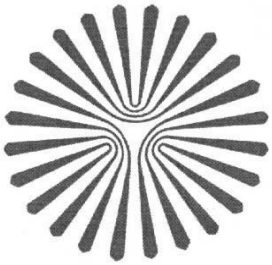


دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشکده علوم پایه و کشاورزی

گروه علمی: بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان پایان نامه:

شناسایی ارقام برنج در لوکوس ژن عامل عطر و طعم (آروما) با استفاده از نشانگرهای مولکولی

استاد راهنما: دکتر اسدالله احمدی خواه

استاد مشاور:دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

نگارش: عبدالملک آرخی

خرداد ماه ۸۹

چکیده:

کیفیت برنج از جمله مهمترین فاکتورهای بازارپسندی آن در ایران و جهان می‌باشد. یکی از عوامل تعیین کنندهٔ کیفیت برنج، میزان عطر و طعم آن می باشد. بررسی ها نشان داده که ماده ۲-استیل-۱-پیرولین، مهمترین ترکیب شیمیایی ایجاد کنندهٔ عطر و طعم در برنج بوده و توسط ژن مغلوب آروما (*fgr*) که دارای یک حذف ۸ نوکلئوتیدی و سه SNP در اگزون شمارهٔ ۷ کروموزوم شمارهٔ ۸ در برنجهای معطر می باشد، کنترل می‌شود. در این تحقیق، بر اساس ارزیابی فنوتیپی ۴۲ رقم و لاین برنج تهیه شده از منابع داخلی و خارجی از نظر آروما، به ترتیب تعداد ۹، ۱۶ و ۱۷ رقم، در سه گروه بسیار آروماتیک، آروماتیک و غیر آروماتیک طبقه‌بندی شدند. برای تعیین ژنوتیپ آنها از نظر لوکوس ژن آروما نیز دو جفت آغازگر Arm1 و Arm2 بر اساس توالی ژن فوق الذکر طراحی و تکثیر نمونه‌های DNAی استخراج شده با روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گردید. از بین این دو جفت آغازگر، Arm1 که حذف ۸ نوکلئوتیدی فوق الذکر را در ژن آروما احاطه می-کرد، توانست تولید یک باند چندشکل همبارز نماید، که اندازه آن در همه ارقام بسیار آروماتیک و برخی از ارقام آروماتیک ۱۰۳ و در برخی دیگر از ارقام آروماتیک و همه ارقام غیرآروماتیک ۱۱۱ جفت باز بود. همچنین نتایج بررسی ها نشان داد که ارزیابی فنوتیپیِ میزان آروما از طریق استشمام، دقت بالایی ندارد و از اینرو در یک برنامه اصلاحی موفق برای بهبود عطر ارقام مورد نظر، می‌توان به جای روش ارزیابی فنوتیپی از ژنوتیپ‌یابی مولکولی بر اساس نشانگر اختصاصی و همبارز Arm1 استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج، عطر و طعم، آروما، *fgr*، نشانگر اختصاصی.

حروف و علائم بکار گرفته شده در پایان نامه

2AP = 2 Acetyl –1- Pyroline

AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism

ALP = Amplicon Length Polymorphism

ASA = Allele Specific Amplification

BADH2 = Betaine Aldehyde Dehydrogenase two

DAF = DNA Amplification Fingerprinting

EST = Expressed Sequence Tag

Fgr = Fragrance

GC-MS = Gas Chromatography Mass Spectrometery

HPLC = High Pressure Liquid Chromatography

IRRI = International Rice Research Institute

MAS = Marker-Assisted Selection

ORF = Open Reading Frame

PBR = PCR Based RFLP

QTL = Quantitative Trait Loci

RAPD= Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism

RLGS = Restriction Landmark Genomic Scanning

SCAR = Sequence Characters Amplified Region

SNP = Single Nucleic Polymorphism

SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism

SSR = Simple Sequence Repeat

STS = Sequence Tag Site

VNTR = Variable Number of Tandem Repeat

فهرست مطالب

فصل اول :مقدمه و کلیات ۱

۱ -۱) مقدمه ۲

۱-۲) جایگاه برنج ۳

۱-۳) منشأ،کونه ها و انواع برنج ۴

۱-۴) وضعیت تاگزونومی برنجهای آروماتیک ۸

۱-۵) آشنایی با نشانگرهای مولکولی ۱۰

۱-۵-۱) مقدمه ۱۰

۱-۵-۲)چند شکلی DNA ۱۱

۱-۵-۳) راههای تشخیص چند شکلی. ۱۲

۱-۵-۴) نشانگرهای ژنتیکی ۱۲

۱-۵-۵) انواع نشانگرهای ژنتیکی ۱۳

۱-۵-۶) برخی کاربردهای نشانگرهای مولکولی ۱۵

۱-۶) گزینش بکمک نشانگرها ۱۷

فصل دوم: بررسی منابع: ۲۱

۲-۱) کیفیت و عطر و طعم برنج ۲۲

۲-۲) ترکیبات فرار موجود دربرنجهای معطر ۲۲

۲-۳) ساختمان شیمیایی عامل عطر و طعم برنج ۲۶

۲-۴) غلظت 2AP در برنجهای معطر و غیر معطر ۲۷

۲-۵) روشهای مختلف مورد استفاده در ارزیابی فنوتیپی عطر و طعم برنج ۲۸

۲-۵-۱)روش های حسی ۲۸

۲-۵-۲)روش شیمیایی ۳۰

۲-۶) مسیر بیوسنتز 2AP ۳۲

۲-۷) ژنتیک صفت کیفی عطر و طعم ۳۴

۲-۸) موتاسیونهای موجود در ژن BADH2 ۳۹

فصل سوم: مواد و روشها ۴۱

۳-۱- مواد گیاهی ۴۲

۳-۲- استخراج DNA ۴۳

۳-۲-۱) مراحل استخراج ۴۳
۳-۳) آغازگرهای طراحی شده ۴۴
۳-۴)واکنش PCR ۴۵
۳-۵) سیکل حرارتی PCR ۴۵
۳-۶) تهیه ژل الکتروفورز ۴۶
۳-۷) عمل الکتروفورز ۴۷
۳-۸) عکسبرداری و مشخص نمودن اندازه باندها ۴۷
۳-۹) ارزیابی فنوتیپی ۴۷
۳-۱۰) ارزیابی ژنوتیپی ۴۸

فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۹
۴-۱)نتایج و بحث ۵۰
۴-۱-۱) نتایج ارزیابی فنوتیپی آروماى ارقام برنج ۵۰
۴-۱-۲) تعیین ژنوتیپ ارقام برنج از نظر عطر و طعم با استفاده از نشانگر ASA ۵۲
۴-۱-۳) مقایسه نتایج ارزیابی ژنوتیپی با ارزیابی فنوتیپی ۵۴
۴-۱-۴) بحث ۵۴
فهرست منابع ۵۸

فصل اول:

«مقدمه و کلیات»

۱-۱) مقدمه:

برنج پس از گندم یکی از مهمترین محصولات زراعی است و تولید آن بخش قابل توجهی از برنامهٔ تأمین غذایی و خودکفایی را در بردارد. کیفیت برنج تحت کنترل عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی و روشهای فرآوری بوده و ساختار ژنتیکی یک رقم خاص تا حدود زیادی تعیین کنندهٔ خصوصیات کیفی آن می باشد.

در گذشته تلاش بیشتر محققان بر این بود که ارقام جدیدی با خصوصیات زراعی خوب و عملکرد بالا تولید نمایند، ولی امروزه توجه آنها به بهبود کیفیت دانه و افزایش ارزش غذایی آن نیز معطوف گردیده است، یکی از عوامل مهم تعیین کننده کیفیت برنج، میزان عطر و طعم(Aroma) آن می‌باشد که نقش مؤثری در بازارپسندی آن در ایران و جهان دارد. با توجه به حساس بودن ذائقه مردم ایران زمین به کیفیت برنج پخت شده و پائین بودن پتانسیل عملکرد ارقام بومی و با کیفیت مناطق مختلف کشور، تولید و معرفی ارقامی که هر دو خصوصیت یاد شده را دارا باشند دارای اهمیت خاصی است. این امر در گذشته بدلیل وجود لینکاژ میان عملکرد پائین و ژن‌های عامل کیفیت و یا به عبارتی رابطه عکس میان عملکرد و کیفیت، به نتایج مطلوبی نرسیده است و استفاده از ابزار ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی و گزینش به کمک نشانگرها برای خصوصیات کیفی مطلوب در یک برنامه اصلاحی می‌تواند به عنوان یک راهکار جدید بسیار مؤثر معرفی گردد.

اصلاح موفق ارقام آروماتیک نیز عمدتاً بستگی به شناسایی کارآمد خصوصیات مطلوبی دارد که با میزان آروما در ارتباط تنگاتنگی است. تحقیقات مختلف نشان داده که مهم‌ترین ترکیب شیمیایی مؤثر در میزان عطر و طعم برنج، ماده ۲-استیل -۱-پیرولین (2AP) می‌باشد که توسط یک ژن مغلوب (*fgr*) واقع بر روی کروموزوم شمارهٔ ۸ برنج کنترل می گردد. با این توضیح که در ارقام معطر، یک حذف ۸ نوکلئو تیدی (GATTAGGC) و سه SNP در اگزون شماره ۷ برنج‌های نوع جاسمین و باسماتی، با ایجاد یک کدون توقف پیش‌رس وبا عدم تولید آنزیم کامل بتائین آلدئید دهیدرو ژناز (BADH2)، سنتز 2AP و تولید عطر را باعث می‌گردند، در حالی که ارقام غیرمعطر با کد کردن آنزیم فوق به صورت کامل، از سنتز 2AP ممانعت نموده و تولید عطر را متوقف می‌نمایند.

در این تحقیق بر اساس توالی ژن *fgr* اقدام به طراحی آغازگرهای جدید موسوم به نشانگرهای مستقیم ژن گردید وسعی شد تا ضمن تعیین ژنوتیپ ارقام مختلف برنج از نظر لوکوس این ژن، کارآیی و (کارآمدی) نشانگرهای اختصاصی آن در تخمین تظاهر صفت عطر و طعم مورد بررسی قرار گیرند. این امر محققان را در بهبود کیفیت برنج کمک می‌نماید و چون کارآمدی

نشانگرهای اختصاصی ژن آروما برای نخستین بار است که در کشور اجرا می‌گردد، گام مهمی در راستای جایگزینی روش‌های سنتی ارزیابی کیفیت برنج (که هم پر زحمت و وقت گیر بوده و هم خالی از خطا نیست) با یک روش دقیق مبتنی بر اطلاعات توالی ژن عامل، محسوب شده و پنجره امیدبخشی را برای ارزیابی چنین خصوصیتی باز خواهد نمود. بی شک استفاده از نشانگرهای مولکولی به خصوص نشانگرهای مستقیم یک ژن در زمرهٔ یکی از مهیج‌ترین و جدیدترین جنبه‌های این طرح می‌باشد.

بنابراین به طور خلاصه اهداف این طرح عبارتند از:

۱- تعیین ژنوتیپ ارقام مختلف برنج از نظر لوکوس ژن آروما (*fgr*)

۲- ارزیابی کارآیی (کارآمدی) نشانگرهای اختصاصی ژن آروما در تخمین تظاهر صفت عطر و طعم در برنج

۱-۲) جایگاه برنج:

برنج (*Oryza sative* L.) دومین غله مهم دنیاست و از لحاظ تولید دانه بعد از گندم رتبه دوم را به خود اختصاص داده است. تقریباً تمامی برنج‌های تولید شده به مصرف غذایی انسان می‌رسد وغذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان محسوب 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 نشاسته ای 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. بر خلاف گندم که محصول فصل سرد است و تولید آن به عنوان گیاهی زمستانه، در مناطق دارای آب و هوای معتدل و نیمه گرمسیری، انجام می‌گیرد، این گیاه محصول فصل گرم است و عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کشت می‌گردد، در نواحی دارای فصول متناوب مرطوب و خشک، تولید برنج در فصل بارندگی تمرکز دارد ودر صورت

وجود و تأمین آب اضافی، در فصل خشک، کشت می گردد. در نواحی معتدل با ارتفاع زیاد، کشت آن به دوره زمانی فاقد یخ زدگی، محدود میگردد. بیش از۹۰٪ برنج دنیا، در آسیا تولید می شود.

اندازه ژنوم این گیاه کوچک بوده(۴۳۰ مگاباز) و بدلیل ارتباط آن با دیگر گونه های مهم زراعی غلات، مطالعات ژنتیکی بسیاری بر روی آن صورت پذیرفته و در نتیجه دسترسی به منابع ژنومی آن مانند نقشه های ژنتیکی کاملاً تعریف شده، مجموعهٔ گسترده ای از توالی های نشانمند بیان شده (ESTs[1]) و یک نقشهٔ کروموزومی مصنوعی مخمر(YAC[2]) به راحتی امکانپذیر می‌باشد و این خصوصیت ها باعث گردیده که از آن بعنوان یک الگو در مطالعات ژنتیکی غلات استفاده گردد.

۱-۳) منشأ،گونه ها و انواع برنج:

گونهٔ اصلی زراعی برنج در حدود ده هزار سال پیش در منطقه ای که شامل شمال شرقی هند، بنگلادش، برمه، تایلند، لائوس، ویتنام و جنوب چین می گردد، اهلی شده است. بیشترین تنوع اشکال زراعی اولیه و خویشاوندان وحشی آنها در این منطقه وسیع یافت شده است . برنج از جمله قدیمیترین گیاهان زراعی است که در هند و چین برای بیش از هشت هزار سال کشت می شده است. برنج از منطقه اولیه تنوع اش به جنوب شرقی آسیا و جزایر مجاور در ناحیه اقیانوسیه، گسترش یافته است. تنها گونه زراعی دیگر برنج ، *O. glaberima* است که بومی مناطق فوقانی رودخانه نیجر درغرب آفریقا است. اگرچه این گونه هنوز در سطح کوچکی در نواحی گرمسیری غرب آفریقا کشت می شود، ولی با ارقام اصلاح شده *O. sativa* در حال جایگزینی است. اعتقاد بر این است که دوگونه مزبور، از یک نیای مشترک، منشأ یافته باشند که طی مسیرهای جداگانه ای قرار گرفته‌اند و احتمالاً این جدایی، بر اثر تفکیک زمین‌ها و تشکیل قاره آسیا و آفریقا، ایجاد شده است (۱). جنس *Oryza* دارای ۲۱ گونه وحشی و ۲ گونه زراعی و با تعداد کروموزوم پایه ۱۲ می‌باشد (جدول شماره ۱-۱)، که ۹ گونه از گونه های وحشی، تتراپلوئید و بقیه متعلق به گروه دیپلوئیدها می‌باشند (۶۱).

[1]. Expressed Sequence Tag
[2] Yeast Artificial chromosome

جدول شمارۀ۱-۱ : تعداد کروموزوم، ترکیب ژنومی و توزیع جغرافیایی انواع برنج (۶۱)

ردیف	گونه	2n	ژنوم	توزیع جغرافیایی
O. sativa complex				
۱	*O. sativa L.*	۲۴	AA	سرتاسر جهان
۲	*O. nivara sharma et shastry*	۲۴	AA	مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا
۳	*O. rufipogon Griff*	۲۴	AA	مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، مناطق گرمسیری استرالیا
۴	*O. breviligulata A.Chev.et Roehr*	۲۴	$A^g A^g$	آفریقا
۵	*O. glaberrima steud.*	۲۴	$A^g A^g$	غرب آفریقا
۶	*O. longistaminata A.Chev et roehr*	۲۴	$A^g A^g$	آفریقا
۷	*O. meridionalis Ng*	۲۴	$A^g A^g$	مناطق گرمسیری استرالیا
۸	*O. glumaepatula steud*	۲۴	A^{gp} A^{gp}	آمریکای مرکزی و جنوبی
O. officinalis complex				
۹	*O. punctata Kotschy ex Steud.*	۲۴ ۴۸	BB BBCC	آفریقا
۱۰	*O. minuta J. S. Pesl. e C.B.presi*	۴۸	BBCC	فیلیپین و گینه نو پاپوآ
۱۱	*O. officinalis Wall ex Watt*	۲۴	CC	مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا وگرمسیری استرالیا
۱۲	*O. rhyzomatis Vaughan*	۲۴	CC	سری لانکا
۱۳	*O. eichingeri A.peter*	۲۴	CC	جنوب آسیا و غرب آفریقا
۱۴	*O. latifolia Desv.*	۴۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی
۱۵	*O. alta Swallen*	۴۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی

۱۶	*O. grandiglomis(Doell) prod.*	۴۸	CCDD	آمریکای مرکزی و جنوبی
۱۷	*O. australiensis Domin*	۲۴	EE	مناطق گرمسیری استرالیا
۱۸	*O. brachyantha A.Chev.*	۲۴	FF	آفریقا
O. meyeriana complex				
۱۹	*O. granulata Nees et Am.ex Watt*	۲۴	GG	آسیای جنوب و جنوب شرقی
۲۰	*O. meyeriana(Zoll.et Mor. Ex steud.)Bad.*	۲۴	GG	آسیای جنوب شرقی
O. ridleyi complex				
۲۱	*O. logiglomis Jansen*	۴۸	HHJJ	Iriann Jaya, اندونزی و گینه نو پاپوآ
۲۲	*O. ridleyi Hook.f.*	۴۸	HHJJ	جنوب آسیا
ژنوم ناشناخته				
۲۳	*O. shlechteri pilger*	۴۸	ناشناخته	گینه نو پاپوآ

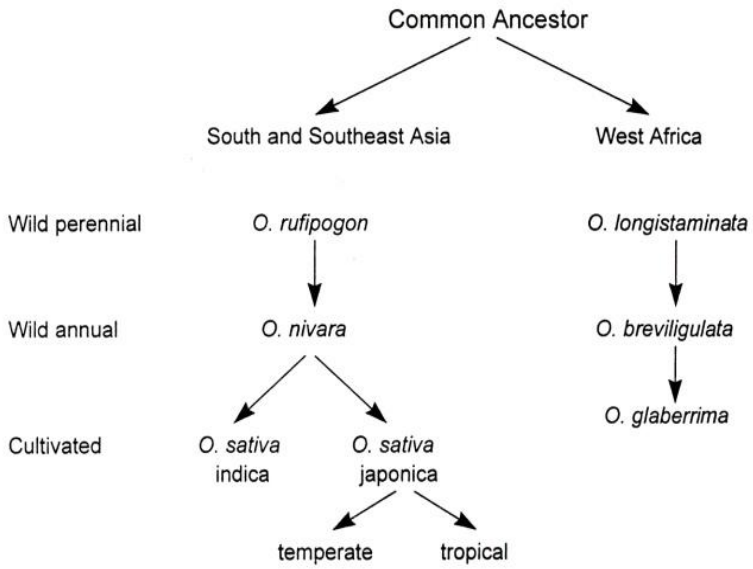
گونه زراعی *O. sativa* (2n=2x=24)، دارای فرمول ژنومی AA می‌باشد، کروموزوم‌های گونه *O.glaberrima* (2n=2x=24)، به خوبی با *O.sativa* جفت نمی‌شوند و لذا به آن فرمول ژنومی A^g A^g داده اند. شش گونه Oryza، یکساله و بقیه چند ساله ودائمی هستند. دو گونه *O .nivara* و *O. Rufipogon* که وحشی و دارای ژنوم AA هستند، به طور وسیعی در جنوب شرق آسیا، توزیع یافته اند و به راحتی با یکدیگر و با برنج زراعی، تلاقی پذیرند(۱). به طور کلی مسیر تکاملی دو گونه برنج زراعی درشکل شمارهٔ (۱-۱) نشان داده شده است (۶۱).

گونه *O. sativa* از نظر تیپ اقلیمی به سه نوع یا نژاد جغرافیایی که عموماً دارای مشخصات زیر می باشند تقسیم بندی می شود:

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

[1] .indica

می یابند که برای 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..



شکل شماره۱-۱: مسیر تکاملی دو گونه زراعی برنج (۶۱).

۲) ژاپنی[1] : این نوع برنجها از چین به ژاپن و کره انتقال یافته و از نوع معتدله می باشند، از نظر صفات مختلف، دارای ساقه ها و برگهای کوتاه، پنجه دهی متوسط، مقاوم به دمای پائین و طول روز، دانه های گرد و کوتاه با محتوی آمیلوز پائین که دانه ها را در هنگام پخت به صورت چسبنده در می آورد، 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 ساقه های ضخیم و برگهای محکم و پهن، پنجه دهی کم، سنبله های بلند، مقاومت به ریزش و دانه های گرد و بلند از دیگر نژادها متمایز می گردند.

Galszman در سال ۱۹۸۷ ، تعداد ۱۶۸۸ کولتیوار برنج را از قسمتهای مختلف دنیا جمع آوری کرد و با استفاده از آنالیز چند متغیره، داده های حاصل از تغییرات آللی در ۱۵ مکان آیزوزایمی

[1] . japonica
[2] . Javanica

را مـورد تجزیـه وتحلیـل قـرار داد و در نتیجـهٔ آن ۹۵٪ کولتیوارهـا را در شـش گـروه مجـزا (I,II,III,IV,V,VI) و ۵٪ باقی مانده را در حدواسط این گـروه هـا قـرارداد. در ایـن تقسـیم بنـدی، صفات مورفولوژیکی در نظر گرفته نشده بودند، در مقایسه این شش گروه با گروهبنـدیهای صـورت گرفته با استفاده از صفات فوق الذکر، مشخص گردید که گروه I با برنجهای گروه ایندیکا و گروه VI با نوع ژاپونیکا مطابقت داشته وبرنجهای گروهV نیز برنجهای آروماتیک شبه قاره هند مانند باسـماتی را شامل می شود.

۱-۴) وضعیت تاگزونومی برنجهای آروماتیک:

کولتیوارهای آروماتیک در گروههای I,V,VI واقـع گردیـده اند(جـدول شـماره ۱-۲). تنهـا تعداد کمی ازکولتیوارهای متعلق به گروه I (indica) و گـروه VI (japonica) و بیشـتر کولتیوارهـای گروه V جزو برنجهای آروماتیک هستند. برنجهای مشهور و با کیفیت بالای باسماتی هندوستان و

گروه	نام کولتیوار	کشورمنشأ
I	Zhao Xing 17	China
	Khao Dawk	Mali Thailand
	Khao	Mali Thailand
	Som Hong	Thailand
	Nahng Nuan	Thailand
	Jao Mali	Thailand
	Tam Xuan	Vietnam
	Tam Xuan Hai Hau	Vietnam
	Somali	Cambodia
	Hawm Mali	Thailand
V	Kamod	India
	Kalimunch	India
	Nama Tha Lay	Myanmar
	Ram Tulsi	India
	Kala Nimak	Bangladesh
	Basmati 370	India
	Basmati 5853	India
	Basmati 5877	India
	Dom Siah	Iran
	Badshahbhog	Bangladesh
	Moosa Tarum	Iran

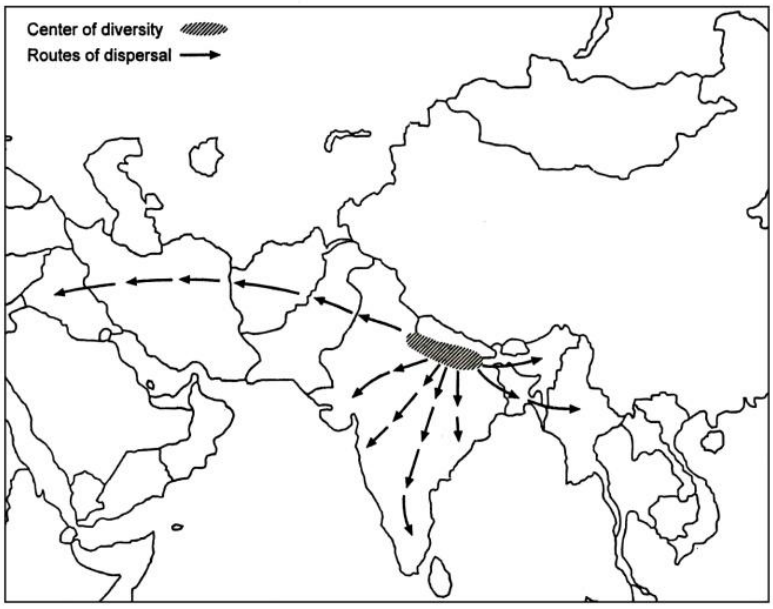
	Barah Lawangin Anbarboo Bindli Dubraj Taungpyan Hmwe Balugyun Boke Hmwe Tulsi Majri Kalijira Jeeraga Samba Xiang Keng 3 Xiang Nuo 4 Kamini Bhog Ngakywe Pawsan Hmwe	Afghanistan Afghanistan Iraq India India Myanmar Myanmar Myanmar India Bangladesh India China China India Myanmar Myanmar
VI	Rojolele Mentik wangi Xiang wqang3 Sukanandi Milfore(6)2 Azucena Milagrosa	Indonesia Indonesia China Indonesia Philippines Philippines Philippines

جدول شماره ۱-۲: برخی ارقام آروماتیک برنج متعلق به گروههای مختلف (۶۱)

پاکستان در گروه V قرار گرفته اند، از جمله برنجهای متعلق به این گروه می توان برنجهای معطر دانه درشت و متوسط basmati،Pankhari203، Ambemohar، Kataribhog،Hansraj،Lawangin وصدری ایران و برنجهای دانه ریز Badshahbhog، Prasadbhog، Tulsimanjri،Bindli و NamaTha Lay را نام برد. بیشتر برنجهای متعلق به این گروه از خاصیت طویل شدن دانه بسیار خوبی برخوردارند.

مرکز تنوع برنجهای آروماتیک گروه V دامنه کوههای هیمالیا در ایالت های Bihar و Uttar Pradesh(UP) هندوستان و ناحیه ای به نام Tarai در کشور نپال است (شکل ۱-۲)، بیشتر

برنجهای آروماتیک، هنوز هم در این مناطق کشت داده می شوند و از این نواحی از یک سو به طرف شمال غرب یعنی پنجاب در هندوستان و پاکستان، افغانستان، ایران وعراق و از سوی دیگر به طرف شمال شرق یعنی بنگلادش و میانمار و ایالت های مختلف هندوستان مانند اوریسا، بنگال، آسام (Assam) و مانیپور گسترش یافته اند. انتشار آن به طرف غرب نیز به ایالتهای مختلف هندوستان از قبیل Rajasthan، Madhya Pradesh، Maharastra و Gujarat صورت پذیرفته است(شکل۱-۲). جالبترین نکته قابل ذکر اینست که شرقی ترین محدودهٔ برنجهای گروه V کشور میانمار است. برنجهای متعلق به این گروه در مناطق شرقی و جنوب شرقی آسیا دیده نمی شوند.



شکل۱-۲.: مرکز تنوع و مناطق انتشار برنج‌های آروماتیک گروه V (۶۱)

۱-۵) آشنایی با نشانگرهای مولکولی :

۱-۵-۱) مقدمه:

در ایران ۹۵٪ برنجهای زراعی از ارقام زیر گونه هندی بوده و کیفیت پخت و کیفیت خوراکی آن از مسائل جدی بشمار می رود. میزان عطر و طعم یکی از عوامل تعیین کننده کیفیت خوراکی برنج بوده و تحت کنترل ژن آروما *fgr*[1] می باشد. از اینرو کیفیت برنج از جمله مهمترین

[1]. Fragrance

فاکتورهای بازار پسندی آن در ایران می باشد. از طرفی ارقام با کیفیت بومی مناطق مختلف کشور از پتانسیل عملکرد نسبتاً پائینی برخوردار هستند، لذا تولید و و معرفی ارقامی که دارای هر دو خصوصیت یاد شده باشند، بسیار ضروری بنظر می رسد. اما، تولید و معرفی این ارقام از طریق روشهای سنتی اصلاح نباتات، بدلیل وجود لینکاژ میان عملکرد پائین و ژنهای عامل کیفیت یا بعبارتی رابطه عکس میان عملکرد و کیفیت در گذشته به نتایج مطلوبی نرسیده است. راه حل این مسئله استفاده از ابزار ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی برای ارتقاء هر دو خصوصیت یاد شده، اولاً در شناسایی صحیح فنوتیپ و ثانیاً ردیابی تغییرات فنوتیپی در نسلهای درحال تفکیک می باشد. برای دستیابی به این مهم، می توان از نشانگرهای مولکولی که دارای پیوستگی با ژن مورد نظر هستند استفاده نمود یا اینکه چنانچه ژن مسئول جدا شده است، بر اساس توالی آن اقدام به طراحی آغازگرهای جدید موسوم به نشانگرهای مستقیم ژن نمود. سپس بوسیله این نشانگرها، ارقام مختلف را تعیین ژنوتیپ کرد.

۱-۵-۲)چند شکلی DNA :

تغییرات در توالی نوکلئوتیدها سبب ایجاد تنوع در ساختمان ژنتیکی یک جمعیت می شود. تفاوت در ساختمان ژنومی موجودات سبب بروز تفاوت در جمعیتهای آنان می شود. حضور بیش از یک نوع آلل در یک لوکوس در ژنوم موجودات را چند شکلی گویند.

چند شکلی های DNA، از اختلاف موجود در توالی های DNA در مکانهای اتصال آغازگرها (به عنوان مثال جهش های نقطه ای)، یا از طریق دگرگونی هایی که اندازه DNA هدف را تغییر می دهند(مانند الحاق، حذف و واژگونی که نواحی تکثیر شونده را تحت تأثیر قرار می دهند) بوجود می آیند.

جهش هایی که در ژنوم یک موجود رخ می دهد ممکن است سبب بروز نقص در عملکرد ژن شده (سنتز پروتئینها) و در فنوتیپ آشکار گردد و یا اینکه تغییری در عملکرد ژن نداشته و در فنوتیپ آشکار نشود. این چند شکلی ها همچنین پایه ای برای تهیه نقشه های پیوستگی ژنی

می باشند که برای تشخیص جایگاههای ژنی جهت تغییرات مهم اقتصادی و تسریع در سرعت اصلاح صفات تولیدی کاربرد دارند.

۱-۵-۳) راههای تشخیص چند شکلی :

الف) کاریوتیپ :

کروموزوم ها که در مرحله ای از تقسیم میتوز قابل رؤیت می گردند بوسیله روشهای سیتوژنتیکی بر اساس اندازه مرتب می شوند که به این عمل کاریوتیپ گویند. تعداد و اندازه کروموزوم ها در هر گونه مختص همان گونه می باشد. تغییر در اندازه و ساختمان کروموزومها همچون حذف یا الحاق کروموزومی، ممکن است در مرحله تقسیم میوز رخ دهد، این نوع از تغییرات که ممکن است در فنوتیپ بروز کند بوسیله کاریوتیپ قابل شناسایی بوده اما جهش های نقطه ای را نمی توان با کاریوتیپ تشخیص داد.

ب) استفاده از نشانگرها:

بوسیله نشانگرهای مولکولی همچون RFLP[1]، RAPD[2]، AFLP[3] و غیره میتوان چند شکلی را در سطح DNA شناسایی کرد.

۱-۵-۴) نشانگرهای ژنتیکی:

نشانگرهای ژنتیکی بیانگر تفاوتهای ذاتی (ژنتیکی) میان ارگانیزمهای منفرد می باشند. بطورکلی، این نشانگرها نشاندهنده خود ژنهای مورد جستجو نیستند بلکه بعنوان "علامت" یا "پرچم" برای ژنهای مورد نظر عمل می نمایند. به آندسته از نشانگرهایی که در فاصله خیلی نزدیکی از ژن ها قرار دارند و یا بعبارتی دارای لینکاژ قوی با ژن های مورد نظر هستند، "نشانه های

[1] Restriction fragment length polymorphism
[2] Random amplified polymorphic DNA
[3] Amplified fragment length polymorphism

ژنی"اطلاق می گردد. بایستی توجه داشت که نشانگرها تنها در فاصله نزدیکی از ژنهای کنترل کنندهٔ آن صفت واقع گردیده و اثری روی فنوتیپ آن صفت ندارند.

۱-۵-۵) انواع نشانگرهای ژنتیکی:

تاکنون تقسیم بندی های مختلفی در خصوص نشانگرهای ژنتیکی ارائه شده است. در ذیل یک نمونه از آنها را که درآن نشانگرها را به چهار گروه طبقه بندی نموده اند ذکرمی گردد و از آنجائیکه هر یک از این نشانگرها در سیرمراحل تعیین محل ژن عامل عطر و طعم برنج که موضوع این تحقیق می باشد، نقش به سزایی داشتند، توضیحات مختصری در خصوص هر یک آز آنها داده می شود:

الف- نشانگرهای مورفولوژیکی یا فنوتیپی[۱]

ب- نشانگرهای بیوشیمیایی[۲]

ج- نشانگرهای سیتوژنتیکی[۳]

د- نشانگرهای مولکولی یا نشانگرهای DNA[۴]

الف) نشانگرهای مورفولوژیکی یا فنوتیپی:

صفات مورفولوژیکی و قابل رؤیت که بطور عمده توسط یک ژن کنترل می شوند می توانند بعنوان یک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. این نشانگرها مبتنی بر پلی مورفیسم در شکل ظاهری یک صفت (نظیر رنگ گل، شکل برگ و...) بوده و به نشانگرهای کلاسیک یا ظاهری هم معروفند. بدلایل وجود معایبی ازقبیل فراوانی و تنوع کم، تأثیر پذیری از شرایط محیطی، داشتن توارث غالب و مغلوب در اغلب موارد و وجود اثرات اپیستازی و پلیوتروپی ودر برخی مواقع انتظار طولانی مدت برای ظهور آن صفت برای مشاهده و ثبت آن درگیاهان چند ساله و...، باعث گردیده که دراستفاده از این نشانگرها محدودیت ایجاد گردد.

---

[1] Morphological Markers
[2] Biochemical Markers
[3] Cytogenetical Markers
[4] Deoxyribonucleic acid Markers

ب) نشانگرهای بیوشیمیایی:

این نشانگرها خود بر دو نوعند: الف)ماکرومولکولها ب)ایزوزایمها یا آللوزایمها

در سالهای اخیر آیزوزایمها بطور موفقیت آمیزی بعنوان نشانگرهای بیوشیمیایی در زمینه های خاصی از ژنتیک و اصلاح نباتات، بعنوان نشانگرهای ژنتیکی تقریباً خنثی مورد استفاده قرار گرفته اند. نشانگرهای بیوشیمیایی، پروتئین هایی هستند که نتیجهٔ بیان ژن می باشند. این پروتئینها از طریق الکتروفورز و رنگ آمیزی ، قابل جداسازی و تشخیص هستند.

ایزوزایمها، اشکال متفاوت یک آنزیم با ماهیت پروتئینی هستند که واکنش یکسانی را کاتالیز می نمایند یا در واقع می توان گفت که فراورده های آللهای مختلف یک یا چند ژن هستند.این مولکولها بر روی الکتروفورگرام[1] از طریق واکنش رنگی مرتبط با فعالیت آنزیمی آشکار می شوند. از عیبهای مهم این نشانگرها می توان محدود بودن تعداد و تأثیر پذیری آنها از محیط یا مرحلهٔ نموی گیاه را نام برد.

بایستی ذکر نمود که نشانگرهای پروتئینی (ایزوزایمها) نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی مناسبترند زیرا این نشانگرها معمولاً همبارز هستند و هر آنزیم محصول تنها یک ژن است (البته استثنائاتی وجود دارد) و اختصاصی بودن ژن مورد نظر را منعکس می نماید و از اینرو استفاده از آنها بعنوان نشانگر می تواند مفیدتر باشد. البته این نشانگرها از پلی مورفیسم کافی در درون یک گونه زراعی برخوردار نیستند.

ج) نشانگرهای سیتوژنتیکی:

این نشانگرها مبتنی بر تغییرات ساختمانی کروموزوم و تعداد کروموزومها بوده و شامل حذف، اضافه، مضاعف شدگی، وارونگی، جابجایی و ... می شوند.

د) نشانگرهای مولکولی یا نشانگرهای DNA :

[1] Electrophoregram

یک نشانگر مولکولی توالی از DNA است که به آسانی تشخیص داده شده و می توان توارث آنرا به سادگی زیر نظر داشت. این نشانگرها در واقع از کلاسهای مختلفی از جهشهای حادث شده در DNA نظیر [جایگزینی (جهش نقطه ای)، نوآرایی(حذف و اضافه شدن بازها) یا بروز اشتباهاتی در تعدادموتیف های DNA تکراری)] بوجود آمده اند.

این نشانگرها برخلاف نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، از نظر نوع و تعداد نامحدود بوده و تحت تأثیر عوامل محیطی و یا مراحل نموی گیاه قرار نمی گیرند، از مزایای دیگر آنها خنثی بودن آنهاست، بدین معنی که معمولاً در مناطق خنثی ژنوم یا همان مناطق غیر رمز کننده واقع گردیده اند، بدلایل فوق این نشانگرها در زمره پرکاربردترین نشانگرها محسوب می گردند.

۱-۵-۶) برخی کاربردهای نشانگرهای مولکولی:

۱. تهیه نقشه دقیق لینکاژ یا نقشه اشباع (داشتن این نقشه که از نشانگرهای مولکولی زیادی تشکیل شده باشد، برای جداسازی و همسانه سازی ژن موردنظر و ردیابی آن در جمعیتهای انتخابی در نسلهای درحال تفکیک یا در طی عمل تلاقی برگشتی الزامی است).
۲. مطالعه و تعیین جایگاه کروموزومی لوکوس های عامل صفات کمی (QTLs[1])
۳. مطالعه روابط فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی گونه های گیاهی و بررسی تنوع سوماکلونی
۴. کمک به فرایند انتخاب در برنامه های اصلاحی
۵. ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی در داخل ژرم پلاسم و شناسایی ارقام و واریته ها

هر نشانگر دارای مزایا و معایبی است. بهترین نشانگر، نشانگری است که هنگام استفاده برای اهداف فوق آلذکر علاوه بر داشتن توارث همبارز، تکرارپذیری، چند شکلی و سهولت کاربرد از قابلیت آشکارسازی راحت و مؤثری برخوردار و مستلزم صرف وقت و کار کمتری باشد.

متأسفانه هیچ نشانگر مولکولی از همهٔ این ویژگیها برخوردار نیست. طیف گسترده ای از تکنیکهای مولکولی وجود دارند که چند شکلی را در سطح DNA آشکار می نمایند.این نشانگرها

[1] Quantitative trait loci