

کرده و به مدت ۲۴ ساعت داخل یخچال نگهداری شدند.

نشان‌گرهای STS

نشان‌گر S_{10019} هم‌بسته با ژن Rf_4 روی کروموزوم ده و نشان‌گر $RG140$ هم‌بسته با ژن Rf_3 روی کروموزوم ۱ قرار دارند (۱۷).

نشان‌گر SSR

تعداد ۲۰ نشان‌گر در والدین برای مشاهده چند شکلی آزمایش شده‌اند و پس از مشاهده چندشکلی در جمعیت F_2 برای امتیازبندی مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و واکنش هضم آنزیمی طبق روش ستاری و همکاران انجام گرفت (۱۷). واکنش زنجیره‌ای در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل mM $MgCl_2$ ، mM 2 و PCR Buffer $1 \sim 2$ ، mM NTP $0.25 \sim 1$ از آنزیم تک پلی‌مراز بود. شرایط PCR برای نشان‌گر S_{10019} به صورت یک چرخه ۹۴ دقیقه در ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه (۹۴ درجه برای ۱ دقیقه، ۵۸ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه) و ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه بود.

توالی‌های محصول واکنش PCR برای شناسایی لاین عقیم از بارور با آنزیم‌های مربوطه هضم شدند. برای هضم آنزیم نشان‌گر S_{10019} از آنزیم $BSTUI$ و نشان‌گر $RG140$ از آنزیم $PVUII$ استفاده شد. محصولات واکنش PCR پس از مشاهده باند مورد نظر، برای شناسایی لاین عقیم از بارور با آنزیم‌های مربوطه هضم شدند. واکنش هضم آنزیمی شامل ده میکرولیتر از محصول پی سی آر، $7/7$ میکرولیتر آب مقطر استریل، دو میکرولیتر از بافر آنزیم، $0/3$ از آنزیم مربوط استفاده شد. برای هضم آنزیمی نشان‌گر S_{10019} از آنزیم $BSTU$ استفاده شد و هضم واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

محصول هضم آنزیمی به ژل آگارز دو درصد با ولتاژ ۶۰ برده شدند و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. تعداد ده نشان‌گر در والدین برای مشاهده چند شکلی آزمایش شده‌اند و پس از مشاهده چندشکلی در جمعیت F_2 برای امتیازبندی مورد استفاده قرار گرفتند. شرایط PCR برای نشان‌گرهای SSR ، به صورت یک چرخه ۹۴ دقیقه در ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه (۹۴ درجه برای یک دقیقه، ۵۵ درجه برای یک دقیقه و ۷۲ درجه برای یک دقیقه) و ۷۲ درجه برای پنج دقیقه بود. محصولات PCR ، پس از دیدن باند مورد نظر در ژل آگارز، برای امتیازبندی به ژل آکریل آمید شش درصد دناچوره برده شدند. برای تهیه گروه لینکازی، از نرم‌افزار Join Map استفاده شد. فواصل نقشه براساس تبدیل نسبت نوترکیبی به سانتی مورگان تعیین شدند (۸).

اعاده‌کننده باروری مختلف را بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که لاین‌های اعاده‌کننده باروری ایندیگای $Milyang46$ و $H804$ دارای دو آلل اعاده‌کننده باروری غالب می‌باشد، اما لاین‌های اعاده‌کننده باروری ژاپونیکای $H921$ و $T984$ یک آلل اعاده‌کننده باروری دارند. هرچند نتایج گزارشات مختلف نشان می‌دهد که باروری $CMS-WA$ از طریق یک یا دو جفت آلل اعاده‌کننده باروری کنترل می‌شود که در لاین‌های اعاده‌کننده باروری مختلف وجود دارند (۱۴، ۷، ۲).

این آلل‌ها به صورت پیوسته یا مستقل در لاین‌های اعاده‌کننده باروری مختلف عمل می‌کنند (۷، ۲). در دسترس بودن نقشه‌های مولکولی اشباع شده، به ویژه نقشه ژنوم برنج با نشان‌گرهای SSR اشباع شده (۱۳) و تکنیک‌های کارآمد تعیین نشان‌گر DNA ، یافتن مکان آلل‌های اعاده‌کننده باروری در برنج را بسیار مؤثر و دقیق امکان‌پذیر ساخته است.

جینگ و همکاران (۷)، دریافتند که مکان Rf_4 در $IR24$ با نشان‌گر $RM171$ ($OSR33$) و $RM228$ روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ به ترتیب با فاصله ژنتیکی $3/7$ و $3/4$ سانتی‌مورگان قرار دارد.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa L.*) مورد استفاده در این مطالعه شامل لاین نرعیقیم سیتوپلاسمی ($IR58025A$) که این لاین از منبع سیتوپلاسمی نوع WA^1 می‌باشد و لاین برگرداننده باروری به نام WA^2 می‌باشد، که در طرح تحقیقاتی تولید برنج هیبرید مورد استفاده قرار می‌گیرند. گیاهان مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. در زمانی که گیاهان در مرحله ۴ برگ‌گی بودند، از برگ‌ها نمونه‌برداری شد و استخراج DNA ژنومی از گیاهان با استفاده از روش $CTAB$ تغییریافته استخراج شد (۱۵). مقداری از برگ‌های پودر شده به تیوب‌های $1/5$ میلی‌متری منتقل شده و سپس مقدار 550 میکرولیتر بافر استخراج به آن اضافه شد. مقدار 30 میکرولیتر از SDS (۲۰٪) به آن‌ها اضافه و پس از عمل ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آب گرم 65 درجه قرار گرفتند. پس از آن 92 میکرولیتر $NaCl$ 5 مولار و مقدار 75 میکرولیتر $CTAB$ اضافه و به مدت 15 دقیقه داخل حمام آب گرم 65 درجه قرار گرفتند و پس از اضافه کردن کلروفرم دو فاز تشکیل و فاز رویی برداشته شده و به تیوب جدید منتقل شد و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شده و پس از عمل رسوب‌دهی به مدت ده دقیقه در 12000 دور در دقیقه و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. رسوب DNA با الکل 70% شسته و پس از خشک شدن، رسوب یا کلاف DNA را با 100 میکرولیتر TE حل

نتایج و بحث

از نشان گر RM243 نیز برای تعیین همبستگی با ژن برگرداننده باروری روی کروموزوم یک استفاده شد و پس از مشاهده آن روی ژل اکریل امید و تجزیه آن، همبستگی کمتری با ژن برگرداننده باروری نشان داد. در آنالیز حاصل از گروه بندی نرم افزار Join map نشان گرهای RM302، RM580، نسبت کای اسکور ۱:۲:۱ آنها معنی دار نشده اند. ولی نشان گرهای RM243، RM490، RM23 به همراه نشان گر STS (RG140) در یک گروه لینکاژی، گروه بندی شدند (شکل ۵). روی کروموزوم ده نیز نشان گرهای RM258، RM269، RM3510، RM271، RM294 هیچ چندشکلی نشان ندادند در حالی که نشان گرهای RM244، RM171، RM311 چندشکلی نشان دادند. نشان گر RM228 نیز در والدین پلی مورفیمی نشان داد ولی نسبت کای اسکور آن معنی دار نشد. نشان گرهای RM244 و RM311 با استفاده از نرم افزار Join map در یک گروه لینکاژی، گروه بندی شدند ولی نشانگر RM171 با استفاده از نرم افزار Join map در گروه جدا گروه بندی شد که شاید دلیل بر فاصله بیشتر از ۵۰ سانتی مورگان بین آنها باشد و نهایتاً نقشه کروموزومی ۱۰ به دست آمد (شکل ۵). فاصله ژن باروری Rf₄ با نشان گر RM244، ۷ سانتی مورگان تعیین شد. روی کروموزوم دو نیز نشانگرهای RM307 و RM401 استفاده شد و نسبت کای اسکور هیچ کدام معنی دار نشد. شناسایی مورفولوژیکی باروری گیاهان نیاز به هزینه وقت و زمان زیادی است، لیکن انتخاب به کمک نشانگر راه حل مناسبی برای شناسایی لاین های عقیم از بارور و صرفه جویی اقتصادی از نظر هزینه و زمان می باشد. به این برای، انتخاب به کمک نشان گر در اصلاح گران نباتات کاربرد فراوانی دارد. عمده ترین نشان گرهای مورد استفاده در انتخاب به کمک نشان گر، نشان گرهای مولکولی می باشند. یافتن نشان گر مولکولی پیوسته با ژن مورد نظر، در شناسایی مولکولی لاین های عقیم از بارور، لازم و ضروری می باشد. از این رو، تهیه نقشه ژنتیکی از راه های مورد استفاده در پیدا کردن نشان گر پیوسته با ژن مورد نظر می باشد. از آن جا که بیشترین لاین های عقیم برنج مورد استفاده در ایران از نوع سیتوپلاسم WA می باشند، در این مطالعه، ژن (های) برگرداننده باروری در این نوع از سیتوپلاسم مکان یابی شدند و نشان گرهای پیوسته با ژن برگرداننده باروری، معرفی شدند. از نشان گرهای پیوسته با ژن برگرداننده باروری (Rf₃) روی کروموزوم یک، نشان گر STS، RG140 به فاصله یک سانتی مورگان و نشان گر RM490 به فاصله ۱۵ سانتی مورگان از ژن برگرداننده باروری Rf₃ شناسایی و روی کروموزوم ده نیز، نشان گر RM244

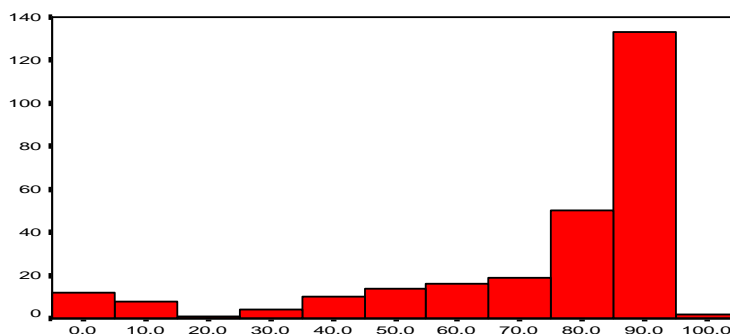
توزیع باروری گیاهان براساس باروری دانه گرده در جمعیت F₂ در نمودار ۱ نشان داده شده است. بررسی تفکیک باروری جمعیت F₂ (آمل-۲ × IR58025A) از طریق بررسی درصد باروری دانه گرده نشان داد که ۱۴۳ گیاه بارور، ۶۱ گیاه نیمه بارور، ۵۵ گیاه نیمه عقیم و ۱۱ گیاه کاملاً عقیم بودند. برای فهمیدن چند ژنی بودن از آزمون کای اسکور استفاده شد. این آزمون نسبت ۹ (کاملاً بارور)، ۳ (نیمه بارور)، ۳ (نیمه عقیم)، ۱ (کاملاً عقیم) ($X^2_{115} = 2.18$) و یا نسبت ۱۵ (بارور) : ۱ (عقیم) ($X^2_{133,9} = 5.06$) را برای درصد باروری دانه گرده تأیید کرد. لذا می توان نتیجه گرفت که صفت برگرداننده باروری در رقم آمل-۲ دو ژنی است و دو ژن غالب و مستقل از هم هستند.

از نشان گرهای استفاده شده روی کروموزوم یک و ده، نقشه کروموزومی به دست آمد (شکل ۵). از آغازگر STS مورد استفاده (RG140) برای جمعیت F₂ حاصل از تلاقی IR58025A و آمل-۲، آغازگر RG140 چندشکلی بین والدین نشان داده (شکل ۳)، در حالی که نشانگر S10019 هیچ پلی مورفیمی بین والدین نشان نداد (شکل ۱).

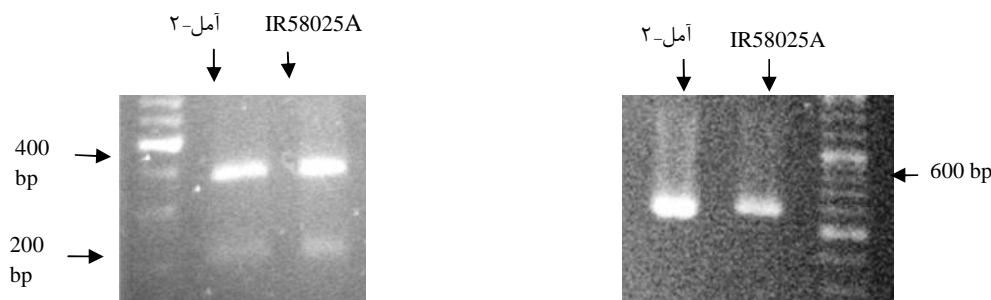
نشان گر RG140، در جمعیت F₂ حاصل از آمل-۲ و IR58025A قبل از هضم آنزیمی قطعات بانندی به اندازه تقریباً 1500 bp ایجاد کرد (شکل ۲) و پس از هضم آنزیمی قطعات بانندی به اندازه 1150 و 1250 bp ایجاد کرد (شکل ۳). آزمون کای اسکور نشان داد که ژن Rf₃ و RG140 روی یک کروموزوم بوده با هم پیوستگی دارند. نسبت ۱:۲:۱ برای ژن مورد نظر RG140 معنی دار نشده که نشان دهنده هم تفرقی آنهاست و نسبت کای اسکور ۰/۱ به دست آمده و با توجه به ۴۳ گیاه هتروزیگوت، ۲۳ گیاه والد مادری و ۲۴ گیاه والد پدری بیشترین همبستگی را با ژن باروری (Rf₃) نشان دادند. نشان گر RG140 در جمعیت مورد بررسی بین والدین چند شکلی نشان داد و با توجه به آنالیز انجام شده همبستگی بسیار بالایی با ژن برگرداننده باروری (Rf₃) نشان داده است و فاصله آن با ژن برگرداننده یک سانتی مورگان برآورد شد. از نشان گرهای مورد استفاده روی کروموزوم یک، RM490، RM243، RM580، RM23، RM84، RM302، RM128، RM104، RM237، RM128 بودند که فقط نشان گرهای RM580، RM243، RM490، RM23 چندشکلی نشان دادند. از دیگر نشان گرهای مورد استفاده روی کروموزوم ی، نشان گر RM490 بوده که پس از مشاهده چندشکلی در والدین، با استفاده از ژل اکریل امید تجزیه و تحلیل بانندی انجام شد (شکل ۴) و فاصله آن با ژن برگرداننده باروری ۱۵ سانتی مورگان برآورد شد.

به ترتیب شامل ۱۲۲ و ۱۹۷ گیاه، ژن برگرداننده باروری را با استفاده از نشان‌گرهای AFLP و RFLP نقشه‌یابی کرد. وی دو QTL^۱ را روی کروموزوم ۱۰ شناسایی و پیوسته با نشان‌گر C1361 معرفی کرد. علوی و همکاران (۱) در جمعیت حاصل از کراس Neda A (CMS) و IR36، شامل ۶ گیاه کاملاً عقیم و ۸۵ گیاه بارور ژن بازگرداننده باروری (Rf₃) را مکان‌یابی کردند. آنها نشانگرهای RG140 و RM1 را با فاصله‌های ۱۲/۵ و ۵/۶ سانتی‌مورگان از این ژن نقشه‌یابی و آنها را نشان‌گرهای مناسبی برای استفاده در انتخاب به کمک به نشان‌گر معرفی کردند. جینگ و همکاران (۷) در جمعیت حاصل از کراس بین IR64 و Zhensnan 97A نشان‌گر RM244 را با نسبت نوترکیبی ۱۶/۷٪ و به فاصله ۱۷/۳ سانتی‌مورگان از ژن برگرداننده باروری (Rf6(t)) روی کروموزوم ۱۰ مکان‌یابی کردند. آنها RM244 را نشان‌گر مناسبی برای استفاده در انتخاب به کمک نشان‌گر معرفی کردند.

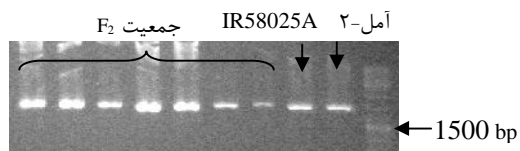
پیوسته با ژن برگرداننده باروری Rf₄ با فاصله هفت سانتی‌مورگان از این ژن، مکان‌یابی شدند و نشانگرهای مناسبی در انتخاب به کمک نشان‌گر، برای شناسایی لاین عقیم از بارور در این جمعیت معرفی شدند. ستاری و همکاران (۱۷) نشان دادند که تعیین نشان‌گر RG140 / PVU II قابل استفاده در غربال برای بازگرداندن باروری در سیتوپلاسم WA می‌باشد. تعیین نشان‌گرهای پیوسته می‌توانند برای استفاده در MAS به کار روند و نیز امکان کلون ژن بر اساس نقشه ژن‌های بازگرداننده باروری کمک را فراهم می‌کنند. نشان‌گرهای STS نشانگرهای اختصاصی هستند که می‌توانند در شروع برنامه اصلاحی برنج هیبرید برای شناخت لاین‌های جدید و برای بهبود کارایی MAS^۱ در لاین‌های برگرداننده بارور استفاده شوند. در بررسی دیگری، تنگ (۲۰) در دو جمعیت بک کراس (BC₁F₁) و F₂ حاصل از کراس IR13419-113-1/RD21A و RD21A/RD21A/IR24



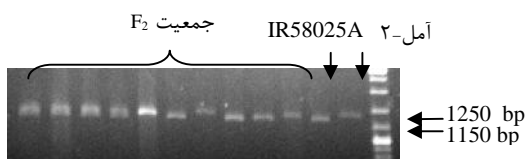
نمودار ۱- توزیع فراوانی گیاهان براساس درصد باروری دانه گرده در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی. آمل-۲ × IR58025A.



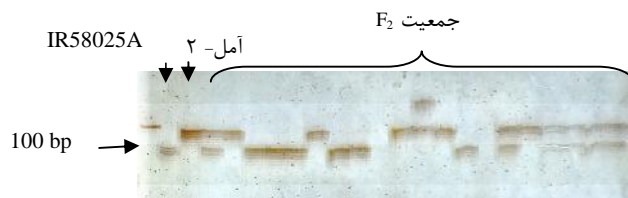
شکل ۱- قطعات باندهی حاصل نشان‌گر S₁₀₀₁₉ در والدین IR58025A و آمل-۲ پیش از هضم آنزیمی (الف) و پس از هضم آنزیم (ب).



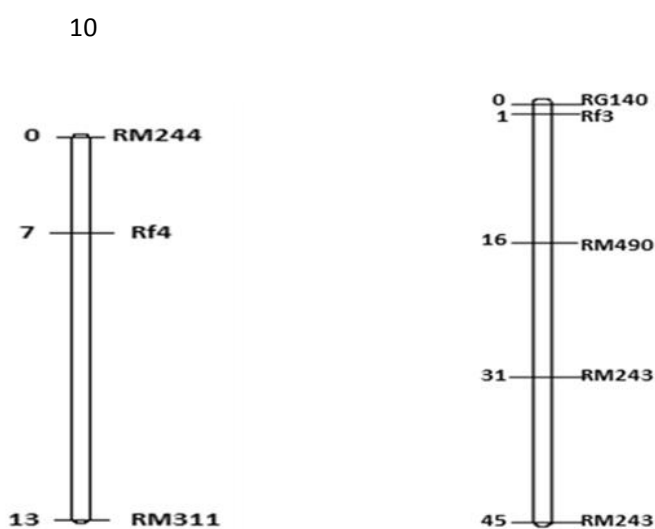
شکل ۲- قطعات بانندی حاصل از جمعیت F₂ حاصل از آمیخته IR58025A × Aml-2 به اندازه 1500 bp پیش از هضم آنزیمی.



شکل ۳- قطعات بانندی جمعیت F₂ حاصل از آمیخته IR58025A × Aml-2 با استفاده از نشانگر RG140 پس از هضم آنزیمی.



شکل ۴- قطعات بانندی جمعیت F₂ حاصل از آمیخته IR58025A × Aml-2 با استفاده از نشانگر RM490.



شکل ۵- نقشه کروموزوم‌های ۱ و ۱۰ برنج.

منابع

1. Alavi, M., A. Ahmadikhah, B. Kamkar and M. Kalateh. 2009. Mapping Rf3 locus in rice by SSR and CAPS markers. *International Journal of Genetics and molecular Biology*, 1: 121-126.
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. Budar, F. and G. Pelletier. 2001. Male sterility in plants, occurrence, determinism, significance and use. *Life Science*, 324: 543-550.
4. Fu, H.W. and Q.Z. Xue. 2004a. Analysis of restoring genes of three type of cytoplasmic male sterility in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2: 336-341.
5. Hu, J. and Z. Li. 1985. A primary studies on the inheritance of male sterility of rice male sterile lines with four different kinds of cytoplasm. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 4: 15-22 (In Chinese with an English abstract).
6. Huang, W., L. Wang, P. Yi, X.L. Tan, X.M. Zhang, Z.J. Zhang, Y.S. Li and Y.G. Zhu. 2006. RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS-rice. *Acta Genetica Sinica*, 33: 330-338.
7. Jing, R., X. Li, P. Yi and Y. Zhu. 2001. Mapping fertility restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 42: 167-171.
8. Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12: 172-175.
9. Li, Y.C. 1985. The pedigree analysis of the inheritance of the restoring gene in IR24 Science Agriculture Sinica, 1: 24-31 (In Chinese with an English abstract).
10. Li, Y.C. and L.P. Yuan. 1986. Genetic analysis of fertility restoration in male sterile lines of rice. In: IRRI, ed. *Rice Genetics. Proceedings International Rice Genet Symposium IRRI, Manila*, pp: 617-632.
11. Li, Z.B. and Y.G. Zhu. 1986. Rice male sterile cytoplasm and fertility restoration. In: *Hybrid Rice/Proceedings of the International Symposium on Hybrid Rice. International Rice Research Institute (IRRI), Manila*, pp: 85-102.
12. Longping, Y. 2004. Hybrid rice technology for food security in the world. 4th FAO Rice Conference. Rome, Italy.
13. McCouch, S.R., L. Teytelman, Y.B. Xu, K.B. Lobos, K. Clare and M. Walton. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9: 199-207.
14. Mishra, G.P., R.K. Singh, T. Mohapatra, A.K. Singh, K.V. Prabhu, F.U. Zaman and R.K. Sharma. 2003. Molecular mapping a gene for fertility restoration of Wild Abortive (WA) Cytoplasmic Male Sterility using a Basmati rice restorer line. *Plant Biochemistry & Biotechnology*, 12: 37-42.
15. Murray, M.G. and W.F. 1980. Thompson Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
16. Raj, K.G. and S.S. Virmani. 1988. Genetics of fertility restoration of WA type cytoplasmic male sterility in rice. *Crop Science*, 28: 787-792.
17. Sattari, M., A. Kathiresan, G.B. Gregorio, J.E. Hernandez, T.M. Nas and S.S. Virmani. 2007. Development and use of a two-gene marker-aided selection system for fertility restorer genes in rice. *Euphytica*, 153: 35-42.
18. Shen, Y., Q. Cai, M. Gao and X. Wang. 1996. Isolation and genetic characterization of fertility restoring revertant induced from cytoplasmic male sterile rice *Euphytica*, 90: 17-23.
19. Tan, Y.P., S.Q. Li, L. Wang, G. Liu, J. Hu and Y.G. Zhu. 2008. Genetic analysis of fertility restorer genes in rice. *Biologia Plantarum*, 52: 469-474.
20. Teng, L.S. and Z.T. Shen. 1994. Inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in rice. *Rice Genetics, Newsletter*, 11: 95-97.
21. Wang, S.L. 1980. Study on inheritance of restoring factor and approach of developing new restorer in rice *Agricultural Science and Technology of Hunan*. 4: 1-4 (In Chinese with an English abstract).
22. Yao, F.Y., C.G. Xu, S.B. Yu, J.X. Li, Y.J. Gao, X.H. Li and Q. Zhang. 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.

Gene Mapping of Fertility Restorer Gene(s) in Rice using STS and SSR Markers

Bahareh Koshkholgh¹, Nad Ali Babaeian Jelodar² and Nad Ali Bagheri³

1- M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Corresponding author: bahare.khoshkholgh@yahoo.com)

2 and 3- Professor and Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: September 27, 2011

Accepted: May 28, 2012

Abstract

Hybrid technology is very successful in increasing rice yield. Genetic map of fertility restorer genes using STS markers linked to fertility gene in F₂ population from parental plants (IR58025A) and Amol-2 in rice was studied. Present work was conducted in biotechnology laboratory of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University in 2010. In current study 20 SSR markers and two STS marker were used. RG140, RM49, RM243, RM23, RM302, RM580, RM244, RM311, RM171 and RM228 showed polymorphism, while, RM128, RM104, RM258, RM84, RM269, RM3510, RM271, RM294, S10019 did not showed polymorphism. RG140, RM490, RM243 and RM23 by using Join Map Software have been grouped in one linkage group and RM244, RM311 in another group. The fertility gene was mapped between RG140 and RM490 with 1 cM distance to RG140 and the distance of fertility gene to RM490 was obtained 15 cM and the other gene (Rf₄) was mapped between RM244, RM311 with 7 cM distance to RM244.

Keywords: Fertility Restorer Genes, Rice, SSR Molecular Markers, STS Molecular Markers