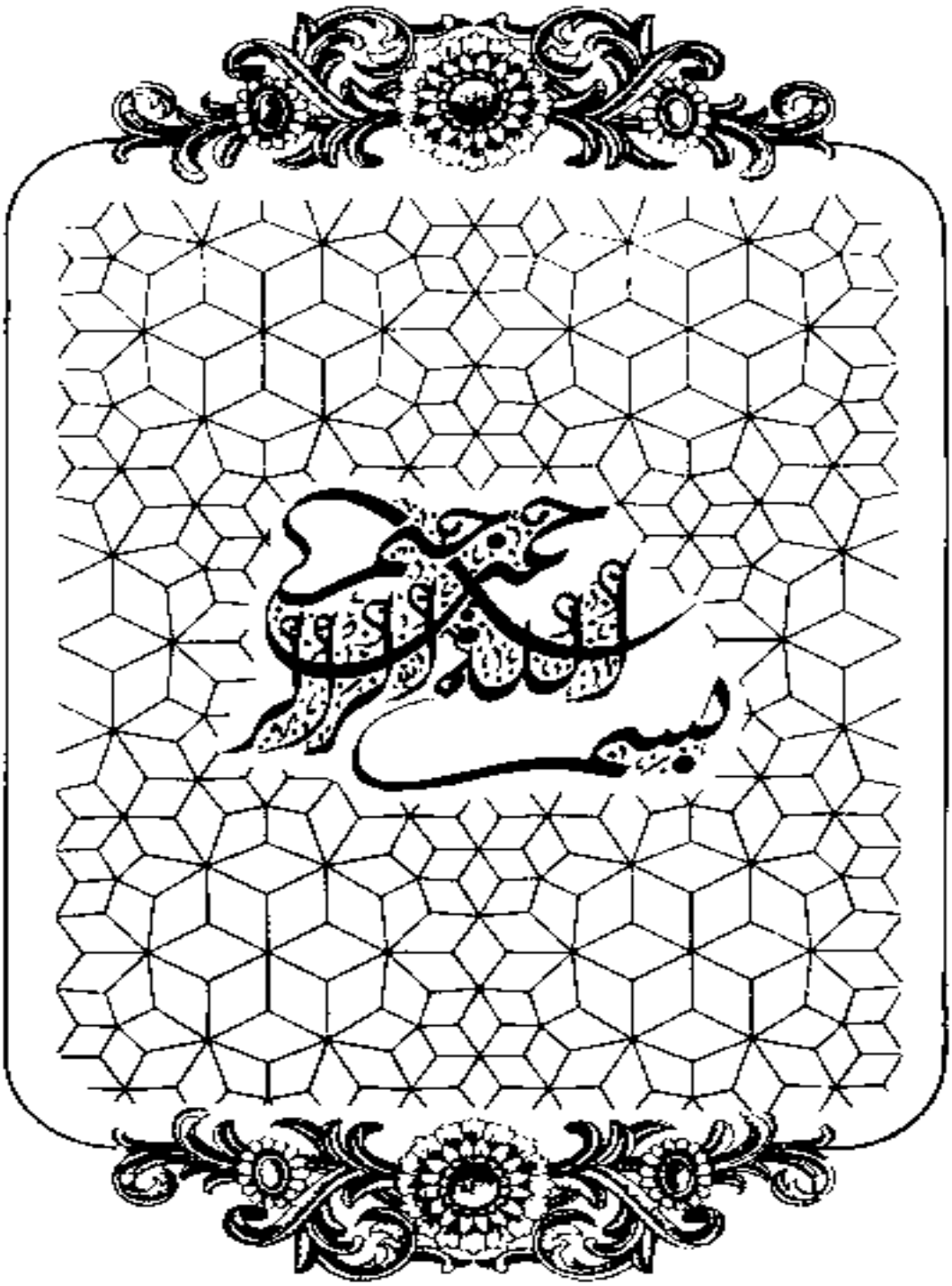

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زراعي

پايان نامه جهت دريافت درجه كارشناسی ارشد (M.SC.)
رشته بيوتكنولوژي در كشاورزي

بررسي و شناسايي ژن(هاي) كانديد تجديد كننده باروري در سيستم نر عقيمي سيتوپلاسمي WA برنج

پژوهش و نگارش:
بهجت مجيدي

اساتيد راهنما:
دكتر اسدالله احمدي خواه
دكتر كمال قاسمي بزدي

استاد مشاور:
مهندس ماهرخ شربتخواري

پاييز ۱۳۸۸

تعهدنامه

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 بمنظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد میشوند:

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

۲) در انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب ..... دانشجوی رشته ..... مقطع **کارشناسی ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرائی آنرا قبول کرده و به آن ملتزم میشوم.

تقدیم به

مادرم

پشتوانه زندگی‌ام، که با دریای محبت و فداکاری‌هایش موجب رشد و هدایت من شد و چراغ زندگی‌ام به وجود نگاه گرمش و فداکاری‌هایش روشن است.

پدرم

استوارترین پشتوانه زندگی و بهترین آموزگارم، که چگونه زیستن را به من آموخت.

خواهران و برادرانم:

که با فداکاری‌ها، راهنمایی‌ها و عطوفت بیکرانشان دوران تحصیل را بر من آسان نمودند.

و دوست عزیزم

سمیه خسروی، به خاطر فداکاری‌ها و محبت‌های بی دریغش

تشكر و قدرداني

سپاس و ستايش خداي راست كه در اوليت بي‌آغاز و در آخريت بي‌انجام است. شكر و سپاس به نام آن كرامت بي-انتها و عزت نفس بي‌منتها كه انديشه رهسپردن در مسير ارتقاء علم و ايمان و معرفت را به انسان ارزاني داشت و به لطف و بنده نوازي، خلق را از باديه گمراهي به سر حد هدايت رسانيد. خدايي كه در اطاعت و بندگي‌اش، هر چند بكوشيم به جايي نمي‌رسيم، جز آنكه در برابر استحقاقش، به سبب فضل و احسانش كوتاهي ورزيده‌ايم. سپاس شايسته خداوند سبحان است كه موهبت بيكران به بنده ارزاني داشت تا گامي ديگر در ارتقاء خود بپيمايم. از اين رو با خضوع و افتادگي تمام، وظيفه خود مي‌دانم كه صميمانه‌ترين مراتب سپاس و قدرداني خود را تقديم به تمام كساني نمايم كه در طي اين مدت مرا ياري نموده‌اند.

از استاد راهنماي بزرگوار و دلسوزم، جناب آقاي دكتر احمدي خواه كه افتخار شاگردي را نصيب اين حقير نمودند بخاطر تمام راهنمايي‌ها و مساعدت‌هاي بي‌دريغ و ارزشمندشان در طي انجام و تدوين پايان نامه نهايت تشكر و امتنان را دارم و توفيق روز افزون را براي ايشان از درگاه ايزد منان مسئلت دارم.

از استاد ارجمند خود جناب دكتر قاسمي بزدي، به خاطر مساعدت هاي ايشان و نكته سنجي‌هاي بجا و ارزشمندشان در طي تدوين پايان نامه و راهنمايي‌هاي بي دريغشان كمال تشكر را دارم.

از استاد مشاور گرانقدرم سركار خانم ماهرخ شربت خواري كه با راهنمايي‌هاي ارزشمند مرا مورد لطف و عنايت قرار دادند و از هيچ كمكي فروگذار نكردند تشكر مي‌كنم.

از اساتيد محترم: سركار خانم دكتر رمضان‌پور، جناب آقاي دكتر سلطانلو، جناب آقاي دكتر نوابپور و دكتر پهلواني به خاطر آنچه از ايشان آموختم سپاسگزارم.

از دوستان و همكلاسي‌هاي عزيزم خانم‌ها: مولودي، قلي‌زاده، شعيبي، يوسفي‌راد، چركزي، پالوج و قديرزاده به خاطر همراهي‌هاي هميشگي‌شان متشكرم.

از دوستان عزيزم، همراهان هميشگي و فداكارم كه هميشه حضورشان را در كنارم احساس كرده ام،خانم‌ها: سميه خسروي، سميرا جعفري، زهرا رشيدي و هانيه عسگري صميمانه قدرداني مي‌نمايم و آرزوي خوشبختي و موفقيت برايشان دارم.

و از خانواده عزيزم كه پشتوانه تلاشم بوده‌اند بخصوص مادر مهربانم، و تمامي كساني كه در راه ارتقاء علمي من گام برداشته اند سپاسگزارم و اميدوارم خدا اين نعمت‌هاي گرانمايه را برايم جاودانی نمايد.

چکیده

سیستم نرعقیمي WA یك نوع ایده آل از CMS اسپوروفیتیك برنج ایندیکا مي‌باشد که در ۹۰ درصد موارد از آن براي تولید بذور هیبرید استفاده مي‌شود. در تحقیقات قبلي ژن Rf4 تجدید کننده باروري در یك قطعه 206kb حاوي ۵ ژن به عنوان محتمل‌ترین ژن‌هاي کاندید تجدید کننده باروري براي *Rf4* احاطه شده بین دو مارکر *RM6737* و*AB443* واقع بر کروموزوم ۱۰ ردیابي و تشخیص داده شده بود. ژنهای کاندید مذکور واقع در این منطقه همگی جزء کلاس PPR پروتئین‌ها هستند و دارای پپتیدهای میتوکندریایی در N ترمینال خود می‌باشند . براي شناسایي این ژن از میان ژنهاي کاندیداي احتمالي، از روش بررسي بیان ژن که شامل استخراج RNA و RT-PCR می‌باشد استفاده گردید و با توجه به توالي آنها ۵ جفت پرایمر براي این ژن ها طراحي و تولید گردید. براي تولید بافت گیاهي مورد نیاز بذر ارقام بارور و استریل مورد نظر در مزرعه اي در پردیس دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبیعي کشت گردید و در مراحل مختلف نمونه‌برداري صورت گرفت. از نمونه‌هاي حاصل RNA استخراج گردید و cDNA آن تهیه شد و در نهایت بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف رشد گیاه شامل مراحل گیاهچه، پنجه‌زنی و خوشه‌دهی در ارقام IR24 (رقم تجدید کننده باروري حامل مکان ژني*Rf4*) و رقم IR68897-A (رقم نرعقیم) توسط روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت با مقایسه نتایج تحقیقات قبلی و تحقیق حاضر از میان ژن‌های کاندید دو ژن *OsIFCD036677* و *Rf-1B* به‌دلیل نحوه بیانشان به‌عنوان محتمل‌ترین ژن‌های عامل باروری در سیستم نرعقیمي WA در نظر گرفته شدند.

واژه هاي کلیدي:

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱- بيان مسئله ۱
۱-۱- جايگاه برنج ۱
۱-۲- توليد برنج هيبريد ۱
۱-۲-۱- انواع نرعقيمي ۲
۱-۲-۲- ژن هاي مرتبط با نرعقيمي ۲
۱-۲-۳- ژن هاي بازگرداننده باروري ۳
۱-۲-۴-PPR پروتئين‌ها ۳
۲- فرضيات و اهداف تحقيق ۴

فصل دوم: بررسي منابع

۲-۱- جايگاه برنج ۶
۲-۲- ويژگي هاي بوتانيكي و ژنتيكي برنج ۶
۲-۳- مراحل رشد برنج ۷
۲-۳-۱- دوره رشد رويشي ۷
۲-۳-۲- دوره رشد زايشي ۷
۲-۳-۳- دوره رسيدگي ۸
۲-۴- اصلاح برنج ۸
۲-۴-۱- نرعقيمي ۹
۲-۴-۱-۱- انواع نرعقيمي ۹
۲-۴-۱-۱-۱- نرعقيمي ژني حساس به محيط ۱۰
۲-۴-۱-۱-۲- نرعقيمي سيتوپلاسمي ژنتيكي ....
۲-۴-۲- ژن هاي مرتبط با نرعقيمي سيتوپلاسمي .....
۲-۴-۲-۱- ميتوكندري وژنوم ميتوكندريايي ...
۲-۴-۳- ژن هاي بازگرداننده باروري .....

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۴-۳-۱- مكانيسم عمل ژن‌هاي تجديدكننده باروري .....
۲-۵- PPR پروتئين‌ها .....
۲-۶- نمونه‌هاي گياهي از استفاده از اثر متقابل هسته و سيتوپلاسم .....
۲-۶-۱- اطلسي .....

۲-۶-۲- تربچه .....
۲-۶-۳- گونه‌هاي براسيكا (تيره شب بو) .....
۲-۶-۴- آفتابگردان .....
۲-۶-۵- برنج .....
۲-۶-۶- مقايسه دو سيستمBT وWA براي شناسايي ژن‌هاي عامل باروري .....
در سيستم WA برنج و ساير سيستم‌ها.
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- مواد گياهي .....
۳-۲- استخراج RNA .....
۳-۲-۱- مراحل استخراج RNA .....
۳-۲-۲- تعيين كميت و كيفيت RNA استخراج شده ....
۳-۲-۳- بارگذاري روي ژل .....
۳-۲-۴- آزمون طيف سنجي (تعيين غلظت) .....
۳-۲-۵- آزمون طيف سنجي (تعيين خلوص) .....
۳-۳- تيمار DNase .....
۳-۴- ساخت cDNA .....
۳-۴-۱- تركيبات مورد استفاده جهت توليد cDNA ..
۳-۴-۲- روش كار .....
۳-۵- انجام واكنش‌هاي زنجيره‌اي پلي‌مراز جهت تكثير ژن كانديد مورد نظر از روي cDNA.....
۳-۵-۱- تعريف واكنش زنجيره‌اي پلي مراز (PCR) .....

فهرست مطالب

عنوان
صفحه

۳-۵-۲- واكنشگرهاي واكنش‌هاي زنجيره‌اي پلي‌مراز ...
۳-۵-۳- طراحي آغازگرها .....
۳-۵-۴- برنامه حرارتي .....
۳-۵-۵- بررسي الگوي بيان ژن ها از طريق تزريق محصولات PCR به ژل آگارز .....
۳-۶- آناليز توالي .....
فصل چهارم: نتايج
۴-۱- نتايج استخراج RNA .....
۴-۲- نتايج ساخت cDNA.....
۴-۳- نتايج بررسي‌هاي انجام شده توسط دو نرم‌افزار PFAM و MITOPROTII.....
۴-۴- نتايج انجام PCR .....

۴-۴-۱- مرحله گیاهچه‌ای .....
۴-۴-۲- مرحله پنجه‌زنی .....
۴ -۴-۳- مرحله زایشی .....
۴-۴-۳-۱- مرحله آبستنی .....
۴-۴-۴- مرحله خوشه‌دهی .....
۴-۴-۵- بیان ژن های اکتین و نواحی بین ژنی .....
فصل پنجم: بحث
۵-۱- بررسی پنج کاندید مورد مطالعه .....
۵-1-۱- ژن *Rf-1A* .....
۵-۱-۲- ژن *Rf-1B* .....
۵-۱-۳- ژن *Rf-1C* .....
۵-۱-۴- ژن *Rf-1D* .....
۵-۱-۵- ژن Os-503 .....
نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات .....

فهرست جداول

عنوان

صفحه

جدول ۲-۱- گونه‌های برنج، تعداد کروموزوم، نوع گونه، اندازه ژنوم و توزیع جغرافیایی .....
جدول ۲-۲- ژن‌های میتوکندریایی .....
جدول ۳-۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده. .....
جدول ۴-۱- نحوه بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در اندام‌های ارقام مختلف در مرحله گیاهچه‌ای .....
جدول ۴-۲- نحوه بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در اندام‌های لاین‌های مختلف در مرحله پنجه‌زنی .....
جدول ۴-۳-نحوه بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در اندام‌های رویشی لاین‌های مختلف در مرحله آبستنی .....
جدول ۴-۴- نحوه بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در اندام‌های زایشی (خوشه) ارقام مختلف در مرحله آبستنی .....
جدول ۴-۵-الگوی بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در اندام‌های رویشی لاین‌های مختلف در مرحله خوشه‌دهی .....
جدول ۴-۶- نحوه بیان ژن‌های کاندید باروری در سیستم WA در خوشه لاین‌های مختلف در زمان خوشه‌دهی .....

فهرست اشکال

عنوان
صفحه

شکل ۲-۱- توليد جهاني برنج .....
شکل ۲-۲- نحوه استفاده از نرعقيمي ژنتيکي و سيتوپلاسمي ...
شکل ۲-۳- توضيحات تصويري در مورد PPR پروتئين‌ها .....
شکل ۲-٤- بازگرداندگي اثر ژن هاي عامل CMS توسط محصولات ژن‌هاي *Rf* .....
شکل ۲-۵- نواحي شيمريک عامل CMS در ژنوم‌هاي ميتوکندريايي گونه‌هاي مختلف .....
شکل ۲-٦- نقشه برداري و کلونينگ ژن‌هاي *Rf* و ويژگي هاي زير خانواده PPR پروتئين‌ها .....
شکل ۲-۷- نقش ژن *Rf-1A* در تجديد باروري .....
شکل ۲-۸- مقايسه نتايج طبقه‌بندي انجام شده در مورد چند ژن در برنج .....
شکل ۲-۹- قطعه ۲۰٦ کيلو بازي حامل مکان ژني *Rf4* .....
شکل ٤-۱- الگوي الکتروفورزي RNA استخراج شده .....
شکل ۴-۲- نحوه بيان ژن‌هاي کانديد باروري در سيستم WA برنج در برگ و در مرحله گياهچه‌اي براي لاين‌هاي مختلف .....
شکل ۴-۳- الگوي الکتروفورزي بيان ژن‌هاي *Rf:B,C&D* در مرحله پنجه‌زني در برگ لاين‌هاي مختلف برنج .....
شکل ٤-۳- الگوي الکتروفورزي بيان ژن هاي مورد بررسي در مرحله آبستني و در ارقام مختلف و اندام‌هاي مختلف .....
شکل ۴-۴- الگوي الکتروفورزي بيان دو ژن *Os-503* و *Rf-B* در مراحل بوتينگ و پنجه زني .....
شکل ۴-۵- نمونه‌اي از الگوي الکتروفورزي محصول PCR به‌دست آمده با cDNA خوشه ارقام IR68 و IR24 .....
شکل ٤-٦- الگوي الکتروفورزي بيان ژن‌هاي اکتين و نواحي بين‌ژني .....
شکل ٤-۷- الگوي الکتروفورزي ديگري از بيان ژن هاي اکتين در يکي از مراحل PCR .....

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱- بیان مسئله

۱-۱- جایگاه برنج

برنج (*Oryza sativa*.L)، براي بيش از نيمي از مردم جهان، بويژه مناطق پرجمعيت و داراي رشد صعودي جمعيت، مهم‌ترين ماده غذايي مي‌باشد. برنج يكي از مهم‌ترين غلات مناطق گرمسيري بوده است و بر اساس يك ماخذ جهاني (ايري، ۲۰۰۸)، توليد برنج، اندكي كمتر از گندم است. ميزان توليد برنج در سال ۲۰۰۸ در ايران ۲/۲ ميليون تن و در كل كشورهاي دنيا، ۶۶۱/۸ ميليون تن بوده است (فاو، ۲۰۰۸). توليد سالانه برنج در جهان بايد از سطح كنونی آن، به ۸۱۰ ميليون تن در سال برسد تا بتواند جوابگوي نيازهاي جمعيت در حال افزايش صعودي باشد (لانگ و زو، ۲۰۰۸). جمعيت كنوني جهان بيش از ۶ ميليارد نفر است و در سال ۲۰۳۰ به ۸ ميليارد نفر خواهد رسيد. در اين ميان آنچه افزايش نمي‌يابد سطح كره زمين است و براي حل اين مشكل تنها مي‌توان از قابليت گياهان براي توليد محصول بيشتر سود جست. در جهت افزايش عملكرد در هر هكتار مي‌توان از ارقام پرمحصول استفاده نمود. با توجه به عملكرد ارقام اصلاح شده كنوني و همچنين استفاده از فن‌آوري‌هاي جديد جهت گسترش ارقام پرمحصول، پيش‌بيني شده است كه در سال ۲۰۳۰ ميزان توليد برنج زرد در دنيا ۶۰ درصد بيش از سال ۱۹۹۵ باشد (كروگر، ۲۰۰۸).

۱-۲- توليد برنج هيبريد

برنج‌هاي هيبريد مي‌توانند ۳۰-۱۵ درصد محصول بيشتري نسبت به لاين‌هاي اينبرد توليد كنند (كروگر،۲۰۰۸). براي توليد برنج هيبريد مي‌توان از روش‌هايي مثل خودناسازگاري، آپوميكسي و سيستم نرعقيمي استفاده نمود. در چين كه از مراكز بسيار بااهميت توليد برنج جهان است، ۵۰ درصد زمين‌هاي زير كشت برنج، از قدرت توليد بالاي بذور هيبريد سود مي‌برند و ۱/۴ تن در هكتار بيش از متوسط عملكرد لاين‌هاي اينبرد توان توليد دارند. واضح است كه فن‌آوري توليد بذور هيبريد، در افزايش توليد جهاني برنج كاملا موثر است. در ميان روش‌هاي توليد بذور هيبريد، استفاده از نرعقيمي موثرترين و باثبات‌ترين روش است (يانگ و وانگ، ۲۰۰۲).

۱-۲-۱- انواع نرعقیمی

در میان انواع موجود نرعقیمی، عقیمی دانه گرده، متداولترین و فراوانترین نوع نرعقیمی گیاهان در طبیعت میباشد که خود به سه دسته غیرژنتیکی (ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۳)، ژنتیکی (GMS) و سیتوپلاسمی ژنتیکی[1] تقسیم میشود (نیر، ۱۹۹۳). نرعقیمی سیتوپلاسمی ژنتیکی اولین بار در برنج توسط شینجیو و اومورا گزارش داده شد. در این گیاه در حدود ۲۰ منبع CMS شناسایی شده است که در میان سیستمهای موجود، سیستم WA[2]، پایدارتر است و کاربرد بیشتری دارد (ویرمانی و همکاران، ۱۹۹۸).

۱-۲-۲- ژنهای مرتبط با نرعقیمی

ژنهای ایجاد کننده نرعقیمی سیتوپلاسمیک، معمولا بهصورت چارچوبهای قرائت آزاد[3] هستند. این orfها، حاصل فرایند نوترکیبی هستند و بهصورت شیمریك درآمدهاند. این پدیده احتمالاً عامل مهم تشکیل و تکامل ژنهای CMS میباشد (براون،۱۹۸۵). نقطه مشترك اکثر این ژنها این است که ژنهای CMS اغلب شامل بخشهایی از زیرواحدهای مختلف ژنهای نرمال ATP سنتاز هستند.

۱-۲-۳- ژنهای بازگرداننده باروری

برای استفاده از نرعقیمی در تولید گیاهان هیبرید، این صفت باید بتواند در گیاهان انتخابی تجدید شود و یك لاین دهنده گرده و یك لاین پذیرنده گرده ایجاد شود. در بسیاری از موارد نرعقیمی میتواند توسط ژنهای هسته-ای تجدید کننده باروری بازگردانده شود. تجدید کنندگی باروری، به دو صورت بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام میشود. اکثر ژنهای کلون شده و شناسایی شده عامل تجدید باروری، عقیمی را به روش ژنتیکی خنثی میکنند و محصول نواحی کدکننده آنها، پروتئینهایی موسوم به PPR پروتئین-ها که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد، میباشند (کای و همکاران، ۱۹۹۶).

1- Cytoplasmic Male Sterility (CMS)
2- Wild Abortive Cytoplasmic Male Sterility
3- Open Reading Frame

۱-۲-۴- پروتئین‌ها PPR[1]

PPR پروتئین‌ها یا موتیف‌هاي تکراري پنتاتریکوپپتیدي، که اولین بار توسط اسمال وپیترز شناسایي شده‌اند، از یک توالي ۳۵ آمینواسیدي ظاهرا تخریب شده تشکیل شده‌اند. این پروتئین‌ها در بسیاري از فرایندهاي مختص RNA، همانند ویرایش، رونویسي و شروع ترجمه آن دخیل هستند و با فرایند پردازش آنها نیز ارتباط دارند (اسمال و پیترز، ۲۰۰۰). تجدیدکننده‌هاي ژنتیکي، محصول پروتئیني از این دسته را کد مي‌کنند.

۲- فرضیات و اهداف تحقیق

ژن‌هاي تجدید کننده باروري در سیستم CMS/WA برنج در یک ناحیه ژني مرتبط با کلاسترهاي PPR پروتئیني قرار دارند (زنگ و همکاران، ۲۰۰۲) و شامل مکان‌هاي ژني *Rf3*، *Rf4* و*Rf5* هستند. دو ژن *Rf3* و*Rf4* براي باروري و حیات دانه گرده در CMS نوع WA ضروري هستند. البته به نظر مي‌رسد که اثر لوکوس *Rf4* بزرگتر است و براي تجدید باروري کافي مي‌باشد (تان، ۱۹۹۸).

با توجه به فرضیه‌هاي موجود، ژن *Rf4* به‌عنوان عامل اصلي در تجدیدکنندگي باروري سیستم WA مورد بررسي قرار گرفته است. در بررسي که توسط احمدي خواه و کارلو، درسال ۲۰۰۶ انجام شد، براي ایجاد نقشه دقیق فیزیکي و ژنتیکي ژن *Rf4*، از ۲ نوع مارکر SSR (تکرارهاي توالي منفرد)[2] و مارکر جدیدا طراحي شده براي بررسي جمعیت F2 در لاین ندا A و آمل استفاده شد. تجزیه پیوستگي ژنتیکي مارکر SSR پیوسته با ژن *Rf4* را روي کروموزوم ۱۰ مشخص کرد و دو مارکر SSR که با نزدیک‌ترین فواصل، *Rf4* را احاطه کرده‌اند، شناسایي شدند (RM171 وRM6737). در ناحیه بین RM171 و *Rf4*، یک جفت پرایمر جدیدا طراحي شده موسوم به AB443، دو مارکر خاص لاین عقیم به نام‌هاي AB443-400 و AB443-500 را تولید نمودند. مشخص شد که ژن *Rf4*، بین دو مارکر RM6737 وAB443-400 قرار گرفته است و محدوده ژنتیکي مورد نظر، شناسایي شد. در این محدوده ژنتیکي جستجو براي شناسایي

1- Pentatrico Peptide Repeats
2- Simple Sequence Repeats

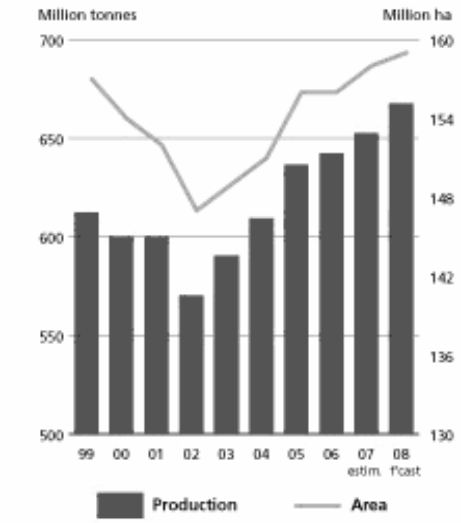
ژن تجدید کننده باروري آغاز شد و مشخص شد که قطعه مورد بررسي در برنج ايندیکا، قطعه‌اي ۲۰۶ کیلوبازي است. با توجه به اینکه ویژگي عمومي *Rf* ژن‌هاي گیاهي کد کردن PPR پروتئیني با توالي عبوري میتوکندریایي است (آکاجي وهمکاران،۲۰۰٤)، این ناحیه براي این ژن‌ها و این توالي‌ها مورد جستجوي بیشتر قرار گرفت. نرم‌افزارهاي مورد استفاده در این بررسي‌ها شامل PFAM و MITOPROTII هستند. نتایج این تحقیقات نشان داد که درمیان۹۰ ژن موجود در این محدوده، فقط ۸ ژن یك پروتئین با تکرارهاي چندگانه PPR را کد مي‌کنند و نتایج طبقه‌بندي محصولات این ژن‌ها نشان داد که تنها ٦ ژن در این میان به کلاس Rf تعلق دارند. در بررسي حاضر سعي بر شناسایي ژن عامل باروري*Rf4* در سیستم WA برنج، از میان کاندیداهاي مذکور داشتیم که در پایان تحقیق دو ژن *RF1B* و *Os503* به عنوان ژن‌هاي عامل تجدید باروري در سیستم مورد بررسي شناسایي شدند.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱-جایگاه برنج

برنج (*Oryza sativa*.L)، براي بيش از نيمي از مردم جهان، به انضمام مناطق پرجمعيت و سريع‌الرشد، مهمترين ماده غذايي مي‌باشد. برنج مهم‌ترين غله مناطق گرمسيري است و بر اساس يك ماخذ جهاني (ايري، ۲۰۰۸) توليد برنج، اندكي كمتر از گندم است. سطح زير كشت برنج در سال ۲۰۰۸، در كل دنيا ۱۵۵۷۱۱۰۰۰ هكتار، در آسيا ۱۳۹۶۱۷۰۰۰ هكتار، در چين ۲۹۲۰۰۰۰۰ هكتار و در ايران ۵۷۵۰۰۰ هكتار بوده است. توليد كل برنج در دنيا در سال ۲۰۰۸، معادل ۶۶۱۸۱۱۰۰۰ تن، در آسيا ۶۰۰۵۴۱۰۰۰، در چين ۱۹۳۰۰۰۰۰۰ و در ايران ۲۲۷۳۰۰۰ تن بوده است.



شکل ۲-۱- تولید جهانی برنج در سال ۲۰۰۸ (طبق آمار فاو).

متوسط جهاني توليد برنج در سال ۲۰۰۸ در حدود ۴۲۵۰، در آسيا ۴۳۰۰، در چين ۶۶۱۰ و در ايران ۳۹۵۰ كيلوگرم برهكتار بوده است (USDA، ۲۰۰۸). برنج در تمام قاره‌ها (به غيرازمناطق يخبندان) كشت مي‌شود. محدوده جغرافيايي كشت برنج شامل ۵۳ درجه عرض شمالي تا ۴۰ درجه عرض جنوبي است. ازسطح دريا تا ارتفاع بيش از ۳۰۰۰ متر در هيماليا مي‌تواند تحت كشت برنج قرار گيرد. در حال حاضر بيش از ۹۰ درصد برنج جهان در آسيا كشت مي‌شود. بزرگترين توليدكننده‌هاي برنج در جهان شامل چين (۳۱ درصد توليد جهاني)، هند (۲۰ درصد) و اندونزي (۹

درصد) مي‌باشند. بزرگترين صادر كننده‌هاي برنج در جهان شامل تايلند (۲۶ درصد)، ويتنام (۱۵ درصد) و ايالات متحده (۱۱ درصد) مي‌باشند. بزرگترين وارد كننده‌هاي برنج در جهان شامل اندونزي (۱۴درصد)، بنگلادش (۴درصد) و برزيل (۴ درصد) مي‌باشند (فاو، ۲۰۰۸).

۱-۲- ويژگي‌هاي بوتانيكي و ژنتيكي برنج

گياه برنج به جنس *Oryza* از خانواده گرامينه، رده گلاميفلورا، كلاس تك‌لپه‌ايها و از آنژيواسپرما مي‌باشد. گونه‌هاي برنجي كه كشت مي‌شوند شامل ساتيوا و گلابريما هستند كه گونه ساتيوا در سطح وسيعي كشت مي‌شود، اما گونه گلابريما[1] تنها در آفريقا كشت مي‌شود. اين دو گونه تفاوت‌هاي مورفولوژيكي كمي نشان مي‌دهند ولي دورگ بين آن-ها هميشه عقيم است.

گونه ساتيوا مجددا به گروه‌هاي اكولوژيكي جاپونيكا، ايندیكا و جاوانيكا تقسيم مي‌شود. تنها در واحد حفظ و ذخيره ژرم‌پلاسم IRRI (انستيتو تحقيقات بين‌المللي برنج، تاسيس در ۱۹۶۰)، بيش از ۸۰۰۰ واريته، لاين ويا رقم وحشي برنج نگهداري مي‌شود (ويرماني و همكاران، ۲۰۰۳). درگونه‌هاي برنج اريزا، تعداد كروموزوم 2n=24 يا ۴۸ مي-باشد. اين گياه به دليل كوچكي اندازه ژنوم، مقدارپايين DNA تكراري، طبيعت ديپلوئيد و امكان دستكاري راحت آن در كشت بافت، در برنامه‌هاي ژنوميك گياهي بسيار مورد توجه قرار دارد (احمدي خواه و همكاران، ۲۰۰۷). نقشه ژنتيكي برنج تهيه و تكميل شده است. در جدول ۱-۱- تعداد كروموزوم و نوع گروه‌هاي ژنومي و توزيع جغرافيايي تعدادي از گونه‌هاي برنج آورده شده است.

1- Glaberima

جدول ۲-۱ گونه‌هاي برنج،تعداد کروموزوم، نوع گروه‌هاي ژنومي و توزيع جغرافيايي آنها.

منطقه پراکنش	ژنوم	تعداد کروموزوم (۲n)
گونه‌هاي زراعي		
آفریقای غربی	A^9A^9	۲۴
آسیا	AA	۲٤
گونه‌هاي وحشي		
آمریکای مرکزی و جنوبی	CCDD	٤۸
استرالیا	EE	۲٤
آفریقای غربی	AA^9	۲٤
آفریقای غربی و مرکزی	FF	۲٤
آفریقای شرقی و مرکزی	CC, BBCC	۲٤-٤۸
امریکای جنوبی	CCDD	٤۸
آسیای جنوبی و آسیای جنوب غربی		۲۴
آمریکای مرکزی و جنوبی	CCDD	٤۸
گینه نو	-	٤۸
آفریقا	A^1A^1	۲٤
آسیای جنوب شرقی، چین	-	۲٤
آسیای جنوب شرقی، گینه نو	BBCC	٤۸
آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و استرالیا	AA	۲٤
آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و گینه نو	CC	۲٤
آفریقا	BBCC, BB^7	٤۸
آسیای جنوبی	-	٤۸
آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی	AA	۲٤
گینه نو	$A^{cu}A^{cu}$	۲٤

O. glaberrima
O. sativa
O. alta
O. australlensis
O. bathii (O. breviligulata)
O. brachyantha
O. eichingert
O. grandiglumis
O. granulate
O. latifolia
O. longiglumis
O. longistaminata (O. bathii)
O. meyeriana
O. minuta
O. nivara (O. tatua, O. rufipogon)
O. officinalis
O. punctata
O. ridiey
O. rufipogon (O. perennis, O. fatua, O. perennis Subsp. Balunga)
O. rufipogon (O. Perennis subsp. cubensis
O. schachteii

۲-۳- مراحل رشد برنج

رشد برنج شامل سه مرحله کلي رويشي (از جوانه‌زني تا شروع تشكيل خوشه)، زايشي (ازشروع تشكيل خوشه تا گلدهي) و رسيدگي (از گلدهي تا بلوغ دانه) است. در نواحي گرمسيري، دورة زايشي در حدود ۳۵ روز، و دورة رسيدگي در حدود ۳۰ روز به‌طول مي‌انجامد. اختلافات دورة رشد ناشي از تغييرات طول دورة رويشي است. طول دوره رشد رويشي بين ۴۵ تا ۶۵ روز متغير است. مراحل رشد (بر اساس مقياس عددي از صفر تا نه (سه دوره رشد مزبور)، هر كدام شامل ۱۰ مرحله متمايز هستند كه به‌صورت زير شماره گذاري و توصيف مي‌شوند:
مرحله صفر: از جوانه‌زني تا ظهور را در بر مي‌گيرد. مرحله يك: گياهچه، مرحله دو: پنجه، مرحله سه: رشد طولي ساقه هستند. اين چهار مرحله مربوط به مرحله رويشي مي‌باشند. مرحله زايشي با تشكيل خوشه و آبستني (چهارمين مرحله) آغاز مي‌گردد. مرحله پنج شامل خروج خوشه و مرحله شش، مرحله گلدهي مي‌باشد. مراحل ۴، ۵ و ۶ مربوط به فاز زايشي مي‌باشند. مرحله ۷، شيري شدن، ۸، خميري شدن و ۹، يعني آخرين مرحله بلوغ دانه مي‌باشد. اين مراحل نيز مربوط به آخرين دوره نمو برنج مي‌باشند (ايري، ۲۰۰۹).

۲-۳-۱- دوره رويشي

در اين دوره بذور پس از خيسانده شدن (به مدت ۲۴ ساعت) و تداوم جذب آب به مدت ۲۴ ساعت ديگر وارد مرحله پيش جوانه‌زني مي‌شوند، پس از اين مرحله ريشه‌چه و ساقه‌چه از پوسته برنج خارج مي‌شوند. حدود روز دوم يا سوم پس از بذرپاشي در خزانه، اولين برگ از داخل غلاف برگ خارج مي‌شوند. در پايان مرحله صفر، هنوز برگ اوليه حالت پيچيده دارد اما رشد طولي گياهچه همچنان ادامه دارد. مرحله گياهچه با ظهور برگ شروع شده و تا قبل از آشكار شدن اولين پنجه ادامه دارد. به‌طور متوسط هر ۴-۳ روز در اين مرحله يك برگ توسعه مي‌يابد.
مرحله پنجه از ظهور اولين پنجه شروع شده و تا زمان حداكثر پنجه ادامه دارد. پنجه‌ها از جوانه‌هاي جانبي گره‌ها بوجود آمده و همزمان با رشد و نمو، جايگزين برگ-ها مي‌شوند. رويداد پنجه‌زني ۳۰ روز پس از نشاءكاري رخ