دانشکده علوم زراعی

پایان نامه دوره دکتری در رشته اصلاح نباتات گرایش بیوتکنولوژی گیاهی

موضوع:

تجزیه ژنتیکی و مکان یابی مولکولی ژن (های) برگرداننده باروری برای نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA در برنج

استاد راهنما:

دکتر: نادعلی بابائیان جلودار

نام دانشجو:

نادعلی باقری

بهمن ماه ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زراعی

پایان نامه دوره دکتری در رشته اصلاح نباتات گرایش بیوتکنولوژی گیاهی

موضوع:

تجزیه ژنتیکی و مکان یابی مولکولی ژن (های) برگرداننده باروری برای نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA در برنج

استاد راهنما:

دکتر: نادعلی بابائیان جلودار

اساتید داور:
دکتر: قربانعلی نعمت زاده
دکتر: سید کمال کاظمی تبار
دکتر: حبیب الله سمیع زاده
دکتر: علی دلجو

نام دانشجو:

نادعلی باقری

بهمن ماه ۱۳۸۸

سپاسگزاری

رسول خدا فرمودند: « من علمنی حرفا فقد سیرنی عبدا »

خداوندا تو را سپاس که جامعهٔ بشری را به زیور علم و دانش آراستی و انسان و انسانیت را فرهنگ و تعالی بخشیدی.

اکنون که در پرتو عنایات الهی، رهنودهای اساتید فرزانه و مساعدت دوستان، پژوهش حاضر را به انجام رسانیده‌ام، وظیفهٔ خود میدانم از تمام عزیزانی که در این راستا یاریم داده‌اند، سپاسگزاری نمایم. چونکه: من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق.

بدینوسیله از آقایان دکتر نادعلی بابائیان جلودار و مهندس اسماعیل حسن نتاج که رهنمودهای علمی و عملی زیادی در انجام این پایان نامه داشته‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین از همهٔ همکلاسی‌ها: آقایان علی دهستانی کلاگر، غفار کیانی، رضا طالبی و محمدرضا زنگی بخاطر مساعدت در انجام این پروژه تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

در نهایت:

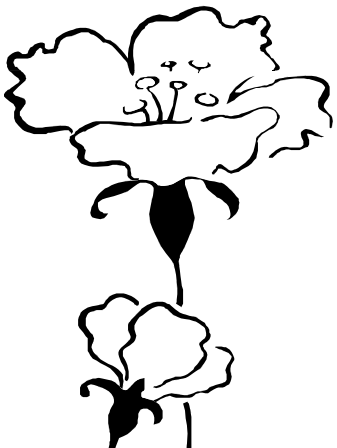
از تمامی معلمان، استادان، دوستان و خانواده ام در کل دوران تحصیل سپاسگزارم.

تقدیم به:

پیشگاه مقدس قطب عالم امکان حضرت مهدی صاحب الزمان (عج).

و

تمامی رهپویان راه علم و معرفت که به حکایت ن و قلم و آنچه می نگارد معترفند.



تقدیم به:

پدر و مادر مهربان و گرامیم که اولین معلمین زنـدگی‌ام بودند و برای شکوفائیم، پژمردند و بـرای بالنـدگیم، خمیدنـد و بـا زحمات بی‌شائبه مرا در این راه مقدس یاری نمودند.

تقدیم به:

برادران و خواهران عزیزم.

تقدیم به:

همسر فداکار و مهربان و فرزند دلبندم.

چکیده:

اطلاعات در مورد ژن های اعاده کننده باروری، اصلاح و یا انتخاب لاین های برگرداننده باروری را در برنامه های اصلاحی برنج هیبرید، آسان می نماید. توارث پذیری ژن های اعاده باروری نوع WA-CMS در برنج، با استفاده از لاین های نر عقیم سیتوپلاسمی IR58025A ، IR62829A و IR68899A در ترکیب با سه واریته اعاده کننده باروری مورد مطالعه قرار گرفت. باروری دانه گرده و خوشه در گیاهان نسل F_1، مشابه با والدین برگرداننده باروری یعنی آمل-۲، IR50 و پویا بودند که بیانگر غالب بودن ژن (های) اعاده کننده باروری می باشد و سیستم نر عقیم سیتوپلاسمی بصورت اسپوروفیتیک است. ارزیابی باروری در جمعیت های F_2 و نتاج تست کراس (BC_1) نشان داد که صفت اعاده باروری در ارقام آمل-۲ و IR50 توسط دو ژن غالب و در پویا توسط یک ژن غالب کنترل می شود. مطالعه قابلیت ترکیب پذیری و هتروزیس روی ۱۲ هیبرید همراه با هفت ژنوتیپ برنج (سه لاین نر عقیم سیتوپلاسمی و چهار واریته اعاده کننده باروری) بصورت طرح تلاقی لاین × تستر جهت شناخت الگوی توارث پذیری تعدادی از صفات مورفولوژیکی برای انتخاب ژنوتیپ های برتر انجام گرفت. تجزیه واریانس، تفاوت معنی داری را بین ژنوتیپ ها، تلاقی ها، لاین ها، تسترها و اثر متقابل لاین × تستر برای صفات تعداد پنجه در بوته، ارتفاع گیاه، تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، طول خوشه، تعداد گلچه در هر خوشه، درصد باروری خوشه و عملکرد دانه نشان داد. بیشترین مقدار هتروزیس برای عملکرد دانه (۱۰۶/۶۰ درصد) در تلاقی پویا × IR68899A مشاهده شد. سهم نسبی تنوع در تسترها نسبت به اثر متقابل لاین × تستر برای صفات مورد مطالعه بیشتر بوده که نشان دهنده برآورد بیشتر واریانس GCA یا بعبارتی عمل ژن افزایشی بین تسترهای مورد استفاده در مطالعه برای صفات مختلف می باشد. تلاقی های پویا × IR68899A، IR58025A × IR50 و پویا × IR58025A ترکیبات بسیار خوبی برای عملکرد دانه و بیشتر صفات وابسته به عملکرد بواسطه اثرات SCA بالا و معنی دار و اثرات هتروتیک شناسایی شدند. در برنامه های اصلاحی برای تولید برنج هیبرید با استفاده از سیستم سه لاین، پیدا کردن لاین های اعاده کننده باروری مناسب با قدرت ترکیب پذیری بالا مهم می باشد بدلیل اینکه با انتقال ژن Rf به این ارقام از طریق روش اصلاحی بک کراس می توان لاین های اعاده کننده باروری خوب را انتظار داشت. اگر در این روش بتوان از نشانگرهای مولکولی برای انتخاب استفاده نمود هزینه کار خیلی کمتر شده و سریعتر به R لاین مطلوب دست خواهیم یافت. زیرا در این جا نیازی به تست نتاج نسلهای مختلف بک کراس نیست، همچنین با تشخیص در مراحل اولیه رشدی می توان بوته های حاوی ژن Rf را تشخیص داده و بقیه را حذف نمود. هدف اصلی در این تحقیق مکان یابی ژن یا ژن های Rf روی کروموزوم برنج می باشد. نتایج نشان داد که آغازگرهای RM258 و RM228 روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ و آغازگرهای RM151 و RM490 روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱، در رقم آمل-۲ پیوستگی بالایی با ژن اعاده کننده باروری داشتند. فاصله نشانگرهای RM151 و RM490 تا ژن اعاده کننده باروری (Rf_3) به ترتیب ۴/۱۸ و ۱/۳۹ سانتی مورگان برآورد شده است. همچنین نشانگرهای RM258 و RM228 روی کروموزوم ۱۰ با ژن اعاده کننده باروری (Rf_4)، به ترتیب به فواصل ۲/۷۸۳ و ۸/۴۱ سانتی مورگان بوده است. تجزیه پیوستگی برای لاین IR50 نشان می دهد که نشانگر RM1 با ژن اعاده کننده باروری (Rf_3)، روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱ در فاصله ۱/۲۵ سانتی مورگان پیوسته می باشد. همچنین در این رقم نشانگرهای RM258 و RM228 با ژن اعاده کننده باروری (Rf_4)، روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ به ترتیب با فاصله ۲/۵ و ۸/۸۴ سانتی مورگان پیوسته می باشند. تجزیه پیوستگی برای رقم پویا نشان می دهد که نشانگرهای RM271 و S10019 با ژن اعاده کننده باروری (Rf_4)، روی کروموزوم ۱۰ به ترتیب با ۳/۳۱ و ۱/۳۲۴ سانتی مورگان پیوسته می باشند.

واژه های کلیدی:

مکان یابی مولکولی، لاین اعاده کننده باروری، نرعقیمی سیتوپلاسمی و برنج.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول - خصوصیات و استفاده از نر عقیمی در اصلاح برنج هیبرید ۳

۱ – ۱ - نرعقیمی سیتوپلاسمی ۳

۱ – ۱ – ۱ - کشف نر عقیم سیتوپلاسمی در برنج ۳

۱ – ۱ – ۲ - طبقه بندی نوع نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) در برنج ۳

۱ – ۱ – ۲ – ۱ - CMS-WA ۴

۱ – ۱ – ۲ – ۲ - CMS-HL ۵

۱ – ۱ – ۲ – ۳ - BT-CMS ۵

۱ – ۱ – ۳ - خصوصیات مکان های ژنی مرتبط با نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) در برنج ۶

۱ – ۱ – ۴ - توارث پذیری و نقشه یابی ژن های اعاده کننده باروری برای CMS در برنج ۸

۱ – ۱ – ۴ – ۱ - توارث پذیری و نقشه یابی Rf برای CMS-WA ۸

۱ – ۱ – ۴ – ۲ - توارث پذیری و نقشه یابی Rf برای CMS های نوع HL و BT. ۹

۱ – ۱ – ۵ - کلونینگ ژن Rf و مکانیزم CMS در برنج ۱۱

۱ – ۲ - نر عقیمی ژنتیکی ۱۲

۱ – ۲ – ۱ - خصوصیات نر عقیم حساس به طول روز و درجه حرارت در برنج ۱۲

۱ – ۲ – ۲ - توارث پذیری و مکان یابی نر عقیمی حساس به درجه حرارت/ طول روز در برنج ۱۳

۱ – ۳ - نر عقیمی و توسعه برنج هیبرید ۱۴

۱ – ۳ – ۱ - استفاده از هتروزیس از طریق سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) ۱۴

۱ – ۳ – ۲ - استفاده از هتروزیس از طریق سیستم GMS ۱۶

۱ – ۴ - اصلاح و توسعه برنج برتر ۱۶

۱ – ۵ - اصلاح و توسعه برنج هیبرید در ایران ۱۷

فصل دوم - ژنتیک و قابلیت ترکیب پذیری ژن (های) اعاده باروری ۱۹

۲ – ۱ – چکیده ۱۹

۲ – ۲ – مقدمه ۲۰

۲ – ۳ - مواد و روشها ۲۰

۲ – ۳ – ۱ - مواد گیاهی ۲۰

۲ – ۳ – ۲ - برآورد درصد باروری دانه گرده و باروری خوشه ۲۰

۲ – ۳ – ۳ - تجزیه لاین × تستر ۲۱

۲ – ۴ – نتایج ۲۱

۲ – ۴ – ۱ – ژنتیک اعاده باروری ۲۱
۲ – ۴ – ۲ – قابلیت ترکیب پذیری اعاده کننده باروری ۲۲
۲ – ۵ – بحث ۲۳

فصل سوم – هتروزیس و تجزیه قابلیت ترکیب پذیری برای عملکرد و صفات ۳۰
۳ – ۱ – چکیده ۳۰
۳ – ۲ – مقدمه ۳۰
۳ – ۳ – مواد و روشها ۳۱
۳ – ۳ – ۱ – مواد گیاهی ۳۱
۳ – ۳ – ۲ – تجزیه آماری ۳۱
۳ – ۴ – نتایج ۳۲
۳ – ۴ – ۱ – میانگین بر آورد شده صفات ۳۲
۳ – ۴ – ۲ – تجزیه قابلیت ترکیب پذیری ۳۲
۳ – ۴ – ۲ – ۱ – قابلیت ترکیب پذیری عمومی ۳۳
۳ – ۴ – ۲ – ۲ – قابلیت ترکیب پذیری خصوصی ۳۳
۳ – ۴ – ۳ – برآورد هتروزیس ۳۴
۳ – ۵ – بحث ۳۵

فصل چهارم – مکان یابی مولکولی ژن (های) کنترل کننده نر عقیمی ۴۱
۴ – ۱ – چکیده ۴۱
۴ – ۲ – مقدمه ۴۱
۴ – ۳ – نرعقیمی ۴۲
۴ – ۴ – نشانگرها ۴۲
۴ – ۵ – انواع نشانگرها ۴۳
۴ – ۶ – نشانگرهای مولکولی غیرمبتنی بر پی. سی. آر ۴۶
۴ – ۷ – نشانگرهای مولکولی مبتنی بر پی. سی. آر ۴۷
۴ – ۸ – کاربرد نشانگرهای مولکولی در برنج ۵۴
۴ – ۹ – شرایط استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه های تهیه نقشه ژنتیکی ۵۴
۴ – ۱۰ – نشانگرهای DNA ۵۵
۴ – ۱۰ – ۱ – میکروساتلایت ۵۵
۴ – ۱۰ – ۲ – نقاط نشانمند از توالی (STS) ۵۶
۴ – ۱۱ – واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۶
۴ – ۱۲ – وسایل و اجزاء واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۹

۴ – ۱۳ – متغیرهایی که روی صحت یا درستی کار تک پلیمراز تاثیر می گذارند..... ۶۱
۴ – ۱۴ – آغازگرها..... ۶۴
۴ – ۱۵ – عوامل موثر بر واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۶۶
۴ – ۱۶ – الکتروفورز..... ۶۹
۴ – ۱۷ – انواع الکتروفورز..... ۷۰
۴ – ۱۷ – ۱ – الکتروفورز ژل پلی آکریلامید..... ۷۰
۴ – ۱۷ – ۲ – الکتروفورز ژل استات سلولز..... ۷۱
۴ – ۱۷ – ۳ – الکتروفورز ژل آگارز..... ۷۱
٤ – ۱۸ – فاکتورهای موثر در میزان مهاجرت دی. ان. آ در ژل های آگارز..... ۷۱
۴ – ۱۹ – ترکیب بافر الکتروفورز..... ۷۳
٤ – ۲۰ – رنگ آمیزی دی. ان. آ در ژل های آگارز..... ۷۴
٤ – ۲۱ – شدت جریان برق، ولتاژ و توان..... ۷۴
۴ – ۲۲ – انواع آگارز..... ۷۵
٤ – ۲۳ – محلول رنگی شاخص حرکت..... ۷۶
۴ – ۲۴ – نقشه های پیوستگی ژنتیکی..... ۷۶
۴ – ۲۴ – ۱ – ویژگی های نقشه..... ۷۷
۴ – ۲۴ – ۲ – مفهوم فاصله ژنتیکی..... ۷۸
۴ – ۲۴ – ۳ – سانتی مورگان..... ۷۹
۴ – ۲۴ – ۴ – روش امتیاز دهی LOD (Logarithm (base 10) of odds)..... ۸۰
۴ – ۲۵ – سابقه نقشه یابی ژن اعاده کننده باروری در برنج..... ۸۱
۴ – ۲۶ – مواد و روشها..... ۸۲
۴ – ۲۶ – ۱ – مواد گیاهی..... ۸۲
۴ – ۲۶ – ۲ – تولید جمعیت برای نقشه یابی مولکولی و برآورد باروری..... ۸۲
۴ – ۲۶ – ۳ – تهیه نمونه برگی..... ۸۳
۴ – ۲۶ – ۴ – اندازه گیری درصد باروری..... ۸۳
۴ – ۲۶ – ۵ – استخراج DNA..... ۸۳
۴ – ۲۷ – انواع روش های اسخراج دی. ان. آ از گیاهان عالی..... ۸۴
۴ – ۲۸ – تعیین کمیت و کیفیت دی. ان. آ..... ۸۶
۴ – ۲۸ – ۱ – تعیین کمیت دی. ان. آ از طریق اسپکتروفوتومتر..... ۸۶
۴ – ۲۸ – ۲ – تعیین کمیت و کیفیت دی. ان. آ به وسیله الکتروفورز ژل آگارز..... ۸۶
۴ – ۲۹ – یکسان نمودن غلظت دی. ان. آی نمونه‌های استخراج شده..... ۸۷
۴ – ۳۰ – آغازگرها..... ۸۷
۴ – ۳۱ – تنظیم شرایط برای پی. سی. آر و نکات مربوطه..... ۹۲

۴ – ۳۲ – پی. سی. آر و شرایط الکتروفورز ژل آگارز ۹۳
۴- ۳۳ – بارگذاری نمونه ها و اجرای الکتروفورز ۹۳
۴-۳۴- امتیاز دهی ژنوتیپی جمعیت F_2 ..... ۹۴
۴ – ۳۵- تجزیه نسل در حال تفکیک از طریق بالک (BSA) ۹۴
۴ – ۳۶ – تجزیه SSR ۹۵
۴ – ۳۷ – ترسیم نقشه لینکاژی ۹۵
۴-۳۸ – نتایج و بحث ۹۵
۴-۳۸ – ۱ – آمل-۲ ..... ۹۵
۴-۳۸ – ۲ – IR50 ..... ۱۰۷
۴-۳۸ – ۳ – پویا ۱۱۲
۴ – ۳۹ – بحث ۱۱۹
۴- ۴۰ – پیشنهادات ۱۲۳
ضمیمه **۱۲۴**
منابع **۱۴۰**

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱ – ۱ – حالت های عقیمی دانه گرده سه نوع مهم نر عقیمی سیتوپلاسمی (CMS) ۵
شکل ۱ – ۲– تصویر شماتیک از تفاوت ساختاری بین orf79 و orfH79 ..... ۷
شکل ۱–۳– مدل شماتیکی از فواصل ژن Rf روی کروموزوم ۱۰ برنج ۱۰
شکل ۲ – ۱–الگوی توزیع باروری دانه گرده در نسل F2 تلاقی ها ۲۴
شکل ۴ – ۱ – موقعیت نشانگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه روی کروموزوم های برنج ۸۸
شکل ۴–۲– چند شکلی بین لاین های والدینی IR68899A و آمل–۲ با ۹۷
شکل ۴–۳– الگوی نوار بندی نشانگر RM151 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۰
شکل ۴–۴ – الگوی نوار بندی نشانگر RM151 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۰۰
شکل ۴–۵– الگوی نوار بندی نشانگر RM490 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۱
شکل ۴–۶– الگوی نوار بندی نشانگر RM490 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۰۲
شکل ۴–۷ – الگوی نوار بندی نشانگر RM258 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۳
شکل ۴–۸– الگوی نوار بندی نشانگر RM258 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۰۴
شکل ۴–۹– الگوی نوار بندی نشانگر RM228 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۵
شکل ۴–۱۰– الگوی نوار بندی نشانگر RM228 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۰۵
شکل ۴– ۱۱ – نقشه یابی Rf روی کروموزوم ۱ و ۱۰ برای رقم آمل–۲، نشانگر ۱۰۷
شکل ۴–۱۲– چند شکلی بین لاین های والدینی IR68899A و IR50 با استفاده ۱۰۸
شکل ۴–۱۳– الگوی نوار بندی نشانگر RM228 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۸
شکل ۴–۱۴– الگوی نوار بندی نشانگر RM228 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۰۹
شکل ۴–۱۵– الگوی نوار بندی نشانگر RM258 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۰۹
شکل ۴–۱۶– الگوی نوار بندی نشانگر RM258 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۱۰
شکل ۴–۱۷– الگوی تفکیک نشانگر RM1 در بوته های عقیم جمعیت F_2 ..... ۱۱۰
شکل ۴–۱۸– الگوی تفکیک نشانگر RM1 در نمونه های گیاهی از جمعیت F_2 ..... ۱۱۱
شکل ۴– ۱۹– نقشه یابی Rf روی کروموزوم ۱ و ۱۰ برای رقم IR50، نشانگرها در ۱۱۲
شکل ۴–۲۰– چند شکلی بین لاین های والدینی IR68899A و پویا با استفاده از ۱۱۴
شکل ۴– ۲۱ – الگوی نوار بندی نشانگر RM271 در بوته های عقیم از جمعیت F_2 ..... ۱۱۷
شکل ۴–۲۲ – الگوی نوار بندی نشانگر S10019 در والدین تلاقی ۱۱۸
شکل ۴ – ۲۳– الگوی نوار بندی نشانگر S10019 در بوته های عقیم ۱۱۸
شکل ۴ – ۲۴– الگوی نوار بندی نشانگر S10019 در بوته های عقیم از جمعیت F_2 ..... ۱۱۸
شکل ۴ – ۲۵ – نقشه یابی Rf روی کروموزوم ۱۰ برای رقم پویا، نشانگرها در طرف راست ۱۱۹

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۱ – ۱ – خصوصیات ۳ سیستم نر عقیمی سیتوپلاسمی در برنج ۴

جدول ۱ – ۲ – مکان های ژنی باروری و محل نر عقیمی ژنتیکی حساس به درجه حرارت ۱۵

جدول ۲ – ۱ – میانگین باروری خوشه و باروری دانه گرده والدین و هیبریدهای F_1 برنج ۲۵

جدول ۲ – ۲ – باروری دانه گرده گیاهان در جمعیت های F_2 برنج ۲۶

جدول ۲ – ۳ – باروری خوشه گیاهان در جمعیت های F_2 برنج ۲۶

جدول ۲ – ۴ – باروری دانه گرده گیاهان در جمعیت های تست کراس برنج ۲۷

جدول ۲ – ۵ – باروری خوشه گیاهان در جمعیت های تست کراس برنج ۲۷

جدول ۲ – ۶ – تجزیه واریانس برای قابلیت ترکیب پذیری صفات باروری دانه و باروری خوشه ۲۸

جدول ۲ – ۷ – واریانس های قابلیت ترکیب پذیری عمومی (GCA) و خصوصی (SCA) و ۲۸

جدول ۲ – ۸ – اثر GCA والدین برای باروری دانه گرده و باروری خوشه در برنج ۲۸

جدول ۲ – ۹ – اثر قابلیت ترکیب پذیری خصوصی (SCA) و هتروزیس والد برتر ۲۹

جدول ۳ – ۱ – میانگین صفات برای هفت والد و ۱۲ هیبرید F_1 در برنج ۳۷

جدول ۳ – ۲ – تجزیه واریانس برای اثرات قابلیت ترکیب پذیری صفات مختلف در برنج ۳۸

جدول ۳ – ۳ – سهم نسبی لاین ها و تسترها و اثر متقابل آنها به واریانس کل در برنج ۳۸

جدول ۳ – ۴ – اثرات قابلیت ترکیب پذیری عمومی (g_i) برای صفات در والدین برنج مورد مطالعه ۳۹

جدول ۳ – ۵ – اثرات قابلیت ترکیب پذیری خصوصی (s_{ij}) برای صفات در تلاقی های برنج مورد مطالعه ۳۹

جدول ۳ – ۶ – هتروزیس میانگین والدین (Ht) و هتروزیس والد برتر (Htb) در تلاقی های برنج ۴۰

جدول ۴ – ۱ – موارد و خصوصیات مورد مقایسه دو نشانگر رپید و آر. اف. ال. پی ۵۳

جدول ٤ – ۲ – محدوده موثر جداسازی مولکول های خطی ودر صد آگارز در ژل ۷۲

جدول ۴ – ۳ – مواد مورد نیاز و مقادیر هر کدام از آنها برای تهیه محلول مادری ۹۲

جدول ۴ – ۴ – SSR – پی.سی.آر را می توان طبق دستورالعمل فوق شروع نمود ۹۳

جدول ۴ – ۵ – فراوانی نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین مکان ژنی نشانگر مثبت و ۱۰۶

جدول ۴ – ۶ – تفکیک آلل های نشانگر بین ۱۰۰ گیاه از جمعیت F_2 در تلاقی آمل-۲ × IR68899A ۱۰۶

جدول ۴ – ۷ – فراوانی نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین مکان ژنی نشانگر مثبت و ۱۱۱

جدول ۴ – ۸ – تفکیک آلل های نشانگر بین ۱۰۰ گیاه از جمعیت F_2 در تلاقی IR68899A × IR50 ..... ۱۱۲

جدول ۴ – ۹ – فراوانی نوترکیبی و فواصل ژنتیکی بین مکان ژنی نشانگر مثبت ۱۱۷

جدول ۴ – ۱۰ – تفکیک آلل های نشانگر بین ۱۰۰ گیاه از جمعیت F_2 در تلاقی پویا × IR68899A ۱۱۹

لیست علایم و اختصارات

BSA	تجزیه نسل در حال تفکیک بصورت بالک (Bulked Segregant Analysis)
CMS-WA	نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA (Cytoplasmic male sterility-Wild abortive)
CMS-BT	نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع BT (Cytoplasmic male sterility-Baotai)
CMS-HL	نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع HL (Cytoplasmic male sterility-Hunglian)
GCA	قابلیت ترکیب پذیری عمومی (General combining ability)
Ht	هتروزیس میانگین والدین (Midparent Heterosis)
Htb	هتروزیس والد برتر (High-parent Heterosis)
IRRI	موسسه تحقیقات بین المللی برنج (International Rice Research Institute)
MAS	انتخاب به کمک نشانگر (Marker-assisted selection)
ORFs	چهار چوب خواندن باز (Open reading frames)
PCR	واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase chain reaction)
PGMS	نرعقیمی ژنتیکی حساس به طول روز (Photoperiod-sensitive genic male sterility)
PPR	پنتا تری کو پپتید (Pentatricopeptide repeat)
Rf gene	ژن اعاده کننده باروری (Fertility restorer gene)
RFLP	چند شکلی طولی قطعات حاصل از هضم (Restriction fragment length polymorphism)
ROS stress	استرس گونه ها به اکسیژن (Reactive oxygen species stress)
SCA	قابلیت ترکیب پذیری خصوصی (Specific combining ability)
SSR	توالی ساده تکراری (Simple sequence repeats)
TGMS	نرعقیمی ژنتیکی حساس به درجه حرارت (Temperature-sensitive genic male sterility)

مقدمه

از شروع فعالیت های کشاورزی، تلاش ها برای افزایش بیشتر و بهتر کمیت و کیفیت غذا وجود داشته و ادامه دارد. جمعیت دنیا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه روز به روز در حال افزایش است و این در حالی است که امکان گسترش اراضی مزروعی بسیار اندک بوده و بعلاوه حوادثی نظیر خشکی، بیماری ها و کاهش حاصلخیزی خاک های موجود باعث کاهش محصول می شوند. با عنایت به اهمیت موضوع، دستیابی به روشهایی برای افزایش عملکرد گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

برنج (*Oryza sativa* L: 2n = 2x = 24) متعلق به خانواده گرامینه و جنس اوریزا، که شامل ۲٤ گونه می باشد که ۲۲ گونه وحشی و دو گونهٔ (*O. sativa*) و(*O. glaberrima*) زراعی می باشند. امروزه، برنج غذای اصلی مردم دنیاست، بیش از ۹۰ درصد برنج دنیا در آسیا تولید شده و به مصرف می رسد و بیش از نصف برنج آسیا در کشورهای هند و چین تولید می شود. به نظر می رسد که تولید برنج در دنیا زیاد شده، اما افزایش بیشتر تولید برنج برای برآورد تقاضا، با توجه به افزایش روز افزون جمعیت دنیا مورد نیاز می باشد. تولید سالیانه برنج دنیا می بایستی از ۵۲۷ میلیون تن به ۷۵۸ میلیون تن تا سال ۲۰۲۰ برسد تا بتواند جوابگوی تقاضای مورد نیاز باشد [۵۸]. طبق آمار منتشره از مؤسسه بین المللی برنج IRRI[1]، میزان واردات برنج ایران به ۱/۵ میلیون تن در سال ۲۰۲۰ خواهد رسید. برنج یکی از عمده ترین محصول دانه ای قدیمی می باشد و بواسطه داشتن کربوهیدرات بالا، چربی کم و غنی از پروتئین ها، ویتامین ها و مواد معدنی، غذای اصلی و اساسی برای مردم است. برنج بعنوان غذای اصلی برای بیش از ده هزار سال مورد مصرف قرار می گیرد و در ۱۱۳کشور کشت می شود. برآورد می شود که نیمی از جمعیت جهان، تماما یا بطور نسبی از برنج امرار معاش کنند. افزایش سریع مصرف برنج، عمدتا بواسطه افزایش جمعیت انسانی در کشور های در حال رشد می باشد. پیش بینی می شود که جمعیت در دنیا دائما افزایش خواهد یافت و از ۶ میلیارد موجود به ۸ میلیارد در سال ۲۰۳۰ خواهد رسید. بر اساس مستندات فائو (FAOSTAT)، خسارت سالیانه زمین برای مصارف دیگر حدود ۱۰ تا ۳۵ میلیون هکتار در سال برآورد شده، که نیمی از این زمین ها مربوط به اراضی کشاورزی است. با توجه به چالش رشد جمعیت و کاهش اراضی کشاورزی، بدیهی است که تنها راه حل این مشکل، اصلاح عملکرد محصول غلات عمدتا برنج، گندم، ذرت و غیره می باشد [۲۰۵]. خوشبختانه برنج بعنوان غذای جمعیت دنیا توسط سازمان ملل مهم شناخته شده است. سال ۲۰۰۴ هم بعنوان سال بین المللی برنج نام گذاری شده که منعکس کننده اهمیت برنج بعنوان منبع غذای اولیه می باشد. بویژه، برنج نیز بعنوان محصول غله ای مدل، برای تحقیقات پایه و اصلاح گیاه شناخته شده است. افزایش تعداد دانشمندان دنیا که برای افزایش عملکرد محصول تلاش می کنند، همگام با تقاضای بیشتر جمعیت دنیا، جالب توجه می باشد.

از لحاظ تاریخی، افزایش عملکرد غلات در دنیا، نخست در سال های ۱۹۷۰و۱۹۸۰رخ داده، که بعنوان انقلاب سبز شناخته شد که با استفاده از ژن های نیمه- پاکوتاه باعث افزایش بیشتر عملکرد گندم و برنج شده است. دوم، استفاده از هتروزیس بواسطه استفاده از نر عقیمی برنج است. این روش، عملکرد محصول را بیش از ۲۰ درصد نسبت به ارقام برنج اینبرد اصلاح شده افزایش می دهد. در حال حاضر تولید برنج هیبرید در جهان بصورت سیستم سه- لاینی (نرعقیم سیتوپلاسمی) و یا دو- لاینی (نر عقیم حساس به طول روز یا درجه حرارت) می باشند. برنج هیبرید در بیش از ۲۰ کشور معرفی شده و هم اکنون بعنوان ابزار اولیه برای افزایش عملکرد محصول برنج تبدیل شده است.

به دلیل گسترش اطلاعات بشر از فرآیندهای نرعقیمی در گیاهان و به کارگیری این اطلاعات در برنامه‌های به‌نژادی، افزایش زیادی در تولید اغلب گیاهان زراعی حاصل شده ولی همواره نیاز به تولید بیشتر وجود دارد.

---

1 - International Rice Resarch Institute

امید است که این مجموعه مورد توجه و استفاده علاقه مندان و پژوهشگران این رشته قرار گیرد و هر روز شاهد هموار شدن زمینه های مناسب جهت انجام تحقیقات کاربردی در کشور اسلامی باشیم، تا موجبات حرکت به سوی استقلال و خود کفایی کشور، هرچه بیشتر فراهم شود.

فصل اول - بررسی خصوصیات لاین های نر عقیم مورد استفاده در اصلاح برنج هیبرید

۱-۱- نرعقیمی سیتوپلاسمی

استفاده از هتروزیس در نسل F_1 در کارهای اصلاح نبات بخوبی شناخته شده است. مزیت نر عقیم سیتوپلاسمی (CMS) این است که دانه گرده در لاین نر عقیم، عقیم بوده، درحالیکه اندام ماده نرمال می باشد. این حالت مناسب می باشد چرا که اجازه می دهد کلاله از طریق گیاهان دیگر دگرگرده افشانی شده و تولید بذور هتروزیس نماید. در نتیجه امکان تولید بیشتر بذور هیبرید را امکان پذیر می نماید. تا کنون ارقام CMS و ژرم پلاسم نر عقیم دیگری نیز شناسایی شده و بکار گرفته شده اند. هر چند، با توجه به تئوری قدیمی که هتروزیس در نسل F_1 در گیاهان خود گرده افشان وجود ندارد، عقیده عموم بر این بود که هتروزیس در برنج وجود ندارد. از طرف دیگر تا آن زمان هیچ ژرم پلاسم CMS در برنج نیز وجود نداشت، لذا بهره برداری از هتروزیس در برنج عملا محدود بود.

۱-۱-۱- کشف نر عقیم سیتوپلاسمی در برنج

نخستین گزارش از نر عقیم سیتوپلاسمی در برنج در سال ۱۹۵۴ توسط Weeraratne و همکاران ثبت شده است [۸۰]. هر چند CMS در کالتیوارهای برنج الیت ابتدا توسط Shinjyo و Omura در سال ۱۹۶۶ گزارش شده بود. آنها گزارش کردند که مجموعه ای از لاین های CMS (که CMS-BT نامیده شد)، لاین نگهدارنده و اعاده کننده باروری لاین هایCMS را از طریق تلاقی بین گونه ای Chinsurah Boro II / Taichung native 65 توسعه دادند [۱۴۱]. بدنبال آن Watanable، لاین CMSی بود که از طریق Lead rice بعنوان والد غیر دوره ای با Fijisaka 5 اصلاح شده بود. این لاین های CMS که از برنج ژاپونیکا بدست آمده بودند افزایش عملکرد معنی داری را نسبت به ارقام برنج اینبرد اصلاح شده نشان نداده بودند.

در چین، تحقیق روی نر عقیمی برنج در سال ۱۹۶۴ توسط Longping Yuan، آغاز شد، زمانیکه او یک گیاه نر عقیم را در واریته ایندیکا Dong-Ting-Wan-Xian یافته بود. این یافته مشکلی را بر طرف نکرد تا اینکه در سال ۱۹۷۰، گیاه نر عقیم خودبخودی در جمعیت برنج وحشی (که بعنوان CMS-WA نامیده شد) در جزیره Hainan شناسایی شد. چهار سال بعد، نخستین ترکیب برنج هیبرید بنام Nanyou-2 که از CMS-WA بدست آمده بود در سال ۱۹۷۳ معرفی شد، که پتانسیل عملکرد بالایی نسبت به ارقام اینبرد اصلاح شده را نشان می داد. این نقطه عطفی بود که برنج هیبرید را می توان بعنوان یک روش امیدبخش برای افزایش قابل ملاحظه عملکرد به دنبال ژن پاکوتاهی (که در انقلاب سبز نخست مورد استفاده قرار گرفته)، مورد استفاده قرار داد. همچنین برنج هیبرید تئوری قدیمی که محصولات خود گرده افشان هتروزیس ندارند را رد نمود. این امر اشتیاق برای اصلاح لاین های CMS جدید را بسیار بر انگیخت. از اینرو، مجموعه ای از لاین های CMS از ارقام اکولوژیکی مختلف در چین از تلاقی بین ارقام بین گونه ای، بین زیر گونه ای و بین واریته ای اصلاح شده بودند.

۱-۱-۲- طبقه بندی نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) در برنج

از زمانیکه نخستین لاین CMS-WA اصلاح شد و در تولید برنج هیبرید مورد استفاده قرار گرفت، مجموعه ای از لاین های CMS الیت توسط اصلاحگران در چین توسعه یافت. برآورد می شود که بیش از ۶۰ نوع لاین CMS بر اساس منشاء سیتوپلاسمی شامل تیپ WA، تیپ Dina l، تیپ Honglian، تیپ Gambiaka، تیپ k و تیپ Maxie در چین از سال ۱۹۷۰ تا اواسط سال های ۱۹۸۰ اصلاح شده باشند. اگر چه لاین های CMS، منشاء و صورت های عقیمی متفاوتی دارند و یا رابطه اعاده کننده باروری- نگهدارنده باروری متفاوتی دارند، عموما می توان آنها را به سه تیپ یعنی تیپ WA، تیپ HL و تیپ BT بر اساس

توارث پذیری، مورفولوژی دانه های گرده عقیم و روابط اعاده کننده باروری- نگهدارنده باروری آنها گروه بندی نمود که در جدول ۱ - ۱ نشان داده شده است.

CMS-WA -۱-۲-۱-۱

همانطور که در بالا گفته شد، CMS-WA، یکی از CMS های نماینده در این گروه بندی است. CMS-WA بیشتر شامل لاین های CMS ایندیکا می باشندکه اخیرا در تولید هیبرید همانند Aibai، Tenye، تیپ برنج Indonesia، تیپ k، تیپ Gambiaka، تیپ Dissi، Maxie CMS و غیره بصورت تجاری در آمده اند. لاین های CMS در این گروه از تلاقی بین برنج وحشی یا ارقام برنج قدیمی (*O. nivara*، *O. rufipogon*، *O. glaberrima* و *O. sativa* ssp. indica) بعنوان والد مادری با ارقام برنج ایندیکا زودرس (همانند Zhen-shan 97، Xieqingzao، Gu y-12 و II-32 و غیره) بعنوان لاین های والد پدری تکراری بدست آمده اند. عقیمی دانه گرده نسبتا طی مراحل اولیه توسعه میکروسپور، عمدتا در مرحله تک هسته ای رخ می دهد (جدول ۱-۱)، دانه گرده بیشتر بصورت نامنظم شکل گرفته و با محلول I_2-KI غیر قابل رنگ پذیر می باشد (شکل ۱-۱- A).

بیش از ۹۰ درصد دانه گرده در هیبرید F_1، نرمال بوده و دانه های گرده عقیم و بارور در نسل F_2 بصورت ۱ : ۳ یا ۱ : ۱۵ (عقیم به بارور) تفکیک می شوند که نشان دهنده یک یا دو آلل اعاده کننده باروری در تلاقی های مختلف می باشد. نر عقیمی این لاین های CMS تحت شرایط محیطی مختلف پایدار بوده و طیف اعاده کنندگی باروری این گروه محدود به گونه های ژنوم AA می باشد. خروج خوشه کامل نبوده و ابتدای خوشه معمولا مقداری توسط غلاف برگ پرچم شان در زمان خوشه دهی احاطه شده و داخل آن باقی می ماند. عقیمی این نوع CMS معمولا توسط ارقام ایندیکای نیمه پا کوتاه زودرس (که در دره Yangtze کشور چین منشاء گرفته اند) حفظ می شود.

بعضی از ارقام SLO17، Peta، Taiying-1، IR24، IR26 و IR64 از آسیای جنوبی و ارقام ایندیکای دیر رس منشاء گرفته از جنوب چین همانند Cina و Xue-Gu-Zao، قابلیت اعاده کنندگی باروری بالایی را برای این تیپ CMS دارند.

جدول ۱-۱- خصوصیات سه سیستم نر عقیمی سیتوپلاسمی در برنج.

نوع CMS	حالتهای عقیمی				
	مورفولوژی دانه گرده	قابلیت رنگ پذیری دانه گرده	نوع عقیمی	مرحله عقیمی	آلل های اعاده کننده باروری
CMS-WA	نامنظم	خیر	اسپوروفیتیک	تک هسته ای	۱-۲ جفت (Rf3, Rf4)، غالب
CMS-HL	کروی	خیر	گامتوفیتیک	دو هسته ای	۱ جفت (Rf6, Rf5)، غالب
CMS-BT	کروی	بله	گامتوفیتیک	سه هسته ای	۱ جفت (Rf1)، غالب

شکل ۱–۱– حالت های عقیمی دانه گرده مربوط به سه نوع مهم نر عقیمی سیتوپلاسمی (CMS).

شکل A، نشان دهنده دانه های گرده عقیم CMS-WA با شکل نامنظم و غیر قابل رنگ پذیری در محلول I_2KI.

شکل B، نشان دهنده دانه های گرده عقیم CMS-HL با شکل کروی و غیر قابل رنگ پذیری در محلول I_2KI.

شکلC، نشان دهنده دانه های گرده عقیم CMS-BT با شکل کروی و قابل پذیری در محلول I_2KI.

۱–۱–۲–۲– CMS-HL

لاین Hinglina CMS اولیه از طریق تلاقی بر گشتی یک برنج وحشی ریشک قرمز (*O. rufipogon*) بعنوان والد مادری با رقم Lian-Tang-Zao، یک رقم ایندیکای زودرس بعنوان والد پدری زودرس توسط دانشگاه Wuhan در سال ۱۹۷۴ بدست آمده است. عقیمی دانه گرده در این گروه از CMS، معمولا در مرحله دو هسته ای رخ می دهد، دانه های گرده عقیم کروی بوده و قابل رنگ پذیر با محلول I_2KI نیستند (شکل ۱–۱– B).

عقیمی دانه گرده از طریق بافت گامتوفیتیک دانه گرده مشخص می شود. اگر چه حدود ۵۰ درصد دانه های گرده در هیبرید های F_1 بدست آمده از لاین های Honglian CMS نرمال می باشد، اما تشکیل بذر آنها نرمال است. تفکیک عقیمی در جمعیت های نسل F_2 مشاهده نشده که نشاندهنده حالت گامتوفیتیک واقعی می باشد.

رابطه بین اعاده کننده های باروری و نگهدارنده های باروری در لاین های Honglian CMS، بر خلاف لاین های CMS-WA می باشد. بطور کلی، بیشتر ارقام ایندیکای زودرس، منشاء گرفته از دره Yangtze، همانند Zhenshan 97، Longzi، Wen-Xian-Zao و Xue-gu-zao بعنوان نگهدارنده باروری برای CMS-WA می باشند اما برای Honglian CMS بعنوان اعاده کننده باروری می باشند. علاوه بر این، طیف لاین های اعاده کننده باروری برای Hinglian CMS نسبت به CMS-WA که لاین های اعاده کننده های باروری در داخل گونه های ژنوم AA می باشند، گسترده تر می باشد.

۱–۱–۲–۳– CMS- BT

جدایی از CMS های WA و HL، نوع دیگر CMS، CMS-BT می باشد. این گروه CMS شامل لاین های Dian-1 و Dian-3 می باشند. این لاین ها از طریق جابجایی هسته ای و تلاقی برگشتی ارقام ایندیکای بومی (E – Shan – Ta – Bai - Gu و Chinsurah Boro II) بعنوان والد مادری با ارقام ژاپونیکای چینی همانند Taichung 65 بعنوان والد پدری دوره ای توسعه یافته اند. دانه های گرده در این گروه CMS معمولا در مرحله سه هسته ای عقیم می باشند. دانه های گرده لاین نر عقیم بصورت کروی بوده و با محلول I_2-KI رنگ پذیر می باشند (شکل ۱–۱– c). معمولا دانه گرده، عقیمی کامل را نشان داده و بساک ها باز نمی شوند مگر تحت شرایط درجه حرارت بالا و رطوبت پایین. اما رابطه اعاده کننده باروری و نگهدارنده باروری همانند CMS-HL عمل می نمایند [۵۳ و ۲۱۴]. لاین های CMS-BT، طیف اعاده کننده باروری نسبتا بیشتری نسبت به CMS-WA (که می تواند به آسانی اعاده شوند) دارند. ژن های اعاده کننده باروری عمدتا در ارقام زراعی نواحی مرتفع کوهستانی در Yunnan و در ارقام

زراعی غرب آسیا وجود دارند. بطور کلی تمامی ارقام ایندیکا از ایری، منابع اعاده کننده باروری قوی برای CMS-BT می باشند در حالیکه ارقام ژاپونیکا از ژاپن و چین بعنوان نگهدارنده باروری این نوع نر عقیم سیتوپلاسمی می باشند. در هیبرید های F_1 بدست آمده از آنها، تشکیل بذر نرمال و باروری دانه گرده همانند CMS نوع HL حدود ۵۰ درصد می باشد و گیاهان عقیم در جمعیت F_2 مشاهده نخواهند شد. علاوه بر این، تعدادی از لاین های CMS بدست آمده از دگرگشنی بین برنج وحشی در داخل گونه هایی با ژنوم AA و ارقام برنج بعنوان والدین تکراری، خصوصیات اعاده کننده باروری متفاوتی را جهت شناخت نوع CMS دارند. برای مثال، دو لاین نر عقیم سیتوپلاسمی IR66707A و IR69700A که در ایری بدست آمده اند نرعقیمی بسیار پایداری دارند. نر عقیمی آنها نمی تواند توسط هیچ یک از لاین های اعاده کننده باروری شناخته شده، اعاده شود. اما لاین هایی که سیتوپلاسم شان را به ترتیب از *O. perennis* و *O. glumaepatula* گرفته اند، از جمله ژنوم هسته ای برنج زراعی IR64، یک اعاده کننده باروری قوی برای CMS های نوع WA، HL و BT می باشند [۲۲] که Song و همکاران (۱۹۹۹)، تولید سه لاین CMS به نام های MO1A، MO2A و MO3A را از تلاقی بین برنج وحشی Dongxiang (*O. rufipogon* Griff) و MM872 (L. ssp. indica *O. sativa*) گزارش نمودند. این سه لاین CMS، ۱۰۰ درصد نر عقیمی با بساک جزئی ناقص نشان داده و نر عقیمی این لاین ها می تواند فقط از طریق بعضی از لاین های برنج بدست آمده از برنج وحشی Dongxiang، بر گردانده شود، بیشتر از 63 Minghui، یک لاین اعاده کننده باروری قوی برای CMS نوع WA، HL وBT استفاده می شود، که این بدین معنی است که این لاین های CMS می توانند متعلق به یک گروه جدید CMS باشد. این نشان می دهد که سیتوپلاسم های با مکان های ژنی CMS متفاوت در گونه های ژنوم AA وجود دارد و آنها برای رابطه ژن با ژن برای برگرداندن باروری مستعد می باشد.

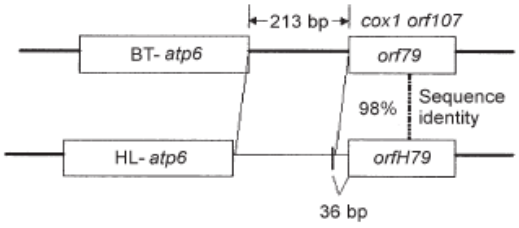
۱-۱-۳ - خصوصیات مکان های ژنی مرتبط با نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) در برنج

عقیده بر آن است که فنوتیپ نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) از ORFs[1] نامتعارف، منشاء گرفته از آرایش مجدد DNA میتوکندریایی ایجاد می شود [۱۳۴]. اگر چه مجموعه ای از مکان های ژنی مرتبط با نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) همانند T-urf13 در ذرت تگزاس، orf138 در تریچه و orf107 در سورگم A3 [۱۵] شناسایی شده است، اما بیشتر مکان های ژنی نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) شناخته شده تا حدودی با ژن های میتوکندریایی همولوگ هستند. تا کنون، حداقل ۹ ژن میتوکندریایی برای ترکیبات زنجیره تنفسی شناخته شده که در نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) گونه های گیاهی مختلف دخالت دارند، که عبارتند از nad3، nad5 و nad7 از ترکیب I، cox1 و cox2 از ترکیب IV، atp1، atp6، atp8 و atp9 از ترکیب V [۱۴، ۴۹، ۱۴۷ و ۱۶۶]. اما تعداد زیادی از توالی های تکراری و زاید، ژنوم میتوکندریایی را خیلی بزرگ ساخته (معمولا بیش از kb ۲۰۰) که نمی توان مکان ژنی ویژه ای را شناسایی کرد. مکان های ژنی مرتبط با نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) در بسیاری از گیاهان در حال شناخته شدن می باشند، مکانیزم مولکولی نر عقیمی سیتوپلاسمی(CMS) نیز بطور عمده مورد بررسی قرار نگرفته و نیاز هست که توجه بیشتری در آینده به آن شود. در سه دهه گذشته، استراتژیهای زیادی برای تعیین توالی مکان های ژنی میتوکندریایی مورد هدف بکار رفته است. یکی از این روش ها شناسایی ژن های تظاهر یافته بطور متفاوت از طریق غربال کتابخانه cDNA میتوکندریایی بوده است. روش دیگر مقایسه الگوهای RFLP برایmtDNA بین گیاه نر عقیم و لاین نگهدارنده آن از طریق ژن های میتوکندریایی شناخته شده بعنوان پروب هایی جهت توصیف ژنوم میتوکندریایی تغییر یافته بوده است. روش سوم مقایسه الگوهای واکنش زنجیره ای پلی مورفیسم (PCR) برای mtDNA بین گیاه موتانت و گیاه بارور بر اساس اطلاعات کامل ژنوم متیوکندریایی بوده است. تمام روش های مذکور بطور موفقیت آمیزی مشخص کرد که ORFs جدید از آرایش مجدد قطعات mtDNA ایجاد شده اند.

1 - Open reading frames

در اوایل دهه ۱۹۹۰، چندین گروه گزارش کردند که ژنوم میتوکندریایی سیتوپلاسم نوع BT، دارای دو نسخه مضاعف شده[1] از ژن atp6 می باشد که زیر واحد کمپلکس ATPase را کد می کند [۶۰]. ژن N-atp6 یک نسخه mRNA بطول حدود kb ۱/۵ را ایجاد می نماید و B-atp6 یک نسخه mRNA بطول ۲kb را ایجاد می نماید. تحقیقات بیشتر مشخص نمود که این تفاوت از طریق نسخه برداری همزمان ORF مشخص شده که orf79 نامیده شد و در پایین دست B-atp6 غیر نرمال قرار دارد [۳]. دو ژن از طریق یک لینکر اینترسیسترونیک[2] ۲۱۳ نکلئوتیدی از هم جدا هستند، orf79 شیمریک دارای ۲۴۰ نکلئوتید است که پپتید عبور کننده از غشاء را کد می کند. یک ناحیه پایانه- C جدید، مشابه با orf107 در رقم سورگوم A3 و یک پایان -N همولوگ با Cox1 میتوکندریایی برنج وجود دارد [۳]. هر چند orf79 دائما تظاهر می کند، اما محصولات آن بطور خاصی و به مقدار زیاد در میکروسپور تجمع می یابد، که می تواند بر نرینگی اثر بدی داشته باشد. آزمایشات ژنتیک معکوس[3] آشکار کرد که orf79 با یک سیگنال عبوری میتوکندریایی تحت کنترل پروموتور s ۳۵ ویروس موزائیک کلم گل می تواند سبب عقیمی دانه گرده در یک لاین برنج نرمال شود [۱۸۲]، گیاهان ترانسژنیکی که نیمه نر عقیمی را نشان دادند، دارای ۵۰ درصد دانه های گرده عقیم می باشند، در حالیکه اندام های ماده نرمال می باشد. آزمایشات بیشتر در محیط کشت آزمایشگاهی، مشخص نمود که پپتید ORF79 برای سلول های E-Coli میزبان، کشنده است که مطابق با حضور یک آمینو اسید ۵ تایی تکراری از نواحی پایانه- C می باشد. این ثابت می کند که عمل ORF79 مشابه پپتید سمی URF13 در CMS-T ذرت [۲۴]، ORF552 در آفتابگردان و ORF133 در تربچه می باشد [۲۹ و ۱۰۲].

جالب توجه است که دو کپی از atp6 نسخه برداری شده و یک ORF شیمریک جدید، orfH79 را تشکیل داده که در لاین CMS-HL شناسایی شده و بر اساس توالی ژنومی میتوکندریی در قسمت پایین دست HL-atp6 قرار دارد [۲۰۰]. ۹۸ درصد توالی در قسمت OrfH79 و orf79 در ناحیه کد کننده مشابه بوده و فقط چهار نوکلئوتید تغییر یافته منجر به سه اسید آمینه جایگزینی می شود. اما یک توالی اضافی bp ۳۶ در بالا دست orfH79 وجود دارد، که در ناحیه بین HL-atp6 و orfH79 شناسایی شده و نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه با atp6-orf79 می باشد (شکل ۱-۲). این توالی توانایی نسخه برداری بطور مستقل را به orfH79 می دهد، ضمنا این توالی می تواند با HL-atp6 برای تولید نسخه ترکیبی، بطور همزمان نسخه برداری شود. این الگوی نسخه برداری بین BT و CMS-HL متفاوت می باشد و با استفاده از الگوی نورترن[4] زمانیکه orf79 بعنوان یک پروب بکار رفت، تایید شد چرا که فقط یک باند kb ۲- در تیپ BT و دو باند kb ۲و kb ۰/۵ در لاین های HL-CMS مشاهده شد.



شکل ۱-۲- تصویر شماتیک از تفاوت ساختاری بین orf79 و orfH79.

تحقیقات ترانسژنیک در رابطه با تظاهر orfH79 نشان می دهد که تمامی گیاهان ترانسژنیک بصورت فنوتیپ نیمه عقیم با ۵۰ درصد دانه گرده عقیم می باشند وقتی که orfH79 با atp6 میتوکندریایی ترکیب شده و پپتیدی که از Ubi یا OS45

1 - Duplicated
2 - Intercistronic linker
3 - Reverse genetic experiments
4 - Northern