پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان:

نقشه‌یابی ژن‌های تجدیدکننده باروری در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی WA در برنج

نگارش: مهران علوی

اساتید راهنما:

دکتر اسدالله احمدی خواه

دکتر بهنام کامکار

استاد مشاور:

مهندس مهدی کلاته عربی

تابستان ۱۳۸۸

فهرست

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	**۱**
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- مشخصات گیاه‌شناسی برنج	٤
۱-۳- گرده‌افشانی و لقاح	۸
۱-٤- شرایط مناسب برای کشت برنج	۸
فصل دوم: بررسی منابع	**۱۰**
۲-۱- چندشکلی ژنتیکی در برنج	۱۱
۲-۲- نرعقیمی	۱۲
۲-۲-۱- نرعقیمی سیتوپلاسمی	۱۲
۲-۲-۲- نرعقیمی متاثر از حساسیت به عوامل محیطی	۱۵
۲-۳- ویژگی‌های بیوشیمیایی و سیتولوژیکی گیاهان حامل سیتوپلاسم عقیم	۱٦
۲-٤- مکانیسم توسعه CMS در گیاهان	۱۷
۲-۵- تولید برنج هیبرید	۱۸
۲-٦- بازگرداندن باروری	۱۸
۲-۷- ژنتیک تجدید باروری	۲۰
۲-۸- مکانیسم بازگرداندن باروری	۲۱
۲-۹- مطالعات مکان‌یابی ژن‌های تجدید کننده‌باروری در برنج	۲۳
۲-۱۰- نشانگرهای مولکولی	۲٦
۲-۱۰-۱- نشانگرهای DNA	۲۸
۲-۱۰-۱-۱- نشانگرهای RAPD	۲۸
۲-۱۰-۱-۲- نشانگرهای STS	۳۰
۲-۱۰-۱-۳- نشانگر CAPS	۳۱
۲-۱۰-۱-٤- نشانگر SSR	۳۱

۲-۱۰-۱-۵- نشانگرهای SCAR	۳٤
۲-۱۱- انتخاب به کمک نشانگر MAS	۳٦
۲-۱۲- نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی	۳۸
۲-۱۳- روش‌های نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی QTL	۳۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها	**٤۲**
۳-۱- مواد گیاهی	٤۳
۳-۲- صفات مورد مطالعه	٤٤
۳-۲-۱- باروری دانه گرده و بذر دهی خوشه	٤٤
۳-۲-۲- رنگ کلاله	٤٥
۳-۳- استخراج DNA برای آنالیز PCR	٤٦
۳-٤- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)	٤۸
۳-٥- روش انجام PCR	٤۹
۳-٦- تکثیر با نشانگرهای SSR	٥۰
۳-۷- طراحی آغازگر CAPS و آشکارسازی آن	٥۳
۳-۷-۱- برش با آنزیم برشی	٥۳
۳-۸- آنالیز تفکیک بالک (BSA)	٥٤
۳-۹- آنالیز پیوستگی	٥٥
۳-۱۰- نقشه‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمّی (QTL)	٥٥
فصل چهارم: نتایج	**٥٦**
٤-۱- توزیع فنوتیپی باروری دانه گرده در جمعیتF	٥۷
٤-۲- تفکیک فنوتیپی باروری دانه گرده	٥۸
٤-۳- آزمون استقلال ژن‌های IR36	٦۰
٤-٤- آنالیز تفکیک توده های در حال تفرّق (BSA)	٦۱
٤-٤-۱- نشانگرهای SSR	٦۱
٤-٤-۲- نشانگر CAPS	٦۳

٤-٥- نقشه‌یابی ژن بازگرداننده باروری Rf3 در جمعیت F2 ٦٥
٤-٦- شناسایی مکان‌های QTL برای ژن‌های بازگرداننده باروری ٦٨
٤-٦-١- شناسایی مکان‌های QTL با استفاده از روش تک نشانگری ٦٨
٤-٦-٢- نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب مکان‌های QTL برای ژن‌های بازگرداننده باروری ٦٩
٤-٦-٣- نقشه‌یابی فاصله‌ای چندگانه مکان‌های QTL برای ژن‌های بازگرداننده باروری ٧١
فصل پنجم: بحث ٧٣
فصل ششم: منابع ٧٧
ضمائم ٩٢

چکیده:

نر عقیمی سیتوپلاسمی (CMS) در گیاهان به سبب تخریب یا نـوآرایی ژنـوم میتوکنـدری بـه وجـود می‌آید. اثر CMS می‌تواند به وسیله ژن‌های بازگرداننده باروری که در هسته قرار دارند خنثی شـود و گیاه قادر به تولید دانه گرده فعال شود. بنابراین سیتوپلاسم نرعقیم و ژن‌هـای بازگردانـنده بـاروری در هسته، به عنوان ابزاری مفید برای تولید بذر هیبرید و بهره‌وری از هتروزیس به شمار می‌رود. نرعقیمی سیتوپلاسمی WA در برنج برای تولید بذر هیبرید به صورت تجاری استفاده می‌شود. در ایـن تحقیـق از جمعیت F2 حاصل از تلاقی ندا-A × IR36 برای ترسیم نقشه ژنتیکی لوکـوس *Rf3* و تجزیـه و تحلیل این مکان ژنی با به کارگیری نشانگرهای SSR و CAPS استفاده شد. آنالیز پیوستگی ژنتیکـی نشان داد که ۳ نشانگر SSR شـامل RM1، RM3233، RM38 و یـک نـشانگر CAPS (بـه نـام RG140/*Eco*RI) بر روی بازوی کوچک کروموزوم یک بـرنج بـا لوکـوس *Rf3* پیوسـتگی دارنـد. لوکوس *Rf3* بین دو نـشانگر RM1 و RM3873 بـه ترتیـب بـا فاصـله ۵/٦ و ١٤ سـانتی‌مورگـان مکانیابی شد. از آنجا که جمعیت F2 مورد مطالعه، با نسبت (S)۱: (F)۱۵ برای دو ژن پیوسته تفکیک حاصل کرد، برای یافتن این مکان‌های ژنی پیوسته از روش نقشه‌یابی QTL استفاده گردید. نتایج ایـن آنالیز نشان داد که ۲ تا ۳ مکان ژنی پیوسته در لوکوس *Rf3* وجود دارد کـه در مجمـوع بـیش از ۹۳٪ تغییرات صفت مورد بررسی را توجیه می‌نمایند. نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) حاکی از آن است کـه اثـر مکـان Q2 (حدفاصـل نـشانگرهای RM3873 و RM7241) انـدکی بـیش از مکـان Q1 (حدفاصل نشانگرهای RM1 و RM3873) در نمود فنوتیپی صفت بازگردانندگی باروری می‌باشـد. از نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق که پیوسـتگی آن‌هـا بـا لوکـوس *Rf3* اثبـات شـده اسـت، می‌توان در برنامه گزینش به کمک نشانگر (MAS) بـرای صـفت بازگرادننـدگی بـاروری در سیـستم نرعقیمی سیتوپلاسمی WA برنج بهره جست. همچنین از این نشانگرها می توان برای شروع گام‌زنـی کروموزومی ژن‌های موجود در این لوکوس و کلون کردن آن‌ها در آینده نزدیک استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج – ژن های بازگرداننده باروری – نشانگر SSR – ژن *Rf3*

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) دومین غلّه مهم دنیاست و از لحاظ تولید دانه بعد از گندم رتبه دوم را به خود اختصاص داده است. تقریباً تمام برنج تولید شده به مصرف غذای انسان می‌رسد و غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان محسوب می‌شود. بر خلاف گندم که محصول فصل سرد بوده و به عنوان گیاهی زمستانه تولید آن در مناطق معتدل نیمه گرمسیری صورت می‌گیرد، برنج محصول فصل گرم بوده و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کشت می گردد. در نقاطی که دوره‌های متناوب بارندگی و خشکی وجود دارد، تولید برنج در فصل بارندگی متمرکز می‌باشد و فقط در صورت وجود و تامین آب اضافی در فصل خشک کشت می‌گردد. در نواحی معتدل و مرتفع، کشت برنج به دوره زمانی فاقد سرما محدود می‌شود.

سطح زیر کشت برنج در سال ۲۰۰۸ در کل دنیا ۱۵۵۷۱۱۰۰۰ هکتار، در آسیا ۱۳۹۶۱۷۰۰۰ هکتار، در چین ۲۹۲۰۰۰۰۰ هکتار و در ایران ۵۷۵۰۰۰ هکتار بوده است. تولید کل برنج در دنیا در سال ۲۰۰۸ معادل ٦٦١٨١١٠٠٠ تن، در آسیا ٦٠٠٥٤١٠٠٠، در چین ۱۹۳۰۰۰۰۰۰ و در ایران ۲۲۷۳۰۰۰ تن بوده است. متوسط جهانی تولید برنج در سال ۲۰۰۸ در حدود ٤٢٥٠، در آسیا ٤٣٠٠، در چین ٦٦١٠ و در ایران ۳۹۵۰ کیلوگرم برهکتار بوده است (USDA، ۲۰۰۸). برنج در تمام قاره‌ها (به غیر از مناطق یخبندان) کشت می‌شود. محدوده جغرافیایی کشت برنج شامل ۵۳ درجه عرض شمالی تا ٤٠ درجه

عرض جنوبی است. از سطح دریا تا ارتفاع بیش از ۳۰۰۰ متر در هیمالیا می‌تواند تحت کشت برنج قرار گیرد. در حال حاضر بیش از ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا کشت می‌شود.

Oryza sativa L. گونه اصلی زراعی برنج در حدود ۱۰۰۰۰ سال پیش در منطقه‌ای که شامل شمال شرقی هند، بنگلادش، برمه، لائوس، ویتنام و جنوب چین می‌گردد، اهلی شده است. برنج از جمله قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که در هند و چین برای بیش از ۸۰۰۰ سال کشت می‌شده است. برنج از منطقه اولیه تنوّع خود به جنوب شرقی آسیا و جزایر مجاور در ناحیه اقیانوسیه گسترش یافت. تنها گونه زراعی برنج که بومی مناطق بالادست رودخانه نیجر در غرب آفریقا می باشد، *O. glaberrima* است. اگر چه این گونه در سطح کوچکی در نواحی گرمسیری کشت می‌گردد، ولی توسط ارقام اصلاح شده *O. sativa* در حال جایگزینی است. اعتقاد بر این است که دو گونه مذبور از یک جَد مشترک منشأ گرفته باشند که در طی مسیرهای جداگانه قرار گرفته‌اند و احتمالاً این جدایی بر اثر تفکیک زمین و تشکیل قاره آسیا و آفریقا ایجاد شده است.

شواهد نشان می‌دهند که تقریبا ٤۰۰۰ سال قبل از میلاد، در کشورهای هند و چین، کشت برنج متداول بوده است. پس از گندم، برنج دومین غلّه مهم در دنیا به حساب می‌آید. نزدیک به ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید برنج متعلق به کشورهای خاور دور می‌باشد. بیش از نصف محصول برنج هم در دو کشور هند و چین تولید می‌شود. بطور کلی، کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری برمه، تایلند، ویتنام، لائوس، اندونزی، فیلیپین، پاکستان، هند، آمریکا، ژاپن، ایتالیا، مصر، چین، برزیل، کوبا، مکزیک و استرالیا از تولید کنندگان برنج به شمار می‌آیند.

جنس *Oryza* دارای بیست گونه با تعداد کروموزوم پایه ۱۲ می‌باشد. این جنس شامل گونه‌های دیپلوئید با شش گروه ژنومی A, B, C, D, E و F می باشد. گونه زراعی *O. sativa* دارای فرمول ژنومی AA (۲n=۲x=۲٤) می‌باشد. کروموزوم‌های گونه *O. glaberrima* (۲n=۲x=۲٤) به خوبی با *O. sativa* جفت نشده و لذا به آن فرمول ژنومی A_gA_g داده‌اند. شش گونه Oryza یکساله و بقیه چند ساله (دایمی) می‌باشند. دو گونه *O. nivara* و *O. rufipogon* که وحشی بوده و دارای ژنوم AA می‌باشند به طور وسیعی در جنوب شرقی آسیا توزیع یافته و به راحتی با یکدیگر تلاقی‌پذیر هستند (جدول ۱-۱).

۱-۲- مشخصات گیاهشناسی برنج

ساقه برنج راست، استوانه‌ای و جز در قسمتی که گره‌ها وجود دارند تو خالی است. ارتفاع ساقه به ٦٠ تا ۲۰۰ سانتیمتر می‌رسد. برنج علاوه بر ساقه اصلی، ٤ تا ٥ ساقه فرعی دارد. برگهای برنج به صورت متناوب در دو ردیف در دو طرف ساقه قرار گرفته‌اند. برگ برنج دارای غلاف، پهنک، زبانک و گوشوارک است. همچنین برنج مانند گندم، دارای گل آذین خوشه‌ای می‌باشد که دانه‌ها در آن قرار می‌گیرند. برخلاف سنبلچه‌های گندم، جو، ذُرت که فشرده و نزدیک به هم هستند، سنبلچه‌های برنج به صورت غیر فشرده روی محورهای اصلی و فرعی گل آذین قرار دارند. میوه برنج دارای غلافی سفید رنگ، قهوه‌ای، کهربایی، قرمز یا بنفش است که این میوه را به همراه غلاف آن، شلتوک می‌نامند. برای قابل استفاده شدن برنج برای انسان، باید شلتوک را پوست کند، یعنی غلاف را از دانه جدا نمود.

جدول ۱-۱. گونه‌های برنج، تعداد کروموزوم‌ها، ژنوم گروه‌ها و توزیع جغرافیایی آن‌ها

منطقه پراکنش	ژنوم	تعداد کروموزوم (۲n)
گونه‌های زراعی :		
افریقای غربی	A_gA_g	۲٤
آسیا	AA	۲٤
گونه‌های وحشی :		
آمریکای مرکزی و جنوبی	CCDD	٤٨
استرالیا	EE	۲٤
آفریقای غربی	AA^9	۲٤
آفریقای غربی و مرکزی	FF	۲٤
آفریقای شرقی و مرکزی	CC, BBCC	۲٤-٤٨
امریکای جنوبی	CCDD	٤٨

O. glaberrima
O. sativa
O. alta
O. australlensis
O. bathii (O. breviligulata)
O. brachyantha
O. eichingert
O. grandiglumis

- ادامه جدول ۱-۱. گونه‌های برنج، تعداد کروموزوم‌ها، ژنوم گروه‌ها و توزیع جغرافیایی آن‌ها

O. granulate	۲٤		آسیای جنوبی و آسیای جنوب غربی
O. latifolia	٤۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی
O. longiglumis	٤۸	-	گینه نو
O. longistaminata (O. bathii)	۲٤	A^1A^1	آفریقا
O. meyeriana	۲٤	-	آسیای جنوب شرقی، چین
O. minuta	٤۸	BBCC	آسیای جنوب شرقی، گینه نو
O. nivara (O. tatua, O. rufipogon)	۲٤	AA	آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و استرالیا
O. officinalis	۲٤	CC	آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و گینه نو
O. punctata	٤۸	BBCC, BB^7	آفریقا
O. ridiey	٤۸	-	آسیای جنوبی
O. rufipogon (O. perennis, O. fatua, O. perennis Subsp. Balunga)	۲٤	AA	آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی
O. rufipogon (O. Perennis subsp. cubensis			
O. schachteii	۲٤	$A^{cu}A^{cu}$	گینه نو

برنج گیاهی است که دارای ارقام زودرس (طول دورهٔ رشد ۱۳۰ تـا ۱٤٥ روز)، متوسـط رس (۱٥۰ تـا ۱٦۰ روز) و ارقام دیررس (۱۷۰ تا ۱۸۰ روز) می‌باشد. برای شناخت بهتر گیاه برنج به ذکر قسمت‌های مختلف آن از قبیل ریشه، ساقه، برگ و غیره می‌پردازیم. ریشهٔ برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر در

عمق ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متری خاک نفوذ می‌نماید. در این گیاه به غیر از ریشه‌های جنینی از محل گره‌ها نیز ریشه بوجود می‌آید. هر چقدر رشد برگها بیشتر باشد بر رشد ریشه‌ها هم افزوده شده و در نتیجه می‌توان گفت که با افزایش تعداد پنجه‌ها تعداد برگ بیشتر شده و در نتیجه رشد ریشه‌ها نیز زیادتر می‌گردد. در زمان باز شدن گلها و به خوشه‌رفتن برنج رشد ریشه حداکثر مقدار خود را دارد. ساقهٔ برنج بندبند و تو خالی بوده و در فواصل مختلف ساقه جداره‌های سختی قرار دارد که در آن قسمت‌ها ساقه توپر می‌باشد و گره نام دارد. فاصلهٔ بین دو گره را میان گره می‌نامند. برگهای این گیاه کشیده و دارای رگبرگ‌های موازی بوده و بدون دمبرگ است و قاعدهٔ برگ پهن‌تر از سایر نقاط آن می‌باشد و قسمتی از ساقه گیاه یا تمام محیط آنرا احاطه کرده که آنرا غلاف یا نیام می‌نامند. در قاعده برگ در طرفین غلاف دو صفحهٔ کوچک یا بزرگ بنام گوشوارک[1] وجود دارد. همچنین در محل اتصال غلاف به ساقه زائدهٔ کوچکی بنام زبانک[2] وجود دارد. همچنین تعداد گره‌ها در این گیاه از ۱۰ تا ۲۰ عدد متغیر می‌باشد. در مقادیر مساوی شاخص سطح برگ (LAI) بوته‌های دارای ساقهٔ بلند از نور بهتر می‌توانند استفاده نمایند ولی به آسانی ورس می‌کنند. ارتفاع بوته‌های برنج در ارقام مختلف از ۵۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متر و گاهی اوقات به ۲۰۰ سانتی‌متر می‌رسد. برگهای این گیاه متناوب بوده و در دو جانب متقابل ساقه قرار دارند. تعداد برگها در ارقام مختلف برنج متفاوت بوده، در ارقام زودرس ١٤ تا ١٥ برگ، در ارقام متوسط‌رس ١٦ تا ١٧ برگ و در ارقام دیررس تعداد برگها ١٨ تا ١٩ برگ بر روی هر ساقه می‌باشد. افزایش دمای هوای پیرامونی در زیاد شدن سطح برگ اثر تعیین کننده‌ای داشته و موجب بیشتر شدن تعداد برگها می‌گردد. در مقادیر مساوی شاخص سطح برگ (LAI) بوته‌هایی که برگهای کوچک و زیادتر دارند از بوته‌هایی که برگهای بزرگ و اندک دارند بهترند. پنجه‌ها به جوانه‌های اولیه گفته می‌شوند که در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی تبدیل به ساقه می‌شوند. از مرحله ٤ تا ٥ برگی شدن گیاه پنجه‌زنی آغاز می‌گردد. پنجه‌ها در مراحل اولیه رشد برای تأمین مواد غذایی خود از ساقهٔ اصلی استفاده می‌کنند و این عمل تا ظهور حداقل ۳ برگ و چند ریشه ادامه می‌یابد. موقعی که نشاها از خزانه به زمین اصلی منتقل شدند پنجه‌زنی شروع شده و تا یک ماه بعد نیز ادامه می‌یابد. پس از پایان یک ماه رشد پنجه‌ها به حداکثر خود رسیده و پس از آن از تعداد آنها کاسته

[1] Stipule
[2] Ligule

خواهد شد. شرایط اقلیمی به ویژه آب و هوا در رشد پنجه‌ها بسیار مهم و مؤثر می‌باشد. قدرت تولید پنجه در برنج خیلی زیاد است، بطوری که هر بوته برنج معمولاً ٤ تا ٥ پنجه تولید می‌کند. گل آذین در برنج به صورت خوشه‌ای بوده و دارای انشعابات فرعی می باشد و حاوی سنبلچه‌های تک گلچه‌ای است. برنج بر خلاف سایر غلات که ٣ تا ٤ پرچم دارند دارای ٦ پرچم است. نافه کوتاه و بساک‌ها به صورت دوخانه‌ای و دارای یک مادگی بوده که حاوی یک تخمدان می‌باشد. کلاله دو شاخه و پردار است. مادگی دارای تخمدان یک برچه‌ای می باشد. در اطراف هر گل دو برگک بنام پوشینه[1] وجود دارد که یکی لما[2] و دیگری پالئا[3] نامیده می‌شود. همچنین در انتهای هر سنبله دو برگک بنام پوشه[4] وجود دارد. برگک فوقانی یا گلوم گل دهندهٔ لما (گلومل یا پوشینه سنبله که ریشک روی آن می‌رود) و پالئا (گلومل یا پوشینهٔ گیاهان گرامینه که فاقد ریشک است)، همراه با گل در برگرفته شده یک گل را تشکیل می‌دهند. در برنج گلوم‌ها خیلی کوچک بوده و حتی ممکن است گاهی اوقات حذف شده باشند. طول گلوم‌های خارجی ١/٤ لما و پالئا و در بعضی از ارقام هم اندازهٔ لما و پالئا است. عموماً لما دارای ریشک و پالئا فاقد ریشک می‌باشد. ٧ تا ٩ روز بعد از گل دادن لایه آلرون از تغییر شکل لایهٔ خارجی بافت آندوسپرم بوجود می‌آید. گل آذین در برنج به صورت پانیکول بوده و فرق آن با گل آذین سنبله در این است که در پانیکول هر سنبلک دارای دم باریک و بلندی می‌باشد و به همین دلیل به آن خوشه سنبل هم گفته می‌شود. پانیکول در ارقام مختلف برنج به شکلی فشرده، باز و یا نیمه‌باز است. البته از نقطه نظر اصلاحگران دست اندر کار تولید بذر هیبرید، ارقامی که گل آنها بیشتر باز باشد بهترند، زیرا مقدار دگرگشنی و در نتیجه تولید بذر آنها بیشتر است. پانیکول برنج در انتهای ساقه قرار دارد و دارای شاخه‌های فرعی با محورهای ثانوی می‌باشد. خوشچه‌ها روی دو گل کوتاه به وجود می‌آیند که نوک آن روی گلوم‌های نازا (لمای عقیم) توسعه یافته است و به چند وجهی کنگره‌دار تبدیل می‌شوند. بنابراین نوک فنجانی شکل و متورم مشابه یک زوج گلوم حقیقی است و به آن گلوم حقیقی گفته می‌شود. هر خوشچه دارای محور کوچکی بنام محور سنبله است که روی آن یک گل در محور برگک پانویه که گلوم‌های نازا نام دارد، تشکیل می‌شود. گل‌دهی در برنج از نوک گل آذین

[1] Glumelle
[2] Lemma
[3] Palea
[4] Glume

شروع شده و به سمت پایین ادامه می‌یابد. در موقع ظهور خوشه نیاز ریشه بـه مـواد غـذایی بـه ویـژه ازت، فسفر و پتاس زیاد است.

۱-۳- گرده افشانی و لقاح

برنج گیاهی است خود گشن و بین صفر تا ۳ درصد دگرگشنی دارد. گرده افشانی تقریباً هم‌زمان با باز شدن گل‌ها در شرایط طبیعی روی می‌دهد. دمای مطلوب برای گرده افشانی در حدود ۳۱ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد است. در دمای پـایین‌تـر از ۱۰ تـا ۱۳ درجـه‌سـانتی‌گـراد و همچنـین بـالاتر از ٦۰ درجـه سانتی‌گراد گرده‌افشانی متوقف می‌گردد. خشکی و دمای پایین می‌تواند روی گـرده افـشانی اثـر منفـی داشته باشد. حداقل دما برای انجام عمل لقاح ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. زمان بـاز شـدن گـل‌هـا ۸ صبح الی ۲ بعدازظهر بوده و گل آذین گل ها در بین یک دورهٔ ۷ تا ۱۰ روزه باز مـی‌شـوند و در اکثـر آنها ۲ تا ٤ روز پس از خروج گل آذین از غلاف برگ این کار را انجام می‌دهند.

۱-٤- شرایط مناسب برای کشت برنج

میانگین دمای مورد نیاز برنج هنگام رشد باید بین ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتیگراد باشد. پایین بـودن دمـا در اوایل فصل زراعی یا آبیاری مزرعه با آب سرد سبب می‌شود که زمان رسیدن دانه‌ها به تأخیر افتد. بـالا بودن دما هم موجب کاهش تعداد سنبلچه‌های بارور و وزن دانه‌ها می‌شـود. نـور هـم یکـی از عوامـل مؤثر در رشد گیاه است. شدت نور در اوایل فصل زراعی شاید عامل محدود کننده‌ای برای رشد بـرنج به حساب آید. اما با نزدیک شدن به پایان فصل زراعی. بویژه موقع تشکیل خوشه. رقابت برای جـذب نور بین بوته‌ها افزایش می‌یابد. مناسب‌ترین میزان رطوبت برای گلدهی گیـاه بـرنج. ۷۰ تـا ۸۰ درصـد است. رطوبت کمتر از ٤۰ درصد عامل بازدارنده‌ای برای گلدهی گیاه بـه شـمار مـی‌رود. وزش بـاد و ریزش باران و تگرگ. در زمان گلدهی زیان‌بار است. همچنین بارندگی موقـع برداشـت محـصول هـم عملیات مربوط به خشک شدن محصول را به تأخیر می‌اندازد. برنج. در کل گیاه آب دوستی بـه شـمار می‌رود، ولی آبزی نیست. چون ریشه گیاهان آبزی قادر نیست که تارهای کشنده و ریـشه‌هـای فرعـی

تولید کند. در حالی که ریشه برنج هم تار کشنده و هم ریشه فرعی دارد. آب مورد نیاز بـرنج از سـایر غلات بیشتر است. هشتاد درصد آب مورد نیاز محصول بـرنج تولیـد شـده در جهـان بـویژه در نقـاط استوایی از آب باران تـأمین مـی‌گـردد. ۲۰ درصـد بـاقی مانـده را از آب رودخانـه و آب چـاه تـأمین می‌نمایند. نتایج بدست آمده نشان داده که اگر دمـای آب کمتـر از ۱۹ درجـه سـانتیگراد باشـد، زمـان رسیدن دانه به تأخیر می‌افتد. اگر هم از ۳۰ درجه بیشتر باشد، گسترش ریـشه و میـزان عملکـرد گیـاه برنج به دلیل محدود بودن اکسیژن موجود در آب کم می‌شود و بازدهی گیاه کاهش می‌یابـد. بـرنج در خاک‌های مختلف از فقیر تا غنی که تنها آب مورد نیاز گیاه تأمین باشد به عمل می‌آید. البته مقـدار آب مصرفی در خاک‌های سبک بیش از خاک‌های سنگین است. مناسب‌ترین خاک برای کشت برنج خـاک رسی با لایه غیر قابل نفوذ در عمق ۵۰ تا ۱۵۰ سانتیمتری و همراه با مقدار زیادی مواد آلی است. برنج اصولاً نسبت به شوری خاک و شوری آب مقاوم است. در صورتی که آب کافی برای شستشوی نمک خاک وجود داشته باشد، می‌توان از برنج برای اصلاح خاکهای شور استفاده نمود.

با توجه به مکانیابی لوکوس Rf3 بر روی کروموزوم یک برنج در تحقیقات قبلـی، تحقیـق حاضـر بـا هدف محدود کردن ناحیه ژن Rf3 برنج به کمک نشانگرهای مولکولی با روش های نقشه یابی سـاده و نقشه یابی QTL انجام شد. سوالات تحقیق: الف) نحـوه وراثـت تجدیـد بـاروری در لایـن IR36 چگونه است؟ ب) در لاین IR36 در لوکوس Rf3 چند ژن وجود دارد؟ ج) آیا امکان تحدیـد نقـشه مولکولی این لوکوس وجود دارد؟

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- چندشکلی ژنتیکی در برنج

نقشه‌های ژنتیکی کروموزوم‌های برنج از قبل تهیه شده است. تاکنون چند شکلی مورفولوژیکی معنی‌داری در برنج گزارش شده است که نشانگرهای مناسبی برای مطالعات ژنتیکی برنج می باشد و به عنوان مبنایی برای طراحی اولین نقشه‌های ژنتیکی مورد استفاده واقع شدند (مک‌کوچ و همکاران، ۱۹۸۸). امروزه نقشه کروموزوم‌های برنج به وسیله نشانگرهای مولکولی قابل ارزیابی می‌باشد (تنکسلی و همکاران، ۱۹۹۱). به سبب همگانی بودن نشانگرهای مولکولی ایجاد نقشه‌های مورد توافق[1] در برنج ممکن شد (مک کوچ و همکاران، ۱۹۸۸) که همه نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی را در بر می‌گیرد. این نقشه شامل ۱۳۵ مکان ژنی مطابق با کلون‌های انتخاب شده از کتابخانه ژنومی PstI، و پوشش ۱۳۸۹ سانتی مورگان از ژنوم برنج می‌باشد. تلاش‌های زیادی برای تهیه جمعیت‌های پایه برای نقشه یابی مولکولی بیشتر در برنج انجام شد (گودردونی و همکاران، ۱۹۹۰؛ IRRI، ۱۹۹۱؛ تنکسلی و همکاران، ۱۹۹۱؛ وانگ، ۱۹۹۲). زو و همکاران (۱۹۹٤) ۱۰۰ نشانگر RFLP را به همراه ۸ مکان ژنی ایزوزایم برای یک جمعیت دابل هاپلوئید نقشه‌یابی کردند که بر روی

[1]Consensus maps

۱۲ کروموزوم برنج با میانگین ۸ سانتی مورگان توزیع شده بودند. آخـرین مـدل نقـشه پیوسـته SSR برنج توسط مک کوچ و همکاران (۲۰۰۲) منتشر شد که شـامل ۲۲٤۰ نـشانگر SSR بـود. فلتـوس و همکاران (۲۰۰٤)، ٤۰۸ چندشکلی بالقوه SNP و ۸۹۸ چندشکلی بالقوه INDLS بین دو زیـر گونـه هندی و ژاپنی شناسایی کردند.

۲-۲- نرعقیمی[1]

نرعقیمی به حالتی اطلاق می‌شود که گیاه قادر نیست دانه گرده بارور تولید کند امـا انـدام مـاده فعـال می‌باشد، لذا گیاه قادر نیست با دانه گرده خودی بارور شود و این عمل منجر به دگرگشنی می‌شود. بـا توجه به اینکه برنج یک گیاه خودگرده افشان است تولید بذر هیبرید مستلزم وجـود نرعقیمـی در ایـن گیاه می‌باشد. نرعقیمی در برنج می‌تواند به یکی از اشکال زیر ایجـاد شـده باشـد: نـرعقیمـی ژنتیکـی سیتوپلاسمی، نرعقیمی با حساسیت به اثرات محیطی[2] (حساسیت به دمـا[3] TGMS یـا حـساسیت بـه نور[4] PGMS)، القای نرعقیمی با استفاده از مواد شیمیایی[5] (ویرمانی و همکاران ۲۰۰۳).

۲-۲-۱- نرعقیمی سیتوپلاسمی[6] CMS

اولین گزارش‌ها در مورد نرعقیمی سیتوپلاسمی در گیاهان به وسیله کورنز در سال ۱۹۰٤ ارایـه شـد و در گیاه محبوبه شب[7] مورد مطالعه قرار گرفت (کریوپو، ۱۹۷۳). تاکنون CMS در بـسیاری از گیاهـان زراعی مهم و بیشتر از ۱٦۰ گونه از گیاهان وحشی یافت شده اسـت. CMS در بـرنج اولـین بـار بـه وسیله شینجوی و اومورا (۱۹٦٦) گزارش شد. در برنج تقریباً ۲۰ منبـع CMS شناسـایی شـده اسـت (جدول ۲-۱؛ ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۸). البته در بین سیستم‌هـای CMS مختلـف، توزیـع سیـستم

[1] Male sterility
[2] Environment-sensitive male sterility
[3] Thermogenic male sterile
[4] Photogenic male sterile
[5] Chemically induced male sterility
[6] Cytoplasmic genetic male sterility
[7] Night beauty

WA[1] بیشتر از همه می‌باشد و تقریباً برای تولید ۹۰ درصد از بذرهای هیبرید به کار می‌رود. این سیستم پایدار می‌باشد، همچنین لاین‌های بازگرداننده باروری[2] برای این سیستم به آندازه کافی وجود دارد. برای این سیستم چندین ژن بازگرداننده باروری وجود دارد (راج و ویرمانی، ۱۹۸۷؛ یائوو همکاران، ۱۹۹۷؛ زانگ و هانگ، ۲۰۰۱).

در همه گیاهان عالی لاین‌های حامل سیتوپلاسم عقیم قادر نیستند دانه گرده زنده تولید نمایند. صفت نرعقیمی تحت تاثیر باروری گیاه مادری قرار نمی‌گیرد. توارث نر عقیمی سیتوپلاسمی مطابق با قوانین مندل[3] نمی باشد (لوینگ، ۱۹۹۳). مکانیزم فعالیت فاکتورهای سیتوپلاسمی و فاکتورهای هسته‌ای ظاهراً در گونه‌های مختلف تفاوت دارد. این مورد در سیتوپلاسم عقیم در گیاهان یک گونه نیز متفاوت است.

نرعقیمی به وسیله اثر متقابل فاکتور ژنتیکی S موجود در سیتوپلاسم و ژنهای هسته‌ای کنترل می‌شود (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳). اکنون موقعیت فاکتور نرعقیمی S در DNA میتوکندری مشخص شده است. لاین A به عنوان لاین نرعقیم می باشد که در این لاین فاکتور S در سیتوپلاسم و آلل *rf* به صورت مغلوب[4] در هسته باعث عقیمی می شود. لاین B که به عنوان لاین نگهدارنده[5] شناخته می‌شود شبیه به لاین A می‌باشد، اما به جای سیتوپلاسم عقیم دارای سیتوپلاسم بارور N است که این لاین قابلیت خودگشنی دارد.

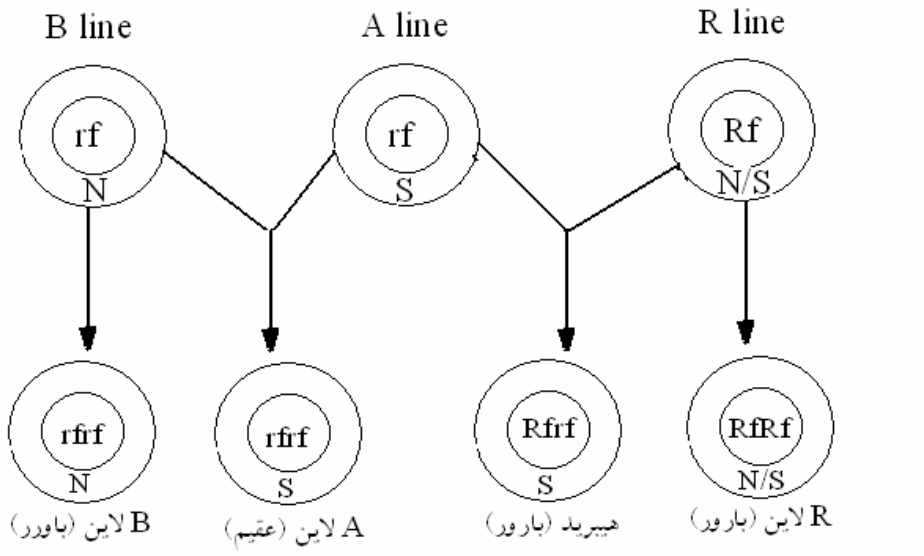
لاین B به عنوان نگهدارنده لاین A تلقی می‌شود، به طوری که وقتی لاین B با لاین A تلاقی می‌یابد، نتاج حاصله همگی A لاین خواهند بود. اما لاین دیگر که در برنامه هیبریداسیون مورد استفاده واقع می‌شود، R لاین یا لاین بازگرداننده باروری لاین A است، که دارای ژن‌های بازگرداننده باروری به صورت غالب[6] می‌باشد. زمانی که لاین R با لاین A تلاقی می‌یابد، بذور F_1 تولید شده دارای قابلیت باروری می باشند. ژن‌های بازگرداننده باروری به صورت هموزیگوس غالب *(RfRf)* یا به

[1] Wild abortive
[2] Fertility restoration
[3] Mendel's rules
[4] Recessives
[5] Maintainer line
[6] Dominant

صورت هتروزیگوس (Rfrf) صرف نظر از عقیم بودن یا طبیعی بودن سیتوپلاسم، باعث باروری هیبریدهای F_1 می‌شود (شکل ۲-۱).

جدول ۲-۱. انواع مختلف نرعقیمی سیتوپلاسمی در برنج (ویرمانی و همکاران ۱۹۹۸).

نوع سیستم نر عقیمی	اسپروفیتیک (S)، گامتوفیتیک (G)
Wild abortive (WA)	S
H	G
Kalinga I	G
Lalruma	G
BT	G
HL	G
Dianu A (DA)	G
R	G
L	G
Kaliya 1	G
ARC	G
Gambiaka (Gam)	S
ID	G
UP	G
P	G
TN I	G
O.rufipogon (CW)	G
O. glumaepatula	G
O. perennis	G
O. nivara	G



شکل ۲-۱. نحوه استفاده از نرعقیمی ژنتیکی- سیتوپلاسمی. N سیتوپلاسم نرمال، S سیتوپلاسم عقیم (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳).

۲-۲-۲- نرعقیمی متاثر از حساسیت به عوامل محیطی

این نوع نر عقیمی به وسیله بیان ژن‌های هسته‌ای که تحت تاثیر فاکتورهای محیطی نظیر دما، طول روز یا هر دو قرار می‌گیرد کنترل می‌شود. این نوع از نرعقیمی اولین بار در فلفل و متعاقباً در گیاهان مختلف گزارش شد (مارتین و کارفورد،۱۹۵۱).

البته این سیستم فقط در برنج به صورت تجاری مورد استفاده قرار گرفته که این عمل مدیون کار سخت دانشمندان چینی بوده است. با شناسایی سیستم نرعقیمی حساس به دمای محیط و نرعقیمی حساس به طول روز (PGMS/TGMS) در لاین برنج نانگکن ۵۸S[1] (از زیر گونه ژاپونیکا[1]) در

[1] Nongken 58 S