ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره٤ ، زمستان ١٣٨٧
صفحه٧٤-٦٥

شناسایی نشانگرهای مولکولی اختصاصی سیتوپلاسم نرعقیم WA در برنج و تولید نشانگرهای اختصاصی SCAR

اسدالله احمدی‌خواه
استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : ahmadikhah_a@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

در این مطالعه از ٤ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی و ٤ لاین نگهدارنده متناظر با آنها جهت بررسی‌های مولکولی استفاده شد. با استفاده از ٣٥ آغازگر RAPD اقدام به تکثیر دی. ان. اِ. لاین‌های ایزوسیتوپلاسمیک نرعقیم و نگهدارنده شد. پنج آغازگر RAPD توانستند پنج نوار چندشکل میان لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ندا-A و لاین نگهدارنده آن ندا-B پیدا نمایند. برای تأیید بیشتر ارتباط نوارهای شناسایی شده با سیتوپلاسم نرعقیم یا نربارور، از این ٥ آغازگر برای غربال دی. ان. اِ. شش لاین نرعقیم و نگهدارنده هم استفاده شد که از میان آنها تنها دو آغازگر OPC05 و OPH03 توانستند نوارهای اختصاصی سیتوپلاسم نرعقیم را تکثیر کنند. آغازگرهای OPC05 و OPH03 تولید نوارهایی به ترتیب به طول ٥٠٠~ جفت باز و ١٩٠٠~ جفت باز نمودند. نوار ١٩٠٠~ جفت بازی تولید شده توسط OPH03 با موفقیت در پلاسمید pGEM-T همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی شد. براساس توالی این نوار، چندین آغازگر جدید SCAR طراحی و ساخته شد و از آنها برای یافتن چندشکلی میان لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده استفاده شد. نتایج PCR با این آغازگرهای SCAR حاکی از آن است که دو تا از این آغازگرها در ترکیب با هم (SCARmt01R-SCARmt01F) قادر به تولید چندشکلی میان لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده هستند. همچنین استفاده از آغازگرهای ترکیبی RAPD منجر به تولید چندشکلی میان لاین CMS و لاین نگهدارنده توسط آغازگرهای OPA01-OPB04 شد. همسانه‌سازی و توالی‌یابیِ نوار تولید شده توسط این آغازگرها و طراحی سه جفت نشانگر SCAR جدید بر اساس این توالی، نیز منتج به شناسایی یک نشانگر همبارز و اختصاصی SCAR با قابلیت بازشناسی لاین‌های CMS از لاین‌های نگهدارنده شد. شناسایی این نشانگرها و استفاده از آنها در ترکیب با هم می‌تواند به پیشبرد اهداف اصلاحی در برنامه تولید برنج هیبرید کمک شایانی نماید.

واژه های کلیدی

**برنج ،
نرعقیمی سیتوپلاسمی ،
نشانگرهای مولکولی ،
RAPD ،
SCAR**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

مقدمه

نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS)[1] در اکثر گیاهان زراعی و در بیش از ۱۶۰ گونه گیاه گلدار مشاهده شده است (۱). نرعقیمی سیتوپلاسمی در برنج اولین بار در سال (۱۹۶۶) از چین گزارش شد (۲). بیش از ۲۰ منبع CMS مختلف در برنج شناسایی شده است (۳) ولی در بین آنها، نرعقیمی سیتوپلاسمی WA[2] دارای فراوانی بالاتری بوده و اکنون صنعت تولید بذر هیبرید برنج حدود ۹۰٪ وابسته به این منبع نرعقیمی می‌باشد (۴، ۵ و ۶). مشخص شده که در تمام موارد به جز یک مورد (۷)، عامل کنترل کننده CMS در میتوکندری قرار دارد (۸). 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 (۸ و ۹). اما، به کمک ژن‌های تجدیدکننده باروری (ژن‌های *Rf*) می‌توان باروری را به لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) بازگرداند. از اینرو، سیستم‌های CMS/*Rf* مدل‌های مناسبی برای مطالعه بر هم کنش‌های ژنتیکی و کارکرد تعاونی ژنوم‌های میتوکندریایی و هسته‌ای می‌باشند (۱۰). سیتوپلاسم به دست آمده از برنج وحشی که به نرعقیمی سیتوپلاسمی تیپ وحشی (CMS-WA) معروف است، به صورت اسپروفیتی به ارث می‌رسد و بنابراین، این نوع نرعقیمی سیتوپلاسمی کاربرد وسیعی در تولید لاین‌های جدید CMS دارد که در برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید قابل استفاده هستند (۱۱ و ۱۲).

اساس ایجاد تنوع ژنتیکی، تفاوت یا چند شکلی طبیعی ناشی از تغییر توالی‌های دی. ان. اِ. در ژنوم‌های گیاهی و جانوری در بین و داخل یک گونه می‌باشد (۱۲ و ۱۳). کشف نشانگرهای جدید در چند دهه اخیر که مبتنی بر شناسایی چندشکلی‌ها در مولکول دی.ان.اِ. بوده است، پنجره امیدبخشی به روی بهنژادگران گشوده است. تفاوت نشانگرهای مولکولی مبتنی بر چندشکلی‌های طبیعی موجود در ژنوم است. این نشانگرها در زمره پرکاربردترین نشانگرها در اصلاح نباتات هستند، زیرا به تعداد زیادی در ژنوم وجود دارند و در واقع از گروه‌های مختلفی از جهش‌های حادث شده در دی. ان. اِ. [نظیر جهش نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن بازها یا بروز اشتباهاتی در تعداد موتیف‌های دی. ان. اِ. تکراری] به وجود آمده‌اند (۱٤ و ۱۵). به همین دلیل استفاده از آنها در اصلاح نباتات به خصوص در تکنولوژی تولید بذر هیبرید برنج روز به روز افزایش می‌یابد. به طور مثال، از نشانگرهای RFLP (۱۶) برای بازشناسی لاین‌های CMS از لاین‌های نگهدارنده استفاده به عمل آمده است (۱۷ و ۱۸). اما استفاده از نشانگرهای RFLP برای ارزیابی سریع تعداد زیادی نمونه چندان کارآمد نیست (۱۹).

همچنین از نشانگرهای SSR برای تشخیص لاین‌های CMS-WA از لاین‌های نگهدارنده و تجدید کننده باروری استفاده شده است (۱۹). یاشیتولا و همکاران (۲۰۰۴) از جفت آغازگرهای RM9 برای آشکارسازی چند شکلی میان لاین‌های CMS-WA، نگهدارنده و تجدید کننده باروری استفاده نموده و موفق به همسانه‌سازی و توالی‌یابی یک نوار چند شکل (با اندازه ۳۲۳ جفت نوکلئوتید) شدند که فقط در لاین‌های CMS-WA تکثیر می‌شد (۱۹).

نشانگرهای RAPD اولین نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] (PCR) بودند که با هدف نقشه‌یابی ژنتیکی و انگشت نگاری دی. ان. اِ. ابداع گردیدند (۲۰). از این نشانگرها استفاده‌های گسترده‌ای در نقشه‌یابی ژنتیکی، انگشت‌نگاری ژنومی و مطالعه تنوع ژنتیکی شده است (۲۱ ، ۲۲، ۲۳ و ۲٤)، زیرا انجام آن‌ها نسبتاً ساده بوده و نیازی به دانستن توالی جهت طراحی آغازگر نمی‌باشد. البته از نشانگرهای RAPD برای بازشناسی لاین‌های CMS از لاین‌های نگهدارنده نیز استفاده شده است (۱۸، ۲۵ و ۲۶) که نتایج نسبتاً خوبی به دست داده است. اخیراً، ایچی و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از آغازگر تصادفی OPA12 یک نوار چند شکل به طول ۱۶۰۰ جفت باز شناسایی نمودند که فقط در

[1] Cytoplasmic male sterility

[2] WA male sterility

[3] Polymerase chain reaction

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

دو لاین CMS-WA تکثیر می‌شود، اما در لاین‌های نگهدارنده متناظر با آن‌ها تکثیر نمی‌گردد (۲۶).

با توجه به این که تولید برنج هیبرید در ایران اخیراً با استفاده از سیتوپلاسم CMS-WA آغاز شده، بنابراین نیاز به توسعه این صنعت، بیش از پیش وظیفه متخصصین اصلاح نباتات، ژنتیک و بیوتکنولوژی کشور را در راستای انتقال این سیتوپلاسم به لاین‌های جدید جهت گسترش منابع والدینی که بتوانند در این برنامه مورد استفاده قرار گیرند، سنگین می‌کند. گسترش سریع منابع والدینی مبتنی بر آگاهی از وضعیت سیتوپلاسمی مواد گیاهی وارد شده در برنامه اصلاحی و بازشناسی این مواد در سطح سیتوپلاسمی از یکدیگر و همچنین از سایر موادی است که در ترکیبات جدیدِ لاین‌های مختلف به دست می‌آیند. ولی درجه بالای چندشکلی میان دی. ان. اِی میتوکندریایی لاین CMS و لاین نگهدارنده متناظر با آن، امر شناسایی عامل میتوکندریایی کنترل کننده نرعقیمی را با مشکل مواجه می‌سازد (۸)؛ از اینرو شناسایی نشانگرهای مولکولی و یا توسعه نشانگرهای مولکولی جدید و استفاده از آنها می‌تواند به شناسایی این سیتوپلاسم‌ها با درجه اطمینان بالا کمک نماید. همچنین از نشانگرهای مولکولی اختصاصی CMS-WA می‌توان برای ارزیابی خلوص بذر در جاهایی که لاین‌های نرعقیم در کنار لاین‌های نگهدارنده کشت می‌شوند، استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج دی. ان. اِ.

در این مطالعه از ۴ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (ندا-A، IR67017-A، یوسن-A و IR68897-A) و ۴ لاین نگهدارنده متناظر با آنها (B لاین‌های آن‌ها) استفاده شد. این لاین‌ها در شرایط کنترل شده با دمای ۲۸/۲۶ ^{o}C (شبانه/روزانه) کشت شدند و در زمانی که ارتفاع گیاهچه‌ها به ۱۰ سانتی‌متر رسید، از برگ‌ها نمونه‌برداری شد تا از آن‌ها برای استخراج دی. ان. اِ. استفاده شود. دی. ان. اِ. کل با استفاده از روش CTAB (۲۷) با انجام تغییراتی استخراج شد (۲۸).

آغازگرهای مورد استفاده و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (*PCR*)

از ۳۵ آغازگر تصادفی RAPD (Operon Technology) برای یافتن چندشکلی میان لاین‌های CMS و نگهدارنده استفاده شد. واکنش PCR برای آغازگرهای RAPD طبق برنامه زیر اجرا شد: ۹۴ºC بمدت ۲ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴ºC بمدت ۳۰ ثانیه، ۳۵ºC بمدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ºC بمدت ۱ دقیقه؛ و سرانجام ۷۲ºC بمدت ۷ دقیقه. لازم به ذکر است PCR با آغازگرهای RAPD تا تثبیت الگوی باندهی (حداقل برای ۳ بار) تکرار شد و در اینجا تنها نتایجِ مربوط به آن دسته از آغازگرهایی گزارش می‌شود که از تکرارپذیری بالایی برخوردار بوده‌اند. فرآورده‌های PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ محتوی ۰/۵ µg/ml اتیدیوم بروماید جدا شدند. قطعات چندشکل در ناقل پلاسمیدی pGEMT طبق دستورالعمل کمپانی مربوطه (شرکت فرمنتاز، روسیه) همسانه‌سازی شدند و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. برای طراحی آغازگرهای جدید SCAR از برنامه Primer 3.0 استفاده شد (۲۹؛ http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

واکنش PCR برای آغازگرهای اختصاصی SCAR طبق برنامه زیر اجرا شد: ۹۴ºC بمدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴ºC بمدت ۱ دقیقه، ۵۵، ۵۷ یا ۶۰ºC (بسته به آغازگرهای مورد استفاده) بمدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ºC بمدت ۱ دقیقه؛ و سرانجام ۷۲ºC بمدت ۷ دقیقه. فرآورده های PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ محتوی ۰/۵ µg/ml اتیدیوم بروماید جدا شدند (۳۰).

همسانه‌سازی و توالی‌یابی دی. ان. اِ.

برای همسانه‌سازی قطعات دی. ان. اِی مورد نظر، از کیت مخصوص تخلیصِ قطعات از ژل آگارز، ساخت شرکت اگروديا‌گ‌نوستیکا[1] (مسکو، روسیه)، استفاده شد. نوارهای مورد نظر از ژل جدا و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت تخلیص

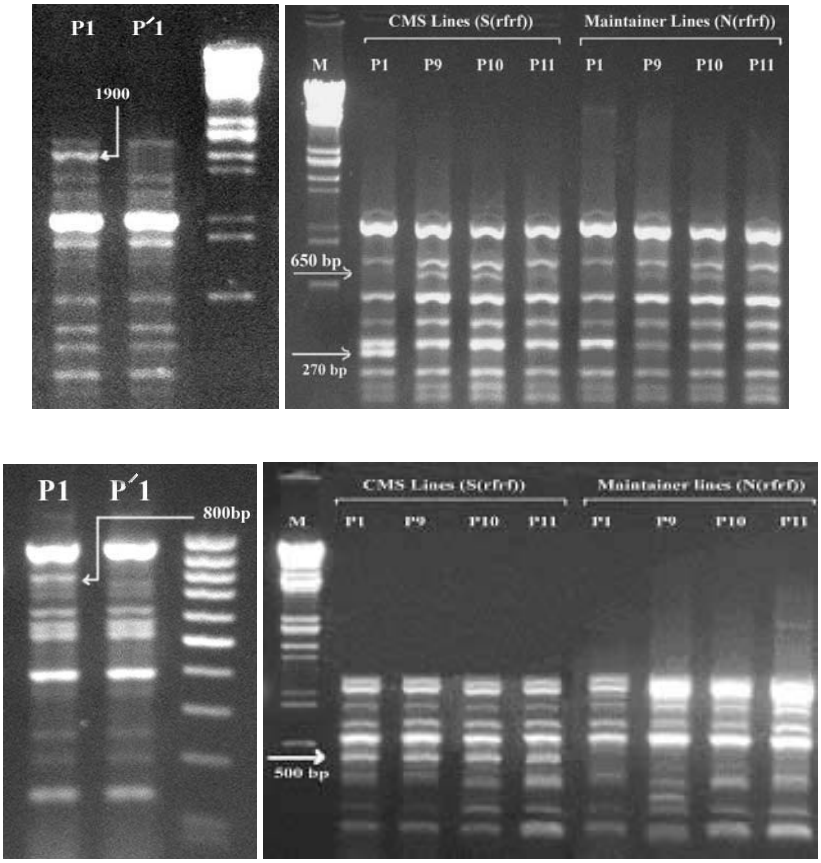
[1] AgroDignostica

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

شدند (۳۱). قطعات تخلیص شده، با استفاده از کیت شرکت پرومگا (www.promega.com) در ناقل همسانه‌سازی pGEM-T ادغام شدند (۳۲) و سپس به روش آنزیمی خاتمه بسط زنجیره (۳۳) توالی‌یابی گردیدند (در شرکت سیلکس، روسیه). چندین آغازگر طویل (اختصاصی) بر روی توالی‌های به دست آمده طراحی و از آن‌ها برای تکثیر دی. ان. اِ. این‌های نرعقیم و نگهدارنده مورد مطالعه استفاده شد.

نتایج و بحث

برای شناسایی نشانگرهای مولکولی با قابلیت تفکیک میان سیتوپلاسم نرعقیم (با ژنوتیپ S/rfrf) و سیتوپلاسم طبیعی نربارور (با ژنوتیپ N/rfrf)، دی. ان. اِ. کل استخراجی از دو لاین ایزوژن برنج به نام‌های ندا–A (لاین CMS) و ندا–B (لاین نگهدارنده) با استفاده از ۳۵ آغازگر RAPD به وسیله واکنش PCR تکثیر شد. در آنالیز RAPD، پنج آغازگر منفرد قادر به کشف چندشکلی میان این دو لاین بودند. نشانگرهای OPA09، OPA14، OPC02، OPC05 و OPH03 با تکرارپذیری بالایی توانستند چندین نوار چندشکل میان لاین CMS (یا A لاین) و لاین نگهدارنده (یا B لاین) پیدا نمایند. نشانگرهای OPA09، OPA14 و OPC05 نوارهای مختص لاین نرعقیم به ترتیب با اندازه های ۲۰۰~ جفت باز، ۸۰۰~ جفت باز و ۵۰۰~ جفت باز تولید کردند. همچنین، نشانگرهای OPC02 و OPH03 تنها تولید یک نوار مختص لاین نرعقیم به ترتیب با اندازه ۲۷۰~ جفت باز و ۱۹۰۰~ نمودند (شکل ۱). لازم به ذکر است که این نوارهای چندشکل دارای تکرارپذیری بالایی بوده‌اند (آزمایش برای ۳ بار تکرار شد).



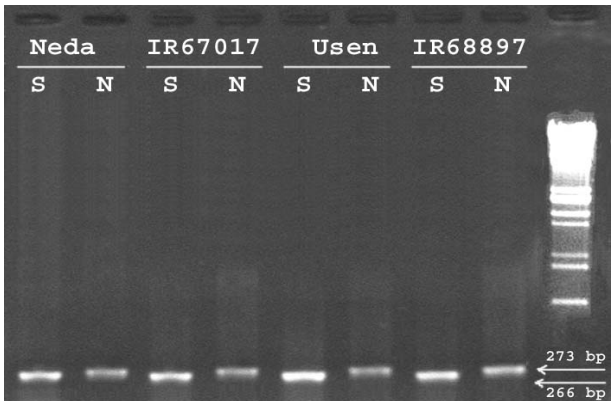
شکل ۱. الگوی نواردهی آغازگرهای OPC02 (بالا، راست) و OPH03 (بالا، چپ)، OPC05 (پایین راست) و OPA14 (پایین، چپ). P1، ندا–A؛ P´1، ندا–B؛ P9، IR67017؛ P10، یوسن؛ P11، IR68897. نوارهایی که حداقل میان ۲ لاین چندشکلی نشان داده‌اند، در شکل نشان داده شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

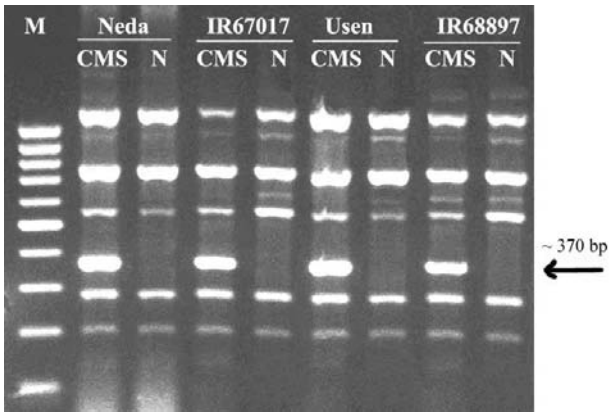
برای تعمیم و تأیید این نتایج در سطح وسیعتر و معتبرتری، دی.ان.اِ. از سه جفت دیگر لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده‌های متناظر با آنها در معرض تکثیر با ۵ آغازگر چندشکل پیش‌گفته قرار داده شد. تنها دو آغازگر توانستند نوارهای مختص سیتوپلاسم نرعقیم شناسایی نمایند. آعازگرهای OPC05 و OPH03 همان نوارهای پیش‌گفته را فقط در تمامی لاین‌های نرعقیم با تکرارپذیری بالا (تا تثبیت الگوی نواردهی با حداقل ۳ بار آزمایش) تولید نمودند (شکل ۱).

برای تبدیل نشانگرهای غیر اختصاصی فوق به نشانگرهای اختصاصی SCAR[1]، نوارهای چندشکل تولید شده توسط آغازگرهای OPC05 و OPH03 با موفقیت در وکتور pGEM-T همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی شدند. چندین آغازگر بر روی توالی‌های به دست آمده (به ترتیب به طول ۵۲۰ جفت باز برای OPC05 و ۱۸۸۰ جفت باز برای OPH03) طراحی و از آن‌ها برای تکثیر دی. ان. اِی ۸ لاین مورد مطالعه استفاده شد. هیچکدام از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی ۵۲۰ جفت بازی آغازگر OPC05 نتوانستند چندشکلی میان لاین‌های CMS و لاین‌های نگهدارنده آشکار سازند. اما در مورد قطعه تکثیری $OPH03_{1880}$، از بین شش آغازگر طراحی شده، تنها دو آغازگر SCARmt01-F و SCARmt01-R توانستند یک نوار چندشکل همبارز بین لاین‌های نگهدارنده و نرعقیم تولید نمایند که پس از توالی‌یابی نوارهای مربوط به برخی از لاین‌های نگهدارنده و نرعقیم، مشخص شد اندازه نوار چندشکل در لاین‌های نگهدارنده (۲۶۸-۲۶۶ جفت باز مربوط به دو لاین نگهدارنده ندا-B و IR68897-B) حدود ۷-۶ جفت باز بزرگتر از لاین‌های نرعقیم (۲۷۳-۲۷۱ جفت باز مربوط به دو لاین نرعقیم ندا-A و IR68897-A) می‌باشد (شکل ۲). توالی‌های مربوط به لاین‌های نرعقیم ندا-A و IR68897-A به ترتیب با شماره اختصاصی DQ778740 و DQ683437 و توالی مربوط به لاین نگهدارنده IR68897-B با شماره اختصاصی DQ683438 در بانک ژن جهانی (www.ncbi.nlm.nih.gov) ثبت شده است.



شکل ۲. نمونه نوارهای تولید شده با آغازگرهای SCARmt01-F & R در ۸ لاین مورد بررسی.

در این آزمایش همچنین برای افزایش امکان آشکارسازی چندشکلی میتوکندریایی میان لاین‌های CMS و نگهدارنده مورد بررسی، از ترکیبات دو به دوی برخی آغازگرهای RAPD استفاده گردید. یکی از این ترکیبات، (ترکیب OPA01-OPB04) منجر به تکثیر یک نوار چندشکل تنها در لاین‌های CMS با اندازه تقریبی ۳۷۰ جفت باز گردید (شکل ۳).



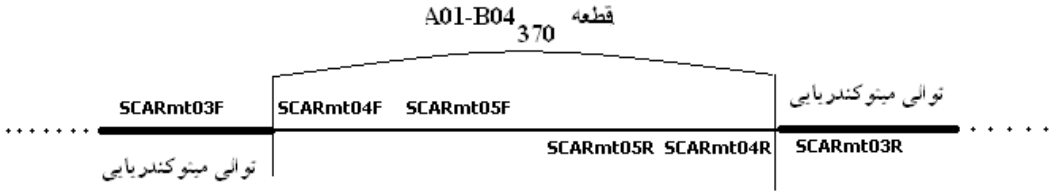
شکل ۳. الگوی نواردهی ۴ لاین نرعقیم و ۴ لاین نگهدارنده متناظر با آن‌ها توسط آغازگرهای ترکیبی OPA01-OPB04.

برای تبدیل نشانگر فوق به نشانگر اختصاصی SCAR، نوار چندشکل مربوط به لاین CMS ندا-A پس از همسانه‌سازی مورد توالی‌یابی قرار گرفت (با شماره اختصاصی DQ683439 در بانک ژن جهانی). براساس توالی قطعه $A01\text{-}B04_{370}$، ۳ جفت آغازگر

[1] Sequence characterized amplified region

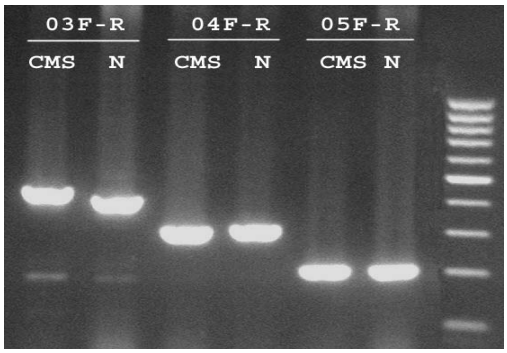
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

(بـــا نمادهـــای SCARmt03F&R, SCARmt04F&R, SCARm05F&R) طراحی و سنتز گردید. لازم به ذکر است کـه براساس آنالیز همردیف‌سازی این تـوالی بـا تـوالی میتوکنـدریایی بـرنج، دو آغـازگر SCARmt03F و SCARmt03R بـه گونـه‌ای طراحی شدند که بتوانند این قطعه را از دو طـرف احاطـه نماینـد. برای این کار لازم بود توالی ایـن دو آغـازگر در خـارج از تـوالی قطعه $A01\text{-}B04_{370}$ و بر روی تـوالی میتوکنـدریایی احاطـه‌کننـده ناحیه مزبور قرار بگیرد. این در حالی بود که چهار آغـازگر دیگـر در داخل قطعه مزبور طراحـی گردیدنـد (شـکل ۴). در نهایـت از همه آنها بـرای تکثیـر دی. ان. اِ. لایـن CMS و لایـن نگهدارنـده متناظر با آن استفاده شد.



شکل ۴. نحوه طراحی آغازگرهای SCAR بر اساس توالی قطعه $A01\text{-}B04_{370}$ و توالی میتوکندریایی احاطه کننده آن.

تکثیر با آغازگرهای اختصاصـی فـوق حـاکی از آن اسـت کـه دو آغازگر احاطه‌کننده SCARmt03F&R قادر به آشکارسازی تفاوت میان لاین CMS و لاین نگهدارنده متناظر با آن می‌باشند (شکل۵).

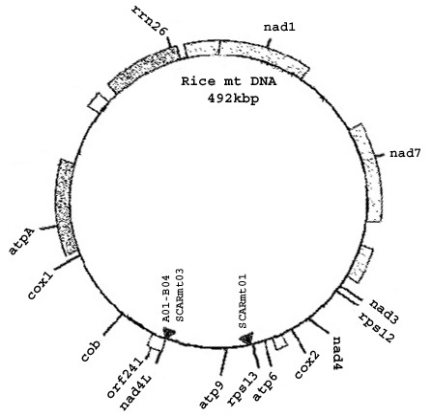


شکل ۵. نمونه الگوی نواردهی لاین CMS و لاین نگهدارنده با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس توالی قطعه $A01\text{-}B04_{370}$ و توالی میتوکندریایی احاطه کننده آن، بر روی ژل آگارز دو درصد پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید.

قطعـات چندشـکل تکثیـر شـده در لایـن CMS نـدا–A و لایـن نگهدارنده ندا–B به وسیله آغازگرهای SCARmt03F&R، پس از همسانه‌سازی توالی‌یابی گردیدند. نتـایج تـوالی‌یـابی حـاکی از آن است که طول قطعه تکثیری در لاین CMS (با شماره اختصاصـی DQ683440 در بانک ژن جهـانی) ۴ جفـت بـاز بزرگتـر از لایـن نگهدارنده (با شماره اختصاصی DQ683441) می‌باشد.

مقایسه توالی این قطعه با توالی میتوکندریایی برنج نشان می‌دهد که این قطعه در طولی معادل ۳۴۹ جفت باز دارای حـدود ۹۸٪ شباهت با ناحیه پروموتری ژن میتوکندریایی *nad4L* می‌باشد. این یافته حاکی از آن است کـه احتمـالاً یکـی از کاندیـداهای ژن عامل CMS می‌تواند ژن *nad4L* باشد.

در نهایت، آنالیز همردیف‌سازی توالی‌هـای قطعـات بـه دست آمده در این مطالعه، با توالی میتوکندریایی بـرنج، منجـر بـه مکان‌یابی فیزیکـی ایـن نشـانگرهای اختصاصـی بـر روی تـوالی میتوکندری برنج شده است (شکل ۶).



شکل ۶. نتیجه آنالیز همردیف‌سازی توالی نشانگرهای تولید شده بر روی توالی میتوکندری برنج. مکان فیزیکی هر نشانگر بر روی توالی میتوکنـدری بـرنج بـا پیکان‌های توپر نشـان داده شـده اسـت (تصـویر مـورد اسـتفاده بـرای نمـایش موقعیت نشانگرهای پیدا شده در این مطالعه، از منبع شـماره ۳۴ اقتبـاس شـده است).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

مشخص شده که ژن عامل نرعقیمی سیتوپلاسمی در دی. ان. اِ. میتوکندریایی قرار دارد (۸ و ۳۵)؛ اما به علت آن که این صفت دارای وراثت مادری است، آمیزش بین یک لاین CMS به عنوان والد مادری و یک لاین بارور به عنوان والد پدری، منتج به ایجاد ترکیبات جدید سیتوپلاسمی نمی‌شود (۲۴ و ۳۶) و از اینرو، امکان ردیابی این خصوصیت و نقشه‌یابی آن از طریق روش رایج برای ژن‌های هسته‌ای وجود ندارد (۱۰). برای فائق آمدن بر این مشکل، استفاده از نشانگرهای تصادفی نظیر RAPD پیشنهاد شده است (۳۷ و ۳۸). از طرف دیگر، لاین‌های والدینی مورد استفاده در تولید بذر هیبرید، بالاخص لاین CMS (A لاین) و لاین نگهدارنده ایزوسیتوپلاسمیک آن (B لاین) بایستی دارای درجه خلوص بسیار بالایی (در حدود ۹۹ درصد) باشند و باید دقت کافی مبذول گردد تا از اختلاط بذر آن‌ها در خزانه و مزرعه جلوگیری شود. اما، در مزارع تولیدی معمولاً اختلاط A لاین‌ها و B لاین‌ها اجتناب ناپذیر است و هیچ راهی در مراحل اولیه رشد، مگر در زمان گلدهی، برای تشخیص این اختلاط وجود ندارد، زیرا A لاین و B لاین کاملاً شبیه یکدیگرند و تنها تفاوت آن‌ها در نوع سیتوپلاسم است. برای ارزیابی اختلاط و درجه خلوص این لاین‌ها، از نشانگرهای مولکولی نظیر RFLP استفاده شده است (۱۷ و ۱۸). اما نشانگرهای RFLP برای غربال سریع تعداد زیادی نمونه مناسب نیستند (۱۹). در عوض نشانگرهای RAPD برای تشخیص لاین‌های CMS از لاین‌های نگهدارنده پیشنهاد و بکار گرفته شده‌اند (۱۸ و ۲۵). اخیرا نیز، ایچی و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از یک آغازگر RAPD (بنام OPA12) نواری با اندازه ۱۶۰۰ جفت باز شناسایی نمودند که فقط در دو لاین CMS-WA تکثیر می‌شد، اما در لاین‌های نگهدارنده متناظر با آن‌ها تکثیر نمی‌شد (۲۶). چنانچه در مطالعه حاضر نیز دیدیم استفاده از آغازگرهای RAPD منتج به آشکارسازی چندشکلی میان لاین‌های CMS و لاین‌های نگهدارنده گردید. اما، تکرارپذیری پایین و تولید تعداد زیادی نوار باعث شده تا استفاده از نشانگرهای RAPD برای تشخیص لاین‌های CMS از لاین‌های نگهدارنده چندان کارآمد نباشد (۱۹).

پس از شناسایی یک نشانگر غیر اختصاصی مانند RAPD می‌توان آن را تبدیل به یک نشانگر اختصاصی SCAR کرد (۳۱ و ۳۹). نشانگرهای SCAR مبتنی بر PCR، عموماً همبارز هستند و امکان تفکیک انواع ژنوتیپ‌ها را میسر می‌کنند (۴۰ و ۴۱). از نشانگرهای SCAR با موفقیت برای شناسایی و نقشه‌یابی ژن‌های زیادی در گیاهان مختلف، از جمله ژن‌های مقاومت به بیماری‌های گوناگون در کاهو (۳۹)، مرکبات (۳۱)، چغندر قند (۴۲)، گوجه‌فرنگی (۴۳) و گندم (۴۴)، برای نقشه‌یابی میزان سلولز دیواره سلولی در برنج (۴۵) و برای تعیین جنسیت در گیاهان روغنی (۴۶) استفاده شده است. برای مثال، یاشیتولا و همکاران در سال ۲۰۰٤ (۳۵) از یک جفت آغازگر SSR برای تکثیر دی. ان. اِ. لاین CMS-WA و نگهدارنده‌های مربوطه استفاده نمودند که از بین چند نوار تکثیر شده تنها فقط یکی از آن‌ها در لاین CMS تکثیر می‌شد. آن‌ها این نوار چندشکل ۳۲۳ جفت نوکلئوتیدی را پس از همسانه‌سازی، توالی‌یابی کرده و نهایتاً آن را تبدیل به یک نشانگر اختصاصی SCAR نمودند که فقط در لاین‌های CMS-WA تکثیر می‌شد.

اما، همیشه امکان تبدیل نشانگرهای RAPD به نشانگرهای SCAR وجود ندارد. برای مثال، در تحقیقی که توسط پاران و میشل‌مور در سال ۱۹۹۳ (۴۷) انجام شد، از نه نشانگر RAPD شناسایی شده، تنها چهار عدد تبدیل به نشانگرهای SCAR شدند. در مطالعه حاضر نیز، از بین سه نشانگر RAPD چندشکل میان لاین‌های مختلف CMS و نگهدارنده‌های متناظر با آن‌ها، تنها دو نشانگر با موفقیت تبدیل به نشانگر اختصاصی SCAR شد. احتمالاً یکی از دلایل این امر، حساسیت بالای روش RAPD است، زیرا مکمل نبودن حتی یک نوکلئوتید در پایانه ′۳ آغازگر کوتاه RAPD بر کارآیی تکثیر توسط آغازگر به شدت تأثیر می‌گذارد؛ از اینرو آغازگرهای SCAR طراحی شده بر اساس آن‌ها ممکن است نتوانند قطعه مورد نظر را تکثیر کنند (۴۸).

از آنجا که در این تحقیق از چهار جفت لاین ایزوسیتوپلاسمیک (شامل ۴ لاین CMS-WA و ۴ لاین نگهدارنده مربوطه) استفاده گردید، ممکن است این سوال مطرح گردد که آیا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

تعداد لاین‌های آزمایشی برای نتیجه‌گیری کافی می‌باشد؟ با توجه به اینکه دو نشانگر غیر اختصاصی RAPD به نشانگرهای اختصاصی همبارز SCAR تبدیل شده‌اند که امکان بازشناسی لاین‌های CMS را از لاین‌های نگهدارنده فراهم می‌کنند و از سوی دیگر آنالیز BLAST اثبات کرد که این دو نشانگر SCAR در ناحیه دی. ان. اِ. میتوکندریایی قرار دارند (شکل ۶)، جای تردیدی وجود ندارد که نشانگرهای توسعه یافته در این تحقیق با کارآمدی کامل قادر به شناسایی لاین‌های CMS-WA از لاین‌های نگهدارنده می‌باشند؛ چنانچه آزمون این دو نشانگر SCAR در تعداد دیگری لاین CMS-WA و نگهدارنده‌های مربوطه (شامل ۶ جفت لاین) حاکی از دقت ۱۰۰٪ این نشانگرها در تعیین ژنوتیپ لاین‌های مورد آزمایش می‌باشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

منابع

1. Laser KD and Lersten NR (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot Rev, 38: 425–454.
2. Shinjyo C and Omura T (1966) Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, Oryza sativa L. I. Fertilities of F1, F2 and offsprings obtained from their mutual reciprocal back-crosses and segregation of completely male sterile plants. Jap J Breed, 16: 179-180.
3. Virmani SS, Siddiq EA and Muralidharan K (1998) Advances in hybrid rice technology. Proc. 3rd Int Symp on Hybrid Rice, IRRI: 129.
4. Raj KG and Virmani SS (1987) Allelism test for restorer genes of six promising IR restorer lines. Rice Genet Newslett, 3: 23-24.
5. 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.
6. 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 Sci, 42: 1873-1875.
7. 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 Mol Biol, 14(4): 477–490.
8. Schnable PS and Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in plant Sci, 3(5): 175-180.
9. 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.
10. Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, Long Y, Zhong Y and Liu Y-G (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. The Plant Cell, 18: 676–687.
11. Komori T, Yamamoto T, Takemori N, Kashihara M and 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.
12. Zhang QY, Liu YG, Zhang GQ and Mei MT (2002) Molecular mapping of the fertility restorer gene Rf-4 for WA cytoplasmic male sterility in rice. Acta Genet Sinica, 29: 1001-1004.
13. He GH, Wang WM, Liu GQ, Hou L and Xiao YH (2002) Mapping of two fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in minghui63 using SSR markers. Acta Genet Sinica, 29(9): 798-802.
14. McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Zing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D and Stein L (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (Oryza sativa L.). DNA Res, 9: 199-207.
15. Virmani SS, Sun ZX, Mou TM and Jauhar Ali A, Mao CX (2003) Two-line Hybrid rice breeding manual. Los Baños (Philippines), International Rice Research Institute.
16. Botstein B, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet, 32: 314-331.
17. Narayanan KK, Senthilkumar P, Venmadhi S, Thomas G and Thomas J (1996) Molecular genetic studies on the rice mitochondrial genome. p. 689–695. In: Khush GS (ed.) rice genetics III. Proc. Third Intl. Rice Genet. Symp., Los Banos, Manila, the Philippines. 16–20 Oct. 1995. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines.
18. Sane AP, Seth P, Ranade SA, Nath P and Sane PV (1997) RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice. Theor Appl Genet, 95: 1098–1103.
19. Yashitola J, Sundaram RM, Biradar SK, Thirumurugan T, Vishnupriya MR, Rajeshwari R, Viraktamath BC, Sarma NP and Sonti RV (2004) A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. Crop Sci, 44: 920–924.
20. Welsh J and Mc Clelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res., 19: 303-306.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

21. Gonzalez JM and Ferrer E (1993) Random amplified polymorphic دی. ان. اِ. analysis inHordeum species. Genome, 38: 1029-1031.
22. Lanza LLB., de Souza CL, Ottoboni LMM, Vieira MLC and de Souza AP (1997) Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. Theor Appl Genet, 94(8): 1023-1030.
23. Chowdari KV, Venkatachalam SR, Davierwala AP, Gupta VS, Ranjekar PK and Govila OP (1998) Hybrid performance and genetic distance as revealed by the (GATA)4 microsatellite and RAPD markers in pearl millet. Theor Appl Genet, 97: 163-169.
24. Virk AS, Bran JS and Mangot BK (2000) Cytoplasmic differentiation using near-isonuclear polycytoplasmic male sterile lines in pearl millet. Euphytica, 67(1): 127-134.
25. Jena KK and Pandey SK (1999) DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. Hybrid Rice Newsl, 2: 13–14.
26. Ichii M, Hong DL, Ohara Y, Zhao CM 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.
27. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA, 81: 8014–8018.
28. Ahmadikhah A (2006) Molecular tagging of CMS and fertility restoration genes in rice. Ph.D thesis. MTAA Publications, Moscow, Russia: pp 161.
29. Rozen S and Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
30. Richards AD and Rodgers A (2007) Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. Chem Soc Rev, 36: 471-483.
31. Deng Z, Huang S, Xiao SY and Gmitter FG (1997) Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. Genome, 40: 697-704.
32. Clark JM (1998) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases, Nucl Acids Res, 16: 9677-9686.
33. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 74: 5463-5467.
34. Newton KJ (1988) Plant mitochondrial genomes: Organization, expression and variation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 39:503–532
35. Smart CJ, Monéger F and Leaver CJ (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. Plant Cell, 6: 811–825.
36. Tang HV, Pring DR, Shaw LC, Salazar RA, Muza FR, Yan B and Schertz KF (1996) Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. Plant J, 10(1): 123–133.
37. Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L and Philouze J (2000) Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. Genome, 43: 29-40.
38. Tingey SV, Rafalski JA and Villiams JGK (1992) Genetic analysis with RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding: Selected papers from the Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota, USA.
39. Kesseli RV., Paran I and Michelmore RW (1992) Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. In: Proceeding of the Symposium: "Application of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota, USA. 31-36.
40. Jiang C and Sink KC (1997) RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. Euphytica, 94: 229-333.
41. Hernandez P, Dorado G, Cabrera A, Laurie DA, Snape JW and Martin A (2002) Rapid verification of wheat-Hordeum introgressions by direct staining of SCAR, STS, and SSR amplicons. Genome, 45: 198-203.
42. Barzen E, Stahl R, Fuchs E, Borchardt DC and Salamini F (1997) Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rrl allele conferring resistance to rhizomania. Molecular Breeding, 3: 231-238.
43. Dax E, Livneh O, AUskevicius E, Edelbaum O, Kedar N, Gavish N, Milo J, Geffen A, Blumenthal A, Rabinowitch HD and Sela I (1998) A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, Tm2, in tomato. Euphytica, 101: 73-77.
443. Laroche A, Demeke T, Gaudet DA, Puchalski B, Frick M and McKenzie R (2000) Development of a PCR marker for rapid identification of the *Bt-10* gene for common bunt resistance in wheat. Genome, 43: 217-223.
45. Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T and Sasaki T (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 EST site. Plant Cell, 14: 525–535.
46. Danilova TV and Karlov GI (2006) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Hmulus lupulus* L.). Euphytica, 151(1): 15-21.
47. Paran I. and Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet, 85: 985–993.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]

48. Koveza OV (2003) Identification, cloning and the study of molecular markers of pea genome. Ph.D thesis. MCU Publications, Moscow, Russia: 175 pp.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.6.9]