دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده علوم زراعی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته مهندسی کشاورزی

گرایش اصلاح نباتات

موضوع

نقشه یابی ژنتیکی ژن القا کننده باروری (Rf) در برنج با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت

استاد راهنما

دکتر نادعلی بابائیان جلودار

استاد مشاور

دکتر نادعلی باقری

نام دانشجو

بهاره خوش خلق

مهر ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم زراعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت کارشناسی ارشد (M.Sc)
رشته مهندسی کشاورزی
گرایش اصلاح نباتات

موضوع

نقشه یابی ژنتیکی ژن اعاده کننده باروری (Rf) در برنج با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت

استاد راهنما

دکتر نادعلی بابائیان جلودار

استاد مشاور

دکتر نادعلی باقری

نام دانشجو

بهاره خوش خلق

مهر ۱۳۹۰

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خداوند متعال را که جامعه بشری را توانایی تفکر و تعلیم و علم و دانش بخشیدی. اکنون که در پرتو عنایت حق تعالی، راهنمایی های اساتید و همکاری دوستان، پژوهش حاضر را به انجام رسانده ام، وظیفه خو د می دانم از تمامی عزیزانی که در این راستا اینجانب را یاری نمودند صمیمانه ترین سپاس ها را نثار نمایم

از راهنمایی های ارزنده و سودمند جناب آقای دکتر باباییان سپاس و قدردانی می نمایم . و همچنین از مشاورت های ارزشمند جناب آقای دکتر باقری نهایت تشکر و قدردانی می نمایم . از کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی، مهندس نتاج که رهنمودهای علمی و عملی زیادی نمودند نیز نهایت تشکر و قدردانی را می نمایم

همچنین از راهنمایی هایی که مهندس هاشمی در راستای این پژوهش داشته اند و از جناب آقای دکتر عسکری و دکتر پاکتین نیز تشکر به خاطر راهنمایی هایشان تشکر می نمایم

از همکلاسی هایم، خانم مهندس کریمی، مهندس طباطبایی، مهندس آشوری و آقای مهندس مدرسی و مهندس حاتمی و خانم مهندس حسینی و دیگر دوستان که در راستای این پژوهش کمک و یاری رساندند، نهایت سپاس و تشکر می نامیم

در پایان از تمامی زحمات پدر و مادر عزیز و مهربانم و همچنین خواهر عزیزم که همواره در تمامی لحظات زندگی یاریم نمودند، صمیمانه ترین قدرشناسی را نثار آنها می نمایم و این پایان نامه را تقدیم به خانواده ام که زبانم در قدردانی از آنها قاصر است.

این پایان نامه خود را تقدیم می کنم به

پدرم و مادر مهربانم

و خواهر عزیزم

چکیده

ارزیابی ژنتیکی ژن اعاده کننده باروری برای نر عقیمی نوع WA در برنج با استفاده از لاین نر عقیم سیتوپلاسمی IR58025A در ترکیب با آمل- 2 مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۲۷۰ بوته از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی (آمل- ۲ ×IR58025A) به طور تصادفی انتخاب و درصد باروری یا عقیمی این گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت . نسبت باروری دانه گرده در گیاهان نسل F_2 به صورت ۱۴۳ گیاه بارور، ۶۱ گیاه نیمه بارور، ۵۵ گیاه نیمه عقیم و ۱۱ گیاه کاملاً عقیم بودند. ارزیابی باروری در جمعیت F_2 نشان داد که صفت اعاده باروری در رقم آمل ۲ توسط ۲ ژن غالب کنترل می شود. در این مطالعه تعداد ۲۰ نشانگر SSR و ۲ نشانگر STS مورد استفاده قرار گرفت . نشانگرهای RM294، RM269، RM258، RM237، RM3510، RM271، چندشکلی ندادند و نشانگرهای RM307، RM401، RM311، RM302، RM304، RM490، RM580، RM243، RM23، RM228 و RM244 چندشکلی نشان دادند. مطالعات نشان می دهد که ژن باروری Rf_3 با نشانگرهای RM243 و RM490 روی کروموزوم یک پیوستگی داشته است و با استفاده از آ زمون کای اسکور (۲/۱۸ $=X^2$) دو ژنی بودن تأیید می شود. همچنین بررسی ژنتیکی ژن های بر گرداننده باروری نشان داد نشانگر مولکولیRG140 با ژن Rf_3 روی کروموزوم ۱ پیوسته می باشد و نشانگر STS (RG140) پیوستگی بالایی با ژن باروری نشان داده و فاصله آن ۱ سانتی مورگان بدست آمده است و نشانگر خوبی برای MAS و انتقال ژن به حساب می آید. همچنین فاصله ژن باروری RF_4 با نشانگر RM244 روی کروموزوم ۱۰، ۷ سانتی مورگان بدست آمده است

کلمات کلیدی: ژن بازگرداننده باروری، نشانگر مولکولی STS، نشانگر مولکولی SSR، برنج

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱ – ۱ – برنج هیبرید و اهمیت آن	۱
۱ – ۲ – نر عقیمی در برنج	۲
۱ – ۲ – ۱ – طبقه بندی نوع نرعقیمی در برنج	۳
۱ – ۲ – ۲ – مطالعات مولکولی روی ژنوم میتوکندریایی برنج	۵
۱ – ۲ – ۲ – ۱ – طبقه بندیی نوع نرعقیمی سیتوپلاسمی در برنج	۷
۱ – ۲ – ۲ – ۲ – ۱ - CMS-WA	۷
۱ – ۲ – ۲ – ۲ - ۲ - CMS-BT	۸
۱ – ۲ – ۲ – ۲ - ۳ - CMS-HL	۹
۱ – ۱ – ۳ – نشانگرها	۱۰
۱ – ۱ – ۳ – ۱ – نشانگرهای مورفولوژیکی	۱۰
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – نشانگرهای مولکولی	۱۰
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – ۱ – نشانگرهای RFLP	۱۱
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – ۲ – نشانگرهای RAPD	۱۱
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – ۳ – نشانگرهای AFLP	۱۲
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – ۴ – نشانگرهای SSR	۱۲
۱-۱-۳-۲-۵ – نشانگرهای ISSR	۱۲
۱ – ۱ – ۳ – ۲ – ۶ – نشانگرهای SSCP	۱۳
۱ – ۱ – ۴ – شرایط استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه های تهیه نقشه ژنتیکی	۱۳
۱ – ۱ – ۴ – ۱ – نشانگرهای DNA	۱۴
۱ – ۱ – ۴ – ۲ – میکروساتلایت	۱۴
۱ – ۱ – ۴ – ۳ – نقاط نشانمنداز توالی (STS)	۱۶
۱ – ۲ – نقشه ژنتیکی	۱۷
۱ – ۲ – ۱ – نوترکیبی و نقشه های ژنتیکی	۱۷
۱ – ۲ – ۲ – انواع جمعیت برای تهیه نقشه	۱۸
۱ – ۲ – ۲ – ۱ – جمعیت تلاقی برگشتی (BC)	۱۹
۱ – ۲ – ۲ – ۳ – جمعیت F_2	۱۹
۱ – ۲ – ۲ – ۴ – جمعیت RIL	۱۹
۱ – ۲ – ۲ – ۵ – جمعیت دابل هاپلوئید (DHL)	۱۹
فصل دوم- بررسی منابع	
۲ – ۱ – توارث و نقشه یابی برنج	۲۱
۲ – ۱ – ۱ – توارث پذیری و نقشه یابی ژن های اعاده کننده باروری برای CMS در برنج	۲۱
۲ – ۱ – ۱ – ۱ – توارث پذیری و نقشه یابی برای CMS-WA	۲۱
۲ – ۱ – ۱ – ۲ – توارث پذیری و نقشه یابی برای CMS های نوع (HL و BT)	۲۵
۲ – ۱ – ۱ – ۳ – توارث و نقشه یابی برای CMS های نوع Diss	۲۸
۲ – ۱ – ۲ – توارث و نقشه یابی برای نرعقیمی ژنتیکی (EGMS)	۲۸

۲ – ۱ -۳- نر عقیمی ژنتیکی نیمه عقیمی	۳۱
۲ – ۱ -۴- کلونینگ ژن باروری	۳۲
فصل سوم مواد و روش ها	
۳ – ۱ - ۱ - مواد گیاهی	۳۴
۳ – ۱ - ۱ – ۱- تولید جمعیت برای نقشه یابی مولکولی باروری و برآورد	۳۴
۳ – ۱ - ۱ - ۲- برآورد درصد باروری دانه گرده	۳۵
۳ – ۱ - ۱ – ۳- اندازه گیری درصد باروری	۳۶
۳ – ۱ – ۲- بررسی های مولکولی	۳۶
۳ – ۱ - ۲ - ۱- تهیه نمونه برگی	۳۶
۳ – ۱ - ۲ - ۱- انجام مراحل استخراج DNA	۳۷
۳- ۱ – ۲- ۲- بررسی کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده	۳۸
۳- ۱ – ۲- ۲- ۱- روش کار	۳۹
۳- ۱ –۲ – ۳- انجام واکنش PCR	۴۰
۳- ۱ – ۲- ۴- آماده سازی آغازگرها	۴۲
۳- ۱ – ۲- ۴-۱- نشانگرهای STS	۴۲
۳- ۱ – ۲- ۴-۲- نشانگرهای SSR	۴۳
۳- ۱ –۳ - الکتروفورز با ژل عمودی	۴۴
۳- ۱ –۳ – ۱- ژل پلی اکریل آمید	۴۴
۳- ۱ –۳ – ۲- تیمار ظرف ژل	۴۵
۳- ۱ –۳ – ۳- تهیه ژل پلی اکریل آمید	۴۵
۳- ۱ –۳ – ۴- رنگ آمیزی به روش نیترات نقره	۴۶
۳- ۱ –۳ – ۵- نوترکیبی و نقشه پیوستگی ژنتیکی	۴۸
فصل سوم نتایج و بحث	
۳- ۱ –۴- ارزیابی های فنوتیپی	۵۰
۳- ۱ –۵- ارزیابی های ژنوتیپی	۵۰
۳- ۱ –۵-۱ نشانگرهای STS	۵۱
۳- ۱ –۵-۱-۲- نشانگر S10019	۵۱
۳- ۱ –۵-۱-۳- نشانگر RG140	۵۲
۳- ۱ – ۵-۲- نشانگر SSR	۵۳
۳- ۱ – ۶ - ساختار نقشه پیوستگی	۵۴
پیشنهادات	۶۳
ضمائم	۶۴
منابع	۶۸

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل۳-۱- نمونه DNA ژنومی استخراجی از گیاه مورد نظر	۴۰
شکل۴-۲- توزیع فنوتیپی درصد باروری دانه گرده در F_2 جمعیت آمل۲ و IR58025A	۵۰
شکل۴-۳- الف- الگوی نوار باندی حاصل از نشانگر S10019 در والدین IR58025A و آمل۲	۵۱
شکل۴-۴- ب- الگوی نوار باندی نشانگر RG140 حاصل از جمعیت F2 حاصل از آمل۲ × IR58025A	۵۱
شکل۴-۵- الگوی نوار باندی جمعیت F2 حاصل از آمل۲ × IR58025A با استفاده از نشانگر RG140	۵۲
شکل۴-۶- قطعات باندی جمعیت F2 حاصل از آمل۲ × IR58025A با استفاده از نشانگر RM490	۵۳
شکل۴-۷- قطعات باندی جمعیت F2 حاصل از آمل۲ × IR58025A با استفاده از نشانگر RM243	۵۳
شکل۴-۸- نقشه پیوستگی کروموزوم ۱۰	۵۴

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول۳-۱ – مواد و غلظت نهایی واکنش PCR	۴۱
جدول۳- ۲ – برنامه و زمان بندی حرارتی دستگاه PCR	۴۱
جدول۳- ۳ - آغازگرهای مورد استفاده نشانگر STS	۴۲
جدول۳-۴- آغازگرهای مورد استفاده نشانگر SSR	۴۳

مقدمه
و کلیات

۱-۱- برنج هیبرید و اهمیت آن

برنج (*Oryza sativa. L*: 2n = 2x = 24) متعلق به خانواده گرامینه و جنس اوریزا، که شامل ۲۴ گونه می باشد که ۲۲ گونه وحشی و دو گونهٔ (*O. sativa*) و (*O. glaberrima*) زراعی می باشند. این گونه پلی پلوئید بوده و شماره پایه کروموزوم های آن ۵ است (X=5). واریته های اورایزا ساتیوا (*Oryza sativa L.*)، به دو نژاد جغرافیایی ایندیکا و ژاپونیکا تقسیم می شوند هیبریدهای بین این دو نژاد از حیث درجه عقیمی متفاوتند، بعضی کاملاً سالم و برخی از آنها، قسمتی یا کاملاً عقیم هستند (یزدی صمدی، ۱۳۷۰). برنج غذای مهم برای بیش از نیمی از مردم جهان است که شامل ۶۰٪ از کل غذای چین را شامل می شود. بیش از ۹۰ درصد برنج در آسیا تولید شده و به مصرف می رسند و بیش از نصف برنج آسیا در کشورهای هند و چین تولید می شود. به نظر می رسد تولید برنج در دنیا زیاد شده، اما افزایش بیشتر تولید برنج برای برآورد تقاضا، با توجه به افزایش روزافزون جمعیت دنیا مورد نیاز می باشد (Yuan et al, 1998). به نحوی که هر ساله برای تأمین نیازهای داخلی مقادیر قابل توجهی برنج از خارج وارد می گردد، تأمین کمبود برنج از طریق کاشت و برداشت ارقان بومی قابل حصول نمی باشدزیرا ارقام بومی عمدتاً ارقام پابلند، با خاصیت کود پذیری کم، حساس به بیماری می باشند. ارقام برنج هیبرید می توانند جایگزین مناسبی برای حصول عملکرد بیشتر و گامی مؤثر جهت کاهش واردات برنج می باشد (Yuan et al, 1998).

طبق آمار منتشره از مؤسسه بین المللی برنج IRRI[1]، میزان واردات برنج ایران به ۱/۵ میلیون تن در سال ۲۰۲۰ خواهد رسید (Yuan et al, 1998). با سازگاری وسیع واریته های پاکوتاه، عملکرد برنج در چین از ۲ تن در هکتار در ۱۹۶۰ تا ۳/۵ تن در هکتار در ۱۹۷۰ رسیده است. اصلاح و معرفی ذرت هیبرید در اوائل ۱۹۳۰ یکی از مهمترین دستاوردهای اصلاح نباتات بوده است. کشف ذرت هیبرید باعث گردید که به نژادگران تشویق گردند تا با استفاده از پدیده هتروزیس یا رشد عالی هیبرید در سایر گیاهان از جمله سورگوم، ارزن، پنبه، آفتابگردان و برنج و غیره بپردازند(Yuan et al, 1998).

1- International Rice Research Institute

هیبریدهای برنج اولین بار در سال ۱۹۷۰ در چین تجاری شدند. در طول دهه گذشته، ویتنام، هند، فیلیپین، بنگلادش و امریکا تولید هیبرید برنج را شروع کردند. حدود ۵۰٪ از برنج در چین، واریته های هیبرید هستند که به طور متوسط ۶/۹ میلیون در هکتار عملکرد تولید می کنند. ۵۰٪ واریته های باقی مانده، به صورت واریته های خالص با عملکرد بالا می باشند که عملکردی حدود ۵/۴ میلیون تن در هکتار تولید می کنند . بنابراین متوسط واریته های برنج هیبرید در چین عملکردی حدود ۲۷٪ (۱/۵ میلیون تن در هکتار) بیشتر از واریته های خالص با عملکرد بالا تولید می کنند(Virmani et al, 2002). سطح زیر کشت ارقام اصلاح شده پر محصول فقط ۳۰ درصد از کل اراضی زیرکشت برنج را تشکیل می دهد. تولید برنج هیبرید در چین، تولید پایدار برنج در جنوب و جنوب شرقی آسیا (نظیر هند، فیلیپین، بنگلادش، ویتنام و تایلند) را فراهم نموده است. موفقیت در تولید برنج هیبرید، کشورهایی نظیر ایران، مصر و پاکستان را به منظور اتخاذ چنین روشی تشویق کرد ه است. از روش های مؤثر برای تولید پایدار برنج در ایران، استفاده از برنج هیبرید به همراه روش اصلاح مولکولی می تواند یک راهکار مناسب باشد بهره وری تجاری از هتروزیس برا ی بالا بردن تولید برنج ضروری می باشد. استفاده از نرعقیمی سیتوپلاسمی و سیستم بازگرداننده‌باروری تولید بذر هیبرید را آسان می کند (Virmani et al, 2002).

۱ – ۲ - نر عقیمی[1] در برنج

میتوکندری نقش مهمی در گستره فیزیولوژیکی در یوکاریوت ها دارد . در مقایسه با دیگر یوکاریوت ها، ساختمان و اندازه ژنوم های میتوکندریایی گیاهان بسیار متنوع تر هستند . تعدادی از مطالعات نشان داده اند که نوترکیبی بالایی در ژنوم های میتوکندریایی گیاهان رخ می دهد که نقش بالایی در بزرگ شدن اندازه ژنوم دارد

در گیاهان، ژن های میتوکندریایی به طور مستقیم تولید نرعقیمی را تحت تأثیر قرار میدهند (Maruyamaet al, 1991). گیاهانی که قادر به تولید دانه گرده نیستند، نرعقیم[2] خوانده می شوند

1- Male Sterility
2- Male Sterile

۱ – ۲ – ۱ - طبقه بندی نوع نرعقیمی در برنج

از انواع متفاوت نرعقیمی، نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS[1])، نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط (EGMS[2]) و نرعقیمی ژنتیکی – سیتوپلاسمی (GCMS[3]) و نرعقیمی ناشی از عوامل شیمیایی می باشند. نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط شامل نرعقیمی ژنتیکی حساس به دما (TGMS[4]) و نرعقیمی ژنتیکی حساس به طول روز (PGMS[5]) می باشند (Hunan et al, 1986).

اگر نرعقیمی توارث مندلی نشان ندهد به جای ان وراثت مندلی را نشان دهد نرعقیمی سیتوپلاسمی خوانده می شود که به باروری ماده بر می گردد (Hosseini et al, 2010). به عبارتی نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) صفتی است با وراثت مادری که بر اثر اختلال یا باززایی ژنوم میتوکندریایی و در نتیجه ناتوانی در تولید دانه های گرده بارور و فعال ایجاد می شود (احمدی خواه، ۱۳۸۷). که در بیش از ۱۵۰ گونه های گیاهان محصولات مهم کشاورزی ایجاد شده است. فنوتیپ CMS توسط ناترتیبی ژن هایی که اغلب شیمری[6] در ساختمان هستند ایجاد می شود (Liu et al, 2004). اما به کمک ژن های تجدیدکننده باروری[7] (RF) می توان باروری را به لاین های نرعقیم سیتوپلاسمی(CMS) برگرداند (احمدی خواه، ۱۳۸۷). آنها بیان ژن های همراه با CMS را تغییر می دهند و بنابراین اثر تخریبی که توسط ژن‌های همراه با CMS ایجاد می شود، را کاهش می دهند یاحذف می کنند (Lin et al, 1980).

1- Cytoplasmic Male Sterility
2- Environmental male sterility
3- Genetic- cytoplasmic male sterility
4- Thermosensitive Genetic- cytoplasmic male sterility
5- photoperiodsensitive Genetic- cytoplasmic male sterility
6- Chimeric
7- Fertility restoration

از آنجا که برنج گیاهی خودگشن[1] می باشد، لازم است از سیستم مؤثرنرعقیمی برای ایجاد و تولید واریته های هیبرید F_1 استفاده شود (Shen et al, 1996). سیستم نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی (CMS) توسط اثرات متقابل سیتوپلاسم و ژن های هسته ای کنترل می شود. وجود یکنواختی ژن مغلوب هسته ای برای سیستم باروری همراه با عقیمی که ناشی از فاکتور ژنتیکی در سیتوپلاسم می شود یک گیاه عقیم را می سازد این فاکتور ژنتیکی موجود در سیتوپلاسم قسمتی ازDNA میتوکندریایی گزارش شده است. در غیاب فاکتور ژنتیکی القا کننده عقیمی در سیتوپلاسم، گیاهان عقیم بارور می شوند. اگر یگ گیاه در سیتوپلاسم دارای فاکتور القا کننده عقیمی(S) و ژن های باروری مغلوب (Rf) در هسته باشد، به عنوان گیاه عقیم یا لاینA خوانده می شود

در یک گیاه اگر ژن های بازگرداننده باروری به صورت مغلوب (Rf)، اما دارای فاکتور ژنتیکی (N) در سیتوپلاسم، باشند گیاهان قادر خواهند بود عقیمی گیاهان نرعقیم را نگهداری کنند و به عنوان گیاهان نگهدارنده یا لاین B معرفی شده اند

اگر ژن های بازگرداننده باروری در یک گیاه غالب (Rf) باشند، گیاه برگرداننده یا لاین (R) خوانده می شوند

در سیستم CMS که به اسم سیستم سه لاینی معروف می باشد از سه لاین متفاوت استفاده می شود: لاین عقیم (لاین A)، لاین نگهدارنده (لاین B)، لاین برگرداننده (لاین R). استفاده از این سیستم برای تولید تجاری بذور هیبرید شامل ۲ مرحله می باشد. یک لاین نرعقیم سیتوپلاسم نگهداری می شود و توسط هیبریداسیون آن با لاین نگهدارنده تکثیر می شود . هیبریدهای تجاری F_1 توسط کراس یک لاین نرعقیم سیتوپلاسم با بازگرداننده مناسب تولید می شوند(Virmani et al, 2002).

از دیگر سیستم ها از محیط برای تولید لاین عقیم نیز استفاده می شو د. سیستم نرعقیمی حساس به محیط (EGMS) از دو لاین B (لاین نگهدارنده) و R (لاین برگرداننده) استفاده می شود که به آن سیستم دو لاینی گفته می شود عموماً لاین های TGMS وقتی در دمای بالاتر از ۲۵- ۳۰ درجه

1- Self Pollination

سانتی گراد قرار می گیرند، عقیم می شوند. سیستم TGMS برخلاف CMS احتیاجی به لاین R ندارد که از مزیای آن به شمار میرود زیرا در صورتی که در محیط مناسب رشد کند باروری گیاه TGMS برگرداننده می شود. به علاوه سیستمTGMS آسیب پذیری ژنتیکی را کاهش می دهد زیرا بیان عقیمی وابسته به سیتوپلاسم نمی باشد، بنابراین هیبریدها با زمینۀژنتیکی متنوعی ایجاد می شوند (Virmani et al, 2002).

۱ – ۲ -۲ – مطالعات مولکولی ژنتیکی روی ژنوم میتوکندریایی[1]

ژنوم های میتوکندریایی (mt) ساختمان بسیار پیچیده ای دارند . آنها در اندازه های بسیار متنوعی در بین گونه ها یافت می شوند که میزان آن از ۲۰۰ kb در .Brassica spp تا ۲۰۰۰ kb در بعضی از سبزیجات متغیر است برای بیشتر از ۲۰ پروتئین کدکننده که شناسایی شده اند، حدودtRNA ۱۳ و ۳ نوع متفاوت از RNA ریبوزومی شناسایی شده اند . ژنوم میتوکندریایی برنج یک ساختمان پیچیده ژنتیکی حدود۳۰۰ kb را دارد که کوچکتر از دیگر غلات می باشد برگرداننده باروری توسط یک لوکوس بزرگ اثر در لاین رستنورر باسماتی PRR78 کنترل شده است که با فاصله فیزیکی ۱۶۳/۶ Kb روی کروموزوم ۱۰ به طور فیزیکی مکان یابی شده است(Komori et al, 2004).

عقیده بر آن است که فنوتیپ نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) از ORF نامتعارف، منشأ گرفته از آرایش مجدد DNA میتوکندریایی ایجاد می شود. تاکنون، حداقل ۹ ژن میتوکندریایی برای ترکیبات زنجیره تنفسی شناخته شده که در نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) گونه های گیاهی مختلف دخالت دارند، که عبارتند ازnad5, nad3 و nad7 از ترکیبI، cox1 و cox2 از ترکیب،atp I، atp 6، atp 8، atp 9، از ترکیب V (Brown et al, 1999، Heazlewood et al, 2003) اما تعداد زیادی از توالی های تکراری و زائد، ژنوم میتوکندریایی را خیلی بزرگ ساخته(معمولاً بیش از ۲۰۰ kb) که نمی توان مکان ویژه ای را شناسایی کرد. مکان های ژنی مرتبط با نر عقیمی سیتوپلاسمی (CMS) در بسیاری از گیاهان در حال

1- Genome mitochondrial

شناخته شدن می باشند، مکانیزم مولکولی نر عقیمی سیتوپلاسمی (CMS) نیز بطور عمده مورد بر رسی قرار نگرفته و نیاز هست که توجه بیشتری در آینده به آن شود. در سه دهه گذشته، استراتژیهای زیادی برای تعیین توالی مکان های ژنی میتوکندریایی مورد هدف بکار رفته است یکی از این روش ها شناسایی ژن های تظاهر یافته بطور متفاوت از طریق غربال کتابخانه cDNA[1] میتوکندریایی بوده است. روش دیگر مقایسه الگوهای RFLP برای mtDNA بین گیاه نر عقیم و لاین نگهد ارنده آن از طریق ژن های میتوکندریایی شناخته شده بعنوان پروب هایی جهت توصیف ژنوم میتوکندریایی تغییر یافته بوده است. روش سوم مقایسه الگوهای واکنش زنجیره ای پلی مورفیسم (PCR) برای mtDNA بین گیاه موتانت و گیاه بارور بر اساس اطلاعات کامل ژنوم متیوکندریایی بوده است. تمام روش های مذکور بطور موفقیت آمیزی مشخص کرد که ORFs جدید از آرایش مجدد قطعات mtDNA ایجاد شده ا ند. با استفاده از تجزیه RFLP، مشخص گردید سیتوپلاسم PET1 آفتابگردان از نوع بارور آن، مشخص گردید یک ناحیه ۱۷ kb از ژنوم میتوکندریایی شامل قطعه هایی۱۲ kb وارونه شده و یک قطعه۵kb اضافی بوده است که توسط تکرارهای ۲۶۱bp وارونه شده اند. یک قطعه ۵kb اضافی در پایین دست orf 225 bp در پایین دست ژن atpA تولید شده است. این orf یک پروتئین ۱۶ -kDA را کد می کنند که در دو گیاه عقیم و بارور تجمع پیدا کرده است.

تجمع orfH22 نسخه برداری می شود و پروتئین را کد می کند مانع اختصاصی بودن بافت و سلول می شوند و باروری را کم می کنند این نتایج نقش orfH22 را تأیید می کنند(Jia et al, 2001). تاکنون، سه ژن برگرداننده باروری، Rf_2 از ذرت، Rf از Petunia، Rfk1 از هویج کلون شده اند به‌عبارتی دیگر، Petunia Rf و Rfk1 (Rf0) از هویج پروتئین متشکل از ۱۴ تکرار و ۱۶ تکرار از ۳۵-aa (PRR[2]) سه نکلئوتیدی را کد می کنند. این سه ژن دو نوع متفاوت از پروتئین را کد می کنند؛ Rf_2 ذرت تجمع پروتئین URF13 همراه با CMS را کاهش نمی دهند، در حالیکه دو ژن برگرداننده دیگر پروتئین PCF همراه با CMS مخصوصاً، پروتئین ORF125 را کاهش می دهند (Liu et al, 2004).

1- complementary DNA

2- Pentatricopeptide Repeat Motif

RNA در همه انواع CMS نوع BT ، دو رشته ای شناخته شده است در حالیکه در لاین نگهدارنده این گونه نمی باشد وزن مولکولی آن۱۸ kb بوده است.

۱ – ۲ – ۲ – ۱ – طبقه بندی نرعقیمی سیتوپلاسمی(CMS) برنج

CMS در حال حاضر تولید برنج هیبرید در جهان به صورت سیستم سه لاینی (نرعقیم سیتوپلاسمی) و یا دو لاینی (نرعقیم حساس به طول روز یا درجه حرارت) می باشند. از سیستم های مورد استفاده در CMS سیستم های WA، BT و HL می باشند. سیستم WA[1] متعلق به سیستم CMS اسپوروفیتیک[2] می باشند که قادر به تولید گرده نرمال نیستند ژن های هسته ای قادر به برگرداندن باروری دانه گرده می باشند و بررسی های ژنتیکی انجام گرفته نشان داد که دو ژن اصلی در برگرداندن باروری در این سیستم نقش موثری دارند.

۱ – ۲ – ۲ – ۱ - ۲ -۱ CMS -WA

همان طور که در بالا گفته شد، CMS – WA یکی از CMS های نماینده در این گروه بندی است. سیستم اجباری وحشی(CMS – WA) از جمعیت گونه های وحشی*O.rufipogon* مشتق شده اند که گسترده ترین سیستم مورد استفاده برای تولید هیبرید می باشد. CMS – WA بیشتر شامل لاین های CMS ایندیکا[3] می باشد که اخیراً در تولید هیبرید همانند تیپ برنج Indonezia، تیپ k، تیپ Gambiaka، تیپ Dissi، Maxie و غیره به صورت تجاری در آمده اند . عقیمی دانه گرده نسبتاً طی مراحل اولیه توسعه میکروسپور، عمدتاً در مرحله تک هسته ای رخ می دهد. دانه گرده بیشتر به صورت نامنظم شکل گرفته و با محلول I_2 - KI غیر قابل رنگ پذیر می باشد. بیش از ۹۰ درصد دانه گرده در

1- Wild Abortive
2- Sporophitic

3- Indica

هیبرید F_1، نرمال بوده و دانه های گرده عقیم و بارور در نسل F_2 به صورت ۳:۱ یا ۱۵:۱ (عقیم به بارور) تفکیک می شوند که نشان دهنده یک یا دو الل اعاده کننده باروری در تلاقی های مختلف می باشد . نرعقیمی این لاین های CMS تحت شرایط محیطی مختلف پایدار بوده و طیف اعاده کنندگی باروری این گروه محدود به گونه های ژنوم AA می باشد. خروج خوشه کامل نبوده و ابتدای خوشه معمولاً مقداری توسط غلاف برگ پرچم شان در زمان خوشه دهی احاطه شده و داخل آن باقی می ماند عقیمی این نوع CMS معمولاً توسط ارقام ایندیکای نیمه پاکوتاه زودرس (که در دره Yangtze کشورچین منشأ گرفته اند) حفظ می شود

CMS-BT -۲ -۲ - ۲ - ۲ - ۱

جدایی از CMS های WA و HL، نوع دیگر CMS، CMS-BT می باشد. این گروه CMS شامل لاین های Dian-1 و Dian-3 می باشند. این لاین ها از طریق جابجایی هسته ای و تلاقی برگشتی ارقام ایندیکای بومی (E – Shan – Ta – Bai - Gu و Chinsurah Boro II) بعنوان والد مادری با ارقام ژاپونیکای چینی همانند Taichung 65 بعنوان والد پدری دوره ای توسعه یافته اند. دانه های گرده در این گروه CMS معمولا در مرحله سه هسته ای عقیم می باشند . دانه های گرده لاین نر عقیم بصورت کروی بوده و با محلول I_2-KI رنگ پذیر می باشند. معمولا دانه گرده، عقیمی کامل را نشان داده و بساک ها باز نمی شوند مگر تحت شرا یط درجه حرارت بالا و رطوبت پایین . اما رابطه اعاده کننده باروری و نگهدارنده باروری همانند CMS-HL عمل می نمایند (Hu et al, 1985، Brown et al, 1999). لاین های CMS-BT، طیف اعاده کننده باروری نسبتا بیشتری نسبت به CMS-WA (که می تواند به آسانی اعاده شوند) دارند. ژن های اعاده کننده باروری عمدتا در ارقام زراعی نواحی مرتفع کوهستانی در Yunnan و در ارقام زراعی غرب آسیا وجود دارند . بطور کلی تمامی ارقام ایندیکا از ایری، منابع اعاده کننده باروری قوی برای CMS-BT می باشند در حالیکه ارقام ژاپونیکا از ژاپن و چین بعنوان نگهدارنده باروری این نوع نر عقیم سیتوپلاسمی می باشند . در هیبرید های F_1 بدست آمده از آنها، تشکیل بذر

نرمال و باروری دانه گرده همانند CMS نوع HL حدود ۵۰ درصد می باشد و گیاهان عقیم در جمعیت F_2 مشاهده نخواهند شد. علاوه بر این، تعدادی از لاین های CMS بدست آمده از دگرگشنی بین برنج وحشی در داخل گونه هایی با ژنوم AA و ارقام برنج بعنوان والدین تکراری، خصوصیات اعاده کننده باروری متفاوتی را جهت شناخت نوعCMS دارند. برای مثال، دو لاین نر عقیم سیتوپلاسمیIR66707A و IR69700A که در ایری بدست آمده اند نرعقمیمی بسیار پایداری دارند . نر عقیمی آنها نمی تواند توسط هیچ یک از لاین های اعاده کننده باروری شناخته شده، اعاده شود. اما لاین هایی که سیتوپلاسم شان را به ترتیب از *O. Perennis* و *O. Glumaepatula* گرفته اند، از جمله ژنوم ه سته ای برنج زراعی IR64، یک اعاده کننده باروری قوی برایCMS های نوع WA، HL و BT می باشند (Dalmacio et al, 1995 , Brar et al, 1995).

CMS - HL - ۳ - ۲ - ۲ - ۲ - ۱

لاین Hinglina CMS اولیه از طریق تلاقی بر گشتی یک برنج وحشی ریشک قرمز (*O. rufipogon*) بعنوان والد مادری با رقم Lian-Tang-Zao، یک رقم ایندیکای زودرس بعنوان والد پدری زودرس توسط دانشگاه Wuhan در سال ۱۹۷۴ بدست آمده است. عقیمی دانه گرده در این گروه از CMS، معمولا در مرحله دو هسته ای رخ می دهد، دانه های گرده عقیم کروی بوده و قابل رنگ پذیر با محلول I_2KI نیستند. عقیمی دانه گرده از طریق بافت گامتوفیتیک دانه گرده مشخص می شود. اگر چه حدود ۵۰ درصد دانه های گرده در هیبرید های F_1 بدست آمده از لاین هایHonglian CMS نرمال می باشد، اما تشکیل بذر آنها نرمال است. تفکیک عقیمی در جمعیت های نسل F_2 مشاهده نشده که نشان دهنده حالت گامتوفیتیک واقعی می باشد. رابطه بین اعاده کننده های باروری و نگهدارنده های باروری در لاین های Honglian CMS، بر خلاف لاین های CMS-WA می باشد. بطور کلی، بیشتر ارقام ایندیکای زودرس، منشاء گرفته از دره Yangtze، همانند Zhenshan 97، Longzi، Wen-Xian-Zao و Xue-gu-zao بعنوان نگهدارنده باروری برای CMS-WA می باشند اما برای Honglian CMS بعنوان