بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده تولید گیاهی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی‌ارشد (M.Sc) در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

انتقال برخی ژن‌های کیفی به رقم پرعملکرد برنج ندا با روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر (MAB)

نگارش

حجت غفاری

استاد راهنما

دکتر اسدالله احمدی خواه

استاد مشاور

دکتر محمد فارسی

شهریور ۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی ـ پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود. بنابراین بمنظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

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

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

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

اینجانب **حجت غفاری** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آنرا قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به:

همسر عزیز

پدر بزرگوار ، مادر مهربان

خواهران و در نهایت روح و روان پاک برادرم

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خداوندی را سزاست که همه‌ی گویندگان از مدح و ثنای او عاجزند و شمارندگان و حسابگران از شمارش نعمت‌ها و بخشش‌های او درمانده و کوشش کنندگان نمی‌توانند حق نعمت او را ادا کنند. اعتراف می‌کنم که نه زبان شکر تورا دارم و نه توان شکر بندگان تو.

از استاد راهنما جناب آقای دکتر **اسدالله احمدی‌خواه** که با درک فراوان از موقعیت من در تهیه و تنظیم این پایان نامه همواره یاریگرم بودند و در حین تحصیل و انجام پایان‌نامه با گشاده رویی از هیچ کمکی دریغ نورزیدند و همواره از مساعدت‌های علمی ایشان بهره‌مند بوده‌ام قدردانی نموده و سلامتی و موفقیت ایشان را از درگاه خداوند متعال خواستارم.

از جناب آقای دکتر محمد فارسی که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را بر عهده داشتند و با دلسوزی و پشتکار، رهنمون‌های دقیق و نکته‌سنجی‌های صحیح خویش موجب دلگرمی من برای تداوم این راه بودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

همچنین از زحمات، جناب آقایان **دکتر** سعید نواب پور و دکتر کمال قاسمی بزدی که مسئولیت داوری این پایان نامه را برعهده گرفتند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

از جناب آقای دکتر فیروز صمدی که به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی مدیریت جلسه دفاع از پایان نامه ام را بر عهده داشتند، تشکر و قدردانی می نمایم.

در پایان از تمام کارکنان گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، مسئول آزمایشگاه ژنتیک و همکلاس‌هایم، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

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 برخی خصوصیت‌های کیفی به برنج، دو رقم ندا (پرعملکرد، فاقد عطر و طعم، با درجه ژلاتینی شدن نامناسب و بعنوان والد تکراری) و صدری (کم عملکرد، دارای عطر و طعم، با درجه ژلاتینی شدن مناسب و بعنوان والد بخشنده) تلاقی داده شدند و F_1 حاصل با والد تکراری ندا تلاقی برگشتی داده شد. نتاج BC_1 از نظر وجود ژن آروما (*fgr*) با آغازگرهای اختصاصی ژن *fgr* و همچنین آزمون نتاج شناسایی شدند. برای شناسایی بوته‌های شبیه‌تر به والد دوره‌ای اقدام به گزینش پس زمینه به کمک ۱۰۰ نشانگر SSR گردید. نتیجه گزینش پیش‌زمینه در این نسل برای ردیابی ژن *fgr* نشان داد که ٤ بوته BC_1 حامل آلل ژن آروما در حالت هتروزیگوسی (*Fgrfgr*) هستند. نتیجه گزینش پس‌زمینه با ٣٤ نشانگر SSR چندشکل نشان داد که بوته شماره یک دارای بالاترین شباهت به لاین ندا (۸۷/۸ درصد) بود، لذا با رقم ندا تلاقی برگشتی داده شد. در نسل دوم تلاقی برگشتی (BC_2) نتیجه گزینش پیش‌زمینه برای ردیابی ژن *fgr* نشان داد که ۱۰ بوته BC_2 حامل ژن آروما در وضعیت هتروزیگوس (*Fgrfgr*) هستند. با انجام گزینش پس‌زمینه با نشانگرهای SSR چندشکل، لاین ۱۰-۱# با شباهت ژنومی ۹۷/۱ به والد تکراری شناسایی و برای دستیابی به خلوص ژنتیکی بیشتر خودگشن گردید. همچنین، گزینش پیش زمینه برای دمای ژلاتینی شدن در نسل BC_1 به کمک ارزیابی فنوتیپی بررسی شد. نتیجه گزینش پیش زمینه در این نسل برای دمای ژلاتینی شدن (GT) نشان داد که بوته شماره ۳ دارای دامنه GT مناسب‌تری بود. برای شناسایی بوته‌های شبیه‌تر به والد دوره‌ای اقدام به گزینش پس زمینه به کمک ٣٤ نشانگر SSR چندشکل گردید. نتیجه گزینش پس زمینه نشان داد که این بوته دارای ۸۵/۸ درصد شباهت به رقم ندا بود، لذا با آن تلاقی برگشتی داده شد. در نسل دوم تلاقی برگشتی (BC_2) بررسی خصوصیت دمای ژلاتینه شدن نشان داد که لاین ٦-٣# امتیاز مناسبی را به خود اختصاص داد؛ نتیجه گزینش پس زمینه در این نسل نشان داد که لاین ٦-٣# با ۹۱/۳ درصد بالاترین شباهت را به والد تکراری داشت. بنابراین این لاین برای دستیابی به خلوص ژنتیکی بیشتر در پایان برنامه خودگشن گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها روش مفید و کارامدی برای انتقال ژن یا خصوصیت هدف به زمینه ژنتیکی والد گیرنده می‌باشد، به طوری که در این تحقیق تنها با دو نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی در پایان برنامه اصلاحی، هدف پروژه محقق گردید.

واژه‌های کلیدی: برنج، تلاقی برگشتی، نشانگرهای SSR، آروما، دمای ژلاتینه شدن

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- اهمیت برنج ۲

۱-۲- مشخصات گیاه شناسی برنج ٤

۱-۳- منشا گونه‌ها و انواع برنج ۷

۱-٤- شرایط مناسب برای کشت برنج ۹

۱-۵- وضعیت تاکسونومی برنج‌های آروماتیک ۱۰

۱-٦- فرضیه‌ها و اهداف ۱۳

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- نشانگرهای مولکولی ۱٦

۲-۱-۱- نشانگرهای DNA ۱۷

۲-۱-۱-۱- نشانگرهای RAPD ۱۸

۲-۱-۱-۲- نشانگرهای STS ۱۹

۲-۱-۱-۳- نشانگر CAPS ۲۰

۲-۱-۱-٤- نشانگرهای SSR ۲۰

۲-۱-۱-۵- نشانگرهای SCAR ۲۲

۲-۲- تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها (MAB) ۲۳

۲-۲-۱- نمونه‌های عملی کاربرد MAB ۲۵

۲-۳- چندشکلی ژنتیکی در برنج ۲۵

۲-٤- اصلاح کیفیت در برنج ۲٦

۲-٤-۱- عطر و طعم برنج ۲٦

۲-٤-۲- روش‌های مختلف مورد استفاده در ارزیابی فنوتیپی عطر و طعم برنج ۲۷

۲-٤-۲-۱- روش‌های حسی ۲۷

۲-٤-۲-۲- روش شیمیایی ۲۹

۲-٤-۲-۲-۱- روش کروماتوگرافی ۲۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-٤-۳- ترکیبات فرار موجود در برنج‌های معطر ۳۰
۲-٤-٤- ساختمان شیمیایی عامل عطر و طعم برنج ۳۳
۲-٤-٥- غلظت 2AP در برنج‌های معطر و غیر معطر ۳٤
۲-٤-٦- مسیر بیوسنتز 2AP ۳٥
۲-٤-۷- ژنتیک صفت کیفی عطر و طعم ۳۷
۲-٤-۸- موتاسیون‌های موجود در ژن BADH2 ..... ٤۱
۲-٤-۹- میزان آمیلوز (AC) ٤۳
۲-٤-۱۰- دمای ژلاتینی شدن (GT) ٤٤

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی ٤۸
۳-۲- نمونه‌برداری و استخراج DNA ٤۸
۳-۲-۱ مراحل استخراج ٤۸
۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ٥۰
۳-٤- روش انجام PCR ٥۰
۳-٥- آغازگرهای طراحی شده ٥۱
۳-٥-۱- آغازگر طراحی شده به منظور گزینش پیش زمینه ٥۱
۳-٥-۲- آغازگرهای مورد استفاده در گزینش پس زمینه (نشانگرهای SSR) ٥۲
۳-٦- الکتروفورز افقی ٥٤
۳-۷- الکتروفورز عمودی ٥٤
۳-۸- گزینش ژن آروما ٥٥
۳-۸-۱- گزینش ژنتیکی ژن آروما ٥٥
۳-۸-۲- گزینش فنوتیپی ژن آروما ٥٥
۳-۹- بررسی توارث ژن آروما ٥٥
۳-۱۰- مقدار آمیلوز ٥٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱۱- دمای ژلاتینی شدن ۵۷
۳-۱۲- روش انتخاب ۵۸
۳-۱۳- آنالیز داده‌ها ۵۸

فصل چهارم: نتایج

٤-۱- توارث آروما در تلاقی ندا × صدری ٦۰
٤-۲- انتخاب برای آروما در نسل BC1 ..... ٦۰
٤-۲-۱- گزینش پیش زمینه برای ژن آروما در نسل BC1 ..... ٦۰
٤-۲-۲- آزمون فنوتیپی برای آروما در نتاج خودگشن شده BC1 ..... ٦۱
٤-۲-۳- گزینش پس زمینه در نسل BC1 ..... ٦۲
٤-۳- انتخاب برای درجه حرارت ژلاتینی شدن در نسل BC1 ..... ٦٤
٤-٤- انتخاب برای مقدار آمیلوز در نسل BC1 ..... ٦٥
٤-٥- گزینش برای آروما و آمیلوز در نسل BC2 ..... ٦۷
٤-٥-۱- گزینش پیش زمینه برای ژن آروما در نتاج BC2 لاین ۱# ٦۷
٤-٥-۲- گزینش پس زمینه برای ریخته ارثی والد ندا در نتاج BC2 لاین ۱# ٦۸
٤-٥-۳- تعیین مقدار آمیلوز نتاج BC2 لاین ۱۰-۱# ٦۹
٤-٦- گزینش برای آروما و درجه حرارت ژلاتینی شدن در نسل BC2 ..... ٦۹
٤-٦-۱- گزینش پیش زمینه برای ژن آروما در نتاج BC2 لاین ۳# ۷۰
٤-٦-۲- گزینش پس زمینه برای ریخته ارثی والد ندا در نتاج BC2 لاین ۳# ۷۰
٤-٦-۳- تعیین درجه حرارت ژلاتینی شدن نتاج BC2 لاین ٦-۳# ۷۱

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات

٥-۱- بحث ۷٤
٥-۲- پیشنهادات ۷۹

منابع ۸۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- گونه‌های برنج، تعداد کروموزوم‌ها، ژنوم گروه‌ها و توزیع جغرافیایی آن‌ها ۷
جدول ۱-۲- برخی ارقام آروماتیک برنج متعلق به گروه‌های مختلف ۱۱
جدول ۲-۱- گروه بندی بر اساس میزان آمیلوز موجد در دانه برنج ٤۳
جدول ۳-۱- مواد مصرفی جهت هر واکنش PCR ۵۰
جدول ۳-۲- پروفیل حرارتی PCR ۵۱
جدول ۳-۳- مشخصات آغازگر مورد استفاده به منظور گزینش پیش زمینه در این تحقیق ۵۱
جدول ۳-٤- آغازگرهای SSR استفاده شده و موقعیت آنها در ژنوم برنج ۵۲
جدول ۳-۵- تعیین گروه GT بر اساس میزان گسترش در قلیا ۵۷
جدول ٤-۱- نتایج حاصل از ارزیابی معطر یا غیر معطر بودن دانه برنج در نسل F2 تلاقی نداx صدری ٦۰
جدول ٤-۲- نتایج مربوط به بررسی فنوتیپی میزان آروما بر روی نسل BC1F2 ..... ٦۲
جدول ٤-۳- نتایج حاصل از گزینش پس زمینه در نسل BC1 ..... ٦۳
جدول ٤-٤- نتایج حاصل از آزمایش GT بر روی نتاج خودگشن شده BC1 ..... ٦٤
جدول ٤-۵- نتایج حاصل از گزینش پس زمینه در نتاج BC2 لاین ۱# ٦۸
جدول ٤-٦- نتایج حاصل از گزینش پس زمینه در BC2-3 ..... ۷۱
جدول ٤-۷- امتیازهای مربوط به GT در نتاج خودگشن شده BC2 ..... ۷۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- مسیر تکاملی دو گونه زراعی برنج ۸
شکل ۱-۲- مرکز تنوع و مناطق انتشار برنج‌های آروماتیک گروه V ۱۲
شکل ۲-۱- تفاوت در تعداد نسخه‌های توالی تکراری SSR که منتج به ایجاد چندشکلی می‌گردد ۲۱
شکل ۲-۲- مقایسه گرافیکی میزان بازیابی ژنوم والد تکراری با استفاده از تلاقی برگشتی به کمک نشانگر و تلاقی برگشتی سنتی ۲٤
شکل ۲-۳- ساختمان شیمیایی ماده ۲-استیل-۱-پیرولین (2AP) ۳٤
شکل ۲-٤- مسیر بیوسنتز2AP در برنج (a) سنتز 2AP وابسته به BADH2 .(b) سنتز2AP غیر وابسته به BADH2 ..... ۳٦
شکل ۲-۵- مسیر بیوشیمیایی مربوط به ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز BAD و سنتز ترکیب معطر 2AP در گیاهان عالی ۳۷
شکل ۲-٦- موتاسیون‌های مختلف ساختمان BADH2 ..... ٤۲
شکل ۳-۱- مقایسه توالی دو ژن غالب و مغلوب آروما ۵۲
شکل ۳-۲- تصاویر استاندارد برای تعیین مقدار آمیلوز ۵٦
شکل ۳-۳- نمونه آزمون تخریب قلیایی دانه‌های برنج سفید ارقام مختلف ۵۸
شکل ٤-۱- تصویر حاصل از الکتروفورز عمودی نتاج BC1 با جفت آغازگر اختصاصی Arm1. رقم ندا (والد گیرنده) ٦۱
شکل ٤-۲- دندروگرام مربوط به نسل BC1 که با روش نی (۱۹۷۸) به دست آمده است ٦۳
شکل ٤-۳- تصویر حاصل از آزمایش GT ٦٤
شکل ٤-٤- تصویر حاصل از آزمایش GT بر روی نمونه ۳# در نسل BC1 ..... ٦۵
شکل ٤-۵- تصویر حاصل از آزمایش تعیین مقدار آمیلوز دو رقم ندا و صدری ٦٦
شکل ٤-٦- تصویر حاصل از بررسی مقدار آمیلوز موجود در نتاج خودگشن شده نسل BC1 ..... ٦٦
شکل ٤-۷- تصویر حاصل از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ٤٪ در نتاج تلاقی برگشتی لاین ۱# در نسل BC2 ..... ٦۷
شکل ٤-۸- تصویر حاصل از تعیین آمیلوز در BC2 ..... ٦۹
شکل ٤-۹- تصویر حاصل از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ٤٪ در نتاج BC2 لاین ۳# ۷۰
شکل ٤-۱۰- تصویر حاصل از بررسی میزان GT درنتاج BC2 لاین‌های ۱۰-۱# و ٦-۳# ۷۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- اهمیت برنج

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهمترین منابع غذایی مردم در سطح جهان می باشد ودر سطحی بالغ بر ۱٤٦ میلیون هکتار کشت می‌گردد و میزان تولید آن نیز بالغ بر ۵۲۰ میلیون تن در هکتار می باشد. دو سوم کالری روزانه مردم در مناطق آسیا ویک سوم کالری مورد نیاز مردم در آمریکای لاتین وآفریقا از طریق مصرف برنج تامین می‌شود.

امروزه برنج غذای اصلی بیش از نیمی از بشر است و این به منظور امنیت غذای ملی حائز اهمیت می‌باشد. برنج 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 می‌گردد. در نقاطی که دوره‌های متناوب بارندگی و خشکی وجود دارد، تولید برنج در فصل بارندگی متمرکز می‌باشد 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.

این گیاه یک منبع اصلی انرژی، پروتئین، ویتامین (B1)، ریبوفلاوین (B2)، نیاسین، آهن و کلسیم در رژیم غذایی است. میزان کالری حاصله از برنج مشابه گندم و مقدار پروتئین موجود در آن کمتر از گندم است. در مقایسه با اقلامی نظیر گوشت و حبوبات، برنج دارای پروتئین کمتری است. لیکن مواد قندی و نشاسته‌ای موجود در آن از سیب زمینی، حبوبات و گندم بیشتر است. بایستی گفت که اگرچه پروتئین برنج در مقایسه با سایر غلات، نسبتاً کم است، ولی ارزش غذایی پروتئین آن به علت محتوی بالا و تعادل مطلوب اسیدهای آمینهٔ اساسی مثل لایسین، بالاتر است.

شواهد نشان می‌دهند که تقریبا ٤۰۰۰ سال قبل از میلاد، در کشورهای هند و چین، کشت برنج متداول بوده است. نزدیک به ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید برنج متعلق به کشورهای خاور دور می‌باشد. بیش از نصف محصول برنج هم در دو کشور هند و چین تولید می‌شود. بطور کلی، کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری 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.

سطح زیر کشت برنج در سال ۲۰۰۸ در کل دنیا ۱۵۵۷۱۱۰۰۰ هکتار، در آسیا ۱۳۹۶۱۷۰۰۰ هکتار، در چین ۲۹۲۰۰۰۰۰ هکتار و در ایران ۵۷۵۰۰۰ هکتار بوده است. تولید کل برنج در دنیا در سال ۲۰۰۸ معادل ٦٦١٨١١٠٠٠ تن، در آسیا ٦٠٠٥٤١٠٠٠، در چین ۱۹۳۰۰۰۰۰۰ و در ایران ۲۲۷۳۰۰۰ تن بوده است. متوسط جهانی تولید برنج در سال ۲۰۰۸ در حدود ٤٢٥٠، در آسیا ٤٣٠٠، در چین ٦٦١٠ و در ایران ۳۹۵۰ کیلوگرم برهکتار بوده است (USDA، ۲۰۰۸). برنج در تمام قاره‌ها (به غیر از مناطق یخبندان) کشت می‌شود. محدوده جغرافیایی کشت برنج شامل ۵۳ درجه عرض شمالی تا ٤٠ درجه عرض جنوبی است. از سطح دریا تا ارتفاع بیش از ۳۰۰۰ متر در هیمالیا می‌تواند تحت کشت برنج قرار گیرد. در حال حاضر بیش از ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا کشت می‌شود.

Oryza sativa L. گونه اصلی زراعی برنج در حدود ۱۰۰۰۰ سال پیش در منطقه‌ای که شامل شمال شرقی هند، بنگلادش، برمه، لائوس، ویتنام و جنوب چین می‌گردد، اهلی شده است. برنج از جمله قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که در هند و چین برای بیش از ۸۰۰۰ سال کشت می‌شده است. برنج از منطقه اولیه تنوّع خود به جنوب شرقی آسیا و جزایر مجاور در ناحیه اقیانوسیه گسترش یافت. تنها گونه زراعی برنج که بومی مناطق بالادست رودخانه نیجر در غرب آفریقا می باشد، *O. glaberrima* است. اگر چه این گونه در سطح کوچکی در نواحی گرمسیری کشت می‌گردد، ولی توسط ارقام اصلاح شده *O. sativa* در حال جایگزینی است. اعتقاد بر این است که دو گونه مذبور از یک جدّ مشترک منشأ گرفته باشند که در طی مسیرهای جداگانه قرار گرفته‌اند و احتمالاً این جدایی بر اثر تفکیک زمین و تشکیل قاره آسیا و آفریقا ایجاد شده است.

اندازه ژنوم این گیاه کوچک بوده (٤٣٠ مگاباز) و بدلیل ارتباط آن با دیگر گونه‌های مهم زراعی غلات، مطالعات ژنتیکی بسیاری بر روی آن صورت پذیرفته و در نتیجه دسترسی به منابع ژنومی آن مانند نقشه‌های ژنتیکی کاملاً تعریف شده، مجموعهٔ گسترده‌ای از توالی‌های نشانمند بیان شده (ESTs) و شاخص ژن برنج TIGR و یک نقشهٔ کروموزومی مصنوعی مخمر (YAC) به راحتی امکانپذیر می‌باشد و این خصوصیت‌ها باعث گردیده که از آن بعنوان یک الگو در مطالعات ژنتیکی غلات استفاده گردد.

۱-۲- مشخصات گیاهشناسی برنج

ساقه برنج راست، استوانه‌ای و جز در قسمتی که گره‌ها وجود دارند تو خالی است. ارتفاع ساقه به ٦٠ تا ۲۰۰ سانتیمتر می‌رسد. برنج علاوه بر ساقه اصلی، ٤ تا ٥ 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، 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.

برنج گیاهی است که دارای ارقام زودرس (طول دورهٔ رشد ۱۳۰ تا ١٤٥ روز)، متوسط رس (۱۵۰ تا ١٦٠ روز) و ارقام دیررس (۱۷۰ تا ۱۸۰ روز) می‌باشد. برای شناخت بهتر گیاه برنج به ذکر قسمت‌های مختلف آن از قبیل ریشه، ساقه، برگ و غیره می‌پردازیم. ریشهٔ برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر در عمق ۲۰ تا 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 تو خالی 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 میان گره 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. همچنین در محل اتصال غلاف به ساقه زائدهٔ کوچکی بنام زبانک[2] وجود دارد. همچنین تعداد گره‌ها در این گیاه از ۱۰ تا

1 Stipule
2 Ligule

۲۰ عدد متغیر می‌باشد. در مقادیر مساوی شاخص سطح برگ (LAI) 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 ١٤ تا ۱۵ برگ، در ارقام متوسطرس ١٦ 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 ٤ 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 ٤ تا ۵ پنجه تولید می‌کند. گل آذین در برنج به صورت خوشه‌ای بوده و دارای انشعابات فرعی می باشد و حاوی سنبلچه‌های تک گلچه‌ای است. برنج بر خلاف سایر غلات که ۳ تا ٤ پرچم دارند دارای ٦ 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 می‌باشد. در اطراف هر گل دو برگک بنام پوشینه[1] وجود دارد که یکی لما[2] و دیگری پالئا[3] نامیده می‌شود. همچنین در انتهای هر سنبله دو برگک بنام پوشه[4] وجود دارد. برگک فوقانی یا گلوم گل دهندهٔ لما (گلومل یا پوشینه سنبله که ریشک روی آن می‌رود) و پالئا

1 Glumelle
2 Lemma
3 Palea
4 Glume

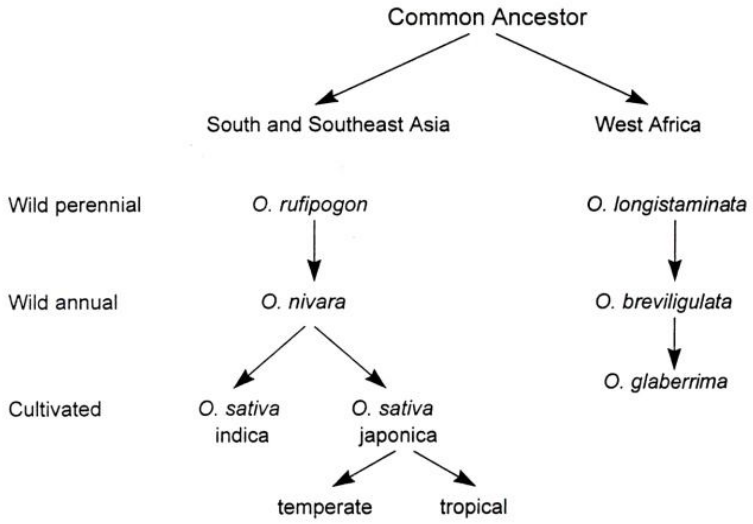
(گلومل یا پوشینهٔ گیاهان گرامینه که فاقد ریشک است)، همراه با گل در برگرفته شده یک گل را تشکیل می‌دهند. در برنج گلوم‌ها خیلی کوچک بوده و حتی ممکن است گاهی اوقات حذف شده باشند. طول گلوم‌های خارجی ۱/٤ لما و پالئا و در بعضی از ارقام هم اندازهٔ لما و پالئا است. عموماً لما دارای ریشک و پالئا فاقد ریشک می‌باشد. ۷ تا ۹ روز بعد از گل دادن لایه آلرون 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.

۱-۳- منشأ، گونه‌ها و انواع برنج

جدول ۱-۱. گونه‌های برنج، تعداد کروموزوم‌ها، ژنوم گروه‌ها و توزیع جغرافیایی آن‌ها

گونه‌های برنج	تعداد کروموزوم (۲n)	ژنوم	منطقه پراکنش
گونه‌های زراعی			
O. glaberrima	۲٤	A_gA_g	افریقای غربی
O. sativa	۲٤	AA	آسیا
گونه‌های وحشی:			
O. alta	٤۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی
O. australlensis	۲٤	EE	استرالیا
O. bathii (O. breviligulata)	۲٤	AA^9	آفریقای غربی
O. brachyantha	۲٤	FF	آفریقای غربی و مرکزی
O. eichingert	۲٤-٤۸	CC, BBCC	آفریقای شرقی و مرکزی
O. grandiglumis	٤۸	CCDD	امریکای جنوبی
O. granulate	۲٤		آسیای جنوبی و آسیای جنوب غربی
O. latifolia	٤۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی
O. longiglumis	٤۸	-	گینه نو
O. longistaminata (O. bathii)	۲٤	A^1A^1	آفریقا
O. minuta	٤۸	BBCC	آسیای جنوب شرقی، گینه نو
O. nivara (O. tatua, O. rufipogon)	۲٤	AA	آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و استرالیا
O. officinalis	۲٤	CC	آسیای جنوبی و جنوب شرقی، چین جنوبی و گینه نو
O. punctata	٤۸	BBCC, BB^7	آفریقا
O. schachteii	۲٤	$A^{cu}A^{cu}$	گینه نو

گونه زراعی *O. sativa* (2n=2x=24)، دارای فرمول ژنومی AA می‌باشد،کروموزوم‌های گونه *O.glaberrima* (2n=2x=24)، به خوبی با *O.sativa* جفت نمی‌شوند و لذا به آن فرمول ژنومی $A^g A^g$ داده‌اند. شش گونه *Oryza*، یکساله و بقیه چند ساله و دائمی هستند. دو گونه *O .nivara* و *O. rufipogon* که وحشی و دارای ژنوم AA هستند، به طور وسیعی در جنوب شرق آسیا، توزیع یافته اند و به راحتی با یکدیگر و با برنج زراعی، تلاقی پذیرند (توسلی و همکاران، ۱۳۸٤). به طور کلی مسیر تکاملی دو گونه برنج زراعی در شکل (۱-۱) نشان داده شده است (سود و صیدیق، ۱۹۷۸).



شکل ۱-۱: مسیر تکاملی دو گونه زراعی برنج

گونه *O. sativa* از نظر تیپ اقلیمی به سه نوع یا نژاد جغرافیایی که عموماً دارای مشخصات زیر می‌باشند تقسیم‌بندی می‌شود:

۱) هندی[1]: نوع گرمسیری، معمولاً پا بلند، دارای ساقه‌های ضعیف و حساس به ورس، برگ‌های طویل و آویزان، حساس به دمای پائین و طول روز، دانه های باریک که به راحتی ریزش می‌یابند که برای

1 indica

دوره طولانی به حالت خواب باقی می مانند بوده وعمدتاً به صورت خشک پخت گردیده و در کشورهای هندوستان، سری لانکا، مالزی و تایلند کشت می شوند.

۲) ژاپنی[1]: این نوع برنج‌ها از چین به ژاپن و کره انتقال یافته و از نوع معتدله می‌باشند، از نظر صفات مختلف، دارای ساقه‌ها و برگ‌های کوتاه، پنجه دهی متوسط، مقاوم به دمای پائین و طول روز، دانه‌های گرد و کوتاه با محتوی آمیلوز پائین که دانه‌ها را در هنگام پخت به صورت چسبنده در می‌آورد، هستند. برنج‌های مربوط به این نژاد مقام به ورس بوده و از خصوصیت کودپذیری خوبی برخوردارند.

۳) حد واسط هندی- ژاپنی[2]: این نوع برنجها پا بلند بوده و با دارا بودن خصوصیاتی از قبیل ساقه‌های ضخیم و برگهای محکم و پهن، پنجه‌دهی کم، سنبله های بلند، مقاومت به ریزش و دانه‌های گرد و بلند از دیگر نژادها متمایز می‌گردند.

Galszman در سال ۱۹۸۷، تعداد ۱٦۸۸ کولتیوار برنج را از قسمت‌های مختلف دنیا جمع‌آوری کرد و با استفاده از آنالیز چند متغیره، داده‌های حاصل از تغییرات آللی در ۱۵ مکان آیزوزایمی را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و در نتیجهٔ آن ۹۵٪ کولتیوارها را در شش گروه مجزا (I,II,III,IV,V,VI) و ۵٪ باقی مانده را در حدواسط این گروه‌ها قرارداد. در این تقسیم بندی، صفات مورفولوژیکی در نظر گرفته نشده بودند، در مقایسه این شش گروه با گروه‌بندی‌های صورت گرفته با استفاده از صفات فوق‌الذکر، مشخص گردید که گروه I با برنج‌های گروه ایندیکا و گروه VI با نوع ژاپونیکا مطابقت داشته و برنج‌های گروهV نیز برنج‌های آروماتیک شبه قاره هند مانند باسماتی را شامل می‌شود.

۱-٤- شرایط مناسب برای کشت برنج

میانگین دمای مورد نیاز برنج هنگام رشد باید بین ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد. پایین بودن دما در اوایل فصل زراعی یا آبیاری مزرعه با آب سرد سبب می‌شود که زمان رسیدن دانه‌ها به تأخیر افتد. بالا بودن دما هم موجب کاهش تعداد سنبلچه‌های بارور و وزن دانه‌ها می‌شود. نور هم یکی از عوامل مؤثر در رشد گیاه است. شدت نور در اوایل فصل زراعی شاید عامل محدود کننده‌ای برای رشد برنج به حساب آید. اما با نزدیک شدن به پایان فصل زراعی. بویژه موقع تشکیل خوشه. رقابت برای جذب نور

1 Japonica
2 Javanica