ارزیابی نشانگرهای میتوکندریایی (mtDNA) در تشخیص لاین‌های CMS برنج از لاین‌های نگهدارنده آن‌ها

غفار کیانی*[1] و قربانعلی نعمت‌زاده[1]

پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*ghkiani@gmail.com

چکیده

لاین‌های CMS مورد استفاده در سیستم سه لاین تولید بذر هیبرید برنج در زمان تکثیر غالباً با لاین‌های نگهدارنده آن‌ها اختلاط می‌یابند. استفاده از این‌گونه بذور ناخالص در تولید بذر هیبرید برنج باعث غیریکنواختی و افت عملکرد در برنج هیبرید می‌گردد. برای حذف بوته‌های خارج از تیپ در مزارع تکثیری لاین‌های CMS، از ارزیابی‌های فنوتیپی که بسیار هزینه‌بر و وقت‌گیر است، استفاده می‌شود. گزینه مناسب برای حذف ناخالصی در لاین‌های CMS استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد. در این مطالعه از نشانگرهای میتوکندریایی مبتنی بر PCR طراحی شده از توالی‌های ویژه در ژنوم لاین‌های CMS برنج استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که نشانگر *cms* توانائی متمایز نمودن لاین‌های نرعقیم ندا A و نعمت A را از لاین‌های نگهدارنده آن‌ها داراست. بطوریکه این نشانگر باند مورد انتظار به وزن ۳۸۶ جفت باز درحالی‌که لاین‌های نگهدارنده آن‌ها فاقد باند موردنظر بودند. همچنین نشانگر *drrcms* به خوبی لاین‌های نرعقیم دشتA، چمپاA و آمل۳A را از لاین‌های نگهدارنده مربوط به آن‌ها متمایز نمود. بطوریکه این نشانگر در لاین‌های نرعقیم مذکور باند مورد انتظار به وزن ۱۳۰ جفت باز و در لاین‌های نگهدارنده متناظر آن‌ها باند مورد انتظار ۱۴۲ جفت باز را تولید نمود. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگرهای *cms* و*drrcms* قادر به تفکیک بوته‌های نرعقیم از نگهدارنده می‌باشند. از این نشانگرها در جریان تکثیر بذور CMS برای تشخیص مولکولی بوته‌های خارج از تیپ می‌توان بطور عملی استفاده نمود. این امر به پیشبرد تکنولوژی بذر هیبرید برنج در کشور کمک شایانی را خواهد نمود.

کلمات کلیدی: برنج، نشانگرهای میتوکندریائی، نر عقیمی، خلوص ژنتیکی

مقدمه

تاکنون بیش از ۲۰ منبع CMS مختلف در برنج شناسایی شده است ولی در بین آن‌ها، نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA[1] دارای فراوانی بالاتری بوده و اکنون صنعت تولید بذر هیبرید

1 - Wild Abortive

برنج، حدود ۹۰٪ وابسته به این منبع نرعقیمی می‌باشد (یائو و همکاران، ۱۹۹۷؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۲). مشخص شده که در تمام موارد به جز یک مورد (لفبر و همکاران، ۱۹۹۰)، عامل کنترل کننده CMS در میتوکندری قرار دارد (اشنیبل و وایز، ۱۹۹۸). به عبارتی CMS صفتی است با وراثت مادری که بر اثر اختلال یا بازآرایی ژنوم میتوکندریایی و در نتیجه ناتوانی در تولید دانه‌های گرده بارور و فعال ایجاد می‌شود (اشنیبل و وایز، ۱۹۹۸؛ یوان، ۱۹۹۲).

لاین‌های CMS مورد استفاده در سیستم سه لاین تولید بذر هیبرید برنج در زمان تکثیر غالباً با لاین‌های نگهدارنده آن‌ها اختلاط می‌یابند. با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان اقدام به خالص سازی لا ین‌های نر عقیم برنج نمود. در این راستا می‌توان به استفاده از نشانگرهای RFLP (نارایانان و همکاران، ۱۹۹۶؛ سانی و همکاران، ۱۹۹۷)، RAPD (سانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ جنا و پاندی، ۱۹۹۹؛ ایچی و همکاران، ۲۰۰۳) اشاره نمود که با توجه به هزینه بر بودن RFLP و نیز تکرار پذیری کم RAPD استفاده از این نشانگرها در سطح گسترده برای خالص سازی لاین‌های CMS برنج، عملی نمی‌باشد. ابداع و استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی مبتنی بر PCR طراحی شده از توالی‌های ویژه در ژنوم لاین‌های CMS برنج توسط یاشیتولا و همکاران (۲۰۰۴) و راجندرا کومار و همکاران (۲۰۰۷) گزارش گردیده است. استفاده از این نشانگرها در خالص سازی لاین‌هایCMS برنج از نظر هزینه و زمان صرفه جویی قابل ملاحظه ای را به دنبال داشته و تولید بذر هیبرید یکنواخت را تضمین خواهد نمود.

با توجه به اصلاح و معرفی لاین‌های نرعقیم برنج نظیر ندا، نعمتA، دشتA، چمپا و آمل۳A در ایران، لزوم حفظ و نگهداری و تکثیر آن‌ها بسیار ضروری است. بطوریکه هر سال ارزیابی‌های پایداری عقیمی، تکثیر و خالص سازی این لاین‌ها با روش‌های فنوتیپی انجام می‌گیرد. یکی از این روش‌ها، GOT[1] می‌باشد. این روش بر اساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و گل‌دهی در مرحله بلوغ می‌باشد (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴). با توجه به اینکه بسیاری از این ویژگی‌های مورفولوژیک چندژنی می‌باشند و از طرفی نیز تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارند، ضرورت استفاده از روشی سریع، دقیق و با کارآیی بالا و در عین حال با هزینه کم از جمله نشانگرهای مولکولی بیش از پیش احساس می‌شود. استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی در تشخیص لاین‌های ایزوسیتوپلاسمیک (A و B لاین ها) و استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی برای خالص سازی لاین‌هایCMS برنج از اهداف این تحقیق بود.

1- Grow out test

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۵ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (نـدا A، نعمـت A، دشـتA، چمپـا A و آمـل A۳) و ۵ لاین نگهدارنده متناظر آن‌ها جهت بررسی‌های مولکولی اسـتفاده گردیـد. بـذور از پژوهـشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شدند. ارقام در سال زراعی ۱۳۸۹ در مزرعـه پژوهـشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شدند.

استخراج DNA از نمونه های برگی طبق روش کوچرت و همکاران (۱۹۸۹) انجام گرفت. نشانگرهای میتوکندریایی (mtDNA) مورد استفاده برای مطالعه چندشکلی بین لاین‌های ایزوسیتوپلاسمیک نرعقیم و نگهدارنده در جدول ۱ آمده است. مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری برای نشانگرهای *cms* و *drrcms* شامل ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمر از بود. واکنش PCR برای نشانگر *cms* با پروفیل حرارتی ۷ دقیقه برای ۹۵ °C، ۳۵ چرخه از ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۴ °C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در استفاده از آغازگر *cms* از نشانگر RG136 به صورت توأم به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. نشانگر *cms* در لاین‌های نرعقیم باندی به وزن ۳۸۶ جفت باز و RG136 باندی ۱/۱ کیلوباز تولید می‌کند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). فراورده‌های PCR برای نشانگرهای فوق با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در انجام PCR با استفاده از نشانگر *drrcms* مخلوط واکنش مشابه مورد بالا بود. برای این نشانگر، واکنش PCR با پروفیل حرارتی ۵ دقیقه برای ۹۴ °C، ۳۵ چرخه از ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. نشانگر *drrcms* در لا ین‌های نر عقیم باندی به وزن ۱۳۰ و در لاین‌های نربارور باندی به وزن ۱۴۲ جفت باز تولید می‌کند (راجندراکومار و همکاران، ۲۰۰۷). فراورده‌های PCR برای این نشانگر با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۳/۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی نشانگر *drrcms* روی ژنوتیپ‌های نرعقیم و نگهدارنده مورد مطالعه در شکل ۱ آمده است. بر اساس نتایج بدست آمده، این نشانگر به خوبی لاین‌های نرعقیم دشتA، چمپا A و آمل A۳ را از لاین‌های نگهدارنده مربوط به آن‌ها متمایز نمود. بطوریکه این نشانگر در لاین‌های نرعقیم مذکور باند مورد انتظار به وزن ۱۳۰ جفت باز و در لاین‌های نگهدارنده متناظر آن‌ها باند مورد

انتظار ۱۴۲ جفت باز را تولید نمود. ولی این نشانگر بین لاین‌های نرعقیم ندا A و نعمتA با نگهدارنده‌های آن‌ها چندشکلی نشان نداد. بنابراین، این نشانگر قابلیت تشخیص بوته‌های خارج از تیپ را در فرایند تکثیر و خالص سازی فقط برای لاین‌های دشت A، چمپا A و آمل A۳ دارا می‌باشد. نتایج بدست آمده در انطباق با نتایج راجندراکومار و همکاران (۲۰۰۷) می‌باشد. در ارزیابی لاین‌های نرعقیم دشت A، چمپا A و آمل A۳ با نشانگر *cms* چندشکلی بین این لاین‌های نرعقیم با نگهدارنده های آن‌ها مشاهده نگردید اما این نشانگر توانائی متمایز نمودن لاین‌های نرعقیم ندا A و نعمت A را از لاین‌های نگهدارنده آن‌ها دارا بود. بطوریکه این نشانگر باند مورد انتظار به وزن ۳۸۶ جفت باز درحالی‌که لاین‌های نگهدارنده آن‌ها فاقد باند موردنظر بودند. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگر *cms* فقط قادر به تفکیک بوته‌های نرعقیم از نگهدارنده در لاین‌های ندا A و نعمت A می‌باشد و در جریان تکثیر بذور CMS برای تشخیص مولکولی بوته‌های خارج از تیپ می‌توان از این نشانگر بطور عملی استفاده نمود. نتایج بدست آمده در تائید نتایج یاشیتولا و همکاران (۲۰۰۴) می‌باشد. در مزارع تکثیری لاین‌های CMS، مزرعه تکثیری با فاصله مناسبی از سایر مزارع ایزوله می‌شوند تا امکان آلوده سازی با گرده های سایر ارقام وجود نداشته باشد. تحت چنین شرایطی، تنها راه ایجاد ناخالصی در لاین‌های CMS از طریق لاین نگهدارنده آن توسط اختلاط مکانیکی در مرحله برداشت و خرمن‌کوبی می‌باشد. نشانگرهای میتوکندریائی مورد استفاده در این با دقت و بطور موثر می‌تواند ناخالصی موجود در لاین‌های CMS ناشی از لاین نگهدارنده را با هزینه و زحمت بسیار کمتر نسبت به GOT در سطح ژنتیکی شناسائی نماید. همچنین با استفاده از این نشانگرها خصوصاً در مراحل اولیه تکثیر بذور لاین‌های CMS (فاز رویشی) و خالص سازی آن‌ها در سطح مولکولی علاوه بر صرفه جویی در زمان به پیشبرد اهداف اصلاحی در برنامه تولید بذر برنج هیبرید کمک شایانی را خواهند نمود.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان اجرا شده است. بدینوسیله از مدیریت و پرسنل آن موسسه تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

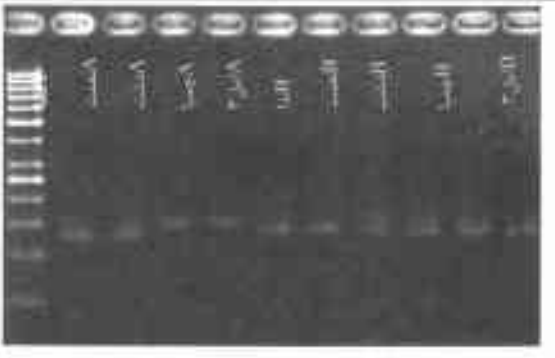
منابع

1. Ichii, M., D.L. Hong, Y. Ohara, C.M. Zhao, and S. Taketa. 2003. Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica.* 129:249–252.
2. Jena, K.K., and S.K. Pandey. 1999. DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. *Hybrid Rice Newslletter*. 2:13–14.
3. Kochert, G., S.D. Tanksley, and J.P. Price. 1989. RFLP training course laboratory manual. p. 5–6. Rockefeller Program on Rice Biotechnology, Cornell Univ., Ithaca, NY.

4. Lefebvre A, Scalla R and Pfeiffer P. 1990. The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Molecular Biology*. 14(4): 477–490.
5. Narayanan, K.K., P. Senthilkumar, S. Venmadhi, G. Thomas, and J. Thomas. 1996. Molecular genetic studies on the rice mitochondrial genome. p. 689–695. In G.S. Khush (ed.) rice genetics III. Proc. Third Intl. Rice Genet. Symp., Los Banos, Manila, the Philippines. 16–20 Oct. 1995. Int. Rice Res. Inst., Manila, the Philippines.
6. Rajendrakumar, P., A.K. Biswal, S.M. Balachandran, M.S. Ramesha, B.C. Viraktamath and R.M. Sundaram. 2007. A Mitochondrial Repeat Specific Marker for Distinguishing Wild Abortive Type Cytoplasmic Male Sterile Rice Lines from their Cognate Isogenic Maintainer Lines. *Crop Science*. 47: 207-211.
7. Sane, A.P., P. Seth, S.A. Ranade, P. Nath, and P.V. Sane. 1997. RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 1098–1103.
8. Schnable PS and Wise RP 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*. 3(5): 175-180.
9. Yao FY, Xu CG, Yu SB, Li JX, Gao YJ, Li XH and 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.
10. Yashitola J., T. Thirumurugan, R. M. Sundaram, M. K. Naseerullah, M. S. Ramesha, N. P. Sarma and R. V. Sonti, 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Science*. 42: 1369-1373.
11. Yashitola J., R. M. Sundaram, S. K. Biradar, T. Thirumurugan, M. R. Vishnupriya, R. Rajeshwari, B. C. Viraktamath, N. P. Sarma and R. V. Sonti, 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: 920-924.
12. Yuan LP 1992. Development and prospect of hybrid rice breeding. In: You CB and Chen ZL (Eds.), Agricultural Biotechnology. Proc Asian-Pacific Conf Agric Biotechnol, China Sciences and Technology Press, Beijing: 97-105.
13. Zhang TX, Jan CC, Miller JF and Fick GN 2002. Inheritance of fertility restoration for two cytoplasmic male sterility sources of *Helianthus pauciflorus* (*rigidus*) Nutt. *Crop Science*. 42: 1873-1875.

جدول ۱- نشانگرهای میتوکندریایی مورد استفاده در این تحقیق

ردیف	نام نشانگر	توالی رفت	توالی برگشت
۱	drrcms	acc ttt ggg cga tgg tt	ggg ttt aga gtc gcc ac
۲	cms	act ttt tgt ttt tgt gta gg	tgc cat atg tcg ctt aga ctt tac



شکل ۱- شناسائی مولکولی لاین‌های نرعقیم ندا، نعمت، دشت، چمپا و آمل۳ از لاین‌های نگهدارنده آن‌ها ندا، نعمت، دشت، چمپا و آمل۳ با استفاده از نشانگر *drrcms*