Iranian Genetics Society
Journal of Genetics and Plant Breeding
Shahid Bahonar University of Kerman
Print ISSN : 3060-7965 Online ISSN : 3060-7271

# Molecular evaluation of some foreign onion hybrids and native populations for cytoplasmic male sterility and the *ms* fertility-restorer gene

**Saheb Marawany-Nejad**

MSc Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email address: sahebmarwany@gmail.com

**Mohammad Farkhari**

*Corresponding Author: Associate Professor, Crop and Horticultural Sciences Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. Email address: farkhari@areeo.ac.ir

Former Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email address: farkhari@asnrukh.ac.ir

**Abdulsattar Darabi**

Associate Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahvaz, Iran. Email address: Darabi6872@yahoo.com

## *Abstract*

**Objective**

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most important vegetable crops in Iran, and a large proportion of the short-day onion cultivars grown in the country are foreign hybrids. Evaluation of germplasm for cytoplasm type and the allelic status of the fertility-restorer gene locus is considered the first step in breeding programs aimed at developing onion hybrid cultivars. In the present study, several foreign hybrids and three native short-day onion populations from Iran were evaluated for cytoplasm type and allelic status at the fertility-restorer *ms* locus using specific molecular markers.

**Materials and Methods**

The Cp-cytotype, orf725, and orf219 markers were used to determine cytoplasm type. In contrast

the jnurf13 and AcPMS1 markers were used to determine the allelic status of the fertility-restorer gene locus *ms*. DNA was extracted from bulb scale tissues. Two bulbs from each foreign hybrid and 3–6 bulbs from each native population were evaluated separately. Amplified products were separated using 1% agarose gel electrophoresis, and banding patterns were evaluated.

**Results**

All foreign hybrids evaluated, with the exception of one cultivar, possessed S-type cytoplasmic male sterility, whereas all samples from native populations possessed normal, male-fertile cytoplasm. Analysis of the fertility-restorer gene locus *ms* revealed that the foreign hybrids carried either the homozygous recessive (*msms*) or heterozygous (*Msms*) genotype at this locus. In addition, most samples from native populations exhibited the homozygous recessive (*msms*) genotype, whereas the fertility-restoring allele was present in the heterozygous (*Msms*) state in some samples.

**Conclusion**

No cytoplasmic male sterility was detected in the native populations examined. Therefore, foreign hybrids carrying male-sterile cytoplasm can serve as sources for developing male-sterile maternal lines (A lines). Moreover, using molecular markers to identify genotypes carrying the recessive *ms* allele can accelerate the development and purification of male-sterile maternal (A) and maintainer (B) lines and improve the efficiency of onion breeding programs.

**Keywords:** Cytoplasmic male sterility, Male-sterile maternal line, Maintainer line, Marker-assisted selection.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Marawany-Nejad Saheb, Farkhari Mohammad, Darabi Abdulsattar (2025). Molecular Evaluation of Some Foreign Onion Hybrids and Native Populations (*Allium cepa* L.) for Cytoplasmic Male Sterility and the *Ms* Fertility-Restorer Gene. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 2 (4), 119-134.

*Journal of Genetics and Plant Breeding* 2 (4), 119-134. DOI: 10.22103/gpb.2024.23117.1006

Received: October 23, 2025. Received in revised form: December 19, 2025.

Accepted: December 20, 2024. Published online: December 23, 2025.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and Iranian Genetics Society.

© the authors

مجله ژنتیک و به نژادی گیاهی
شاپا چاپی: ۷۹۶۵-۳۰۶۰ شاپا الکترونیکی: ۷۲۷۱-۳۰۶۰
انجمن ژنتیک ایران

# بررسی مولکولی برخی از هیبریدهای خارجی و توده‌های بومی پیاز (*Allium cepa* L.) از لحاظ نوع سیتوپلاسم نرعقیم و ژن بازگرداننده باروری *Ms*

**صاحب مروانی‌نژاد**

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: sahebmarwany@gmail.com

**محمد فرخاری**

*نویسنده مسئول: دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. رایانامه: farkhari@areeo.ac.ir

دانشیار سابق، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: farkhari@asnrukh.ac.ir

**عبدالستار دارابی**

دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: Darabi6872@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۹

---

## چکیده

**هدف:** پیاز (*Allium cepa* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات سبزی کشور است که بخش عمده ارقام روزکوتاه کشت‌شده در ایران را هیبریدهای خارجی تشکیل می‌دهند. نخستین گام در برنامه‌های اصلاحی تولید ارقام هیبرید پیاز، بررسی ژرم‌پلاسم از نظر نوع سیتوپلاسم و وضعیت جایگاه ژنی بازگرداننده باروری است. در پژوهش حاضر، تعدادی از هیبریدهای خارجی و سه توده بومی پیاز روزکوتاه ایران از نظر نوع سیتوپلاسم و وضعیت جایگاه ژنی بازگرداننده باروری *Ms* با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**مواد و روش‌ها:** برای تعیین نوع سیتوپلاسم از نشانگرهای Cp-cytotype، orf725 و orf219 و برای تعیین وضعیت آلل‌های جایگاه ژنی بازگرداننده باروری *Ms* از نشانگرهای jnurf13 و AcPMS1 استفاده شد. استخراج DNA از فلس سوخ‌ها انجام گرفت. برای هر هیبرید خارجی دو سوخ و برای توده‌های بومی ۳ تا ۶ سوخ به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. محصولات تکثیرشده با استفاده از ژل آگارز یک درصد جداسازی و الگوهای باندی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**نتایج:** تمامی هیبریدهای خارجی مورد بررسی، به جز یک رقم دارای سیتوپلاسم نرعقیم از نوع S بودند، درحالی‌که در تمامی نمونه‌های مربوط به توده‌های بومی، دارای سیتوپلاسم نربارور بودند. بررسی جایگاه ژنی بازگرداننده باروری *Ms* نشان داد که هیبریدهای خارجی از نظر این جایگاه دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب (*msms*) یا هتروزیگوت (*Msms*) بودند. همچنین، بیشتر نمونه‌های متعلق به توده‌های بومی دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب (*msms*) بودند و در برخی نمونه‌ها، آلل بازگرداننده باروری به‌صورت هتروزیگوت (*Msms*) مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** در نمونه‌های بومی مورد بررسی، سیتوپلاسم نرعقیم شناسایی نشد؛ بنابراین، برای تولید لاین مادری نرعقیم (لاین A) می‌توان از منابع دارای سیتوپلاسم نرعقیم موجود در هیبریدهای خارجی استفاده کرد. همچنین، بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی ژنوتیپ‌های دارای آلل مغلوب *ms* می‌تواند فرایند تولید و خالص‌سازی لاین‌های مادری نرعقیم (A) و نگهدارنده (B) را تسریع کرده و کارایی برنامه‌های اصلاحی پیاز را افزایش دهد.

**کلیدواژه‌ها:** انتخاب به کمک نشانگر، لاین مادری نرعقیم، لاین نگهدارنده، نرعقیمی سیتوپلاسمی.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** مروانی‌نژاد صاحب، فرخاری محمد، دارابی عبدالستار (۱۴۰۴) بررسی مولکولی برخی از هیبریدهای خارجی و توده‌های بومی پیاز (*Allium cepa* L.) از لحاظ نوع سیتوپلاسم نرعقیم و ژن بازگرداننده باروری *Ms*. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۲(۴)، ۱۱۹-۱۳۴.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and Iranian Genetics Society

© the authors

## مقدمه

پیاز (*Allium cepa* L.) یکی از مهم‌ترین سبزی‌های جهان است که به دلیل سطح زیر کشت گسترده، میزان تولید بالا و ارزش اقتصادی قابل‌توجه، جایگاه ویژه‌ای در کشاورزی و صنایع غذایی دارد. سطح زیر کشت این محصول در جهان حدود ۵.۷۲

میلیون هکتار است و سالانه بیش از ۱۰۸ میلیون تن پیاز تولید می‌شود (FAO, 2024). در ایران نیز پیاز با سطح زیر کشت حدود ۵۷ هزار هکتار و تولید نزدیک به سه میلیون تن، از مهم‌ترین محصولات سبزی کشور محسوب می‌شود (Ministry of Agriculture-Jihad of Iran, 2024).

بر اساس طول روز بحرانی موردنیاز برای آغاز تشکیل سوخ، ارقام پیاز به سه گروه روزکوتاه (Short-day)، روزمتوسط (Intermediate-day) و روزبلند (Long-day) تقسیم می‌شوند. ارقام روزکوتاه معمولاً در طول روزهای حدود ۱۰ تا ۱۲ ساعت، ارقام روزمتوسط در حدود ۱۲ تا ۱۴ (یا تا ۱۶) ساعت و ارقام روزبلند در طول روزهای ۱۴ تا ۱۶ ساعت یا بیشتر تشکیل سوخ می‌دهند که این نیاز فتوپریودی با منشأ جغرافیایی و سازگاری هر رقم ارتباط نزدیکی دارد (Atif et al. 2020). در نواحی گرمسیر کشور همانند خوزستان و جنوب کرمان، ارقام روزکوتاه پیاز در پاییز کشت شده و در بهار و یا حتی اوایل تابستان برداشت می‌شوند و در مناطق معتدل ایران، کشت پیاز معمولاً در اواخر زمستان یا اوایل بهار انجام می‌شود و عمدتاً از ارقام روزمتوسط و روزبلند استفاده می‌شود.

پیاز با فرمول کروموزومی 2n=2x=24 یک گیاه دگرگشن محسوب می‌شود. یکی از موفق‌ترین راهکارهای افزایش عملکرد و یکنواختی در پیاز، تولید ارقام هیبرید است. بهره‌گیری از هتروزیس در این گیاه موجب افزایش عملکرد، یکنواختی رسیدگی، بهبود کیفیت پیاز، افزایش قابلیت انبارمانی و ارتقای مقاومت به برخی عوامل بیماری‌زا شده است (Brewster 2008). بااین‌حال، به دلیل اندازه کوچک گل‌ها و دشواری انجام اخته‌سازی دستی، تولید بذر هیبرید تجاری با استفاده سیستم نرعقیمی ژنتیکی – سیتوپلاسمی (Cytoplasmic Male Sterility; CMS) به‌عنوان کارآمدترین روش تولید بذر هیبرید در پیاز موردتوجه برنامه‌های اصلاحی قرار گرفته است.

نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) یک صفت عمدتاً با وراثت مادری است که در موارد بررسی‌شده در سطح مولکولی، با بیان ژن‌های جدید و اغلب شیمری موجود در ژنوم میتوکندریایی ارتباط دارد. محصولات این ژن‌ها می‌توانند با ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، فرایند رشد و تکوین گامتوفیت نر را مختل کرده و در نهایت موجب نرعقیمی شوند (Hanson & Bentolila, 2004). ژن‌های مرتبط با CMS ممکن است توسط ژن‌های بازگرداننده باروری (*Rf*) که عمدتاً پروتئین‌های تکراردار پنتاتریکوپپتید (Pentatricopeptide, PPR) را کد می‌کنند و تحت کنترل مستقیم ژنوم هسته‌ای هستند، سرکوب یا خنثی شوند (Gaborieau et al. 2016). علاوه بر این، تعداد کمی از ژن‌های *Rf* که پروتئین‌های غیر PPR را کد می‌کنند نیز گزارش شده‌اند (Cui et al. 1996; Fujii et al. 2009; Hu et al. 2012; Kitazaki et al. 2015).

علاوه بر سیتوپلاسم طبیعی حداقل چهار نوع سیتوپلاسم نرعقیم S، T، R و Y در پیاز شناسایی شده است. سیتوپلاسم CMS-S برای اولین‌بار در گونه پیاز قرمز ایتالیایی مشاهده شد و پس از آن CMS-T از رقم فرانسوی Jaune paille des venus به دست آمد (Manjunathagowda et al. 2021). سیتوپلاسم نرعقیم R شباهت زیادی به سیتوپلاسم نرعقیم نوع T دارد (Havey & Kim 2021) و سیتوپلاسم نرعقیم Y از جدیدترین سیتوپلاسم‌های نرعقیم شناسایی شده در پیاز است

(Kim & Kim 2019). در حال حاضر CMS-S و CMS-R در تولید بذر هیبرید در پیاز زیاد مورداستفاده قرار گرفته است (Havey & Kim 2021).

مطالعات انجام‌شده در زمینه نرعقیمی ژنتیکی – سیتوپلاسمی (CMS) در پیاز، پیشرفت قابل‌توجهی در شناسایی انواع سیتوپلاسم و توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های بازگرداننده باروری ایجاد کرده است. ، سیتوپلاسم‌های نرعقیم در برخی ژرم‌پلاسم‌های ایرانی، با استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی شده است (Dehghani et al. 2021)، هرچند در تعیین ژن‌های بازگرداننده باروری موفق نبودند. در سال‌های اخیر، مطالعات مولکولی منجر به شناسایی ژن‌های کاندید و نشانگرهای دقیق‌تری برای تفکیک انواع سیتوپلاسم شده است؛ به‌طوری‌که Bishnoi et al. (2024) با مقایسه ژنوم میتوکندری، ژن شیمری *orf725* را به‌عنوان مهم‌ترین تفاوت میان لاین نرعقیم و نگهدارنده معرفی کردند، درحالی‌که Ahn & Kim (2023) ژن *orf219* را به‌عنوان ژن کاندید نرعقیمی در سیتوپلاسم CMS-T معرفی و نشانگرهای مولکولی اختصاصی برای تفکیک سیتوپلاسم‌های N، S، R و T توسعه دادند. همچنین نشانگرهای مبتنی بر HRM ارائه‌شده توسط Khrustaleva et al. (2023)، امکان شناسایی سریع و دقیق سیتوپلاسم‌های مختلف را فراهم کرده است. علاوه بر این، توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط با جایگاه ژنی بازگرداننده باروری *Ms*، از جمله نشانگرهای معرفی‌شده توسط Bang et al. (2011)، Park et al. (2013)، Havey (2013) و Kim (2014) کاربرد انتخاب به کمک نشانگر (MAS) را در برنامه‌های اصلاحی پیاز به طور چشمگیری افزایش داده است.

شناسایی سیتوپلاسم و ژن‌های بازگرداننده باروری با استفاده از تلاقی‌های آزمایشی در پیاز، به دلیل دوساله بودن این گیاه، سه تا چهار سال زمان نیاز دارد؛ درحالی‌که نشانگرهای مولکولی این فرایند را به میزان قابل‌توجهی تسریع می‌کنند. در سال‌های اخیر، استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی، جایگزین روش‌های فنوتیپی زمان‌بر برای تشخیص نرعقیمی شده است. این نشانگرها امکان شناسایی سریع و دقیق انواع سیتوپلاسم و ژن‌های بازگرداننده باروری را در مراحل اولیه رشد گیاه فراهم کرده و موجب افزایش دقت و کاهش هزینه برنامه‌های اصلاحی می‌شوند. باوجود اهمیت اقتصادی پیاز در ایران، اطلاعات مربوط به وضعیت نرعقیمی ژنتیکی –سیتوپلاسمی در ارقام تجاری و به‌ویژه توده‌های بومی کشور محدود است. شناسایی منابع ژنتیکی دارای سیتوپلاسم نرعقیم و تعیین وضعیت ژن‌های بازگرداننده باروری، می‌تواند نقش مهمی در طراحی برنامه‌های اصلاحی، انتخاب والدین مناسب و توسعه ارقام هیبرید داخلی ایفا کند. براین‌اساس، پژوهش حاضر باهدف تعیین نوع سیتوپلاسم و بررسی ژن بازگرداننده باروری *Ms* در تعدادی از هیبریدهای خارجی و سه توده بومی پیاز استان خوزستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در این مطالعه ۱۳ هیبرید خارجی پیاز یک توده بومی پیاز بهبهان و دو توده پیاز سفید و قرمز رامهرمز استفاده گردید. اطلاعات مربوط به نمونه‌های مطالعه شده در جدول (۱) آمده است. در بین نمونه‌های پیاز خارجی هر سه نوع پیاز قرمز، زرد و سفید وجود داشت.

**جدول ۱. کد نمونه‌های پیاز و شرکت یا منبع تأمین‌کننده آن‌ها**

**Table 1. Codes of onion samples and their sources of origin**

| کد Code | کد هیبرید یا نام رقم/توده Hybrid code or variety/population name | شرکت تولیدکننده/محل جمع‌آوری Producer/Collection site | کد Code | کد هیبرید یا نام رقم/توده Hybrid code or variety/population name | شرکت تولیدکننده/محل جمع‌آوری Producer/Collection site |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-b | Behbahan | Behbahan | 7-1 | 7-1 | Emerald seed |
| 2-b | Behbahan | Behbahan | 7-2 | 7-2 | Emerald seed |
| 3-b | Behbahan | Behbahan | 8-1 | 8-1 | Desert seed |
| 4-b | Behbahan | Behbahan | 8-2 | 8-2 | Desert seed |
| 5-b | Behbahan | Behbahan | 9-1 | 9-1 | Desert seed |
| 6-b | Behbahan | Behbahan | 9-2 | 9-2 | Desert seed |
| b5-r | Behbahan | Behbahan | 10-1 | 10-1 | Emerald seed |
| b6-r | Behbahan | Behbahan | 10-2 | 10-2 | Emerald seed |
| C1-w | Ramhormoz | Ramhormoz | 11-1 | 11-1 | Emerald seed |
| C2-w | Ramhormoz | Ramhormoz | 11-2 | 11-2 | Emerald seed |
| C3-w | Ramhormoz | Ramhormoz | 12-1 | 12-1 | Emerald seed |
| C1-r | Ramhormoz | Ramhormoz | 12-2 | 12-2 | Emerald seed |
| C2-r | Ramhormoz | Ramhormoz | 13-1 | 13-1 | Emerald seed |
| C3-r | Ramhormoz | Ramhormoz | 13-2 | 13-2 | Emerald seed |
| 1-2 | Desert seed | Desert seed | 14-1 | 14-1 | Desert seed |
| 1-3 | Desert seed | Desert seed | 14-2 | 14-2 | Desert seed |
| 2-1 | Desert seed | Desert seed | 15-1 | 15-1 | Desert seed |
| 2-2 | Desert seed | Desert seed | 15-2 | 15-2 | Desert seed |
| 3-1 | Desert seed | Desert seed | 16-1 | 16-1 | Emerald seed |
| 3-2 | Desert seed | Desert seed | 16-2 | 16-2 | Emerald seed |
| 4-2 | Desert seed | Desert seed | ag-1 | ag-1 | * |
| 4-3 | Desert seed | Desert seed | ag-2 | ag-2 | * |
| 5-3 | Desert seed | Desert seed | t1 | t1 | * |
| 5-4 | Desert seed | Desert seed | t2 | t2 | * |
| 6-1 | Emerald seed | Emerald seed | 40-1 | 4030 | Enza zaden |
| 6-2 | Emerald seed | Emerald seed | 40-2 | 4030 | Enza zaden |

* دو نمونه پیاز t و ag پیاز زرد هستند و از بازار میوه و تره‌بار تهیه گردید و اسم رقم و شرکت تولیدکننده آنها مشخص نیست.

* Two onion samples, T and Ag, are yellow onions purchased from a local fruit and vegetable market. The cultivar names and producing companies of these samples were unknown.

**استخراج دی.ان.ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:** از هر رقم امیدبخش خارجی دو سوخ و از توده بهبهان ۶ سوخ و از توده پیاز قرمز و سفید رامهرمز هر کدام ۳ سوخ به‌صورت تصادفی انتخاب و نمونه‌برداری از فلس سوخ‌های انتخاب شده برای

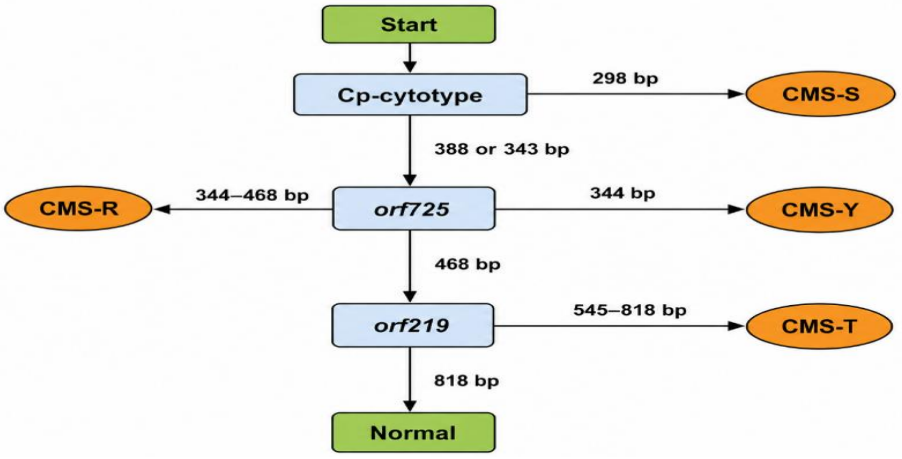
استخراج دی.ان.ای انجام شد. به‌منظور استخراج دی.ان.ای ژنومی از روش CTAB تغییریافته استفاده گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت دی.ان.ای از نانودراپ و برای اطمینان از عدم شکستگی دی.ان.ای از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

جهت شناسایی نوع سیتوپلاسم از آغازگرهای پیشنهاد شده در مطالعه Ahn &Kim (2023) استفاده شد (جدول ۲ و شکل ۱). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از دستگاه ترموسایکلر مدل PeqSTAR 2X (شرکت PEQLAB، آلمان) استفاده شد. همچنین طراحی و سنتز آغازگرها توسط شرکت بیومجیک‌ژن (ایران) انجام پذیرفت. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر و با استفاده از مسترمیکس 2X (شرکت سیناکلون، ایران) تهیه شدند. برای هر آغازگر ابتدا توسط برنامه حرارتی گرادیانت دمای بهینه اتصال بر روی یک نمونه شناسایی و سپس دمای شناسایی شده برای ژنوتیپ‌سنجی همه نمونه‌ها مورداستفاده قرار می‌گرفت.

**جدول ۲. توالی آغازگرهای مورداستفاده برای تعیین نوع سیتوپلاسم**

**Table 2. Primer sequences used for cytoplasm type determination in onion**

| نام نشانگر<br>Marker name | آغازگر پیشرو<br>Forward | آغازگر معکوس<br>Reverse |
|---|---|---|
| Cp-cytotype | CATTCCATTCTATAA TAAACTCTAATAA | GGGTCGATATTCTTCCTTATTGTTT |
| orf725 | CAGATGCTTACGCCG GATGGAA | MK-R1: TCCTAGTGTCCGGGGTTTCT<br>orf725 -R3:CGTTCCGAAGGCGAATAAAAATTTGG |
| orf219 | CAGCGGAACTCACG ACTCTA | orf725-R1: GTGGCACTCTAGTGGGCAGT<br>atp1-R2: ATATGCCACCGCCTGTTTAC |




**شکل ۱. مراحل تعیین نوع سیتوپلاسم با استفاده از نشانگرهای ذکرشده در جدول ۲**

**Figure 1. Steps for determining cytoplasm type using the markers listed in Table 2**

**جدول ۳. توالی نشانگرهای مورداستفاده برای تعیین آلل‌های جایگاه ژنی *Ms***

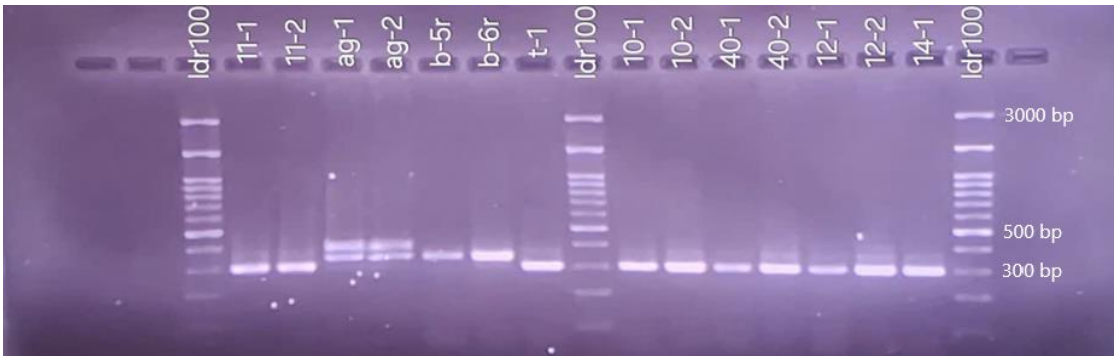
**Table 3. Marker sequences used to determine the alleles at the *Ms* gene locus**

| نام نشانگر<br>Marker name | آغازگر پیشرو<br>Forward primer | آغازگر معکوس<br>Reverse primer |
|---|---|---|
| jnurf13 | TGCAAGCTTGGAACTTACGC | TTGCCAAAGGTTGCAATACA |
| AcPMS1 | GGTCACCAGGTGGATAGAGAA | TCATTGAGCTGCATCCAAAA |

## نتایج و بحث

دمای بهینه اتصال برای آغازگرهای مختلف بین ۴۶ الی ۶۹ درجه سانتیگراد بود. شناسایی نوع سیتوپلاسم به‌صورت مرحله‌ای مطابق با شکل ۱ انجام شد.

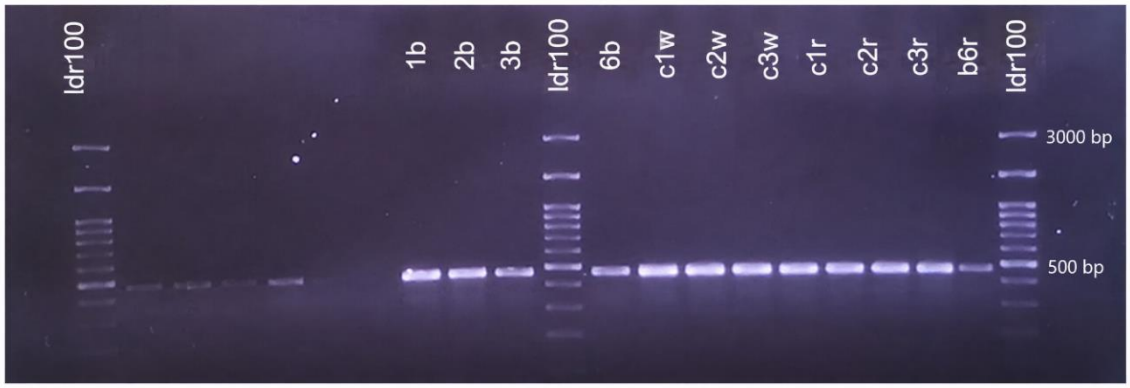
**نشانگر Cp-cytotype:** ابتدا تمام نمونه‌های توسط نشانگر CP ژنوتیپ‌سنجی شدند. تمام هیبریدهای خارجی به جز نمونه ag دارای باند با اندازه ۲۹۹ جفت باز بودند که طبق بامطالعه Ahn &Kim (2023) دارای سیتوپلاسم نرعقیم از نوع S هستند. در مقابل تمام بوته‌های گرفته شده از توده‌های پیاز قرمز و سفید رامهرمز مشابه با هیبرید ag دارای باندهای ۳۴۳ و ۳۸۸ جفت باز بودند. همچنین ۴ عدد از سوخ‌های توده بهبهان دارای هر دو باند و ۲ نمونه دیگر تنها دارای باند ۳۴۳ جفت بازی بود (شکل ۲). مشابه با نتایج مطالعات قبل، در این مطالعه نیز همه هیبریدهای تجاری به جز نمونه ag دارای سیتوپلاسم از نوع S است. دلیل استفاده زیاد از این سیتوپلاسم در تولید بذر ارقام هیبرید، ساده‌بودن القا باروری به این نوع سیتوپلاسم با تک ژن هسته‌ای *Ms* می‌باشد (Kim and Kim 2019; Kim et al. 2015، Kim 2014). در مطالعه Ahn &Kim (2023) از مجموع ۲۵۱ اکسیژن اصلاحی پیاز کره جنوبی، ۸۲ نمونه دارای سیتوپلاسم نرعقیم از نوع S شناسایی شد.




**شکل ۲. نتایج ژنوتیپ‌سنجی نمونه‌های پیاز با استفاده از نشانگر Cp-cytotype (تصویر نماینده یکی از ژل‌های آگارز است).**

**Figure 2. Genotyping results of onion samples using the Cp-cytotype marker (a representative image of one of the agarose gels).**

**نشانگر orf725:** ژنوتیپ‌هایی که دارای سیتوپلاسم از نوع S نبودند توسط نشانگر orf725 ژنوتیپ‌سنجی شدند. همه نمونه‌های مورد بررسی دارای بلندی به اندازه ۴۶۸ جفت باز بودند که طبق مطالعه Ahn &Kim (2023) نشان می‌دهد که سیتوپلاسم آنها از نوع سیتوپلاسم نرعقیم Y و یا R نمی‌باشند. نتایج ژنوتیپ‌سنجی با این نشانگر در شکل ۳ آمده است. همه نمونه‌ها دارای باندی با اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت باز بود که مطابق بامطالعه Ahn &Kim (2023) منطبق بر باند ۴۶۸ جفت‌بازی است. بدین ترتیب سیتوپلاسم نمونه‌های موردمطالعه از نوع Y و یا R نبوده و می‌تواند از نوع سیتوپلاسم نربارور یا سیتوپلاسم نرعقیم T باشد.



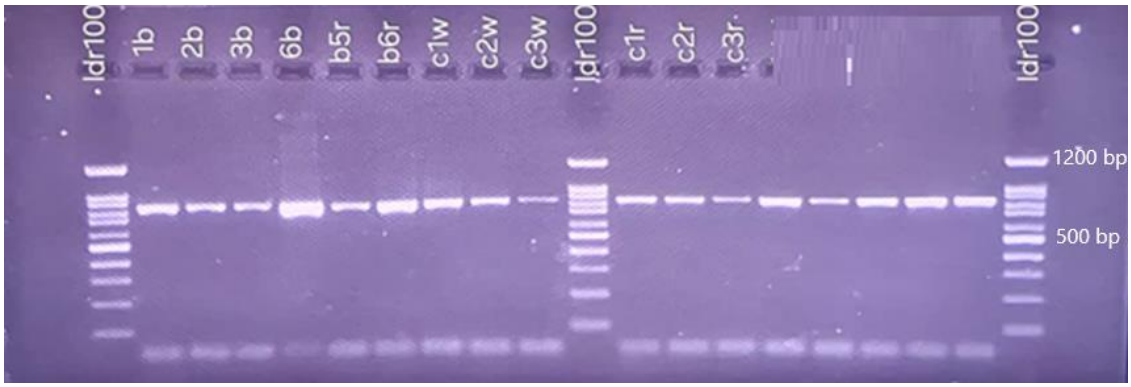

**شکل ۳. نتایج ژنوتیپ‌سنجی برخی از نمونه‌های منتخب پیاز با استفاده از نشانگر orf725**

**Figure 3. Genotyping results of selected onion samples using the orf725 marker**

سیتوپلاسم نرعقیم Y برای اولین‌بار در دو لاین به نام‌های PI273626 و PI236025 شناسایی شد (Kim et al. 2019). در مطالعه Ahn &Kim (2023) در میان ۲۵۱ نمونه ژرم‌پلاسم پیاز کره‌ای CMS-Y مشاهده نشد. همچنین در بین ۱۷۳ نمونه ژرم‌پلاسم خارجی پیاز، تنها چهار نمونه حاوی سیتوپلاسم از نوع Y بودند. نرعقیمی در CMS-Y ناپایدار است و بنابراین برای تولید ارقام هیبرید مورداستفاده قرار نمی‌گیرد. Kim et al. (2019) مشاهده نمودند که لاین PI273626 که دارای سیتوپلاسم نرعقیم از نوع Y و از لحاظ مکان ژنی *Ms* به‌صورت هموزیگوت مغلوب است، بااین‌حال مقداری دانه گرده تولید می‌کند. اما در مقابل CMS-R به‌خاطر پایدار بودن و نیز مشابه با سیتوپلاسم از نوع S توسط ژن هسته‌ای *Ms* به‌راحتی قابل‌بازیافت است و ازاین‌رو از این نوع سیتوپلاسم نرعقیم نیز در برنامه‌های به‌نژادی استفاده می‌شود. Ahn &Kim (2023) در بررسی ۲۵۱ لاین کره‌ای، ۱۶۰ لاین دارای سیتوپلاسم نرعقیم از نوع R شناسایی نمودند.

**نشـانگر orf219:** برای تعیین نهایی وضـعیت سـیتوپلاسـم نمونه‌های بخش قبل، این مواد ژنتیکی توسـط نشـانگر orf219 ژنوتیپ‌یابی شـدند. طبق نتایج به دسـت آمده، همه نمونه‌ها تولید باند ۸۱۸ جفت بازی نمودند (شـکل ۴). طبق شـکل ۱، سیتوپلاسم این نمونه‌ها، از نوع سیتوپلاسم نرمال است.

طبق انتظار سـیتوپلاسـم تمام نمونه‌های متعلق به توده‌های بومی از نوع سـیتوپلاسـم نربارور بودند. از طرفی رقم ag نیز دارای سیتوپلاسم نربارور بود که نشان می‌دهد از نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی برای تولید این هیبرید استفاده نشده و یا این رقم تجاری یک رقم هیبرید نیست.




**شکل ٤. نتایج ژنوتیپ‌سنجی برخی از نمونه‌های منتخب پیاز با استفاده از نشانگر orf219**

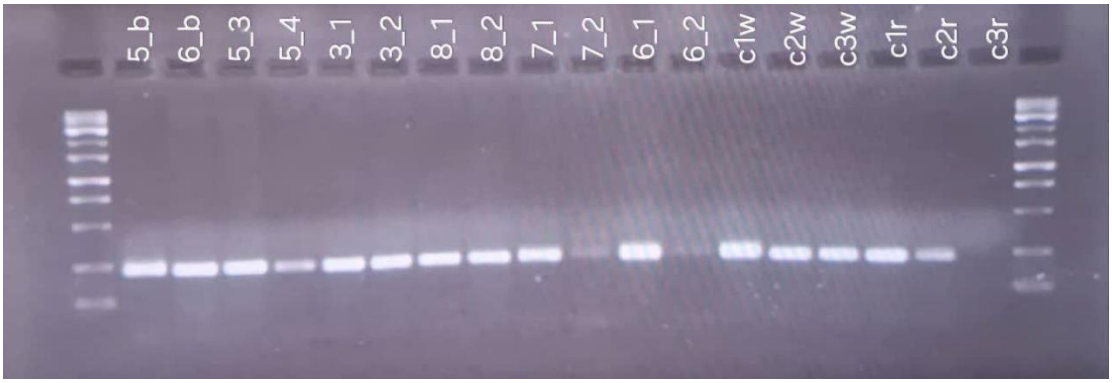
**Figure 4. Genotyping results of selected onion samples using the orf219 marker**

## بررسی آلل بازگرداننده باروری

**نشانگر jnurf13:** باتوجه‌به الگوی باندی در شکل ۵، نشانگر jnurf13 بر روی ژل آگارز قادر به تفکیک و ایجاد تمایز بین نمونه‌ها از لحاظ ژن بازگرداننده باروری نبود. این نشـانگر با ژن بازگرداننده *Ms* لینکاژ داشـته و تولید دو باند به طول ۲۴۱ و ۲۲۹ جفت باز می‌نماید که به ترتیب نشانگر وجود آلل *Ms* و *ms* است. تفاوت بین طول دو آلل این نشانگر تنها ۱۲ جفت باز است (Kim 2014). ژل آگارز مورداستفاده، قادر به تفکیک این دو آلل از یکدیگر نبود.

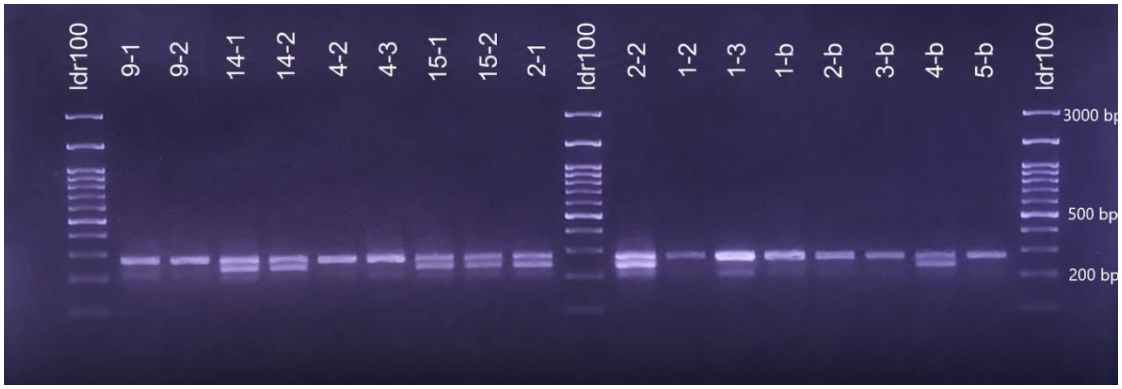
**نشـانگر AcPMS1:** تمام نمونه‌ها از لحاظ وجود ژن بازگرداننده باروری *Ms* توسـط نشـانگر AcPMS1 مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. در این مکان ژنی دو آلل با اندازه ۲۴۲ و ۲۷۶ جفت باز وجود دارد که به ترتیب نشـان‌دهنده حضـور آلل *Ms* و *ms* می‌باشند (Kim et al. 2015). مطابق با نتایج ژنوتیپ‌سنجی دو حالت هموزیگوت مغلوب و هتروزیگوت میان نمونه‌ها وجود داشـت. اما در هیچ نمونه موردمطالعه‌ای، حالت هموزیگوت غالب مشـاهده نگردید (شـکل ۶). تمام نمونه‌های هیبرید خارجی دارای آلل مغلوب بازگرداننده باروری (*ms*) به‌صـورت هتروزیگوت و یا هموزیگوت بودند. به‌طوری‌که در نمونه‌های شـماره ۹، ۴، ۸، ۶، ag، t، ۱۶ ژن بازگرداننده باروری به‌صـورت خالص مغلوب و ژنوتیپ سـایر هیبریدها در این مکان ژنی به‌صـورت ناخالص بود. در میان

نمونه‌های پیاز مربوط به توده‌های بهبهان و رامهرمز نیز ژنوتیپ‌سنجی در این مکان ژنی به‌صورت خالص مغلوب یا ناخالص بود. به طور یکه تمام نمونه‌های مربوط به توده بهبهان به جز یک نمونه و تمام نمونه‌های مربوط به توده پیاز قرمز رامهرمز، در این مکان ژنی به‌صورت خالص مغلوب بودند. در مقابل تمام نمونه‌های متعلق به توده سفید رامهرمز و نمونه 4-b در این مکان ژنی به‌صورت ناخالص بودند.




**شکل ٥. نتایج ژنوتیپ‌سنجی برخی از نمونه‌های پیاز با استفاده از نشانگر jnurf13**

**Figure 5. Genotyping results of some onion samples using the jnurf13 marker**




**شکل ٦. نتایج ژنوتیپ‌سنجی نمونه‌های پیاز با استفاده از نشانگر AcPMS1 (تصویر نماینده یکی از ژل‌های آگارز است).**

**Figure 6. Genotyping results of onion samples using the AcPMS1 marker (a representative image of one of the agarose gels).**

در مطالعای دیگر با استفاده از چندین نشانگر مولکولی (OPT، PsaO، Jnurf-13 و AcSKP1) ارتباط محکمی بین این نشانگرها و مکان ژنی *Ms* نشد (Dehghani et al. 2021). نشانگر AcPMS1 بر اساس ژن AcPMS1 طراحی شده

است. PMS1 یک پروتئین ترمیم ناجوری DNA (DNA mismatch repair protein PMS1) است. این نشانگر بر اساس یک مطالعه تجزیه تفرق توده و RNAseq شناسایی گردید و دارای لینکاژ کامل با مکان ژنی *Ms* در بررسی ۱۲۴ نمونه پیاز متعلق به ۲۱ کشور مختلف بود. در شناسایی این نشانگر از نشانگرهای OPT و Jnurf-13 استفاده شده است. به‌طوری‌که با ارزیابی ۴۲۷۳ فرد از یک جمعیت BSA، موفق به یافتن دو فرد شدند که بین مکان ژنی *Ms* و یکی از این دو نشانگر نوترکیبی به وقوع پیوسته است (Kim et al., 2015). در مطالعه‌ای دیگر، ۲۱ ژنوتیپ مختلف پیاز از لحاظ خصوصیات ظاهری و نیز وضعیت نرعقیمی ژنتیکی – سیتوپلاسمی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی بررسی گردید. در این پژوهش، از نشانگر متعلق به ژن AcPMS1 برای بررسی وضعیت ژن بازگرداننده *Ms* بهره بردند. در نهایت تطابق صددرصدی بین وضعیت فنوتیپی و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی به‌دست آمد (Tahir et al. 2025).

در پژوهش حاضر فراوانی آلل مغلوب (*ms*) در بین توده‌های بومی بیشتر از فراوانی آلل غالب (*MS*) بود. به‌طوری‌که در ۱۲ نمونه مطالعه شده داخلی، ۵ فرد به‌صورت هتروزیگوت و مابقی در این مکان ژنی دارای ژنوتیپ خالص مغلوب بودند. در مطالعه‌ای ۲۹ جمعیت مختلف پیاز از لحاظ مکان ژنی *Ms* توسط نشانگر AcPMS1 موردمطالعه قرار گرفتند و هر سه حالت *MsMs*، *msms* و *Msms* در میان ژرم‌پلاسم موردمطالعه شناسایی گردید. در این مطالعه نیز فراوانی آلل *ms* بیشتر از *Ms* به‌دست آمد (González-Chavira et al. 2023). فراوانی بالاتر آلل *ms* را ناشی از وقوع قدیمی‌تر این جهش و یا نرخ بالاتر وقوع آن دانستند (Little et al. 1994). باتوجه‌به فراوانی کم آلل *Ms* عدم شناسایی حالت خالص غالب در توده‌های داخلی می‌تواند به‌خاطر تعداد کم نمونه‌های مطالعه باشد.

**نتیجه‌گیری:** باتوجه‌به نتایج این پژوهش، در تمام هیبریدهای موردمطالعه متعلق به دو شرکت Emerald seed و Desert seed از سیتوپلاسم نرعقیم نوع S استفاده شده است. نتایج حاصل از بررسی ژن‌های بازگرداننده باروری نشان داد که توده‌های بومی موردمطالعه از لحاظ مکان ژنی *Ms* دارای هر دو آلل غالب و مغلوب هستند و در تهیه لاین نگهدارنده (B لاین) باید به این مسئله توجه داشت. در ضمن تمامی نمونه‌های داخلی مورد بررسی دارای سیتوپلاسم نربارور بودند و سیتوپلاسم نرعقیم در آن‌ها شناسایی نشد؛ بنابراین، بهره‌گیری از منابع ژنتیکی و مواد به‌نژادی خارجی دارای سیتوپلاسم نرعقیم می‌تواند در کوتاه‌مدت برای توسعه و تسریع برنامه‌های تولید هیبرید پیاز در کشور ضروری باشد. در مجموع، نتایج این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز توسعه لاین‌های والدینی مناسب و کاهش وابستگی به بذر هیبرید خارجی در برنامه‌های اصلاحی آینده باشد.

## References

Ahn, W., & Kim, S. (2023). Identification of a candidate gene responsible for male sterility conferred by CMS-T cytoplasm in onion (*Allium cepa* L.) and development of molecular markers for detection of CMS-T cytoplasm. *Euphytica*, *219*(2), 28.

https://doi.org/10.1007/s10681-023-03158-5

Atif, M. J., Ahanger, M. A., Amin, B., Ghani, M. I., Ali, M., & Cheng, Z. (2020). Mechanism of Allium crops bulb enlargement in response to photoperiod: A review. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(4), 1325. https://doi.org/10.3390/ijms21041325

Bang, H., Cho, D. Y., Yoo, K. S., Yoon, M. K., Patil, B. S., & Kim, S. (2011). Development of simple PCR-based markers linked to the *Ms* locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica, 179*(3), 439-449. https://doi.org/10.1007/s10681-010-0342-5

Bishnoi, R., Solanki, R., Singla, D., Mittal, A., Chhuneja, P., Meena, O. P., & Dhatt, A. S. (2024). Comparative mitochondrial genome analysis reveals a candidate ORF for cytoplasmic male sterility in tropical onion. *3 Biotech, 14*(1), 6. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03850-2

Brewster, J. L. (2008). *Onions and other vegetable alliums* (2nd edn). CABI, Wallingford, UK, 432 p. https://doi.org/10.1079/9781845933999.0000

Cui, X., Wise, R. P., & Schnable, P. S. (1996). The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, *272*(5266), 1334-1336. https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1334

Dehghani, R., Abbasi, Z., Talebi, M., Shahmansouri, E., & Sayed Tabatabaei, B. E. (2021). Identification of male sterile (T, S) of fertility (N) cytoplasm by PCR-based molecular markers to access maintainer lines in onion. *Journal of Horticulture and Postharvest Research, 4*(3), 277-288. https://doi.org/10.22077/jhpr.2020.3665.1163

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2024) FAOSTAT: Crops and livestock products. Available at: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL. Last accessed 2 August 2026.

Fujii, S., & Toriyama, K. (2009). Suppressed expression of retrograde-regulated male sterility restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(23), 9513-9518. https://doi.org/10.1073/pnas.0901860106

Gaborieau, L., Brown, G. G., & Mireau, H. (2016). The propensity of pentatricopeptide repeat genes to evolve into restorers of cytoplasmic male sterility. *Frontiers in Plant Science, 7*, 1816. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01816

González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., González-Pérez, E., Guerrero-Aguilar, B. Z., & Villalobos-Reyes, S. (2023). Identification of sources of cytoplasmic male sterility in onion (*Allium cepa* L.) germplasm using molecular markers. *Journal of Research in Agriculture and Animal Science, 10*(3), 63-70.

Hanson, M. R., & Bentolila, S. (2004). Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect

male gametophyte development. *The Plant Cell*, *16*(Suppl. 1), S154-S169. https://doi.org/10.1105/tpc.015966

Havey, M. J. (2013). Single nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (*Ms*) locus in open-pollinated and inbred populations of onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *138*(4), 306-309.

Havey, M. J., & Kim, S. (2021). Molecular marker characterization of commercially used cytoplasmic male sterilities in onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *146*(5), 351-355. https://doi.org/10.21273/JASHS05083-21

Hu, J., Wang, K., Huang, W., Liu, G., Gao, Y. A., Wang, J., Huang, Q., Ji, Y., Qin, X., Wan, L., Zhu, R., Li, S., Yang, D., & Zhu, Y. (2012). The rice pentatricopeptide repeat protein *RF5* restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *The Plant Cell*, *24*(1), 109-122. https://doi.org/10.1105/tpc.111.093211

Khrustaleva, L., Nzeha, M., Ermolaev, A., Nikitina, E., & Romanov, V. (2023). Two-step identification of N-, S-, R- and T-cytoplasm types in onion breeding lines using high-resolution melting (HRM)-based markers. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2), 1605. https://doi.org/10.3390/ijms24021605

Kim, S. (2014). A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (*Ms*) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. *Molecular Breeding*, *34*(3), 769-778. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0073-8

Kim, S., Kim, C. W., Park, M., & Choi, D. (2015). Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. *Theoretical and Applied Genetics*, *128*(11), 2289-2299. https://doi.org/10.1007/s00122-015-2584-z

Kim, B., & Kim, S. (2019). Identification of a variant of CMS-T cytoplasm and development of high resolution melting markers for distinguishing cytoplasm types and genotyping a restorer-of-fertility locus in onion (Allium cepa L.). *Euphytica*, *215*(10), 164. https://doi.org/10.1007/s10681-019-2492-4

Kim, B., Kim, C. W., & Kim, S. (2019). Inheritance of fertility restoration of male-sterility conferred by cytotype Y and identification of instability of male fertility phenotypes in onion (*Allium cepa* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *94*(3), 341-348. https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1512383

Kitazaki, K., Arakawa, T., Matsunaga, M., Yui-Kurino, R., Matsuhira, H., Mikami, T., & Kubo, T. (2015). Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris*). *The Plant Journal*, *83*(2), 290-299.

https://doi.org/10.1111/tpj.12888

Little, T., Jones, H. A., & Clarke, A. E. (1944). The distribution of the male-sterility gene in varieties of onion. *Herbertia, 11*, 310-312.

Manjunathagowda, D. C., Muthukumar, P., Gopal, J., Prakash, M., Bommesh, J. C., Nagesh, G. C., Megharaj, K. C., Manjesh, G. N., & Anjanappa, M. (2021). Male sterility in onion (*Allium cepa* L.): Origin, evolutionary status, and their prospectus. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *68*(2), 421-439. https://doi.org/10.1007/s10722-020-01077-1

Ministry of Agriculture-Jihad of Iran (2024) Agricultural Statistics Yearbook: Volume 1, Field Crops, 2023–2024. Ministry of Agriculture-Jihad, Tehran, Iran. Retrieved from https://dpe.maj.ir [In Persian]

Park, J., Bang, H., Cho, D. Y., Yoon, M. K., Patil, B. S., & Kim, S. (2013). Construction of high-resolution linkage map of the *Ms* locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, *192*(2), 267-278. https://doi.org/10.1007/s10681-012-0851-5

Tahir, M., Shahzad, R., Aleem, S., Jamil, S., Rahman, S., & Cheema, K. L. (2025). Genetic analysis of fertility restoration systems and cytoplasmic types in onion (*Allium cepa*) genotypes using DNA markers. *Pakistan Journal of Botany, 57*(2), 603-608. https://doi.org/10.30848/PJB2025-2(12)