸۱/۴	۴۸	لاین ۷	٪۵۷/۲
۹	ساحل	٪۷۵/۳	۲۹	Pi-1	٪۷۰/۹	۴۹	لاین ۸	٪۸۵/۲
۱۰	عنبربو	٪۸۹	۳۰	Pi-2	٪۷۱/۳	۵۰	لاین ۹	٪۵۷/۶
۱۱	طارم محلی	٪۸۶	۳۱	خزر	٪۳۳/۳	۵۱	لاین ۱۰	٪۹۰/۲
۱۲	IR-749R	٪۸۷/۴	۳۲	دم سیاه	٪۸۶/۴	۵۲	لاین ۱۱	٪۸۰
۱۳	آمل-۳	٪۴۲/۲	۳۳	موسی طارم	٪۳۴/۳	۵۳	لاین ۱۲	٪۸۷/۹
۱۴	ندا	٪۳۲	۳۴	بینام	٪۳۲	۵۴	لاین ۱۳	٪۸۷/۳
۱۵	ندا	٪۲۸/۲	۳۵	شیمر	٪۳۰/۵	۵۵	لاین ۱۴	٪۷۲/۲
۱۶	نعمت	٪۳۰/۵	۳۶	حسنی	٪۵۵/۶	۵۶	لاین ۱۵	٪۹۰/۵
۱۷	سپیدرود	٪۷۵	۳۷	شفق	٪۴۴/۶	۵۷	لاین ۱۶	٪۷۳/۹
۱۸	آمل-۲	٪۸۰	۳۸	اوندا	٪۳۶/۳	۵۸	لاین ۱۷	٪۹۱/۸
۱۹	کیفی ۶۹	٪۳۵/۳	۳۹	باسماتی	٪۳۲/۹	۵۹	B5	٪۶۵
۲۰	IR 50	٪۸۶/۷	۴۰	تای چونگ	٪۸۸/۳	۶۰	ندا	٪۳۰

تشکر و قدر دانی

از مسئولین محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی و کشاورزی کرج بدلیل در اختیار قرار دادن امکانات تشکر می شود. از سازمان مدیریت، برنامه ریزی استان مازندران جهت تامین اعتبار اولیه این تحقیق سپاسگزاری و قدردانی می شود.

منابع

1. Bozorgipoor, R. 1370. DNA molecular markers in plant breeding. Research and Manufacture Journal. No. 2: 46-49.
2. Bharaj, T.S., S.S. Virmani and G.S. Khsh. 1995. Chromosomal location of fertility restoring genes for wild abortive cytoplasmic male sterility using primary trisomic in rice. Euphytica 83: 169-173.
3. Bharaj, T.S., S.S. Bains and M.R. Gagneja. 1991. Genetics of fertility restoration of wild abortive cytoplasmic male sterility in rice. (*Oryza sativa* L.). Euphytica 56: 19-203.
4. Chen, X., S. Temnykn, Y. Xu, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome- wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet., 95: 553-567.
5. Clark, M.S. 1997. Plant Molecular Biology. Springer. 592 pp.
6. Govinda Raj, k. and S.S.Virmani. 1988. Geneties of fertiliy restoration of WA type cytop1asmic male sterility in rice. Crop Science, 28: 787-792.
7. Huang, C.S., T.H. Tseng and C. Liu. 1986. Inheritance of fertility restoration of cytoplasmic male sterility in indica rice , In: International Rice Rice Research (IRRI). Rice Genetics. pp. 649-654.
8. Ichikawa, N., N. Kishimoto, A. Inagaki, A. Nakamura, Y. Koshinno ,Y. Yokozeki, H.I. Oka, S. Samoto, H. Akagi, K. Higo, C. Shinjyo, T. Fujmurs and H. Shimada. 1997. A rapid PCR-based selection of a rice line containing the Rf-l gene, which is involed in restoration of cytoplasmic male sterility. Mol. Breed 3: 195-202.
9. Jing, R., X. Li, P. Yi and Y. Zhu. 2001. Mapping fertility restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 167-171.
10. Jons, J.W. and S.L. Emsweller. 1926. A male sterile onion. Pro. Am. Soc. hort. Sci., 34: 582-585.
11. Li, Z., W.H. Shao, Y.K. Zhu, R.J., Li, Z.L. Liu and J.M. Wan. 1982. The study and Practice of Hybrid Rice. Shanghai press, Shanghai, China.
12. Malyshev, S.V. and N.A. Kartel. 1997 Molecular in mapping of plant genomes. Molecular Biology. 31: 163-171.
13. Nguyen, T.L., G. Zhang, G. Magpanty, S.S. Virmani, N. Huang, D.S. Brar, G.S. Kush and Z.K. Li. 2002 . PCR-based DNA markers for WA-CMS fertility restoring gene Rf_3 in rice. Rice Genet., News. 15: 36 pp.
14. Tan, XL. and S. Trangoonrang. 1998. Genetic analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QTL mapping. Theor. Appl. Genet., 96: 994-999.
15. Takita, T. 1995. Development of a super high-yielding japonicindica hybrid. Sci., 45: 274 pp.
16. Teng, L.S. and Z.T. Shen. 1994. Inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in rice. Rice Genet News. 11: 95-97.
17. Virmani, S.S., K. Govinda Raj, C. Casal, R.D. Dalmacio and P.A. Aurin. 1986. Current knowledge and further outlook on cytoplasmic genetfic male sterility and fertility restoration in rice. In: Rice Genetics. pp. 633-647.
18. Wang, S. 1980. Inheritance of Rgenes in rice methodas for selection of new R lines . Agric Sci., Technol., Hunan 4: 1-4.
19. Yao, F.Y., C.G. Xu, S.B. Yu, J.X. Li, Y.J. Gao, H. lLi and Q. Zhang. 1997. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male steriliy system of rice (*Oryza sativ*a L.) Euphytica 98: 183-187.

20. Young, J.B. S.S., Virmani. 1984. Inheritance of fertility restoration in a rice cross. Rice Genetic News. 1: 102-103.
21. Zhou, T. 1983. Analysis of R genes in hybrid indica rice of WA type. Agron. Sin., 9: 241-247.
22. Zhang, G., T.S. Bharaj, S.S. Virmani and N. Huang. 1997. Mapping of the Rf-3 nuclear fertility restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. Theo. Appl. Genet., 94: 27-23.

Identification of Fertility Restorer Lines in a Number of Iranian Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.), Using STS Markers

A. Yazdanpanah[1], N.A. Babaeian Jelodar[2], G. Nematzadeh[2], N.A. Bagheri[3] and R. Talebi[4]

Abstract

In order to identify restorer lines in hybrid rice system, sixty lines and cultivars were studied. Two STS makers of RG140 that is linked to Rf_3 locus on chromosome 1 and S10019 that is linked to Rf_4 locus on chromosome 10 were used to screen restorer line .Then, after digestion with two restriction-enzymes (*EcoR*I and *Fnud*II), the results showed that 27 lines had Rf_3 gene, 3 lines had Rf_4 gene and 20 lines had both fertility restorer genes (Rf_3 and Rf_4) with more than 85 percent fertility based on phenotypic test. Therefor these lines can be used as restorer lines in hybrid rice seed production. However the other lines with less than 85 percent field fertility can not be used as restorers.

Keywords: Fertility Restorer, Rice (*Oryza sativa* L.), STS markers

1- Former M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
4- Assistant Professor, Azad University Sanandaj branch