بسم الله الرحمن الرحيم

٤٦٣٣٨

دانشکده علوم کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات
(گرایش اصلاح نباتات)

مکان یابی ژن تجدیدکننده باروری در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA با استفاده از نشانگرهای ملکولی ریزماهواره در برنج هیبرید

از

سعید یاراحمدی

استادان راهنما

دکتر محمد مهدی سوهانی و دکتر ابوبکر جوهرعلی

استادان مشاور

مهندس علی اکبر عبادی و دکتر بابک ربیعی

فروردین ۱۳۸۷

۱۳۸۷/۵/۲۸

دانشگاه گیلان

تقدیم به

پدر بزرگوارم و روان پاک مادرم و خانواده مهربانم که شکیبایی و پارسایی و گذشت
به من آموختند و روشنایی مسیر زندگی‌ام هستند

و

همسر عزیزم که اسوه مهربانی و فداکاری برای من می‌باشد.

به نام خدا

اکنون که توانسته‌ام گامی در مسیر دانش بردارم خداوند را به خاطر انجام این مهم و همه نعمت های بیکرا نش سپاسگزارم. انجام این تحقیق میسر نبود مگر به یاری کسانی که بر خود فرض می‌دانم از زحمات آنان سپاسگزاری کنم. بهترین درودهای خود را تقدیم روح مادر عزیزم می‌کنم که به من راه زندگی را آموخت. از خانواده عزیزم به ویژه پدرم که همواره مشوق من بودند، کمال تشکر را دارم. از همسر مهربان که همواره همراه من بودند، سپاسگذارم. از استادان عزیزم جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی که قدم به قدم مرا یاری کرده و برای من استاد اخلاق بودند، سپاسگزارم. از آقای دکتر حبیب اله سمیع زاده و آقای دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی به خاطر بازخوانی پایان نامه و راهنمایی‌های ارزنده‌شان قدردانی می‌نمایم. همچنین از زحمات سرکار خانم دکتر حسن پور، نماینده محترم تحصیلات تکمیلی تشکر می‌کنم. همه اساتید گروه زراعت و اصلاح نباتات که برای همیشه افتخار شاگردی آنها را خواهم داشت بی نهایت سپاسگزارم. همچنین از آقای دکتر بابک ربیعی وآقای مهندس علی اکبر عبادی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان تشکر می‌کنم. از سرکار خانم نوریان و آقای مهندس ترابی کارشناسان محترم آزمایشگاه موسسه تحقیقات برنج، به خاطر همکاری صمیمانه قدردانی می‌کنم. همچنین از زحمات تک تک دوستان و همکلاسی‌های عزیزم و آقایان، صدقی، سلطانی، بادبرین و مکاری که در این مدت افتخار آشنایی با آنها را داشتم، سپاسگزارم.

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... خ
چکیده انگلیسی ..... د

مقدمه ۲

فصل اول: کلیات و مرور منابع

۱-۱- تاریخچه برنج ۶
۱-۲- اهمیت و ارزش غذایی برنج ۶
۱-۳- مشخصات گیاه شناسی برنج ۶
۱-۴- مشخصات ژنتیکی برنج ۷
۱-۵- اهمیت برنج در تحقیقات مولکولی ۷
۱-۶- نرعقیمی ۸
۱-۶-۱- نرعقیمی سیتوپلاسمی ژنتیکی ۸
۱-۶-۲- نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط ۸
۱-۶-۳- نرعقیمی ناشی از عوامل شیمیایی ۸
۱-۷- انواع دانه گرده ۹
۱-۷-۱- دانهٔ گرده عقیم معمولی ۹
۱-۷-۲- دانهٔ گرده عقیم و کروی ۹
۱-۷-۳- دانهٔ گرده عقیم و رنگ‌پذیر ۱۰
۱-۷-۴- دانهٔ گرده بارور ۱۰
۱-۸- نشانگرها ۱۱
۱-۸-۱- نشانگرهای مورفولوژیک ۱۱
۱-۸-۲- نشانگرهای پروتئینی ۱۲
۱-۸-۳- نشانگرهای مولکولی ۱۲
۱-۸-۳-۱- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA ۱۳
۱-۸-۳-۱-۱- تعداد متفاوت ردیفهای تکراری (VNTR) ۱۳
۱-۸-۳-۱-۲- چند شکلی طولی قطعات حاصل از هضم (RFLP) ۱۴
۱-۸-۳-۱-۳- DNA چند شکل تکثیر شدهٔ تصادفی (RAPD) ۱۵
۱-۸-۳-۱-۴- تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) ۱۶
۱-۸-۳-۱-۵- DNA تکرار شونده ۱۷
۱-۸-۳-۱-۵-۱- ماهواره‌ها ۱۸

۱-۸-۳-۱-۵-۲-ماهوارک‌ها ۱۸
۱-۸-۳-۱-۵-۳- ریزماهواره‌ها ۱۸
۱-۹- تهیه نقشه‌های پیوستگی ۲۰
۱-۹-۱- آنالیز دست جمعی لاین‌ها (BLA) ۲۰
۱-۹-۲- تجزیه دست جمعی افراد درحال تفرق (BSA) ۲۱
۱-۹-۳- روش تعیین ژنوتیپ انتخابی ۲۴
۱-۱۰- جمعیتهای نقشه یابی ۲۵
۱-۱۰-۱- جمعیتهای موقت ۲۵
۱-۱۰-۱-۱- جمعیت در حال تفرق F_2/F_3 ..... ۲۶
۱-۱۰-۱-۲- جمعیت تلاقی برگشتی (BC) ۲۷
۱-۱۰-۲- جمعیتهای دائمی ۲۷
۱-۱۰-۲-۱- جمعیت دابل هاپلوئید (DH) ۲۷
۱-۱۰-۲-۲- جمعیت اینبرد لاینهای نوترکیب (RIL) ۲۸
۱-۱۰-۲-۳- لاینهای ایزوژنیک نزدیک (RIL) ۲۹
۱-۱۱- عوامل موثر بر صحت تهیه نقشه‌های ژنتیکی ۳۰
۱-۱۲- مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه مکان یابی ژنهای تجدیدکننده باروری ۳۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت والدین وجمعیت F_2 ..... ۳۵
۲-۲- خصوصیات لاین نرعقیم ۳۵
۲-۳- خصوصیات لاین نربارور ۳۶
۲-۴- عملیات کاشت و نگهداری لاین‌ها و جمعیت F_2 ..... ۳۷
۲-۵- شناسایی بوته‌های نرعقیم و نربارور و تهیه نمونهٔ گلچه از آنها ۳۷
۲-۶- تعیین درصد باروری دانهٔ گرده ۳۸
۲-۷- تعیین درصد باروری خوشه ۳۹
۲-۸- تهیهٔ نمونه‌های برگی ۳۹
۲-۹- شناسایی افراد هموزیگوت عقیم و بارور ۳۹
۲-۱۰- استخراج DNA ۴۰
۲-۱۱- روش استخراج DNA ۴۱
۲-۱۲- بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ۴۳
۲-۱۳- ژل آگارز ۴۳
۲-۱۴- تهیه ژل آگارز ۴۴
۲-۱۵- بارگیری DNA ژنومی و انجام الکتروفورز به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ۴۴

۲-۱۶- آماده سازی آغازگرهای ریز ماهواره ۴۵
۲-۱۷- انجام واکنش PCR ۴۵
۲-۱۸- ژل پلی اکریل آمید ۴۷
۲-۱۹- روش تهیه ۱۰۰ میلی لیتر اکریل آمید ۴۰٪ ۴۸
۲-۲۰- الکتروفورز عمودی ۴۸
۲-۲۰-۱- تیمارکردن شیشه‌ها ۴۸
۲-۲۰-۲- تهیه و تزریق ژل پلی اکریل آمید ۴۹
۲-۲۱- واسرشته سازی محصولات PCR ۵۰
۲-۲۲- بار گذاری نمونه‌ها و انجام الکتروفورز ۵۰
۲-۲۳- رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره ۵۱
۲-۲۴- روش تهیه محلول‌های مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۵۱
۲-۲۵- روش رنگ آمیزی ۵۲
۲-۲۶- چگونگی تجزیه و تحلیل داده‌ها ۵۳

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- مشخصات فنوتیپی والدین و جمعیت مورد مطالعه ۵۷
۳-۲- مطالعه و جستجوی چندشکلی بین والدین ۵۷
۳-۳- شناسایی نشانگرهای پیوسته با استفاده از افراد کاملا عقیم ۵۹
۳-۴- شناسایی نشانگرهای پیوسته با استفاده از افراد کاملا بارور ۶۳
۳-۵- آزمون نسبتهای دو جامعه به منظور تایید نتایج کای اسکور ۶۵
۳-۶- برآورد فاصله ژنتیکی نشانگر تا ژن Rf با افراد موجود در دو دنباله توزیع فنوتیپی ۶۵
نتیجه گیری کلی ۷۱
پیشنهادها ۷۱

منابع مورد استفاده ۷۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- درجه حرارت و زمان بهینه شده در مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۶
جدول۲-۲- مقادیر بهینه شده مواد در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۷
جدول ۱-۳- مشخصات فنوتیپی افراد عقیم مورد مطالعه ۵۸
جدول۳-۱- آزمون کای اسکور به منظور مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگرهای SSR با فراوانی‌های مورد انتظار ۱: ۲: ۱ در کلاس مغلوب ۶۰
جدول ۳-۲- فراوانی نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین ۹ نشانگر ریزماهواره چند شکل و ژن‌های Rf بر اساس تابع کوسامبی در دنباله فنوتیپی نرعقیم ۶۳
جدول۳-۳- آزمون کای اسکور به منظور مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگرهای SSR با فراوانی‌های مورد انتظار ۱: ۲: ۱ در کلاس فنوتیپی نربارور ۶۴
جدول۳-۴- آزمون نسبت‌های دو جامعه ۶۵
جدول۳-۵- فراوانی‌های نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین نشانگرهای ریزماهواره و ژن‌های Rf بر اساس تابع کوسامبی در ۷۰ بوته موجود در دو دنباله توزیع فنوتیپی جمعیت F_2 ..... ۶۸

فهرست شکل‌ها

عنوان.....صفحه

شکل ۱ -۱- دانهٔ گرده عقیم معمولی..... ۹

شکل ۱-۲- دانهٔ گرده عقیم و کروی..... ۱۰

شکل ۱-۳- دانهٔ گرده عقیم و رنگ پذیر..... ۱۰

شکل ۱-۴- دانهٔ گرده بارور..... ۱۱

شکل ۱-۵- تهیهٔ لاین‌های اینبرد نوترکیب..... ۲۹

شکل ۲-۱- بساک والد نرعقیم..... ۳۶

شکل ۲-۲- بساک والد نربارور..... ۳۷

شکل ۲-۳- نمونه‌ای از DNA ژنومی استخراج شده به روش CTAB..... ۴۳

شکل ۳-۱- الگوی نوار بندی بین دو والد IR42686R و IR58025A با به کار گیری نشانگرهای مختلف..... ۵۸

شکل ۳-۲- الکتروفورز محصولات PCR دنباله فنوتیپی نرعقیم با آغازگر RM6344..... ۶۲

شکل ۳-۳- الکتروفورز محصولات PCR دنباله عقیم و بارور با آغازگر RM519..... ۶۸

چکیده

مکان یابی ژن تجدید کننده باروری در سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA با استفاده از نشانگرهای ملکولی ریزماهواره در برنج هیبرید

سعید یاراحمدی

واریته‌های هیبرید حاصل از سیستم نرعقیمی WA حدود 90٪ تولید برنج هیبرید را در بر می‌گیرند. اکثر مطالعات نشان داده است که صفت تجدید باروری در این سیستم توسط دو ژن مستقل کنترل می‌شود، اما فقدان فهم صحیح از توارث ژنتیکی ژن یا ژن‌های اعاده کننده باروری برای سیتوپلاسم نوع WA، هنوز آنرا به صورت مسئله‌ای حل نشده باقی گذارده است. برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های تجدید کننده باروری، جمعیت F_2 حاصل از تلاقی IR58025A و IR42686R در مزرعه تحقیقاتی به عنوان گیاهان مستقل در طول فصل رشد پرورش داده شد. 4 ژن تجدید کننده باروری بر روی کروموزوم‌های 1، 7، 10 و 12 با کمک نشانگرهای ریزماهواره‌ای شناسایی شدند. از 53 نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه، 15 نشانگر چند شکلی قابل قبولی بین والد نر عقیم و نربارور نشان دادند. نشانگرهای ریزماهواره RM443 و RM315 در مجاورت ژن Rf_3 و به ترتیب در فاصله 4/6 و 20/7 سانتی مورگان از ژن فوق روی کروموزوم 1 قرار داشتند. نشانگر RM6344 در فاصله 4/6 سانتی مورگان نسبت به ژن Rf_1 روی کروموزوم 7 قرار داشت. چهار نشانگر RM258، RM591، RM271 و RM6737 در مجاورت ژن Rf_4 و به ترتیب در فاصله‌های 7/4، 22/6، 6 و 2/9 سانتی مورگان از ژن فوق روی کروموزوم 10 قرار داشتند. نشانگرهای RM519 و RM7003 که بر روی کروموزوم 12 قرار دارند به ترتیب 7/8 و 19/1 سانتی مورگان با ژن Rf دیگری که Rf_7 نامیده شد، مکان یابی شدند. جستجوی ژن‌های تجدید کننده باروری بسیار مهم است زیرا ارزیابی فنوتیپی این صفت، بسیار وقت گیر است و نیاز به تعیین باروری سنبله در نتاج تست کراس می‌باشد و برای چنین صفاتی در تلاقی برگشتی انتخاب براساس یک آلل نشانگر از والد دهنده که در نزدیکی ژن مورد نظر قرار دارد می‌تواند بازده و صحت انتخاب را افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: برنج هیبرید، نشانگرهای ریزماهواره، ژن‌های تجدید کننده باروری

Abstract

Mapping of restorer fertility gene in WA type cytoplasmic male sterility in hybrid rice

Saeid Yarahmadi

Hybrid rice varities from wild abortive (WA) type CMS accounted for approximately 90% of hybrid rice. Majority of the studies, indicated that the fertility restoration in this system is controlled by two independent genes, however lack of proper understanding of the genetic analysis of restorer fertility gene/s for WA cytoplasm still remains unresolved, to tag the restorer gene/s, a F_2 population from a cross between IR42686R and IR58025A was raised in the field as single plant plants during the cropping season. 4 Rf genes identified on chromosomes 1, 7, 10 and 12 with SSR markers. Out of 53 pairs of microsatellite markers that were used in this study, 15 markers showed polymorphism between IR42686R and IR58025A. microsatellite markers RM443 and RM315 were linked with the Rf_3 gene on chromosome1 at genetic distance of 3.7 and 21.2 cM respectively. Four SSR markers, RM258, RM591, RM271 and RM6737 were linked with Rf_4 gene at distance of 7.4, 22.6, 6 and 2.9 cM respectively. RM519 and RM7003 located on chromosome 12 and had distance of 7.8 and 19.1 cM with another Rf locus that named Rf_7. Searching for restorer genes is a good approach when phenotyping is very time-consuming and requires the determination of spikelet sterility in testcross progeny. for such as traits in backcross, selection for a marker allel from the donor parent at a locus near the target gene can increase the efficiency and accuracy of selection.

Key words: Hybrid rice, Microsatellite markers, Rf genes.

مقدمه

برنج یکی از مهمترین منابع غذایی انسان و دومین غذای اصلی اکثریت مردم جهان می‌باشد. سهم بزرگ برنج در سبد غذایی خانوار ایرانی و ارزش بالای تغذیه‌ای این ماده غذایی در تامین مواد مغذی مورد نیاز جامعه، مبین اهمیت این محصول است [اداره کل آمار اطلاعات کشاورزی وزارت کشاورزی، ۱۳۸۴]. سطح زیر کشت برنج در جهان در حدود ۱۵۱ میلیون هکتار برآورد شده است که ۱۰ درصد از کل اراضی کره زمین را تشکیل می‌دهد. مقدار کل تولید جهانی برنج در حدود ۵۳۰-۵۲۰ میلیون تن بوده و ۹۵ درصد از برنج دنیا در کشورهای در حال توسعه بخصوص در آسیا کشت می‌شود [سازمان خوار و بار جهانی، ۲۰۰۷]. سطح زیر کشت برنج در کشورمان ۶۳۰/۰۰۰ الی ۶۴۰/۰۰۰ هکتار برآوردشده است که حدود ۰/۴٪ از کل اراضی زیر کشت برنج جهان را داراست [سازمان خوار و بار جهانی، ۲۰۰۷]. در ایران سالیانه بیش از ۳ میلیون تن شلتوک تولید می‌شود که حاصل فرآوری آن حدود ۲ میلیون تن برنج سفید است و این در حالی است که مصرف سالیانه برنج کشورمان ۲/۴۰۰/۰۰۰ الی ۲/۵۰۰/۰۰۰ تن می‌باشد و نیاز به وارد کردن مقادیر قابل توجهی از خارج می‌باشد. پیش بینی‌ها نشان می‌دهد که نیاز به برنج در سال ۲۰۲۵ میلادی در حدود ۷۵۸ میلیون تن یعنی ۷۰٪ بیش از مصرف کنونی آن در جهان خواهد بود. در آسیا که منبع غذایی عمده مردم آن برنج بوده و رشد جمعیت متاسفانه در آن سریعتر می‌باشد، انتظار می‌رود که ظرف ۴۰ سال آینده نیاز به برنج دو برابر شود [نعمت زاده، ۱۳۸۲]. با توجه به اینکه افزایش تولید برنج روند کندتری از مصرف آن در جهان دارا می‌باشد در آینده با کاهش صادرات جهانی روبرو خواهیم بود و توجه به افزایش تولید داخلی به منظور خود کفایی امری بسیار مهم تلقی می‌شود.

استفاده از فناوری اصلاح و تولید بذر هیبرید یکی از راه‌های مهم رسیدن به خودکفایی در تولید برنج است [نعمت زاده، ۱۳۸۲]. موفقیت تولید برنج هیبرید در طی دو دهه اخیر در چین ثابت کرده است که پتانسیل تولید برنج به وسیله استفاده تجاری از هتروزیس در این گیاه خودگشن می‌تواند افزایش یابد [ویرمانی[1]، ۱۹۹۴]. واریته‌های برنج هیبرید به مقدار ۱/۵-۱ تن در هکتار بیشتر از ارقام اصلاح شده نیمه پاکوتاه در چین و سایر کشورها محصول تولید می‌کنند [لین[2] و یوآن[3]، ۱۹۸۰]. کاربرد این فناوری در کشورهایی همچون ویتنام، هند، فیلیپین، بنگلادش، میانمار و آمریکا موجب افزایش عملکرد دانه و نیز افزایش درآمد کشاورزان آن مناطق شده است. شایان

1- Virmani
1- Lin
2- Yuan

ذکر است که این فناوری در کشور چین فرصت‌های شغلی فراوانی ایجاد نموده است. براساس آمارهای موجود، تقاضا برای مصرف برنج در کشور به علت افزایش جمعیت، رو به افزایش می‌باشد، به نحوی که هر ساله برای تامین نیازهای داخلی مقادیر قابل توجهی برنج از خارج وارد می‌شود. تامین کمبود برنج از طریق کاشت و برداشت ارقام بومی قابل حصول نمی‌باشد، زیرا ارقام بومی عمدتا ارقامی پا بلند، با کود پذیری کم و حساس به بیماری‌ها و خوابیدگی می‌باشند و معمولا عملکردی پایین دارند. ارقام برنج هیبرید می‌توانند جایگزین مناسبی برای حصول عملکرد بیشتر و گامی موثر جهت کاهش واردات برنج باشند [درستی، ۱۳۸۰]. نرعقیمی سیتوپلاسمی و سیستم اعاده کننده باروری برای گسترش و تجاری نمودن این فناوری بسیار کارآمد می‌باشند.

گیاهان نرعقیم به دلیل تغییر یا آرایش مجدد ژنوم میتوکندریایی، قادر به تولید دانه گرده فعال نیستند. اما نرعقیمی سیتوپلاسمی می‌تواند به وسیلهٔ ژن‌های هسته‌ای برگردانده شود. بنابراین سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی به طور وسیعی برای تولید بذر هیبرید استفاده می‌شوند[یوآن، ۱۹۹۲]. نرعقیمی سیتوپلاسمی پدیده‌ای معمول در گیاهان می‌باشد که به طور وسیعی به منظور ممانعت از خودگرده افشانی جهت تولید بذر هیبرید در محصولات مختلف به کار گرفته می‌شود. علاوه بر بهره برداری تجاری، سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی فرصت نادری را برای امتحان تنظیم ژنوم میتوکندریایی به وسیله ژن‌های هسته‌ای در موجودات پرسلولی فراهم می‌کند. در برنج، سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی که متشکل از لاین‌های برگرداننده باروری (R)، لاین‌های نرعقیم (A) و نگهدارنده‌ها (B) می‌باشد، برای تولید بذر هیبرید برنج از سال ۱۹۷۵ در چین به کار گرفته شده است [ویرمانی و همکاران، ۱۹۸۶]. در حال حاضر هیبرید ایندیکا ۵۰ ٪ مناطق تحت کشت برنج چین را، بیشتر براساس سیستم‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی Wild abortive، Gambiaka و Dissi D52 به خود اختصاص داده است [زانگ[3] و همکاران، ۱۹۹۷]. موفقیت هیبرید ایندیکا بیشتر به واسطه وجود تعدادی از واریته‌های ایندیکا می‌باشد که ژن‌های تجدید کننده باروری (Rf) را دارا می‌باشند. در مقابل هیبرید جاپونیکا تنها در ۲٪ از مناطق برنج خیز چین کشت می‌شود [لی[1] و همکاران، ۱۹۸۲] زیرا اکثر لاین‌های جاپونیکا فاقد ژن‌های تجدید کننده باروری می‌باشند [ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳]. واریته‌های برنج هیبرید تولید شده براساس نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA تقریباً ۹۰٪ برنج هیبرید تولیدی چین را تشکیل می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی بر روی ژن‌های تجدید کنندهٔ نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA انجام شده است [یوآن، ۱۹۹۲].

اصلاح‌گران نبات به طور معمول به منظور شناسایی لاین‌های تجدیدکننده باروری از روش تست کراس لاین‌های امید بخش با لاین نرعقیم موجود و ارزیابی نتاج F_1 برای باروری دانه گرده و گلچه استفاده می‌کنند. لاین‌های پدری نتاجی که بیش از ۸۰٪ باروری دانه

3- Zhang
1- Li

گرده و گلچه را نشان دهند به عنوان لاین‌های تجدیدکننده باروری معرفی می‌شوند اما با استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگرها می‌توان در وقت و همچنین در هزینه‌های مربوط به تست کراس و ارزیابی آنها صرفه‌جویی کرد [ناس[1] و همکاران، ۲۰۰۳؛ ستاری[2] و همکاران، ۲۰۰۷]. به منظور انتقال ژن Rf به ارقامی با ترکیب پذیری بالا از روش اصلاحی بک کراس استفاده می‌گردد. اگر در این روش بتوان از انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد، هزینهٔ کار خیلی کمتر شده و سریعتر به R لاین مطلوب دست خواهیم یافت. چون با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن Rf، نیازی به تست نتاج نسل‌های مختلف تلاقی برگشتی نیست، به عبارتی با استفاده از این نشانگرها می‌توان بوته‌های حاوی ژن Rf را در مراحل اولیهٔ رشد شناسایی کرد و بقیه را حذف نمود [احمدی خواه[3] و همکاران، ۲۰۰۷]. قدم اول برای استفاده از این روش نشانمند کردن ژن Rf است که در این تحقیق در پی انجام این امر مهم می‌باشیم.

2- Nas
3- Sattari
4- Ahmadikhah

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- تاریخچه برنج

برنج از قدیمی‌ترین گیاهان است که در دنیا کشت می‌شود. مبدا پیدایش برنج، آسیای جنوب شرقی است. این گیاه در حدود ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در چین کشت می‌شده و پس از آنکه زراعت آن گسترش یافت، به تدریج ارقامی به وجود آمدند که در دلتای رودخانه‌ها و دره‌ها به صورت آبی کشت گردیدند [خدا بنده، ۱۳۷۴]. این گیاه از آسیای جنوب شرقی به سایر نواحی مستعد آسیا مانند چین و ژاپن و بعد به آسیای صغیر، افریقا و اروپا راه یافت. سابقهٔ کشت برنج در ایران به ۲۰۰۰ سال پیش می‌رسد [یزدی صمدی و عبد میشانی، ۱۳۷۳].

۱-۲- اهمیت و ارزش غذایی برنج

برنج پس از گندم مهمترین گیاه زراعی دنیا می‌باشد. برنج قوت غالب بیش از یک سوم جمعیت دنیا را تشکیل می‌دهد، این ماده به منزلهٔ نیمی از خوراک یک میلیارد و هشتصد میلیون نفر و نیز از ربع تا نیمی از غذای چهارصد میلیون نفر دیگر است. بیش از ۹۰٪ این ماده غذایی در قاره آسیا تولید می‌شود. در ایران برنج جایگاه ویژه‌ای دارد به طوری که قسمت اعظم غذای مردم ایران را به خود اختصاص می‌دهد. کشت انواع مختلف شلتوک در کل کشور حدود ۵۵۰ هزار هکتار با تولید ۲۱۱۵۰۰۰ تن برآورد شده است. دانهٔ برنج دارای ۷/۷٪ پروتئین، ۷۵/۲٪ مواد غیر ازته، ۲/۲٪ سلولز، ۰/۵٪ خاکستر می‌باشد. قابلیت هضم آن به مراتب بیش از سیب زمینی، نان چاودار و گندم، شیر و سایر محصولات غذایی است. از نظر ارزش غذایی و میزان کالری تولیدی، برنج بر اکثر مواد غذایی مورد استفاده انسان برتری دارد [نورمحمدی و همکاران، ۱۳۸۳].

۱-۳- مشخصات گیاه شناسی برنج

برنج گیاهی یکساله و علفی از رده تک لپه‌ایها، راستهٔ *Clumifflorae*، تیرهٔ *Graminae*، قبیلهٔ *Oryzae* و جنس *Oryza* می‌باشد. برنج گیاهی مخصوص مناطق پرآب و گرم و مرطوب می‌باشد. جنس *Oryza* دارای حدود ۲۵ گونهٔ مختلف است. کلیهٔ انواع زراعی برنج به گونهٔ *sativa* از جنس *Oryza* تعلق دارند و در مناطق مختلف دنیا کشت آن رواج دارد [کریمی، ۱۳۷۵]. سنبله‌ها در برنج به صورت انفرادی و با فاصلهٔ کم روی پانیکول، که در امتداد بالاترین گره ساقه است، قرار گرفته‌اند. در هر پانیکول تعداد ۷۵ تا ۱۵۰ سنبلچه وجود دارد و هر سنبلچه شامل یک عدد گلچه است. هر گلچه دارای دوگلوم کوتاه می‌باشد و در هر گلچه ۶

پرچم، یک مادگی با دو کلالهٔ پرمانند و دو لودیکول وجود دارد [نورمحمدی وهمکاران، ۱۳۸۳؛ راشد محصل و همکاران، ۱۳۷۶].برنج دارای سه زیر گونه به نام‌های هندی (ایندیکا)، ژاپنی (ژاپونیکا) و جاوه‌ای (جاوانیکا) می‌باشد که هر یک دارای ویژگی‌های مورفولوژیک خاصی هستند [نورمحمدی و همکاران، ۱۳۸۳].

۱-٤- مشخصات ژنتیکی برنج

جنس *Oryza* دارای بیست گونه با تعداد کروموزوم پایهٔ ۱۲ می‌باشد. این جنس شامل گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید با شش گروه ژنومی A، B، C، D، E و F می‌باشد. کروموزوم‌های گونهٔ *O.glaberrima* به خوبی با *O.sativa* جفت نشده و لذا به آن فرمول ژنومی AgAg داده‌اند. دو گونهٔ *O.nivara* و *O.rufipogon* که وحشی بوده و دارای ژنوم AA می‌باشند و به طور وسیعی در جنوب شرقی آسیا پراکنده شده و به راحتی با یکدیگر و با برنج زراعی تلاقی پذیر است [ارزانی، ۱۳۷۸].

۱-۵- اهمیت برنج در تحقیقات مولکولی

برنج به دلیل کوچکی ژنوم ($۰/۴۵\times۱۰^{۹}$)، سطح پلوئیدی پایین آن (دیپلوئید است) و آسانی دستکاری آن در کشت بافت در صف مقدم مطالعات ژنومیکس گیاهی قرار گرفته است. علاوه بر دلایل ذکر شده، دلایل دیگری نیز وجود دارد که برنج را به مادهٔ آزمایشی خوبی بخصوص برای کاربرد نشانگرهای مولکولی تبدیل کرده است.

- برنج دومین غلهٔ مهم دنیا می‌باشد و غذای بیش از ۵۰٪ مردم جهان را تشکیل می‌دهد.
- به علت قابلیت رشد در شرایط متفاوت امکان بررسی و مطالعهٔ آن در محیط‌های مختلف وجود دارد.
- مجموعه ژرم پلاسم برنج بیش از ۱۲۰۰۰۰ رقم را شامل می‌شود [احمدی خواه و همکاران، ۲۰۰۷].

۱-٦- نرعقیمی

پدیدهٔ نرعقیمی به صورت ناتوانی گیاه برای تولید دانهٔ گردهٔ فعال تعریف می‌شود. این پدیده در بیش از ۱۵۰ گونهٔ گیاهی مشاهده شده است [هوانگ[1] و همکاران، ۲۰۰۳]. برای توسعهٔ هیبریدهای برنج از سیستم‌های نرعقیمی ژنتیکی و غیر ژنتیکی می‌توان استفاده کرد.

1- Huang

۱-۶-۱- نرعقیمی سیتوپلاسمی ژنتیکی

این نوع نرعقیمی در نتیجهٔ اثر متقابل بین فاکتور ژنتیکی موجود در سیتوپلاسم و ژن‌های هسته‌ای ایجاد می‌شود. فاکتور ژنتیکی موجود در سیتوپلاسم که در پدیدهٔ نرعقیمی نقش ایفا می‌کند در DNA میتوکندری قرار دارد. این نوع نرعقیمی می‌تواند به وسیلهٔ ژن‌های هسته‌ای برگردانده شود. از این نوع نرعقیمی در سیستم سه لاین تولید بذر هیبرید برنج به طور وسیعی استفاده می‌شود [ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷]. سه نوع نرعقیمی سیتوپلاسمی ژنتیکی در برنج گزارش شده‌اند که عبارتند از WA، BT و HL. عقیمی WA از نوع اسپورفیتیک می‌باشد و به طور وسیعی برای تولید بذر هیبرید برنج در زیر گونه‌های هندی به کار می‌رود. عقیمی HL و BT از نوع گامتوفیتیک می‌باشند و باروری دانهٔ گرده توسط ژنوتیپ خود دانهٔ گرده تعیین می‌شود اما در عقیمی نوع اسپورفیتی باروری دانهٔ گرده توسط ژنوتیپ فرد تعیین می‌شود [هوانگ و همکاران، ۲۰۰۳].

۱-۶-۲- نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط

این سیستم نرعقیمی به وسیلهٔ ژن‌های هسته‌ای که بیان آنها توسط فاکتورهای محیطی همچون دما، طول روز و یا هر دوتحت تاثیر قرار می‌گیرد، کنترل می‌شود. از این نوع نرعقیمی در سیستم دو لاین تولید بذر هیبرید برنج استفاده می‌شود [ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷].

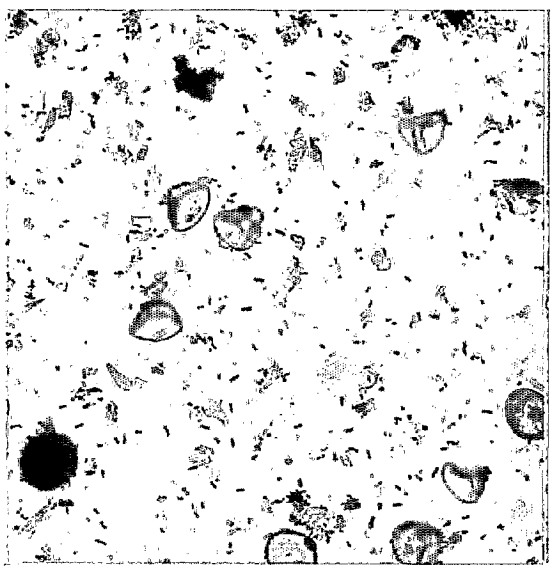
۱-۶-۳- نرعقیمی ناشی از عوامل شیمیایی

این نوع نرعقیمی روشی غیر ژنتیکی به منظور تولید لاین‌های نرعقیم می‌باشد. برخی از مواد شیمیایی مانع تشکیل گامت‌های زندهٔ بارور می‌شوند. این مواد شیمیایی را گامت کش گویند. این روش در اصل برای گیاهانی که دارای گل‌های دوجنسه می‌باشند و تولید لاین‌های نرعقیم ژنتیکی یا سیتوپلاسمی ژنتیکی در آنها دشوار است، به کار می‌رود. از اوایل دههٔ ۱۹۷۰ تلاش‌هایی به منظور شناسایی و استفاده از عوامل شیمیایی در تولید بذر هیبرید برنج انجام گرفته است و مواد شیمیایی گوناگونی تاکنون بدین منظور به کار گرفته شده‌اند. چین شاید تنها کشوری باشد که گامت کش‌ها را در سطح تجاری به منظور تولید بذر هیبرید برنج استفاده کرده است. اما استفاده از این گونه مواد به دلیل زیان‌هایی که ممکن است برای سلامتی انسان داشته باشند و همچنین به دلیل وجود لاین‌های CMS و EGMS مورد توجه قرار نگرفته است [ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۷].

۱-۷- انواع دانه گرده

دانه‌های گرده به وسیله رنگ آمیزی با محلول رنگ آمیزی I_2-KI به انواع زیر تقسیم می‌شوند.

۱-۷-۱- دانهٔ گرده عقیم معمولی: این نوع دانه‌های گرده، دارای شکل‌های نامنظم و بعضا چندوجهی می‌باشند و با محلول رنگ آمیزی I_2-KI رنگ‌پذیر نیستند (شکل ۱-۱). این نوع عقیمی اغلب در مرحله تک هسته‌ای رخ می‌دهد.



۱-۱- دانهٔ گرده عقیم معمولی

۱-۷-۲- دانهٔ گرده عقیم و کروی: این نوع دانه‌های گرده، کروی بوده ولی رنگ‌پذیر نیستند (شکل ۱-۲). این نوع عقیمی در مرحله دوهسته‌ای رخ می‌دهد. بنابراین به این نوع عقیمی، عقیمی نوع دوهسته‌ای نیز گفته می‌شود.