مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۶۱-۱۵۵)

نشانمند کردن ژن‌های برگرداننده باروری بوسیله تجزیه کلاس مغلوب در برنج

سعید یاراحمدی[۱]، محمد مهدی سوهانی[۲]*، ابوبکر جوهرعلی[۳]، بابک ربیعی[۴] و علی اکبر عبادی[۵]
۱، ۲، ۴، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
۳، ۵، محققین موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
(تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۴- تاریخ تصویب: ۸۸/۲/۱۳)

چکیده

نشانمند کردن ژن‌های برگرداننده باروری برای نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی نوع WA با استفاده از ۱۰۰۰۰ بوته جمعیت F_2 حاصل از تلاقی دو رقم IR58025A در IR42686R انجام شد. این مطالعه اصولاً به منظور کاهش فاصله نشانگرهایی انجام شد که در حال حاضر برای ژن‌های RF شناسایی شده‌اند. این جمعیت F_2 از آن جهت منحصر بفرد بوده است که امکان شناسایی و نشانمند کردن ٤ ژن RF بر روی کروموزومهای ۱، ۷، ۱۰ و۱۲ آن وجود دارد. ژن RF_3 بر روی کروموزوم ۱ بین دو نشانگر ریزماهواره RM443 و RM315 در فاصله ژنتیکی ۳/۳ و ۲۰/۲ سانتی‌مورگان شناسایی شد. ژن RF_6 که بر روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد بین دو نشانگر ریزماهواره RM6737 و RM271 با فاصله بسیار نزدیک ۲/۲ و ٤/۳ سانتی‌مورگان شناسایی شد. در این تحقیق یک نشانگر ریزماهواره جدید همبسته با ژن RF_7 بر روی کروموزوم ۱۲ با فاصله ژنتیکی ۷/۸ سانتی‌مورگان از ژن مذکور بنام RM519 گزارش شده است. در این مطالعه همچنین تایید شد که نشانگر ریزماهواره RM6344 بر روی کروموزوم ۷ با فاصله ۱۲/۲ سانتی‌مورگان با ژن RF_4 همبسته بود. شناسایی و نشانمند کردن نشانگرهای ریزماهواره که با ٤ ژن RF با فاصله کمی همبسته باشند برای اصلاح گران ارقام هیبرید جهت انتخاب بسیار مفید خواهد بود. علاوه بر این، هرمی کردن ژن‌های RF با دیگر منابع ژنتیکی نرباروری شناخته شده، جهت توسعه لاینهای بازگرداننده باروری قوی امکان‌پذیر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: نشانگر ریزماهواره، ژن‌های RF، برنج هیبرید، تجزیه پیوستگی.

مقدمه

استفاده از فناوری برنج هیبرید در چین و سایر نقاط در افزایش عملکرد بسیار موفق بوده است. ارقام برنج هیبرید در چین حدود ۱/۵-۱ تن در هکتار عملکرد بیشتری نسبت به ارقام خالص نیمه پاکوتاه و با عملکرد بالا، تولید می‌کنند. لذا یکی از راه‌های موثر افزایش تولید برنج، استفاده از فناوری برنج هیبرید است. نرعقیمی سیتوپلاسمی ژنتیکی و سیستم برگرداننده باروری (CMS/RF)، ابزار ژنتیکی موثری برای بهره‌برداری از این فناوری می‌باشد (Virmani & Wan, 1988). در برنج سیستم‌های CMS/RF مختلفی وجود دارند. نر عقیمی سیتوپلاسمی نوع وحشی (WA) به دلیل اینکه سیتوپلاسم آن از برنج وحشی منتقل شده است، عقیمی وحشی[1] نامیده می‌شود و به طور وسیعی برای تولید بذر هیبرید در زیر گونه‌های هندی برنج به کار می‌رود (Ahmadikhah & Karlov, 2006). ارقام برنج هیبرید تولید شده براساس نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA تقریباً ۹۰٪ از برنج‌های هیبرید چین را تشکیل

1. Wild abortive

* نویسنده مسئول: محمد مهدی سوهانی تلفن: ۰۹۱۲-۴۲۲۷۹۶۰ E-mail: msohani_99@yahoo.com

می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی بر روی ژن‌های بازگرداننده باروری به نرعقیمی سیتوپلاسمی WA انجام شده است. این صفت در مطالعات مختلف به صورت تک ژنی (Govinda & Virmani, 1988; Wang, 1980)؛ دو ژنی (Bharaj et al., 1995; Zhou, 1983) و چند ژنی (Pei, 1980) گزارش شده است. از نتایج نشانمند کردن ژن‌های RF می‌توان برای، هرم بندی ژن‌های RF و شناسایی گیاهان دارای ژن‌های بازگرداننده در مراحل ابتدایی رشد و زیاد کردن سرعت تلاقی برگشتی به وسیله انتخاب به کمک نشانگرها استفاده کرد. هدف از این تحقیق نشانمند کردن ژن یا ژن‌های RF وشناسایی نشانگرهای ریزماهواره‌ای پیوسته با این ژن‌ها در اولین برنج هیبرید معرفی شده در ایران (IRH1) بود تا انتقال این ژن‌ها به دیگر ارقام به وسیله انتخاب براساس نشانگر، تسهیل گردد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از هیبرید F_1 حاصل از تلاقی IR58025A/IR42686R برای تجزیه ژنتیکی صفت تجدید کنندگی باروری استفاده شد. والد نر این هیبرید از طریق آمیزش تصادفی یک جمعیت مرکب شامل ۱۱ لاین برگرداننده باروری مختلف و لاین نرعقیم ژنتیکی IR36 و به روش انتخاب تک بوته از جمعیت مذکور در موسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI) توسعه یافت. حدود ۱۰۰۰۰ فرد از این جمعیت و با فاصله ۲۵ × ۲۵ سانتیمتری و به صورت تک بوته در مزرعه آزمایشی موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) کشت گردیدند. در اوایل مرحله گل‌دهی میزان باروری با رنگ‌آمیزی دانه‌های گرده با محلول I_2-KI بررسی شد. برای ارزیابی میزان دانه‌بندی، خوشه‌ها قبل از گل‌دهی به وسیله پاکت پرگامین پوشیده شدند. گیاهانی که میزان رنگ پذیری دانه گرده آنها کمتر از ۱٪ بود و بذر پر تولید نکردند به عنوان افراد کاملا عقیم انتخاب شدند. DNA برگ‌های تازه لاین‌های والدینی و ۴۷ فرد کاملاً عقیم انتخاب شده از جمعیت F_2 به روش CTAB استخراج شد (Murray & Thompson, 1990). چند شکلی لاین‌های والدینی با استفاده از ۵۳ جفت آغازگر ریزماهواره انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۱۵ میکرو لیتر شامل ۵۰ نانوگرم دی ان ای الگو، ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از چهار نوع دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها، ۳۶ نانوگرم (۲/۴ نانوگرم در هر میکرو لیتر) از هر کدام از آغاز گرها، بافر پی سی آر (دارای ۱۰ میلی‌مول تریس، ۵۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم و ۰/۰۱% ژلاتین)، ۲ میلی مول کلرید منیزیم و ۱ واحد آنزیم تک دی‌ان‌ای پلی مراز انجام شد. چرخه‌های حرارتی مورد استفاده شامل ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشته‌سازی اولیه دی ان ای و به دنبال آن ۳۵ چرخه به صورت ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه دمای ۵۵ یا ۶۰ درجه سانتیگراد (بسته به نوع آغازگر) و ۲ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود و نهایتاً یک چرخه ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط انتهایی در نظر گرفته شد. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید واسرشته‌ساز ۶٪ تولید شده به وسیله هر آغازگر، عمل الکتروفورز بمدت ۴۵ دقیقه تا ۲ ساعت با توان ۱۰۰ وات و دمای ثابت ۵۰ درجه سانتیگراد و رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از نیترات نقره انجام شد. فراوانی نوترکیبی بین نشانگرها و لوکوس RF با استفاده از حداکثر درست نمایی (Allard, 1956) و با فرض بر اینکه همه افراد کاملاً عقیم از نظر مکان RF هموزیگوت می‌باشند، تخمین زده شد. برای انجام آزمون پیوستگی بین نشانگرها و ژن‌های RF از دو روش آزمون کای اسکویر و مقیاس LOD بر اساس تجزیه تابع حداکثر درست نمایی استفاده شد. در آزمون کای اسکویر، فراوانی‌های مشاهده شده با نسبت‌های مورد انتظار ۱:۲:۱ مقایسه شدند. در صورت فقدان پیوستگی بین ژن RF و نشانگر، باید در کلاس عقیم نسبت ۱ (نوار بارور): ۲ (نوار هتروزیگوس): ۱ (نوار عقیم) مشاهده شود. در روش LOD نیز نسبت لگاریتم تابع درست نمایی تحت فرض صفر (عدم پیوستگی نشانگر و ژن RF) به فرض یک (پیوستگی نشانگر و ژن RF) محاسبه و LOD=3 به عنوان حداقل آستانه معنی دار در نظر گرفته شد. تبدیل مقادیر نوترکیبی به فواصل نقشه نیز براساس تابع کوسامبی[1] محاسبه شد (Allard, 1956).

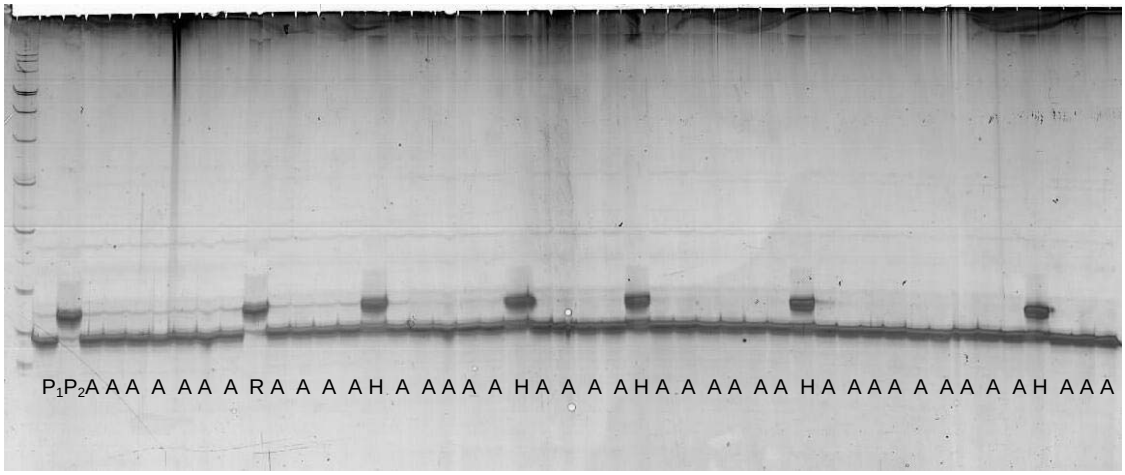
1. Kosambi

نتایج و بحث

دلیل مطالعه این هیبرید عملکرد بالاتر ۱/۵ تن در هکتاری آن نسبت به رقم اصلاح شده خزر است (Dorosti et al., 2006). از بین ۵۳ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای مورد مطالعه، ۱۵ جفت آغازگر الگوی نواربندی چند شکلی بین لاین‌های والدینی نشان دادند و جهت مطالعه کلاس مغلوب استفاده شدند. تجزیه کلاس مغلوب با استفاده از افراد کاملاً عقیم روش قابل اعتمادی برای نشانمند کردن ژن‌های RF می‌باشد (Jing et al., 2001; Zhang et al., 1994).

جدول ۱ فراوانی‌های مشاهده شده و مورد انتظار و آزمون کای اسکویر را برای هر یک از ۱۵ نشانگر چند شکل در کلاس مغلوب نشان می‌دهد. درصد نوترکیبی و فاصله ژنتیکی بین نشانگرها و ژن‌های RF و مقیاس LOD در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین شکل ۱ نمونه‌ای از ژل‌های رنگ آمیزی شده با نیترات نقره و تفاوت نوارهای تکثیر شده در والدین و افراد را برای آغازگر RM519 از کروموزوم ۱۲ را نشان می‌دهد. ژن RF3 با نشانگرهای RM443 و RM315 در روی کروموزوم ۱ پیوسته بود و فاصله این ژن تا نشانگرهای فوق به ترتیب ۳/۳۸ و ۲۰/۲ سانتی‌مورگان بود (جدول۲). Yao et al. (1997) دو ژن بازگرداننده باروری را بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۱۰ مکان‌یابی نمودند و گزارش کردند که اثر ژن RF_4 که بر روی کروموزوم ۷ قرار دارد بیشتر از ژن RF_3 واقع بر روی کروموزوم ۱ می‌باشد. آنها همچنین اظهار داشتند که ژن RF واقع بر روی کروموزوم ۱۰ (RF6) در فاصله ۲۲/۴ سانتی‌مورگانی بین نشانگرهای G4003 و C234 و در فاصله ۳/۳ سانتی‌مورگان از نشانگر G4003 قرار دارد. Nguyen et al. (1998) گزارش کردند که صفت بازگرداننده باروری را دو ژن RF که بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۱۰ قرار دارند کنترل می‌کنند و ژن واقع بر کروموزوم ۱ در نزدیکی RG140 قرار دارد. Zhang et al. (1998) سه نشانگر RAPD به نام‌های OPK05-800، OPU10-100 و OPW0L-350 را با ژن RF_3 که بر روی کروموزوم ۱ قرار دارد پیوسته معرفی نمودند. همچنین آنها سه نشانگر RFLP پیوسته با ژن RF_3 را بر روی کروموزوم ۱ شناسایی کردند.

در مطالعه حاضر ژن RF_6 که بر روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد با نشانگرهای RM6737، RM271، RM591 و RM258 پیوسته بود و فاصله ژن تا نشانگرهای مذکور به ترتیب ۲/۲، ۴/۳، ۲۱/۷ و ۶/۷ سانتی‌مورگان برآورد گردید (جدول۲). Ahmadikhah, & Karlov (2006) گزارش نمودند که ژن RF_6 به وسیله دو نشانگر ریزماهواره RM171 و RM6737 احاطه شده و فاصله ژن مذکور تا نشانگرها به ترتیب ۳/۲ و ۱/۶ سانتی‌مورگان برآورد شد که فاصله نشانگر RM6737 تا ژن RF_6 بسیار مشابه با ۲/۲ سانتی‌مورگان برآورد شده در این آزمایش بود.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR بوته‌های عقیم و بارور با آغازگر RM519. P_1 والد عقیم ، P_2 والد بارور، A بوته‌های F_2 با نوار مشابه والد عقیم، H بوته‌های F_2 با نوار مشابه هر دو والد و R بوته‌های F_2 با نوار مشابه والد بارور می‌باشند.

جدول۱- آزمون کای اسکویر به منظور مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگرهای ریزماهواره با فراوانی‌های مورد انتظار ۱: ۲: ۱ در کلاس مغلوب

نشانگر	کروموزوم - بازو	افراد عقیم با نوار والد برگرداننده	افراد عقیم با نوار هر دو والد	افراد عقیم با نوار والد عقیم	χ^2
RM443	۱ – بازوی بلند	۰(۱۱/۲۵)*	۳(۲۲/۵)	۴۲(۱۱/۲۵)	۱۱۲/۲**
RM315	۱ – بازوی بلند	۲(۱۱/۷۵)	۱۴(۲۳/۵)	۳۱(۱۱/۷۵)	۴۳/۴۷**
RM237	۱ – بازوی بلند	۱۲(۱۱/۷۵)	۲۰(۲۳/۵)	۱۵(۱۱/۷۵)	۱/۴۳ ns
RM505	۷ – بازوی بلند	۱۳(۱۱/۵)	۲۱(۲۳)	۱۲(۱۱/۵)	۰/۳۹ ns
RM6344	۷ – بازوی بلند	۱(۱۱/۵)	۹(۲۳)	۳۶(۱۱/۵)	۷۰/۳۰**
RM4098	۷ – بازوی کوتاه	۱۴(۱۱/۲۵)	۲۰(۲۲/۵)	۱۱(۱۱/۲۵)	۰/۹۶ ns
RM258	۱۰ – بازوی بلند	۰(۱۱/۲۵)	۶(۲۲/۵)	۳۹(۱۱/۲۵)	۹۱/۸۰**
RM591	۱۰ – بازوی بلند	۲(۱۱)	۱۴(۲۲)	۲۸(۱۱)	۳۶/۵۵**
RM271	۱۰ – بازوی بلند	۰(۱۱/۷۵)	۴(۲۳/۵)	۴۳(۱۱/۷۵)	۱۱۱/۰۴**
RM6737	۱۰ – بازوی بلند	۰(۱۱/۵)	۲(۲۳)	۴۴(۱۱/۵)	۱۲۲/۵۲**
RM3019	۱۰ – بازوی بلند	۱۴(۱۱/۵)	۱۹(۲۳)	۱۳(۱۱/۵)	۱/۴۳ ns
RM7003	۱۲ – بازوی بلند	۲(۱۱)	۱۲(۲۲)	۳۰(۱۱)	۴۴/۷۳**
RM519	۱۲ – بازوی کوتاه	۱(۱۱/۲۵)	۵(۲۲/۵)	۳۹(۱۱/۲۵)	۹۱/۴۰**
RM17	۱۲ – بازوی کوتاه	۱۱(۱۱/۷۵)	۲۸(۲۳/۵)	۸(۱۱/۷۵)	۲/۱۱ ns
RM3226	۱۲ – بازوی کوتاه	۱۵(۱۱/۵)	۲۲(۲۳)	۹(۱۱/۵)	۱/۶۵ ns

*: اعداد داخل و خارج پرانتز به ترتیب فراوانی‌های مورد انتظار و مشاهده شده را نشان می‌دهند

**: معنی دار در سطح احتمال ۱٪

ns: غیرمعنی دار

جدول ۲- فراوانی نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین نشانگرها و ژن‌های RF و مقیاس LOD

آغازگر	ژن RF	کروموزوم	درصد نوترکیبی	فاصله ژنتیکی براساس تابع کوسامبی	LOD*
RM443	RF_3	۱	۳/۳۳	۳/۳۸	۱۰/۷
RM315	RF_3	۱	۱۹/۱۵	۲۰/۲	۴/۱۸
RM6344	RF_4	۷	۱۱/۹۶	۱۲/۲	۶/۵۴
RM258	RF_6	۱۰	۶/۶۷	۶/۷	۸/۷۷
RM591	RF_6	۱۰	۲۰/۴۵	۲۱/۷	۳/۵۷
RM271	RF_6	۱۰	۴/۲۶	۴/۳	۱۰/۵۷
RM6737	RF_6	۱۰	۲/۱۷	۲/۲	۱۱/۷۷
RM519	RF_7	۱۲	۷/۷۸	۷/۸	۸/۲۱
RM7003	RF_7	۱۲	۱۸/۱۸	۱۹/۱	۴/۱۹

*: حداقل LOD برابر با ۳ به عنوان آستانه معنی دار در نظر گرفته شد.

این اختلاف اندک، با توجه به اینکه در هر دو مطالعه از افراد دو انتهای توزیع فنوتیپی صفت استفاده شده است می‌تواند به خاطر جمعیت‌های متفاوت مورد استفاده باشد. Tao et al. (2004) گزارش کردند ژن RF_1 که باروری را به نرعقیمی سیتوپلاسمی نوعDian1 بازمی‌گرداند در بین نشانگرهای RM171 و RM6100 و بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ قرار دارد و به ترتیب با نشانگرهای مذکور ۲/۸ و ۴/۹ سانتی‌مورگان فاصله دارد. Liu et al. (2004) دو ژن برگرداننده باروری (RF6(t) و RF_5) را در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع HL بر روی کروموزوم ۱۰ مکان‌یابی کردند و گزارش نمودند که ژن RF5 با نشانگر ریزماهواره RM3150 هم تفرق است و به وسیلهٔ نشانگرهای RM1108 و RM5373 احاطه شده است. همچنین ژن RF6(t) با نشانگر ریزماهواره‌ای RM5373 هم تفرق بود و به وسیلهٔ نشانگرهای RM6737 و SBD07 احاطه می‌شود. Tan et al. (1998) دو QTL روی کروموزوم ۱۰ مکان‌یابی کردند که صفت بازگرداننده باروری را کنترل می‌کردند. یکی از آنها کاملا با نشانگر C1361 پیوسته بود و در ناحیه میانی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ قرار

داشت و ۷۱/۵٪ از واریانس فنوتیپی را توجیه کرد. QTL دیگر که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۰ و در بین نشانگرهای R2309 و RG257 قرار داشت، ۲۷/۳٪ از واریانس فنوتیپی را کنترل نمود. Jing et al. (2001) دو ژن بازگرداننده باروری را در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA با استفاده از نشانگرهای SSLP، بر روی بازوی کوتاه و بازوی بلند کروموزوم ۱۰ مکان یابی نمودند. جمعیت مورد استفاده آنها یک جمعیت F_2 حاصل از تلاقی IR24 و Zhenshan97A بود. فاصلهٔ ژنتیکی ژن RF_4 با نشانگرهای RM171 و RM228 که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ قرار داشتند به ترتیب ۳/۷ و ۳/۴ سانتی‌مورگان گزارش شد. همچنین آنها در جمعیت F_2 دیگری که از تلاقی IR64 و Zenshan97A حاصل شده بود، گزارش نمودند که نشانگر RM244 که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۰ قرار دارد با ژن RF دیگری پیوسته است. Mishra et al. (2003) ژن بازگرداننده باروری را بر روی کروموزوم ۱۰ و با فاصله ۹/۵ سانتی‌مورگان از نشانگر RM258 گزارش نمودند، در حالی که در این مطالعه فاصله آن دو اندکی کمتر و در حدود ۶/۷ سانتی‌مورگان برآورد شد. Huang et al. (2000) ژن بازگرداننده باروری به نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع HL را بر روی کروموزوم ۱۰ مکان‌یابی کردند. آنها گزارش کردند که نشانگرهای RM171 و RM258 به ترتیب ۳/۶ و ۷/۸ سانتی‌مورگان با ژن مورد نظر فاصله دارند. Akagi et al. (1996) ژن بازگرداننده باروری به نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع HL را بر روی کروموزوم ۱۰ و با فاصله ۳/۷ سانتی‌مورگان از نشانگر RM171 گزارش کردند.

در پژوهش حاضر نشانگر RM6344 با ژن RF_4 که بر روی کروموزوم ۷ قرار دارد پیوسته بود و فاصله این نشانگر با ژن مورد نظر ۱۲/۲ سانتی‌مورگان برآورد شد (جدول۲). Bharaj et al. (1995) با استفاده از لاین‌های تری سومی اولیه دو ژن برگرداننده باروری به نام‌های RF-WA-1 و RF-WA-2 را به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۰ مکان یابی کردند. Yoshimura et al. (1982) ژن برگرداننده باروری (RF1) به سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع Boro را بر روی کروموزوم ۷ گزارش کردند. در مطالعه حاضر همچنین یک ژن RF_7 بر روی کروموزوم ۱۲ که به ترتیب ۷/۸ و ۱۹/۱ سانتی‌مورگان با نشانگر RM519 و RM7003 فاصله داشت شناسایی شد (جدول۲). این ژن اولین بار در این تحقیق شناسایی شد. اکثر پژوهشگران معتقدند که صفت تجدید باروری در برنج را دو ژن کنترل می‌کند. اگر چه اکثر منابع ژنتیکی بازگرداننده باروری به طور بالقوه دارای دو ژن بازگرداننده باروری می‌باشند، اما در مطالعه حاضر چهار ژن بازگرداننده باروری شناسایی شد. دلیل این امر استفاده از والد نر لاین بازگرداننده باروری IR42686 در این مطالعه بوده است. این لاین در موسسه IRRI از طریق آمیزش تصادفی یک جمعیت مرکب شامل ۱۱ لاین برگرداننده باروری مختلف (Basmati 370، Ram Tulasi, Mohan, Bhog, IR19228-24-1-2، IR19226-335-1-1، Basmati T3، IR9129-209-2-2، IR48، IR520-1-26، IET 4888 و Hansa Raj) که صفاتی همچون کیفیت دانه و صفات گل دهی مطلوب داشتند و لاین نرعقیم ژنتیکی IR36 و به روش انتخاب تک بوته از جمعیت مذکور توسعه یافته است. والد ماده لاین IR58025A بود که با انتقال سیتوپلاسم نرعقیم WA از طریق تلاقی برگشتی به لاین IR58025B به دست آمده بود.

آمیزش تصادفی جمعیت مرکب تکنیک اصلاحی بسیار مطلوبی جهت توسعه لاین‌های برگرداننده برتر و هرم‌بندی ژن‌های RF مختلف می‌باشد. این روش اصلاحی خاص منجر به تجمع ژن‌های برگرداننده باروری از لاین‌های تشکیل دهنده جمعیت مرکب گردیده است و به همین دلیل است که بر خلاف اکثر پژوهشگران که معمولاً ۲ و یا حداکثر ۳ ژن RF را در مطالعات خود شناسایی کرده‌اند، در این تحقیق، چهار ژن برگرداننده باروری شناسایی شدند. تا کنون هیچ مطالعه‌ای بر روی صفت تجدید باروری با استفاده از این چنین منابعی انجام نگرفته است. بنابراین، مطالعه ژن‌های برگرداننده باروری با استفاده از این منابع جدید بسیار ضروری می‌باشد. این گونه مواد بسیار با ارزش می‌باشند و می‌توان کار هرم‌بندی سایر ژن‌های برگرداننده از دیگر سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی را با این گونه مواد به راحتی انجام داد. همچنین می‌توان تعداد زیاد لاین‌های برگرداننده باروری جزئی در خزانه

اصلاحی را به وجود چهار یا تعداد بیشتری ژن RF که این صفت را کنترل می‌کنند نسبت داد.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق یک نشانگر ریزماهواره جدید همبسته با ژن RF_7 بر روی کروموزوم ۱۲ با فاصله ژنتیکی ۷/۸ سانتی‌مورگان از ژن مذکور بنام RM519 گزارش شده است. در این مطالعه همچنین تایید شد که نشانگر ریزماهواره RM6344 بر روی کروموزوم ۷ با فاصله ۱۲/۲ سانتی‌مورگان با ژن RF_4 همبسته بود.

سپاسگزاری

هزینه‌های مالی این تحقیق به وسیله دانشگاه گیلان و قطب علمی برنج کشور تامین شده است. از کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) به خاطر همکاری در انجام آزمایش‌های مربوطه قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Ahmadikhah, A. & Karlov, G. I. (2006). Molecular mapping of the fertility-restoration gene RF4 for WA-cytoplasmic male sterility in rice. *Plant Breeding*, 125, 1-5.
2. Akagi, H., Yokozeki Y., Nakamura, A. & Fujimura, T. (1996). A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *RF-1*, identified with inter-SSR fingerprinting, *Genome*, 39, 1205-1209.
3. Allard, R. W. (1956). Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, 24, 235-278.
4. Bharaj, T. S., Virmani, S. S. & Khush, G. S. (1995). Chromosomal location of fertility restoring genes for WA abortive cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice. *Euphytica*, 83, 169-173.
5. Dorosti, H., Ali, A. J., Nematzadeh, G., Ghodsi, H., Allahgholipour M., Nouri, M. Z., Vallizadeh, A., Nahvi, M., Karbalai, M., Eefani, A. R. & Alinia, F. (2006). IRH1-the first aromatic hybrid rice in Iran. *International Rice Research Notes*, 31, 31-32.
6. Govinda, R. K. & Virmani, S. S. (1988). Genetics of fertility restoration of WA type cytoplasmic male sterility in rice. *Crop Science*, 28, 787-792.
7. Huang, C. S, Tseng, T. H. & Liu, C. (1986). Inheritance of fertility restoration of cytoplasmic male sterility in indica rice. In: *Rice genetics*, International Rice Research Institue, Manila, Philippines. Pp. 649-654.
8. Huang, Q. Y., He, Y. Q., Jing, R. C., Zhu, R. S. & Zhu, Y. G. (2000). Mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice using micro-satellite markers. *Chinese Science Bulletin*, 45, 430-432.
9. 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.
10. Liu, X. Q., Xu, X., Tan, Y. P., 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 Genetics and Genomics*, 271, 586-594.
11. Mishra, G. P., Singh, R. K., Mohapatra, T., Singh, A. K., Prabhu, K. V., Zaman F. U. & 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 & Biotechnology*, 12, 37-42.
12. Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
13. Nguyen, T. L., Zhang, G., Magpantay, G., Virmani, S. S., Huang, N., Brar, D. S., Kush, G. S. & Li, Z. K. (1998). PCR-based DNA markers for the WA-CMS fertility restoring gene RF-3 in *rice*. *Rice Genetics Newsletter*, 15, 156.
14. Pei, X. S (1980). A new view on inheritance of male sterility in plant. *Agricultural Science and Technology of Hunan*, 3, 1-12.
15. Tan. X. L., Vanavichit, A., Amornsilpa, S. & Tragoonrung, S. (1998). Genetics analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QTL mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 994-999.
16. Tao. D., Xu, P., Li, J., Hu, F., Yang, Y., Zhou, J., Tan, X. & Jones, M. P. (2004). Inheritance and mapping of male sterility restoration gene in upland *japonica* restorer lines. *Euphytica*, 138(3), 247-254.
17. Virmani, S. S. & Wan B. H. (1988). *Development of CMS lines in hybrid rice breeding*, Pp. 103-114. in: Hybrid rice. International Rice Research Institue, Manila, Philippines.
18. Wang, S. L. (1980). Study on inheritance of restoring factor and approach of developing new restorer in rice. *Agricultural Science and Technology of Hunan*, 4, 1-4.

19. Yao, F. Y., Xu, C. G., Yu, S. B., Li, J. X., Gao, Y. J., Li, X. H. & Zhang, Q. (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.
20. Yoshimura, A., Iwata, N. & Omura, T. (1982). Linkage analysis by reciprocal translocation method in rice plants (*Oryza Sativa* L.). III. Marker genes located in chromosomes 2, 3, 4, and 7. *Japanese Journal of Breeding*, 32, 323-332.
21. Zhang, G., Bharaj, T. S., Virmani, S. S. & Huang, N. (1997). Mapping of the RF3 nuclear fertility restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 241-247.
22. Zhang, Q., Shen, B. Z., Dai, X. K., Saghai Maroof, M. A. & Li, Z. B. (1994). Using bulked extemes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences.* USA, 91, 8675-8679.
23. Zhou, T. (1983). Analysis of R genes in hybrid indica rice of WA type. *Acta Agronomica Sinica*, 9, 241-247.