بررسی و ارزیابی خلوص تعدادی از لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی برنج ایران با استفاده از روش Grow Out Test

مرتضی اولادی*[1]، قربانعلی نعمت‌زاده[1]، سید حمید رضا هاشمی[1]

۱- به‌ترتیب کارشناس، استاد و کارشناس‌ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*m_oladi74@yahoo.com

چکیده

با روند فزاینده افزایش جمعیت، تکنولوژی تولید برنج هیبرید بعنوان یک گزینه برای استفاده از پدیده هتروزیس و بالا بردن تراز عملکرد در دنیا مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر در حدود ۹۵ درصد CMS لاین‌های موجود بر اساس سیتوپلاسم WA می باشند که نشان دهنده اهمیت این نوع از سیتوپلاسم نرعقیم می‌باشد. با توجه به اصلاح و معرفی ارقام بومی لاین های نرعقیم سیتوپلاسمی نظیر ندا A، نعمت A، دشت A، چمپا A، آمل۳ A در کشور، لزوم حفظ و نگهداری و خالص سازی آنها ضروری بنظر می‌رسد. بطوریکه همه ساله باید ارزیابی هایی از نظر پایداری عقیمی، درصد دگرگشنی، خصوصیات زراعی مطلوب صورت گیرد. در این تحقیق پنج لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) به همراه پنج لاین نگهدارنده باروری (B لاین) استفاده گردید. در سال زراعی اول در حدود ۱۰۰۰ بوته از هرA لاین و ۱۰۰۰ بوته از هر B لاین در محیط کاملا ایزوله در مزرعه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان کشت گردید. پس از انتخاب بوته ها در مزرعه در خطوط A لاین، آزمون تست دانه گرده بر روی آنها با محلول یدید یدور پتاسیم یک درصد (جهت دستیابی به بوته های صددرصد عقیم) صورت گرفت. نهایتا تلاقی های A/B بین بوته‌های صد در صد عقیم A و نگهدارنده B صورت گرفت در نتیجه در حدود ۱۱ درصد بوته مربوط به ندا A، ۲۴ درصد بوته مربوط به نعمت A، ۱۱/۷ درصد بوته دشت A، ۵/۷ درصد بوته چمپا A، ۲/۹ درصد بوته آمل۳ A، صددرصد عقیم بودند. در سال زراعی دوم لاین‌های خواهری بهمراه B لاین مورد نظر در خطوط مجزا جهت مطالعه عقیمی دانه گرده مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده به‌دلیل خلوص بالا از پتانسیل بالایی در تولید ارقام هیبرید برخوردار باشند.

کلمات کلیدی: برنج، نرعقیم سیتوپلاسمی، خالص‌سازی، Grow Out Test

مقدمه

از آنجا که برنج غذای اصلی نیمی از جمعیت جهان می‌باشد، تولید جهانی آن نیز باید تا سال ۲۰۳۰، به میزان ۴۰ درصد افزایش یابد تا بتواند جوابگوی نیازهای جمعیت رو به رشد باشد (راجندران و همکاران، ۲۰۰۷). با توجّه به محدودیت‌های اقلیمی برای رشد و توسعه زمین‌های زیر کشت این مقدار غذا باید از زمین‌های موجود و با استفاده کمتر از عوامل اگروشیمیایی به دست آید. پس از معرفی و تکثیر برنج هیبرید در چین، تولید ارقام هیبرید به عنوان یک گزینه تکنولوژیکی قابل اجرا برای استفاده از پدیده هتروزیس و شکستن سقف عملکرد ژنتیکی در اقصی نقاط جهان مورد توجه قرار گرفت. از آنجایی که برنج گیاهی تقریبا خودگشن است، جهت تولید تجاری بذر هیبرید برنج باید از سیستم‌های نرعقیمی استفاده شود. نرعقیمی به بیان ساده به عدم توانایی گیاه در تولید دانه گرده فعال اطلاق می‌گردد که توسط اثر متقابل فاکتورهای ژنتیکی که درون ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی وجود دارد کنترل می‌شود (نانس، ۲۰۰۶). روش سه‌لاینی بر مبنای نرعقیمی سیتوپلاسمی و سیستم بازگرداننده باروری است که در آن برای تولید بذر هیبرید از سه لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) یا A لاین، لاین نگهدارنده یا B لاین و لاین بازگرداننده باروری یا R لاین استفاده می‌شود (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳). در این سیستم لاین نرعقیم حاوی فاکتورهای کنترل کننده نرعقیمی (S) در سیتوپلاسم و آلل‌های مغلوب (rf) ژن‌های بازگرداننده باروری در هسته می‌باشد. لاین نگهدارنده با لاین CMS ایزولاین بوده، به این جهت که دارای ژن‌های مشابه هسته‌ای با لاین‌های CMS بوده و تنها در فاکتور سیتوپلاسمی (N) از آنها متفاوت می‌باشد. لاین‌های B علاوه بر این که خودبارور هستند، می‌توانند جهت نگهداری و تکثیر لاین‌های A به کار روند، زیرا زمانی‌که با لاین‌های A تلاقی می‌یابند منجر به حفظ عقیمی در این لاین‌ها می‌گردند. در حال حاضر در حدود ۹۵ درصد لاین‌های CMS موجود بر اساس سیتوپلاسم WA می‌باشند (ایچی و همکاران، ۲۰۰۳) که نشان دهنده اهمیت این نوع سیتوپلاسم می‌باشد. با توجه به اصلاح و معرفی ارقام بومی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی نظیر ندا A، نعمت A، دشت A، چمپا A، آمل۳ A در کشور (نعمت‌زاده و همکاران، ۲۰۰۶)، لزوم حفظ، نگهداری و تکثیر آنها ضروری به‌نظر می‌رسد. به طوری که همه ساله باید ارزیابی‌هایی از نظر پایداری عقیمی دانه گرده، درصد دگرگشنی و دیگر صفات مهم آلوگامی صورت گیرد. از این گذشته با بررسی‌های به عمل آمده، لاین‌های B بیشترین گیاهان خارج از تیپ را در لاین‌های CMS تشکیل می‌دهند. بنابراین حفظ خلوص ژنتیکی لاین‌های CMS برای بهره‌برداری از پتانسیل هتروزیس ضروری می‌باشد (ژیانهوا و همکاران، ۱۹۹۷؛ یاشیتولا و همکاران،

۲۰۰۲). ارزیابی خلوص بذور هیبرید و لاین‌های والدینی به طور معمول با استفاده از آزمون GOT [1] صورت می‌گیرد که بر اساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و گلدهی در مرحله بلوغ می‌باشد (بالستر و همکاران، ۱۹۹۸؛ کارگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ جنیا و پاندی، ۱۹۹۹؛ سانگ و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین هدف از تحقیق حاضر خالص‌سازی لاین‌های آلوپلاسمیک برنج با استفاده از نشانگرهای موفولوژیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق پنج لاین نر عقیم CMS به نام‌های ندا A، نعمت A، دشتA، چمپا A، آمل۳ Aبهمراه لاین‌های نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفتند. بذرپاشی لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده به ترتیب در تاریخ ۱۳۸۸/۱/۲۶ و ۱۳۸۸/۱/۱۷ صورت گرفت. نشاءکاری A لاین ها در تاریخ ۸۸/۳/۱۰ و B لاین ها در تاریخ ۸۸/۳ /۱۷ (به فاصله ۷ روز – جهت همزمانی گلدهی) انجام شد. نشاءکاری A/B بصورت یک به یک و با فاصله انجام گرفت بطوری‌که در حدود ۱۰۰۰ بوته از هر کدام از لاین‌ها جهت نشاء کاری در نظر گرفته شد که حدود ۳۰۰ متر مربع برای هر CMS اختصاص یافت. کلیه مراقبتهای زراعی لازم طبق عرف منطقه صورت گرفت. قبل از شروع گلدهی، محیط با استفاده از چتایی کاملا ایزوله گردید.

آزمون تست دانه گرده و انجام تلاقی‌های دستی

ابتدا بوته های A لاین دارای فرم ایده‌آل[2] در مزرعه انتخاب و با نصب اتیکت مشخص شدند. تست دانه گرده با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی یدید-یدور پتاسیم یک درصد صورت گرفت. بطور تصادفی یک خوشه جهت ارزیابی تست دانه گرده با یدید یدور پتاسیم انتخاب و با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. جهت انتخاب بوته‌های صد در صد عقیم خوشه‌ها از ۱ تا ۱۰ امتیازدهی شدند. بطوریکه عدد ۱۰ بیانگر صد در صد عقیم بودن می‌باشد. والد پدری نیز فقط بصورت تک بوته در مزرعه انتخاب و کدگذاری شد. بطوری‌که هر لاین A با لاین B انتخابی تلاقی داده شده بدین شکل که ۲ الی ۳ خوشه از لاین A جهت دورگ گیری انتخاب گردید. انتخاب بوته ها و عقیم‌سازی بعد از ظهر بوده و در صبح روز بعد والد پدری انتخاب و عمل گرده افشانی در ساعت ۱۲-۱۳ ظهر انجام گرفت.

1- Grow out test
2- Ideotype

نتایج و بحث

در سال اول اجرای این تحقیق تنظیم همزمانی گلدهی مدنظر قرار گرفت. بدین ترتیب ایزوله کردن هنگام گل‌دهی، انتخاب تک بوته A لاین، نصب اتیکت و شماره گذاری در مزرعه انجام گردید (شکل-۱). در ادامه بوته های A لاین دارای فرم ایده‌آل انتخاب و تک خوشه آن جهت آزمون تست دانه گرده مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲). بوته های صددرصد عقیم انتخاب و با B لاین انتخابی تلاقی داده شد. در سال دوم بذور هر یک از لاین‌های نرعقیم بطور جداگانه در روی خط در کنار B لاین آن در محیط کاملا ایزوله کشت گردید. ردیف های که کاملا" یکنواخت و بدون هیچگونه بوته‌های off type بوده، انتخاب و به‌صورت بالک جمع‌آوری گردید. در اینجا ابتدا A / B را مورد بررسی قرار می‌گیرد (جدول ۱). از حدود ۹۰ بوته ندا A در حدود ۱۰ بوته صددرصد عقیم انتخاب و دو رگ گیری انجام شد (۱۰ تلاقی). در مورد نعمت A در حدود ۴۵ بوته مورد ارزیابی قرار گرفت که بوته های صددرصد عقیم با این شماره ها انتخاب و تلاقی صورت گرفت (۱۱ تلاقی). در مورد دشت A در حدود ۸۵ بوته مورد ارزیابی قرار گرفت که بوته هایی با نمره ۱۰ و ۹/۵ با این شماره ها انتخاب شدند و تلاقی صورت گرفت (۱۰ تلاقی). در مورد چمپا A در حدود ۱۴۰ بوته لاین A مورد ارزیابی قرار گرفت که بوته هایی با نمره ۱۰ و ۹ با این شماره ها انتخاب و تلاقی صورت گرفت (۸ تلاقی). در مورد آمل۳ A در حدود ۲۷۰ بوته لاین A مورد ارزیابی قرار گرفت که بوته هایی با نمره ۱۰ و ۹/۷۵ و ۹ با این شماره ها انتخاب شدند و تلاقی صورت گرفت (۸ تلاقی). در همه این تلاقی‌ها بعد از ۳۰ روز F1 برداشت و B لاین ها نیز از مزرعه بصورت تک بوته و با کد انتخابی موردنظر برداشت شدند. از این لاین‌های انتخابی می‌توان در برنامه‌های تولید بذر هیبرید استفاده نمود.

یکی از چالش‌های مهم تولید بذر برنج هیبرید، خلوص ژنتیکی بذر می‌باشد، زیرا سطح بالایی از خلوص در این گیاه جهت بهره‌برداری از سطح مناسبی از هتروزیس امری ضروری است. لذا بروز ناخالصی در طی مراحل مختلف تولید بذور هیبرید به علت پراکندگی دانه گرده غیروالدینی، دگرگرده-افشانی ناخواسته و اختلاط فیزیکی، خصوصا اختلاط بذور لاین‌های A و B (مهمترین منبع ناخالصی) دور از انتظار نمی‌باشد. برآورد می‌شود به ازای هر ۱٪ ناخالصی در بذور هیبرید، مقدار کاهش عملکرد در حدود ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار خواهد بود (کوموری و نیتا، ۲۰۰۴). به طوری که ایچی و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند که مقدار خلوص بذور هیبرید ارائه شده به کشاورز نباید از ٪۹۶ کمتر باشد در حالی که در گزارش راجندران و همکاران (۲۰۰۷) حداقل خلوص ٪۹۸ اعلام گردید. طبیعی است که لاین‌های والدینی مورد استفاده در تولید بذر هیبرید نیز باید از سطح بالایی از خلوص ژنتیکی(٪۹۹≥) برخوردار باشند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). بر همین اساس کوموری و نیتا (۲۰۰۴) گزارش نمودند که لازمه تولید بذور هیبرید خالص، داشتن پیش فرض صحیحی از مدیریت خلوص لاین‌های والدینی

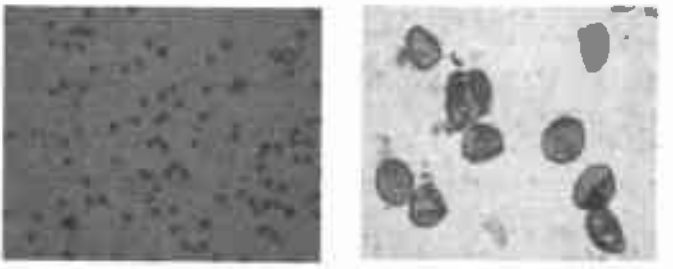
به‌ویژه لاین‌های CMS می‌باشد. به همین منظور ارزیابی، نگهداری و بررسی خلوص ژنتیکی لاین‌ها در این تحقیق صورت گرفت. با توجه به اصلاح و معرفی ارقام بومی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی در کشور، کنترل و گواهی بذور تولید شده به لحاظ خلوص ژنتیکی امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد که در این زمینه نقش نشانگرهای مولکولی بر کسی پوشیده نیست. با توجه به نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده به‌دلیل خلوص بالا از پتانسیل بالایی در تولید ارقام هیبرید برخوردار باشند.

منابع

1. Ballestter, J. and M. Carmen. 1998. Determination of F_1 hybrid seed purity in pepper using PCR–based markers. *Euphytica*. 103: 223–226.
2. Garg, A., A.K. Singh, K.V. Prabhu, T. Mohapatra, N.K. Tyagi, N. Nandakumar, R. Singh and F.U. Zaman. 2006. Utility of a fertility restorer gene linked marker for testing genetic purity of hybrid seeds in rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*. 34: 9-18.
3. 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.
4. Jena K.K. and S.K. Pandey. 1999. DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. *Hybrid Rice Newsletter*. 2:13–14
5. Jianhua, Z., M.B. Mcdonald and P.M. Sweeney. 1997. Testing for genetics purity in Petunia and Cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers. *Horticultural Science*. 32: 246-274.
6. Komori, T. and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breeding*. 123: 549–553.
7. Nancy, A.E. 2006. Cytoplasmic male sterility and fertility Restoration. *The plant Cell*. 18: 515-517.
8. Nematzadeh, G., A. JuharAli, M. Sattari, A. Valizadeh, E. Alinejad and M.Z. Nouri. 2006. Relation between different allogamic associated trait characteristics of the five newly developed cytoplasmic male sterile (CMS) lines in rice. *Journal of Central European Agriculture*. 7: 49-56.
9. Rajendran, N., R. Gandhimani, S. Singh and K. Palchamy. 2007. Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 156:129–139.
10. Sang, X., Z. Yang, B. Zhong, Y. Li, L. Hou, Y. Pei, G. Li and G. He. 2006. Assessment of purity of rice CMS lines using cpDNA marker. *Euphytica*. 152: 177 – 183.

11. Virmani, S.S., C.X. Mao, R.S. Toledo, M. Hossain and A. Janaiah. 2002. Hybrid rice seed production technology and its impact on seed industries and rural employment opportunities in Asia. *IRRI Technical Bulletins*. PP: 1-13.
12. Virmani, S.S., Z.X. Sun, T.M. Mou, A. Jauharali and C.X. Mao. 2003. Two-line hybrid rice breeding manual. Los Bonos (Philippinines), Internationahl Rice Research Institute.
13. 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.
14. 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.

شکل ۱- شمای مزرعه خالص سازی لاین های نر عقیم سیتوپلاسمی A/B – پژوهشکده برنج و مرکبات



الف ب

شکل ۲- آزمون تست دانه گرده با استفاده از محلول یدید- یدور پتاسیم در لاین‌های ندا A (الف) و نعمت A (ب)

جدول ۱- لیست لاین های تک بوته انتخابی نر عقیم سیتوپلاسمی A/B

امل A/B ۲	جیبا A/B	دشت A/B	نعمت A/B	ندا A/B
امل ۲ A/B (نمره عقیمی ۹)	جیبا A/B (نمره عقیمی ۹)	دشت A	۲- نعمت A/B ۳/۵	۹/۵
۱۲۹	۱۴۵	۸	۵- نعمت A/B	۳۶/۵
(نمره عقیمی ۹/۷۵)	(نمره عقیمی ۹)			
۲۳۴	۲۴	۹ (نمره عقیمی ۹/۵)	۶- نعمت A/B	۳۱/۵
۲۳۵ (نمره عقیمی ۹)	۶۶	۱۰ (نمره عقیمی ۹/۵)	۷- نعمت A/B	۳۶/۵
۲۳۹	۸۲ (نمره عقیمی ۹)	۲۵ (نمره عقیمی ۹/۵)	۹- نعمت A/B	۴۲/۵
۲۵۴	۹۰ (نمره عقیمی ۹)	۵۴	۱۱- نعمت A/B	۴۳/۵
۲۵۶	۱۲۲	۵۸	۱۲- نعمت A/B	۴۵/۵
۱۰۶	۱۲۴	۶۵	۱۵- نعمت A/B	۷۰/۵
		۸۰	۲۱- نعمت A/B	۷۱/۵
		۸۱	۲۲- نعمت A/B	۸۰/۵
			۲۸- نعمت A/B	