Summer (2024) 13(46): 45-57.
DOI: 10.30473/cb.2024.70720.1959
Received: 2, Mar. 2024 Accepted: 27, May 2024

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of new male sterile rice lines and validation of associated molecular markers to identify their genetic seed purity

Alireza Tarang*, Majid Sattari

Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Correspondence
Alireza Tarang
Email: a_tarang@hotmail.com

ABSTRACT

The use of heterosis in hybrid rice breeding technology is one of the ways to increase production per unit area, and hybrid rice varietiesproduce 20 to 30 percent higher yields than improved or high-yielding varieties of the same growing period. The seed of male sterile lines in hybrid rice seed production is controlled based on the potential for producing male sterile lines (A line), evaluation as a fertile line (B line) and the percentage of allogamy or appropriate behaviour of the flowering male sterile lines and the factors that influence this. Ensuring the genetic purity of hybrid seed is a prerequisite for the successful production of hybrid rice. Hybrid seed is often contaminated by pollen from other varieties or by self-fertilisation from impure parental lines (cytoplasmic male sterile). The aim of this study was to identify informative microsatellite markers (SSR) able to discriminate hybrid rice parental lines and allow their use in the evaluation of seed purity, as well as to characterise the morphology of F1 hybrid rice to complement the varietal description. As part of the hybrid rice production programme, an initial evaluation of traits related to the degree of outcrossing, sterility stability and genetic purity in male sterile rice lines is required to select the preferred lines. In the present study, eighteen Iranian and exotic cytoplasmic male sterile lines of different cytoplasmic origins and their maintainers (B line) and one thermosensitive genetic male sterile (TGMS) line, TG51, were tested in a randomised complete block design. The use of molecular markers based on PCR was investigated to assess their purity. The results showed significant differences in plant height, flag leaf length, flag leaf width, number of fertile tiller, flower length and width, panicle length, initial panicle condition, percentage of allogamy, total number and percentage of panicle fertility. The mean comparison of the traits showed that the selection and prioritization of superior lines according to the percentage of fertility, panicle outgrowth, percentage of allogamy and flower density were related to the traits Fajr A and Neda A and IR58025 A. Due to adequate height, panicle length, number of flowers and higher percentage of allogamy in Dasht B, these lines were included in the seed production program as favorable lines.Molecular tests were performed based on PCR using four markers for purity of the seed parent, CMS and differentiation between male-sterile and maintenance lines. The combination of the CMS and RG136 markers as well as the RMT6 marker made it possible to distinguish between CMS-WA lines and those without male sterility. The results showed that the bands of the drrcms marker discriminate cytoplasmic male sterility lines between different WA, DISSI and Gambiaca sources and generate different monomorphic fragments for each of the male sterile and B lines. Therefore, these markers can be used for genetic purity and possible infection test of seed parents and suitable alternative for GOT.

KEYWORDS

CMS-WA, Cytoplasmic male sterility, Hybrid rice, Molecular marker.

How to cite
Tarang, A., & Sattari, M. (2024). Characterization of new male sterile rice lines and validation of associatedmolecular markers to identify their genetic seed purity. *Crop Biotechnology, 13*(46), 45-57.

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال سیزدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل و ششم، تابستان ۱۴۰۳ (۵۷-۴۵)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۷

DOI: 10.30473/cb.2024.70720.1959

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

تعیین خصوصیات لاین‌های جدید نرعقیم برنج و اعتبارسنجی نشانگرهای مولکولی همبسته برای تشخیص خلوص ژنتیکی بذرآن‌ها

علیرضا ترنگ*، مجید ستاری

موسسه تحقیقات برنج ایران (RRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:
علیرضا ترنگ
رایانامه: a_tarang@hotmail.com

چکیده

استفاده از پدیده هتروزیس در فناوری برنج هیبرید یکی از راه‌های دست‌یابی به افزایش عملکرد در واحد سطح است و ارقام برنج هیبرید موجب افزایش ۳۰-۲۰ درصدی عملکرد نسبت به ارقام اصلاح شده پر محصول می‌گردد. در این مطالعه، خلوص ۱۸ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ایرانی و خارجی و نگهدارنده آن‌ها به همراه یک لاین نرعقیم ژنتیکی به نام TG51 با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR ارزیابی شد. این لاین‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کشت و سپس خلوص آن‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی، ارزیابی شد. مقایسه میانگین صفات نشان داد که لاین‌های برتر از نظر صفات موردمطالعه به ترتیب لاین‌های نرعقیم IR58025A، فجر A و ندا A بودند. جهت بررسی خلوص بذور والد CMS و تمایز بین لاین نرعقیم و نگهدارنده آزمایشات مولکولی با استفاده از ۴ نشانگر مبتنی بر PCR انجام شد. در نشانگر ترکیبی CMS و RG136 و همچنین نشانگر RMT6 بیشترین تمایز بین لاین‌های CMS-WA و نگهدارنده حاصل شد و در منابع دیگر نرعقیمی کارایی نداشتند. اما نتایج حاصل از باندهای تولیدی نشانگر drrcms نشان داد که این نشانگر می‌تواند به خوبی بین تمامی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی از منابع مختلف Gambiaca, Arc, WA و نگهدارنده تمایز ایجاد کند؛ لذا از این نشانگر می‌توان در تست خلوص ژنتیکی و تشخیص آلودگی‌های احتمالی در بذور والدینی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

برنج هیبرید، نرعقیمی سیتوپلاسمی، CMS-WA، نشانگر مولکولی.

استناد به این مقاله:

ترنگ، علیرضا و ستاری، مجید (۱۴۰۳). تعیین خصوصیات لاین‌های جدید نرعقیم برنج و اعتبارسنجی نشانگرهای مولکولی همبسته برای تشخیص خلوص ژنتیکی بذرآن‌ها. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۵۷-۴۵.

مقدمه

برنج بعد از گندم یکی از مهم‌ترین منابع غذایی و تأمین کالری بیش از نیمی از جمعیت جهان است. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت،کاهش زمین‌های زیر کشت، ضرورت افزایش تولید و پایداری این محصول استراتژیک، استفاده از روش‌های نوین جهت تولید بیشتر اجتناب‌ناپذیر است. یکی از این روش‌ها استفاده از فناوری برنج هیبرید است. افزایش عملکرد ارقام هیبرید تا میزان ۲۰ درصد نسبت به ارقام اصلاح شده به روش معمول، سبب توسعه روزافزون آن گردیده است (حسین ۱۹۹۶، پارادو ۱۹۹۸، ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۴). جونز در سال ۱۹۲۶ برای اولین بار پدیده هتروزیس را در برنج گزارش کرد و چین اولین کشوری بود که از این پدیده در تولید برنج هیبرید به صورت تجاری استفاده نمود (معین و همکاران، ۱۹۸۷). از لحاظ تئوری انتظار می‌رود تلاقی بین لاین‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند منجر به هتروزیس بالاتری در نتاج شود. (نیوبری، ۲۰۰۳). اساساً دو روش مختلف برای ایجاد هیبریدهای برنج به کار می‌رود که اولین روش یک سیستم شامل سه لاین (لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) یا A line، لاین نگهدارنده یا B line و لاین برگرداننده باروری یا R line) و دومین روش یک سیستم اصلاح دولاینی نرعقیمی لاین‌های حساس به دما است که در آن تنها دو لاین در تولید برنج هیبرید دخالت دارند. امکان تولید اقتصادی در سیستم اصلاح دولاینی وجود دارد و می‌تواند جایگزین مناسبی به‌جای سیستم سه لاینی گردد (تیاگاراجان و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود سیستم سه‌لاینی (CGMS) پایدارترین و معمول‌ترین سیستم به کار رفته برای توسعه برنج هیبرید در بسیاری از کشورها از جمله چین، ویتنام، هند و بنگلادش می‌باشد. هرچند سیستم‌های نرعقیمی (CMS) مختلفی از قبیل، WA، Arc، GAM و DISSI توسعه یافته وجود دارند اما با این وجود لاین‌های دارای سیتوپلاسم Wild Abortive A عمومی‌ترین لاین‌های مورد استفاده از میان لاین‌های CMS به کار رفته برای توسعه هیبرید سه لاینی در کشورهایی که برنج هیبرید را به صورت تجاری کشت می‌کنند می‌باشند (یوان، ۱۹۹۵). پتانسیل تولید بذر لاین نرعقیم (A line) و همچنین میزان درصد دگرگشنی و یا رفتار مناسب گلدهی لاین نرعقیم و عوامل مؤثر بر آن نقش بسیار مهمی در تولید بذر برنج هیبرید دارد؛ بنابراین تهیه و تولید لاین‌های جدید نرعقیم با قابلیت ترکیب‌پذیری مناسب، پتانسیل بالای دگرگشنی، رفتار مناسب گلدهی، تولید بذور خالص و مقاومت به آفات و امراض علاوه بر افزایش تولید بذر باعث اقتصادی شدن تولید بذر هیبرید برنج می‌گردد. موفقیت در کشت برنج هیبرید به کارایی تکنولوژی تولید بذر در تأمین به موقع بذور با خلوص ژنتیکی بالا وابسته است. برآورد شده است که به ازای هر یک درصد ناخالصی در بذر هیبرید، ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کاهش عملکرد خواهیم داشت (مائو و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از لاین‌های والدینی خالص در تولید بذر هیبرید می‌تواند سطوح خلوص موردنیاز برای بذر هیبرید را تضمین نماید. معمول‌ترین آلودگی‌هایی که در تولید بذر هیبرید مشاهده می‌گردد مربوط به اختلاط لاین‌های نگهدارنده با CMS لاین می‌باشد (شیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). این اختلاط سبب کاهش شدید عملکرد در نسل بعد خواهد شد. امکان تمایز لاین‌های CMS و نگهدارنده قبل از گلدهی وجود ندارد و حذف ناخالصی‌ها نیازمند به کار بیشتر می‌باشد که در نتیجه هزینه تولید بذر هیبرید افزایش یافته و همچنین کیفیت آن نیز کاهش معنی‌داری خواهد یافت. همچنین در روند برنامه تولید برنج هیبرید ارزیابی اولیه از صفات مرتبط با میزان دگرگشنی در لاین‌های نرعقیم، پایداری عقیمی و همچنین میزان خلوص ژنتیکی جهت گزینش لاین‌های مطلوب ضروری است. این مطالعه با هدف ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی، رفتار گلدهی و میزان دگرگشنی لاین‌های جدید نرعقیم سیتوپلاسمی، ارزیابی و اعتبارسنجی تعدادی نشانگر مولکولی همبسته جهت تمایز دقیق بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده آن اجرا گردید.

پیشینه پژوهش

در سه دهه اخیر کشورهای مختلف جهان به ویژه کشورهای آسیایی بسته به شرایط و نیازهای خود اقدام به معرفی ارقام برنج هیبرید نمودند. ارقام هیبرید NSIC Rc114H،PSB Rc26H، PSB Rc72H و NSIC Rc116H از جمله مهم‌ترین ارقام معرفی شده در کشور فیلیپین می‌باشند. رقم PSB Rc72 در مؤسسه تحقیقات برنج فیلیپین در آزمایش‌های مزرعه‌ای مقایسه عملکرد، ۱۲ تن در هکتار محصول تولید نمود که نسبت به متوسط عملکرد در این کشور (۳۲۵۰ کیلوگرم در هکتار) بسیار بیشتر بود. متوسط عملکرد این رقم در مزرعه کشاورزان، ۱۰/۶ تن در هکتار بود محققان این کشور معتقدند که با اختصاص ۱/۴

میلیون هکتار از شالیزارهای این کشور به کشت ارقام برنج هیبرید نه‌تنها می‌توانند در تولید برنج خودکفا شوند؛ بلکه قادر به صادرات این محصول نیز می‌باشند (دلاکروز، ۲۰۰۳). در آزمایشی در ایری[1] رقم خالص IR72 و هیبرید IR75217H در ۴ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه آن افزایش معنی‌دار عملکرد رقم هیبرید بود. در این آزمایش که نقش تعداد پنجه در افزایش عملکرد با تیمارهای سنین مختلف گیاهچه (۷، ۱۴ و ۲۱ روزه) و تعداد بوته در مترمربع در دو سطح ۲۵ و ۵۰ عدد مورد ارزیابی قرار گرفته بود، رقم هیبرید به دلیل کنترل مناسب پنجه‌زنی و عدم تولید پنجه‌های غیرمؤثر توانست مواد پرورده اندوخته شده را به سمت پنجه‌های مؤثر هدایت نموده و موجب افزایش عملکرد گردد (لافارج و همکاران، ۲۰۰۴).

اولین فعالیت تحقیقاتی در خصوص برنج هیبرید در ایران از سال زراعی ۱۳۶۶ در دانشکده کشاورزی ساری و مؤسسه تحقیقات برنج آمل در مازندران با واردکردن دو لاین نرعقیم سیتوپلاسمی به نام‌های V20A و W32A شروع شد (نعمت‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵) همچنین جهت ارزیابی تعدادی از لاین‌های برنج هیبرید آزمایش مقدماتی مقایسه عملکرد با تعداد شش ژنوتیپ هیبرید، هفت لاین والدینی و رقم خزر به عنوان شاهد اجرا شد و نتایج نشان داد که لاین هیبرید (IR58025A/IR42686R) با عملکرد ۷۳۴۵ کیلوگرم در هکتار و هتروزیس استاندارد ۵۶ درصد نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری قابل توجهی داشت (درستی، ۱۳۸۱). در مطالعه ترکیب‌پذیری تعدادی از ارقام برنج در موسسه تحقیقات برنج کشور چهار لاین هیبرید که از نظر زودرسی و پتانسیل عملکرد دانه برتری چشمگیری نسبت به سایر ارقام داشتند، شناسایی شدند. همچنین در آزمایش دیگری هیبرید امیدبخش IR58025A/IR42686R با عملکرد ۷-۸/۵ تن در هکتار و سازگاری مناسب در مناطق مختلف مورد توجه قرار گرفت و هتروزیس این هیبرید از ۲۴/۵ تا ۴۶ درصد برآورد گردید. با توجه به مطلوب بودن عوامل کیفی، هیبرید مذکور در سال ۱۳۸۹ به عنوان رقم هیبرید دیلم به جامعه کشاورزان معرفی شد (درستی، ۱۳۸۹).

ضعف شکم سفیدی، پوکی، درصد خرد بالای دانه و نیز دیررس بودن ارقام برنج هیبرید، بزرگ‌ترین عیب آن‌ها محسوب می‌شود که توسعه و ترویج این نوع ارقام را به چالش می‌کشد(ستاری، ۱۳۹۷). از این رو ضرورت اصلاح لاین‌های جدید هیبرید و بهبود نقاط ضعف آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و مورد توجه به‌نژادگران می‌باشد. روش معمول برای تست خلوص بذر، روش GOT (Grow-Out-Test) می‌باشد. تست GOT شامل ارزیابی ویژگی‌های متعدد مورفولوژیکی و گلدهی در گیاهان بالغ برای تمایز هیبریدها است (ورما، ۱۹۹۶، یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲). با این وجود روش GOT به دلیل متاثر بودن از شرایط محیطی و نیاز به گذار از مرحله نموی خاص ناکارمد است از اینرو استفاده از نشانگرهای DNA برای تست خلوص بذر پیشنهاد شده است، زیرا از این روش می‌توان برای ارزیابی دقیق و سریع ژنوتیپ یک گیاه استفاده کرد. یاشیتولا و همکاران با یک نشانگر SSR مبتنی بر PCR، مطالعاتی روی تمایز لاین‌های برنج با سیتوپلاسم WA از لاین‌های نگهدارنده هم‌جنس‌شان انجام دادند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). سوندارام و همکاران، زینیان و همکاران از نشانگرهای SSR جهت تمایز لاین‌های والدینی هیبرید و نیز ارزیابی خلوص بذور هیبرید استفاده کردند (سوندارام و همکاران، ۲۰۰۸، زینیان و همکاران، ۲۰۰۵). نیرمالا و همکاران جهت تمایز بین CMS لاین‌ها و نگهدارنده‌های مربوط به آن‌ها از نشانگرهای AFLP استفاده کردند(نیرمالا و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه‌ای دیگر نشانگرهای ریز ماهواره و STS برای تمایز بین CMS لاین و نگهدارنده‌ها، برگردانده باروری و هیبرید، غربال شده‌اند و سودمند بودن آن‌ها را برای برآورد خلوص بذور هیبرید گزارش کرده‌اند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲) همچنین از نشانگرهای STMS برای انگشت‌نگاری برنج‌های هیبرید و لاین‌های والدینی‌شان استفاده گردید و پس از تأیید نتایج با تست GOT از آن‌ها برای تست خلوص ژنتیکی بذور هیبرید استفاده شد (ناندا کومار و همکاران، ۲۰۰۴). راجندراکومار و همکاران یک توالی DNA میتوکندریایی را برای تمایز بین لاین‌های CMS و نگهدارنده هم‌جنس‌شان شناسایی کردند و بیان کردند که به کارگیری این مارکر به‌عنوان جایگزینی برای اصول مورفولوژی GOT در آشکارسازی دقیق آلودگی در پایه بذور CMS امکانپذیر می‌باشد (راجندراکومار و همکاران ، ۲۰۰۷).

روش‌شناسی پژوهش

این آزمایش با هدف ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی رفتار گلدهی و میزان دگرگشنی لاین‌های جدید نرعقیم سیتوپلاسمی، ارزیابی و اعتبارسنجی چهار نشانگر مولکولی همبسته جهت تمایز

1. International Rice Research Institute (IRRI)

دقیق بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده آن اجرا گردید. در تحقیق حاضر دو لاین جدید نرعقیم سیتوپلاسمی به نام‌های فجر A و شیرودی A حاصل از تلاقی برگشتی بین ارقام فجر و شیرودی با لاین نرعقیم IR58025A و اولین لاین نرعقیم ژنتیکی حساس به درجه حرارت (TGMS) ایرانی بنام TG51 حاصل از القای موتاسیون با گاما 250GY در رقم نعمت (سیه‌چهره و همکاران، ۱۴۰۲) به همراه تعداد ۱۶ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی خارجی و ایرانی از منابع سیتوپلاسمی مختلف و لاین‌های نگهدارنده آن‌ها جمعاً به تعداد ۱۹ لاین از نظر خصوصیات زراعی و رفتار گلدهی شامل صفات ارتفاع بوته (سانتی‌متر) طول برگ پرچم (سانتی‌متر)، عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)، تعداد پنجه بارور، طول گلچه (سانتی‌متر)، عرض گلچه (سانتی‌متر)، طول خوشه (سانتی‌متر)، وضعیت خروج خوشه و درصد دگرگشنی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در سه تکرار ارزیابی شدند. داده‌های حاصل از اندازه گیری صفات با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لیست لاین‌های نر عقیم مورد مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است.

کلیه لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده به صورت مجزا و ایزوله در کنار هم مورد کشت قرار گرفتند و توسط چتایی از هم جدا شدند. روش کشت به صورت نشایی بوده و برای این کار در نیمه اول فروردین بذور A line و B line به میزان حدود ۱۰۰ گرم در متر مربع به طور جداگانه در خزانه به صورت ایستگاهی با پوشش پلاستیکی بذر پاشی شدند. برای خزانه A line جهت جلوگیری از تداخل بذر ، بذر پاشی در کرت‌هایی با فاصله پنج متر از هم رعایت شد. همزمان با رشد گیاهچه در خزانه اقدام به آماده سازی زمین اصلی نموده و کاملاً تسطیح و آب تخت شد. وقتی که گیاهچه‌ها به حدود چهار برگی رسیدند و قبل از پنجه زنی در خزانه، گیاهچه‌های والد نر عقیم (A line) و لاین نگهدارنده (B line) با سن حدود ۲۵ روزه نشاکاری شدند. همچنین به منظور اعتبار سنجی، نشانگرهای مولکولی همبسته جهت ارزیابی خلوص ژنتیکی بذور لاین‌های CMS و تمایز بین لاین نرعقیم و نگهدارنده آن‌ها استفاده گردید. در این تحقیق از ۴ نشانگر مبتنی بر PCR شامل نشانگرهای ترکیبی CMS (سیتوپلاسمی)، RG136 (هسته‌ایی)، RMT6 (هسته‌ایی) و drrcms (سیتوپلاسمی) جهت تست خلوص ژنتیکی و تشخیص آلودگی‌های احتمالی در بذور والدینی و تمایز بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده آنها استفاده شد(جدول ۲).

جدول ۱. لاین های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده مورد مطالعه

Table 1. Cytoplasmic male sterile and maintainer rice lines studied

لاین نرعقیم A line	منبع عقیمی source	لاین نگهدارنده B line	وضعیت Condition
فجر A	CMS-WA (IR58025A × فجر)	فجر B	Maintainer
شیرودی A	CMS-WA (IR58025A × شیرودی)	شیرودی B	Maintainer
نعمت A	CMS-WA (IR58025A × نعمت)	نعمت B	Maintainer
ندا A	CMS-WA (IR58025A × ندا)	ندا B	Maintainer
هراز A	CMS-WA (IR58025A × هراز)	هراز B	Maintainer
دشت A	CMS-WA (IR58025A × دشت)	دشت B	Maintainer
چمپا A	CMS-WA (IR58025A × چمپا)	چمپا B	Maintainer
IR 58025 A	CMS-WA	IR 58025 B	Maintainer
IR 68897 A	CMS-WA	IR 68897 B	Maintainer
IR73328 A	MUTANT IR62829 B	IR73328 B	Maintainer
IR 68885 A	MUTANT IR62829 B	IR 68885 B	Maintainer
IR 68902 A	CMS-WA	IR 68902 B	Maintainer
IR 68899 A	CMS-WA	IR 68899 B	Maintainer
IR 75596 A	CMS-WA	IR 75596 B	Maintainer
IR 79124 A	MUTANT IR62829 B	IR 79124 B	Maintainer
IR 78376 A	Gambiaca	IR 78376 B	Maintainer
IR 75601 A	CMS-DISSI	IR 75601 B	Maintainer
IR78328 A	CMS-WA	IR78328 B	Maintainer
TG 51	Nemat TGMS		

جدول ۲. اطلاعات نشانگرهای مورد مطالعه

Table 2. Information of the studied markers

نشانگر Primer	آغازگر رفت Forward	آغاز گر برگشت Reverse	منبع Refrance
CMS	ACTTTTTGTT TTTGTGTAGG	TCCCAGAAAGCTACTACAGC	(یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴)
RG136	TCCCAGAAAGCTACTACAGC	GCAGACTCCAGTTGACTTC	(فا و لانگ، ۲۰۰۴)
RMT6	GATGGTTTGGAAGGCTG	GGGTTTAGAGTCGCCAC	(احمدی‌خان و همکاران، ۲۰۱۵)
Drrcmc	ACCTTTGGGCGATGGTT	GGGTTTAGAGTCGCCAC	(احمدی‌خان و همکاران، ۲۰۱۵)

از هر یک از لاین‌ها نمونه برگ‌های جوان بوته به مقدار لازم برای استخراج DNA برداشت و پس از قرار گرفتن درون فویل‌های ۱۵×۱۵ سریعاً به فلاسک یخ منتقل گردید و در پایان کار به فریزر ۷۰- درجه سلیسیوس انتقال داده شد تا در فرصت مناسب DNA استخراج گردد. استخراج DNA به روش CTAB و با تغییراتی انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم ، ۰/۴ میلی مول دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPS)، یک واحد DNA پلیمراز و ۰/۲۵پیکومول از هر آغازگر انجام شد. چرخه های حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۴ چرخه و اسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵/۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. الگوی نواربندی ایجاد شده توسط نشانگرها برای تشخیص لاین‌های نرعقیم (A line) از نگهدارنده (B line) در برنج به کار گرفته شد. محصولات تکثیر شده در روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ران و رنگ آمیزی بوسیله محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میکرولیتر) انجام شد. عکسبرداری با استفاده از دستگاه eGel documenter در زیر نور UV صورت پذیرفت.

یافته‌های پژوهش

مطالعه و بررسی برخی خصوصیات مورفولوژیکی لاینهای نرعقیم سیتوپلاسمی (A line) لاین

در این پژوهش، تعدادی از خصوصیات مورفولوژیکی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (A Line) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که برای صفات ارتفاع بوته، تعداد پنجه بارور، سطح برگ پرچم، طول خوشه و درصد خروج خوشه از غلاف، اثرات معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین(جدول۴)، لاین‌های نرعقیم IR68885A، IR58025A و ندا A دارای کوتاهترین ارتفاع بودند. همچنین، تعداد پنجه‌های بارور در لاین‌هایی که دارای ارتفاع کمتری بودند، مانند IR58025Aو ندا A، بیشتر بود. این امر ظرفیت تولید بذر بیشتر را ممکن می‌سازد. سطح برگ پرچم از صفات مهم در فتوسنتز و پر شدن دانه‌ها پس از لقاح است. با وجود اینکه در تولید بذر هیبرید قسمتی از برگ پرچم حذف می‌شود (به دلیل انتقال بهتر دانه گرده بر روی کلاله مادگی)، اما نقش آن انکارناپذیر است. با توجه به جدول ۴ لاین‌های IR58025A و IR68902A بیشترین و لاین IR68899A کمترین سطح برگ را داشتند.در این تحقیق صفات خروج خوشه از غلاف و ریشک نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد خروج کامل خوشه از غلاف از صفات مطلوب A لاین‌ها است. لاینی که خروج خوشه بیشتری داشته باشد، تعداد گلچه بیشتری در معرض محیط قرار می‌دهد و بنابراین تعداد دانه نوکلئوس بیشتری قابلیت تولید پیدا می‌کند. در این میان، لاین‌های چمپاA، هراز A و IR75601A دارای بیشترین طول خوشه و لاین IR68899A دارای کوتاهترین طول خوشه بود. صفت تعداد کل گلچه و همچنین تعداد دانه بارور و عقیم نقش تعیین‌کننده و مستقیمی در عملکرد دارند. با توجه به عقیم بودن لاین‌های A، میزان دانه‌های بارور تشکیل شده در آن بسیار پایین است. بنابراین، باید لاین‌هایی که دارای درصد دگرگشنی بالاتری هستند جهت والدین تولید بذر انتخاب نمود. لاین‌های IR68885A و فجر A دارای بیشترین میزان دگرگشنی بودند. با توجه به جدول ضرایب همبستگی (جدول ۵)، صفت ارتفاع بوته با صفات طول خوشه و سطح برگ پرچم همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد. از طرفی، طول

خوشه با سطح برگ پرچم نیز همبستگی معنی‌دار دارد. همچنین، طول برگ پرچم با میزان عقیمی دانه همبستگی منفی دارد. تعداد گلچه‌های تشکیل شده بر روی خوشه‌ها نیز با طول و عرض دانه‌ها همبستگی منفی معنی‌داری دارد. گزینش و اولویت‌بندی لاین‌های برتر مورد مطالعه از نظر صفات مورد مطالعه نظیر درصد باروری، خروج خوشه از غلاف، درصد دگرگشنی و تعداد گلچه به ترتیب مربوط به IR58025A، فجرA و ندا A است. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به محدودیت‌های موجود در تکثیر لاین‌های نرعقیم، از جمله دستیابی به میزان قابل قبولی از تلاقی مؤثر و تشکیل بذر در فرایند گرده‌افشانی، لازم است جهت رفع این نقیصه، لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده دارای خصوصیات مطلوب مورفولوژیکی و آلوگامی باشند یا در این راستا اصلاح شوند.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی لاین‌های نرعقیم برنج مورد مطالعه

Table 3. Analysis of variance for morfological traits in male sterile rice lines studied

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)										
		ارتفاع بوته Plant height	تعداد پنجه Tiller number	طول برگ پرچم Flag leaf length	عرض برگ پرچم Flag leaf width	طول خوشه Panicle length	تعداد گلچه number of flowers	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	طول دانه Grain length	عرض دانه Grain width	درصد دگرگشنی Cross fertilization (%)
لاین Line	۱۸	۴۸۳/۱۷**	۶۶/۰۳**	۱۰۸/۶۱**	۰/۰۷۰**	۱۸/۶۶**	۱/۶۶**	۳۳۷۳/۷۱**	۱۸۶/۶۶**	۴۲۷۷/۶۰۰**	۰/۰۹۸**	۴۸/۰۰**
تکرار Replication	۲	۱۳۶/۱۲*	۱۱/۵۲	۴۹/۹۴	۰/۰۰۵	۰/۶۱	۱۰۷۲/۶۰	۱۸/۸۰	۹۹۱/۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۶۱	۶/۰۲
اشتباه آزمایشی Experimental error	۳۶	۳۰/۹۲	۴۲/۲۷	۲۴/۸۰	۰/۰۰۸	۲/۴۸	۶۸۵/۴۳	۲۸/۴۵	۹۱۸/۸۵	۰/۰۰۲	۰/۰۳۴	۹/۳۲
ضریب تغییرات (CV)		۷/۶	۹/۴	۲/۶	۸/۴	۴/۸	۱۹/۳	۱۸/۲	۱۵/۴	۹/۷	۱۲/۳	۸/۶

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و یک درصد، ns: غیر معنی دار

ns: Not significant, * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۴. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی لاین های نرعقیم سیتوپلاسمی برنج

Table 4. Mean comparison of morfological traits in male sterile rice lines studied

لاین‌های A A lines	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)	تعداد پنجه Tiller number	طول برگ پرچم (سانتی‌متر) Flag leaf length(cm)	عرض برگ پرچم (سانتی‌متر) Flag leaf width(cm)	طول خوشه(سانتی‌متر) Panicle length(cm)	تعداد گلچه number of flowers	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	طول دانه (میلی‌متر) Grain length (mm)	عرض دانه (میلی‌متر) Grain width(mm)	درصد دگرگشنی cross fertilization (%)
IR 58025 A	81.33 e	35.7 a	43 a-c	1.57 ab	25.07 f-i	219.33 b-g	4 c-e	215.67 a-f	2.5 bc	1.02 c-e	1.9 de
IR شیرودی A	91.33 c-e	29.33 b-d	c–42.17 a	1.5abc	25.47 e-i	276.33 a	1.33 de	249.33 abc	2.4 c	1.1 abc	0.5 e
فجرA	b 102	25.33 a-d	41.7 a-c	1.37 cd	29.53 bc	i۶۷152/	17 b	124.33 g	2.5 bc	1.12 ab	11.4 ab
نعمتA	101.33 b	23.33 a-d	48 a	1.27 d-e	32.6 a	193.33 ei	1 de	192.67 c-f	2.67 abc	1.13 a	0.53 e
ندا A	86.33 d-g	30.33 a-c	31.7 ef	1.4 b-d	27.77 b	162.33 h-i	10 b-e	126.67 g	2.67 abc	1.1 abc	6.63 b-d
هراز A	119 a	20.7 b-d	47 ab	1.4 b-d	30.4 ab	252 a-d	12.33 bc	239.67 a-d	2.5 bc	1.1 abc	5.2 c-e
دشت A	119 a	24.7 a-d	c–41.33 a	1.4 b-d	28.17 b-e	227.33 a-g	9.33 b-e	217.33 a-f	2.5 bc	1.08 a-d	4.03 c-e
چمپا A	114 a	22.7 b-d	38 b-e	1.57 ab	28.97 b	257.6 abc	3 c-e	255 ab	2.5 bc	1.02 c-e	1.13 d-e
IR 78378 A	78.7 g	19 b-d	32 d-f	1.47 abc	22.7 i	219.33 b-g	6.67 c-e	212.33 a-f	2.5 bc	1.03 c-e	3.17 c-e
IR 68897 A	91 c-e	21.7 b-d	34.17 c-	1.23 d-e	29.33 bc	234.67 a-f	4 c-e	230.67 a-e	2.67 abc	1 de	1.77 de
IR 68885 A	88 d-g	31.33 ab	47.17 ab	1.2 e	26.23 d-h	211.33 c-h	30.67 a	175 e-g	2.5 bc	1.01 de	14.53 a
IR 79124 A	94.7 b-d	25 a-d	38.7 a-e	1.23 d-e	24.8 g-i	180.67 g-i	0.33 e	202.67 b-f	2.83 ab	1.05 a-e	0.13 e
IR 68902 A	92.33 b-d	18 cd	31 ef	1.43 abc	27.8 b-g	226.33 a-g	2.33 c-e	224.33 a-f	2.5 bc	1.01 de	1.13 de
IR 78376 A	96.33 b-d	2.33 b-d	−33.33 c	1.6 a	28.54 b	264 ab	1 de	262.33 a	2.5 bc	1.08 a-d	0.33 e
IR 75601 A	88.33 d-g	21.7 b-d	39 a-e	1.47 abc	29.9 abc	241.67 a-e	9.67 b-e	208.33 a-f	2.5 bc	1 de	4.03 c-e

5.77 c-e	1.03 b-e	2.5 bc	169.67 fg	11.33 bc	201.33 d-i	24.4 hi	1.1 e	5.26 f	25.7 a-d	−33.79 f	IR 68899 A
2.30 de	0.97 e	2.5 bc	186.33 def	3.67 c-e	118.33 fi	25.03 f-i	1.43 abc	43a-c	20.33 b-d	113 a	IR 73328 A
8.37 bc	0.98 e	2.83 ab	211 a-f	18.33 b	229.67 a-g	27.06 cg	1.5 abc	−41.33 a	16.7 d	95.7 b-d	IR78328 A
0.17 e	1.13 a	3 a	200.67 b-f	0.33 e	201 d-i	28.03 bf	1.23 de	38 b-e	23.33 a-d	89.33 d-f	TG 51

در هر ستون حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد به کمک آزمون دانکن است.

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan test.

جدول ۵. ضرایب همبستگی بین صفات مرفولوژیکی مختلف در لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی برنج

Table 5. Correlation coefficients between different morphological traits in male sterile rice lines studied

صفات Traits	ارتفاع بوته Plant height	تعداد پنجه Tiller number	طول برگ پرچم Flag leaf length	عرض برگ پرچم Flag leaf width	طول خوشه Panicle length	تعداد گلچه number of flowers	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	طول دانه Grain length	عرض دانه Grain width	درصد دگرگشنی cross fertilization (%)
ارتفاع بوته Plant height	1.00										
تعداد پنجه Tiller number	-0.15	1.00									
طول برگ پرچم Flag leaf length	0.44 **	0.16	1.00								
عرض برگ پرچم Flag leaf width	0.31 **	0.13	-0.01	1.00							
طول خوشه Panicle length	0.44 **	-0.12	0.35**	-0.17	1.00						
تعداد گلچه number of flowers	0.14	-0.23*	0.07	0.09	0.14	1.00					
تعداد دانه های بارور Filled grain number	-0.04	0.21	0.19	-0.18	-0.07	-0.16	1.00				
تعداد دانه عقیم Sterile grain number	0.22	-0.30*	0.08	0.17	0.11	0.87**	-0.37**	1.00			
طول دانه Grain length	0.13	0.08	0.15	0.03	0.34**	-0.15	-0.18	-0.05	1.00		
عرض دانه Grain width	0.09	-0.21	0.02	-0.26*	-0.10	-0.40**	-0.15	-0.21	-0.03	1.00	
درصد دگرگشنی cross fertilization (%)	-0.06	0.24*	0.14	-0.13	-0.06	-0.31*	0.97**	-0.50**	-0.08	-0.13	1.00

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و یک درصد، ns: غیر معنی دار

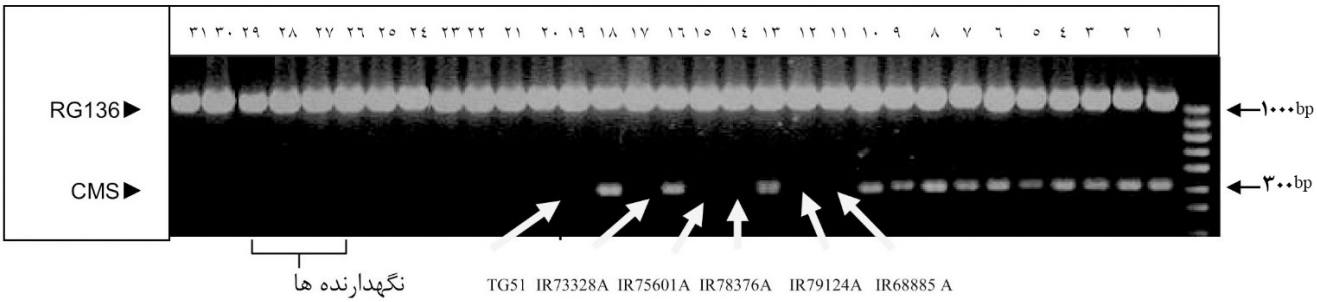
ns: Not significant, * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

ارزیابی مولکولی لاینهای نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده های مربوط به آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR

استفاده از نشانگر CMS به صورت ترکیبی با نشانگر RG136

نشانگر CMS یک نشانگر طراحی شده از آغازگر RM9 می‌باشد که یک قطعه ۳۸۶ جفت بازی از لاین‌های نرعقیم ایجاد می‌کند، در حالیکه هیچ باندی از نگهدارنده‌ها تولید نمی‌گردد. به‌منظور رفع این نقیصه و اطمینان از کارایی بهتر، در این مطالعه از آغازگر ترکیبی دیگری به نام RG136 استفاده شد که یک قطعه Kb ۱/۱ برای تمامی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده را ایجاد می‌نماید (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). در این مطالعه، تمامی لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده با استفاده از نشانگر RG136 یک قطعه Kb ۱/۱ تولید کردند. در مقابل، با استفاده از نشانگر CMS، تنها یک قطعه bp ۳۸۶ در لاین‌های نرعقیم CMS-WA ایجاد شد و در سایر لاین‌ها از جمله نرعقیم CMS، dissi و GAM و لاین TG ۵۱ و نگهدارنده‌های آن‌ها، هیچ باندی ایجاد نشد. لاین‌های IR58025A، فجر A، نعمت، ندا A، هراز A، دشت A، چمپا A، IR68902، A IR79124،

IR68897 A، IR78378A، IR78376 A همگی با سیستم CMS-WA یک قطعه ۳۸۶bp را نشان دادند. از آن‌جا که لاین‌های IR68885A (موتانت)، IR79124 A (موتانت)، IR73328A (موتانت)، IR78376 A (GAM)، IR75601 A (dissi) و لاین TG51 به همراه تمامی نگهدارنده‌های موجود، باندی نشان ندادند(شکل ۱) ، مشخص می‌شود که از این دو نشانگر ترکیبی تنها برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی با سیستم WA می‌تواند کارآمد باشد.



شکل ۱. الگوی باندی ایجاد شده از نشانگرهای ترکیبی CMS و RG136: همه لاین ها با استفاده از نشانگر RG136 قطعه مونومورف نشان دادند. با نشانگر CMS تنها لاین های CMS-WA باند نشان داده ولی بقیه شامل GAM،dissi، موتانت و لاین TG51 باندی نشان ندادند.

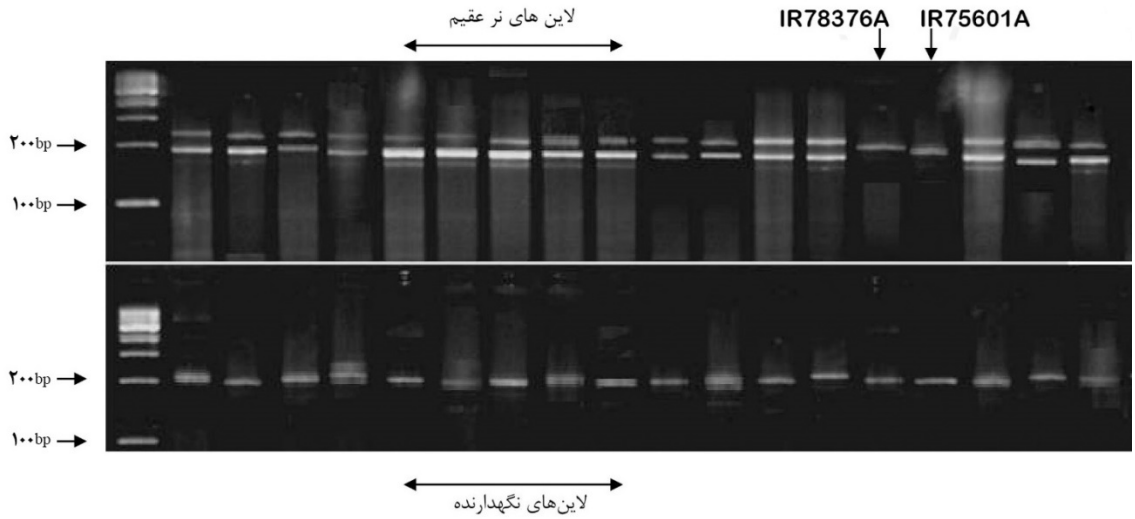
Figure 1. Banding pattern obtained using combined CMS and RG136 markers: All lines showed monomorphic fragment using RG136 marker. Using the CMS marker, only CMS-WA lines showed a band, but the others including GAM, dissi, mutant and TG51 line did not show a band.

نشانگر RMT6

نشانگر RMT6 یک نشانگر است که در لاین‌های نرعقیم قطعات حدود ۱۹۷bp و ۲۱۱bp را تولید می‌کند. این نشانگر در لاین‌های نگهدارنده نیز یک قطعه حدود ۲۰۹bp تولید می‌نماید (راجندر اکومار و همکاران، ۲۰۰۷). با استفاده از این نشانگر بر روی نمونه‌های DNA ژنومی لاین‌های مورد مطالعه، قطعات حدود ۱۹۷ bp و ۲۱۱ bp در لاین‌های CMS-WA و موتانت به دست آمد و یک قطعه ۲۰۹bp در تمامی لاین‌های نگهدارنده تولید گردید (شکل ۲). با این حال، در لاین‌های نرعقیم با سیستم‌های dissi و GAM، قطعه ضعیف ۲۰۹bp حاصل گردید که ممکن است به دلیل تفاوت منابع سیتوپلاسمی و نرعقیمی باشد. همچنین، در مورد لاین TG51 هیچ باندی مشاهده نشد و دلیل آن این است که این یک نرعقیم ژنتیکی است و با سایر لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی متفاوت است. این نشانگر قادر به تمایز لاین‌های (dissi) IR75601، (GAM) IR78376 A از نگهدارنده‌های آنها نمی‌باشد.

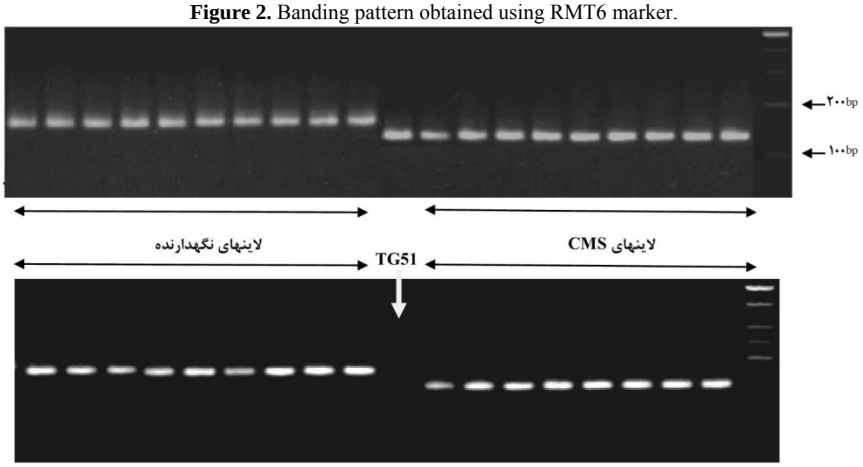
نشانگر drrcms

با انجام توالی‌یابی بر روی قطعات حاصل از نشانگر RMT6 و انجام بررسی‌های بیشتر، یک نشانگر به نام drrcms طراحی شد که توانایی تفکیک بین لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده آنها را دارد (راجندراکومار و همکاران، ۲۰۰۷). با اجرای واکنش PCR با استفاده از این آغازگر بر روی DNA ژنومی لاین‌های مورد استفاده در این تحقیق، قطعات باندی با اندازه‌های مختلف برای لاین‌های نرعقیم (تقریباً ۱۵۰bp) و لاین‌های نگهدارنده (تقریباً ۱۵۷bp) مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل ۲. الگوی باندی ایجاد شده با نشانگر RMT6

Figure 2. Banding pattern obtained using RMT6 marker.



شکل ۳. الگوی باندی ایجاد شده با نشانگر drrcms. لدر 100bp(100bp-500bp)

Figure 3. Banding pattern obtained using drrcms marker. 100bp ladder (100bp-500bp)

همچنین، توانستیم این تمایز را برای لاین‌های نرعقیم سیستم‌های دیگر نیز مشاهده کنیم، که این امر توانایی گسترده استفاده از این نشانگر را برای بررسی خلوص لاین‌های والدینی هیبرید در منابع مختلف نشان می‌دهد. با این حال، در مورد لاین TG51 به دلیل متفاوت بودن نوع عقیمی آن، تمایزی حاصل نشد و باید از نشانگرهای اختصاصی‌تر استفاده شود. این نشانگر در مقایسه با نشانگرهای SSR که هتروزیگوتی را نشان می‌دهند، تنها یک باند ایجاد می‌نماید که تجزیه و تحلیل و استفاده از آن را آسان‌تر و گسترده‌تر می‌کند. به نظر می‌رسد این ویژگی در این نشانگر، سبب می‌شود که از آن در تشخیص اختلاط بذور لاین‌های نرعقیم و همچنین بررسی خلوص بذور تولیدی، به ویژه برای مؤسسات تولید بذر، استفاده شود و نیاز به آزمایش با روش‌های هزینه‌بر و زمان‌بر GOT را از بین ببرد.

بحث و نتیجه‌گیری

لاین‌های نرعقیم با خصوصیات مورفولوژیکی مطلوب مانند ارتفاع کوتاه، تعداد پنجه بارور بالا و درصد دگرگشنی بالا می‌توانند در تولید بذر هیبرید برنج کارآمد باشند(چن و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین تشخیص اختلاط بذر لاین‌های نرعقیم و اطمینان از خلوص بذرهای تولیدی برای حفظ یکپارچگی و کیفیت ارقام زراعی حیاتی است. نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای ضروری در این زمینه ظهور کرده‌اند و روشی دقیق و کارآمد برای شناسایی صفات ژنتیکی و تمایز بین ژنوتیپ‌های مختلف ارائه می‌دهند. نشانگرهای مولکولی مانند ریزماهواره‌ها (SSRs)، چندریختی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) و چندریختی طول قطعه تکثیرشده (AFLPs) راهکارهای منحصربه‌فردی را

ارائه می‌دهند که می‌توان از آن‌ها برای ایجاد تمایز در زمینه‌های ژنتیکی مختلف بهره برد (چودهری و همکاران، ۲۰۲۲). نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) ابزاری مهم در تولید بذر هیبرید برنج است با این حال، لاین‌های نرعقیم به دلیل عقیمی ، نیاز به گرده افشانی دستی دارند و تکثیر آن‌ها دشوار است. در این مطالعه، خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی ۱۹ لاین جدید نرعقیم سیتوپلاسمی و لاین‌های نگهدارنده آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.یافته‌های این مطالعه نشان داد نشانگر CMS که شامل آغازگر RM9 است، برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی با سیستم WA از سایر لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده‌ها کارآمد نیست. این نشانگر فقط یک قطعه 386bp در لاین‌های نرعقیم WA-CMS ایجاد می‌کند، در حالی که در سایر لاین‌های نگهدارنده هیچ باندی ایجاد نمی‌شود. در مقابل، نشانگر ترکیبی RG136 که توسط یاشیتولا (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴) معرفی شد، برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده‌ها از یکدیگر موثرتر بود. مطالعات نشان داده است نشانگرهای مولکولی مانند نشانگر CMS و نشانگر RG136 در ترکیب با هم می توانند برای تأیید خلوص و شناسایی بذور هیبریدی استفاده شوند (گو و همکاران، ۲۰۲۲). استفاده ترکیبی از این نشانگرها محققان را قادر می‌سازد تا با ایجاد پروفایل های مولکولی ، هیبریدهای واقعی را در بذور از ناخالصی ها متمایز کنند(نایاک و همکاران، ۲۰۱۵). این رویکرد اصالت دانه های هیبریدی را تضمین می کند که برای تولید و توزیع بذر تجاری حیاتی است. تکثیر نشانگر RMT6 نیز در بین انواع مختلف لاین‌های برنج CMS و نگهدارنده نشان دهنده چند شکلی بین تمام لاین‌های WA-CMS و نگهدارنده‌های آن‌ها بود که دو قطعه در لاین CMS و یک قطعه را در لاین نگهدارنده تکثیرمی‌کرد(کوشتا و همکاران، ۲۰۱۴). با این وجود در مطالعه ما این نشانگر قادر به تمایز لاین‌های IR75601 (dissi)، IR78376 A (GAM) از نگهدارنده‌های آن‌ها نبود. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نشانگر توسعه یافته drrcms نسبت به نشانگر CMS که توسط یاشیتولا معرفی شد، برتری قابل توجهی دارد. این برتری به این دلیل است که این نشانگر می تواند بر اساس اندازه های متفاوت قطعات، لاین WA-CMS را از نگهدارنده های خویشاوند آنها تشخیص دهد، در حالی که نشانگر CMS نیاز به ترکیب شدن با یک نشانگر اختصاصی ژنوم هسته ای دیگر دارد (رودونی و همکاران، ۲۰۱۱). از اینرو نشانگر drrcms به دلیل سادگی و کارایی بالا، می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب برای بررسی خلوص ژنتیکی لاین‌های نرعقیم در مؤسسات تولید بذر مورد استفاده قرار گیرد. از جمله دیگر مزایای نشانگر drrcms می‌توان تمایز دقیق بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده نام برد که این نشانگر را به جایگزینی مناسب برای روش‌های مبتنی بر GOT تبدیل می‌کند.

پیشنهادات برای تحقیقات آینده

مطالعه و ارزیابی لاین‌های جدید نرعقیم سیتوپلاسمی در شرایط محیطی مختلف می‌تواند به درک بهتری از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رفتاری این لاین‌ها در مقابل متغیرهای محیطی کمک کند. همچنین، بررسی اثرات متقابل بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده آنها می‌تواند اطلاعاتی ارزشمند درباره تأثیرات تعاملی بین این دو لاین ارائه دهد. همچنین برای مطالعات آینده با توجه به اینکه خصوصیات لاین‌های A و B ارزیابی شده ا ست پیشنهاد می‌شود آزمون GOT با آزمون‌های نشانگرهای ملکولی مقایسه و بر اساس آزمون GOT دقت نشانگرهای مورد ارزیابی قرار گیرد.

همچنین بر اساس یافته های این تحقیق پیشنهاد می‌شود لاین‌های نرعقیم IR58025A، ندا A، فجر A، و لاین نگهدارنده دشت A به عنوان نگهدارنده برای لاین نرعقیم خودشان مورد توجه قرار گیرند. همچنین می‌توان از نشانگر مولکولی drrcms با موفقیت برای تمایز لاین‌های cms و نگهدارنده آنها و نیز تشخیص اختلاط بذور cms از منابع مختلف نرعقیمی سیتوپلاسمی در لاین‌های نرعقیم ایرانی استفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که لاین TG51 و سایر لاین‌های این گروه نیاز به بررسی جداگانه و اختصاصی دارند و نیز بررسی کامل خصوصیات این لاین‌ها، از جمله مورفولوژی و آلوگامی، امکان ارزیابی جامع و دقیق در زمینه بهبود ژنتیکی و استفاده اثربخش آنها در تولید بذر را فراهم می‌کند.

سپاسگزاری

این مقاله نتایج پروژه تحقیقاتی ۹۷۰۴۶۶-۰۲۰-۰۴-۰۴-۰۰ مصوب مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی می‌باشد. از تمام افرادی که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

References

Ahmadikhah, A., Mirarab, M., Pahlevani, M. H., & Nayyeripasand, L. (2015). Marker□assisted backcrossing to develop an elite cytoplasmic male sterility line in rice. The Plant Genome, 8(2), plantgenome2014-07.

Akagi, H., Yokozeki, Y., Inagaki, A., and Fujimura, T. (1996). Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 93: 1071–1077.

Alavi, M., Ahmadikhah, A., Kamkar, B, and Kalateh, M. (2009). Mapping Rf3 locus in rice by SSR and CAPS markers. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 1(7): 121-126.

Chen, Y., Shahid, M. Q., Wu, J., Deng, R., Chen, Z., Wang, L., ... & Liu, X. (2022). Thermo-sensitive genic Male sterile lines of neo-tetraploid rice developed through gene editing technology revealed high levels of hybrid vigor. Plants, 11(11), 1390.

Choudhury, A., Deb, S., Kharbyngar, B., Rajpal, V. R., & Rao, S. R. (2022). Dissecting the plant genome: through new generation molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 69(8), 2661-2698.

Guanghua, H., Lei, H., Yuehua, X., Xiaoying, L., Guoqing, N., Guangwei, Y., and Yan, P. (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.

Guo, Y., Li, B., Li, M., Zhu, H., Yang, Q., Liu, X., ... & Wang, T. (2022). Efficient marker-assisted breeding for clubroot resistance in elite Pol-CMS rapeseed varieties by updating the PbBa8. 1 locus. Molecular Breeding, 42(7), 41.

Hossain, M. (1996). Economic prosperity in Asia: Implications for rice research. P. 316. In G.S. Khush (ed.) Rice Genetics III, Proc.Third Intl. Rice Genet. Symp., Los Ban˜ os, Manila, *the Philippines*. 16–20 Oct. 1995. International Rice Rearch Institute, Manila, the Philippines.

Ichii, M., Hong, D.L., Ohara, Y., Zhao, C.M., and Taketa, S. (2003). Characterization

of CMS and maintainer lines in indica rice (Oryza sativa L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica*. 129: 249–252.

Ingale, B.V., Waghmode, B.D., and Hodawadekar, S.S. (2008). Identification of Restorers and Maintainers for different CMS Lines of Rice. *Madras Agric*. J. 95 (7-12): 266-277.

IRRI. (1994). Lecture notes. *Asian Rice Biotechnology Network* (ARBN).

Jena, K.K., and Pandey, S.K. (1999). DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. *Hybrid Rice News*. l2:13-14.

John Newbury, H. (2003). *Plant molecular breeding*. P, 52.

Kochert, G., Tanksley, S. D., & Price, J. P. (1989). RFLP training course laboratory manual. *Rockefeller Program on Rice Biotechnology, Cornell Univ., Ithaca, NY*, 5-6.

Komori, T., & Nitta, N. (2004). A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR□based markers. *Plant Breeding*, 123(6), 549-553.

Koshta, N., Tetwar, S., & Yadav, P. (2014). Marker Assisted Selection in Hybrid Rice Breeding. Biosciences, 1357.

Mao, C.X., Virmani, S.S., & Kumar, I. (1996). Technological innovations to lower the costs of hybrid rice seed production. P. 111–128.

McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., ... & Blair, M. (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Oryza: from molecule to plant*, 89-99.

Nadakumar, N., Singh, A. K., Sharma, R. K., Mohapatra, T., Prabhu, K. V., and Zaman, F. U. (2004). Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.

Narayanan, K.K., Senthilkumar, P., Venmadhi, S., Thomas, G., and Thomas, J. (1996). *Molecular genetic studies on the rice mitochondrial genome*. P. 689-695.

Nayak, D. K., Pandit, E., Mohanty, S., Barik, D. P., & Pradhan, S. K. (2015). Marker-assisted selection in back cross progenies for transfer of bacterial leaf blight resistance genes into a popular lowland rice cultivar. ORYZA-An International Journal on Rice, 52(3), 163-172.

Pha, N. T., & Lang, N. T. (2004). Marker assisted selection in rice breeding for bacterial leaf blight. Omon rice, 12, 19-26.

Rajendran, N., Gandhimani, R., Singh, S., and Palchamy, K. (2007). Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (Oryza sativa L.). *Euphytica*. 156: 129–139

Rudnóy, S., Páldi, E., Bratek, Z., Lásztity, D., & Rácz, I. (2011). Detection of genome-specific ribosomal DNA sequences from bread wheat by a modified PCR-based method.

Samonte, S. O. P. B., Wilson, L. T., & Medley, J. S. (2010). Heterosis in pre-heading yield-related rice traits. *Texas Rice*, 10(1), 7-11.

Paroda, R. S. (1998). Priorities and opportunities of rice production and consumption in India for self-sufficiency. *Sustainability of rice in the global food system*, 357-390.

Rajendran, N., Gandhimani, R., Singh, S., & Palchamy, K. (2007). Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (Oryza sativa L.). *Euphytica*, *156*(1-2), 129-139.

Sane, A. P., Seth, P., Ranade, S. A., Nath, P., & Sane, P. V. (1997). RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice. *Theoretical and applied genetics*, *95*, 1098-1103.

Sattaryi, M. (2018). Study of quantitative traits and cooking quality of some hybrid rice cultivars in Mazandaran province. *The 18th National Rice Conference*, Sari.

Sundaram, R. M., Naveenkumar, B., Biradar, S. K., Balachandran, S. M., Mishra, B., IlyasAhmed, M., ... & Sarma, N. P. (2008). Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica*, *163*, 215-224.

Siyah Chehreh, Muhammad. Kayani, Ghaffar. Sattari, Majid., Kazemi Tabar, Kamal. Nawabpour, Saeed. (2023). Characterization of temperature-sensitive male sterility gene (TGMS) in Nemat mutant rice. Agricultural Plant Breeding Journal, 15(45), 164-171

Thiyagarajan, K., Manonmani, S., Malarvizhi, D., Robin, S., Pushpam, R., & Sundaram, K. M. (2010). Development of new TGMS lines with good floral traits in rice. *Electronic Journal of Plant Breeding*, *1*(4), 568-571.

Verma, M. M. (1996). Procedures for grow-out test (GOT). *Seed Technol. Newsl*, *26*, 1-4.

Virmani, S. S. (2003). Advances in hybrid rice research and development in the tropics. *Hybrid rice for food security, poverty alleviation, and environmental protection*, 7-20.

Virmani, S. S., & Kumar, I. (2004). Development and use of hybrid rice technology to increase rice productivity in the tropics. *International Rice Research Notes*, *29*(1), 10-19.

Wen, L., Liu, G., Li, S. Q., Wan, C. X., Tao, J., Xu, K. Y., ... & Zhu, Y. G. (2007). Proteomic analysis of anthers from Honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid. *Botanical Studies*, *48*(3), 293-309.

Ye-Yun, X., Zhan, Z., Yi-Ping, X., & Long-Ping, Y. (2005). Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers. *Rice Science*, *12*(1), 7.

Yan, W. (2000). Crop heterosis and herbicide. *United States Patent*, 6,066, 779.

Yashitola, J., Thirumurugan, T., Sundaram, R. M., Naseerullah, M. K., Ramesha, M. S., Sarma, N. P., & Sonti, R. V. (2002). Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Science*, *42*(4), 1369-1373.

Yashitola, J., Sundaram, R. M., Biradar, S. K., Thirumurugan, T., Vishnupriya, M. R., Rajeshwari, R., ... & Sonti, R. V. (2004). A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. *Crop science*, *44*(3), 920-924.

Yuan, L. P. (1995). Current status of hybrid rice in China and future strategies for 21st century. *Hybrid rice seed production technology. Directorate of Rice Research, Hyderabad, India*, 31-33.