تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۹۴

گزینش مورفولوژیکی و مولکولی ژن(های) اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های در حال تفکیک برنج

مصطفی عیدی کهنکی*[1]، غفار کیانی[2] و قربانعلی نعمت‌زاده[3]

۱*- **نویسنده مسوول:** دانش آموخته ی گروه اصلاح‌نباتات، 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 دریافت: ۹۲/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳

چکیده

تلفیق روش‌های کلاسیک اصلاح نبات و گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی، سرعت تولید لاین‌های جدید اصلاحی را افزایش خواهد داد. محدودیت ارقام مناسب اعاده‌کننده باروری، تعداد کم لاین‌های موثر و سازگار و پایه محدود ژنتیکی آن‌ها، از مشکلات اساسی در تولید برنج هیبرید به شمار می‌رود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و گزینش بوته‌های دارای ژن‌های اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های در حال تفکیک برنج (*Oryza sativa* L.). انجام شد. بر این اساس، مطالعه ژنوم هسته‌ای لاین‌های گزینش شده، همراه با بررسی‌های مولکولی جهت شناخت لاین‌های اعاده‌کننده باروری در دو جمعیت حاصل از تلاقی‌های 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 لاین‌های R5، R7، R9، R28 و R45 با انجام آزمون‌های باروری دانه گرده و خوشه در مجموع دارای باروری بیش از ۷۵ درصد بودند. با بررسی‌های مولکولی انجام شده بر روی لاین‌ها و ژنوتیپ‌های گزینش شده، چهار نشانگر SSR همبسته با ژن‌های *Rf* شامل: RM171، RM3148، RM1 و RM258 الگوی باندی مناسبی را از نظر ژن‌های اعاده‌کننده باروری ارائه نمودند به طوری که لاین‌های R3 ، R5، R7، R9، R18، R25، R27، R28، R29 و R45 در نسل F_4 حداقل برای دو نشانگر الگوی باندی، مشابه شاهد اعاده‌کننده باروری (IR50) را نشان دادند. با تلفیق نتایج حاصل، لاین‌های R5، R7، R9، R28 و R45 به عنوان لاین‌های دارای پتانسیل مناسب جهت اعاده‌کردن باروری شناسایی شدند که با بررسی‌های بیشتر در نسل-های آینده می‌توانند به عنوان لاین‌های مطلوب اعاده‌کننده باروری در فرآیند تولید برنج هیبرید مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه‌ها : برنج، گزینش، ژن(های) اعاده‌کننده باروری، نشانگر مولکولی

مقدمه

بهبود مورفولوژیکی گیاه و استفاده از هتروزیس[1] از روش‌های مؤثری هستند که تا کنون برای افزایش پتانسیل عملکرد محصولات زراعی از طریق اصلاح‌نبات 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 اصلاح مولکولی باید به همراه صفات مورفولوژیکی مناسب و هتروزیس قوی باشد تا نتایج مطلوبی حاصل شود (زو[2]، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی نشانگرهای کلیدی موثر در هتروزیس حاصل از هیبرید F_1 برنج ژاپونیکا به انجام رسید برخی از نشانگرهای SSR و RAPD همبستگی معنی‌داری با ژن‌های موثر در هتروزیس نشان دادند لذا هتروزیس مشاهده شده در

1-Heterosis

2- Zhou

نسل F_1 می‌تواند با انتخاب موثر آلل‌های همبسته با این پدیده بهبود یابد (چو و همکاران[1]، ۲۰۰۴) از آنجا که تکنولوژی تولید برنج هیبرید افزایش عملکردی معادل ۲۰-۱۵ درصد بیشتر از بهترین لاین‌های خالص نیمه پاکوتاه داشته (ویرمانی و همکاران[2]، ۲۰۰۵؛ ویرمانی، ۱۹۹۶) لذا به عنوان یکی از گزینه‌های امیدبخش اصلاح برنج به منظور افزایش تولید در واحد سطح مورد توجه قرار گرفته است (شیبا و همکاران[3]، ۲۰۰۵). در رابطه با تولید برنج هیبرید دو سیستم به‌طور موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی سیستم سه لاین که در آن از نرعقیمی سیتوپلاسمی[4] (CMS) بهره برده می‌شود و دیگری سیستم دو لاین[5] (EGMS) که در آن از نرعقیمی سیتوپلاسمی حساس به محیط استفاده می‌گردد (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳). سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی به طور گسترده به منظور تولید هیبرید تاکنون مورد استفاده قرارگرفته است (نعمت‌زاده و کیانی[6]، ۲۰۱۰). اما استفاده از این سیستم به منظور بهره-برداری از هتروزیس در محصولات دانه‌ای تنها وقتی می‌تواند مورد استفاده واقع شود که لاین‌های برگرداننده باروری مطلوب موجود و در دسترس باشند (نعمت زاده و ستاری، ۱۳۸۱). از طرفی محدودیت ارقام مناسب اعاده‌کننده باروری، تعداد کم لاین‌های موثر وسازگار و پایه محدود ژنتیکی آن‌ها، همواره از مشکلات اساسی تولید برنج هیبرید بوده است. در این رابطه، باید باروری دانه گرده یا خوشه و یا هر دوی آن‌ها نیز به عنوان شاخصی برای شناسایی بوته‌های اعاده‌کننده باروری مورد استفاده قرار گیرد (یومادوی و همکاران[7]، ۲۰۱۲) و ژنوتیپ‌هایی که باروری دانه گرده و خوشه بالایی داشته باشند پتانسیل لازم جهت اعاده کردن باروری را دارند. از آنجایی که مبنای انتخاب در برنامه‌های اصلاح نبات، بررسی صفت یا صفات مورد نظر می‌باشد، با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان مسیر اصلاح را کوتاه‌تر و دقیق‌تر نمود. انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS)[8]، روشی است که ژن یا ژن‌های مورد نظر را می‌توان 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 هزینه‌ها را در بر دارد (استرومبرگ و همکاران[9]، ۱۹۹۴) در این انتخاب گزینش بر پایه ژنوتیپ نشانگر (نه بر پایه فنوتیپ آن) که به ژن مورد نظر همبستگی داشته انجام می‌گیرد (دودلی[10]، ۱۹۹۷). باقری (۱۳۸۸) گزارش نمودند که همبستگی نشانگر RM490 با ژن اعاده‌کننده باروری در جمعیت مورد نقشه‌یابی که شامل ۳۶ گیاه عقیم هموزیگوس و ۱۰۰ گیاه انتخاب شده بطور تصادفی از جمعیت F_2 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 آن‌ها در اصلاح‌نبات با انجام پژوهش‌های متعدد در این رابطه، منجر به پیشرفت‌های قابل توجهی در این زمینه شده است. زیرا از یک سو تولید سریعتر لاین‌های اعاده‌کننده باروری را فراهم ساخته و از سوی دیگر باعث کاهش هزینه‌های بالای مراحل اصلاحی می‌گردد (دنگ و همکاران[11]، ۲۰۰۶). با استفاده صحیح از نشانگرها اولاً نیازی به آزمون نتاج نسل‌های مختلف تلاقی برگشتی[12] نیست و ثانیاً می‌توان بوته‌های حاوی ژن‌های اعاده‌کننده باروری را در مراحل اولیه رشدی تشخیص داده و بقیه را حذف نمود.

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

ریزماهواره‌ها[1] 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[2]، ۲۰۰۴؛ کورزون[3]، 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[4]، ۲۰۰۲؛ مک کوچ و همکاران[5]، ۲۰۰۲؛ سینگ و همکاران[6]، ۲۰۰۴). در مطالعه ای 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[7]، ۲۰۱۲). هدف از اجرای این پژوهش شناسایی و گزینش بوته‌های دارای ژن‌های اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های درحال 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 علوم‌کشاورزی و منابع طبیعی ساری واقع در کیلومتر ۹ 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 F_4 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 نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) می‌باشد (نعمت‌زاده و کیانی، ۲۰۱۰). رقم نعمت (لاین ۲۸-D2-۱۲) 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 F_4 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 برترانتخابی از نظر ژن‌های اعاده-کننده باروری در نسل‌های در حال تفکیک، دورگ-گیری این ژنوتیپ‌های انتخابی (به عنوان والد پدری) با دو لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ندا و نعمت (به عنوان والد مادری) انجام و همچنین از لاین IR50 به عنوان شاهد اعاده کننده باروری استفاده شد. در این آزمایش، از میان ۴۵ تلاقی انجام شده در نهایت پس از خزانه‌گیری و نشاکاری تعداد ۳۰ هیبرید F_1 در مزرعه مستقر گردید. در مرحله بعد به منظور بررسی وضعیت عقیمی و یا باروری نتاج حاصل از تست کراس، دانه گرده این گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت که طی آن از بوته‌های

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.*

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 (I_2-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[1]، 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 هبیریدهای F_1 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 تغییریافته دلاپورتا و همکاران (دلاپورتا و همکاران[2]، ۱۹۸۳). انجام و کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش الکتروفورز[3] ژل آگارز و اسپکتروفتومتری[4] مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی ژن های اعاده کننده باروری در جمعیت های 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 پلیمراز (PCR)[5] در حجم ۲۵ میکرولیتر به ازای هر نمونه در نظر گرفته شد که شامل ۱۸/۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر 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 میلی مولار 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 سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 اصلاح‌نبات دارد و در انتخاب درست والدین به اصلاحگر کمک می‌کند (زالی، ۱۳۷۳؛ موسسه تحقیقات بین المللی برنج[6]، ۱۹۹۳) نتایج حاصل از آمار توصیفی صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های انتخابی جمعیت‌های مورد بررسی در جدول ۲ نشان می-دهند 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

1- Govinda raj & Virmani
2- Dellaporta *et al.*
3- Electrophoresis
4-Spectrophotometer
5 -Polymerase Chain Reaction
6- IEE, Rice Alamance

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 باگزینش ژنوتیپ-هایی با ارتفاع مناسب وتلاقی‌دادن 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 پیداکند 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 اصلاح‌نبات کلاسیک از تلاقی آزمون[1] ارقام با لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و ارزیابی نتاج F_1 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 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، RM3148،RM1 وRM258 الگوی باندی مناسبی را ارائه نمودند.

قطعات DNA پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نشانگر RM258 همبسته با ژن Rf_4 واقع بر روی کروموزوم شماره ۱۰ برنج برای لاین‌های اعاده‌کننده باروری (R) باندی به طول ۱۵۵ جفت باز و برای بقیه لاین‌ها (غیر اعاده‌کننده باروری) باندی به طول ۱۷۰ جفت باز را نشان دادند. به طوری که لاین‌های R3، R5، R18، R19، R24 و R28 باندی مشابه شاهد اعاده‌کننده باروری (IR50) و سایر لاین‌ها باندی متفاوت نشان دادند (شکل ۱).

در همین رابطه جیان و همکاران[2] (۲۰۰۳) به منظور نقشه‌یابی مولکولی ژن‌های اعاده‌کننده باروری در نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA لاین‌های اعاده‌کننده برنج باسماتی، جمعیت F_2 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 ژن ها شناسایی نمودند. هوانگ و همکاران[3] (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 میشرا و همکاران[4] (۲۰۰۳) با نشانگر RM258 برای لاین اعاده‌کننده باروری قطعه باندی به طول ۱۲۵ جفت باز و برای لاین غیراعاده‌کننده باروری باندی به اندازه ۱۳۰ جفت باز را گزارش کرده‌اند.

1- Test cross

2- Gyan *et al.*
3- Huang *et al.*
4- Mishra *et al.*

جدول ۱- آغازگرهای SSR مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نشانگرها	موقعیت کروموزومی	اندازه باند	توالی رفت	توالی برگشت	توالی تکرار شونده
RM171	۱۰	۳۲۸	aacgcgaggacacgtacttac	acgagatacgtacgcctttg	$(GATG)_5$
RM228	۱۰	۱۵۴	ctggccattagtccttgg	gcttgcggctctgcttac	$(CA)_6(GA)_{36}$
RM258	۱۰	۱۴۸	tgctgtatgtagctcgcacc	tggcctttaaagctgtcgc	$(GA)_{21}(GGA)_3$
RM271	۱۰	۱۰۱	tcagatctacaattccatcc	tcggtgagacctagagagcc	$(GA)_{15}$
RM151	۱	۱۹۷	ggctgctcatcagctgcatgcg	tcggcagtggtagagtttgatctgc	$(TA)_{23}$
RM490	۱	۱۰۱	atctgcacactgcaaacacc	agcaagcagtgctttcagag	$(CT)_{13}$
RM1	۱	۱۱۳	gcgaaaacacaatgcaaaaa	gcgttggttggacctgac	$(GA)_{26}$
RM3148	۱	۱۶۶	gactattgctcgaacactttg	ttgtctgctttggtatttgc	$(CA)_{20}$

جدول ۲- دامنه تغییرات، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات صفات اندازه‌گیری 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

نشانگر RM3148 همبسته با ژن Rf_3 واقع بر روی کروموزوم شماره ۱ برنج برای لاین‌های اعاده‌کننده باروری قطعه باندی به طول ۱۷۰ جفت باز و برای بقیه لاین‌ها باندی 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.

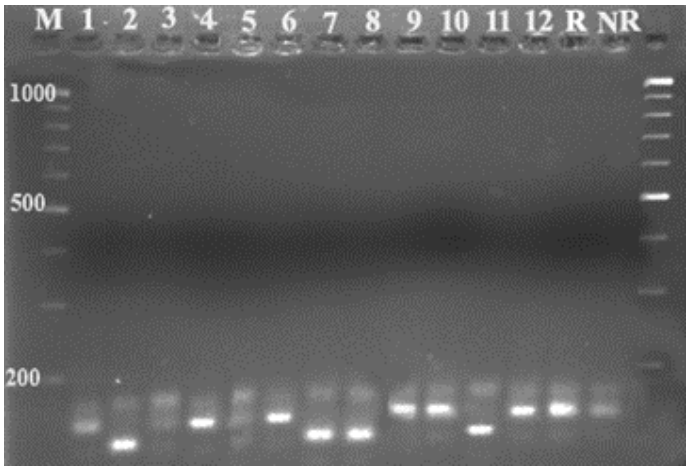
با بررسی‌های انجام شده روی نشانگرهای استفاده شده لاین‌های R3، R5، R7، R9، R18، R25، R27، R28، R29 و R45 حداقل برای دو نشانگر الگوی باندی، مشابه شاهد اعاده‌کننده باروری (IR50) را نشان دادند. با تلفیق نتایج حاصل از آزمون‌های باروری گرده و باروری خوشه و همچنین بررسی‌های مولکولی با نشانگرهای بکار برده شده می‌توان لاین‌های R5، R7، R9، R28 وR45 را به عنوان لاین‌های دارای پتانسیل مناسب جهت اعاده‌کردن

باروری در نظر گرفت. مشخصات زراعی این لاین‌ها در جدول ۴ آمده است.

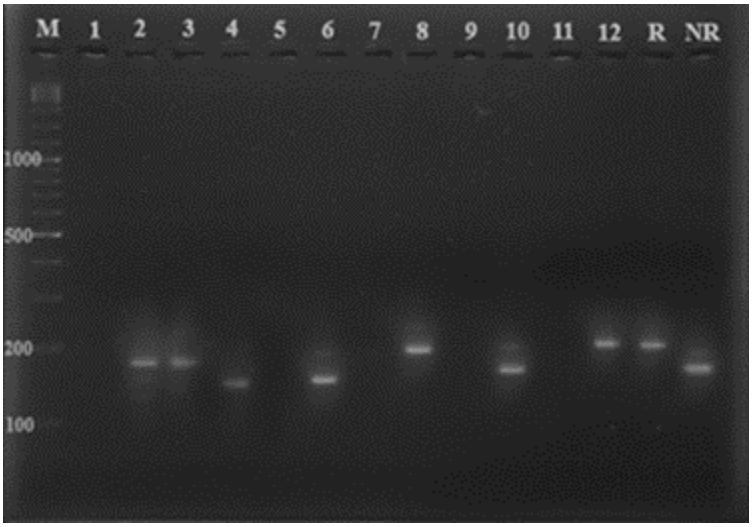
با توجه به نقش مهم ارتفاع بوته در پراکنش مناسب دانه‌های گرده برای لاین‌های نرعقیم این لاین ها با داشتن ارتفاع مناسب می‌توانند در فرآیند تولید هیبرید موثر واقع شوند لاین‌های مذکور از نظر سایر صفات نظیر طول خوشه، تعداد پنجه، تعداد دانه وضعیت مطلوبی دارند و با بررسی‌های بیشتر در نسل‌های آینده می‌توانند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

جدول۳- بررسی هیبریدهای F_1 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 باندی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر RM258 روی ژل آگارز ۲ درصد M، R و N R 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.



شکل ۲- الگوی باندی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر RM3148 روی ژل آگارز ۲ درصد M، R و N R 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.

جدول٤- مشخصات زراعی لاین‌های اعاده کننده باروری

لاین	ارتفاع (سانتی‌متر)	طول خوشه (سانتی‌متر)	تعداد پنجه	تعداد دانه	تعداد دانه پر	طول دانه (میلی‌متر)	عرض دانه (میلی‌متر)	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 نرعقیمی 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 کلکسیون‌ها در به نژادی گیاهان. مقالات کلیدی سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. تبریز ۱۲ تا ۱۷ شهریور، صص: ۱۳۵ – ۱۴۳.

۳. عیدی‌کهنکی م. (۱۳۹۲). گزینش فنوتیپی و مولکولی ژن(های) اعاده‌کننده باروری در جمعیت‌های در حال تفکیک برنج، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد اصلاح‌نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی‌ساری، 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 minipreparation: 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 microsatelite markers. Gramene. Rice Genetics Newsletters, 16: 75-77.

16. IEEI Rice Alamance. 1993. Internation 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 resroration 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.