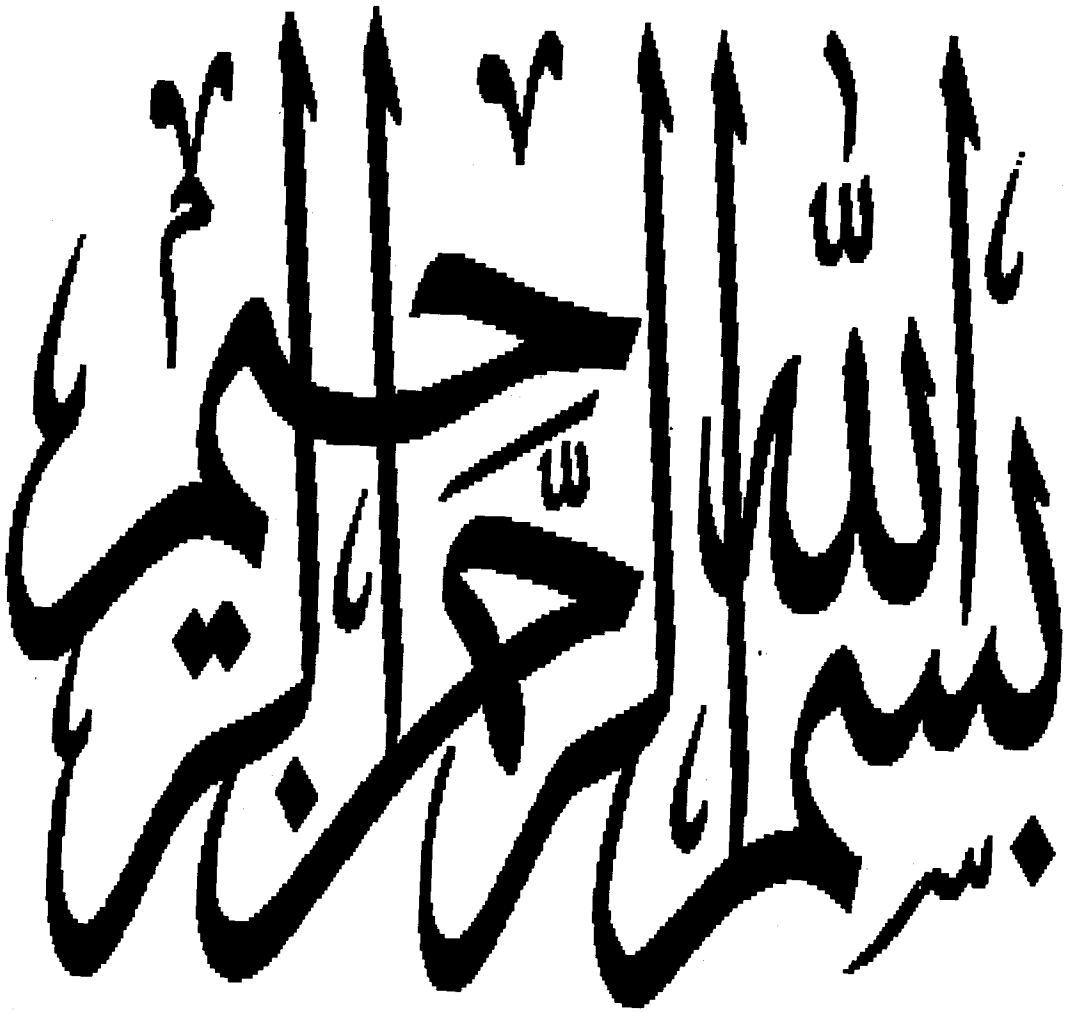
١٤٧٠
٧ ج طوبى



٣٨٥،١

۱۳۸۰/۱۰/۱۱
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه مازندران
دانشکده علوم کشاورزی ساری
گروه زراعت و اصلاح نباتات

موضوع

جستجو و شناسائی لاین‌های اعاده کننده باروری و نگهدارنده نرعقیمی سیتوپلاسمی در گیاه برنج (*Oryza sativa* L.)

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته اصلاح نباتات

استاد راهنما

دکتر قربانعلی نعمت زاده

استاد مشاور

دکتر نادعلی بابائیان

015419

نگارش

اسدالله تریز

شهریور ۱۳۸۰

۳۸۶۰۱

«بسمه تعالی»

دانشگاه مازندران
معاونت آموزشی
تحصیلات تکمیلی

«ارزشیابی پایان‌نامه در جلسه دفاعیه»

دانشکده علوم کشاورزی

نام و نام‌خانوادگی : اسداله ترنج شمارهٔ دانشجوئی :

رشته تحصیلی : اصلاح نباتات مقطع : کارشناسی ارشد سال تحصیلی : نیمسال اول ۸۱ - ۸۰

عنوان پایان‌نامه : جستجو و شناسایی لاین های اعاده کننده باروری و نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی در گیاه برنج

تاریخ دفاع : ۸۰/۶/۳۱

نمره پایان‌نامه (به عدد) : ۱۸/۸۷

نمره پایان‌نامه (به حروف) : هجده و هشتاد و هفت صدم

هیأت داوران

استاد راهنما : جناب آقای دکتر قربانعلی نعمت زاده امضاء

استاد مشاور : جناب آقای دکتر نادعلی بابائیان امضاء

استاد مدعو : نماینده رئیس محترم دانشکده جناب آقای دکتر ایرج امینی امضاء

استاد مدعو : نماینده مدیریت محترم گروه جناب آقای دکتر محمدعلی اسماعیلی امضاء

نماینده کمیته تحصیلات تکمیلی : جناب آقای دکتر سید کمال کاظمی اینا امضاء

سپاسگزاری

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق

منت خدای را عز و جل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت. سپاس خدای تعالی را که به این بنده کمترین خود، در لباس علم و مقام عمل توفیق خدمت به خلق عطا فرمود. شاید که رونده سبیل کمال و یابنده معرفت جمال بی همتایش باشم.

اکنون که سرانجام پس از دو سال تلاش بی وقفه به لطف و مدد حق، توانستم این پایان نامه را به اتمام برسانم، بر خود فرض می‌دانم از تمام کسانی که به نحوی مرا در انجام، ارائه و تدوین این پروژه یاری نموده‌اند نهایت تشکر و سپاسگزاری را ابراز دارم.

از استاد راهنمای ارجمند و گرامی خود جناب آقای دکتر نعمت زاده که در طول اجرای پایان نامه با نظارت مستمر و مستقیم مرا مورد لطف و عنایت خویش قرار دادند، بسیار سپاسگزارم.

از استاد بزرگوار خود جناب آقای دکتر بابائیان که سمت مشاوره را در این پایان نامه به عهده داشتند نیز سپاسگزاری می‌نمایم.

همچنین از اعضاء محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات جناب آقایان دکتر اسماعیلی، مدیر محترم گروه، دکتر کاظمی تبار و دکتر امینی و عضو بسیار فعال بخش تحصیلات تکمیلی، سرکار خانم نوروزی تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

از کادر اداری دانشکده کشاورزی ساری بخاطر تلاش در جهت فراهم آوردن محیطی درخور تحصیل، سپاسگزارم.

از تمامی دوستان عزیز و صمیمی خود که در مراحل اجرای طرح با مساعدت‌ها و تشویق‌های خود بنده را مورد عنایت خویش قرار دادند، جناب آقایان مهندس براتی، حسین‌زاده، باقری (نادعلی)، رشیدی، گوهرچینی، توسلی، کیانی، حسینی، شعاع حسینی، سلیمانی، احمدی، کمالی، واعظی، باقری (محسن) و آهک‌پز مراتب قدردانی و سپاسگزاری خود را ابراز می‌دارم.

از تمامی اعضاء خانواده خود که با نهایت از خود گذشتگی امکان تحصیل را برایم فراهم آوردند، بسیار سپاسگزارم. و در خاتمه باید ابراز دارم که بدون شک فداکاری، ایثار و شکیبائی همسرم بوده که مرا در انجام موفقیت‌آمیز این طرح مصمم و توانمند کرده بود، از ایشان نیز بسیار سپاسگزار و متشکرم.

اسدالله تریز

شهریور ۱۳۸۰

تقدیم به:

مدافعین حیثیت ملی و هویت دینی

هشت شهید زادگاهم:

منوچهر آسوده، بهادراحمدیار،

علیرضا احمدی، غلامرضا احمدی،

غلامحسین سعادتمند، علی بخشی،

قربانعلی احمدی، اصغر امیری

و

معلم شهید حسین نیری پسند

چکیده

به منظور شناسائی لاین‌های اعاده کننده باروری و نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی، ۳۸ لاین مختلف برنج مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا در سال ۱۳۷۹ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران، این ۳۸ لاین با ۴ لاین نر عقیم سیتوپلاسمی ندا A، خزر A، IR68897A و IR62829A تلاقی داده شد که در مجموع ۵۲ هیبرید بدست آمد، سپس در سال ۱۳۸۰ باروری دانه گرده و خوشه هیبریدهای حاصله، مورد ارزیابی قرارگرفت. والدین پدری هیبریدهائی که بالای ۶۰٪، بین ۶۰-۳۰٪، ۳۰-۱٪ و کمتر از ۱٪ باروری دانه گرده و بالای ۸۰٪، بین ۸۰-۳۰٪، بین ۳۰-۰/۱٪ و ۰٪ باروری خوشه را نشان دادند، بترتیب بعنوان اعاده کننده باروری (R لاین)، اعاده کننده نسبی (PR لاین)، نگهدارنده نسبی (PM لاین) و نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی (B لاین) شناسائی گردیدند.

آزمایش باروری دانه گرده ثابت کرد که لاین‌های آمل ۱، آمل ۲، IR24، IR28 ، IR36، IR56، IR62030R و IR60966R برای سیتوپلاسم نر عقیم ندا A و لاین‌های IR56 و IR62030R برای سیتوپلاسم نر عقیم IR68897A ، اعاده کننده باروری می‌باشند. در آزمون باروری خوشه، فقط دو لاین IR24 و IR60966R باروری بالای خوشه (۸۰٪ به بالا) را نشان دادند و از اینرو بعنوان لاین اعاده کننده باروری برای لاین نر عقیم ندا A شناخته شدند. بنابراین در صورتی که این لاین‌های اعاده کننده با لاین نر عقیم مربوطه تلاقی یابند، قادر به تجدید باروری آن می‌باشند.

در آزمایش باروری دانه گرده، لاین شصتک محمدی برای لاین نرعقیم خزر A، لاین‌های IR67411-164-2-3-3-2 ، ۷۹۱۱ کیفی، IR97039-115-3-1 و Usen برای لاین نر عقیم ندا A، لاین‌های Usen و نعمت B لاین برای لاین نر عقیم IR68897 A و لاین‌های آمل۳ B و نعمت B برای لاین نرعقیم IR62829 A نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی تشخیص داده شدند. ولی در آزمایش باروری خوشه، لاین‌های ۷۹۱۱ کیفی، IR97039-115-3-1 و Usen نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی برای لاین نر عقیم ندا A و لاین‌های IR67017-180-2-1-2 ، Usen و نعمت B لاین، نگهدارنده نر عقیمی برای لاین نر عقیم IR68897A تشخیص داده شدند، در حالی که برای دو لاین نر عقیم خزر A و IR62829 A لاین نگهدارنده‌ای شناسائی نشد. بنابراین ماهیت ژنتیکی این لاین‌های نگهدارنده طوری است که می‌توان در یک برنامه تلاقی برگشتی (یا بوسیله امتزاج پورتوپلاست) اقدام به تعویض سیتوپلاسم آنها و در نتیجه آنها را ازBلاین تبدیل به A لاین (نر عقیم سیتوپلاسمی) نمود.

کلمات کلیدی: برنج هیبرید، نر عقیمی سیتوپلاسمی، اعاده کننده باروری، نگهدارنده نرعقیمی سیتوپلاسمی.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست اشکال	e
فهرست جداول	f
فصل اول: مقدمه و کلیات	۱-۱۰
۱-۱ مقدمه	۲
۱-۲ تاریخچه کشت برنج	۴
۱-۳ مبداء و انتشار برنج	۴
۱-۴ گیاهشناسی برنج	۵
۱-۵ وضعیت ژنتیکی برنج	۶
۱-۶ نرعقیمی	۷
۱-۶-۱ نرعقیمی ژنتیکی	۷
۱-۶-۲ نرعقیمی سیتوپلاسمی	۸
۱-۶-۳ نرعقیمی ژنتیکی- سیتوپلاسمی	۸
۱-۷ سیستم دو لاین	۹
فصل دوم: بررسی منابع	۱۱-۴۶
۲-۱ مقدمه	۱۲
۲-۲ سیستم‌های CMS در برنج	۱۵
۲-۳ ایجاد تنوع در CMS	۱۶
۲-۳-۱ روش‌های ایجاد تنوع در CMS	۱۷

عنوان	صفحه
۱-۱-۳-۲ هیبریداسیون داخل گونه‌ای	۱۷
۲-۱-۳-۲ جهش القائی	۱۸
۳-۱-۳-۲ هیبریداسیون بین گونه‌ای	۱۸
۴-۱-۳-۲ امتزاج پروتوپلاست	۱۹
۴-۲ شناسائی منابع CMS	۲۰
۱-۴-۲ روش کلاسیک	۲۱
۲-۴-۲ روش‌های ملکولی	۲۱
۳-۴-۲ شناسائی محصولات ترجمه میتوکندری	۲۳
۵-۲ موانع و مشکلات ایجاد تنوع سیتوپلاسمی	۲۴
۶-۲ دگرگشنی لاین‌های CMS	۲۵
۷-۲ هیبرید برنج و هتروزیس	۲۶
۸-۲ اصلاح لاین‌های والدینی	۲۷
۹-۲ قابلیت ترکیب پذیری لاین‌های CMS	۲۸
۱۰-۲ عقیمی هیبرید F_1	۲۹
۱۱-۲ کنترل ژنتیکی اعاده کردن باروری	۳۰
۱۲-۲ انتخاب لاین‌های نگهدارنده نرعقیمی سیتوپلاسمی	۳۱
۱۳-۲ انتخاب لاین‌های اعاده کننده باروری	۳۲
۱۴-۲ فراوانی لاین‌های نگهدارنده و اعاده کننده	۳۳
فصل سوم: مواد و روشها	۳۷-۴۵

عنوان	صفحه
۳-۱ مکان و زمان اجرای آزمایش	۳۸
۳-۲ سال اول	۳۸
۳-۲-۱ مواد گیاهی	۳۸
۳-۲-۲ انتخاب بوته از لاین‌های CMS بعنوان والد مادری	۳۸
۳-۲-۳ آزمون باروری دانه گرده لاین‌های CMS در آزمایشگاه	۳۸
۳-۲-۴ طرز تهیه محلول ۱٪ یدور یدید پتاسیم (IKI)	۳۹
۳-۲-۵ آماده کردن لاین CMS جهت تلاقی	۳۹
۳-۲-۶ انتخاب خوشه از لاین‌های پدری جهت تلاقی	۴۱
۳-۲-۷ تلاقی بین ارقام یا لاین‌های پدری با لاین‌های CMS	۴۱
۳-۲-۸ آزمون مجدد باروری لاین‌های CMS گرده‌افشانی شده	۴۲
۳-۲-۹ تعیین تعداد بذر تشکیل شده در هر تلاقی	۴۲
۳-۳ سال دوم	۴۲
۳-۳-۱ مواد گیاهی	۴۲
۳-۳-۲ آزمون باروری دانه گرده نتاج هیبرید در آزمایشگاه	۴۳
۳-۳-۳ آزمون باروری نتاج هیبرید در مزرعه	۴۳
۳-۳-۴ مقایسه نتایج آزمون باروری دانه گرده و خوشه	۴۳
۳-۳-۵ شناسائی لاین‌های اعاده کننده نر باروری (R لاین)	
و نگهدارنده نرعقیمی (B لاین)	۴۴
۳-۳-۶ تعیین فراوانی لاین‌های نگهدارنده و اعاده کننده	۴۴

عنوان	صفحه
۴-۳ تجزیه آماری و طرح آزمایشی	۴۴
۴-۵ انتقال سیتوپلاسم نرعقیم (CMS) به لاین‌های نگهدارنده	۴۵
فصل چهارم: نتایج و بحث	۴۶-۵۹
۴-۱ دورگ‌گیری	۴۷
۴-۲ طبقه‌بندی لاین‌های پدری	۴۹
۴-۲-۱ لاین‌های اعاده کننده باروری	۴۹
۴-۲-۲ لاین‌های نگهدارنده نرعقیمی سیتوپلاسمی	۵۲
۴-۳ تجزیه واریانس	۵۸
۴-۴ انتقال نرعقیمی سیتوپلاسمی به لاین‌های نگهدارنده	۵۹
پیشنهادات	۶۱
فصل پنجم: منابع	۶۲-۷۰
الف- منابع فارسی	۶۳
ب- منابع خارجی	۶۳

فهرست اشکال

عنوان شکل **صفحه**

شکل ۱-۴. دانه‌های گرده هیبرید حاصل از تلاقی یک لاین اعاده کننده باروری (الف) و یک لاین اعاده کننده نسبی (ب) با یک لاین نر عقیم سیتوپلاسمی ۵۱

شکل ۲-۴. دانه‌های گرده هیبرید حاصل از تلاقی یک لاین نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی (الف) و یک لاین نگهدارنده نسبی (ب) با یک لاین نر عقیم سیتوپلاسمی ۵۴

شکل ۳-۴. . توزیع فراوانی لاین های مطالعه شده از نظر باروری و یا عقیمی ۵۹

فهرست جداول

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۱-۳. فهرست لاین‌های پدری مورد استفاده برای شناسائی لاین‌های اعاده کننده باروری و نگهدارنده نرعقیمی سیتوپلاسمی ۳۹

جدول ۲-۳. فهرست لاین‌های مادری نرعقیم سیتوپلاسمی مورد استفاده در تلاقی با لاین‌های پدری ۴۰

جدول ۱-۴. فهرست تلاقی‌های انجام شده و درصد دانه تشکیل شده پس از دورگ‌گیری ۴۸

جدول ۲-۴. والدین پدری اعاده کننده باروری و میزان باروری دانه گرده و خوشه هیبرید مربوطه ۴۹

جدول ۳-۴. لاین‌های نگهدارنده شناسائی شده و درصد باروری دانه گرده و خوشه هیبریدهای مربوطه ۵۳

جدول ۴-۴. وضعیت باروری دانه گرده و خوشه در هیبریدهای مورد آزمایش ۵۶

جدول ۵-۴. تجزیه واریانس دو صفت باروری گرده و خوشه در قالب طرح کامل تصادفی (بترتیب با ۵ و ۳ تکرار) روی داده‌های تبدیل شده ۵۹

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

در کشور ما و کشورهای متکی بر اقتصاد تک محصولی نفت، به دلیل تمام شدن ذخایر نفت در آینده نه چندان دور و نوسان قیمت آن، زنگ خطرهای بسیاری به صدا در آمده است که تأمین غذا را با مشکل جدی مواجه خواهد نمود. لذا به منظور تأمین غذای جمعیت رو به رشد در ۴۰ سال آینده بایستی تولیدات غذایی سه برابر گردد و راهی جز افزایش تولید محصول در سیستم کشاورزی نمی‌باشد. بدلیل محدود بودن زمین های زراعی و کمبود سطح زیر کشت و نیز کمبود شدید آب، بدون تردید باید تولید را در واحد سطح از طریق بهزراعی یا بهنژادی افزایش داد. در بهنژادی، متخصص اصلاح نبات با آگاهی از ماهیت ژنتیکی گیاه به دستکاری ساختمان ژنتیکی آن مبادرت و در نهایت به یک لاین نوترکیب جدید با پتانسیل عملکرد بالا دست می‌یابد ولی این لاین علی‌رغم برخورداری از پتانسیل عملکرد بالا، بدلیل خالص بودن در تمامی مکانهای ژنی از پدیده هتروزیس که در نسل اول حاصل از تلاقی دو لاین خالص یا هیبرید F_1 به تظاهر می‌رسد، محروم است (نعمت زاده ۱۳۷۵، نعمت زاده و تریز ۱۳۸۰، نعمت زاده و ولیزاده ۱۳۸۰). لذا برای نیل به این هدف، اصلاح کنندگان نبات باید همواره بدنبال یافتن ارقام با عملکرد بالا باشند. دستیابی به خود کفایی در تولید برنج و حفظ ثبات قیمت آن از جمله اهداف مهم در کشورهای کم درآمدی است که برنج بعنوان تنها غذای اصلی، اساس تأمین نیازهای غذایی بوده و برای مردم فقیر و آسیب پذیر این کشورها، شغل و درآمد ایجاد می نماید (حسین ۱۹۹۵). . بیش از ۹۰٪ برنج مورد نیاز مردم دنیا در آسیا تولید می شود که بیانگر نقش مهم این محصول در تأمین غذای مردم آسیا است (بلاسوبرامانیان و همکاران ۱۹۹۹). تا سال ۲۰۳۰ تولید برنج باید بمیزان ۷۰٪ بیش از برنج تولیدی در سال ۱۹۹۵ باشد تا بتواند جوابگوی تقاضای جمعیت در حال افزایش و بالا رفتن سطح درآمدها باشد. افزایش پتانسیل عملکرد ارقام برنج، یک استراتژی مهم در این راستا می باشد. از جمله راههای ژنتیکی جهت افزایش تولید، توسعه تیپ های گیاهی جدید مبتنی بر دستکاری ژنتیکی و فیزیولوژیکی، استفاده از ابزار جدید زیستی جهت افزایش عملکرد پتانسیل و بهره مندی از هتروزیس عملکرد می باشد. از میان این گزینه

ها، عملی ترین راه جهت افزایش تولید، تکنولوژی برنج هیبرید (یـا بعبـارتی اسـتفاده از هـتروزیس) می‌باشد (پارودا ۱۹۹۸، ویرمانی و همکاران ۱۹۸۲، ویرمانی ۱۹۸۷، یوهان و ویرمانی ۱۹۸۸). از آنجـا که برنج گیاهی است خودگشن، لذا برای تولید دگرگشنی در آن باید از سیستم نر عقیم سیتوپلاسمی استفاده کرد، بطوری که لاین نر عقیم قادر به تولید دانه گرده بارور نباشد، تا از این طریق نیاز بـه دو رگه گیری دستی برطرف گردد. استفاده از پدیده هتروزیس یا رشد عالی هیبرید، در تولید واریته های هیبرید، یکی از راههای افزایش تولید در واحد سطح می باشد. تکوین تکنولوژی برنج هیـبرید توسـط چینی ها در دهه ۱۹۷۰، نشان داد که استفاده از برنج هیبرید می‌تواند عملکرد را به میزان ۱۵ تا ۲۰٪ افزایش دهد (یوهان ۱۹۷۷، لیـن و یـان ۱۹۸۰، یوهـان و همکـاران ۱۹۸۹، ۱۹۹۴) . از آنجـا کـه نـر عقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی یکی از ابزار عمده برای اصلاح برنج هیبرید می‌باشد، اصلاح لاین های نر عقیم از منابع سیتوپلاسمی متفاوت، مهم است (پرادهان ۱۹۹۰a). از طرفی اساس کـار اصـلاح برنـج هیبرید، غربال و شناسائی لاین های نگـهدارنده نـر عقیمـی و اعـاده کننـده بـاروری بـالقوه می‌باشـد (ایکه‌هاشی و همکاران ۱۹۹۸). پس از معرفی یا اصلاح لاین های نر عقیم سیتوپلاسـمی محلـی، گـام بعدی ارزیابی و شناسایی لاین هایی است که عقیمی لاین CMS را نگهداری یا باروری را در هیبریدها تجدید نمایند. برای حصول این هدف، غربال ژرم پلاسم در منطقه مورد نظر جهت یـافتن ایـن ژن‌هـا ضروری می باشد (پینگالی ۱۹۹۸).

بنابراین برای نگهداری لاین های نر عقیم سیتوپلاسمی نیاز به لاین هـایی مـی باشـد کـه در ترکیب با آنها تولید نتایج نر عقیم نمایند. همچنیـن بـرای سـود جسـتن از پدیـده هـتروزیس جـهت افزایش عملکرد در نتاج هیبرید، باید لاین هایی را پیدا کرد که در ترکیب با لاین نر عقیم، اولاً باروری را به آن برگردانند، ثانیاً تولید نتاجی نمایند که از هتروزیس بالایی برخوردار باشـند. در ایـن تحقیـق هدف ما یافتن لاین های نگهدارنده نر عقیمی سیتوپلاسمی، یافتن لاین های اعـاده کننـده بـاروری و انجام مراحـل اولیـه انتقـال نرعقیمـی سـیتوپلاسـمی و در نتیجـه ایجـاد تنـوع در منـابع نـر عقیـم سیتوپلاسمی از طریق تلاقی برگشتی نتاج نر عقیم با لاین های نگهدارنده، بوده است.