بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده تولید گیاهی
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

انتقال بلوک ژنی بازگرداننده باروری *Rf3* به برنج (*رقم ندا*) با روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها (MAB)

پژوهش و نگارش
علی صادقی

استاد راهنما
دکتر اسدالله احمدی خواه

استاد مشاور
دکتر محمد فارسی

۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **علی صادقی** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی در کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به:

مقام رفیع معلم

و

هر آنکه آموخت

از

اخلاق، علم، دین و زندگی

تشکر و قدردانی

سپاس بی‌پایان پروردگار بی‌همتا را که فرصت علم و دانش را ارزانیم داشت و در تمام مراحل زندگی یاریم نمود. حال که نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است، بر خود لازم می‌دانم از پدر و مادرم که سمبل ایثار و عطوفت برایم بودند، تشکر نمایم. بی‌شک آن چه که بر خاک وجودم روییده، حاصل محبت‌های بی‌دریغ این عزیزان است، از همسر، برادر و خواهران مهربانم، که با همدلی و همراهیشان مرا تا این وادی یاری نموده‌اند، تشکر می‌نمایم. از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر اسدالله احمدی خواه، به پاس راهنمایی‌های بی‌دریغ علمی، سجایای اخلاقی، لمحه‌های ارزنده، سپاسگذاری و قدردانی می‌نمایم.

از مشاور محترم جناب آقای دکتر محمد فارسی که از راهنمایی‌های ارزشمندشان بهره‌مند شدم، سپاسگذارم.

از داوران گرانقدر جناب آقای دکتر محمد هادی پهلوانی و دکتر خلیل زینلی نژاد که زحمت بازخوانی این پایان نامه را متقبل شدند کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر فیروز صمدی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی که مدیریت جلسه دفاع از پایان نامه را بر عهده داشتند، متشکرم.

از کلیه اساتید گروه تولید گیاهی قدردانی می‌کنم.

چکیده

هر چند روش اصلاحی تلاقی برگشتی سنتی یک شیوه مفید جهت انتقال آلل‌های مطلوب از والد بخشنده به والد گیرنده می‌باشد، اما دستیابی به ژن مورد نظر و بازیابی کامل ژنوم والد تکراری طولانی بوده و سایر خصوصیات نامطلوب نیز به طور همزمان و ناخواسته انتقال می‌یابند. برای فائق آمدن بر مشکلات فوق، روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرهای مولکولی (MAB) پیشنهاد شده است. در این تحقیق، به منظور انتقال بلوک ژنی بازگرداننده باروری *Rf3*، از جمعیت نسل F_2 دو رقم ندا (پرعملکرد، فاقد ژنهای بازگرداننده باروری و بعنوان والد تکراری) و IR36 (حاوی ژنهای بازگرداننده باروری و بعنوان والد بخشنده) انتخاب صورت گرفت. این فرد با والد دوره‌ای (ندا) تلاقی داده شد. نتاج BC_1 از نظر وجود نشانگرهای پیوسته به ژن (RM1، RM3233 و RM3873) و همچنین از نظر فنوتیپی و بدنبال آن برای ۱۵ نشانگر پس‌زمینه مورد بررسی قرار گرفتند. هفت بوته انتخاب شد که باروری نسبی نشان دادند و در این بین دو بوته دارای دانه بندی بالاتر (۵۵٪ و ۶۵٪) و شباهت بیشتر از حد انتظار (۹۲/۷٪ و۹۳/۷٪) انتخاب شدند، با انجام تلاقی برگشتی نتاج BC_2 حاصل شد. نتاج BC_2 که با سه نشانگر پیش‌زمینه و ۱۳ نشانگر پس زمینه مورد آزمون قرار گرفت، یک گیاه با باروری بالاتر و شباهت بیشتر به والد دوره‌ایی انتخاب شد و مورد خودگشنی قرار گرفت سپس بذور حاصله نگهداری شد. ۱۷۰ بوته از نسل BC_2 کاشته شد و از نظر پیش‌زمینه (دانه‌بندی و سه نشانگر پیوسته با ژن *Rf3*) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ۷ گیاه بر اساس پیش‌زمینه انتخاب شد که وضعیت هموزیگوت در سه نشانگر پیوسته داشتند و بر اساس انتخاب پس‌زمینه با ۱۰ نشانگر SSR باقیمانده گیاهی با شباهت بالاتر به والد دوره‌ایی (۹۸/۵٪) انتخاب شد که خوشه بندی مناسبی (۸۰٪) داشت.

واژه‌های کلیدی: برنج، تلاقی برگشتی، نشانگرهای SSR، *Rf3*، دانه‌بندی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱-امنیت غذایی ۲

۱-۲- نقش برنج در امنیت غذایی ۳

۱-۳- اهمیت برنج ۴

۱-۴-مشخصات گیاهشناسی برنج ۵

۱-۵- گرده افشانی و لقاح ۷

۱-۶-فرضیه‌ها ۸

۱-۷-اهداف ۸

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- هیبرید ۱۰

۲-۲-نرعقیمی سیتوپلاسمی ۱۱

۲-۲-۱-ویژگی‌های بیوشیمیایی و سیتولوژیکی گیاهان حامل سیتوپلاسم عقیم ۱۲

۲-۲-۲-مکانیسم مولکولی نرعقیمی ۱۲

۲- ۲-۳-روشهای ایجاد نرعقیمی ۱۴

۲-۳-بازگرداندن باروری ۱۴

۲-۳-۱-مکانیسم مولکولی بازگرداننده باروری در سیستم CMS ۱۵

۲-۳-۲-مقایسه مکانیسمهای باروری در سیستمهای مختلف ۱۷

۲-۳-۳-ژنتیک بازگرداننده باروری ۱۸

۲-۴-نشانگرهای مولکولی ۱۹

۲-۴-۱-تقسیم‌بندی نشانگرهای مولکولی بر اساس روش آشکارسازی ۲۰

۲-۵-نشانگرهای RAPD ۲۱

۲-۶-نشانگرهای ریزماهواره ۲۲

۲-۷-مکان‌یابی ژن‌های تجدید کننده باروری در برنج ۲۳

۲-۸-تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها(MAB) ۲۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۸-۱-مبانی و پیش‌نیازهای MAB ۲۵
۲-۸-۲-گزینش پیش‌زمینه به کمک نشانگرها ۲۹
۲-۸-۳-گزینش پس زمینه به کمک نشانگرها ۳۳
۲-۸-۴-کاربردهای روش MAB ۳۶

فصل سوم: مواد و روش

۳-۱-مکان و سال آزمایش ۴۲
۳-۲- مواد گیاهی ۴۲
۳-۳-نمونه برداری و استخراج دی ان ای ۴۳
۳-۳-۱-مراحل استخراج ۴۳
۳-۳-۲-تعیین کیفیت دی ان ای استخراج شده ۴۴
۳-۴-واکنش ژنجیره‌ایی پلیمراز(پی سی آر) ۴۴
۳-۴-۱-تکثیر با نشانگرها SSR ۴۵
۳-۴-۲- آغازگرهای مورد استفاده در گزینش پیش زمینه (نشانگرهای SSR) ۴۶
۳-۴-۳- آغازگرهای مورد استفاده در گزینش پس زمینه (نشانگرهای SSR) ۴۷
۳-۵- ارزیابی باروری دانه گرده و دانه‌بندی خوشه ۴۷
۳-۶- محاسبه میزان شباهت به والد تکراری ۴۷

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- ارزیابی نشانگرهای چندشکل بین والدین ۵۰
۴-۲- انتخاب پیش زمینه برای بلوک ژنی بازگرداننده باروری Rf3 در نسل BC1 ..... ۵۱
۴-۲-۱- انتخاب فنوتیپی برای باروری نتاج نسل BC1 ..... ۵۱
۴-۲-۲- انتخاب مولکولی برای بلوک ژنی بازگرداننده باروری در نسل BC1 ..... ۵۱
۴-۲-۳- گزینش پس زمینه در نسل BC1 ..... ۵۲
۴-۲-۴-انتخاب برای نسل بعد ۵۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۴-۳- انتخاب در نسل BC2 ..... ۵۳
۴-۳-۱-گزینش پیش زمینه برای بلوک ژنی بازگرداننده باروری در نتاج BC2 ..... ۵۳
۴-۳-۲-گزینش پس زمینه برای ریخته ارثی والد ندا در نتاج BC2 ..... ۵۳
۴-۴- گزینش نهایی در نسل BC2F2 ..... ۵۴
۴-۴-۱- گزینش پیش زمینه فنوتیپی و ژنوتیپی در نسل BC2F2 ..... ۵۴
۴-۴-۲- گزینش پس‌زمینه در نسل BC2F2 ..... ۵۶
۴-۴-۳- انتخاب نهایی در نسل BC2F2 ..... ۵۷

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات

۵-۱- افزایش کارآیی و دقت انتقال ژن بازگرداننده باروری ۶۰
۵-۲-کارایی بازیابی ژنوم والد تکراری ۶۳
۵-۳-نتیجه‌گیری کلی ۶۷
۵-۴-پیشنهادات ۶۸
فهرست منابع ۶۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱-.پروتئیهای مختلف که در در بازگرداننده باروری نقش دارند ۱۶
جدول۳-۱-.پروفیل حرارتی پی سی آر..... ۴۵
جدول ۳-۲- آغازگرهای SSR استفاده شده برای گزینش لوکوس هدف (*Rf3*)..... ۴۷
جدول۴-۱- آغازگرهای SSR دارای چندشکلی بین والدین و موقعیت آنها در ژنوم برنج..... ۵۰
جدول۴-۲- نتیجه گزینش در نسل BC1 ..... ۵۱
جدول ۴-۳- نتیجه گزینش پس‌زمینه در نسل BC1 ..... ۵۲
جدول ۴-۴- نتیجه گزینش پس‌زمینه در نسل BC2 ..... ۵۴
جدول ۴-۵- نتیجه گزینش پیش زمینه در نسل BC2F2..... ۵۵
جدول ۴-۶- نتیجه گزینش پس‌زمینه با ۱۰ نشانگر SSR در نسل BC2F2..... ۵۶
جدول۵-۱- نتیجه مشاهدات فنوتیپی و ژنوتیپی باروری در بعضی ،افراد نسلBC2F2..... ۶۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱-تفاوت در تعداد نسخه‌های توالی تکراری SSR که منتج به ایجاد چندشکلی می‌گردد (اقتباس از احمدی خواه، ۱۳۸۷) ۲۲
شکل ۲-۲- (A) موقعیت جایگاه هدف (T) و دو نشانگر احاطه‌کننده آن در موقعیت‌های M1 و M2 بر روی یک کروموزوم ۲۷
شکل ۲-۳- نمایی از مراحل مختلف اینتروگرسیون یک ژن با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها (MAB) نشان داده شده است..... ۳۰
شکل ۲-۴- هشت هاپلوتیپ مربوط به ۷۴ لاین گندم مقاوم به سوختگی فوزاریومی خوشه (FHB) که بر پایه نوع آلل‌های موجود در ۵ نشانگر SSR واقع در نزدیکی ژن عامل مقاومت به دست آمده‌اند. ۳۴
شکل ۲-۵- مقایسه گرافیکی میزان بازیابی ژنوم والد تکراری با استفاده از تلاقی برگشتی به کمک نشانگر و تلاقی برگشتی سنتی ۳۸
شکل ۳-۱- نقشه پیوستگی نشانگرهای پیوسته با لوکوس *Rf3* واقع بر بازوی کوتاه کروموزوم ۱ برنج (اقتباس از علوی و همکاران، ۲۰۰۹) ۴۶
شکل۴-۱- تفکیک نشانگرهای پیش‌زمینه دارای پیوستگی با لوکوس *Rf3* در نسل BC2F2 ..... ۵۵
شکل ۴-۲- نمونه گزینش پس‌زمینه در نسل BC2F2 با نشانگر RM206..... ۵۶
شکل ۵-۱- رابطه بین تعداد آلل نشانگرهای پیوسته با لوکوس ژنی *Rf3* و میزان دانه‌بندی خوشه در نتاج نسل BC1..... ۶۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱-امنیت غذایی

چگونگی میزان رشد جمعیت یکی از شاخصه‌های موثر در میزان مصرف غذا است. بررسی روند افزایش جمعیت جهان در طول تمدن بشری نشان می‌دهد که در طی سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۵۰ میزان جمعیت کره زمین از ۲/۶ میلیارد نفر به بیش از ۶ میلیارد نفر افزایش پیدا کرده است. مراکز مهم رشد جمعیت قاره‌های آفریقا (۲/۶٪) و آسیا (۱۸٪) هستند. با وجود همه معیارهایی که برای کنترل رشد جمعیت به کار گرفته شده و می‌شود، جمعیت جهان هر ساله ۱/۵ درصد افزایش می‌یابد به طوری که جمعیت فعلی جهان حدود ۶ میلیارد است که تا سال ۲۰۵۰ به مرز ۱۱ میلیارد نفر خواهد رسید. به نظر می‌رسد که جمعیت جهان در مقایسه با امکانات طبیعت محدودیت دارد که نتیجه آن کمبود غذا است. تغذیه به کلیه ارتباطات بین انسان و غذا از جمله مصرف و جذب مواد مغذی به وسیله انسان، کنش‌ها، رفتارها و عادت‌ها غذایی و امثال آن گفته می‌شود.

امنیت غذایی به معنی اطمینان از دسترسی تمام مردم به غذای کافی در تمامی اوقات به‌منظور داشتن زندگی سالم و فعال است. مفاهیم اصلی در امنیت غذایی عبارتند: ۱-غذایی کافی؛ ۲- دسترسی (فیزیکی و اقتصادی)؛ ۳- امنیت؛ ۴- زمان و ۵- زندگی سالم. با توجه به مفهوم امنیت غذایی و آمار سازمان بهداشت جهانی و سازمان خوار بار و کشاورزی جهانی مرگ در اثر بی‌غذایی هستند و مردم در آمریکای شمالی، استرالیا و اروپا در شرایط تغذیه بیش از نیاز قرار دارند. میزان مصرف غلات نیز گویای میزان پیشرفت و توسعه کشورهاست. در کشورهای توسعه یافته از مصرف غلات کاسته شده، در عوض میزان مصرف مواد پروتئینی به ویژه پروتئین حیوانی افزایش یافته است.

به نقل از جواهر لعل نهرو آمده است که " مضحک است که برای انسان گرسنه و در حال مرگ از فرهنگ سخن بگویی؛ انسان گرسنه کفر می‌گوید و یا گرسنگی کفر می‌آورد". همچنین معروف است که می‌گویند کسی که ۲۴ ساعت گرسنگی باشد نزاع می‌کند و اگر ۴۸ ساعت بی غذا باشد دزدی می‌کند و سرانجام اگر ۷۲ ساعت گرسنه باشد جنگ و آدم‌کشی راه می‌اندازد. بنابراین فرق بین صلح و هرج و مرج در بسیاری از کشورها ناشی از چند روز بدون غذا ماندن است. یکی از مهمترین بخش‌هایی که در تامین امنیت غذایی دارای نقش اساسی است، بخش کشاورزی است، زیرا به منظور تامین غذای مورد نیاز جامعه باید در وهله اول غذا به میزان کافی و همراه با کیفیت خوب و سالم در سطح کشور وجود داشته باشد تا عرضه گردد. کشاورزی یکی از قدیمی‌ترین فعالیت‌های انسان است

که گیاهان یا حیوانات رابرای فعالیت بشر بخصوص جهت تهیه غذا قابل استفاده می‌گرداند. البته کشاورزی به تنهایی قادر نیست تمامی مشکلات اقتصادی و اجتماعی را حل نماید بلکه توسعه صنایع و بهبود اوضاع اجتماعی و فرهنگی از عوامل موثر در بالا بردن وضع اقتصادی و رهایی از چنگال فقر می‌باشد ولی در میان این عوامل، کشاورزی رتبه اول را دارا می‌باشد. کشاورزی از مهمترین فعالیت‌های اقتصادی کشور ما می‌باشد و تا جایی که اشتغال ۳۰ درصد از مردم را بر عهده دارد (پیردشتی و همکاران، ۱۳۸۵).

۱-۲-نقش برنج در امنیت غذایی

بیش از ۸۰۰۰ سال است که دانه‌ای به نام برنج همراه انسان است. این دانه نه تنها یک منبع غذایی بوده بلکه به عنوان یک عامل بر روی فرهنگ، مذهب و شیوه زندگی مردم آسیا و دیگر نقاط دنیا تاثیر داشته است. عجین شدن برنج با فرهنگ مردم به حدی است که ژاپنیها عقیده دارند که اسراف و ولخرجی پول قابل بخشش است ولی دور ریختن یک کف دست برج هرگز قابل بخشش نیست (پیردشتی و همکاران، ۱۳۸۵).

در حال حاضر برنج ۵۰ درصد از تولید کشاورزی جهان و ۲۰ درصد از انرژی مورد نیاز انسان را تامین می‌کند که این رقم با ۱۹ درصد در مورد گندم قابل مقایسه است. تولید برنج در حال حاضر ۴۰۰ میلیون تن است که این رقم را می‌توان با صید ۱۰۰ تا ۱۲۰ میلیون تن ماهی در سال مقایسه کرد. میزان تقاضا برای برنج در سال ۲۰۳۰ را ۳۸ درصد افزایش خواهد یافت که این رقم رشدی حدود ۲/۴ میلیارد انسان را تشکیل می‌دهد و همچنین ۲۰ درصد نیاز کالری بدن آنها را تامین می‌کند. در بخش بزرگی از قاره آسیا، برنج تامین کننده بیش از ۸۰ درصد کالری و ۷۵ درصد پروتئین مصرفی مردم می‌باشد. همه این عوامل سبب شد که مجمع عمومی سازمان ملل در سال ۲۰۰۲ به فراخوان ۴۴ کشور پاسخ بگوید و سال (۲۰۰۴) را به عنوان سال بین المللی برنج اعلام کند. این نخستین سالی بود که سازمان ملل آن را به یک محصول کشاورزی اختصاص داد و بیانگر اهمیتی است که سازمان ملل برای این محصول کشاورزی قائل است. بنابراین افزایش تولید برنج برابر است با داشتن امنیت غذایی بالا در جوامع مستقیم روی این جوامع تاثیر گذاشته و باعث نابسامانی اقتصادی و فقر در این جوامع می‌شود.

در جهت دستیابی به اهداف خودکفایی در این محصول علاوه بر افزیش تولید در واحد سطح، کاهش ضایعات برنج در کل کشور ۳/۳ درصد، مرحله حمل و نقل و انبارداری ۳/۲ درصد، خرمنکوبی ۲ درصد و ضایعات برنجکوبی ۴/۸ درصد گزارش شده است. بررسی برنج از دیدگاه امنیت غذایی و در قالب سیستم عرضه غذا، نشان میدهد که طی سه دهه اخیر، نقش برنج در الگوی غذایی کشور ما، مرتبا افزایش یافته است، بطوری که مصرف سرانه آن از ۱۵–۲۰ کیلوگرم طی ۳۰–۴۰ سال قبل، به ۳۷/۴ کیلوگرم در دهه گذشته رسیده است. طی دهه گذشته بطور متوسط برنج ۱۱ درصد انرژی و ۹ درصد پروتئین رژیم غذایی جامعه را تامین نموده است (پیردشتی و همکاران، ۱۳۸۵).

۱–۳– اهمیت برنج

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 صورت می‌گیرد 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.

شواهد نشان می‌دهند که تقریبا ۴۰۰۰ 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 دنیا نیز در دو کشور هند و چین تولید می‌شود. بطور کلی، کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری 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=۲۴) می‌باشد. کروموزوم‌های گونه *O. glaberrima* (۲n=۲x=۲۴) 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.

۱-۴- مشخصات گیاهشناسی برنج

ساقه برنج راست، استوانه‌ای و جز در قسمتی که گره‌ها وجود دارند توخالی است. ارتفاع ساقه به ۶۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر می‌رسد. برنج علاوه بر ساقه اصلی، ۴ تا ۵ 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 و 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.

ریشه برنج تا عمق ۲۰ الی 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 توخالی 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 میانگره 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.

1 Stipule

همچنین در محل اتصال غلاف به ساقه زائدهٔ کوچکی بنام زبانک[1] وجود دارد. همچنین تعداد گره‌ها در این گیاه از ۱۰ تا ۲۰ عدد متغیر می‌باشد. در مقادیر مساوی شاخص سطح برگ (LAI^2) 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 ۱۴ تا ۱۵ برگ، در ارقام متوسطرس ۱۶ تا ۱۷ برگ و در ارقام دیررس تعداد برگها ۱۸ تا ۱۹ 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 ۴ تا ۵ 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 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 ۴ تا ۵ پنجه تولید می‌نماید. گل آذین در برنج به صورت خوشه‌ای بوده و دارای انشعابات فرعی می‌باشد و حاوی سنبلچه‌های تک گلچه‌ای است. برنج بر خلاف سایر غلات که ۳ تا ۴ پرچم دارند دارای ۶ 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[3] وجود دارد که یکی لما و دیگری پالئا[4] نامیده می‌شود. همچنین در انتهای هر سنبله دو برگک بنام پوشه 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

1 Ligule
2 Leaf area index
3 Glumelle
4 Palea

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 ۱/۴ لما و پالئا و در بعضی از ارقام هم اندازهٔ لما و پالئا است. عموماً لما دارای ریشک و پالئا فاقد ریشک می‌باشد. ۷ تا ۹ روز بعد از گل دادن، لایه آلورون 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 شروع شده و به سمت پایین ادامه می‌یابد. در موقع ظهور خوشه نیاز ریشه به مواد غذایی به ویژه ازت، فسفر و پتاس زیاد است.

۱-۵- گرده افشانی و لقاح

برنج گیاهی است خودگشن 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 پایین‌تر از ۱۰ تا ۱۳ درجه‌سانتی‌گراد و همچنین بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد گرده‌افشانی متوقف می‌گردد. خشکی و دمای پایین می‌تواند روی گرده افشانی اثر منفی داشته باشد. حداقل دما برای انجام عمل لقاح ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. زمان باز شدن گل‌ها ۸ صبح الی ۲ بعدازظهر بوده و گل آذین گل ها در بین یک دورهٔ ۷ تا ۱۰ روزه باز می‌شوند و در اکثر آنها ۲ تا ۴ روز پس از خروج گل آذین از غلاف برگ این کار را انجام می‌دهند.

۱-۶-فرضیه‌ها:

۱) امکان بازیابی سریع و بالای ژنوم والد گیرنده (ندا) با استفاده از روش MAB در جمعیت‌های تلاقی برگشتی وجود دارد.

۲) کاهش سهم ژنوم والد بخشنده بازگرداننده باروری با استفاده از روش MAB در جمعیت‌های تلاقی برگشتی سریع‌تر از روش‌های معمول است.

۱-۷- اهدف:

۱) انتقال بلوک ژنی *Rf3* از طریق روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرهای مولکولی (MAB) جهت ایجاد لاین بازگرداننده باروری ندا.

۲) کاهش مدت زمان لازم برای ایجاد لاین بازگرداننده باروری

۳) افزایش کارآیی و دقت انتقال ژن بازگرداننده باروری.

فصل دوم

بررسی منابع