به نام حضرت دوست

۴۶۱۷۵

بسمه تعالی

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی

عنوان:

تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته برای ژن های مقاومت به شوری

اساتید راهنما:

دکتر علی حق نظری **دکتر علی مومنی**

اساتید مشاور:

دکتر بهزاد قره یاضی **مهندس علی اکبر عبادی**

تحقیق و پژوهش:

سیده آمنه روحانی

اسفند ۸۶

۱۳۸۷ /۲/ ۱۹

۴۶۱۷۵

تقدیم به اسوه های عشق و فداکاری

پدر و مادر عزیزم

سپاس بیکران پروردگارم که در لحظه لحظه از زندگی ام مرا از رحمت بی دریغش بهره مند ساخت و تا کنون که این سطور را می نگارم لحظه ای این بنده ناچیز را به حال خود وا مگذاشت. از پدر و مادر مهربانم به خاطر محبت، پشتیبانی ، صبر و شکیبایی شان در زندگی و دوران تحصیلم سپاسگزارم. از خواهر و برادر عزیزم ممنونم که در این دوران دوستان خوبی برایم بودند. از همسرم که دوست خوب ایام پریشانی ام در روز های واپسین اجرای این پایان نامه بود سپاسگزارم.

از تمام کسانی که در اجرای این پایان نامه از حضورشان بهره بردم اساتید راهنمای محترم آقایان دکترعلی حق نظری و دکتر علی مومنی به خاطر قبولی راهنمایی این پایان نامه و آقایان مهندس علی اکبر عبادی و دکتر بهزاد قره یاضی بابت مشاوره اینجانب در طول مراحل اجرایی تحقیق ممنون و متشکرم.

از کارکنان محترم موسسه تحقیقات برنج کشور خانمها مهندس نویریان ، اقلیدی ، یکتا، کاتوزی و آقایان مهندس دادرس، ترابی، شفیعی، نحوی، صبوری، عادلی و همه کسانی که در طول اجرای این تحقیق از تجربیاتشان استفاده کردم سپاسگزارم. از اساتید محترم گروه زراعت واصلاح نباتات که در طول شش سال تحصیلم در آن دانشکده از محضرشان علم آموختم و خانم مهندس عظیم خانی مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک متشکرم. از تمام دوستان ، همکلاسی ها و هم دوره ای ها یم که حضورشان این مقطع از تحصیل را برایم پرخاطره و دلنشین ساخت متشکرم.

سیده آمنه روحانی

اسفند ۸۶

تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته برای ژن های مقاومت به شوری

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی زیر مجموعه ای از ژرم پلاسم برنج ایرانی با استفاده از ۱۰ نشانگر ریز ماهواره که به فاصله صفرتا ۸ سانتی مورگان از ژن مقاومت به شوری قرار گرفتند، همچنین ۴ صفت مورفولوژیکی مرتبط با تنش شوری در مرحله گیاهچه ای طراحی شده است. گیاهچه های ۵۹ ژنوتیپ در محلول غذایی یوشیدا رشد کردند. دو سطح شوری با هدایت الکتریکی ۰/۹ دسی زیمنس بر متر (نرمال) و ۱۲ دسی زیمنس بر متر اعمال شد. از ۵۹ ژنوتیپ در ۱۰ جایگاه ریز ماهواره ۶۰ الل حاصل شد. محاسبه شباهت ژنتیکی با داده های مولکولی با استفاده از ضریب Yule و روش گروه بندی UPGMA ژنوتیپ ها را به ۵ دسته تقسیم کرد و با استفاده از داده های مورفولوژیک، ضریب فاصله اقلیدسی و روش گروه بندی UPGMA این ژنوتیپ ها به ۷ گروه در نرمال و ۹ گروه در شرایط اعمال شوری تقسیم شدند. با استفاده از رگرسیون لوجستیک ارتباط هر کدام از ۴ صفت در شاهد و تنش با هر کدام از جایگاه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در شاهد هر ۱۰ جایگاه و در تنش ۴ جایگاه ارتباط معنی دار حداقل با یکی از ۴ صفت داشتند. ۴ جایگاه شناسایی شده تحت تنش ممکن است پس از ارزیابی لازم برای اصلاح به کمک نشانگر مفید باشند.

کلید واژگان: برنج، تنوع ژنتیکی، شوری، ریزماهواره،

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول :مقدمه	
مقدمه	۱
فصل دوم: کلیات وبررسی منابع	
۱-۲- تاریخچه واهمیت کشت برنج	۳
۲-۲- مشخصات گیاه شناسی برنج	۴
۳-۲- مشخصات ژنتیکی برنج	۴
۴-۲- اهمیت برنج در تحقیقات مولکولی	۵
۵-۲- ردیف های تکرار شونده	۷
۱-۵-۲- ریزماهواره	۷
۲-۵-۲- مکانیسم های مختلف در ایجاد چند شکلی در ریزماهواره	۹
۶-۲- اهمیت شوری در ارتباط با محصولات زراعی	۱۰
۷-۲- اهمیت شوری در ارتباط با برنج	۱۱
۸-۲- ژنتیک مقاومت به شوری	۱۳
۹-۲- مروری بر تحقیقات صورت گرفته در زمینه تنوع ژنتیکی با توجه به صفت تحمل شوری در برنج	۱۴
۱۰-۲- مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی ژن های تحمل به شوری	۱۵
فصل سوم: مواد و روش ها	
۱-۳- بررسی صفات مورفولوژیک وفیزیولوژیک	۱۸
۱-۱-۳- مواد گیاهی	۱۸
۲-۱-۳- صفات مورد بررسی	۱۸
۳-۱-۳- جوانه زنی بذور	۱۸
۴-۱-۳- تهیه ظروف کشت	۱۹
۵-۱-۳- تهیه محلول غذایی یوشیدا	۱۹
۶-۱-۳- شرایط رشد گیاه	۱۹
۷-۱-۳- اندازه گیری صفات	۲۱
۸-۱-۳- محتوای نسبی آب گیاه	۲۲
۹-۱-۳- نمره ارزیابی استاندارد	۲۳
۲-۳- بررسی های مولکولی	۲۶
۱-۲-۳- نمونه برداری	۲۶
۲-۲-۳- استخراج دی.ان.اِ	۲۶

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۳-۲-۳-روش تهیه محلول های مادری (STOCK)	۲۸
۴-۲-۳- تعیین کمیت وکیفیت دی.ان.اِ استخراج شده	۲۹
۵-۲-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)	۳۰
۶-۲-۳- تفکیک قطعات تکثیر یافته	۳۳
۱-۶-۲-۳- آماده کردن شیشه ها	۳۳
۲-۶-۲-۳- ساخت ژل پلی اکریلامید	۳۴
۳-۶-۲-۳- الکتروفورز	۳۵
۷-۲-۳- رنگ آمیزی	۳۷
۱-۷-۲-۳- تثبیت	۳۷
۲-۷-۲-۳- آبشویی	۳۷
۳-۷-۲-۳- اشباع کردن سطح ژل با نیترات نقره	۳۷
۴-۷-۲-۳- آبشویی بسیار حساس	۳۸
۵-۷-۲-۳- ظهور	۳۸
۶-۷-۲-۳- توقف	۳۸
۷-۷-۲-۳- آبشویی انتهایی	۳۸
۳-۳- روشهای آنالیز داده ها	۴۱

فصل چهارم: نتایج

۱-۴- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین	۴۳
۱-۱-۴- مقایسه میانگین ارقام از نظر نمره تحمل به شوری	۴۶
۲-۱-۴- نتایج مقایسه میانگین سطوح کنترل و تنش در ۱۰ رقم حساس و ۱۰ رقم متحمل	۴۸
۲-۴- نتایج همبستگی بین صفات	۵۰
۳-۴- آماره های توصیفی جمعیت	۵۱
۱-۳-۴- ضریب تنوع ژنی یا متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (PIC)	۵۳
۲-۳-۴- الل های نادر	۵۴
۳-۳-۴- آماره های F	۵۶
۴-۴- تجزیه خوشه ای داده های مورفولوژیک	۵۷
۵-۴- نتایج تجزیه خوشه ای داده های مولکولی به روش UPGMA با نرم افزار NTSYS	۶۱
۶-۴- نتایج رگرسیون لوجستیک	۶۳

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بررسی نتایج تجزیه واریانس ۶۷

۵-۲- بررسی نتایج تجزیه خوشه ای و رگرسیون ۶۹

۵-۳- پیشنهادات ۷۲

منابع ۷۴

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول۱-۳. نمره ارزیابی استاندارد	۲۳
جدول۲-۳. ارقام و ژنوتیپ ها ی برنج مورد استفاده در تحقیق که از موسسه تحقیقات برنج تهیه گردیدند	۲۴
جدول۳-۳. تهیه محلول های لازم	۲۸
جدول۴-۳. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)	۳۰
جدول ۵-۳. برنامه ریزی چرخه دمایی برای واکنش PCR	۳۱
جدول۶-۳مشخصات ۱۰ آغازگر مورد استفاده در تحقیق	۳۲
جدول ۷-۳ . ترکیبات محلول باند سیلن	۳۴
جدول ۸-۳. ژل مورد استفاده در این تحقیق به شرح زیر تهیه شد	۳۵
جدول۹-۳ . مراحل رنگ آمیزی ژل اکریل آمید به روش نیترات نقره	۳۹
جدول ۱-۴. جدول تجزیه واریانس داده های به دست آمده از صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک	۴۳
جدول ۲-۴. نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک	۴۴
جدول ۳-۴. اطلاعات به دست آمده از مقایسه میانگین نمره مقاومت ۵۹ نمونه مورد بررسی	۴۷
جدول۴-۴ . نتایج مقایسه میانگین سطوح کنترل و تنش ۱۰ رقم متحمل	۴۸
جدول۵-۴ . نتایج مقایسه میانگین سطوح کنترل و تنش ۱۰ رقم حساس	۴۹
جدول۶-۴. اسامی نمونه هایی که در چهار صفت مورد بررسی برتر بودند	۴۹
جدول ۷-۴. همبستگی بین صفات در کنترل	۵۰
جدول۸-۴. همبستگی بین صفات در تنش	۵۰
جدول ۹-۴. مشخصات و اطلاعات به دست آمده از ۱۰ جایگاه ریزماهواره در ۵۹ نمونه ژرم پلاسم برنج	۵۳
جدول ۱۰-۴. هتروزیگوسی مورد انتظار در جایگاههای مورد بررسی	۵۴
جدول ۱۱-۴. اللهای نادر مشاهده شده در نمونه های اصلاحی و بومی	۵۵
جدول۱۲-۴. مقادیر آماره های F_{IS}، F_{IT} و F_{ST} در جایگاههای ا ستفاده شده در این تحقیق	۵۶
جدول ۱۳-۴. اسامی جایگاه ها و تعداد الل هایی که درکنترل با صفات رگرسیون معنی دار تشکیل دادند	۶۳
جدول ۱۴-۴. اسامی جایگاه ها و تعداد الل هایی که در شرایط تنش با صفات رگرسیون معنی دار تشکیل دادند	۶۴
جدول ۱۵-۴. جایگاهها و الل هایی که با صفات رگرسیون معنی دار در کنترل و تنش دارند	۶۵
جدول ۱۶-۴. جایگاههایی که بیشترین رگرسیون را با صفات داشتند	۶۵

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

شکل ۱-۳. ۲۰
شکل۲-۳. ۲۱
شکل ۳-۳. ۲۲
شکل۱-۴. تصویر ژل اکریل آمید نشانگرRM562 ۵۱
شکل۲-۴. تصویر ژل اکریل آمید نشانگر Rm315 ۵۲
شکل ۳-۴. دندروگرام داده های مورفولوژیک (شاهد) ۵۸
شکل ۴-۴. دندروگرام داده های مورفولوژیک (تنش) ۶۰
شکل ۵-۴. دندروگرام حاصل از داده های مولکولی جایگاه هـای مـورد اسـتفاده در تحقیق ۶۲

فصل اول

مصر

برنج (*Oryza sativa* L.) دومین غله مهم جهان است و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم دنیا به خصوص کشورهای در حال توسعه را تشکیل می دهد . این گیاه مهم ترین زراعت نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری می باشد به طوری که ۹۵ درصد محصول برنج دنیا در چین، هند و آسیای جنوب شرقی تولید می شود و در عین حال اغلب در همان جا نیز مصرف می شود.

شوری مهم ترین مساله خاک در کشورهای برنج خیز است (گریگوریو، ۱۹۹۷) و نود درصد از شالیزارهای دنیا نیز به نوعی متاثر از شوری هستند (ان، ۱۹۹۷). به دلیل تغییرات آب و هوایی در اثر افزایش درجه حرارت و در نتیجه تبخیر بیشتر، بالا آمدن سطح آب دریا و استفاده از اراضی حاشیه ای برای تامین غذای بیشتر که معمولا تحت تنش شوری هستند، مشکل شوری در آینده جدی تر خواهد بود (مرادی، ۲۰۰۲).

بررسی اثرات شوری در برنج بیش از ۵۰ سال تحت مطالعه بوده است (لی، ۱۹۹۹). بهترین راهبرد برای افزایش عملکرد در اراضی تحت تاثیر شوری ، استفاده از واریته های متحمل به شوری (لانگ، ۲۰۰۳) و اعمال مدیریت آب و خاک است (گریگوریو و سنادهیرا، ۱۹۹۳).

با توجه به این نکته که اساس موفقیت هر برنامه اصلاحی بر وجود تنوع ژنتیکی استوار است، بنابراین اولین گام در هر برنامه اصلاحی وجود تنوع کافی، ارزیابی و انتخاب تنوع مطلوب می باشد.

بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان، از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی همواره متداول بوده است. ارزیابی فنوتیپی به دلیل اثرات محیط روی بیان ژن ممکن است روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوت های ژنتیکی نباشد. نشانگرهای مولکولی دی.ان.اِ. که قادرند تفاوتهای ژنتیکی را در سطح مولکول دی.ان.اِ ثبت نمایند وسیله مطمئن تری برای دستیابی به تفاوتهای ژنتیکی محسوب می شود و امروزه محققین زیادی در دنیا از این روش برای اهداف مختلف استفاده می کنند (قره یاضی، ۱۳۷۵).

در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره که توسط محققین به عنوان نشانگرهای پیوسته با ژنهای تحمل به شوری گزارش شده اند و برخی صفات مرتبط با تحمل با شوری سعی شده است تا:

۱- تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ های برنج در دسترس که عمدتاً ایرانی بودند در سطح مولکـولی با استفاده از نشانگرهای مذکور مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- باندازه گیری صفات مورفولوژیکی مرتبط با تحمل به شوری، تنوع و تحمل این ژنوتیپ ها مورد بررسی قرار گیرد.

۳- ارتباط بین منابع مقاومت و صفات مورفولوژیک مورد تحقیق قرار گیرد.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۱-۲- تاریخچه واهمیت کشت برنج

برنج (*Oryza sativa* L.) بعد از گندم مهم ترین گیاه زراعی دنیا بوده و از قدیمی ترین گیاهانی است که در دنیا کشت می شده است. مبدا پیدایش برنج در آسیا از جمله هندوستان و چین می باشد. این گیاه حدود ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد در چین به صورت دیم کشت می شده است.

زراعت برنج در ایران از زمان های بسیار دور معمول بوده وتاریخ کشاورزی نشان می دهد که زمان هخامنشیان در ایران کشت می شد و در دوره اشکانیان نیز در گیلان، مازندران و خراسان زراعت آن معمول بوده است (اخوت، ۱۳۷۶).

سطح زیر کشت برنج در سال ۲۰۰۰ حدود ۱۵۴ میلیون هکتار با تولید جهانی ۵۹۹ میلیون تن شلتوک بوده که رتبه دوم را پس از گندم از نظر سطح زیر کشت و رتبه اول را از نظر میزان تولید به خود اختصاص داده است (آمارنامه کشاورزی، وزارت جهادکشاورزی، ۱۳۸۰). درایران نیز برنج جایگاه ویژه ای دارد به طوری که قسمت اعظم غذای مردم ایران به خصوص استان های گیلان و مازندران را به خود اختصاص می دهد . سطح زیر کشت انواع مختلف شلتوک در کل کشور حدود ۵۵۰ هزار هکتار با تولید ۲/۱۱۵ میلیون تن برآورد گردیده که استان مازندران ۲۱ هزار هکتار معادل ۳۷/۸ درصد از اراضی تحت کشت برنج و نیز میزان ۳۹/۸ درصد تولید کل برنج را در اختیار داشته و پس از آن استان گیلان با ۳۵/۵ درصد اراضی برنج کاری و ۳۴/۲ درصد تولید کل برنج در مقام دوم قرار دارد و استان های گلستان، خوزستان و فارس به ترتیب رتبه های سوم تا پنجم را به خود اختصاص داده اند. متوسط عملکرد انواع شلتوک در کشور ۳۸۰۰ کیلوگرم در هکتار برآورد شده و بیش ترین وکم ترین راندمان تولید به ترتیب ۵۹۱۰ و ۱۵۰۰ کیلو گرم در هکتار متعلق به استان های کهکیلویه وبویر احمد و اردبیل می باشد. http://www.fao.org

۲-۲- مشخصات گیاه شناسی برنج

برنج از گیاهان مهم تیره غلات Graminae می باشد که دارای جنس وگونه های متنوعی است . مهم ترین جنس آن اوریزا *Oryza* و گونه زراعی مهم آن ساتیوا *sativa* می باشد که جنس ساتیوا دارای حدود ۲۵ گونه مختلف است. برنج گیاهی تک لپه ، خودگشن، یک ساله می باشد. سیستم ریشه ای آن گسترده افشان بوده و گل آذین آن به صورت خوشه مرکب است (اخوت، ۱۳۷۶).

۲-۳- مشخصات ژنتیکی برنج

تاکنون شش نوع ژنوم مختلف برای برنج تشخیص داده شده است، که گونه زراعی *اوریزا ساتیوا* دارای ژنوم AA با تعداد کروموزوم ۲n =۲x= ۲۴ می باشد. منشا آن جنوب و جنوب شرقی آسیا است و به همین دلیل بیش ترین تنوع از برنج زراعی بومی در این نواحی یافت می شود . هم چنین این گونه درآسیا ، امریکا و اروپا نیز کشت می شود . طبقه بندی برنج بر اساس صفات ظاهری و مورفولوژیک، آن ها را به انواع تیپ های زراعی ژاپونیکا[1] ، ایندیکا[2] و جاوانیکا [3] تقسیم کرده، گروه های ژاپونیکا و جاوانیکا متعلق به نواحی گرمسیری و معتدل بوده و در یک گروه به نام ژاپونیکا قرار گرفته اند (هنر نژاد، ۱۳۷۲؛ اخوت، ۱۳۷۶).

برنج های ایندیکا و ژاپونیکا دو زیر گروه اصلی *Oryza sativa* می باشند. آن ها از نظر خصوصیات مورفولوژیک، شیمیایی و فیزیو لوژیکی تفاوت دارند و این اختلاف باعث گردیده تا به طور وسیع از این گیاه در طبقه بندی ارقام جهت تعیین برنج های قابل دسترس به زیر گونه های مناسب استفاده به عمل آید (تسنودا وتاکاهاشی، ۱۹۸۴؛ زو و همکاران، ۱۹۹۸).

[1] japonica
[2] indica
[3] javanica

۴-۲- اهمیت برنج در تحقیقات مولکولی

در بین غلات برنج دارای کوچک ترین ژنوم از نظر اندازه (۳۴۰ میلیون جفت باز) مـی باشـد و ایـن امـر سبب گردیده است تا برنج به عنوان گیاه زراعی ایده آل در تحقیقات تکـاملی غـلات و گونـه هـای مهـم زراعی مورد استفاده فراوان قرار گیرد (دش و همکاران، ۱۹۹۶).

بنت و اسمیت اعلام داشتند که با این که غلات مختلف از یک جد مشترک منشا گرفته اند ولی اختلافـات زیادی در اندازه ژنوم آن ها دیده می شود. دلایلی دیگر نیز وجود دارد تا برنج ماده آزمایـشی خـوبی بـرای کاربرد نشانگرهای مولکولی باشد (زا و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ داویروالا و همکاران، ۲۰۰۰).

برنج دومین غله مهم دنیا می باشد و غذای بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را تامین مـی کنـد. بـه علـت قابلیت رشد در شرایط محیطی متفاوت امکان بررسی و مطالعه آن در محیط هـای مختلـف وجـود دارد. تنوع واریته های زراعی برنج بیش از سایر گیاهان زراعی می باشد.مجموعه ژرم پلاسم بـرنج دارای بـیش از ۱۲۰۰۰۰ واریته می باشد.

این نکات از دلایلی است که باعث گردیده محققین تحقیقات خود را روی این گیاه متمرکز سـازند. از آن جا که تنوع، ماده خام اصلاح نباتات می باشد و این گیاه دارای تنوع وسیع ژنتیکی و دامنه سازگاری بـالا می باشد، لذا لازمه اتخاذ روشهای مناسب در جهت اصلاح و معرفی ارقام کیفی با عملکـرد بـالا نیـاز بـه شناخت صحیحی از تنوع و ماهیت آن می باشد (زو و همکاران، ۱۹۹۸ ؛ سکند و همکاران، ۱۹۹۱).

یک رویکرد مهم در اصلاح نباتات افزایش تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ های والدینی برای تلاقی است. تنـوع ژنتیکی بین ژنوتیپ های والدینی معمولا به وسیله تفاوت های مورفولوژیکی وفیزیولوژیکی صـفات مهـم اقتصادی و کمی ارزیابی می شود. معایب این شیوه مرسوم وقت گیر بودن، سخت بـودن و تـاثیر عوامـل محیطی در خلال اندازه گیری می باشد. اغلب، این زیان ها در اصلاح برای شوری شدیدتر است. مثلاً هر تغییری در محیط، مثل دما، نور یا رطوبت می تواند به طور قابل ملاحظه ای نیروهـای ناشـی از تعـرق و در نهایت جذب یون را تغییر دهد (ییا و همکاران، ۱۹۹۰؛ فلاورز و همکاران، ۱۹۹۷؛ زنگ و همکـاران، ۲۰۰۴). چنین تغییراتی ممکن است تحمل به شوری در میان ژنوتیپ ها را تغییر دهـد. توجـه بـه ایـن

نکته مهم است که صفات مورفولوژیک اغلب در تعداد محدود هستند و ممکن است ارتباط ژنتیکی حقیقی بین ژنوتیپ ها را به خوبی نشان ندهند.

برعکس، تفاوت ژنتیکی بر اساس چند شکلی (پلی مورفیسم) دی.ان.اِ زیاد بوده و مستقل از عوامل محیطی می باشد. علاوه بر این، وقتی صفات کمی بررسی می شود، مقدار زیاد نمونه برای ارزیابی ژنوتیپ ها لازم است. در مقابل، وقتی آنالیز چندشکلی دی.ان.اِ صورت می گیرد ، مقدار نمونه کمی می تواند آگاهی بخش باشد. بنابراین سنجش های نشانگرهای دی.ان.اِ می تواند کم تر وقت گیرد و کم زحمت تر باشد. در تعیین و تشخیص تنوع ژنتیکی، نشانگرهای دی.ان.اِ که ژنوتیپ ها را متمایز می سازند، قابل اعتمادتر و راحت تر می باشند (زنگ و همکاران، ۲۰۰۴).

از میان نشانگرهای دی.ای.اِ. نشانگرهای ریزماهواره (میکروستلایت) به طور موثری برای تعیین تنوع ژنتیکی بین ارقام برنج مورد استفاده قرار گرفته اند (یانگ و همکاران، ۱۹۹۴؛ گارلند و همکاران، ۱۹۹۹).

۵-۲- ردیف های تکرار شونده

در یوکاریوت ها ردیف های رمز شونده[1] فقط بخش محدودی از دی.ان.اِ را در بر می گیرند. در حقیقت بخش عمده دی.ان.اِ. را ردیف های غیر رمز شونده [2] تشکیل می دهند که عمل و نقش آن ها دقیقا مشخص نشده است. قسمت عمده ردیف های غیر رمزشونده را دی.ان.اِ تکراری یا ردیف های پشت سر هم تکرار شونده[3] تشکیل می دهند. ردیف های تکرارشونده بر اساس اندازه واحد تکرار به ماهواره ها[4] ، ماهوارک ها[5] و ریزماهواره ها[6] تقسیم می شوند. (نقوی، ۱۳۸۴).

۱-۵-۲- ریزماهواره

ریزماهواره ها یا ردیف های تکراری ساده (اس.اس.آر) گروهی از ردیف های تکرارشونده اند که با نام های مختلف همچون تفاوت طول ردیف های ساده[7] ، ردیف های کوتاه تکراری ، موتیف های با ردیف های ساده[8] ، نیز خوانده می شوند. اصطلاح ریزماهواره ابتدا توسط لیت ولوتی[9] در سال ۱۹۸۹ به کار برده شد.

ریزماهواره ها شامل واحدهای تکی ، دوتایی سه تایی، چهار تایی، پنج تایی یا شش تایی تکرار شونده اند که در ژنوم بیشتر یوکاریت ها پراکنده اند. به طوری که در هر ده کیلو جفت باز از ردیف دی.ان.اِ دست کم یک ردیف ریزماهواره ای دیده می شود. ردیف های ریزماهوارهای غیر پایدارند و با کاهش یا افزایش واحدهای تکرارشونده دچار تغییرات فراوان در طول می شوند (نقوی، ۱۳۸۴).

---

1 Coding sequence
2 Non coding sequence
3 tandom repetitive DNA
4 satellites
5 minisatellites
6 Microsatellites
7 simple sequence lenghth polymorphism(sslp)
8 simple sequence motifs
9 litt and luty

تنوع در تعداد تکرار ریزماهواره ها که به کمک پی.سی.آر و الکتروفورز قابل آشکارسازی اند، موجب شده است که از ریزماهواره ها به عنوان ابزار مولکولی با پتانسیل بسیار زیاد برای تشخیص های ژنومی در آزمایشگاه ها استفاده شود.

طول ریزماهواره ها معمولاً کمتر از صد جفت باز بوده و توسط دو ردیف منحصر به فرد در دو طرف محدود شده است. این ریزماهواره ها با روش های پیچیده زیست شناسی مولکولی و با هزینه زیاد شناسایی و ردیف های مجاور آن ها تعیین می شوند، سپس بر اساس ردیف های احاطه کننده هر ریزماهواره آغازگرها طراحی وساخته می شوند (نقوی، ۱۳۸۴).

ریز ماهواره ها در اصلاح تعدادی از گونه ها از قبیل برنج، جو، انگور، کلم، سویا و ذرت به کار گرفته شدند (اسمیت وهمکاران، ۱۹۹۲؛ زا و همکاران، ۱۹۹۲؛ ا سمیت،۱۹۹۲ ؛ زا و همکاران ۱۹۹۳؛ وو و همکاران، ۱۹۹۳ ؛ تمنک و همکاران، ۲۰۰۰).

محققین در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار توانستند تعداد کمی ریزماهواره در توالی های انتشار یافته برنج شناسایی کرده و بر اساس ردیف های بازی مجاور آن ها اقدام به طراحی وساخت آغازگرها نمایند. تا کنون ۲۲۴۰ جایگاه (لوکوس) ریزماهواره در برنج شناسایی شده است و هر روز تعداد بیشتری از این جایگاه ها شناسایی می شوند. مک کوش وهمکاران (۲۰۰۲) اظهار کردند که به طور تخمین ۱۰۰۰۰-۵۷۰۰ ریزماهواره در برنج وجود دارد. در بررسی آن ها نقشه ای شامل ۱۲۰ نشانگر نشان می دهد که این ماهواره ها در سراسر ژنوم برنج توزیع شده اند.(مک کوش و همکاران ۲۰۰۲ ؛ اریف و همکاران، ۲۰۰۲).

برخی از محققین ذکر کردند که چند شکلی ریزماهواره ها در برنج چندین برابر بیشتر از چندشکلی نشانگر آر.اِف.اِل.پی.[1] می باشد. بنابر این برای طبقه بندی ارقامی که قرابت ژنتیکی بیشتری با هم دارند استفاده از نشانگر ریزماهواره بسیار بهتر از نشانگرهایی مثل آر.اِف.اِل.پی. می باشد چرا که در مورد

[1] Restriction fragment length polymorphism (RFLP)