غربالگري لاين‌هاي آلوپلاسميک برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از نشانگر مولکولي RAPD

س. ح. ر. هاشمي[۱]، ق. ع. نعمت‌زاده[۲]، س. م. علوي[۱] و م. اولادي[۳]

چکيده

در سيستم سه لايني توليد بذر هيبريد برنج، بخش اعظمي از ناخالصي ژنتيکي در مرحله تکثير و نگهداري لاين‌هاي نر عقيم سيتوپلاسمي (CMS) صورت مي‌گيرد، در نتيجه بذور لاين‌هاي CMS با بذور لاين‌هاي نگهدارنده (B) اختلاط مي‌يابند. در اين راستا انگشت‌نگاري لاين‌هاي اصلاحي و شناسايي نشانگرهاي اختصاصي، پيش زمينه آزمون خلوص ژنتيکي اين لاين‌ها است. بدين منظور شش لاين نر عقيم سيتوپلاسمي شامل ندا A، نعمت A، دشت A، چمپا A، آمل۳ A و IR58025A به همراه شش لاين نگهدارنده باروري با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD مورد تجزيه و تحليل قرار گرفتند. به دليل زمينه ژنتيکـي مشابه لاين‌هاي CMS و نگهدارنده، لاين‌هاي ايزوژن در اکثر مکان‌هاي نشانگري از الگوي باندي يکساني برخوردار بودند. در اين پژوهش تنها در مورد آغازگرهاي OPH20 و OPH01 به ترتيب قطعه ۹۵۰ و ۸۵۰ نوکلئوتيدي شناسايي گرديدند که قادر به تمايز لاين‌هاي CMS و لاين‌هاي B از يکديگر مي‌باشند يعني لاين‌هاي CMS داراي باندهاي اختصاصي بوده، در حالي که لاين‌هاي نگهدارنده فاقد قطعه مذبور مي‌باشند. جهت بررسي ماهيت هسته‌اي يا سيتوپلاسمي بودن اين باندها، قطعه OPH20-950 bp از لاين‌هاي ندا A و IR58025A جداسازي و با استفاده از سيستم T/A در باکتري Escherichia coli سويه DH5α همسانه‌سازي و نهايتاً تعيين ترادف گرديدند. آناليزهاي همرديفي قطعه مورد نظر با توالي موجود در بانک ژن، نشان‌دهنده همولوژي ۹۵ درصدي با توالي ژنوم ميتوکندريايي بود. تحقيقا از نتايج اين مطالعه مي‌توان در شناسايي و بررسي خلوص ژنتيکي لاين‌هاي CMS (نوع WA) استفاده نمود.

واژه هاي کليدي: برنج، RAPD، لاين نر عقيم سيتوپلاسمي، آزمون خلوص ژنتيکي، ميتوکندري

۱- کارشناس ارشد پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي ساري
۲- استاد دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي ساري
۳- کارشناس پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي ساري

مقدمه

از آنجا که برنج غذاي اصلي نيمي از جمعيت جهان مي باشد، توليد جهاني آن نيز بايد تا سال ۲۰۳۰، به ميزان ۴۰ درصد افزايش يابد تا بتواند جوابگوي نيازهاي جمعيت رو به رشد باشد (۱۳). با توجه به محدوديت هاي اقليمي براي رشد و توسعه زمين هاي زير کشت اين مقدار غذا بايد از زمين هاي موجود و با استفاده کمتر از عوامل اگروشيميايي به دست آيد. پي از معرفي و تکثير برنج هيبريد در چين، توليد ارقام هيبريد به عنوان يک گزينه تکنولوژيکي قابل اجرا براي استفاده از پديده هتروزيس و شکستن سقف عملکرد ژنتيکي در اقصي نقاط جهان مورد توجه قرار گرفت. از آنجايي که برنج گياهي تقريبا خودگشن است، جهت توليد تجاري بذر هيبريد برنج بايد از سيستم هاي نرعقيمي استفاده شود. نرعقيمي به بيان ساده به عدم توانايي گياه در توليد دانه گرده فعال اطلاق مي گردد که توسط يک يا چند متقابل فاکتورهاي ژنتيکي که درون ژن هاي هسته اي و سيتوپلاسمي وجود دارد کنترل مي شود (۱۰). روي سه لايني بر مبناي نرعقيمي سيتوپلاسمي و سيستم بازگرداننده باروري است که در آن براي توليد بذر هيبريد از سه لاين نرعقيم سيتوپلاسمي[1] (CMS) يا A لاين، لاين نگهدارنده[2] يا B لاين و لاين بازگرداننده باروري[3] يا R لاين استفاده مي‌شود (۱۸ و ۱۹). در اين سيستم لاين نرعقيم حاوي فاکتورهاي کنترل کننده نرعقيمي (S) در سيتوپلاسم و آلل‌هاي مغلوب (rf) ژن‌هاي بازگرداننده باروري در هسته مي‌باشد. لاين نگهدارنده با لاين CMS ايزولاين بوده، به اين جهت که داراي ژن‌هاي مشابه هسته اي با لاين‌هاي CMS بوده و تنها در فاکتور سيتوپلاسمي (N) از آنها متفاوت مي باشد. لاين هاي B علاوه بر اين که خود بارور هستند، مي توانند جهت نگهداري و تکثير لاين هاي A به کار روند، زيرا زماني که با لاين هاي A تلاقي مي يابند منجر به حفظ عقيمي در اين لاين‌ها مي‌گردند. در حال حاضر در حدود ۹۵ درصد لاين‌هاي CMS موجود براساس سيتوپلاسم WA[4] مي باشند (آ) که نشان دهنده اهميت اين نوع سيتوپلاسم مي باشد. با توجه به اصلاح و معرفي ارقام بومي لاين هاي نرعقيم سيتوپلاسمي نظير ندا A، نعمت A، دشت A، چمپا A، آمل۳ A در گيلان (۱۲)، لزوم حفظ، نگهداري و تکثير آنها ضروري به نظر مي رسد. به طوري که همه ساله بايد ارزيابي هايي از نظر پايداري عقيمي دانه گرده، درصد دگرگشني و ديگر صفات مهم آلوگامي صورت گيرد. از اين گذشته با بررسي هاي به عمل آمده، لاين هاي B بيشترين گياهان خارج از تيپ[5] را در لاين هاي CMS تشکيل مي دهند. بنابراين حفظ خلوص ژنتيکي لاين‌هاي CMS براي بهره برداري از پتانسيل هتروزيس ضروري مي‌باشد (۸ و ۲۱). ارزيابي خلوص بذور هيبريد و لاين‌هاي والدين به طور معمول با استفاده از آزمون GOT[6] صورت مي گيرد که بر اساس ارزيابي خصوصيات مورفولوژيک و گلدهي در مرحله بلوغ مي‌باشد (۱، ۴، ۷ و ۱۷). با توجه به اين که بسياري از اين صفات چند ژني يا کمي بوده، در نتيجه

1- Cytoplasmic male sterile
2- Maintainer line
3- Restorer line
4- Wild abortive
5- Off-type
6- Grow out test

بروز آنها تحت تاثير عوامل محيطي تاثير مي يابد كه نياز به استفاده از روشي سريع تر با كارايي بالاتر و در عين حال هزينه و زمان كمتر از جمله نشانگرهاي مولكولي ضروري مي‌نمايد (۵، ۱۱ و ۲۰). در اين مطالعه از نشانگرهاي تصادفي RAPD به لحاظ عدم نياز به اطلاعات اوليه و قبلي در مورد توالي DNA هدف، همچنين سادگي و ميزان بالاي چند شكلي جهت شناسايي و تمايز ارقام آلوپلاسميک برنج استفاده گرديد.

در اين زمينه مي توان به تحقيقات آيچي و همكاران (۷) در شناسايي لاين‌هاي CMS و نگهدارنده برنج با استفاده از نشانگر RAPD اشاره نمود. بدين ترتيب كه آنها نه تنها لاين هاي B و CMS را در مرحله گياهچه اي تعيين مشخصه نمودند، بلكه توانستند سيتوپلاسم WA را از سيتوپلاسم DA[1] نيز تفكيک نمايند. سوفرامانين و همكاران (۱۷) نيز از نشانگرهاي RAPD جهت شناسايي دو لاين نرعقيم و نربارور سيتوپلاسمي استفاده نمودند و بيان كردند كه مي‌توان لاين‌هاي A و B را با استفاده از نشانگرهاي تصادفي معين از هم تفكيک نمود. تحقيق مشابه‌اي نيز توسط جنا و همكاران (۱۰)، راجندران و همكاران (۱۳) و راجندرا كومار و همكاران (۱۴) با استفاده از نشانگر مولكولي RAPD كه از منشا ميتوكندريايي برخوردار بود صورت گرفت. لازم بذكر است در شناسايي و تعيين اثر انگشت لاين‌هاي آلوپلاسميک خصوصا لاين‌هاي A و B عمدتا از نشانگرهايي با منشا سيتوپلاسمي نظير ميتوكندري يا كلروپلاست استفاده مي‌شود. كه در زمينه كاربرد نشانگرهاي DNA كلروپلاستي(cpDNA) براي تعيين خلوص ژنتيكي مي‌توان به تحقيقات كوآنژو و همكاران (۵) و سانگ و همكاران (۱۶) اشاره نمود. هدف از تحقيق حاضر غربال لاين‌هاي آلوپلاسميک برنج با استفاده از نشانگرهاي مولكولي مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌هاي گياهي

در مطالعه حاضر از پنج لاين نرعقيم سيتوپلاسمي برنج شامل ندا A (۱)، نعمت A (۳)، دشت A (۵)، چمپا A (۶)، آمل۳ A (۹)، پنج لاين نگهدارنده باروري شامل ندا B (۲)، نعمت B (۴)، دشت B (۷)، چمپا B (۸)، آمل۳ B (۱۰) تهيه شده از پژوهشكده برنج و مركبات، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري به همراه دو لاين IR58025A (۱۱) و IR58025B (۱۲) تهيه شده از موسسه تحقيقات بين‌المللي برنج (IRRI) استفاده گرديد (اعداد داخل پرانتز نشاندهنده شماره ژنوتيپ‌ها بر روي ژل آگارز مي‌باشد). جهت دست‌يابي به بوته‌هاي صد در صد عقيم، آزمون تست دانه گرده بر روي لاين‌هاي نرعقيم با محلول يديد يدور پتاسيم يد درصد ($KI-I_2$) صورت گرفت. نمونه‌هايي كه در آن دانه‌هاي گرده از رنگ‌پذيري تيره و توپر برخوردار بودند به عنوان بوته‌هاي بارور و نمونه‌هايي كه دانه‌هاي گرده به صورت روشن و چروكيده رنگ‌پذيري داشتند، به عنوان بوته‌هاي ۱۰۰% عقيم در نظر گرفته شدند.

1- Dwarf abortive

ĜȝȜ و ǨǐǌȚ RAPD

استخراج DNA ژنومي به روش دلاپورتا و همکاران صورت گرفت (۳). کميت و کيفيت نمونه‌هاي DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر تعيين گرديدند. غربال مولکولي شش لاين نرعقيم سيتوپلاسمي (CMS) به همراه شش لاين نگهدارنده باروري (B لاين) با استفاده از تعداد ۲۵ آغازگر RAPD (Alpha DNA, Montreal, Canada) صورت گرفت (جدول ۱). هر واکنش ۱۲/۵ ميکروليتري عبارت بود از ۴/۹۵ ميکروليتر آب مقطر استريل، ۱/۲۵ ميکروليتر بافر واکنش (10X)، ۱/۳ ميکروليتر کلريد منيزيم ۲۵ ميلي مولار، ۰/۱۲۵، ۰/۷۲۵ ميکروليتر آغازگر ۵ ميکرومولار، يک واحد تک پلي مراز و ۴ ميکروليتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در ميکروليتر. واکنش زنجيره اي پلي مراز با پروفايل دمايي ۴ دقيقه در ۹۴ درجه، ۴۰ سيکل (۱ دقيقه ۹۲ درجه، ۱ دقيقه ۳۲ درجه و ۲ دقيقه ۷۲ درجه) و تکثير نهايي در ۷۲ درجه سانتيگراد به مدت ۱۰ دقيقه در دستگاه ترموسايکلر (MJ Mini, Bio-Rad, USA) اجرا گرديد. مشاهده الگوي نواري محصولات تکثيري بر روي ژل آگارز ۱/۸ درصد و رنگ‌آميزي اتيديوم برومايد (0.5 mg/ml) صورت گرفت.

همسانه‌سازي باند ۹۵۰ جفت بازي OPH20

جهت همسانه‌سازي باند ۹۵۰ جفت بازي OPH20 در باکتري Escherichia coli سويه DH5α، ابتدا قطعه مورد نظر از ژل آگارز MS (Roche Diagnostics GmbH, Germany) جداسازي گرديد. خالص‌سازي قطعه DNA با استفاده از کيت تخليص High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics GmbH, Germany) صورت گرفت. تعيين کميت و کيفيت محصول خالص سازي شده با استفاده از ژل آگارز ۱% و دستگاه اسپکتروفتومتر (Biophotometer, Eppendorf, Germany) اجرا گرديد. در اين تحقيق جهت همسانه سازي قطعه مورد نظر از سيستم T/A وکتور استفاده گرديد که نيازمند به پايانه منتهي به $3'$-dA براي اتصال به پلاسميد مي باشد (۲). جهت افزودن آدنين به دو انتهاي فرآورده PCR، واکنش زنجيره اي پلي مراز با پروفايل دمايي ۳۰ دقيقه در ۷۲ درجه در دستگاه ترموسايکلر اجرا گرديد. هر واکنش ۱۲/۵ ميکروليتري عبارت بود از ۴/۹۵ ميکروليتر آب مقطر استريل، ۱/۲۵ ميکروليتر بافر واکنش (10X)، ۱/۳ ميکروليتر کلريد منيزيم ۲۵ ميلي مولار، ۰/۱۲۵ ميکروليتر dATP ۲۰ ميلي مولار، ۰/۷۲۵ ميکروليتر آغازگر ۵ ميکرومولار، يک واحد تک‌پلي مراز و ۴ ميکروليتر فراورده تخليص شده PCR با غلظت ۴۰ نانوگرم. قطعه موردنظر با توجه به پايانه منتهي به $3'$-dA اضافه شده به انتهاي آن با استفاده از کيت InsTAclone™ PCR Cloning (MBI Fermentas, Lithuania) توسط ليگاز T4 در پلاسميد خطي pTZ57R/T وارد گرديد و در ادامه پلاسميدهاي نوترکيب به سلول‌هاي مستعد

باکتري Escherichia coli سويه DH5α (JM107) انتقال داده شدند. محصول واکنش ترانزيش جهت همسانه‌سازي روي محيط کشت LB حاوي آمپي سيلين، Xgal و IPTG قرار داده شد. جهت غربال پلاسميدهاي حامل قطعه موردنظر، کلوني‌هاي سفيد رنگ انتخاب و با استفاده از روش غربال سريع[1] (۱۵)، پلاسميدهاي حاوي قطعه موردنظر شناسايي گرديدند. جهت تاييد صحت کلون‌هاي غربال شده، کلون‌هاي انتخابي با استفاده از Colony PCR مورد بررسي قرار گرفتند. در نهايت با استفاده از آغازگرهاي استاندارد M13 در دستگاه Prism-ABI 3730 XL-PerkinElmer توالي‌يابي گرديدند. همولوژي توالي با استفاده از الگوريتم BLASTn با استفاده از وبگاه مرکز ملي اطلاعات بيوتکنولوژي[2] بررسي گرديد. همرديفي توالي DNA نيز با استفاده از نرم افزار ClustalW2 صورت گرفت.

جدول ۱- فهرست آغازگرهاي RAPD مورد استفاده در شناسايي لاين‌هاي آلوپلاسميک برنج

آغازگر	توالي	آغازگر	توالي
OPH 01	GGTCGGAGAA	OPH 18	GAATCGGCCA
OPH 02	TCGGACGTGA	OPH 19	CTGACCAGCC
OPH 03	AGACGTCCAC	OPH 20	GGGAGACATC
OPH 06	ACGCATCGCA	OPA 02	TGCCGAGCTG
OPH 07	CTGCATCGTG	OPA 03	AGTCAGCCAC
OPH 09	TGTAGCTGGG	OPA 05	AGGGGTCTTG
OPH 10	CCTACGTCAG	OPA 06	GGTCCCTGAC
OPH 11	CTTCCGCAGT	OPA 07	GAAACGGGTG
OPH 12	ACGCGCATGT	OPA 08	GTGACGTAGG
OPH 13	GACGCCACAC	OPA 09	GGGTAACGCC
OPH 14	ACCAGGTTGG	OPA 11	CAATCGCCGT
OPH 16	TCTCAGCTGG	OPA 12	TCGGCGATAG
OPH 17	CACTCTCCTC		

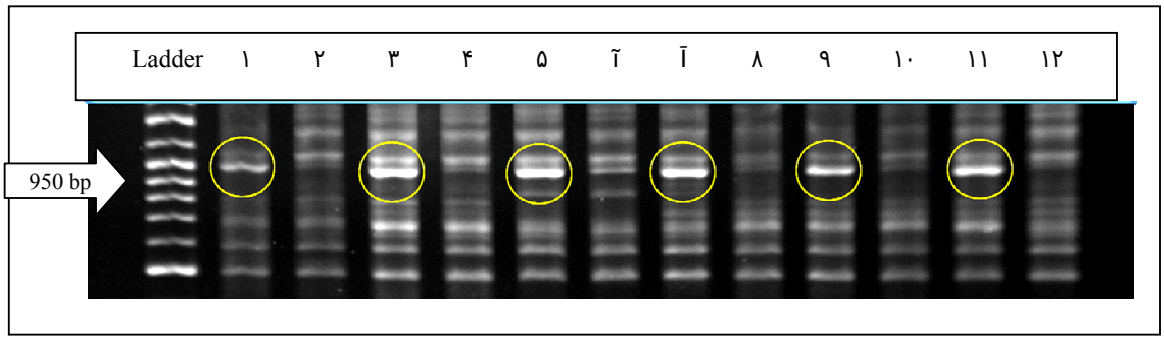
نتايج و بحث

بررسي چندشکلي موجود در لاين‌هاي نرعقيم و نگهدارنده با استفاده از آغازگر تصادفي RAPD صورت گرفت. در ابتدا جهت گزينش آغازگرهايي با الگوي باندي تکرارپذير و مشخص، گراديانت دمايي با استفاده از ۲۵ آغازگر بر روي دو ژنوتيپ ندا A و ندا B اجرا گرديد. با توجه به نتايج حاصل از گراديانت دمايي، ۱۷ آغازگر جهت غربال سيتوپلاسم لاين‌هاي نگهدارنده و نرعقيم انتخاب گرديدند. تعداد باندهاي توليد شده توسط هر آغازگر در دامنه‌اي از ۵ تا ۱۳ عدد متغّير بود و طول قطعات نيز در محدوده ۱۰۰ الي ۱۴۰۰ قرار داشت. نتايج بررسي واکنش زنجيره‌اي پلي مراز نشان مي دهد که اغلب باندهاي بدست آمده RAPD بين ارقام نرعقيم سيتوپلاسمي (لاين A) و ارقام نگهدارنده عقيمي (لاين B) مونومورف مي‌باشند. تحقيقاً اين چنين نتيجه به جهت ماهيت و زمينه ژنتيکي اين لاين‌ها دور از انتظار نمي باشد. لازم بذکر است نشانگر RAPD براي هر کدام از لاين‌هاي نگهدارنده ندا، نعمت، دشت، چمپا،

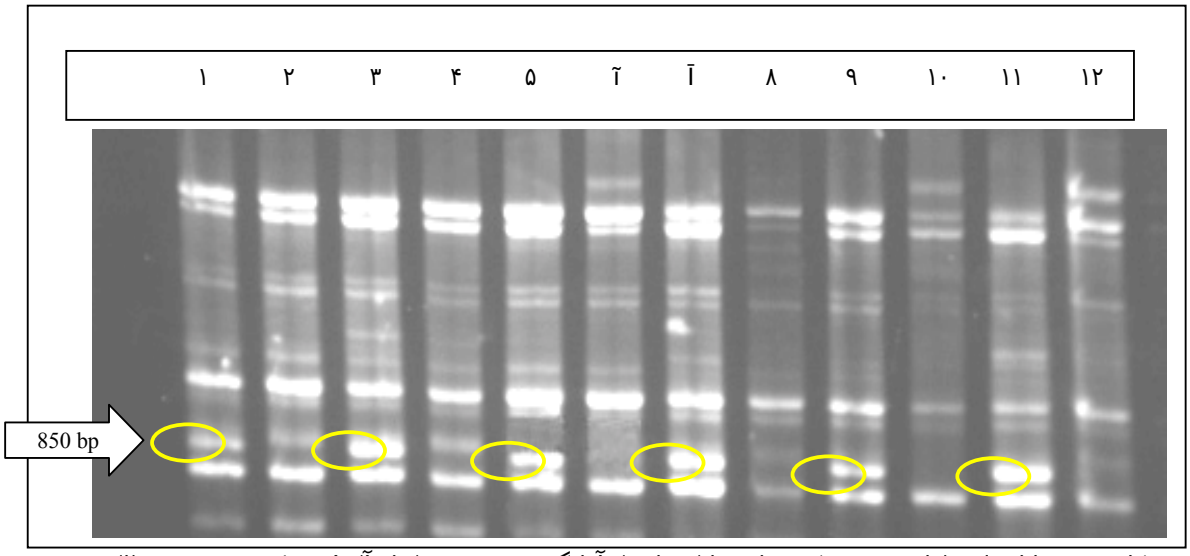
1- Rapid screen

2- Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genBank/index.html

آمل ۳، IR58025A و لاين‌هاي مادري‌شان الهر انگشت منحصر به فردي را توليد نمودند. در اين پژوهش نشانگرهاي OPH 20 و OPH01 از الگوي متفاوتي در لاين‌هاي CMS و نگهدارنده برخوردارند، و قادر به تمايز لاين‌هاي CMS و لاين‌هاي B از يکديگر بودند. در شکل ۱ پروفايل ژل آغازگر OPH20 نشان داده شده است که در آن لاين‌هاي CMS داراي باندي به اندازه 950 bp بوده، در حالي که لاين‌هاي نگهدارنده فاقد آن بودند در آغازگر OPH01 نيز لاين‌هاي CMS داراي باندي به اندازه 850 bp بوده، در حالي که لاين‌هاي نگهدارنده فاقد آن مي‌باشند که در شکل ۲ پروفايل ژل آن نشان داده شده است.

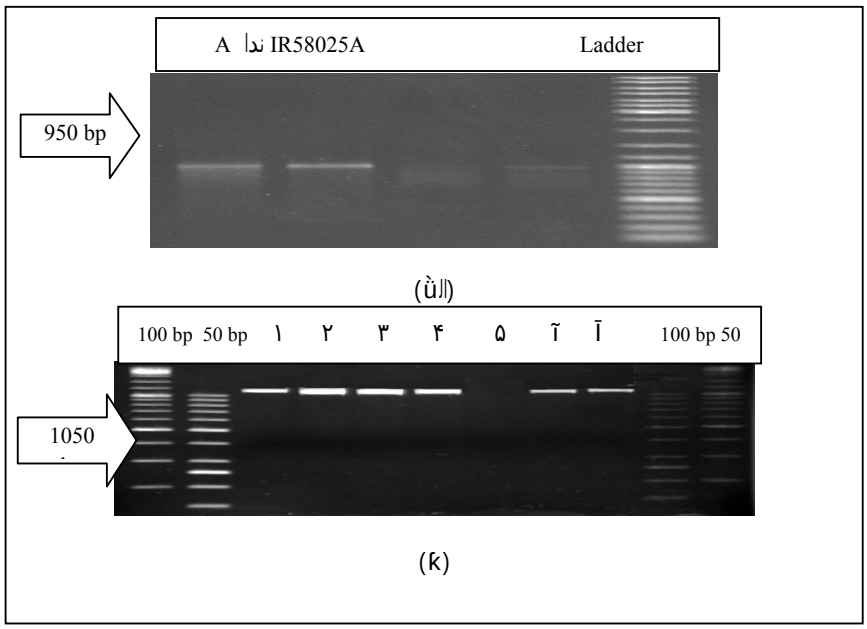


شکل ۱- پروفايل ژل قطعات DNA تکثير يافته با استفاده از آغازگر OPH 20 در ارقام آلوپلاسميک برنج مورد مطالعه
اعداد ۱ الي ۱۲ بترتيب نشاندهنده شماره ژنوتيپ‌ها است (رجوع شود به بخش مواد و روشها).



شکل ۲- پروفايل ژل قطعات DNA تکثير يافته با استفاده از آغازگر OPH 01 در ارقام آلوپلاسميک برنج مورد مطالعه
اعداد ۱ الي ۱۲ بترتيب نشاندهنده شماره ژنوتيپ‌ها (رجوع شود به بخش مواد و روشها) مي‌باشد.

جهت بررسي ماهيت هسته‌اي يا سيتوپلاسمي بودن باند شناسايي شده، قطعه OPH20-950 bp از لاين‌هاي ندا A و IR58025A جداسازي و در ادامه در باكتري Escherichia coli سويه DH5α همسانه‌سازي گرديد (شكل ۳، الف). جهت غربال پلاسميدهاي حامل قطعه موردنظر، كلوني‌هاي باكتري با استفاده از روش غربال سريع بررسي گرديدند. صحت كلون‌هاي غربال شده با استفاده از Colony PCR (شكل ۳- ج) نشان داده شده است. در نهايت محصول PCR كلون‌هاي انتخابي با استفاده از آغازگرهاي استاندارد M13 تعيين توالي گرديد كه در شكل ۴ همرديفي توالي‌هاي ندا A و IR58025A با توالي موجود در بانک ژن نشان داده شده است. با توجه به در دسترس بودن توالي كامل ژنوم ميتوكندري برنج، آناليز بيوانفورماتيكي توالي تعيين ترادف شده با استفاده از نرم‌افزار BLAST با ساير داده هاي مندرج در بانک ژن مربوط به برنج و ساير موجودات صورت گرفت. نتايج نرم‌افزار BLAST حاكي از همولوژي بالاي توالي فوق با توالي ژنوم ميتوكندريايي (همولوژي ۹۵%) بود. براي مقايسه توالي‌هاي مربوط به قطعه OPH20-950 bp با ساير داده‌هاي بانک ژن از نرم افزار CLUSTALW2 نيز استفاده شد.



شكل ۳- باند OPH20-950 تخليص شده از ژل آگارز (شكل الف). غربال كلون‌هاي انتخابي ندا A با استفاده از Colony PCR روي ژل آگارز ۱ درصد (شكل ج).

```
Database        ---AGACATCGT-TCCAGCTGATTCAAATACCTAACTAAGCGACCTGAATGGAAGGCTAA 56
IR58025A        GGGAGACATCGT-TCCAGCTGATTCAAATACCTAACTAAGCGACCTGAATGGAAGGCTAA 59
NedaA           GGGAGACATCGTGTCCAGCTGATTCATATACCTAACTAAGCGACCTGAATGGAAGGCTAA 60
                   ********* ************* **********************************

Database        CCAATGAATGAACTGTTCTCCCCAGCTGTTACGAACTATCAGATGGTCAAGAATTGACAG 116
IR58025A        CCAATGAATGAACTGTTCTCCCCAGCTGTTACGAACTATCAGATGGTCAAGAATTGACAG 119
NedaA           CCAATGAATGAACTGTTCTCCCCAGCTGTTACGAACTATCATATGGCCACGAATTGACAG 120
                ****************************************** **** ** **********

Database        GAATGAAGGGAATTGATTTCAGGGATCAGATAAAGAGGGAATTTATGAAATAAGAGTTAC 176
IR58025A        GAATGAAGGGAATTGACTTCAGGGATCAGATAAAGAGGGAATTTATGAAATAAGAGTTAC 179
NedaA           GAATGAAGGGAATTGATTTCAGGGATCAGATAAAGAGGGAATTTATGAAATAAGAGCTAC 180
                **************** ************************************** ***

Database        GAGAACAACTAGTCGAACAGAAGCATGAGTTAAGTGGTGTTGCTAACTTCCTTACTCATT 236
IR58025A        TAGAACAACTAGTAGAACAGAAGTCTGAGTTAAGTGGTGTTGCTAAATTCCTTACTCATT 239
NedaA           GAGAACAACTAGTCCGACGGAAGCATGAGTTAAGTGGTGTTGCTAACTTCCTTTCTCATT 240
                 ************   ** ****  ********************** ****** ******

Database        GTAGCTGCTTTGATGGGGGACATGGAAGGATTGAAATAACAAGAG--------------- 281
IR58025A        GTACCTGCTTCAATGGGGGACATGGAAGGATTGAAATAAAAAGAGAAAAAAAACAACGCC 299
NedaA           GTATATGCTTTGATGGGGGACATGGTATGATTGAAATAACAAGAGAACAAAAACAGCTCA 300
                ***  *****  ************* * *********** *****
```

شكل ۴- همرديفي توالي‌هاي ندا A و IR58025A با توالي موجود در بانک ژن براي تعيين درصد همولوژي آنها علامت * نشاندهنده نوكلئوتيدهاي مشابه و جاي خالي مبين عدم نوكلئوتيد مشابه در توالي مورد مقايسه مي‌باشد.

در اين تحقيق جهت شناسايي و تمايز لاين‌هاي آلوپلاسمیک برنج از نشانگر RAPD به جهت ماهيت تصادفي بودن و عدم نياز به توالي DNA ميتوكندري جهت اجراي PCR استفاده گرديد. غالب باندهاي مشاهده شده بين لاين CMS و لاين نگهدارنده در داخل ژن رقم، مونومورف بودند كه اين امر دور از انتظار نبوده است. لاين‌هاي نگهدارنده (B) با لاين‌هاي CMS، ايزولاين بوده، يعني داراي ژن‌هاي هسته‌اي مشابه با لاين‌هاي CMS بوده و تنها در فاكتور سيتوپلاسمي (N) متفاوت مي‌باشند (۱۸ و ۱۹). مهمترين مزيت نشانگر ارائه شده در اين تحقيق نسبت به نشانگر اختصاصي ارائه شده توسط ياشيتولا و همكاران، ماهيت چندگانه بودن (Multiplexing) الگوي باندي مذبور مي‌باشد بدين مفهوم كه نشانگر ميتوكندريايي (cms) ارائه شده توسط ياشيتولا و همكاران جهت استفاده نياز به تكرار با ژن نشانگر اختصاصي موجود در هسته سلول را دارد. در حالي كه نشانگر OPH20 به جهت ماهيت چندگانگي الگوي باندي RAPD، نه تنها نياز به نشانگر ديگر هسته‌اي را مرتفع مي‌سازد بلكه قطعه باندي ۹۵۰ جفت بازي آن نيز به جهت ماهيت ميتوكندريايي بودن امكان تفكيک سيتوپلاسم هاي لاين A و B را فراهم مي سازد كه در بررسي خلوص بذور عامل كليدي مي باشد. بروز ناخالصي در طي مراحل مختلف توليد بذور هيبريد به علت پراكندگي دانه گرده غيروالديني، دگر گرده افشاني ناخواسته و اختلاط فيزيكي، خصوصا اختلاط بذور لاين‌هاي A و B امري محتمل مي باشد كه مورد اخير به عنوان مهمترين منبع ناخالصي لحاظ مي گردد. به طوري كه برآورد مي‌شود به ازاي هر ۱% ناخالصي در بذور هيبريد، مقدار كاهش

عملكرد در حدود ۱۰۰ كيلوگرم در هكتار خواهد بود (۹). به طوري كه در گزارp ايTي و همكاران (۲) و راجندران و همكاران (۱۳) مقدار خلوص بذور هيبريد ارائه شده به gشاورز به ترتيب ٪۹۲ و ٪۹۸ اعلام گرديد. طبيعي است كه لاين‌هاي والديني مورد استفاده در توليد بذر هيبريد نيز بايد از سطT بالايي از خلوص ژنتيكي(٪۹۹≤) برخوردار باشند (۲۰). بر همين اساس gوموري و همĜاران (۹) گزارp نمودند كه لازمه توليد بذور هيبريد خالDŽ، داشتن پيش فرLJ صحيحي از مديريت خلـوص لاين‌هاي والديني خصوصا لاين‌هاي CMS مـي‌باشد. به همين منظور روp سريع مبتني بر PCR، براي بررسي خلوص ژنتيكي لاين‌ها ارائه گرديد. با توجه به اصلاح و معرفي ارقام بومـي لاين‌هاي نرعقيم سيتوپلاسمي در كشور، كنترل و گواهي بذور توليد شده به لحاظ خلوص ژنتيكي امري اجتناķناپذير مي‌باشد كه در اين زمينه نقش نشانگرهاي مولكولي بر كسي پوشيده نيست. توجه به نتاƓ حاصله از همرديفي توالي در بانک ژن نشان مي‌دهد مي‌توان باند OPH20-950 با منشا ميتوكندريايي را به عنوان نشانگر اختصاصي جهت شناسايي و آزمون خلوص ژنتيĢي لاين‌هاي CMS از لاين‌هاي نگهدارنده (B) معرفي نمود. در تحقيقات مشابه توسnj آيTي و همĜاران (۲) و سوفرامانين و همĜاران (۱۲) نيز، كاربرد نشانگر RAPD جهت تعيين اثرانگشت لاين هاي نرعقيم و نگهدارنده مورد تاييد قرار گرفت. نتايج اين بررسي مويد پتانسيل بالاي اين نشانگر در تشخيDŽ بذور خارƓ از تيŘ لاين‌هاي نگهدارنده (B) در لاين‌هاي CMS مورد بررسي بوده كه امكان بررسي خلوص بذور را در هر مرحله از رشد فراهم مي‌آورد. همTنين نشانگر مذبور مي‌تواند در برنامـه‌هاي كنترل و گواهي بذور لاين‌هاي آلوپلاسميک برنج مدنظر قرار گيرد.

سĜاگزاري و قدردانی

اين تحقيĀ با حمايت مالي پژوهشكده برنج و مركبات، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري به انجام رسيده است. بدين وسيله از مديريت و همكاران اين پژوهشكده قدردانـي به عمل مي‌آيد.

منابع

1. Ballestter, J. and M. Carmen. 1998. Determination of F_1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. Euphytica. 103: 223-226.
2. Clark, J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Nucl. Acids Res. 16 (20): 9677-9686.
3. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Tickes. 1983. A plant molecular DNA minipreparation version Π. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.
4. Garg, A., A.K. Singh, K.V. Prabhu, T. Mohapatra, N.K. Tyagi, N. Nandakumar, R. Singh and F.U. Zaman. 2006. Utility of a fertility restorer gene linked marker for testing genetic purity of hybrid seeds in rice (*Oryza sativa* L.). Seed Sci. Tech., 34: 9-18.
5. Guanghua, H., H. Lei, X. Yuehua, L. Xiaoying, N. Guoqing, Y.Y. Guangwei and P. Yan. 2003. A common sequence difference between cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines existing in rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast tRNA-Leu gene region. Euphytica. 131: 269-274.
6. Ichii, M., D.L. Hong, Y. Ohara, C.M. Zhao and S. Taketa. 2003. Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. Euphytica. 129: 249-252.
7. Jena K.K. and S.K. Pandey. 1999. DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. Hybrid Rice Newsl. 2: 13-14.
8. Jianhua, Z., M.B. Mcdonald and P.M. Sweeney. 1997. Testing for genetics purity in Petunia and Cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers. Hort Sci., 32: 246-274.
9. Komori, T. and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. Plant Breed. 123: 549-553.
10. Nancy, A.E. 2006. Cytoplasmic male sterility and fertility Restoration. The plant Cell. 18: 515-517.
11. Nandakumr, N., A. Singh, K. Sharma, R.K. Mohapara, T.K.V. Prabhu and F.U. Zaman. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. Euphytica. 136: 257-264.
12. Nematzadeh, G., A. JuharAli, M. Sattari, A. Valizadeh, E. Alinejad and M.Z. Nouri. 2006. Relation between different allogamic associated trait characteristics of the five newly developed cytoplasmic male sterile (CMS) lines in rice. Central Eur. Agric. J., 7: 49-56.
13. Rajendran, N., R. Gandhimani, S. Singh and K. Palchamy. 2007. Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica. 156: 129-139.
14. Rajendrakumar, P.P., A.K. Biswal, S.M. Balachandran, M.S. Ramesha, B.C. Viraktamath and R.M. Sundaram. 2007. A mitochondrial repeat specific marker for distinguishing wild abortive type cytoplasmic male sterile rice lines from their cognate isogenic maintainer lines. Crop Sci., 47: 207-211.
15. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning. New York: Cold Spring. Harbor Laboratory Press. p. 1-1688.
16. Sang, X., Z. Yang, B. Zhong, Y. Li, L. Hou, Y. Pei, G. Li and G. He. 2006. Assessment of purity of rice CMS lines using cpDNA marker. Euphytica. 152: 177-183.

17. Souframanien, J., J.G. Manjaya, T.G. Krishna and S.E. Pawar. 2003. Random amplified polymorphic DNA analyses of cytoplasmic male strils and male fertile Pigeon pea. Euphytica. 129: 293-299.
18. Virmani, S.S., C.X. Mao, R.S. Toledo, M. Hossain and A. Janaiah. 2002. Hybrid rice seed production technology and its impact on seed industries and rural employment opportunities in Asia. IRRI Technical Bull. p. 1-13.
19. Virmani, S.S., Z.X. Sun, T.M. Mou, A. Jauharali and C.X. Mao. 2003. Two-line hybrid rice breeding manual. Los Bonos (Philippinines), Internationahl Rice Research Institute. p. 1-88.
20. Yashitola J., R.M. Sundaram, S.K. Biradar, T. Thirumurugan, M.R. Vishnupriya, R. Rajeshwari, B.C. Viraktamath, N.P. Sarma and R.V. Sonti. 2004. A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. Crop Sci., 44: 920-924.
21. Yashitola, J., T. Thirumurugan, R.M. Sundaram, M.K. Naseerullah, M.S. Ramesha N.P. Sarma and R.V. Sonti. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. Crop Sci., 42: 1369-1373.

Screening of Rice (*Oryza sativa* L.) Alloplasmic Lines Via RAPD Molecular Markers

S.H. Hashemi[1], G.A. Nematzadeh[2], S.M. Alavi[1] and M. Oladi[3]

Abstract

In three-line system, cytoplasmic male sterile (CMS) lines often were contaminated with cognate iso-nuclear maintainer lines during seeds multiplication processes. Therefore fingerprinting of breeding lines and identification of line-specific markers are prerequisite in genetic purity test. Six CMS lines including Neda-A, Nemat-A, Dasht-A, Amol 3-A, Champa-A, IR58025A and their iso-nuclear maintainers were used in this study. Twenty-five random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers used for screening CMS lines and maintainer lines. The result indicated that the iso-gene lines had similar band patterns in most marker loci due to similar genetic background that present between CMS lines and co-maintainer lines. However two specific bands, 950 bp and 850 bp were produced by OPH20 and OPH01 primers that could uniquely recognize the CMS lines from their cognate maintainer lines, respectively. The genetic nature of OPH20-950 band was determinated by isolation of fragment from gel, clone to Escherichia coli bacteria via T/A cloning system, and was sequenced. A BLAST search of OPH20-950 sequence with GenBank indicated 95% homology to a rice mitochondrial DNA. These line-specific fragments could be used as a specific feature (scare marker) for characterization and genetic purity test of WA CMS lines.

Keywords: Rice, RAPD, Cytoplasmic male sterile lines, Genetic purity test, Mitochondri

1- M.Sc., Rice and Citrus Research Institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- B.Sc., Rice and Citrus Research Institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University