دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

نشانمند کردن ژن نرعقیمی حساس به دما (TGMS) در برنج رقم موتانت نعمت

محمد سیه چهره[۱]، غفار کیانی[۲]، مجید ستاری[۳]، سید کمال کاظمی‌تبار[۴] و سعید نواب‌پور[۵]

۱- دانش‌آموخته دکتری رشته اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: gh.kiani@gmail.com)
۳- عضو هیات علمی، موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران
۴- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۵- دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱
صفحه: ۱۶۴ تا ۱۷۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در برنج استفاده از نرعقیمی پیش شرط بهره برداری تجاری از هتروزیس است. دو سازوکار نرعقیمی تثبیت شده در برنج عبارتند از: نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی (CMS) که یک سازوکار سه لاینی است و نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط (EGMS). EGMS دارای دو نوع سازوکار است: PGMS و TGMS. لاین‌های TGMS وقتی طی مراحل شروع خوشه و گلدهی در دمای بالاتر از ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد باشند، عقیم می شوند. به‌منظور سرعت بخشیدن به توسعه لاین‌های TGMS در زمینه‌های ژنتیکی مختلف، انتخاب به کمک نشانگر (MAS) می‌تواند سرعت و دقت این انتقال را افزایش دهد. هدف از این پژوهش شناسایی محل کروموزومی ژن کنترل کننده صفت عقیمی TGMS و نشانگر SSR همبسته با این ژن در رقم نعمت TGMS می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش رقم نعمت TGMS با رقم فجر تلاقی داده شد تا جمعیت‌های F2 و BC1 برای انجام مطالعات ژنتیکی حاصل شوند. پس از استخراج DNA از ۱۴۲ ژنوتیپ و انجام PCR، نتایج مشاهده شده در نسل F1، F2 و BCF1 به خوبی بیانگر این بود که صفت TGMS در نعمت TGMS توسط یک ژن مغلوب کنترل می‌گردد. برای تعیین نشانگر همبسته با ژن TGMS از ۱۴ نشانگر SSR استفاده شد. فراوانی نوترکیبی بین نشانگرها و لوکوس TGMS با استفاده از حداکثر درست نمایی و با فرض اینکه همه افراد کاملا عقیم از نظر مکان TGMS هموزیگوت می باشند، تخمین زده شد. برای انجام آزمون پیوستگی یا استقلال مکان‌های ژنی بین نشانگرها و ژن TGMS از دو روش آزمون کای اسکویر ($\chi 2$) و مقیاس LOD بر اساس تجزیه تابع حداکثر درست نمایی انجام شد.

یافته‌ها: در بین نشانگرها، آغازگرهای RM110 و RM29 همبستگی بالایی با ژن TGMS داشتند (به‌ترتیب ۵/۷۴ و ۱۱/۶۳ سانتی مورگان). نشانگرهای مختلفی توسط محققین برای ژن TGMS بر روی کروموزوم ۲ گزارش شده است.

نتیجه‌گیری: استفاده از جهش در ایجاد عقیمی (TGMS) و تنوع در ژنوتیپ ارقام باعث شده تا نشانگرهای متفاوتی حتی برای یک ژن بخصوص گزارش شود. استفاده از نشانگری که همبستگی بالایی با این صفت داشته باشد (MAS) می‌تواند انتقال ژن TGMS را به ارقام دیگر تسهیل کند.

واژه‌های کلیدی : برنج، جمعیت‌های درحال تفکیک، نرعقیمی حساس به دما، نشانگر مولکولی

مقدمه

افزایش رشد جمعیت در چند دهه گذشته نیاز به تولید ارقام جدید با عملکرد بالا را بطور قابل توجهی افزایش داده است. در بین جوامع بشری، برنج به‌عنوان یکی از مهمترین غلات به شمار می‌رود. شناسایی و استفاده از ژن *sd1* (جهش نیمه پاکوتاه) در گندم در دهه ۱۹۵۰ منجر به انقلاب سبز شد که به رفع کمبود غذا در کشورهای در حال توسعه کمک کرد. توسعه و استفاده از هیبریدها برای چندین محصول کلیدی، مانند ذرت و برنج نیز سهم قابل توجهی در افزایش تولیدات کشاورزی جهانی داشت (۱۸). در برنج استفاده از نرعقیمی پیش شرط بهره برداری تجاری از هتروزیس است زیرا برنج یک محصول خودگرده افشان است. گیاهان نر عقیم یا گرده تولید نمی‌کنند و یا اینکه گرده آنها فاقد قدرت باروری است (۱۷). هتروزیس در برنج از اوایل سال ۱۹۲۶ مشاهده شد (۲۱،۹). با این حال، تلاش برای استفاده از فناوری هیبرید از سال ۱۹۶۶ توسط یوان لونگ-پینگ، پدر برنج هیبریدی، در چین آغاز شد (۳۵). شناسایی نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS[1]) نوع وحشی (WA[2]) در سال ۱۹۷۰ منجر به موفقیت در بهره برداری از هتروزیس در برنج هیبریدی شد. تولید بذر برنج هیبرید شامل استفاده از سازوکارهای نرعقیمی است. دو سازوکار نرعقیمی تثبیت شده در برنج عبارتند از: نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی (CMS) که یک سازوکار سه لاینی است و نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط (EGMS). فن‌آوری هیبرید سه لاینی مبتنی بر نرعقیمی سیتوپلاسمی-ژنتیکی (CMS) به راحتی می‌تواند عملکرد برنج را تا سقف ۱۵-۲۰ درصد نسبت به ارقام نیمه پاکوتاه با عملکرد بالا افزایش دهد. موفقیت در استفاده از برنج هیبریدی به میزان هتروزیس و کارایی تکنیک‌های تولید بذر بستگی دارد. یکی از عمده‌ترین محدودیت‌های پیش‌بینی شده برای تأمین هزینه تولید هتروزیس در برنج، وجود بذر با کیفیت در محدوده قیمت مقرون به صرفه است. در برنامه‌های تولید هیبرید سه لاینی (CMS) مشکلات مربوط به نگهداری لاین‌های نرعقیم A، عدم تنوع در لاین‌های A و R، و وجود ژن‌های باروری جزئی در لاین‌های B باید به طور مداوم برطرف شود که در نهایت منجر به پتانسیل پایین هتروزیس و هزینه‌های بالای تولید بذر در این سازوکار می‌شود. علاوه بر این، از آنجا که ارقام برنج japonica و برنج باسماتی ظاهراً حامل ژن‌های اعاده کننده (R) نیستند، تولید هیبرید با استفاده از لاین‌های japonica نیازمند به یک فرایند طولانی انتقال ژن R است (۴،۱۲،۱۵،۲۳،۲۶). EGMS به طور کلی دارای دو نوع سازوکار است: سازوکار دو لاینی نرعقیمی ژنتیکی حساس به طول روز (PGMS[3]) و نرعقیمی ژنتیکی حساس به گرما (TGMS[4]). به‌طور کلی، لاین‌های TGMS وقتی طی مراحل شروع خوشه و گلدهی در دمای بالاتر از ۲۵-۳۰

1- Cytoplasmic male sterility
2- Wild abortive
3- Photoperiod genetic male sterility
4- Termosensitive genetic male sterility

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]

درجه سانتی‌گراد باشند، عقیم می شوند. یونگ بین و همکاران (۳۲) با بررسی توالی DNA پی بردند که تغییر باز T به C (ترانزیشن) در ژن کدکننده پروتئین PHD-finger (OsMS1) باعث ظهور عقیمی می‌شود. درک کنترل ژنتیکی نرعقیمی ژنتیکی حساس به دما (TGMS) در برنج برای توسعه پایدار صنعت بذر برنج هیبرید در مناطق گرمسیری مهم است. علاوه بر این، سازوکار TGMS خطر آسیب پذیری ژنتیکی را کاهش می‌دهد زیرا تظاهر نرعقیمی به سیتوپلاسم وابسته نیست، بنابراین می توان هیبریدها را با زمینه‌های مختلف ژنتیکی تولید کرد. شناسایی و استفاده از آلل‌های مختلف TGMS در برنج، یک پایه ژنتیکی گسترده‌تر را برای توسعه برنج هیبرید فراهم می کند. به‌منظور سرعت بخشیدن به توسعه لاین‌های TGMS در زمینه‌های ژنتیکی مختلف، انتخاب به کمک نشانگر (MAS[1]) می‌تواند سرعت و دقت این انتقال را افزایش دهد. اما برای بهبود کارایی MAS، شناسایی نشانگری که بتوانند با صفت عقیمی همبسته باشد بسیار مهم است. نشانگرهای SSR می‌توانند سطح بالایی از تنوع آللی را شناسایی کنند و به صورت گسترده برای شناسایی تنوع ژنتیکی در برنج استفاده شده است. نشانگرهای SSR که به‌صورت همبارز هستند در تشخیص پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و تمایز بین ژنوتیپ‌ها از ژرم پلاسم های مختلف کارآمد هستند (۱۰). چندین ژن مربوط به EGMS مانند *tms1* (۲۹) ، *tms2* (۳۰)، *tms3* (۱۲،۲۵)، *tms4* (۴)، *tms5* (۸،۱۹،۲۹،۳۲) ، *tms6* (۱۳)، *tms7* (t) (۱۴) ، *tms8* (۶) ، *tms9* (۲۴) ، *tms9-1* (۲۱)، *tmsX* (۱۸)، *p/tms12-1* (۳۵) و *rtms1* (۷) تا به حال گزارش شده است.

هدف از این پژوهش شناسایی محل کروموزومی ژن کنترل کننده صفت عقیمی TGMS و نشانگر SSR همبسته با این ژن در رقم نعمت TGMS می‌باشد.

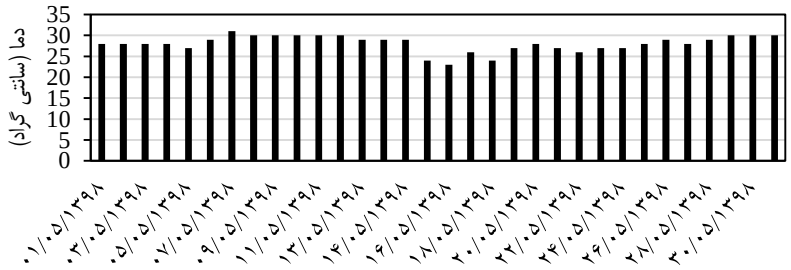
مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی آغازگرهای همبسته با ژن نرعقیمی حساس به دما (TGMS)، آزمایشی در موسسه تحقیقات برنج کشور (معاونت مازندران) واقع در شهرستان آمل با خصوصیات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۴۶ دقیقه شرقی و ارتفاع ۲۹/۸ متر از سطح دریا در طی سه سال انجام شد. در سال اول آزمایش رقم نعمت TGMS با رقم فجر تلاقی داده شد. در سال بعد بخشی از F_1های حاصل از این تلاقی با لاین TGMS تلاقی داده شدند تا جمعیت BC_1 تولید گردد و باقیمانده برای تولید F_2 مدیریت شدند. پس از به خوشه رفتن بوته‌های F_2 و BC_1 در سال سوم، ابتدا جمعیت از نظر خصوصیات ظاهری (عقیمی و باروری) مورد ارزیابی قرار گرفت. درجه حرارت مربوط به دوره رشد گیاه برنج در سال سوم آزمایش در شکل ۱ نشان داده شد. جهت انجام آزمایشات ژنتیکی و تعیین نشانگر(های) پیوسته با ژن مورد نظر و جایگاه ژنی، نمونه برگی از لاین‌های TGMS، رقم فجر و بوته‌های F_2 و BC_1 گرفته شد. در ابتداء برگها با استفاده از ازت مایع پودر گردیدند. سپس استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته انجام گرفت (۲۵). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، غلظت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و به حد ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رسانده شد PCR . در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه حراراتی مورد استفاده شامل ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشت سازی اولیه DNA و به دنبال آن ۳۵ چرخه به صورت ۴۵ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه دمای ۵۵ تا ۶۰ (بسته به تعداد و نوع باز در هر آغازگر) درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگرها و ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. اسامی نشانگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آمده است. دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد شناسایی کروموزوم دارای ژن عقیمی و تعیین محل این ژن بر روی کروموزوم با استفاده از نشانگرهای SSR انجام گرفت. تفکیک محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه با توان ۵۰ وات انجام گرفت. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم برماید به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت (۵). فراوانی نوترکیبی بین نشانگرها و لوکوس TGMS با استفاده از حداکثر درست نمایی (۱) و با فرض اینکه همه افراد کاملا عقیم از نظر مکان TGMS هموزیگوت می باشند، تخمین زده شد. برای انجام آزمون پیوستگی یا استقلال مکان‌های ژنی بین نشانگرها و ژن TGMS از دو روش آزمون کای اسکویر ($\chi 2$) و مقیاس LOD[2] بر اساس تجزیه تابع حداکثر درست نمایی[3] انجام شد. در آزمون کای اسکویر، فراوانی مشاهده شده با نسبت های مورد انتظار ۱:۲:۱ مقایسه شدند. در صورت فقدان پیوستگی بین ژن TGMS و نشانگر، باید در کلاس عقیم نسبت ۱ (نوار بارور): ۲ (نوار هتروزیگوت): ۱ (نوار عقیم) مشاهده شود. در روش LOD نیز نسبت لگاریتم تابع درست نمایی تحت فرض صفر (عدم پیوستگی نشانگر و ژن TGMS) به فرض یک (پیوستگی نشانگر و ژن TGMS) محاسبه می‌شود. اگر آماره LOD بزرگتر از ۳ باشد پیوستگی بین دو مکان ژنی قابل قبول است. اگر کمتر از ۲- باشد پیوستگی رد می‌شود و اگر بین ۲- و ۳ باشد قبل از نتیجه‌گیری باید مشاهدات بیشتری انجام گیرد. تبدیل مقادیر نوترکیبی به فواصل ژنتیکی نیز بر اساس تابع کوسامبی با استفاده از بوته‌های نرعقیم F_2 و BC_1 محاسبه شد (۱). برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

تابع فاصله کوسامبی $km= 0.25 \ln [(1+2r)/(1-2r)]$
فراوانی نوترکیبی = r

1- Marker assisted selection
2- Logarithm of odds
3- Maximum likelihood

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]



شکل ۱- نمودار درجه حرارت مربوط به دوره رشد گیاه برنج در سال زراعی ۱۳۹۸
Figure 1. Temperature diagram related to the growth period of rice plant in the 2019 crop year

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق
Table1. List of primers used in this research

Annealing temperature دمای اتصال	Backward sequence توالی برگشت	Forward sequence توالی رفت	Chromosome Number شماره کروموزوم	Primers آغازگرها
56	ggctaggagttaacctcgcg	gcgggagagggatctcct	2	RM279
56	ctcctcccgatcccaatc	caagaaacctcaatccgagc	2	RM341
56	tcctgtacgccgacgaggtcgag	tcgaagccatccaccaacgaag	2	RM110
56	aacgttggtcatatcggtgg	cagggacccacctgtcatac	2	RM29
56	tctttgacaagaggaaagaggc	ttttccttctcacccacttca	2	RM27
56	tccacgtcgatcgacacgacgg	agcgacgccaagacaagtcggg	2	RM174
56	gggatcaaaccacgtttctg	ctgatcgagagcgttaaggg	2	RM452
56	catcttcctctcttcggcac	cacactttccagtcctctcc	2	RM485
56	ccttttttcagtagccctccc	agcacccatgccttatgttg	2	RM423
56	cagcattgtggcatggatac	ttggatcagccaaaggagac	2	RM555
56	acggtgggattagactgtgc	cctcacgattttcctccaac	2	RM475
56	gccactattcctgcatgtgtttgc	aaattcacgacagagtccacaactgc	2	RM12371
56	cgtacgacgaaagccctaactcg	acaccatcaagcgcctctgc	2	RM12373
56	ctgcaaattggtgggtgattgc	actgacgattgggcacattattcc	2	RM12676

نتایج و بحث

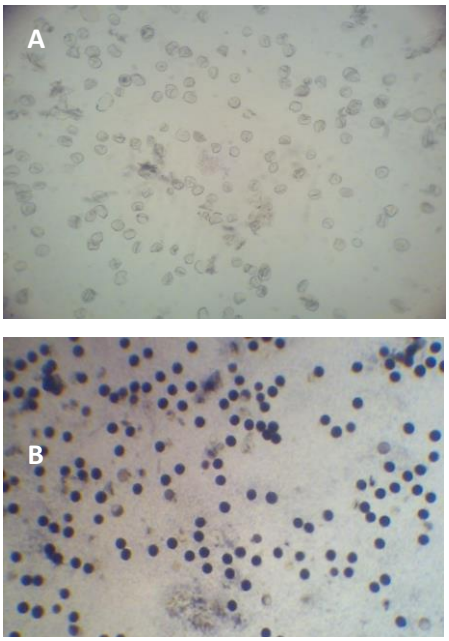
ارزیابی مورفولوژیکی

با شمارش تعداد بوته‌های بارور و عقیم، تعداد ژن‌های دخیل در ایجاد عقیمی با استفاده از مربع کای اسکویر ($\chi 2$) ارزیابی گردید. در مجموع، از ۱۴۲ ژنوتیپ F_2 حاصل از تلاقی لاین TGMS نعمت TGMS با فجر، تعداد ۴۶ ژنوتیپ دارای فنوتیپ عقیمی و ۹۶ ژنوتیپ دیگر دارای فنوتیپ بارور بودند (شکل ۲). در بین بوته‌های BC_1 حاصل از تلاقی TGMS نعمت با F_1 (BCF_1)، ۶ بوته دارای فنوتیپ عقیمی و ۶ بوته دارای فنوتیپ بارور بود. ایـن نتایج که در جدول ۲ آمده است بـا نسبت‌های ژنتیکی مندلی ۱:۳ (بارور: عقیم) در F_2 و ۱:۱ در BC_1 در سطح احتمال $p= 0.01$ مطابقت دارد. نتایج مشاهده شده در نسل F_1، F_2 و BCF_1 به خوبی بیانگر این است که صفت TGMS در نعمت TGMS توسط یک ژن مغلوب کنترل می‌گردد که تقریبا با تمامی مطالعات محققین دیگر همخوانی دارد (۲،۶،۱۵،۲۱،۲۹).

ارزیابی ژنتیکی

با توجه به اینکه برنج دارای ۱۲ جفت کروموزوم می‌باشد و ژن TGMS به وسیله جهش ایجاد گردیده، عملا امکان مطالعه تمامی کروموزوم‌های آن به دلیل هزینه‌های بالای تولید آغازگرها در این پژوهش امکان‌پذیر نبود. با بررسی مقالات مختلف مشاهده شد که اکثر مقالات وجود ژن TGMS را در کروموزم شماره ۲ گزارش کرده‌اند. با توجه مقالات، ۱۴ نشانگر که در اولویت همبستگی با ژن TGMS بودند برای مطالعه انتخاب شدند. اسامی این نشانگرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]



شکل ۲- ارزیابی وضعیت باروری دانه گرده در جمعیت F_2 نعمتtgms/فجر، گیاه عقیم (A) در مقابل گیاه بارور (B)
Figure 2. Evaluation of pollen grain fertility in F_2 population of Nemat-tgms/Fajr. Strile plant (A) versus fertile plant (B)

جدول ۲- الگوی تفرق عقیمی در جمعیت‌های F_2 و BCF_1 بر اساس ارزیابی فنوتیپی
Table 2. Sterility dispersion pattern in F2 and BCF1 populations based on phenotypic evaluation

χ2	Total Plants تعداد کل بوته	No. Fertile plants تعداد بوته‌های بارور	No. Sterile plants تعداد بوته‌های عقیم	population جمعیت
3.15 ns	142	96	46	F_2
0 ns	12	6	6	BC_1

مقدار χ2 بحرانی با یک درجه آزادی در سطوح ۵ و ۱ درصد به ترتیب برابر ۳/۸۴ و ۶/۶۳ می‌باشد.
Critical χ2 with 1 degree of freedom in 5 and 1 percent levels are 3.84 and 6.63, respectively.

ابتدا برای غربالگری، نشانگرهایی که توانستند پلی‌مورفیسم را در بین والدین نشان بدهند برای نشانمند کردن ژن TGMS در جمعیت مغلوب استفاده شدند (۱۶). نشانگر توانستند تنوع را در بین والدین نشان دهند که از آنها برای شناسایی نشانگر(های) همبسته با ژن TGMS در جمعیت کلاس مغلوب استفاده شد. فراوانی نوترکیبی (r) با استفاده فرمول زیر محاسبه گردید (۱۹).

$$r = (2N1 + N2) / 2N$$

که در آن N تعداد کل گیاهان عقیم بررسی شده، N1 تعداد افراد عقیم با نوار هموزیگوت والد بارور، و N2 تعداد افراد عقیم با نوارهای هتروزیگوت می‌باشد. فراوانی نوترکیبی نشان دهنده فاصله ژنتیکی نشانگر از ژن TGMS است که به صورت سانتی‌مورگان (cM) بیان می‌شود (۲۰). فراوانی مورد انتظار، فراوانی مشاهده شده و آزمون χ2 برای نشانگرهای بررسی شده در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین درصد کراسینگ اور (نوترکیبی)، فاصله ژنتیکی بین ژن TGMS و نشانگرهای مورد استفاده و LOD در جدول ۴ آمده است. محاسبه LOD با استفاده از فرمول زیر انجام گرفت.

$$LOD = \log \frac{(1-r)^{NR} \times r^{R}}{0/5^{(NR+R)}}$$

r = فراوانی نوترکیبی
NR = تعداد افراد عقیم بدون نوترکیبی
R = تعداد افراد عقیم دارای نوترکیبی

با توجه به جدول ۳، نشانگرهای RM110 و RM29 فراوانی نوترکیبی پایینی داشتند (به‌ترتیب ۵/۷۱ و ۱۱/۴۲ درصد). فاصله ژنتیکی نشانگرهای RM110 و RM29 نسبت به ژن TGMS بر اساس تابع کوسامبی به‌ترتیب ۵/۷۴ و ۱۱/۶۳ سانتی مورگان شده است. الگوی نواری نشانگر RM29 در شکل ۳ آمده است.

بر اساس نتایج سوبودی و همکاران (۲۵)دونگ و همکاران (۴)، زو و همکاران (۳۰) و ردی و همکاران (۲۳) در کروموزوم ۲ تا به حال ژن‌های *tms4*، *tms5*، *tms9* و *ptgms2-1* به‌ترتیب کشف شده است. دونگ و همکاران (۴) طی تحقیقی گزارش کردند که ژن *tms4* با RM27 همبسته می‌باشد. نتیجه مشابهی توسط Vu و همکاران (۲۰۰۱) بدست آمد. آنها با تحقیق بر روی لاین TGMS-1 پی بردند که نشانگر RM27 همبسته با صفت عقیمی می‌باشد.جیا و همکاران (۷) با مطالعه بر روی ژن tms5، نشانگر RM174 را همبسته با آن دانستند. این در حالی است که در مطالعه وانگ و همکاران (۲۹) این ژن بین نشانگرهای RM279 و RM492 قرار داشت. ماتایاتاورن و همکاران (۱۶) با مطالعه بر روی یکی از لاین‌های TGMS، گزارش کردند که ژن عقیمی در این لاین با نشانگرهای RM154 و RM300 لینک می‌باشد. تمامی نشانگرهایی که توسط این محققین گزارش شده است بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲ قرار دارد. موقعیت برخی از این نشانگرها بر روی کروموزوم ۲ در شکل۴ آمده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]

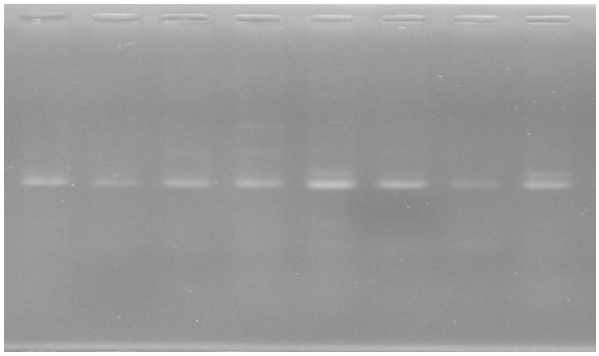
جدول ۳- آزمون کای اسکویر به‌منظور مقایسه فراوانی ژنوتیپی نشانگرهای SSR با فراوانی مورد انتظار در کلاس مغلوب
Table 3. Chi-square test to compare the genotypic frequency of SSR markers with the expected frequency in the recessive class

Primers پرایمرها	No. plants with sterile band تعداد بوته‌های دارای باند عقیم	No. expected plants with sterile band تعداد بوته‌های مورد انتظار دارای باند عقیم	$\chi 2$
RM341	20	35.5	6.76^{*}
RM110	31	35.5	0.57^{ns}
RM29	29	35.5	1.19^{ns}
RM27	22	35.5	5.13^{ns}

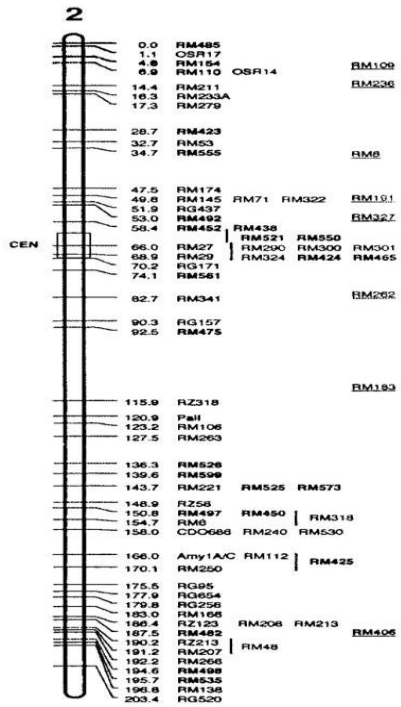
مقدار $\chi 2$ بحرانی با دو درجه آزادی در سطوح ۵ و ۱ درصد به ترتیب برابر ۵/۹۹ و ۹/۲۱ می‌باشد.
Critical $\chi 2$ with 2 degree of freedom in 5 and 1 percent levels are 5.99 and 9.21, respectively.

جدول ۴- درصد نوترکیبی، فاصله ژنتیکی بین نشانگر و ژن TGMS و مقیاس LOD
Table 4. Percentage of recombination, genetic distance between marker and TGMS gene and LOD scale

Primers پرایمرها	Recombination percent درصد نوترکیبی	Genetic distance based on Kosambi فاصله ژنتیکی بر اساس تابع کوسامبی	LOD
RM110	5.71	5.74	4.77
RM29	11.42	11.63	1.47
RM27	24	16.66	-0.14



شکل ۳- الگوی نواری ژنوتیپ‌های نر عقیم (MS) و بارور (F)
Figure 3. Band pattern of male sterile (MS) and fertile (F) genotypes



شکل ۴- موقعیت نشانگرها بر روی کروموزوم
Figure 4. Position of markers on chromosomes

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]

خلایمونگخون و همکاران (۱۹) با هدف تولید لاین‌های هیبرید، سه لاین مختلف را با یک لاین TGMS ایندیکایی تلاقی دادند. نتایج آنها حاکی از آن بود که ژن عقیمی در بین نشانگرهای RM12676 و 2gAP0050058 (نشانگر InDel) قرار دارد. با بررسی‌های بیشتر و با استفاده از آزمون QTR-PCR (Quantitative Real Time PCR) آنها پی بردند که در بین این نشانگرها، ۷ تا ۱۰ ژن مرتبط با بیان در خوشه و پاسخ به دما حضور دارد که این ژن‌ها می‌توانند کاندیدای کنترل کننده ژن TGMS باشند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از جهش در ایجاد عقیمی (TGMS) و تنوع در ژنوتیپ ارقام باعث شده تا نشانگرهای متفاوتی حتی برای یک ژن بخصوص گزارش شود. علاوه بر این، چندین ژن مرتبط برای بروز فنوتیپ عقیمی بر روی کروموزوم کوتاه شماره ۲ در برنج وجود دارد که جهش می‌تواند در هر یک از آنها روی دهد و چون بر روی یک کروماتید قرار دارند، با نشانگرهای مختلفی می‌توانند همبسته باشند. استفاده از نشانگری که همبستگی بالایی با این صفت داشته باشد (MAS) می‌تواند انتقال ژن TGMS را به ارقام دیگر تسهیل کند.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات برنج آمل و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان و نیز از مساعدت‌های آقایان دکتر نادعلی باقری و نیز دکتر عمار افخمی تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Allard, R.W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia, 24: 235-278.
2. Borkakati, R.R. and S.S. Virmani. 1996. Genetics of thermos sensitive genic male sterility in rice. Euphytica, 88(1): 1-7.
3. Bruinsma, J. 2003. World Agriculture: Towards 2015/2030. London, UK: Earthscan.
4. Dong, N.V., P.K. Subudhi, P.N. Luong, V.D. Quang, T.D. Quy, H.G. Zheng, B. Wang and H.T. Nguyen. 2000. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermo-sensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. Theoretical and Applied Genetics, 100(5): 727-734.
5. Ebrahimi, T., Gh.A. Ranjbar, Gh. Nematzadeh and Gh. Kiani. 2013. Molecular Tagging of Stem Anthocyanin Gene in Rice Using SSR Markers. Journal of Crop Breeding, 5(11): 60-69 (In Persian).
6. Hussain, A.J., A.J. Siddiq, E.A. Gupta, U.K. Reddy and P.K. Ranjekar. 2011. Mapping of *tms8* gene for temperature-sensitive genic male sterility (TGMS) in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Breeding, 131(1): 42-47.
7. Jia, J.H., D.S. Zhang, C.Y. Li, X.P. Qu, S.W. Wang, V. Chamarerk, H.T. Nguyen and B.Y. Wang. 2001. Molecular mapping of the reverse thermos sensitive genic male-sterile gene (*rtms1*) in rice. Theoretical and Applied Genetics, 103(4): 607-612.
8. Jiang, D.G., S. Lu, H. Zhou, X.J. Wu, C.X. Zhuang, Y.G. Liu and M.T. Mei. 2006. Mapping of the rice (*Oryza sativa* L.) thermo-sensitive genic male sterile gene tms5 with EST and SSR markers. Chinese Science Bulletin, 51(4): 417-420.
9. Jones, J.W. 1926. Hybrid vigour in rice. Journal of the American Society of Agronomy, 18(3): 424-428.
10. Chukwu, S.C., M.Y. Rafii, S.I. Ramlee, S.I. Ismail, Y. Oladosu, K. Kolapo, I. Musa, J. Halidu, I. Muhammad and M. Ahmed. 2020. Marker-Assisted Introgression of Multiple Resistance Genes Confers Broad Spectrum Resistance against Bacterial Leaf Blight and Blast Diseases in PUTRA-1 Rice Variety. Agronomy, 10(1): 42.
11. Khlaimongkhon, S., S. Chakhonkaen, K. Pitngam, K. Ditthab, N. Sangarwut, N. Panyawut and Th. Wasinanon. 2019. Molecular Markers and Candidate Genes for Thermo-Sensitive Genic Male Sterile in Rice. Rice Science, 26(3): 147-156.
12. Lang, N.T., P.K. Subudhi, S.S. Virmani, D.S. Brar, G.S. Khush, Z. Li and N. Huang. 1999. Development of PCR-based markers for thermos sensitive genetic male sterility gene tms3 (t) in rice (*Oryza sativa* L.). Hereditas, 131: 121-127.
13. Lee, D.S., L.J. Chen and H.S. Suh. 2005. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene tms6 in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 111(7): 1271-1277.
14. Li, R.B., M.P. Pandey, P. Sharma and G. Ballabh. 2005. Inheritance of thermos sensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). Current Science, 88(11): 1809-1815.
15. Lopez, M.T. and S.S. Virmani. 2000. Development of TGMS lines for developing two-line rice hybrids for the tropics. Euphytica, v.114: 211-215.
16. Matthayatthaworn, W., P. Sripichitt, Ch. Phumichai, S. Rungmekarat, S. Uckarach and T. Sreewongchai. 2011. Development of specific simple sequence repeats (SSR) markers for non-pollen type thermo-sensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology, 10(73): 16437-16442.
17. Mishra, A. and A. Bohra. 2018. Non-coding RNAs and plant male sterility: current knowledge and future prospects. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2248-y. Springer-Verlag GmbH Germany, Part of Springer Nature 2018.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]

18. Myers, N. 1999. The next green revolution: its environmental underpinnings. Current Science, 76: 507 -13.
19. Nas, T.M.S., D.L. Sanchez, G.Q. Diaz, M.S. Mendioro and S.S. Vermani. 2005. Pyramiding of thermos-sensitive genetic male sterility (TGMS) genes and identification of a candidate tms5 gene in rice. Euphytica, 145: 67-75.
20. Peng, H.F., X.H. Chen, Y.P. Lu, Y.F. Peng, B.H. Wan, N.D. Chen, B. Wu, S.P. Xin and G.Q. Zhang. 2010. Fine mapping of a gene for non-pollen type thermos sensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 120(5): 1013-1020.
21. Qi, Y.B., Q.L. Liu, L. Zhang, B.Z. Mao, D.W. Yan, Q.S. Jin and Z.H. He. 2014. Fine mapping and candidate gene analysis of the novel thermos-sensitive genic male sterility *tms9*-1 gene in rice. Theoretical and Applied Genetics, 127(5): 1173-1182.
22. Ramaiah, K. 1933. Inheritance of flowering duration in rice. Indian Journal of Agricultural Sciences, 3(3): 377-410.
23. Reddy, A.S. 2000. Genetic analysis of temperature-sensitive male sterility in rice. Abstract, 100: 794-801.
24. Sheng, Z.H., X.J. Wei, G.N. Shao, M.L. Chen, J. Song, S.Q. Tang, J. Luo, C. Hu, P.S. Hu and L.Y. Chen. 2013. Genetic analysis and fine mapping of *tms9*, a novel thermos sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Breeding, 132(2): 159-164.
25. Subudhi, P.K., R.P. Borkakati, S.S. Virmani and N. Huang. 1997. Molecular mapping of a thermo-sensitive genetic male-sterility gene in rice using bulked segregant analysis. Genome, 40(2): 188-194.
26. Virmani, S.S., Z.X. Sun, T.M. Mou, A. Jauhar and C.X. Mao. 2003. Two-line hybrid rice breeding manual. Los Baños, Phillipines: International Rice Research Institute. 88p.
27. Vu, D.Q., V.D. Nguyen, N.L. Pham, D.Q. Tran and H.T. Nguyen. 2001. Mapping of a rice thermosensitive genic male sterility gene from a TGMS mutant line (JAERI-Conf--2001-003). Tano, Shigemitsu (Ed.). Japan.
28. Wang, B.Y., W.W. Xu, J.Z. Wang, W. Wu, H.G. Zheng, Z.Y. Yang, J.D. Ray and H.T. Nguyen. 1995. Tagging and mapping the thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers. Theoretical and Applied Genetics, 91: 1111-1114.
29. Wang, Y.G., Q.H. Xing, Q.Y. Deng, F.S. Liang, L.P. Yuan, M.L. Weng and B. Wang. 2003. Fine mapping of the rice thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms5*. Theoretical and Applied Genetics, 107(5): 917-921.
30. Xu, J.J., B.H. Wang, Y.H. Wu, P.N. Du, J. Wang, M. Wang, C.D. Yi, M.H. Gu and G.H. Liang. 2011. Fine mapping and candidate gene analysis of *ptgms2*-1, the photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 122(2): 365-372.
31. Yamaguchi, Y., R. Ikeda, H. Hirasawa, M. Minami and A. Ujihara. 1997. Linkage analysis of thermo-sensitive genic male sterility gene *tms*-2 in rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Science, 47: 371-373.
32. Yang, Q.K., C.Y. Liang, W. Zhuang, J. Li, H.B. Deng, Q.Y. Deng and B. Wang. 2007. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. Planta, 225(2): 321-330.
33. Yongbin, Q., L. Qinglong, L. Zhang, M. Bizeng, Y. Dawei, J. Qingsheng and H. Zuhua. 2014. Fine mapping and candidate gene analysis of the novel thermos sensitive genic male sterility tms9-1 gene in rice. Theoretical and Applied Genetics, 127: 1173-1182.
34. Yuan, L.P. 1997. Exploiting crop heterosis by two-line system hybrids: Current status and future prospects. In: Proceedings of International Symposium on Two-Line System of Heterosis Breeding in Crops. Sep. 6-8, 1997. Changsha, China: China National Hybrid Rice Research and Development Centre: 215-220.
35. Zhou, Y.F., X.Y. Zhang and Q.Z. Xue. 2011. Fine mapping and candidate gene prediction of the photoperiod and thermos sensitive genic male sterile gene *pms1*(t) in rice. Journal of Zhejiang University-Science B, 12(6): 436-447.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]

Tagging of Temperature-Sensitive Genic Male Sterility (TGMS) Gene in Rice Mutant Nemat Cultivar

Mohammad Siah Chehreh[1], Ghaffar Kiani[2], Majid Sattari[3], Seyed Kamal Kazemitabar[4] and Saeed Navabpour[5]

1- Graduated PhD Student in Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, (Corresponding Author: ghkiani@gmail.com)
3- Rice Research Institute of Iran, Deputy of Mazandaran
4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
5- Associate Professor, Department of Plant Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 25 January, 2022 Accepted: 23 August, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: In rice, the use of male sterility is a prerequisite for the commercial exploitation of heterosis. Two well established male sterility systems in rice are cytoplasmic genetic male sterility (CMS), a three-line system, and environmentally sensitive genic male sterility (EGMS). EGMS has two types of mechanisms: PGMS and TGMS. TGMS lines are sterilized when they are at a temperature above 25-30°C during the cluster and flowering stages. In order to accelerate the development of TGMS lines in various genetic fields, marker-assisted selection (MAS) can increase the speed and accuracy of this transmission. The aim of this study was to identify the chromosomal location of the gene controlling the sterility trait TGMS and the SSR marker associated with this gene in Nemat TGMS cultivar.

Material and Methods: For this study, Nemat TGMS cultivar was crossed with Fajr cultivar to obtain F_2 and BC_1 populations for genetic studies. After DNA extraction from 142 genotypes and PCR, the results observed in F_1, F_2 and BCF_1 generations clearly indicated that the TGMS trait in TGMS is controlled by a recessive gene. For this study 14 SSR markers were used to determine the marker correlated with TGMS gene. The frequency of recombination between markers and TGMS locus was estimated using maximum likelihood, assuming that all individuals were completely sterile in terms of TGMS homozygous location. Linkage between marker loci and TGMS QTL was tested by chi square (χ^2) test and LOD score.

Results: Among the markers, RM110 and RM29 primers had a high correlation with TGMS gene (5.74 and 11.63 cM, respectively). Various markers have been reported by researchers for the TGMS gene on chromosome 2.

Conclusion: The use of mutation in sterilization (TGMS) and variation in cultivar genotype has led to different markers being reported even for a particular gene. The use of markers that have a high correlation with this trait (MAS) can facilitate the transfer of TGMS gene to other cultivars.

Keywords: Molecular Marker, Rice, Segregating Populations, Temperature Sensitive Genic Male Sterility

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-03-03]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.15.45.14.6]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.164]