

ارزیابی فاصله ژنتیکی لاین‌های ایزوسیتوپلاسمی نرعیقیم برنج

Evaluation of Genetic Distance of Rice Male Sterile Isoisoplasmic Lines

عمار افخمی قادی^{۱*}، نادعلی بابائیان جلودار^۲ و نادعلی باقری^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۱۵

چکیده

برای توسعه برنامه‌های به‌نژادی برنج هیبرید، طبقه‌بندی صحیح لاین‌های والدینی در میان گروه‌های هتروتیپ امری ضروری است و می‌تواند به به‌نژادگر در پیش‌بینی عملکرد هیبریدهای F_1 و گزینش والدین مناسب کمک شایانی نماید. از این‌رو در این تحقیق، فواصل ژنتیکی ۲۰ لاین والدینی و ۴۰ لاین نرعیقیم برنج با استفاده از صفات مورفولوژی، گلچه‌ای و گرده‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. گروه‌بندی افراد نشان داد که لاین‌های نرعیقیم ندا در زیر شاخه اول و لاین‌های نرعیقیم نعمت نیز با یکدیگر در زیر شاخه دوم از گروه اول قرار دارند. لاین‌های نرعیقیم دشت A (دشت \times IR68899A)، خزر A، حسنی A، گرده A، سنگ‌طارم A، شصتک‌محمدی A و نگهدارنده آن‌ها نیز هر کدام به‌طور جداگانه در یک گروه قرار گرفتند بنابراین مشخص می‌شود که این لاین‌ها نیز بعد از چندین نسل تلاقی برگشتی به خلوص بالایی رسیده‌اند. از نتایج این تحقیق می‌توان جهت انتخاب لاین‌های نرعیقیم مطلوب و به‌کارگیری در برنامه تولید برنج هیبرید به‌منظور یافتن نتاج با عملکرد بالا استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نرعیقیمی ژنتیکی - سیتوپلاسمی، هیبرید برنج، خصوصیات مورفولوژیکی و گرده‌شناسی

۱. دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین، قزوین، ایران
۲ و ۳. به‌ترتیب استاد و استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
*: نویسنده مسئول
Email: a.afkhami@sanru.ac.ir

مقدمه

به‌کارگیری و توسعه موفق برنج هیبرید در دو دهه گذشته در چین، پتانسیل بیشتر عملکرد برنج با بهره‌گیری از هتروزیس یا قدرت هیبرید در گیاهان خودگشن را به اثبات رسانید (ویرمانی^۱، ۱۹۹۴). از آن‌جا که برنج هیبرید ۲۰-۱۵ درصد عملکرد بیشتری را نسبت به بهترین لاین‌های به‌نژادی پاکوتاه نشان داده است (یوان^۲، ۱۹۹۴؛ ویرمانی، ۱۹۹۴؛ ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین تکنولوژی برنج هیبرید راهکار مؤثری در افزایش بیشتر عملکرد جهانی برنج ارائه کرده است (یوان، ۱۹۹۴؛ ویرمانی، ۱۹۹۴؛ هی و لیو^۳، ۱۹۹۸؛ جانایا و حسین، ۲۰۰۰). در این بین جهت تولید بذره‌های هیبرید تجاری در برنج، به‌کارگیری پدیده نرعقیمی از ضروریات امر می‌باشد. اگرچه انواع مختلف نرعقیمی در برنج شناسایی شده‌اند، ولی نرعقیمی ژنتیکی - سیتوپلاسمی در توسعه و تکامل فن‌آوری تولید بذر هیبرید نقش بیشتری دارد (ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷). طی سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۸ حدود ۲۰ منبع نرعقیم شناسایی شده است اما از منبع WA به‌دلیل ایجاد لاین‌های نرعقیم پایدار و وجود تعداد زیاد لاین‌های اعاده‌کننده برای آن‌ها، در تولید هیبریدهای تجاری بیشتر استفاده می‌شود (ویرمانی و زمان^۴، ۱۹۹۸).

طبقه‌بندی صحیح لاین‌های والدینی در میان گروه‌های هتروتیک برای توسعه برنامه‌های به‌نژادی برنج هیبرید امری ضروری است که می‌تواند به به‌نژادگر در انتخاب والدین و پیش‌بینی عملکرد هیبریدهای F₁ کمک شایانی نماید (نیا^۵ و همکاران، ۱۹۹۹). طی سال‌های گذشته با تلاش‌های بی‌وقفه در اجرای برنامه‌های به‌نژادی برنج هیبرید در ایران، تعدادی لاین نرعقیم ژنتیکی - سیتوپلاسمی تولید گردید که این لاین‌ها در شرایط ارزیابی و یا به‌کارگیری در تولید هیبرید F₁ مورد استفاده قرار می‌گیرند (بابائیان جلودار^۶ و همکاران، ۲۰۰۵). با بررسی‌های به عمل آمده، نشان داده شده است که لاین‌های B بیشترین گیاهان خارج از تیپ را در لاین‌های CMS تشکیل می‌دهند. طبق گزارش سیندهو و کومار (۲۰۰۲) خلوص ژنتیکی بذر هیبرید تجاری در هند ۹۸ درصد می‌باشد (ورما^۷، ۱۹۹۶). گزارش شده که حتی ۱ درصد ناخالصی در لاین مادری، می‌تواند عملکرد بذر هیبرید را حدود ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار

کاهش دهد (مائو^۸ و همکاران، ۱۹۹۸؛ یاشیتولا^۹ و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین حفظ خلوص ژنتیکی لاین‌های CMS برای بهره‌برداری از پتانسیل هتروزیس ضروری می‌باشد (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲). ارزیابی خلوص بذور هیبرید و لاین‌های والدینی به‌طور معمول با استفاده از آزمون GOT^{۱۰} صورت می‌گیرد که براساس ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و گل‌دهی در مرحله بلوغ می‌باشد (بالستر و کارمن^{۱۱}، ۱۹۹۸؛ جنا و پن‌دی^{۱۲}، ۱۹۹۹؛ گارگ^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۶؛ سنگ^{۱۴} و همکاران، ۲۰۰۶). تجزیه فاصله ژنتیکی نیز ابزار مفیدی برای برنامه‌های به‌نژادی در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد و حلقه مهمی بین حفاظت و بهره‌برداری از منابع ژنتیکی موجود، می‌باشد (بوهن^{۱۵} و همکاران، ۱۹۹۹؛ محمدی و پراسانا^{۱۶}، ۲۰۰۳). تجزیه فاصله ژنتیکی ارقام برنج براساس صفات مورفولوژی - زراعی به‌طور معمول انجام می‌گیرد (ماهاپاترا^{۱۷} و همکاران، ۱۹۹۵؛ کاو^{۱۸}، ۱۹۹۵؛ نیا و همکاران، ۱۹۹۹؛ مالون^{۱۹} و همکاران، ۲۰۰۹). نشانگرهای مورفولوژیکی با استفاده از روش‌های چند متغیره با مزایایی همچون عدم‌نیاز به امکانات پیچیده و گران‌قیمت برای اندازه‌گیری، ساده بودن و کم هزینه بودن هنوز از نشانگرهای مورفولوژیکی برای بررسی میزان قرابت بین ژنوتیپ‌ها استفاده شده است (مانیفستو^{۲۰} و همکاران، ۲۰۰۱؛ کوربیلینی^{۲۱} و همکاران، ۲۰۰۲؛ آلمانزا^{۲۲} و همکاران، ۲۰۰۳). هم‌چنین میزان ارتباط بین هیبرید F₁ و فاصله ژنتیکی والدین در مطالعات تعدادی از محققین بررسی شده است (زنگ^{۲۳} و همکاران، ۱۹۹۵).

هدف از این تحقیق، ارزیابی انشعاب ژنتیکی در میان لاین‌های ایزوسیتوپلاسمی و ارقام والدی هیبرید برنج و پیش‌بینی مطلوبیت لاین‌ها در برنامه تولید برنج هیبرید و خالص‌سازی لاین‌های برنج ایزوسیتوپلاسمی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک بود.

8. Mao
9. Yashitola
10. Grow of Test
11. Ballester and Carmen
12. Jena and Pandey
13. Garg
14. Sang
15. Bohn
16. Mohammadi and Prasanna
17. Mahapatra
18. Kaw
19. Malone
20. Manifesto
21. Corbellini
22. Almanza
23. Zang

1. Virmani
2. Yuan
3. He and Liu
4. Virmani and Zaman
5. Nghia
6. Babaeian jelodar
7. Verma

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی مورد استفاده شامل ۷ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی (A لاین) و نگهدارنده آن‌ها (B لاین‌ها)، از مرکز بین‌المللی تحقیقات برنج فیلیپین و هم‌چنین ۳۳ لاین نرعقیم حاصل از هفتمین تلاقی برگشتی ۱۲ رقم بومی و اصلاح‌شده ایرانی با لاین‌های نرعقیم معرفی شده از ایری و لاین‌های والدینی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بود (بابائیان جلودار و همکاران، ۲۰۰۵) (جدول ۱). در سال زراعی ۱۳۹۱، بذور لاین‌های نرعقیم و والدین آن‌ها به‌صورت آزمایشی در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کشت گردید. حدود یک ماه پس از بذرقاشی در خزانه، نشاها با فاصله ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر در زمین اصلی کشت شدند.

بعد از گل‌دهی، جهت ارزیابی خصوصیات گلچه و صفات آلوگامیک، در ساعات اولیه صبح (۹-۱۱) از داخل لاین‌های مورد مطالعه، ۳ بوته از هر لاین و از هر بوته ۲ خوشه انتخاب و جهت بررسی صفاتی همچون طول کیسه بساک، طول میله پرچم، طول کلاله، طول گلوم، میزان خروج خوشه از غلاف (EP^۱) درصد باروری دانه گرده (F)، شکل دانه گرده (۱: چروکیده، ۲: کروی)، درصد باروری خوشه‌ها (FP^۲)، طول گلچه و عرض گلچه به آزمایشگاه منتقل و در زیر بینوکولر و با کاغذ شطرنجی، اندازه‌گیری شدند. همه اندازه‌گیری صفات مطابق سیستم ارزیابی استاندارد انجام گرفت (ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ ایری، ۲۰۰۲).

مطالعه باروری دانه گرده و تعیین درصد عقیمی لاین‌های نرعقیم از روش ویرمانی (ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ ایری، ۲۰۰۲) با استفاده از رنگ‌آمیزی دانه گرده از طریق اضافه نمودن محلول یک درصد یدید- یدور پتاسیم (KI-I₂)، به نمونه و حذف مواد زائد (دیواره بساک) از محیط اسلاید و مشاهده در میکروسکوپ انجام گردید. هم‌چنین بررسی صفات فنولوژی و مورفولوژی تعداد روز تا ۵ درصد گل‌دهی، ۵۰ درصد گل‌دهی، پایان گل‌دهی، رنگ بساک (۱: سفید؛ ۲: زرد روشن؛ ۳: زرد)، رنگ کلاله (۱: سفید؛ ۲: سبز روشن؛ ۳: زرد؛ ۴: ارغوانی روشن؛ ۵: ارغوانی)، وجود یا فقدان ریشک، اندازه ریشک، مقبولیت فنوتیپی، تحمل به کرم ساقه‌خوار، رنگ پایه بوته، یکنواختی فیزیکی لاین‌ها، تعداد بوته‌های خارج از تیپ در لاین‌ها، رنگ نوک دانه، ارتفاع بوته در مرحله سنبله‌دهی (متوسط ده بوته به سانتی‌متر)، تعداد پنجه بارور، طول برگ پرچم، عرض برگ

پرچم، طول خوشه، تعداد گلچه، طول دوره گل‌دهی و مساحت برگ پرچم برای هر لاین انجام گرفت (ایری، ۲۰۰۲). فاصله ماهالانوبیس از روش رائو^۴ (۱۹۵۲) و فاصله تاکسونومی استاندارد از روش /سنیت و سوکال^۵ (۱۹۷۳) تخمین زده شد. برای بررسی فاصله تاکسونومی استاندارد، میانگین لاین‌ها قبل از تجزیه خوشه‌ای با تفریق میانگین از مقادیر هر صفت و تقسیم بر انحراف معیار استاندارد شد. ماتریس فاصله تاکسونومی استاندارد (D_{ij}) برای i و j های منفرد و N صفت مورفولوژی به‌صورت زیر محاسبه شد.

$$D_{ij} = [\sum_{k=1}^n (X_{ki} - X_{kj})^2 / N]^{1/2} \quad (1)$$

هم‌چنین تجزیه خوشه‌ای از طریق فاصله تاکسونومی با استفاده از روش جفت گروهی غیرروزی با میانگین حسابی^۶ (UPGMA) انجام شد.

داده‌های مربوط به تجزیه مورفولوژی برای لاین‌های خواهری نعمت، با استفاده از معیار نمونه‌ای d^۲ ماهالانوبیس و نرم‌افزار PAST، به ماتریس فاصله ژنتیک فنوتیپیک (Phenotypic Genetic Distance Matrix) تبدیل شد در نتیجه دندروگرامی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش جفت گروهی غیرروزی میانگین حسابی به‌دست آمد. برازش (تطبیق) بین ماتریس فاصله و دندروگرام با ضریب همبستگی کوفنتیک (r) (سوکال و رالف^۷، ۱۹۶۲) و با نرم‌افزار PAST محاسبه شد. از میانگین فاصله ژنتیکی حاصل از ضرایب تشابه به‌عنوان ارزش برش برای توصیف خوشه‌ها استفاده شد (مالون، ۲۰۰۹).

جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02 و ضریب تشابه با مربع فاصله اقلیدسی و با الگوریتم UPGMA صورت گرفت. بدین صورت با ادغام داده‌های مربوط به صفات زراعی، مورفولوژی و گلچه‌شناسی یک ماتریس ۶۰ × ۱۸ به‌دست آمد که از این داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و پس از استاندارد کردن میانگین داده‌ها ماتریس شباهت ۶۰ × ۶۰ ایجاد شد و از این ماتریس برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در نرم‌افزار NTSYS استفاده گردید.

4. Rao
5. Sneath and Sokal
6. Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages
7. Sokal and Rohlf

1. Exsertion Panicle
2. Fertility Panicle
3. IRR1

جدول ۱: اسامی لاین‌های نرعیقیم حاصل از تلاقی برگشتی و والد مادری و نگهدارنده
Table 1: List of CMS lines of backcross and maternal and maintainer lines

ردیف B Line	ردیف Row	نمونه لاین‌های نرعیقیم حاصل از تلاقی برگشتی و A لاین‌های مادری Male sterile lines derived from the backcross and A lines	ردیف Row	نمونه لاین‌های نرعیقیم حاصل از تلاقی برگشتی Male sterile lines derived from the backcross	ردیف Row
IR68897 B	L ₄₁	گرده A (گرده × خزر A) Gerde A (Gerde × Khazar A)	L ₂₁	ندا A (ندا × IR58025A) Neda A (Neda × IR58025A)	L ₁
IR68888 B	L ₄₂	گرده A (گرده × IR68888A) Gerde A (Gerde × IR68888A)	L ₂₂	ندا A (ندا × IR68280A) Neda A (Neda × IR68280A)	L ₂
IR68280 B	L ₄₃	گرده A (گرده × دانش A2) Gerde A (Gerde × Danesh A2)	L ₂₃	ندا A (ندا × IR68899A) Neda A (Neda × IR68899A)	L ₃
IR69224 B	L ₄₄	حسنی ریشک قرمز A (حسنی ریشک قرمز × دانش A2) Hasani Rishak Ghermiz A (Hasani Rishak Ghermiz × Danesh A2)	L ₂₄	ندا A (ندا × خزر A) Neda A (Neda × Khazar A)	L ₄
IR58025 B	L ₄₅	IR68888A	L ₂₅	ندا A (ندا × IR62829A) Neda A (Neda × IR62829A)	L ₅
IR62829 B	L ₄₆	IR68280A	L ₂₆	ندا A (ندا × IR67684A) Neda A (Neda × IR67684A)	L ₆
IR67684B	L ₄₇	IR69224A	L ₂₇	ندا A (ندا × IR68888A) Neda A (Neda × IR68888A)	L ₇
IR68899B	L ₄₈	IR58025A	L ₂₈	ندا A (ندا × IR69224A) Neda A (Neda × IR69224A)	L ₈
خزر B Khazar B	L ₄₉	IR62829A	L ₂₉	ندا A (ندا × دانش A2) Neda A (Neda × Danesh A2)	L ₉
ندا B Neda B	L ₅₀	IR68899A	L ₃₀	حسنی A (حسنی × دانش A2) Hasani A (Hasani × Danesh A2)	L ₁₀
حسنی B Hasani B	L ₅₁	خزر A Khazar A	L ₃₁	نعمت A (نعمت × IR68888A) Nemat A (Nemat × IR68888A)	L ₁₁
نعمت B Nemat B	L ₅₂	اوندA (اوندA × IR58025A) Avanda A (Avanda × IR58025A)	L ₃₂	نعمت A (نعمت × IR68899A) Nemat A (Nemat × IR68899A)	L ₁₂
شصتک محمدی B Shastak Mohammadi B	L ₅₃	سنگ طارم A (سنگ طارم × IR68280A) Sang Tarom A (Sang Tarom × IR68280A)	L ₃₃	نعمت A (نعمت × IR62829A) Nemat A (Nemat × IR62829A)	L ₁₃
دشت B Dasht B	L ₅₄	سنگ طارم A (سنگ طارم × خزر A) Sang Tarom A (Sang Tarom × Khazar A)	L ₃₄	نعمت A (نعمت × IR68897A) Nemat A (Nemat × IR68897A)	L ₁₄
اوندA B Avanda B	L ₅₅	سنگ طارم A (سنگ طارم × دانش A2) Sang Tarom A (Sang Tarom × Danesh A2)	L ₃₅	شصتک محمدی A (شصتک محمدی × دانش A2) Shastak Mohammadi A (Shastak Mohammadi A × Danesh A2)	L ₁₅
آمل 3 B Amol 3B	L ₅₆	سپیدرود A (سپیدرود × IR69224A) Sepidrood A (Sepidrood × IR69224A)	L ₃₆	دشت A (دشت × IR68888A) Dasht A (Dasht × IR68888A)	L ₁₆
گرده B Gerde B	L ₅₇	سپیدرود A (سپیدرود × IR68897A) Sepidrood A (Sepidrood × IR68897A)	L ₃₇	دشت A (دشت × IR68888A) Dasht A (Dasht × IR68888A)	L ₁₇
حسنی ریشک قرمز B Hasani Rishak Ghermiz B	L ₅₈	سپیدرود A (سپیدرود × IR62829A) Sepidrood A (Sepidrood × IR62829A)	L ₃₈	اوندA (اوندA × IR68899A) Avanda A (Avanda × IR68899A)	L ₁₈
سنگ طارم B Sang Tarom B	L ₅₉	سپیدرود A (سپیدرود × IR67684A) Sepidrood A (Sepidrood × IR67684A)	L ₃₉	آمل 3 A (آمل 3 × IR69224A) Amol 3A (Amol 3A × IR69224A)	L ₁₉
سپیدرود B Sepidrood B	L ₆₀	سپیدرود A (سپیدرود × خزر A) Sepidrood A (Sepidrood × Khazar A)	L ₄₀	آمل 3 A (آمل 3 × IR68888A) Amol 3A (Amol 3A × IR68888A)	L ₂₀

نتایج و بحث

نتایج حاصل از محاسبه شباهت بین جفت افراد که با استفاده از برآورد ضریب مربع فاصله اقلیدسی (D_{ij}) انجام پذیرفت نشان داد که در بین لاین‌های نرعقیم نعمت، نعمت A (نعمت \times IR68888A) و نعمت A (نعمت \times IR62829A) بیش‌ترین شباهت ($D_{ij} = 1$) را دارا بودند و البته سایر لاین‌های خواهری نیز شباهت بسیار بالایی با یکدیگر داشتند ($D_{ij} > 0/96$). تمامی لاین‌های نرعقیم نعمت شباهت یکسانی با ($D_{ij} = 0/92$) رقم والدی خود داشته است بنابراین تمامی لاین‌ها به یک میزان به خلوص ژنتیکی دست یافتند. (جدول ۲). در زمانی که والدین از نظر ژنتیکی شبیه به هم باشند چند تلاقی محدود ممکن است کافی به نظر برسد درحالی که با انتخاب ژنوتیپ‌های متفاوت به‌عنوان والدین در تلاقی برگشتی جهت حذف اطلاعات ژنتیکی نامطلوب، به چندین تلاقی برگشتی نیاز می‌باشد (فارسی و باقری، ۱۳۹۲).

ضریب تشابه ارقام به‌کار رفته در این تحقیق (ارقام بین‌المللی نگهدارنده باروری و ارقام ایرانی) نشان داد که دو رقم شصتک محمدی و IR67684B بیش‌ترین میزان تفاوت را داشتند (جدول ۳) بنابراین پیش‌بینی می‌شود که ارقام هیبرید حاصل از تلاقی این دو رقم هتروزیس بالایی نشان دهند. به‌طور کلی، رقم شصتک محمدی در بین ارقام مورد مطالعه، ضریب شباهت پایین‌تری در بررسی جفت افراد از خود نشان داده است که می‌توان این تفاوت را ناشی از زودرسی، دارا بودن برگ پرچم وسیع، ارتفاع بلند و خصوصیات متفاوت در مورفولوژی گلچه دانست. رقم حسنی ریشک قرمز نیز تفاوت نسبتاً بالایی با سایر ارقام نشان داده است که البته این رقم شباهت بالایی ($D_{ij} = 0/90$) با رقم حسنی داشته است. از آن‌جاکه رقم حسنی ریشک قرمز از توده جمعیت رقم حسنی خالص گردیده پیش‌بینی شباهت این دو با یکدیگر دور از انتظار نبود.

ضریب تشابه نشان داد که رقم ندا و نعمت شباهت بالایی با یکدیگر دارند ($D_{ij} = 0/92$) از آن‌جاکه این دو رقم، لاین خواهری یکدیگرند شباهتشان قابل پیش‌بینی بود (جدول ۳). بیش‌ترین تفاوت رقم ۳ امل با دو رقم حسنی ریشک قرمز ($D_{ij} = 0/36$) و حسنی ($D_{ij} = 0/39$) بوده است (جدول ۳) که از این تفاوت می‌توان در برنامه دورگ‌گیری و به‌نژادی ارقام و ایجاد تنوع ژنتیکی بیشتر بهره برد. چنانچه تفاوت بین والدین شرکت‌کننده در تلاقی بیشتر باشد امکان ظهور ترکیب مطلوب جدید بیشتری در میزان جمعیت کمتر، وجود خواهد داشت بنابراین گزینش بوته برتر با سهولت بیشتری انجام می‌گیرد.

گروه‌بندی افراد براساس نمودار درختی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۱)، نشان داد که نه گروه تشکیل شده و تمامی لاین‌های نرعقیم ندا ($L_1, L_2, L_3, L_4, L_5, L_6, L_7, L_8, L_9$) و هم‌چنین تمامی لاین‌های نرعقیم نعمت ($L_{11}, L_{12}, L_{13}, L_{14}$) با یکدیگر در گروه اول و به‌ترتیب در زیرگروه اول و دوم قرار دارند و این گروه‌بندی می‌تواند دلیل به خلوص رسیدن این لاین‌ها باشد بنابراین تمامی این ژنوتیپ‌های دو گروه از لاین‌ها، بعد از شش نسل تلاقی برگشتی، به یکدیگر شبیه شده و به خلوص ژنتیکی بالایی رسیدند. ارقام ندا و نعمت لاین‌های خواهری یکدیگر هستند که از تلاقی رقم ۳ امل و سنگ طارم اصلاح گردیدند بنابراین شباهت ژنتیکی لاین‌های نرعقیم حاصل از آن‌ها دور از انتظار نیست. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که رقم نگهدارنده نعمت (نعمت B) (L_{54}) نیز در گروه لاین‌های نرعقیم نعمت قرار گرفته که مؤید آن است که لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده نعمت، شباهت ژنتیکی بالایی پیدا کرده و به خلوص رسیدن لاین‌های نرعقیم را می‌رساند.

لاین نرعقیم دشت A (دشت \times IR68899A) (L_{16}) و نگهدارنده (L_{57}) نیز در گروه اول و زیرگروه چهارم قرار گرفتند بنابراین مشخص می‌شود که از دو لاین نرعقیم دشت، لاین دشت A (دشت \times IR68899A) بعد از چندین نسل تلاقی برگشتی به خلوص بیشتری رسیده است.

لاین نرعقیم خزر A (L_{31}) و نگهدارنده (L_{49}) نیز در یک گروه قرار گرفتند بنابراین مشخص می‌شود که این لاین نیز بعد از چندین نسل تلاقی برگشتی به خلوص بالایی رسیده است.

تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اغلب ژنوتیپ‌های بین‌المللی در یک گروه قرار می‌گیرند به‌طوری که لاین‌های نرعقیم IR68888A (L_{25}), IR68280A (L_{26}), IR62829A (L_{29}), IR68899A (L_{30}) با یکدیگر در گروه دوم و در مجاور هم قرار دارند و لاین‌های نگهدارنده‌شان IR68888 B (L_{42}), IR68280 (L_{46}), IR68899B (L_{48}) و در مجاورت A لاین‌هایشان قرار گرفته‌اند بنابراین شباهت این لاین‌ها به یکدیگر مشخص می‌شود و نشان از تنوع پایین این لاین‌ها و میزان نزدیکی خلوص ژنتیکی آن‌ها است. لاین IR58025A (L_{28}) نیز با لاین نگهدارنده IR58025B (L_{45}) خود در یک گروه و با کمی فاصله در کنار دیگر لاین‌های نرعقیم بین‌المللی قرار دارد.

لاین نرعقیم حسنی (L_{10}) نیز در گروه لاین نگهدارنده خود (L_{59}) و در کنار حسنی ریشک قرمز (L_{58}) قرار دارد. حسنی ریشک قرمز حاصل جهش خود به خودی از توده جمعیت حسنی بوده که ریشک قرمز در آن ایجاد شده است و به‌عنوان

که از خود نشان دادند و باروری نسبی نیز در آن‌ها مشاهده شد جهت تولید بذر هیبرید مناسب نبوده و از برنامه به‌نژادی برنج هیبرید حذف شدند.

لاین نرعقیم شصتک محمدی A (شصتک محمدی × دانش A۲) (L₁₅) و نگهدارنده شصتک محمدی B (L₆₀) نیز در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین این لاین نیز به خلوص ژنتیکی بالایی رسیده است. این دو لاین در پایین‌ترین قسمت دندروگرام قرار گرفتند و بیش‌ترین فاصله را با سایر لاین‌ها دارند که نشان‌دهنده آن است که با سایر ژنوتیپ‌ها بیش‌ترین تفاوت ژنتیکی را دارد و می‌توان از آن در تلاقی‌ها، برای بررسی مولکولی توارث‌پذیری استفاده نمود البته این لاین از نظر خصوصیات زراعی (علی‌رغم زودرسی و کیفیت دانه) مطلوب به نظر نمی‌رسد.

لاین جدید مطرح شده است بنابراین کنار هم قرار گرفتن این ارقام در یک گروه دور از انتظار نیست.

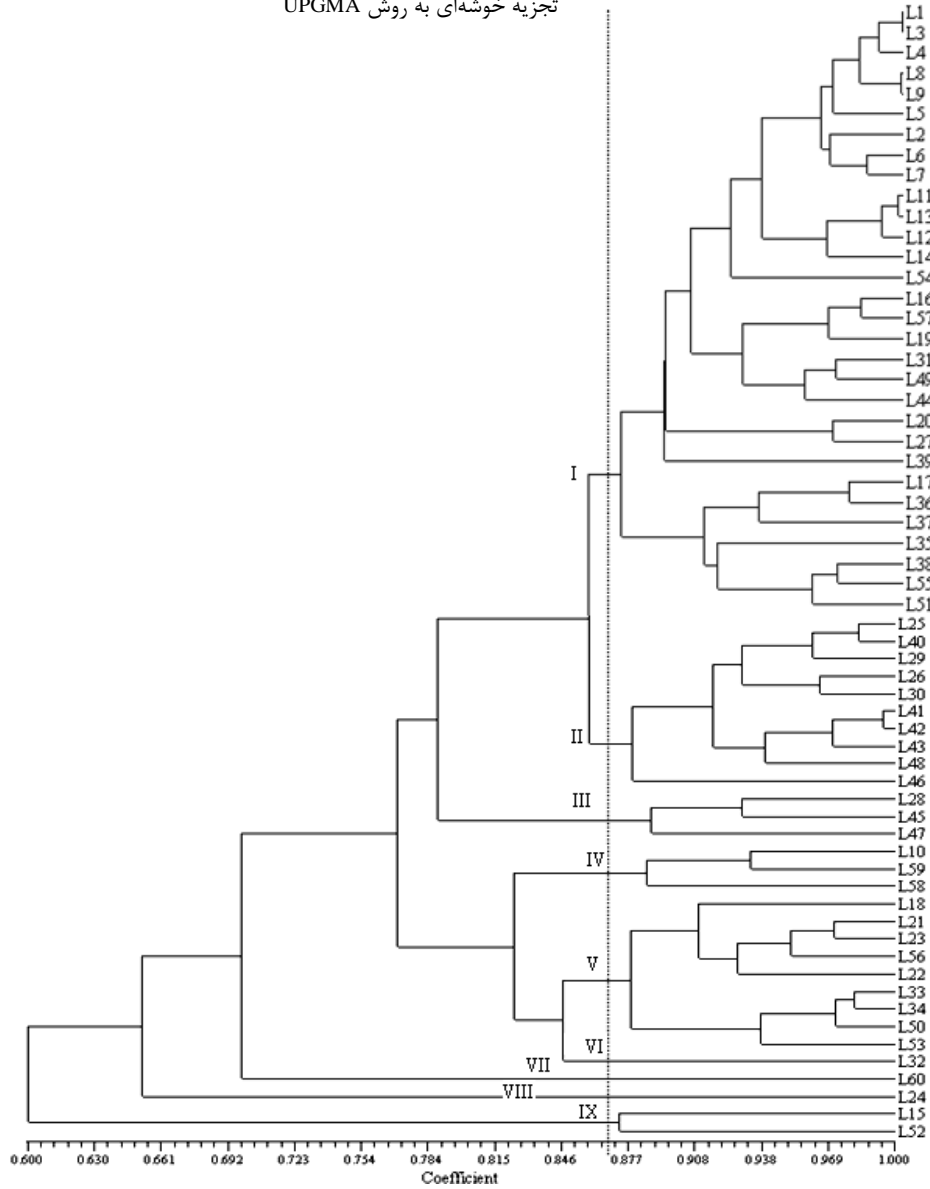
لاین‌های نرعقیم گرده A (گرده × خزر A) (L₂₁)، گرده A (گرده × IR68888A) (L₂₂)، گرده A (گرده × دانش ۲) (L₂₃)، و لاین نگهدارنده گرده B (L₅₆) نیز در یک خوشه قرار گرفتند و بنابراین این لاین‌ها نیز به خلوص ژنتیکی موردنیاز رسیده و شباهت ژنتیکی بالایی با لاین نگهدارنده خود نشان می‌دهند. لاین‌های نرعقیم سنگ طارم A (سنگ طارم × IR68280A) (L₃₃)، سنگ طارم A (سنگ طارم × خزر A) (L₃₄)، و لاین نگهدارنده سنگ طارم B (L₅₀) نیز در یک خوشه قرار گرفتند و بنابراین این لاین‌ها نیز به خلوص ژنتیکی موردنیاز رسیده و شباهت ژنتیکی بالایی با لاین نگهدارنده خود نشان می‌دهند. البته این گروه از لاین‌های سنگ طارم به علت عقیمی متفاوتی

جدول ۲: ضریب تشابه لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی نعمت با یکدیگر و والد نگهدارنده (ضریب مربع فاصله اقلیدسی)

Table 2: Similarity of Nemat CMS lines and B line (Square Euclidean Distance Coefficient)

نعمت A	نعمت A	نعمت A	نعمت A	لاین‌ها Lines
(نعمت × IR68897A) Nemat A (Nemat × IR68897A)	(نعمت × IR62829A) Nemat A (Nemat × IR62829A)	(نعمت × IR68899A) Nemat A (Nemat × IR68899A)	(نعمت × IR68888A) Nemat A (Nemat × IR68888A)	
				نعمت A (نعمت × IR68888A) Nemat A (Nemat × IR68888A)
			0.99	نعمت A (نعمت × IR68899A) Nemat A (Nemat × IR68899A)
		0.98	1	نعمت A (نعمت × IR62829A) Nemat A (Nemat × IR62829A)
	0.98	0.95	0.96	نعمت A (نعمت × IR68897A) Nemat A (Nemat × IR68897A)
0.92	0.92	0.92	0.93	نعمت B Nemat B

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA



شکل ۱: دندروگرام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس صفات اندازه‌گیری شده و با روش مربع فاصله اقلیدسی
 Fig. 1: Dandrogram of genotypes based on traits measured by the Square Euclidean Distance

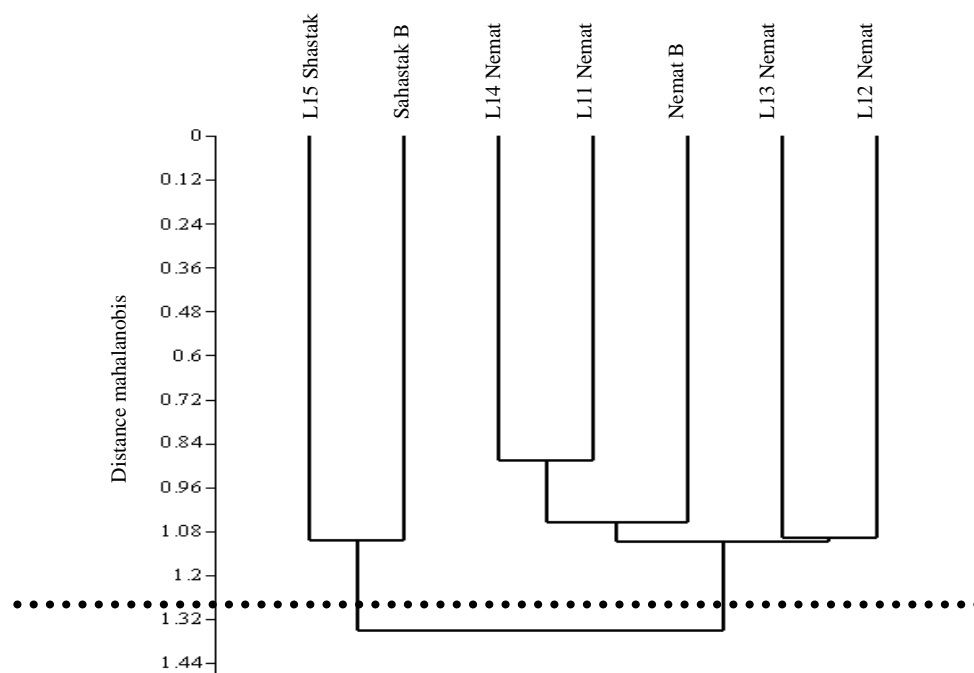
جدول ۳: ضریب تشابه تعدادی از ارقام والدینی و ارقام بین‌المللی نگهدارنده باروری (ضریب مربع فاصله اقلیدسی)

Table 2: Similarity of CMS lines and B lines (Square Euclidean Distance Coefficient)

حسنى B Hasani B	حسنى ريشك قرمز B Hasani Rishak Ghermiz B	B دشت Dasht B	B گرده Gerde B	B ندا Neda B	B نعمت Nemat B	B اوندا Avanda B	شستك محمدى B Shastak Mohammadi B	B سپيدرود Sepidrood B	B سنگ طارم Sang Tarom B	B خزر Khazar B	IR68899 B	IR67684 B	IR62829 B	IR58025 B	IR69224 B	IR68280 B	IR68888 B	IR68897 B	
																		0.99	IR68888 B
																	0.97	0.97	IR68280 B
																0.94	0.91	0.92	IR69224 B
															0.68	0.83	0.85	0.86	IR58025 B
														0.82	0.77	0.89	0.94	0.90	IR62829 B
													0.82	0.90	0.69	0.87	0.87	0.85	IR67684 B
											0.81	0.88	0.80	0.87	0.94	0.95	0.93		IR68899B
																			B خزر Khazar B
										0.78	0.84	0.56	0.75	0.51	0.85	0.87	0.78	0.79	B سنگ طارم Sang Tarom B
								0.93	0.71	0.81	0.57	0.77	0.62	0.79	0.87	0.77	0.77	0.77	B سپيدرود Sepidrood B
							0.46	0.66	0.56	0.50	0	0.28	0.05	0.65	0.45	0.46	0.49		B شستك محمدى Shastak Mohammadi B
						0.62	0.88	0.94	0.79	0.83	0.56	0.76	0.51	0.89	0.85	0.82	0.80		B اوندا Avanda B
					0.79	0.38	0.84	0.82	0.92	0.87	0.86	0.82	0.85	0.91	0.96	0.89	0.92		B نعمت Nemat B
					0.92	0.88	0.43	0.96	0.90	0.80	0.90	0.76	0.90	0.80	0.85	0.93	0.88	0.88	B ندا Neda B
			0.84	0.76	0.89	0.64	0.86	0.90	0.765	0.71	0.45	0.78	0.49	0.84	0.80	0.76	0.77		B گرده Gerde B
		0.80	0.89	0.92	0.84	0.67	0.84	0.84	0.91	0.88	0.71	0.77	0.80	0.93	0.91	0.90	0.93		B دشت Dasht B
	0.72	0.86	0.65	0.60	0.82	0.57	0.71	0.76	0.60	0.49	0.19	0.50	0.22	0.71	0.60	0.56	0.57		B حسنى ريشك قرمز Hasani Rishak Ghermiz B
0.90	0.80	0.89	0.76	0.70	0.91	0.72	0.82	0.92	0.67	0.71	0.36	0.64	0.33	0.79	0.73	0.71	0.71		B حسنى Hasani B
0.39	0.36	0.77	0.56	0.66	0.71	0.54	0.49	0.53	0.55	0.85	0.64	0.59	0.63	0.65	0.78	0.72	0.74	0.75	B آمل 3 Amol 3B

نشان‌دهنده آن است که ۰/۶۲ از تغییرات تصادفی هستند. براساس میانگین تشابه ژنتیکی (۱/۱۵) به‌عنوان ارزش برش دندروگرام، دو گروه می‌توان مشاهده کرد. تمامی لاین‌ها به‌همراه رقم نگهدارنده نعمت در یک گروه قرار دارند و شباهت ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها را می‌رساند. در گروه دوم رقم نگهدارنده شصتک محمدی و لاین نرعقیم حاصل از آن قرار گرفت.

تجزیه کلاستر لاین‌های نعمت (شکل ۲) نشان داد که ضریب همبستگی کوفنتیک (r) (سوکال و رالف، ۱۹۶۲) به‌دست آمده از مقایسه ماتریس عدم تشابه و دندروگرام ۰/۶۲ است که میزان انطباق دندروگرام حاصله و ماتریس داده‌ها را نشان می‌دهد. این مقدار از ضریب، برای نمایش گرافیکی فاصله حد متوسطی محسوب می‌شود. ضریب تبیین (r^2) برابر ۰/۳۸ به‌دست آمد



شکل ۲: دندروگرام هفت لاین نرعقیم و نگهدارنده رقم نعمت و شصتک محمدی حاصل از تجزیه داده‌های مورفولوژی با استفاده از فاصله ژنتیکی ماهالانوبیس (d^2) با روش UPGMA. $0.62 =$ ضریب همبستگی کوفنتیک، $0.38 =$ ضریب تبیین (r^2)، میانگین فاصله ژنتیکی (ارزش برش)

Fig. 2. Dendrogram of seven CMS line and maintainer of the Nemat and Shastak Mohammadi via morphological data using Mahalanobis Genetic Distance (d^2) with UPGMA. $0.62 =$ Cophenetic Correlation Coefficient, $0.38 =$ coefficient of determination (r^2), $1.15 =$ average genetic distance (cut value)

از لاین‌های نرعقیم خالصی که دارای ارتفاع بوته مناسب و زمان گل‌دهی مطلوبی در مقایسه با لاین‌های اعاده‌کننده باروری هستند می‌توان جهت برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید بهره برد.

به‌طورکلی، از نتایج این تحقیق می‌توان جهت انتخاب لاین‌های نرعقیم مطلوب و به‌کارگیری در برنامه تولید برنج هیبرید به‌منظور یافتن نتاج با عملکرد بالا استفاده نمود. بنابراین

منابع

- فارسی، م. و باقری، ع. ۱۳۹۲. اصول اصلاح نباتات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. چاپ دوازدهم. ۳۶۸ صفحه.
- Almanza-Pinzón, M. I., Hairallah, M., Fox, P. N. and Walburton, M. L. 2003. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. *Euphytica*, 130: 77-86.
- Babaeian Jelodar, N., Bagheri, N. and Nattaj, E. 2005. Development of new Iranian male sterile and restorer lines for developing three-line rice hybrid and quality of hybrid rice. 5th International Rice Genetics Symposium and 3rd International Rice Functional Genetics Symposium, 19-23 Novamner. Manila, Philippines, p. 67.
- Ballester, J. and Carmen. M. 1998. Determination of F_1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica*, 103: 223-226.
- Bohn, M., Friedrich, H. and Melchinger. A. E. 1999. Genetic similarities among Winter wheat cultivars determined on basis of RFLPs, AFLPs, SSRs and their use for predicting variance. *Crop Science*, 39: 228-237.

- Corbellini, M., Perenzin, M., Accerbi, M., Vaccino, P. and Borghi, B. 2002. Genetic diversity in bread wheat as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationship to hybrid performance. *Euphytica*, 123: 273-285.
- Garg, A., Singh, A. K., Prabhu, K. V., Mohapatra, T., Tyagi, N. K., Nandakumar, N., Singh, R. and Zaman, F. U. 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.
- He, H. H. and Liu, Y. B. 1998. The research progress on two-line system heterosis in crops. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 20: 39-45.
- IRRI. 2002. Standard evaluation system. International Rice Research Institute, Manila. Philippines.
- Janaiah, A., and Hossain, M. 2000. Hybrid rice for food security in the tropics: an evaluation of farm-level experiences in India. In: Third International Crop Sci. Cong, 17-22 August, Hamburg, Germany.
- Jena, K. K. and Pandey, S. K. 1999. DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. *Hybrid Rice Newsletter*, 2: 13-14.
- Kaw, R. N. 1995. Analysis of divergence in some cold tolerant rice. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 55 (1): 84-89.
- Mahalanobis, P. C. 1936. On the generalized distance in statistics. *Proceedings of National Institute of Sciences (India)*, 2 (1): 49-55.
- Mahapatra, K. C., Mishra, C. H. P. and Acharya, B. 1995. Clustering of rice mutants by different methods of analysis. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 55 (2): 138-147.
- Malone, E., Kopp, M., Malone, G. J., Branco, S. C., Carvalho, F. I. and Oliveira, A. C. 2009. Genetic distances among rice mutant genotypes assessed by AFLP and aluminum tolerance - related traits. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 10 (2): 106-111.
- Manifesto, M. M., Schlatter, A. R., Hopp, H. E., Suárez, E. Y. and Dubcovsky, J. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science*, 41: 682-690.
- Mao, C. X., Virmani, S. S. and Kumar, I. 1998. Technological innovation to lower the cost of hybrid seed production. In: Virmani SS, Siddique EA, Muralidharan K, editors. *Advances in hybrid rice technology*. International Rice Research Institute, Manila. Philippines. pp. 111-128.
- Máric, S., Laric, S., Artincic, J., Pejic, I. and Kozumplik, V. 2004. Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breeding*, 123: 366-369.
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. 2003. Analyses of genetic diversity in crop plants - Salient statistics tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76: 5269-5273.
- Nghia, P. T., Malik, J. P. S., Pandey, M. P. and Singh, N. K. 1999. Genetic distance analysis of hybrid rice parental lines based on morphological traits and RAPD markers. *Omon Rice*, 7: 57-69.
- Rao, C. R. 1952. *Advanced statistical methods in biometric research*. John Willey and Sons, New York.
- Sang, X., Yang, Z., Zhong, B., Li, Y., Hou, L., Pei, Y., Li, G. and He, G. 2006. Assessment of purity of rice CMS lines using cpDNA marker. *Euphytica*, 152: 177-183.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification* WH. Freeman and Co., San Francisco: Freeman, 573 p.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *International Association for Plant Taxonomy*, 11, 33-40., 11: 30-40.
- Verma, M. M. 1996. Procedures for grow-out test (GOT). *Seed Technology Newsletter*, 26: 1-4.
- Virmani, S. S. 1994. Prospects of hybrid rice in the tropics and subtropics. In: Virmani, S. S. (Ed.), *Hybrid Rice Technology, New Developments and Future Prospects*. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Virmani, S. S. and Zaman, F. U. 1998. Improving grain quality of hybrid rice: challenges, strategies and achievement. In: *Advance in hybrid rice technology*. Edited by Virmani, S. S., Siddiq, E. A. and Uralidharan, K., *Proceedings of the 3rd International Symposium on Hybrid Rice*, 14-16 November 1996, Hyderabad, India. Manila (Philippines): International Rice Research Institute. p. 177-186.
- Virmani, S. S., Viraktamath, B. C., Casal, C. L., Toledo, R. S., Lopez, M. T. and Manola, J. O. 1997. *Hybrid rice breeding manual: HR201*. International Rice Research Institute, p. 150.
- Virmani, S. S., Sun, Z. X., Mou, T. M., Jauhar Ali, A. and Mao, C. X. 2003. *Two line hybrid rice breeding manual*. International Rice Research Institute, Los Banos Philippines.
- Xiao, J., Li, J., Yuan, I., McCouch, S. R. and Tanksley, S. D. 1990. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 637-643.
- Yashitola, J., Thirumurugan, T., Sundaram, R. M., Naseerullah, M. K., Ramesha, M. S., Sarma, N. P. and Sonti, R. V. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Science*, 42: 1369-1373.
- Yuan, L. P. 1994. Purification and production of foundation seed of rice PGMS and TGMS lines. *Hybrid Rice*, 6: 1-2.
- Zang, Q., Gao, Y. T., Saghai Maroof, M. A., Yang, S. H. and Li, J. X. 1995. Molecular divergence and hybrid performance in rice. *Molecular Breeding*, 1: 133-142.

Evaluation of Genetic Distance of Rice Male Sterile Isosyttoplasmic Lines

Afkhami Ghadi^{1*}, A., Babaeian Jelodar², N. A. and Bagheri³, N. A.

Abstract

Exact classification of parental lines between hetrotic groups is necessary for improvement of hybrid rice breeding programs because it can help breeders in parental selection and prediction of F₁ hybrids yield. In this research, genetic distance of 18 parental and 40 male sterile lines were evaluated based on morphological, floral and palynological traits. Cluster analysis indicated that Neda male sterile lines were placed in first sub-group and also Nemat male sterile lines were in second sub-group of the first group. Dasht A (Dasht × IR68899A), Khazar A, Hasani A, Gerde A, Sang Tarom A, Shastak Mohammadi A and their maintainer lines were in one separate group. Therefore, these lines had high purity after seventh backcross. The results of this research can be used for selection of suitable CMS lines used in breeding projects of hybrid rice to find high performance progenies.

Keywords: Genetic-cytoplasmic male sterility, Hybrid rice, Morphological and palynology traits

1. PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2 and 3. Professor and Assistant Professor, Respectively, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*: Corresponding author Email: a.afkhami@sanru.ac.ir