مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه اثر ژن *Rf3* برای بازگردانندگی باروری به برنج در زمینه ژنتیکی لاین ندا-A

علی صادقی[1]، اسدالله احمدی‌خواه*[2]، محمد فارسی[3]

[1]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[2]عضو هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی تهران، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی

[3]عضو هیئت علمی دانشگاه فردوسی مشهد, دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: 1391/08/20، تاریخ پذیرش: 1392/05/2

چکیده

در برنامه تولید بذر هیبرید در سیستم سه لاینی، استفاده از لاین با قابلیت ترکیب‌پذیری خصوصی مطلوب حامل ژن‌های بازگرداننده باروری (*Rf*) ضرورت دارد. در این تحقیق، جایگاه ژنی بازگرداننده باروری *Rf3* واقع بر روی کروموزوم شماره یک برنج با روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر، به پس‌زمینه ژنتیکی لاین نرعقیم ندا-A انتقال داده شد و همزمان اثر آن در هر نسل بر باروری دانه گرده و خوشه لاین گیرنده، مورد بررسی قرار گرفت. جهت انتقال، یک گیاه از جمعیت نسل F_2 (حاصل از تلاقی میان ندا-A و IR36) بر اساس نشانگرهای پیوسته به جایگاه ژنی *Rf3* (RM1، RM3873 و RM3233) انتخاب و با لاین ندا-A (به عنوان والد تکراری) تلاقی برگشتی داده شد. نتاج نسل اول تلاقی برگشتی (BC_1) از نظر وجود نشانگرهای پیوسته به ژن و همچنین از نظر فنوتیپی و به دنبال آن برای 15 نشانگر ریز ماهواره پس‌زمینه، مورد بررسی قرار گرفتند. تنها دو بوته نسل BC_1 که در هر سه جایگاه نشانگری دارای آلل غالب از والد بخشنده بودند باروری بالای خوشه (55٪ و 65٪) را نشان دادند. نتاج نسل دوم تلاقی برگشتی (BC_2) از تلاقی دو بوته فوق با والد تکراری حاصل شد. در بین نتاج BC_2 یک گیاه با باروری بالاتر خودگشن شده و 170 بوته از نسل BC_2F_2 از نظر 3 نشانگر RM1، RM3873 و RM3233 و همچنین دانه‌بندی خوشه مورد بررسی قرار گرفتند. هفت بوته با میزان بالاتری از ژنوم والد تکراری (از 91/1 ٪ تا 98/5٪) و در وضعیت هموزیگوتی کامل از نظر سه نشانگر پیوسته به *Rf3* (RM1، RM3873 و RM3233) شناسایی شدند که دارای باروری بالای دانه گرده و همچنین خوشه (75٪تا 97٪) بودند که نشان می‌دهد هر چه هموزیگوسیتی جایگاه ژنی *Rf3* بیشتر شد، بازگرداندن باروری به نرعقیمی نوع وحشی (WA) در پس‌زمینه ژنتیکی لاین گیرنده نرعقیم، بیشتر تقویت گردید. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جایگاه ژنی *Rf3* تاثیر متقابلی با نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA در جهت افزایش باروری دانه گرده و خوشه برنج دارد و از اینرو، می‌تواند همراه با سایر ژن‌های بازگرداننده باروری در برنامه تولید بذر هیبرید برنج به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: بازگرداننده باروری- نرعقیمی WA- نشانگر مولکولی- هیبرید- *Rf3* .

* نویسنده مسئول: اسدالله احمدی‌خواه تلفن: 09112734072 Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

مقدمه

در میان روش‌های متفاوت برای بهبود راندمان عملکرد در برنج، استفاده از سیستم تولید بذرهای هیبرید به خاطر سادگی و نیاز به زحمت کم، مورد توجه قرار گرفته است. چندین لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS[1]) به طور گسترده برای تولید برنج هیبرید اصلاح شده است و صدها واریته هیبرید سه لاینی تولید و برای کشت آزاد شده‌اند (Virmani *et al.*, 2003). در این سیستم، عامل نرعقیمی سیتوپلاسمی S در DNA میتوکندریایی (در خارج از هسته) مشخص شده است. لاین A به عنوان لاین نرعقیم حامل عامل S در سیتوپلاسم و آلل *rf* به صورت مغلوب در هسته می‌باشد. لاین B که به عنوان لاین نگهدارنده[2] شناخته می‌شود مشابه لاین A می‌باشد، اما به جای سیتوپلاسم نرعقیم دارای سیتوپلاسم بارور (N) است و قابلیت خودگشنی دارد (Virmani *et al.*, 2003). وقتی لاین B با لاین A تلاقی می‌یابد، نتاج حاصله همگی نرعقیم (A لاین) خواهند بود. اما لاین دیگری که در برنامه تولید بذر هیبرید مورد استفاده واقع می‌شود، لاین R یا لاین بازگرداننده باروری برای لاین A است که دارای ژن‌های بازگرداننده باروری به صورت غالب (*RfRf*) می‌باشد. زمانی که لاین R با لاین A تلاقی می‌یابد، بذرهای F_1 حاصل بارور می‌باشند. ژن‌های بازگرداننده باروری به صورت هموزیگوس (*RfRf*) یا به صورت هتروزیگوس (*Rfrf*) صرف نظر از عقیم بودن یا طبیعی بودن سیتوپلاسم، باعث باروری هیبریدهای F_1 می‌شوند (Schnable & Wise, 1998). نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS)، صفتی با وراثت مادری است که گیاه نرعقیم قادر به تولید گرده فعال نیست و در میان گیاهان عالی شایع است. سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی موجود ابزاری با ارزش در تولید بذر هیبرید در گونه‌های زراعی خودگرده‌افشان، مثل برنج، کتان و بعضی از سبزیجات زراعی می‌باشند. هیبریدها دارای هتروزیس هستند که بعنوان قدرت هیبرید شناخته شده است و نتاج هیبرید هتروتیک، خصوصیات رشدی بهتری نسبت به والدین خود نشان می‌دهند. سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی می‌توانند عامل قابل توجهی در تولید کارآمد بذر هیبرید باشند (Eckardt, 2006). در برنج تقریباً 20 منبع نرعقیمی سیتوپلاسمی شناسایی شده است. البته در بین سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی مختلف، فراوانی سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع وحشی (WA[3]) بیشتر از همه می‌باشد و تقریباً برای تولید 90 درصد بذور هیبرید به کار می‌رود. این سیستم پایدار بوده و لاین‌های بازگرداننده باروری برای آن به اندازه کافی وجود دارد (Yao *et al.*, 1997). ژن‌های *Rf* مختلفی برای بازگرداندن باروری در سیستم‌های

[1] Cytoplasmic male sterility
[2] Maintainer line
[3] Wild abortive

مختلف نرعقیمی سیتوپلاسمی شناسایی و نقشه‌یابی شده‌اند (Komori *et al.,* 2003). دو ژن *Rf3* و *Rf4* به وسیله‌ی تکنیک‌های RFLP/RAPD به ترتیب بر روی کروموزوم‌های شماره 1 و 10 مکان‌یابی شده‌اند (Yao *et al.,* 1997). ژن *Rf4* بین دونشانگر ریز ماهواره، RM171 و RM228 به ترتیب با فواصل 3/7 و 3/4 سانتی‌مورگان نقشه‌یابی گردید (Jing et al., 2001). Ahmadikhah & Karlov (2006) ژن *Rf4* را بر روی بازوی بلند کروموزوم 10 بین دو نشانگر RM171 و RM206 مکان‌یابی کردند. Alavi *et al.* (2009) نشانگر RM1 در فاصله 6/5 سانتی‌مورگان، نشانگر RG140 در فاصله 12/5 سانتی‌مورگان، نشانگر RM3873 در فاصله 15/8 سانتی‌مورگان و نشانگر RM3233 را در فاصله 17 سانتی‌مورگان از جایگاه ژنی *Rf3* بر روی کروموزوم 1 برنج مکان‌یابی کردند. همچنین Nematzadeh & Kiani (2010) نشانگرهای RM171 و RM258 را برای *Rf4* و نشانگر RM3148 را برای *Rf3* در ارقام ایرانی نقشه‌یابی کردند. مشخص شده که علاوه بر این دو ژن (*Rf3* و *Rf4*) برای سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع وحشی، ژن‌های دیگری نیز در کنترل برگرداندن باروری نرعقیمی سیتوپلاسمی نقش دارند. از جمله می‌توان به ژن *RfWA2* بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره 7 و ژن *Rf5(t)* بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 10 (Liu *et al.,* 2001؛ Ahmadikhah *et al.,* 2007) اشاره نمود.

یکی از روش‌های انتقال قطعات کوچک ژنومی از لاین بخشنده به لاین گیرنده (والد تکراری یا دوره‌ای)، روش تلاقی برگشتی مکرر می‌باشد و هدف از تکرار تلاقی برگشتی افزایش سهم ژنومی والد گیرنده در نتاج نهایی انتخاب شده می‌باشد. انتظار می‌رود مقدار بازیابی ریخته ارثی والد تکراری برای نسل اول تلاقی برگشتی، معادل 75 درصد و پس از 6 نسل تلاقی برگشتی، حدود 99/2 درصد باشد. اما در واقع، هر یک از نتاج تلاقی برگشتی، از این نسبت نظری انحراف دارند که دلیل آن شانس (تصادفی بودن موقعیت کیاسما) و یا وجود پیوستگی میان ژن مورد نظر در والد بخشنده و ژن‌های نزدیک به آن می‌باشد. بنابراین اگر بتوان افرادی را که دارای مقدار بیشتری از ژنوم والد تکراری می‌باشند شناسایی نمود و با آن تلاقی برگشتی داد، با تعداد کمی تلاقی برگشتی می‌توان ژنوم والد تکراری را با کارایی بالا بازیابی نمود. برای نیل به این هدف روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر[1] پیشنهاد شده است (Semagan *et al.,* 2006) که در آن علاوه بر ردیابی ژن هدف با نشانگرهای پیوسته (گزینش پیش‌زمینه[2])، از نشانگرهای توزیع یافته بر روی سایر کروموزوم‌ها نیز برای شناسایی افراد حامل درصد بالاتری از ژنوم والد گیرنده استفاده می‌شود (گزینش پس‌زمینه[3]) و بدین وسیله بازیابی سریع والد

[1] Marker-assisted selection (MAB)
[2] Foreground selection
[3] Background selection

تکراری با تعداد کمی تلاقی برگشتی میسر می‌گردد (Ahmadikhah, 2010).

استفاده از یک ژن نقشه‌یابی شده و یا جدا شده در برنامه‌های اصلاحی، خصوصاً در برنامه تلاقی برگشتی مستلزم شناخت اثر متقابل آن ژن با زمینه ژنتیکی ارقام گیرنده بوده و بررسی تغییرات بیان آن در زمینه ژنتیکی جدید اهمیت بالایی دارد. بدین منظور، در این تحقیق جایگاه ژنی *Rf3* واقع بر روی کروموزوم شماره یک به وسیله روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها به رقم برنج نرعقیم ندا-A حامل نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA انتقال داده شد و اثر متقابل آن با CMS از حیث تأثیر بر باروری دانه گرده و خوشه نتاج حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی سال‌های 1386 تا 1390 در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ندا-A در سال 1386با لاین بازگرداننده باروری IR36 (Ahmadikhah *et al.*, 2002) تلاقی داده شد و در سال بعد از خودباروری هیبرید F_1 جمعیت F_2 ایجاد گردید. لازم به ذکر است که جمعیت F_2 مورد اشاره تفرق دو ژنی با نسبت 15:1 برای دو ژن مضاعف غالب را نشان داده بود و لاین IR36 دارای دو ژن برای برگرداندن باروری به لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی تشخیص داده شد (Alavi et al., 2009). در سال 1388 یک بوته با باروری بالا از جمعیت F_2 انتخاب و با لاین ندا-A (به عنوان والد تکراری) تلاقی برگشتی داده شد تا جمعیت نسل اول تلاقی برگشتی (BC_1) ایجاد گردد. بذور نسل اول تلاقی برگشتی خزانه‌گیری و سپس به زمین اصلی انتقال داده شدند که در نهایت 27 بوته در مزرعه مستقر گردید. بر اساس گزینش پیش‌زمینه با نشانگرهای پیوسته به لوکوس باروری *Rf3* (که شرح آن در بخش‌های بعدی خواهد آمد) و نیز بر اساس گزینش پس‌زمینه با نشانگرهای SSR توزیع یافته در نواحی غیر هدف در ژنوم برنج، دو بوته انتخاب شد و با والد تکراری تلاقی برگشتی داده شد تا بذرهای نسل دوم تلاقی برگشتی (BC_2) حاصل شود. این بذرها در شهریور 1389 خزانه‌گیری و برای خودباروری در شرایط آب و هوایی اهواز کاشته شدند. بر اساس گزینش فنوتیپی برای میزان باروری، یک بوته انتخاب و بذرهای آن جهت تشکیل نسل BC_2F_2 برداشت گردید. در بهار 1390 بذرهای این نسل کشت گردید که در نهایت منجر به استقرار 170 بوته در مزرعه شد.

استخراج DNA از برگ‌های جوان هر نمونه به روش CTAB طبق دستورالعمل (Ahmadikhah, 2009) انجام شد. نشانگر RM1 در فاصله 5/6، نشانگر RM3873 در فاصله 14 و نشانگر RM3233 در فاصله 17 سانتی مورگان از لوکوس *Rf3* که توسط Alavi *et al.* (2009) مورد مکان‌یابی قرار گرفته است به

عنوان نشانگرهای مورد استفاده در گزینش پیش‌زمینه انتخاب شدند (جدول 1).

جدول 1- آغازگرهای SSR استفاده شده برای گزینش جایگاه ژنی هدف (*Rf3*) و موقعیت آنها در ژنوم برنج.

Table 1- SSR primers used in selection of target locus (*Rf3*) and their locations in rice genome.

منبع Reference	کروموزوم حامل Carrying chromosome	توالی (5' ....3') Sequence (5' ....3')	نام آغازگر Primer name
Alavi *et al.*, 2009	1	F: GAAATTCGAAATGGAGGGAGAGC R: CGAGTGGTGGTGACAAATGAGTGG	RM3233
Alavi *et al.*, 2009	1	F: GCTATAGACGCCTCCTCCTTATCC R: CGTACAGCCAGGATCGATCGAAA	RM3873
Alavi *et al.*, 2009	1	F: GCGAAAACACAATGCAAAAA R: CAGTCCAGGTTGGTTGGTTGCG	RM1

برای آزمون باروری دانه گرده، 6-5 بساک از هر خوشه انتخاب شد و در استوکارمن یا یدید پتاسیم یک درصد له شد و میزان رنگ‌پذیری دانه‌های گرده در زیر میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد باروری خوشه با تقسیم تعداد دانه‌های پر به تعداد کل دانه در خوشه محاسبه شد. گیاهان با باروری بالای 70٪ بعنوان کاملاً بارور و گیاهان با باروری بین 50 تا 70 درصد بعنوان بارور نسبی در نظر گرفته شدند.

در گزینش پس‌زمینه برای بررسی منشأ والدینی آلل‌ها از نشانگرهای مولکولی توزیع یافته در سرتاسر ژنوم طبق روش Hospital (2002) استفاده شد. برای این منظور، 96 جفت آغازگر SSR برای آشکارسازی چندشکلی میان دو لاین والدینی استفاده گردید. بر اساس الگوی باندهی، در هر نسل ژنوتیپ والد بخشنده به صورت BB، ژنوتیپ والد دوره‌ای به صورت AA و افراد هتروزیگوت به صورت AB امتیازدهی شدند.

میزان شباهت افراد نسل‌های BC به والد تکراری با فرمول $\frac{N_{AB}+2N_{AA}}{2N_t}$ (Hospital *et al.*, 1992) محاسبه گردید که در آن N_t تعداد کل مکان‌های SSR مورد بررسی، N_{AB} تعداد مکان‌های هتروزیگوت و N_{AA} تعداد مکان‌های هموزیگوت از نظر آلل‌های والد تکراری می‌باشد.

نتایج

برای آشکارسازی چندشکلی بین والدین، از 96 جفت آغازگر ریز ماهواره توزیع یافته در سراسر ژنوم استفاده شد که تنها 15 نشانگر (15/6 درصد) توانستند چندشکلی بین والدین را آشکار نمایند (جدول 2). تعداد 27 گیاه نسل BC_1 در شرایط آب و هوایی گرگان، مورد ارزیابی دانه گرده قرار گرفتند که در کل 7 بوته دارای باروری متوسط به بالا (بالای50٪) شناسایی شدند (جدول 3). این گیاهان با نشانگرهای RM1، RM3873 و RM3233 که با

ژن *Rf3* پیوستگی دارند مورد آزمون قرار گرفتند که همه آنها حداقل در یک جایگاه SSR دارای آللی از والد بخشنده بودند (BB یا AB). آنالیز بیشتر نشان داد که رابطه‌ای قوی (ضریب تبیین=0/689) بین تعداد آلل‌های نشانگرهای پیوسته با جایگاه ژنی باروری *Rf3* و میزان دانه‌بندی نتاج BC_1 وجود داشت (شکل 1).

جدول 2- آغازگرهای SSR دارای چندشکلی بین والدین و موقعیت آنها در ژنوم برنج.

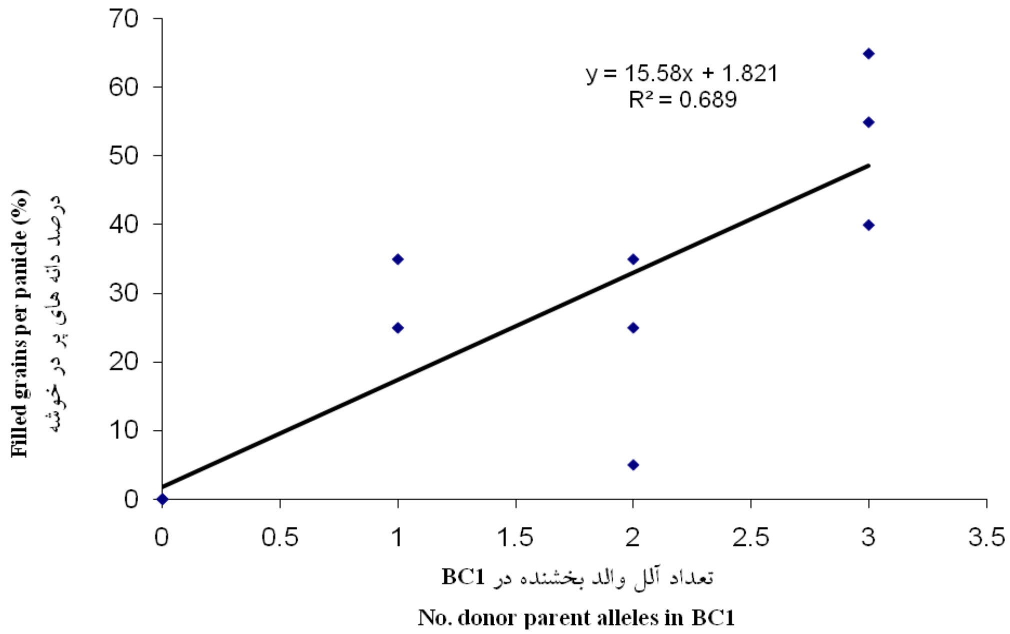
Table 2- SSR primers showing polymorphism between parents and their locations in rice genome.

نام آغازگر Primer name	توالی (5' ………………….3') Sequence (5' …………….3')	کروموزوم Chromosome
RM7241	F: CAGTCGCACTAACTGAACAACACC R: GCTTTCTTTGACTAGACAGAGGCAC-5'	1
RM1146	F: TCTCCCTATTCCCGTGTAAATCG R: CGATCCATGTTAGCTAGTAGCCC	10
RM159	F: GGGGCACTGGCAAGGGTGAAGG R: CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTCTGTTCG	5
RM317	F: CATACTTACCAGTTCACCGCC R: AGTTGATCGACTGTGAGAGGTC	4
RM3510	F: TAAGATCGTAAGATCGCGGC R: GGAGGTGGAGAAGGACGGA	10
RM206	F: CCCATGCGTTTAACTATTCT R: GGTATGCCTAGCTACCTTGC	11
RM242	F: GGCCAACGTGTGTATGTCTC R: GGGTAGGCAGAACCGTATAT	9
RM415	F: CTTCGATCCATCATCCATGG R: GGCTTTGACGCATGTCGTTA	5
RM334	F: GTTCAGTGTTCAGTGCCACC R: GCAGGTGGTTTCTAGTTTCAG	3
RM514	F: AGATTGATCTCCCATTCCCC R: GGTGATCATTATACGAGCCA	3
RM505	F: AGAGTTATGAGCCGGGTGTG R: CGACGATTCTAGCGGTTTAG	7
RM168	F: TGCTGCTTGCCTGCTTCCTTT R: CGGCACCTAACTAAGCAAAG	3
RM332	F: GCGAAGGCGAAGGTGAAG R: CCCACTCACTCTAGTGAGTAC	5
RM687	F: TACGTACATCCTACTACATT R: TCATTTCTAGCGGGAATACC	6
RM210	F: TCACATTCGGTGGCATTG R: GCTCCTACCAACAACAAGTGAAC	8

جدول3- خصوصیات پیش زمینه و پس زمینه گیاهان انتخاب شده در نسل BC1

Table 3- Characters of foreground and background of selected plants in BC1 generation.

شماره گیاه BC1 Num. of BC1 plant	تعداد آلل والد بخشنده No.of donor alleles	باروری دانه گرده (٪) Pollen fertility	دانه پر در خوشه (٪) No. of filled grains per panicle	بازیابی والد تکراری (٪) با نشانگرهای پس‌زمینه Recurrent parent recovery (%) by background markers
1	4	80	65	92.7
3	1	65	25	99.0
7	3	80	35	93.2
9	4	60	40	93.7
13	2	50	25	98.4
14	2	95	35	93.2
16	4	90	55	93.7



شکل 1- رابطه بین تعداد آلل نشانگرهای پیوسته با جایگاه ژنی *Rf3* و میزان باروری خوشه (دانه‌بندی) در نتاج نسل BC1

Figure 1- Relationship between allele numbers of the markers linked with *Rf3* locus and rate of panicle fertility (seed setting) in BC1 progenies.

بوته‌های شماره BC_1-1 و BC_1-16 که هر سه لوکوس فوق را در وضعیت هتروزیگوت حمل می‌نمودند و درصد باروری مناسبی نیز داشتند، انتخاب و با والد تکراری تلاقی برگشتی داده شدند تا نسل BC_2 ایجاد گردد.

جهت افزایش سهم ژنوم والد تکراری و بازیابی بیشتر ژنوم این والد، در شهریور 1389 اقدام به گزینش پیش‌زمینه روی نشاهای نسل BC_2 با استفاده از 3 نشانگر پیوسته با جایگاه ژنی *Rf3* گردید. نتیجه این آزمون مشخص نمود که تنها دو نشاء حامل هر سه نشانگر جایگاه باروری در حالت هتروزیگوت (AB) بودند. از طرفی آزمون پس‌زمینه با 13 نشانگر SSR، مشخص نمود که بوته 1# دارای میزان بالاتری از ژنوم والد تکراری ندا–A بود (95/4 درصد در مقابل 94/8 درصد برای بوته 2#). دانه‌بندی برای بوته 1# حدود 70٪ و برای بوته 2# حدود 50٪ بود. بنابراین، بذور خودگشنی بوته شماره 1# برداشت و در سال بعد کشت گردید.

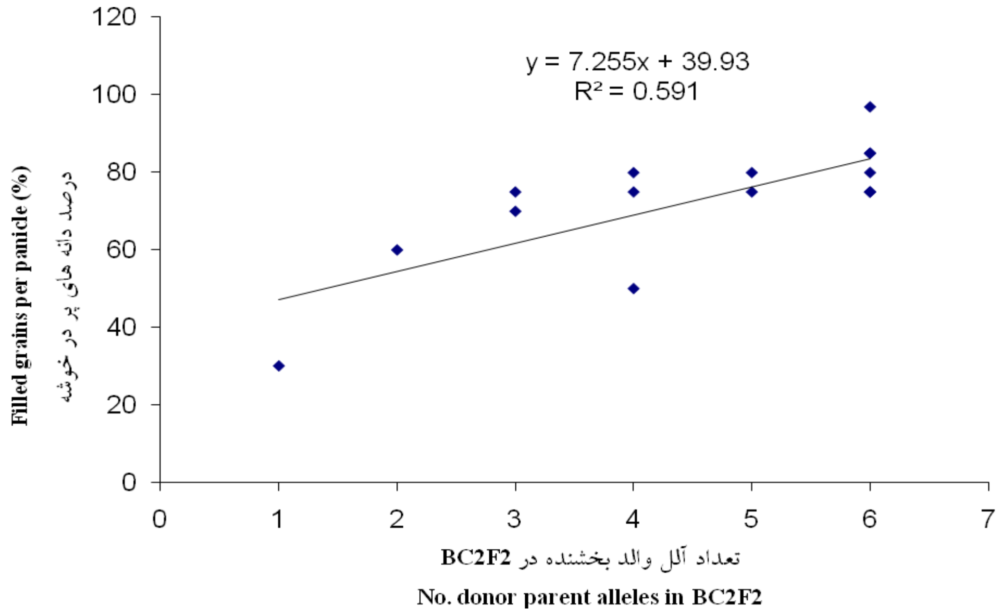
تعداد 170 بوته نسل BC_2F_2 از خودگشنی بوته 1# در مزرعه مستقر گردید. از این جمعیت، 78 بوته دارای ساقه سبز و 92 بوته دارای ساقه ارغوانی بودند که یک صفت فنوتیپی اختصاصی برای رقم ندا به عنوان والد تکراری است. بوته‌های ساقه سبز حذف شدند و بررسی برای بلوک ژنی بازگرداننده باروری*Rf3* بر روی 92 بوته ساقه ارغوانی انجام شد.

تعداد 92 گیاه نسل BC_2F_2 در تیر تا مرداد 1390 به وسیله نشانگرهای پیوسته با ژن *Rf3* (شامل RM1، RM3873 و RM3233)، مورد آزمون قرار گرفتند. از بین گیاهان فوق تنها هفت بوته در این سه جایگاه نشانگری برای آلل‌های والد بخشنده هموزیگوت (BB) بودند. ارزیابی درصد دانه‌های بارور در بوته‌های نسل BC_2F_2 نشان داد که باروری خوشه در تمامی هفت بوته فوق بالای 75 درصد (75٪–97٪) بوده است. تجزیه رگرسیون بر روی بوته‌های نسل BC_2F_2 نشان داد که میان تعداد آلل‌های والد بخشنده در جایگاه نشانگرهای پیوسته به *Rf3* و درصد دانه‌های پر در خوشه رابطه معنی‌داری وجود داشت (ضریب تبین=0/591؛ شکل 2).

بحث

در این تحقیق برای جایگزین کردن بخش کوچکی از کروموزوم شماره یک برنج (حامل مکان بازگرداننده باروری *Rf3*) در لاین نرعقیم ندا–A از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها (MAB) استفاده شد که در آن برای انتقال مکان هدف سه نشانگر پیوسته با این جایگاه ژنی (گزینش پیش‌زمینه) و برای بازیابی سریع ژنوم والد تکراری، 15 نشانگر ریز ماهواره غیر پیوسته با مکان هدف (گزینش پس‌زمینه) به کار رفتند و در هر نسل اثر متقابل میان مکان انتقال یافته با سیتوپلاسم نرعقیم

لاین گیرنده (ندا-A) از حیث باروری دانه گرده و خوشه مورد بررسی قرار گرفت. Benchimol *et al.* (2005) نشان دادند که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند به طور موثری برای اینتروگروسیون یک آلل خاص یا یک خصوصیت مونوژنیک استفاده شوند و در همین راستا محققین مختلف با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره کارایی انتقال خصوصیات مختلف را با این نشانگرها به اثبات رسانده‌اند که نمونه آن تحقیقات Neeraja *et al.* (2007) برای انتقال QTLهای مقاومت به غرقابی و Steele *et al.* (2006) برای انتقال QTLهای خصوصیات ریشه در برنج می‌باشد. همچنین در سال‌های اخیر از روش MAB در موارد زیادی برای جایگزین کردن بخش کوچکی از یک قطعه کروموزومی حامل لوکوس هدف در زمینه ژنومی لاین گیرنده استفاده شده است (Lang *et al.*, 2011; Cuc *et al.*, 2012؛ Suh *et al.*, 2011؛ Huyen *et al.*, 2012).



شکل 2- رابطه میان تعداد آلل والد بخشنده در جایگاه‌های نشانگری پیوسته به *Rf3* و درصد دانه‌های پر در خوشه در نتاج BC_2F_2.

Figure 2- Relationship between allele number of the markers linked with *Rf3* locus and rate of panicle fertility (seed setting) in BC_2F_2 progenies.

بررسی چند شکلی بین والدین نشان داد که از 96 نشانگر ریز ماهواره تنها 15/6 درصد از نشانگرها توانستند چندشکلی بین والدین را آشکار نمایند (جدول 2) که این نتیجه نشان دهنده این است که والدین از خزانه‌ی ژنتیکی بسیار مشابهی (نزدیک به هم) منشاء گرفته‌اند و

این باعث می‌شود تا بازیابی ژنوم والد تکراری در زمان کمتری و با تعداد کمتری تلاقی برگشتی حاصل شود (Prigge *et al.*, 2008). همانطور که مشاهده شد سهم ژنوم والد تکراری در تک بوته انتخاب شده نسل BC_1 ‎92/7٪ بود و برای تک بوته انتخابی در نسل BC_2 به ‎95/4٪ رسید. یکی از دلایل افزایش در دانه‌بندی خوشه (از 65 درصد در نسل BC_1 به 70 درصد در نسل BC_2 و تا 97 درصد در برخی بوته‌های نسل BC_2F_2) احتمالاً می‌تواند ناشی از انتقال ژن‌های کوچک اثری باشد که به رغم افزایش سهم ژنوم والد تکراری به وسیله گزینش پس‌زمینه حذف نشده‌اند و هنوز در برخی نتاج پیشرفته تلاقی برگشتی باقی مانده‌اند، زیرا به نظر Podolsky (1992) بیان ژن‌های *Rf* در شرایط مختلف وابسته به ژنوتیپ لاین بازگرداننده باروری و همچنین ژنوتیپ لاین‌های CMS می‌باشد و ژن‌های کوچک اثر نیز در این رابطه نقش ایفاء می‌کنند (Podolsky, 1992).

نتایج نشان داد که رابطه‌ای قوی (ضریب تبیین=0/689) بین تعداد آلل‌های نشانگرهای پیوسته با جایگاه ژنی باروری *Rf3* و میزان دانه‌بندی نتاج BC_1 وجود داشت (شکل 1). از آنجا که اثر افزایشی در جایگاه ژنی *Rf3* عامل عمده ژنتیکی تعیین کننده میزان باروری می‌باشد (Ahmadikhah *et al.*, 2007; Alavi *et al.*, 2009)، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این بلوک ژنی بسته به اینکه در چه تعداد جایگاه نشانگری دارای آلل والد بخشنده باشد، توانسته باعث ایجاد باروری در نتاج BC_1 شود. اما، همانگونه که نتایج تجزیه رگرسیون نشان داد تعداد آلل‌های موجود در جایگاه ژن هدف، با میزان باروری خوشه در نسل BC_1 نسبت به نسل BC_2F_2 رابطه قوی‌تری داشته است (به ترتیب با ضریب تبین 68/9 و 59/1 درصد). دلیل این امر می‌تواند حذف تعداد بیشتری از ژن‌های کوچک اثر والد بخشنده در نسل BC_2F_2 نسبت به نسل BC_1 باشد، زیرا هر چه میزان بازیابی ژنوم والد تکراری افزایش پیدا می‌کند از سهم ژنوم والد بخشنده حامل ژن‌های کوچک اثر در خارج از ناحیه لوکوس هدف در نتاج BC_2F_2 بیشتر کاسته می‌شود (Semgan *et al.*, 2006; Hospital, 2009). بنابراین چنانچه هدف بیان بالای صفت مورد نظر باشد، باید توجه نمود که عمل گزینش برای مکان هدف و در عین حال بازیابی ژنوم والد تکراری با دقت فراوان انجام شود تا ضمن انتقال ژن هدف و بازیابی حداکثر درصد ژنوم والد تکراری، افرادی با بالاترین میزان بیان صفت مورد نظر نیز انتخاب شوند. لذا نباید تنها بر نتایج نشانگرهای پیوسته به ژن هدف و نشانگرهای به کار رفته برای بازیابی ژنوم والد تکراری تمرکز کرد، بلکه انجام ارزیابی‌های فنوتیپی که معیاری از بیان ژن‌های مورد انتقال در زمینه ژنتیکی لاین گیرنده می‌باشد، ضروری است. همچنین برای ردیابی ژن هدف در نتاج تلاقی برگشتی بهتر است از چند نشانگر پیوسته با آن و در صورت امکان احاطه کننده ژن هدف، استفاده نمود.

برای مثال، Huyen *et al.* (2012) از سه نشانگر پیوسته و احاطه کننده ژن *Saltol* برای ردیابی نتاج متحمل به شوری استفاده کردند و ضمن انتقال دقیق قطعه کروموزومی تحمل به شوری با انجام گزینش پس‌زمینه و متعاقباً ارزیابی‌های فنوتیپی توانستند تحمل به شوری رقم مورد نظر را بهبود دهند. البته، Tada (2007) تنها از یک نشانگر پیوسته به جایگاه *Rf3* برای بررسی تاثیر این جایگاه بر باروری خوشه برنج استفاده کرد و بر این اساس نتیجه‌گیری کرد که جایگاه ژنی *Rf3* به تنهایی نمی‌تواند باروری خوشه را در نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA ایجاد کند، ولی با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی (Alavi *et al.*, 2009; Ahmadikhah *et al.*, 2007) مشخص شده بود که بلوک ژنومی بزرگتری از RM322 تا RM3873 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک با اثر افزایشی در برگرداندن باروری به لاین نرعقیم سیتوپلاسمی نقش ایفاء می‌کند، در تحقیق حاضر به کمک سه نشانگر پیوسته به این جایگاه ژنی قطعه بزرگتری از کروموزوم شماره یک حامل *Rf3*، به لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ندا–A انتقال داده شد و به همین سبب باروری به طور موثرتری به لاین نرعقیم ندا–A برگردانده شد و این جایگاه ژنی توانست باروری خوشه را تا بیش از 75 درصد به لاین‌های CMS نهایی برگرداند. طبق برخی گزارشات دو ژن *Rf3* و *Rf4* به صورت اپیستازی مضاعف غالب (با نسبت تفکیک فنوتیپی 15:1) باعث برگرداندن باروری به نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA می‌شوند (Yao *et al.*, 1997; Nematzadeh and Kiani, 2010; Ahmadikhah et al., 2007)، ولی اثر *Rf3* در برگرداندن باروری پایین‌تر از *Rf4* ذکر شده است (Yao *et al.*, 1997). بنابراین هر چند جایگاه ژنی *Rf3* دارای اثر متقابل نسبتاً بالایی با CMS در جهت افزایش باروری هیبریدهای حاصل می‌باشد، اما برای اطمینان و افزایش احتمال باروری بذرهای هیبرید می‌توان از سایر ژن‌های شناخته شده دیگر مانند *Rf4* در کنار آن در برنامه تولید بذر هیبرید برنج استفاده نمود.

منابع

Ahmadikhah A (2011). Advanced plant breeding. Publications of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Goragan, Iran. 480 pp.

Ahmadikhah A, Karlov GI (2006). Molecular mapping of the fertility-restoration gene *Rf4* for WA-cytoplasmic male sterility in rice. Plant Breeding 125: 363-367.

Ahmadikhah A, Karlov GI., Nematzadeh Gh, Ghasemi Bezdi K (2007). Inheritance of the fertility restoration and genotyping of rice lines at the restoring fertility (*Rf*) loci using molecular markers. International Journal of Plant Production 1(1): 13-21.

Ahmadikhah A, Nematzadeh Gh, Babaeian N, Nayyeripasand L (2002). Identification of new fertility restorer and cytoplasmic male sterility maintainer lines in rice. 4th Symposium on Hybrid Rice. Hanoi, Vietnam. 125-131.

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

Benchimol L, Souza C, Souza A (2005). Microsatellite-assisted backcross selection in maize. Genetics and Molecular Biology 28: 4:789-797.

Cuc LM, Huyen LTN, Hien PTM, Hang VTT, Dam NQ, Mui PT, Quang VD, Ismail AM, Ham LH (2012) Application of marker assisted backcrossing to introgress the submergence tolerance QTL SUB1 into the Vietnam elite rice variety-AS996. American Journal of Plant Sciences 3: 528-536.

Eckardt NA (2006). Cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Plant Cell 18: 515-517.

Hospital F (2002). Marker-assisted backcross breeding: a case study in genotype building theory. In M. S. Kang (Ed.), Quantitative genetics, genomics and plant breeding. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Hospital F (2009). Challenges for effective marker-assisted selection in plants. Genetics 136(2): 303-310.

Hospital F, Chevalet C, Mulsant P (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. Genetics 132:1199-1210.

Huyen LTN, Cuc LM, Ismail AM, Ham LH (2012). Introgression the salinity tolerance QTLs Saltol into AS996, the elite rice variety of Vietnam. American Journal of Plant Sciences 3: 528-536.

Jing R, Li X, Yi P, Zhu Y (2001). Mapping fertility-restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42: 167–171.

Komori T, Yamamoto T, Takemori N, Kashihara M, Matsushima H (2003). Fine genetic mapping of the nuclear gene, Rf-1, that restores the BT-type cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa L.*) by PCR-based markers. Euphytica 129: 241-247.

Lang NT, Tao NV, Buu BC (2011) Marker-assisted backcrossing (MAB) for rice submergence tolerance in Mekong delta. Omonrice 18: 11-21.

Liu X Q, Xu X, Tan Y, Li S Q, Hu J, Huang J Y, Yang D C, Li Y S, Zhu Y G (2004). Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa L.*). Molecular and General Genetics 271: 586–594.

Nematzadeh Gh, Kiani G (2010). Genetic analysis of fertility restoration genes for WA type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. African Journal of Biotechnology 9(38): 6273-6277.

Podolsky RD (1992). Strange floral attractors: pollinator attraction and the evolution of plant sexual systems. Science 258*:* 791–793.

Prigge V, Maurer HP, Mackill DJ (2008). Coparation of observed with the simulated distributions of the parental genome contribution in two marker-assisted backcross progress in rice. Theoretical and Applied Genetics 116: 739-744.

Schnable S, Wise R (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in Plant Science 3(5): 175-180.

Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop, MN (2006). Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. African Journal of Biotechnology 5(25): 2588-2603.

Steele KA, Price AH, Shashidhar HE (2006). Marker-assisted selection to intergress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. Theoretical and Applied Genetics 112: 208-221.

Suh JP, Yang SJ, Jeung JU, Pamplona A, Kim JJ, Lee JH, Hong HC, Yang CI, Kim YC, Jena KK (2011). Development of elite breeding lines conferring Bph18 gene-derived resistance to brown planthopper (BPH) by marker-assisted selection and genome-wide background analysis in japonica rice (Oryza sativa L.). Field Crops Research 120: 215-222.

Tada Y (2007). Effect of *Rf-1*, *Rf3* and *Rf-6(t)* gens on fertitility restoration in rice (*Oryzae sativa L.*) with WA- and BT-type cytoplasmic male sterility. Breeding Sience 57: 223-229.

Virmani SS, Sun ZX, Mou TM, Jauhar A, Mao CX (2003). Two-line Hybrid rice breeding manual. Los Baños (Philippines). International Rice Research Institute.

Yao FY, Xu CG, Yu SB, Li JX, Gao YJ, Li XH, Zhang QF (1997). Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa L.*). Euphytica 98: 183–187.

Study on the effect of *Rf3* gene for fertility restoration to rice in genetic background of Neda-A line

Sadeghi A.[1], Ahmadikha A.[2*], Farsi M.[3]

[1]Departmant of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan university of Agriculture Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2]Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies & Energy engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
[3]Departmant of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdosi University, Mashhad, Iran.

Abstract

In hybrid seed production program based on three-line system, the use of fertility restorer line with desirable specific combining ability carrying fertility restoration (*Rf*) genes is indispensible. In this research, fertility restoration locus *Rf3* was transferred into CMS line 'Neda-A' using marker-assisted backcrossing (MAB) method and simultaneously its effect on pollen and panicle fertility of recipient line was evaluated in each generation. For transferring the locus, a single F_2 plant (derived from 'Neda-A' x 'IR36' cross) was selected based on *Rf3*-linked three markers (RM1, RM3233 and RM3873) and backcrossed to 'Neda-A' (as the recurrent parent). The BC_1 progenies were screened for *Rf3*-linked markers and also phenotyped and subsequently screened for 15 background SSR markers. Only two BC_1 plants with donor dominant allele at all three loci showed high panicle fertility (65% and 50%). BC_2 progenies were developed after backcrossing these two plants to recurrent parent. Among BC_2 progenies, a single plant having a higher fertility was self-pollinated and 170 resultant BC_2F_2 plants were screened with 3 foreground *Rf3*-linked markers (RM1, RM3233 and RM3873) and also evaluated in terms of seed setting. Seven plants were identified with a higher rate of recurrent parent genome (91.1% to 98.5%) and in complete homozygote state at three *Rf3*-linked markers. These plants had a high pollen and panicle fertility (75% to 97%), indicating that with increasing homozygosity of *Rf3* locus, fertility restoration to WA cytoplasmic male sterility in the genetic background of CMS recipient line was further enhanced. Therefore, it can be concluded that *Rf3* locus has an interaction to WA cytoplasmic male sterility in favor of increasing the rice pollen and panicle fertility, and hence it can be utilized along with other restoring fertility genes in hybrid seed production program of rice.

Keywords: ***Fertility restoration, Cytoplasmic sterility of WA, Hhybrid, Molecular marker, Rf3.***

* Corresponding Author: ahmadikhah A. Tel: 09112734072 Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir