دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مهم کمی در برنج (*Oryza sativa* L.)

از:

محمد مسائلی

استاد راهنما:

دکتر بابک ربیعی

شهریور ماه ۱۳۸۹

تقدیم به

تنها بهانه‌های زیستنم، پدر و مادر عزیزم

و خواهران مهربانم

و تمامی آنانی که در مسیر سرنوشتم

لحظه ای در کنارم ایستادند

و با محبت یاریم نمودند

و بنا به تقدیر عبور کردند،

باشد که بپذیرند.

و تقدیم به تنها بهانه آفرینش...

به نام پرودگار آموزگار

سپاس پرودگار راکه به من توفیق داد تا مرحله دیگر از تحصیل راپشت سرگذاشته و این پایان نامه را به سرانجام برسانم. از این رو بر خود وظیفه می دانم از زحمات بی دریغ استاد محترم جناب آقای دکتر بابک ربیعی که همیشه مرا از راهنمایی های خویش بهره مند ساخته اند تشکر و قدردانی کنم. همچنین از آقایان دکتر اعلمی و دکتر سمیع زاده که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند و دکتر محمود قاسم نژاد، به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی سپاسگزاری می کنم. همچنین از مساعدت و راهنمایی های بی دریغ جناب آقای دکتر ترنگ، مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای مهندس صیقلانی، مسئول محترم آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده به خاطر راهنمایی های دلسوزانه ی ایشان تشکر و قدردانی می نمایم. از جناب آقای مهندس پیکی، کارشناس محترم آزمایشگاه به دلیل حمایت های همه جانبه ی ایشان کمال تشکر را دارم. در پایان، از دوستان عزیزم آقای مهندس محمدرضا میرزایی، امین عابدی و سرکار خانم سمیه الهی تشکر می کنم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی.....خ
چکیده انگلیسی.....د
مقدمه.....۲

فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱- برنج.....۵
۱-۲- نشانگرهای ژنتیکی.....۶
۱-۳- انواع نشانگرهای ژنتیکی.....۷
۱-۳-۱- نشانگرهای DNA.....۸
۱-۳-۲- ریزماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSR).....۸
۱-۳-۲-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....۹
۱-۳-۳- تفاوت طول قطعه‌های حاصل از تکثیر (AFLP).....۱۰
۱-۳-۴- مراحل روش AFLP.....۱۱
۱-۳-۴-۱- هضم DNA ژنومی.....۱۱
۱-۳-۴-۲- اتصال سازگارسازهای دو رشته‌ای به انتهای چسبان.....۱۲
۱-۳-۴-۳- تکثیر پیش از مرحله انتخاب.....۱۲
۱-۳-۴-۴- تکثیر انتخابی.....۱۲
۱-۴- انتخاب به کمک نشانگر (MAS).....۱۴
۱-۵- اصول و مبانی تجزیه QTL.....۱۵
۱-۶- اهداف مکان‌یابی QTL.....۱۶
۱-۷- موارد مورد نیاز جهت مکان‌یابی QTL.....۱۷
۱-۷-۱- جمعیت نقشه‌یابی مناسب.....۱۸
۱-۷-۲- غربال فنوتیپی صحیح جمعیت نقشه‌یابی.....۱۸
۱-۷-۳- تهیه یک نقشه پیوستگی اشباع مبتنی بر نشانگرهای مولکولی.....۱۹
۱-۷-۳-۱- انواع جمعیت‌های نقشه‌یابی.....۲۰
۱-۷-۳-۲- جمعیت F_2.....۲۱
۱-۷-۳-۳- تلاقی برگشتی (BC).....۲۱
۱-۷-۳-۴- اینبرد لاین‌های نوترکیب (RIL).....۲۲
۱-۷-۳-۵- هاپلوئیدهای دوگانه (DH).....۲۲
۱-۷-۳-۶- لاین‌های نسبی هم ژن (NIL).....۲۲
۱-۷-۳-۷- Fx:y.....۲۳
۱-۷-۳-۸- جمعیت‌های طبیعی.....۲۳

۱-۷-۴- روش‌های آماری تجزیه اطلاعات ژنوتیپی در ترکیب با اطلاعات فنوتیپی جهت مکان‌یابی QTL ۲۳
۱-۷-۴-۱- روش‌های مبتنی بر صفت ۲۳
۱-۷-۴-۲- روش‌های مبتنی بر نشانگر ۲۳
۱-۷-۴-۲-۱- تجزیه تک‌نشانگری ۲۴
۱-۷-۴-۲-۲- مکان‌یابی فاصله‌ای ساده ۲۵
۱-۷-۴-۲-۳- مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)..... ۲۶
۱-۷-۴-۲-۴- مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه (MIM) ۲۷
۱-۸- عوامل مؤثر بر قدرت مکان‌یابی QTL ۲۷
۱-۹- تفسیر نتایج مکان‌یابی فاصله‌ای ۲۸
۱-۱۰- مروری بر تحقیقات انجام شده ۲۸

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمعیت نقشه‌یابی ۴۶
۲-۲- مراحل و نحوه انجام آزمایش ۴۷
۲-۳- صفات مورد بررسی و روش اندازه‌گیری آن‌ها..... ۴۷
۲-۴- استخراج DNA ژنومی ۴۷
۲-۴-۱- تهیه ژل آگارز..... ۵۰
۲-۵- رقیق سازی DNA ژنومی استخراج شده..... ۵۱
۲-۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۵۲
۲-۷- انجام مراحل AFLP ۵۳
۲-۷-۱- هم غلظت کردن نمونه‌های DNA..... ۵۳
۲-۷-۲- هضم DNA ژنومی ۵۴
۲-۷-۳- دو رشته‌ای کردن سازگارسازها ۵۵
۲-۷-۴- پیوند سازگارسازها با DNAهای هضم شده ۵۷
۲-۷-۵- مرحله پیش تکثیر ۵۸
۲-۷-۶- تکثیر انتخابی ۶۰
۲-۸- الکتروفورز با ژل پلی اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۶۳
۲-۸-۱- دستگاه الکتروفورز عمودی..... ۶۳
۲-۸-۱-۱- تیمار شیشه کوچک با بایند سیلن..... ۶۴
۲-۸-۱-۲- تیمار شیشه بزرگتر با سیگماکت..... ۶۴
۲-۸-۲- تهیه ژل پلی اکریلامید ۶۴
۲-۸-۲-۱- تزریق ژل ۶۴
۲-۸-۳- آماده سازی نمونه‌ها جهت بارگذاری در ژل..... ۶۵

۲-۸-۴- بارگذاری نمونه‌ها و اجرای الکتروفوز ۶۵
۲-۹- رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره ۶۶
۲-۹-۱- تثبیت کردن ۶۶
۲-۹-۲- شستشو با آب مقطر سرد ۶۶
۲-۹-۳- رنگ آمیزی ۶۶
۲-۹-۴- شستشو با آب مقطر سرد ۶۶
۲-۹-۵- آشکار کننده ۶۷

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی‌های فنوتیپی ۶۹
۳-۲- جستجوی چند شکلی در بین والدین ۷۲
۳-۳- تهیه نقشه پیوستگی ۷۶
۳-۴- مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده صفات مورد مطالعه ۷۶
۳-۴-۱- مکان‌یابی فاصله‌ای ۷۶
۳-۴-۲- مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب ۸۲
۳-۵- نتیجه‌گیری کلی ۹۷
۳-۶- پیشنهادات ۱۰۰
فهرست منابع ۱۰۱

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

جدول ۲-۱- محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج DNA و بارگذاری ژل ۵۲
جدول ۲-۲- مواد مورد استفاده در واکنش زنجیرهای پلیمراز برای نشانگرهای ریزماهواره ۵۲
جدول ۲-۳- اجزاء واکنش برش DNA در تکنیک AFLP ۵۴
جدول ۲-۴- مخلوط واکنش جهت دو رشته‌ای کردن سازگارساز PstI ۵۶
جدول ۲-۵- مخلوط واکنش جهت دو رشته‌ای کردن سازگارساز MseI ۵۶
جدول ۲-۶- مخلوط واکنش جهت اتصال سازگارساز به DNA هضم شده ۵۷
جدول ۲-۷- اجزاء واکنش تکثیر پیش انتخابی ۵۸
جدول ۲-۸- مخلوط واکنش تکثیر انتخابی ۶۱
جدول ۲-۹- نام و توالی آغازگرهای مورد نظر در مرحله تکثیر انتخابی ۶۲
جدول ۳-۱- ارزش‌های فنوتیپی صفات مرتبط با عملکرد در والدین و نسل F_2 ..... ۷۰
جدول ۳-۲- واریانس فنوتیپی، ژنوتیپی و محیطی و وراثت پذیری عمومی صفات مورد مطالعه ۷۰
جدول ۳-۳- نشانگرهای ریزماهوارهٔ چند شکل مورد مطالعه و آزمون کای اسکور (χ^2) آن‌ها ۷۳
جدول ۳-۴- نشانگرهای AFLP چند شکل مورد مطالعه و آزمون کای اسکور (χ^2) آن‌ها ۷۵
جدول ۳-۵- نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با عملکرد در روش مکان‌یابی فاصله‌ای ۸۱
جدول ۳-۶- نشانگرهای پیوسته با QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با عملکرد در روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب ۹۵

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۱- ساختار ساقه لوپ. ۱۱
شکل ۱-۲-مراحل مختلف اجرای AFLP ۱۳
شکل ۱-۳- ایجاد نوترکیبی بین کروموزوم‌های هومولوگ ۱۷
شکل ۱-۴- ساختار یک نقشه پیوستگی. ۲۰
شکل ۲-۱- نمونه‌ای از DNA استخراج شده جمعیت F_2 ..... ۵۱
شکل ۲-۲- چرخه حرارتی PCR مورد استفاده برای نشانگرهای ریزماهواره ۵۲
شکل ۲-۳- نمونه‌ای از باندهای مشاهده شده از افراد F_2 برای نشانگر ریزماهواره RM60 ..... ۵۳
شکل ۲-۴- نمونه DNA هضم شده تعدادی از افراد F_2 بر روی ژل آگارز ۵۵
شکل ۲-۵- برنامه دمایی دو رشته‌ای کردن سازگارسازها ۵۶
شکل ۲-۶- برنامه دمایی پیوند سازگارسازها ۵۷
شکل ۲-۷- برنامه دمایی مرحله پیش تکثیر ۵۹
شکل ۲-۸- نمایش نمونه DNA تکثیر شده تعدادی از افراد F_2 در مرحله پیش تکثیر، روی ژل آگارز ۵۹
شکل ۲-۹- قسمتی از تصویر ژل پلی آکریل‌امید واسرشته‌ساز مربوط به تکثیر انتخابی والدین. ۶۰
شکل ۲-۱۰- برنامه دمایی مرحله تکثیر انتخابی ۶۱
شکل ۲-۱۱- نمونه‌ای از باندهای مشاهده شده مرحله تکثیر انتخابی روی ژل آگاروز ۱/۵٪س ۶۳
شکل ۲-۱۲- نمونه‌ای از تصویر ژل پلی اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۶٪ مربوط به تکثیر انتخابی تعدادی از افراد F_2 ..... ۶۷
شکل ۳-۱- توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفت ارتفاع بوته در نتاج F_2 ..... ۷۱
شکل ۳-۲- نقشه پیوستگی ۷۲ نشانگر SSR و AFLP در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی بینام و کادوس. ۷۸
شکل ۳-۳- QTL شناسایی شده برای صفات مربوط به عملکرد به روش IM و CIM در جمعیت F_2 ..... ۹۶

چکیده

شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مهم کمی در برنج (*Oryza sativa* L.)

محمد مسائلی

در این تحقیق، یک جمعیت F_2 متشکل از ۱۸۸ بوته حاصل از تلاقی بین دو رقم خالص بینام و کادوس در سال ۱۳۸۷ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان کشت و صفات مرتبط با عملکرد دانه اندازه‌گیری شد. DNA ژنومی والدین و افراد جمعیت F_2 به روش CTAB استخراج و سپس با استفاده از ۸۵ نشانگر SSR و ۲۰ نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۳۷ نشانگر SSR و ۳۵ نشانگر AFLP چندشکلی خوبی در بین والدین داشتند که برای تهیه نقشه پیوستگی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار MapManager مورد استفاده قرار گرفتند. نقشه حاصل، ۱۴۴۵/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم برنج را پوشش داد و فاصله متوسط هر دو نشانگر مجاور از یکدیگر ۲۱/۵۷ سانتی‌مورگان بود. تجزیه QTL توسط نرم‌افزار QTL Cartographer 2.5 با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب برای صفات مورد مطالعه انجام شد. نتایج نشان داد که از ۱۲ کروموزوم برنج، ۸ کروموزوم حامل ۲۶ ناحیه (QTL) کنترل‌کننده ۹ صفت مهم مطالعه شده در این تحقیق بودند. برای ارتفاع بوته چهار QTL روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۷ (دو QTL)، برای طول خوشه چهار QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۶ و ۷ (دو QTL)، برای وزن هزار دانه یک QTL روی کروموزوم ۳، برای تعداد خوشه در بوته سه QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۶ و ۱۰، برای تعداد دانه پُر در خوشه چهار QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۵ (دو QTL) و ۹، برای تعداد خوشه‌چه پوک در خوشه دو QTL روی کروموزوم‌های ۳ و ۴، برای عملکرد دانه چهار QTL روی کروموزوم‌های ۳، ۶، ۷ و ۱۰، برای روز تا ۵۰ درصد گلدهی نیز سه QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۶ و برای روز تا رسیدگی کامل تنها یک QTL روی کروموزوم ۶ در هر دو روش مکان‌یابی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نشانگرهای RM314، RM60، M74-P51-4، M47-P70-3، RM314 و RM314 احتمالاً می‌توانند به ترتیب به‌عنوان نشانگرهای پیوسته با صفات طول خوشه، وزن هزار دانه، تعداد خوشه در بوته، تعداد دانه پُر در خوشه، روز تا ۵۰ درصد گلدهی و روز تا رسیدگی کامل جهت انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: نشانگرهای مولکولی، مکان‌یابی صفات کمی، برنج، عملکرد و اجزاء عملکرد.

Abstract

Identification of molecular markers linked to genes controlling important quantitative traits in rice (*Oryza sativa* L.)
Mohammad Masaeli

In this study, a F_2 population consisting of 188 plants derived from the cross between two pure lines, Binam and Kadus, were grown in Research field of College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, in 2008 and measured for the yield related traits. Genomic DNA of parents and F_2 progenies were extracted using CTAB method and evaluated using 85 SSR and 20 AFLP markers. Results showed that 37 SSR and 35 AFLP markers, had adequate polymorphism between the parents that were used for generating the linkage map of the population with the MapManager software. Resulting map, covers 1445.7 cM of the rice genome and the average distance of adjacent markers was 21.57 cM. QTL analysis was performed using the interval mapping (IM) and composite interval mapping (CIM) methods by QTL Cartographer software ver. 2.5 for the studied traits. The results showed that 8 of 12 chromosomes contains 26 regions (QTLs), controlling 9 important studied traits in this research. Four QTLs were mapped for plant height on chromosomes 4, 5 and 7 (two QTLs), four QTLs for panicle length on chromosomes 3, 6 and 7(two QTL), one QTL for 1000 grain weight on chromosome 3, three QTLs for panicle number per plant on chromosomes 3, 6 and 10, four QTLs for grain number per panicle on chromosomes 3, 5 (two QTL) and 9, two QTLs for empty spikelet number per plant on chromosomes 3 and 4, four QTLs for grain yield on chromosomes 3, 6, 7 and 10, 3 QTLs for days to 50% flowering on chromosomes 1, 3 and 6 and only one QTL for days to maturity on chromosome 6. The results of this study showed that markers RM314 ،RM60 ،M74-P51-4 ،M47-P70-3 ،RM314 and RM314 can probably utilized as linked markers to panicle length, 1000 grain weight, panicle number per plant, grain number per panicle, days to 50% flowering and days to maturity for Marker assisted selection (MAS) in breeding programs.

Key words: Molecular markers, Quantitative traits mapping, Rice, Yield and yield components.

مقدمه

یکی از عواملی که اصلاح نباتات رامحدود می‌کند نبود اطلاعات کافی در مورد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی همانند عملکرد می‌باشد. مکان‌یابی ژنی‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) یکی از روش‌هایی است که در دو دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفته است [کولارد و مَکیل[1]، ۲۰۰۸]. با رشد مداوم جمعیت در جهان، محدودیت‌های دسترسی به فرآورده‌های غذایی بیشتر حس می‌گردد. با توجه به روند رشدی فوق و با وجود نقش عمده علم ژنتیک و اصلاح گیاهان در افزایش فرآورده‌های غذایی، هنوز تلاش‌های بیشتری برای غلبه بر شرایط نامساعد محیطی و افزایش کیفیت و کمیت محصولات زراعی لازم است [زوبا[2]، ۱۹۹۴]. اخیراً پیشرفت‌های تحسین‌برانگیزی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و فناوری زیستی صورت گرفته و ابزار قدرتمندی برای مطالعه جزئیات ژنتیکی گیاهان زراعی فراهم آمده است. یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه ژنتیک مولکولی، فرآیندهای نشانمند کردن[3] و مکان‌یابی ژن‌ها[4] می‌باشد که به‌نژادی گیاهان زراعی را در رسیدن به اهداف مورد نظر خود یعنی ایجاد گیاهان تراریخته[5]با صفات مطلوب یاری می‌کنند. در واقع، بعد از مکان‌یابی نشانمند کردن، جداسازی و کلون کردن[6] یک ژن، می‌توان آن را انتقال داد و گیاهان تراریخته با خصوصیات جدید را تولید کرد. البته بایستی ذکر کرد که انجام فرآیندهای فوق در صفات کمی (به‌دلیل کنترل ژنتیکی پیچیده‌تر آن‌ها) نسبت به صفات کیفی مشکل‌تر و نیازمند روش‌های ژنتیکی و آماری پیچیده‌تری می‌باشد [کارِنا[7]، ۲۰۰۹]. امروزه، دسترسی به نشانگرهای مولکولی DNA و روش‌های بیومتری قدرتمند، منجر به پیشرفت‌های چشم‌گیری در مکان‌یابی QTLها در گیاهان زراعی شده است. به‌نظر می‌رسد که مهم‌ترین کاربردهای تجزیه QTL، انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی QTL می‌باشد. کاربردهای دیگر تجزیه QTL شامل درک بیشتر ما از وضعیت ژنتیکی صفات پیچیده و آگاهی از ژنومیکس گیاهی می‌باشد. شایان ذکر است که QTLها نواحی کروموزومی بزرگی را در بر می‌گیرند که اغلب این باعث مشکل پیوستگی بین QTLهای مطلوب و صفات نامطلوب می‌شود. بنابراین، یکی از اهداف اصلی تجزیه QTL محدود کردن ناحیه QTL مورد نظر به نواحی کروموزومی کوچک‌تر می‌باشد که موفقیت در انجام این عمل بستگی به نوع طرح آزمایشی به‌کار رفته، نوع و جمعیت در حال تفرق، میزان چندشکلی نشانگرهای به‌کار برده شده و روش‌های آماری مورد استفاده در تجزیه QTL دارد.

1. Collard and Mackill
2. Czuba
3. Gene tagging
4. Gene mapping
5. Transgenic crops
6. Cloning
7. Carena

یکی از اهداف مهم برنامه‌های به نژادی برنج افزایش عملکرد در واحد سطح می‌باشد. به دلیل کمی بودن این صفت مهم و کنترل آن به وسیله چندین ژن و تأثیر شدید عوامل محیطی بر روی آن مطالعه ژنتیکی آن بسیار مشکل است. در صورتی که بتوان با اعمال روش‌های مناسب، تعداد ژن‌ها، جایگاه ژنومی و سهم هر یک از آن‌ها را در کنترل تنوع فنوتیپی عملکرد دانه مشخص نمود، در این صورت صفات کمی نیز با کاریی صفات تک ژنی مطالعه خواهند شد [ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷]. هدف از تمامی روش‌های تجزیه QTL، دستیابی به این مهم بوده و می توان از نتایج آن به خوبی در برنامه‌های به نژادی آینده استفاده نمود.

در این تحقیق اهداف زیر مد نظر بوده است:

۱. ایجاد نقشه پیوستگی نشانگرهای SSR و AFLP در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی رقم‌های بی‌نام و کادوس در برنج.
۲. مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با عملکرد دانه روی نقشه پیوستگی ایجاد شده.
۳. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مورد مطالعه در برنج.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- برنج

برنج به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان، در ۱۱٪ از کل اراضی زراعی جهان زیر کشت بوده که در سال حدود ۶۶۰ میلیون تن برنج از این سطح برداشت شده است. این محصول ۲/۸۸ کالری/فرد/روز را تامین می‌نماید. برنج یکی از گیاهان زراعی عمده، برای انقلاب سبز (که در دهه ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۰ اتفاق افتاد) محسوب می‌گردد. به‌علاوه، برنامه‌های اصلاحی بسیار مهمی در در برنج در نواحی مختلف جهان انجام شدهم است. سه گروه عمده تحقیقاتی بین المللی در جهان روی برنج کار می‌کنند [کارِنا، ۲۰۰۹]:

۱. موسسه تحقیقات بین المللی برنج[1] (IRRI). این مرکز فعالیت جهانی خود را در لس‌بانوس فیلیپین انجام می‌دهد.
۲. کانون گسترش برنج غرب آفریقا[2] (WARDA). این کانون در غرب آفریقا فعالیت دارد.
۳. مرکز بین‌المللی کشاورزی مناطق حاره[3] (CIAT). حوزه فعالیت این مرکز در آمریکای لاتین می‌باشد.

علاوه بر این مراکز تحقیقاتی بین المللی، بسیاری از کشورهای برنج‌خیز دنیا نظیر چین، ژاپن، هندوستان، اندونزی و پاکستان نیز مرکز تحقیقات برنج ملی برنج دارند که برنامه‌های پژوهشی بسیار زیادی روی برنج انجام داده و هم‌اکنون نیز فعالیت‌های زیادی دارند. در ایران نیز موسسه تحقیقات برنج کشور (RRII) واقع در رشت، اجرای پروژه‌های برنج را در سطح ملی هدایت می‌کند.

برنج (*Oryza sativa* L.) گیاهی یکساله، از خانوادهٔ غلات بوده و غذای اصلی بیش از یک سوم جمعیت جهان را تامین می‌کند [زوبا، ۱۹۹۴]. همچنین این گیاه به عنوان یکی از غذاهای اصلی مردم سایران به شمار می‌رود. این محصول با تولید ۳۵۰۰ تن در سال ۲۰۰۷ در رتبه دوازدهم محصولات کشاورزی تولیدی ایران قلمداد می‌شود [F.A.O, 2007].

مطالعات گسترده ژنتیکی و سیتولوژیکی در برنج انجام گرفته است. مطالعات قدیمی عموماً در رابطه با صفات ریخت‌شناختی بود. اما بعدها مطالعات توارثی بیشتر در ربطه با صفات مهم زراعی (از قبیل ارتفاع گیاه، حساسیت به طول روز، بلوغ، عملکرد، مقاومت به بیماری و حشرات و اجزای کیفیت) مرتبط می‌گردد، مد نظر قرار گرفتند [هیرانو و همکاران[4]، ۲۰۰۸]. بیشتر این صفات که به عنوان صفات کمی نامیده می‌شوند توسط پلی‌ژن‌ها کنترل می‌شوند که معمولا دارای تأثیرات

1. International Rice Research Institute
2. West Africa Rice Development Association
3. International Centre for Tropical Agriculture
4. Hirano et al.

اندک بوده و تنها تعداد کمتری از آن‌ها تأثیرات بزرگی دارند. این مکان‌های ژنی اصطلاحاً QTL نامیده شده و می‌توانند توسط نشانگرهای مولکولی (که بایستی دارای تفرق مندلی باشند) شناسایی می‌شوند [کَمپ و کاکس[1]، ۲۰۰۲].

عملکرد همچون بسیاری از صفات مهم زراعی دیگر یک صفت کمی بوده و به‌وسیله چندین ژن کنترل می‌شود که هر یک از آن‌ها در تظاهر فنوتیپ نهایی صفت، به صورت مثبت یا منفی مؤثرند. تنوع فنوتیپی برای اینگونه صفات، به‌وسیله تفاوت‌های کمی پیوسته در بین نتاج و توزیع ارزش‌های فنوتیپی صفت در جمعیت مورد مطالعه مشخص می‌شود. علاوه بر تعداد زیاد ژن، تأثیر ژن‌های تغییردهنده و عوامل محیطی بر روی بروز و در نتیجه توزیع صفات کمی، باعث کاهش وراثت‌پذیری آن‌ها شده و کار با اینگونه صفات را مشکل می‌کنند [ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷]. به دلیل پیچیدگی‌های فوق، متخصصین ژنتیک و به نژادگران گیاهی، اطلاعات اندکی از تعداد ژن‌ها، جایگاه کروموزومی آن‌ها و سهم نسبی شرکت هر یک از ژن‌ها در تظاهر و توزیع فنوتیپی یک صفت کمی دارند. اما اگر بتوان این مدل پیچیده ژنتیکی را به اجزای ژنتیکی منفرد تجزیه نمود، در این صورت شاید بتوان صفات کمی را نیز با کارآیی صفات تک‌ژنی مطالعه نمود [ربیعی، ۱۳۸۲]. مکان ژن‌های کنترل کننده صفات کمی[2] یا QTLها، نواحی ژنتیکی هستند که شامل ژن‌های مرتبط با یک صفت کمی خاص (همچون صفات چند ژنی، چند فاکتوری و یا صفات پیچیده) می‌باشند. QTLها را نمی‌توان توسط ارزش‌های فنوتیپی تعیین نمود، بلکه تنها مسیر جهت تعیین QTL استفاده از نشانگرهای مولکولی است. مکان‌یابی QTL، مبتنی بر تشخیص ارتباط بین فنوتیپ و ژنوتیپ حاصل از نشانگرهای ژنومی است [کَمپ و کاکس، ۲۰۰۲].

۱-۲- نشانگرهای ژنتیکی

در دوره قبل از دهه ۱۹۸۰ مطالعه صفات کمی شامل تکنیک‌های آماری مبتنی بر میانگین‌ها، واریانس‌ها و کوواریانس‌های افراد خویشاوند بود. از سال ۱۹۸۰ یک پیشرفت غیر منتظره بزرگ در تجزیه خصوصیت صفات کمی (که فرصت طلایی را جهت انتخاب QTLها ایجاد نمود) توسط نشانگرهای مولکولی آغاز گردید. عموماً، نشانگرها ژن‌ها را هدف قرار نمی‌دهند اما به‌عنوان علائم و یا پرچم، عمل می‌کنند. این نشانگرها تقریباً نزدیک به ژن‌ها قرار دارند و می‌توانند به عنوان برچسب ژن به‌کار روند. چنین نشانگرهایی به خودی خود تأثیری بر فنوتیپ صفت مورد نظر ندارند، زیرا آن‌ها در نزدیکی ژن‌های کنترل‌کننده صفت قرار دارند و یا به آن‌ها پیوسته هستند. تمامی نشانگرهای ژنتیکی همچون ژن‌ها نواحی ژنومی خاص را در

1. Camp and Cox
2. Quantitative Trait Loci

کروموزوم اشغال کرده‌اند. یکی از استفاده‌های عمده نشانگرهای مولکولی در تحقیقات کشاورزی، در تهیه نقشه‌های پیوستگی است. نقشه‌های پیوستگی جهت تعیین نواحی کروموزومی که حاوی ژن‌های کنترل کننده صفات ساده (که توسط یک ژن کنترل می‌شود) و صفات کمی (که با استفاده از تجزیه QTL شناسایی می‌شوند) تهیه شده‌اند. فرایند ایجاد نقشه‌های پیوستگی و انجام تجزیه QTL (جهت تعیین نواحی مرتبط با صفت) به‌عنوان مکان‌یابی QTL شناخته می‌شود [لورز و ویدهولم[1]، ۲۰۰۵]. نشانگرها جهت تقسیم‌بندی جمعیت نقشه‌یابی به گروه‌های مختلف ژنوتیپی به‌کار می‌روند که این امر مبتنی بر حضور و یا عدم حضور مکان ژنی نشانگر خاص می‌باشد و موجب تخمین تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های مرتبط با صفت مورد نظر می‌شوند. تفاوت‌های حاصله، بیانگر این حقیقت است که مکان ژنی نشانگر مورد استفاده، با QTL کنترل‌کننده صفت، مرتبط می‌باشد. هر چه این نشانگر به QTL مذکور نزدیک‌تر باشد شانس کمتری جهت وقوع نوترکیبی بین نشانگر و QTL وجود دارد. یک QTL پیوسته و نشانگرهای مجاور، اغلب با یکدیگر در نتاج به ارث می‌رسند [وو و همکاران[2]، ۲۰۰۷].

۱-۳- انواع نشانگرهای ژنتیکی

به هریک از خصوصیات موجودات زنده که بتوان از آن به عنوان یک نشانه و مدرک برای بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود بین ارقام، گونه‌ها، جنس‌ها و ... استفاده نمود، نشانگر ژنتیکی گفته می‌شود. نشانگرهای ژنتیکی را می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، نشانگرهای سیتولوژیکی و نشانگرهای مولکولی تقسیم نمود. نشانگرهای مولکولی را می‌توان به دو دسته اصلی نشانگرهای پروتئینی و نشانگرهای DNA تقسیم نمود. از نشانگرهای پروتئینی می‌توان به نشانگرهای آیزوزامی اشاره کرد که شکل‌های مولکولی متفاوت از آنزیم‌های مشابه و با عمل بیوشیمیایی یکسان است [ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷]. معایب عمده نشانگرهای مورفولوژیکی و سیتولوژیکی چندین مورد است، از جمله این‌که آن‌ها از لحاظ تعداد محدودند و تحت تأثیر عوامل محیطی و یا مرحله نموی گیاه قرار می‌گیرند. با وجود این محدویت‌ها، نشانگرهای مورفولوژیکی هنوز به‌عنوان ابزاری ارزشمند برای متخصصین اصلاح نباتات به‌کار می‌روند [لورز و ویدهولم، ۲۰۰۵].

1. L?rz and Widholm
2. Wv et al.

نشانگرهای DNA دسته بزرگی از نشانگرها را شامل می‌شود و خود به دو دسته اصلی نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] (PCR) و نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR تقسیم می‌شود. از جمله نشانگرهای غیر مبتنی برPCR می‌توان به تفاوت طول قطعات حاصل از برش[2] (RFLP) اشاره نمود. همچنین نشانگر چندشکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA[3] (RAPD)، تفاوت طول قطعات قابل تکثیر[4] (ALP)، توالی‌های تکراری ساده[5] (SSR)، تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر[6] (AFLP)، تفاوت شکل فضایی رشته‌های منفرد[7] (SSCP) جزء نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشند [ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷].

۱-۳-۱- نشانگرهای DNA

استفاده از نشانگرهای DNA در اصلاح گیاهان زراعی و حیوانات قلمرو جدیدی را در کشاورزی گشوده که اصطلاحاً اصلاح مولکولی نامیده می‌شود. این نشانگرها بنا به فراوانی‌شان به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. آن‌ها از انواع مختلف جهش‌های DNA نظیر جهش تعویضی(جهش نقطه‌ای)، جهش بازآرایی(درج و حذفیات)، اشتباهات در رونویسی و یا قطعات تکراری DNA به‌وجود آمده‌اند. نشانگرهای DNA از نظر عملکرد خنثی می‌باشند. چرا که آن‌ها در نواحی غیرکننده DNA قرار دارند. بر خلاف نشانگرهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، این نشانگرها به‌طور قابل توجهی از لحاظ تعداد نامحدودند و همچنین تحت تأثیر عوامل محیطی و مرحله نموی گیاه قرار نمی‌گیرند. علاوه بر استفاده از نشانگرهای DNA در طراحی نقشه‌های پیوستگی، آن‌ها کاربردهای متنوعی نظیر ارزیابی سطوح مختلف تنوع درون ژرم‌پلاسم و همچنین تشخیص کولتیوار را دارا می‌باشند. نشانگرهای مولکولی تفاوت‌های ژنتیکی را با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با مواد شیمیایی (اتیدیوم بروماید یا نیترات نقره)، تشخیص با کاوشگرهای رنگی و یا رادیواکتیو نشان می‌دهند [لورز و ویدهولم، ۲۰۰۵].

۱-۳- ۲ ریزماهواره‌ها[8] یا توالی‌های تکراری ساده (SSR)

DNA تکراری یکی از اجزاء اصلی ژنوم موجودات عالی به خصوص گیاهان بوده و تا ۹۰ درصد از کل DNA موجود در ژنوم گیاهان را شامل می‌شود.

1. Polymerase Chain Reaction
2. Restriction Fragment Length Polymorphism
3. Random Amplified Polymorphic DNAs
4. Amplification Length Polymorphism
5. Simple Sequence Repeat
6. Amplified Fragment Length Polymorphism
7. Single Strand Conformation Polymorphism
8. Microsatellite

DNA تکراری را می‌توان به دو گروه تقسیم نمود:

الف- تکرارهای پراکنده DNA که در نقاط مختلفی در ژنوم قرار دارند.

ب- تکرارهای پی در پی[1] که شامل ۲ تا ۱۰۰ قطعه هم شکل DNA می‌باشد.

تکرارهای پی در پی، خود به چهار گروه تقسیم می‌شود:

۱. DNA ماهواره‌ای[2]: ماهواره‌ها شامل تکرارهای بسیار زیادی از هزار تا صد هزار نسخه از یک موتیف مشخص بوده و یک رشته طویل DNA هتروکروماتینی را تشکیل می‌دهند. طول یک واحد تکرار شونده بسیار متغیر بوده و ممکن است از دو تا چند هزار جفت باز باشد. اما واحدهای تکراری ۱۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی رایج‌تر است.

۲. ماهوارک‌ها[3]: اغلب دنباله‌های تکراری یک موتیف ۱۰ الی ۶۰ جفت بازی هستند.

۳. میان ماهواره‌ها[4]: این اصطلاح، برای بیان دسته‌ای از DNAهای تکراری که ویژگی‌های ماهوارک‌ها و ریزماهواره‌ها را دارند و طول آن‌ها در جایگاه مربوطه در حدود ۴۰ جفت باز می‌باشد.

۴. ریزماهواره‌ها: ریزماهواره‌ها قطعه گسترش یافته‌ای از DNA هستند که به صورت پشت سر هم تکرار شده و از واحدهای ۱ الی ۶ جفت بازی تشکیل شده‌اند اما بیشتر آن‌ها دو جفت بازی هستند (همچون $[CP]_n$, $[CA]_n$ و...). ریزماهواره‌ها به دلیل فراوانی بالا و چند شکلی زیادی که دارند نشانگرهای بسیار قوی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و نشانمند کردن ژن‌ها می‌باشد [ربیعی و صبوری، ۱۳۸۷].

۱-۳-۲-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[5]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR روشی است که با استفاده از آن به کمک یک یا دو آغازگر[6] چند نوکلئوتیدی تک رشته‌ای که به رشته‌های مخالف در ناحیه مورد نظر روی DNA الگو(هدف) متصل می‌شوند. قطعات خاص DNA تکثیر می‌شود.

1. Tandem
2. Satellite DNAs
3. Minisatellite
4. Midisatellite
5. Polymerase Chain Reaction
6. Probe