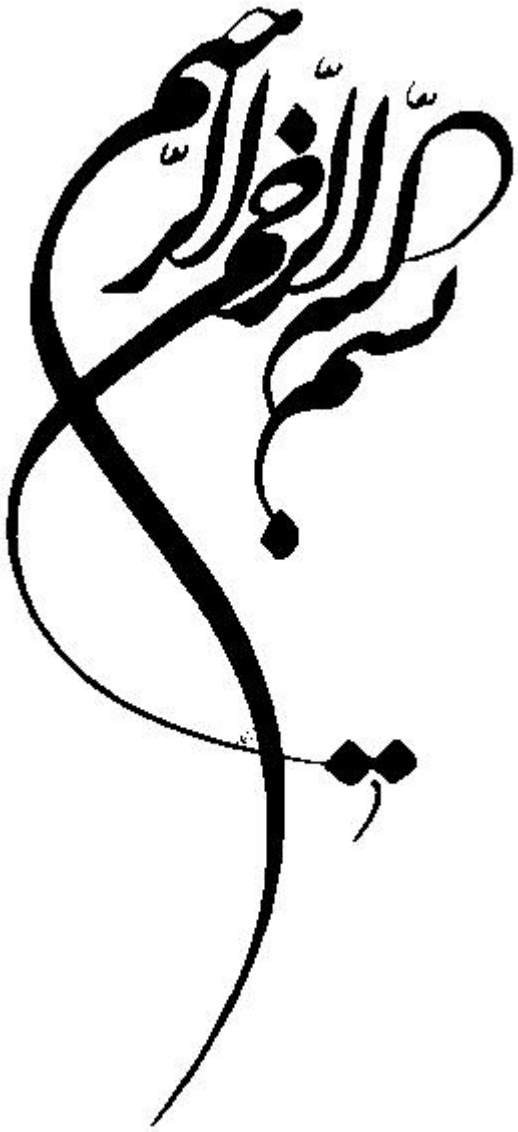
بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه دکتری رشته‌ی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

عنوان پایان‌نامه

مطالعه توارث برخی صفات زراعی و ترکیبات عطری در برنج (*Oryza sativa* L.) و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده آنها با استفاده از نشانگر ریزماهواره

استادان راهنما:
دکتر محمود خدامباشی امامی
دکتر سعدالله هوشمند

استادان مشاور:
دکتر احمد ارزانی
دکتر علیرضا غیاثوند

پژوهشگر:
رضا امیری فهلیانی

تیر ماه ۱۳۸۹

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه آقای رضا امیری فهلیانی جهت اخذ درجه دکتری رشته کشاورزی گرایش اصلاح نباتات با عنوان:

مطالعه توارث برخی صفات زراعی و ترکیبات عطری در برنج (*Oryza sativa* L.) و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده آنها با استفاده از نشانگر ریزماهواره

در تاریخ ۸۹/۴/۲۷ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه بسیار خوب مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استادان راهنمای پایان‌نامه

دکتر محمود خدامباشی **با مرتبه علمی استادیار** **امضاء.....**

دکتر سعدالله هوشمند **با مرتبه علمی استادیار** **امضاء.....**

۲. استادان مشاور پایان‌نامه

دکتر احمد ارزانی **با مرتبه علمی استاد** **امضاء.....**

دکتر علیرضا غیاثوند **با مرتبه علمی استاد** **امضاء.....**

۳. استادان داور داخلی پایان‌نامه

دکتر بهروز شیران **با مرتبه علمی دانشیار** **امضاء.....**

دکتر فریبا رفیعی **با مرتبه علمی استادیار** **امضاء.....**

۴. استادان داور خارجی پایان‌نامه

دکتر قدرت‌الله سعیدی **با مرتبه علمی استاد** **امضاء.....**

دکتر آقافخر میرلوحی **با مرتبه علمی استاد** **امضاء.....**

دکتر سید حسن طباطبایی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

Shahrekord University
Faculty of Agriculture
Department of Agronomy and Plant Breeding

The thesis of Mr. Reza Amiri Fahliani for obtaining of Ph.D in the Plant Breeding field with the title of "The Study of Some Agronomic Traits and Aroma Compounds in Rice (*Oryza sativa* L.) and Mapping Their Controlling Genes Using Microsatellite Markers" was evaluated with the presence of the following thesis committee and was finally ratified with Rank Very Good on July 18, 2010.

1. The supervisors of the thesis:
Dr M. Khodambashi, (Assistance professor) **signature…….**

Dr S. Houshmand, (Assistance professor) **signature…….**

2. The advisors of the thesis:
Dr A. Arzani, (Professor) **signature…….**

Dr A.R. Ghiasvand, (Professor) **signature…….**

3. The internal examiners of the thesis:
Dr B. Shiran, (Associate Professor) **signature…….**

Dr F. Rafiei, (Assistance Professor) **signature…….**

4. The external examiner of the thesis:
Dr GH. Saeidi, (Professor) **signature…….**

Dr A. Mirlohi, (Professor) **signature…….**

Dr S.H. Tabatabaei
Deputy of Research and Postgraduate studies
Faculty of agriculture

کلیه حقوق مادّی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تشکر و قدردانی

سپاس بی‌کران نثار پروردگار بی‌همتا که اینجانب را در خانواده‌ای قرار داد که تحصیل علم از مهم‌ترین ارکان زندگی‌شان بوده‌است. همواره از یکایک اعضای خانواده‌ام به خاطر فراهم کردن محیطی آرام و مناسب جهت تحصیل علم و دانش سپاس‌گزارم. عزیزانی که بدون هیچ چشم‌داشتی همواره مشوق، حامی و همراه من بودند.

بی شک انجام این تحقیق بدون حضور و یا همفکری و همکاری بسیاری از عزیزان برای اینجانب امکان‌پذیر نبود. با نهایت تواضع، از تمامی عزیزان که ترجیح می‌دهم نام گرامی‌شان را ذکر نکنم، صمیمانه سپاسگزارم و بهترین آرزوها را برای تمامی عزیزان خواستارم.

تقدیم به

دخترم گلنوش،

همسرم

و

دیگر اعضای خانواده‌ام

و

تقدیم به تو

Shahrekord University
Faculty of Agriculture

Title of thesis
Study of some agronomic traits and aromatic compounds in rice (*Oryza sativa* l.) and mapping their controlling genes using microsatellite markers

Ph.D. thesis of Agronomy and Plant Breeding Department

Full name
Mr. Reza Amiri Fahliani

Supervisors:
Dr. Mahmood Khodambashi
Dr. Saadollah Houshmand

July, 2010

چکیده

برنج (*Oryza sativa* L.) بعد از گندم، از غذاهای مهم ایرانیان بوده و حدود دو سوم کالری مورد نیاز مردم آسیا از برنج تأمین می‌شود. بعد از عملکرد، بهبود ظاهر دانه، کیفیت پخت، عطر و طعم برنج از دیگر اهداف مهم به‌نژادی در برنج می‌باشند. هدف از اجرای این تحقیق بررسی توارث‌پذیری ویژگی‌های زراعی شامل ارتفاع گیاهچه، ارتفاع بوته، طول ساقه، تعداد پنجه، طول خوشه، طول و عرض برگ ماقبل برگ پرچم و ویژگی‌های کیفی از قبیل طول، عرض و شکل دانه قهوه‌ای برنج و نقشه‌یابی مکان ژنی‌های ژنی (QTLهای) کنترل کننده این ویژگی‌ها و ترکیبات فرّار و عطری، با کاربرد نشانگرهای ریزماهواره بود. یکصد و سی و نه فامیل $F_{۳}$، حاصل از تلاقی رقم موسی‌طارم و رقم ۳۰۴، در قالب طرح آگمنت با ۶ تکرار و با فاصله ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر در منطقه خانمیرزا از توابع شهرستان لردگان، استان چهار محال و بختیاری نشاءکاری شدند. در این آزمایش از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) استفاده شد. تفکیک متجاوز فامیل‌ها برای تمامی ویژگی‌ها دیده شد. مدل ۲ پارامتری رگرسیون چندمتغیره شامل پارامترهای m و $[a]$ برای توجیه میانگین نسل $F_{۳}$ از نظر ویژگی‌های مورد ارزیابی کفایت کرد. پارامتر $[a]$ برای طول خوشه، طول برگ ماقبل برگ پرچم و ارتفاع گیاهچه معنی‌دار نشد. مدل ۲ پارامتری رگرسیون شامل واریانس افزایشی و واریانس محیطی جهت توجیه تنوع موجود در فامیل‌ها کفایت داشت. ژن‌های کنترل کننده طول خوشه، طول برگ ماقبل برگ پرچم و ارتفاع گیاهچه در والدین پراکندگی کامل نشان دادند. بیشترین توارث-پذیری خصوصی ($\geq$ ۰/۸۴) مربوط به ویژگی‌های برنج قهوه‌ای و کمترین آن ($<$ ۰/۲) مربوط به طول خوشه و تعداد پنجه بود. تجزیه توده‌ای نسل‌های در حال تفرّق نشان داد که بیشترین آغازگرهای مرتبط، مربوط به شکل دانه با پنج آغازگر بر روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۱۱ بود. کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۱۱ مکان‌های ژنی بیشتری را برای کنترل ویژگی‌های زراعی داشتند. با استفاده از روش تجزیه فاصله‌ای مرکب، QTLهای مرتبط با ارتفاع گیاهچه (*q*SEH-4 و *q*SEH-9) به ترتیب در مجاورت آغازگرهای RM17377 و RM24117 شناسایی شد. فاصله بین آغازگر و QTL مورد نظر به ترتیب حدود ۳/۹۴ و ۲/۷ سانتی‌مورگان بود که جهت استفاده از این آغازگرها در انتخاب، بسیار مناسب می‌باشند. مجموع سهم واریانس توجیهی توسط این دو مکان ژنی ۵۹/۷۴٪ بود. برای طول خوشه یک QTL بر روی کروموزوم ۹ و در فاصله حدود ۰/۳ سانتی-مورگانی با آغازگر RM24117 شناسایی شد. این QTL بصورت غالبیت ناقص عمل کرده و ۱۴/۴۶٪ از تنوع فنوتیپی را توجیه کرد. دو مکان ژنی برای تعداد پنجه، ۳ مکان ژنی برای عرض برگ، ۲ مکان ژنی برای طول دانه، ۲ مکان ژنی برای عرض دانه و ۲ مکان ژنی برای شکل دانه شناسایی شدند. برای ارتفاع بوته، طول ساقه و طول برگ، هیچ QTLی شناسایی نشد. از ۱۴ مکان ژنی شناخته شده، ۸ عدد بر کروموزوم ۴، ۵ عدد بر کروموزوم ۹ و یک عدد بر کروموزوم ۱ قرار داشتند. ارتفاع گیاهچه، تعداد پنجه، و طول دانه قهوه‌ای، QTLهایی با عمل فوق غالبیت داشتند. ۱۴ ترکیب شیمیایی فرّار از جمله تترادکان، پنتادکان، هگزادکان، هپتادکان، نونیل آلدهاید و لیمونین در برنج شناسایی شدند. سی و هفت مکان ژنی کنترل کننده بر کروموزوم‌های ۱، ۴، ۶، ۹، ۱۱ و ۱۲ برای ترکیب‌های فرّار شناخته شد، و کروموزوم‌های ۹ و ۴ بیشترین مکان ژنی کنترل کننده را بر خود جای دادند. بیست و نه مکان ژنی حالاتی از غالبیت را نشان دادند. مکان ژنی کنترل‌کننده‌ای برای ترکیب‌های بوتیل سیکلو بوتان و سیکلوپروپان شناسایی نشد. برای ترکیب‌های فرّار، هیچگونه هم‌پوشانی مکان ژنی با در نظر گرفتن موقعیت آنها مشاهده نشد. فاصله مطلوب بین نشانگر و QTL نیز بر اساس گزارشات متفاوت، فاصله‌های کمتر از ۴/۵ سانتی مورگان پیشنهاد شده است که در این آزمایش چندین مکان ژنی با چنین فاصله‌ای با نشانگر، شناسایی شده است.

کلمات کلیدی: برنج (*Oryza sativa* L.)، تجزیه میانگین‌ها، توارث‌پذیری، ترکیبات فرّار، تجزیه QTLها، فامیل‌های $F_{۲،۳}$

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the main foods of Iranian people after wheat and around two-third of calories needed for Asian people are provided by this crop. After grain yield, grain appearance, cooking quality, aroma and flavor are the other important breeding goals in rice. This study aimed to investigate the heritability of agro-morphological characters including seedling height, plant height, culm length, culm number, panicle length, penultimate leaf length and width, and quality characters such as brown rice length, width, and shape, and mapping loci (QTLs) controlling these characters and volatile and aroma compounds using microsatellite markers. One hundred and thirty nine $F_{2:3}$ families, derived from a cross between the cultivars Musa Tarom and 304, transplanted in an augmented design with 6 replications and with 25×25 cm planting distance, at Khunmirza region, abroad Lordegan, Chaharmahal and Bakhteyari province. In this study we used microsatellite (SSR) markers. Families showed transgressive segregation for all characters. The 2-parameter model of multivariate regression including **m** and [*a*] parameters was sufficient for mean analysis of the families for all corresponding characters. The parameter [*a*] was not significant for panicle length, penultimate leaf length and seedling height. The 2-parameter model of multivariate regression including additive and environmental variance was sufficient for explaining the variation among families for all characters. The genes controlling the panicle length, penultimate leaf length and seedling height showed complete dispersion in the parents. The maximum narrow-sense heritability belonged to brown rice characters (≥ 0.84) and the minimum one belonged to panicle length and culm number (< 0.2). Using bulked segregant analysis, the most number of linked markers were identified for grain shape with 5 markers on chromosomes 1, 4, 5, and 11. The chromosomes 4, 5, and 11 had more QTL loci controlling the agro-morphological characters. Using composite interval mapping (CIM) method of QTL analysis, the related QTLs to seedling height (*q*SEH-4 and *q*SEH-9) were identified adjacent to RM17377 and RM24117, respectively. The distance between the corresponding markers and identified QTLs was about 3.94 and 2.7cM, respectively, which are very suitable for marker assisted selection for seedling height. These two QTLs explained 59.74% of the variance. One QTL was identified for panicle length on chromosome 9 with a 0.3cM distance to RM24117. This QTL showed partial dominance and explained 14.46% of panicle length variations. Two QTLs identified for culm number, 3 QTLs for leaf width, 2 QTLs for grain length, 2 QTLs for grain width, and 2 QTLs for grain shape. No QTL was identified for plant height, culm length, and leaf length. From the 14 identified QTLs for agro-morphological characters, 8 of them were on the 4th chromosome and 5 of them on the 9th, and one on the 1st chromosome. Over-dominance action of gene was shown for some identified QTLs for seedling height, culm number, and brown rice length. Fourteen volatile compounds such as tetradecane, pentadecane, hexadecane, heptadecane, nonyl aldehyde and limonene were identified in rice using SPME method of GC/MS. Thirty seven QTLs were identified for volatile compounds on chromosomes 1, 4, 6, 9, 11, and 12 that chromosomes 9 and 4 carried the most controlling loci. Twenty nine QTL loci showed different types of dominance. No QTL locus was identified for butyl-cyclobutane and cyclopropane. There was not any pleiotropy of loci identified for volatile and aromatic compounds. The suitable distance recommended for use in marker assisted selection is lower than 4.5cM that in this study we identified several QTLs with this distance to linked markers.

Keywords: $F_{2:3}$ families, heritability, mean analysis, QTL analysis, rice (*Oryza sativa* L.), volatile compounds

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه	۷
فصل دوم – بررسی منابع	۱۲
۲-۱- شرایط اقلیمی و رده‌بندی گیاهی برنج	۱۲
۲-۲- جایگاه رده‌بندی *Oryza* در غلات	۱۳
۲-۳- گونه‌های برنج	۱۳
۲-۴- اجداد چندساله و یک‌ساله برنج	۱۴
۲-۵- قدمت گونه‌های زراعی برنج	۱۶
۲-۵-۱- برنج آفریقایی	۱۶
۲-۵-۲- برنج آسیایی	۱۶
۲-۶- مجموعه *Oryza sativa*	۱۶
۲-۷- ریخت‌شناسی گیاه برنج	۱۸
۲-۷-۱- مفهوم واحد شاخساره	۱۸
۲-۷-۲- برگ	۱۸
۲-۷-۳- ساقه	۲۰
۲-۷-۴- ریشه‌ها	۲۰
۲-۷-۵- خوشه	۲۰
۲-۷-۶- گل	۲۰
۲-۷-۷- دانه	۲۱
۲-۸- فازهای رشد	۲۱
۲-۹- توصیف مولکولی	۲۲
۲-۱۰- صفات کمّی و جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمّی (QTLs)	۲۲
۲-۱۱- دلایل تعیین موقعیت QTL	۲۴
۲-۱۲- اصول مکان‌یابی QTL با استفاده از تجزیه پیوستگی و نقشه‌های ژنتیکی	۲۵
۲-۱۲-۱- گزینش گیاهان والد	۲۵
۲-۱۲-۲- تجزیه پیوستگی	۲۶
۲-۱۲-۳- نقشه ژنتیکی	۲۷
۲-۱۳- تعیین فنوتیپ جمعیت مورد مطالعه	۲۹
۲-۱۴- تجزیه توده‌ای نسل‌های در حال تفرق	۲۹
۲-۱۵- روش‌های آماری مورد استفاده برای نقشه‌یابی QTL	۳۰
۲-۱۵-۱- روش تک نشانگری	۳۰
۲-۱۵-۲- روش نقشه‌یابی فاصله‌ای ساده (SIM)	۳۰
۲-۱۵-۳- روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)	۳۱
۲-۱۵- ۴- روش نقشه‌یابی فاصله‌ای چندگانه (MIM)	۳۱
۲-۱۶- عوامل تأثیر گذار بر قدرت نقشه‌یابی QTL	۳۱

عنوان	صفحه
۲-۱۷- نشانگرهای ژنتیکی	۳۲
۲-۱۷-۱ - نشانگرهای سنتی شامل نشانگرهای ریختی، پروتئینی و آلوزایم‌ها	۳۲
۲-۱۷-۲- نشانگرهای DNA	۳۳
۲-۱۸- توالی‌یابی DNA	۳۴
۲-۱۹- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	۳۴
۲-۱۹-۱- اصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	۳۵
۲-۲۰- ریزماهواره‌ها	۳۶
۲-۲۰-۱- ریزماهواره‌های هسته‌ای	۳۷
۲-۲۰-۲- جایگاه کروموزومی ریزماهواره‌ها	۴۰
۲-۲۰-۳- جهش‌پذیری و تکامل ریزماهواره‌ها	۴۰
۲-۲۰-۴- وظایف بالقوهٔ ریزماهواره‌ها	۴۲
۲-۲۱- ساختار ژنتیکی نسل F_3 حاصل از خودگشنی تک بوته‌های F_2 (فامیل‌های $F_{2:3}$)	۴۲
۲-۲۲- روش‌های ارزیابی ترکیبات فرّار و عطری	۴۳
۲-۲۳- تجزیه ترکیبات آلی و عناصر و شناسایی یک مادهٔ مجهول	۴۴
۲-۲۳-۱- تجزیه کیفی	۴۴
۲-۲۳-۲- تعیین جرم مولکولی	۴۵
۲-۲۳-۳- فرمول مولکولی	۴۵
۲-۲۴- طیف‌سنج جرمی و اصول آن	۴۵
۲-۲۵- تکنیک ریزاستخراجی فاز جامد (SPME)	۴۶
۲-۲۶- وراثت پذیری صفات مورد مطالعه و QTLهای گزارش شدهٔ مرتبط با آنها	۴۷
۲-۲۶- ۱- ارتفاع گیاهچه	۴۸
۲-۲۶-۲- ارتفاع گیاه	۴۹
۲-۲۶-۳- طول خوشه	۵۲
۲-۲۶-۴- طول ساقه	۵۲
۲-۲۶-۵- تعداد پنجه	۵۳
۲-۲۶-۶- ویژگی‌های دانه	۵۴
۲-۲۶- ۷- ترکیبات فرّار و عطری در برنج	۵۷
فصل سوم – مواد و روش‌ها	۶۰
۳- ۱- مواد گیاهی و مراحل کاشت	۶۰
۳- ۲- مشخصات دستگاه GC/MS	۶۱
۳-۱۰- جداسازی و شناسایی ترکیبات با استفاده از GC/MS	۶۱
۳-۳-۱- آماده سازی نمونه به روش HS-SPME	۶۱
۳-۳-۲- جداسازی ترکیبات فرّار	۶۱
۳-۳-۳- شناسایی ترکیبات	۶۲
۳-۴- ارزیابی فنوتیپی ویژگی‌های زراعی مورد مطالعه	۶۲
۳-۴-۱- ارتفاع گیاهچه	۶۲

عنوان	صفحه
۳-۴-۲- ارتفاع بوته	۶۲
۳-۴-۳- طول ساقه	۶۲
۳-۴-۴- طول خوشه	۶۲
۳-۴-۵- تعداد پنجه	۶۳
۳-۴-۶- طول برگ ماقبل برگ پرچم	۶۳
۳-۴-۷- عرض برگ ماقبل برگ پرچم	۶۳
۳-۴-۸- طول برنج قهوه‌ای	۶۳
۳-۴-۹- عرض برنج قهوه‌ای	۶۳
۳-۴-۱۰- شکل برنج قهوه‌ای	۶۳
۳-۵- انتخاب توده‌ها (بالک‌ها)	۶۳
۳-۶- استخراج DNA	۶۴
۳- ۷- بررسی کیفیت و کمّیت DNA استخراج شده	۶۵
۳- ۸- انتخاب آغازگرها	۶۶
۳-۹- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	۶۶
۳-۱۰- تعیین ژنوتیپ فامیل‌ها	۶۶
۳-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری	۷۴
تجزیه جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمّی (QTLs)	۷۶
فصل چهارم – نتایج و بحث	۷۷
۴-۱- ویژگی‌های زراعی و بررسی تفرّق فنوتیپی آنها در فامیل‌های F_3	۷۷
۴-۲- تجزیه وارایانس شاهدها بر اساس ویژگی‌های ارزیابی شده در مزرعه	۸۸
۴-۳- تجزیه میانگین فامیل‌های F_3	۸۸
۴-۴- تجزیه واریانس فامیل‌های F_3 و برآورد توارث‌پذیری خصوصی	۹۰
۴-۵- تعیین ژنوتیپ فامیل‌های F_3 و بررسی چندشکلی آغازگرهای مورد استفاده	۹۶
۴-۶- شناسایی آغازگرهای مرتبط با ویژگی‌های زراعی با استفاده از روش BSA	۹۸
۴-۷- نتایج حاصل از تجزیه QTL برای ویژگی‌های زراعی	۱۰۹
۴-۸- ترکیب‌های فرّار شناسایی شده از طریق HS-SPME – GC/MS و نتایج حاصل از تجزیه QTL برای آنها	۱۱۸
۴-۹- نتیجه‌گیری	۱۲۹
۴-۱۰- پیشنهادات	۱۳۰
منابع	۱۳۱

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۲-۱- ساختار شاخساره در برنج	۱۹
شکل ۲-۲- بخش‌های متفاوت گل برنج	۲۱
شکل ۲-۳- ساختار دانه برنج	۲۲
شکل ۳-۱- آغازگرهای انتخاب شده و جایگاه آنها بر روی کروموزوم‌های ۱ تا ۱۲ و وضعیت پراکندگی آنها بر روی کروموزوم‌ها	۶۷
شکل ۴-۱– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر ارتفاع نهال‌بذر (گیاهچه)	۷۸
شکل ۴- ۲– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر ارتفاع بوته (گیاه)	۷۹
شکل ۴- ۳– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر ارتفاع ساقه	۸۰
شکل ۴- ۴– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر طول خوشه	۸۱
شکل ۴- ۵– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر تعداد پنجه	۸۲
شکل ۴- ۶– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر طول برگ ماقبل برگ پرچم	۸۳
شکل ۴- ۷– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر عرض برگ ماقبل برگ پرچم	۸۴
شکل ۴- ۸– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3 ، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر طول دانه (برنج قهوه‌ای)	۸۵
شکل ۴- ۹– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر عرض دانه (برنج قهوه‌ای)	۸۶
شکل ۴- ۱۰– توزیع فراوانی فامیل‌های F_3، میانگین جمعیت و وضعیت والدین تلاقی در جمعیت از نظر شکل دانه (برنج قهوه‌ای)	۸۷
شکل ۴- ۱۱- الکتروفورز ژل آگارز ۳٪ برای والدین مربوط به آغازگرهایRM23134 ، L02، RM23145 و L06	۹۶
شکل ۴- ۱۲- جایگاه آغازگرهای شناسایی شدهٔ مرتبط با شکل دانه با استفاده از روش BSA	۱۰۲
شکل ۴-۱۳- جایگاه آغازگرهای شناسایی شده بر کروموزوم شمارهٔ ۳ با استفاده از روش BSA	۱۰۳
شکل ۴-۱۴- جایگاه آغازگر شناسایی شده بر کرموزوم شمارهٔ ۴ با استفاده از روش BSA	۱۰۴
شکل ۴-۱۵- جایگاه آغازگرهای شناسایی شده بر روی کروموزوم شمارهٔ ۵ با استفاده از روش BSA	۱۰۵
شکل ۴- ۱۶- آغازگر شناخته شده مرتبط با ویژگی‌های مورد ارزیابی بر کروموزوم شمارهٔ ۷ با استفاده از روش BSA	۱۰۶
شکل ۴-۱۷ – جایگاه آغازگرهای شناخته شدهٔ مرتبط با ویژگی‌های مورد ارزیابی بر کروموزوم ۱۱ با استفاده	۱۰۸

از روش BSA

عنوان صفحه

شکل ۴- ۱۸- نمودار حاصل از تجزیه QTL برای ارتفاع گیاهچه با استفاده از روش فاصله‌ای مرکب (CIM) ۱۰۹

شکل ۴- ۱۹- نمودار مربوط به QTL شناسایی شده برای ارتفاع گیاهچه و سهم واریانس توجیهی این جایگاه بر روی کروموزوم ۹ ۱۱۰

شکل ۴- ۲۰- مکان QTL شناسایی شده بر کروموزوم ۱ با استفاده از تجزیه QTL ۱۱۵

شکل ۴- ۲۱- مکان جایگاه‌های شناسایی شده بر کروموزوم ۴ بر اساس تجزیه QTL ۱۱۶

شکل ۴-۲۲- مکان‌های شناسایی شده مرتبط با ویژگی‌های مورد بررسی بر روی کروموزوم شمارهٔ ۹ با استفاده از روش CIM ۱۱۸

شکل ۴-۲۳- کارتوگرام مربوط به رقم ۳۰۴ و قلّه مربوط به ترکیب نونیل آلدهید ۱۱۹

شکل ۴-۲۴- قلّه گسترده شده (تجزیه شده) توسط نرم‌افزار برای قلّه نهم شناسایی شده در زمان‌بازداری ۹/۰۷۵ (دقیقه) مربوط به رقم ۳۰۴ ۱۱۹

شکل ۴- ۲۵- اطلاعات مربوط به ترکیب نونیل آلدهید (Nonyl Aldehyde) موجود در کتابخانه نرم‌افزار که با نمودار شکل ۴- ۲۱ مقایسه شده است (۹۶٪ شباهت) ۱۱۹

شکل ۴- ۲۶– کروماتوگرام مربوط به فامیل ۲ (بالا)، تجزیه قلّه اول کروماتوگرام (زمان بازداری ۱۰/۷۸۱ دقیقه) به عنوان یک ترکیب ناشناس (وسط)، و تجزیه ترکیب کمفین (camphene) (پایین) که تشابه بسیار زیادی (۹۷٪) با تجزیه ترکیب ناشناس دارد. ۱۲۰

شکل ۴- ۲۷- کروماتوگرام مربوط به فامیل ۵ (بالا)، تجزیه قلّه دهم کروماتوگرام (زمان بازداری ۱۷/۸۰۰ دقیقه) به عنوان یک ترکیب ناشناس (وسط)، تجزیه ترکیب کمفور (پایین) که تشابه بسیار زیادی (۹۶٪) با تجزیه ترکیب ناشناس دارد. ۱۲۱

شکل ۴- ۲۸- کروماتوگرام مربوط به فامیل ۲۰ (بالا)، تجزیه قلّه دهم کروماتوگرام (زمان بازداری ۲۲/۹۰۸ دقیقه) به عنوان یک ترکیب ناشناس (وسط)، تجزیه ترکیب بنزن استیک اسید (Benzene acetic acid) (پایین) که تشابه بسیار زیادی (۸۲٪) با تجزیه ترکیب ناشناس دارد. ۱۲۲

شکل ۴- ۲۹- کروماتوگرام مربوط به فامیل ۲۵ (بالا)، تجزیه قلّه نهم کروماتوگرام (زمان بازداری ۲۳/۲۰۸ دقیقه) به عنوان یک ترکیب ناشناس (وسط)، تجزیه ترکیب پنتادکان (Pentadecane) (پایین) که تشابه بسیار زیادی (۹۶٪) با تجزیه ترکیب ناشناس دارد. ۱۲۳

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۲–۱– گونه‌های oryza، تعداد کروموزوم، علائم ژنومی، و توزیع جغرافیایی	۱۵
جدول ۲-۲- جنس‌ها، تعداد گونه‌ها، توزیع جغرافیایی، تعداد کروموزوم، و ساختار گل در طایفه Oryzeae	۱۷
جدول ۲-۳- انواع متفاوت نشانگرهای مولکولی و ویژگی‌های آنها	۳۸
جدول ۲-۴- ویژگی‌های مورد بررسی، آغازگرهای ریزماهواره مرتبط با ویژگی‌ها، شمارهٔ کروموزوم دربرگیرنده آغازگرها، و منابع گزارش دهنده	۵۰
جدول ۲–۵– توارث‌پذیری گزارش شده توسط دیگر محققین برای ویژگی‌های ارزیابی شده	۵۶
جدول ۳-۱- اسامی آغازگرهای استفاده شده، قطعه تکرار شونده، جایگاه کروموزومی آغازگر و اندازهٔ نوارمورد انتظار حاصل از تکثیر آغازگر	۶۸
جدول ۳-۲- نسل‌ها، پارامترهای مدل افزایشی و غالبیت و ضرائب مربوط به پارامترها در هر نسل برای تجزیه میانگین نسل‌ها	۷۵
جدول ۳-۳- پارامترها، منابع مورد استفاده برای محاسبه اجزای واریانس و ضرایب مورد استفاده در هر منبع برای پارامترهای مؤثر	۷۵
جدول ۴-۱- تجزیه واریانس شاهدها بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی، و درصد ضریب تغییرات ویژگی‌های ارزیابی شده در مزرعه	۸۹
جدول ۴-۲- تجزیه میانگین‌ها ± خطای معیار ویژگی‌ها با استفاده از مدل دو پارامتری رگرسیون چند متغیره و بررسی کفایت مدل با استفاده از آزمون χ^2	۸۹
جدول ۴-۳- تجزیه واریانس فامیل‌های F_3 حاصل از تلاقی رقم موسی‌طارم و رقم ۳۰۴، و درصد ضریب تغییرات برای ویژگی‌های زراعی	۹۵
جدول ۴-۴- اجزای واریانس افزایشی و محیطی ± خطای معیار آنها، نتایج حاصل از آزمون χ^2 و توارث-پذیری خصوصی با استفاده از تجزیه واریانس فامیل‌های $F_{2:3}$ و مدل دو پارامتری رگرسیون چند متغیره	۹۵
جدول ۴-۵- اطلاعات آغازگرهای چندشکل درجمعیت F_3، جایگاه کروموزوم دربرگیرندهٔ آغازگر، اندازه نوار مورد انتظار و اندازهٔ نوار مشاهده شده	۹۷
جدول ۴-۶- توده‌های انتخاب شده، میانگین والدین و میانگین توده‌های انتخابی برای ویژگی‌های مورد مطالعه	۱۰۰
جدول ۴- ۷- اطلاعات آغازگرهای ریزماهوارهٔ پیوسته با ویژگی‌های زراعی ارزیابی شده در جمعیت $F_{2:3}$ با استفاده از تجزیه توده‌ای نسل‌های در حال تفرق	۱۰۱
جدول ۴- ۸- اطلاعات مربوط به QTLهای شناسایی شده د رجمعیت $F_{2:3}$ برای ویژگی‌های زراعی با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب	۱۱۲
جدول ۴-۹- گزارش حاصل از تجزیه مواد مربوط به رقم ۳۰۴ از طریق دستگاه GC/MS	۱۲۰
جدول ۴-۱۰- ترکیب‌های شناسایی شده حاصل از تجزیه بذر فامیل‌ها به روش UA-HS- SPME- GC/MS	۱۲۴
جدول ۴-۱۱- نتایج حاصل از تجزیه QTL ترکیب‌های فرّار و معطر با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب	۱۲۵

جدول ۴-۱۲- نام پیشنهادی برای جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به ترکیب‌های شیمیایی شناسایی شده ۱۲۸

فصل اول

مقدمه

یکی از مسائل بسیار مهم دانشمندان علوم کشاورزی و بویژه به‌نژادگران، مسئله افزایش جمعیت و تـأمین نیاز غذایی آنها می‌باشد. برآورد می‌شود که تا سال ۲۰۳۰، جمعیت جهانی از ۶/۸ میلیارد کنونی به ۸ میلیـارد نفـر برسد و بنابراین به منظور تأمین نیاز غذایی چنین جمعیتی تولید برنج جهانی بایستی حداقل به میزان ۵۰٪ تولیـد کنونی افزایش داشته باشد (سابو و همکاران، ۲۰۰۹). این مسئله به همراه اثرات ناشـی از تغییـرات آب و هـوایی و منابع طبیعی محدود، شرایط تولید را بدتر از آنچه هست می‌نماید. برنج و گندم دو گیاه زراعیِ مهـم بـرای امنیـت غذایی میلیاردها فرد در سراسر جهان هستند. این دو گیاه زراعی غذای بیش از نیمی از جمعیـت جهـان را تـأمین می‌کنند. در بسیاری از نواحی در حال توسعه دنیا، برنج به عنوان یک منبع فراهم کنندهٔ انرژی عمومیت پیدا کرده است (IRRI (ایری)، ۱۹۹۵؛ فائو، ۱۹۹۶). حدود دو سوم انرژی مورد نیاز مردم آسـیا از بـرنج (*Oryza sativa* L.) تأمین می‌شود و بعد از گندم از غذاهای مهم ایرانیان می‌باشد. اگرچه کمتر از ۵٪ بـرنج دنیـا وارد تجـارت جهـانی می‌شود، ولی تقاضای رو به رشد برای برنج و گندم توسط جمعیت در حال افزایش جهان، ایجاب می‌کند کـه ایـن دو گیاه زراعی، انرژی ۴ میلیارد (۵۰٪ جمعیت مورد پیش‌بینی) جمعیت مورد پیش‌بینی تـا سـال ۲۰۳۰ را تـأمین کنند. تغییرات بسیار جالب در زراعت برنج انعکاس دهنده پیشرفت‌هایی در دستکاری ژن‌ها و اکوسیستم گیاه برنج توسط انسان برای حداکثر بهره‌وری می‌باشد. امروزه فعالیت‌های بشری به کشـت بـرنج در بـیش از ۱۰۰ کشـور از شمال تا جنوب دنیا و با عرض جغرافیایی ۴۰ درجه جنوبی تا ۵۳ درجه شمالی منجر شده است (چنـگ و لـووح، ۱۹۹۱).

تولید این محصول (۳/۵ میلیون تن شلتوک در سال ۲۰۰۶ بـر اسـاس آمـار گـزارش داده شـده از IRRI (۲۰۰۸)) در کشور ایران برای نیاز سالانه کافی نبوده و هر ساله مقدار قابـل تـوجهی از ایـن محصـول از خـارج از

کشور وارد می‌گردد. برای رسیدن به خودکفایی برای این محصول ارزشمند و حتی فراهم کردن شرایط صادرات این محصول، افزایش میزان تولید کاملاً ضروری به نظر می‌رسد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۷). از طرفی افزایش محصول برنج و گندم تحت تأثیر دیگر گیاهان زراعی قرار دارد. دلایل بیان این ادعا شامل: فقدان ابزار کافی جهت بهبود ارقام و عملکرد،کاهش منابع آب و زمین، و تنش‌های محیطی می‌باشند. جهت فائق آمدن بر این مشکلات و فراهم کردن تقاضای رو به رشد، لازم است که به‌نژادگران گیاهی، فناوری‌های پیشرفته را بکار ببرند (مونسانتو، ۲۰۰۹). طبیعتاً افزایش تولید محصول برنج با استفاده از ارقام اصلاح شده از مهم‌ترین راهکارهای دستیابی به این هدف می‌باشد (امام، ۱۳۸۲).

برای اصلاح ارقام، اطلاع داشتن از نحوه توارث صفات مؤثر بر افزایش عملکرد کاملاً ضروری و مفید بوده و در برنامه‌ریزی جهت طراحی و اتخاذ روش‌های اصلاحی مؤثر کمک شایانی به به‌نژادگر می‌کند. تغییر موفق ویژگی‌های یک جمعیت با استفاده از دورگ‌گیری، تنها با داشتن اطلاعات، از درجه ارتباط بین ارزش‌های فنوتیپی و ارزش‌های اصلاحی قابل پیش‌بینی است. یک نقش مهم پارامتر توارث‌پذیری (Heritability)، نقش پیش‌بینی کننده آن است، که بیان کننده درجه ارتباط بین ارزش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی است. توارث‌پذیری خصوصی میزانی از فنوتیپ را که بوسیله ژن‌های انتقال یافته از والدین تعیین می‌شود، و سهمی از کل واریانس را که می‌توان به متوسط اثرات افزایشی ژن‌ها اختصاص داد، بیان می‌کند (فالکونر، ۱۹۸۹ و فالکونر و مک‌کی، ۱۹۹۷). از آنجا که همبستگی ژنتیکی صفات در تعیین صفات وارد شده در شاخص انتخاب نقش بسیار مهمی دارند، اهمیت وراثت‌پذیری مورد تأکید قرار می‌گیرد. این اهمیت بر این اصل استوار است که، در صورتی که صفات وارد شده در شاخص، وراثت‌پذیری پایینی داشته باشند، باعث پوشاندن همبستگی ژنتیکی صفات می‌شوند. برای دستیابی به اطلاعات مربوط به نحوه توارث صفات مؤثر و مرتبط با افزایش عملکرد از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۷).

ویژگی‌های ریختی می‌توانند به عنوان علائمی برای شناسایی مراحل رشد گیاهی در مدیریت مزرعه و شاخص‌های انتخاب در برنامه‌های بهبود گیاهان زراعی استفاده شوند (مولدن‌هاور و همکاران، ۱۹۹۴). ویژگی‌های ریختی که معمولاً به عنوان شاخص‌های انتخاب توسط به‌نژادگران برنج استفاده می‌شوند شامل: پاکوتاهی گیاه، ساقه‌های محکم، پنجه‌زنی متوسط، برگ‌های کوتاه و راست، خوشه‌های فشرده و بلند، و زودرسی می‌باشند. اهمیت این ویژگی‌ها، به واکنش برنج به نیتروژن در مطالعاتی که در مورد فیزیولوژی (تاناکا، ۱۹۶۵a,b و استانسل، ۱۹۷۵) و ژنتیک گیاهی (چنگ، ۱۹۶۴a,b,c؛ جنینگز، ۱۹۶۴ و بیچل و جنینگز، ۱۹۶۵) صورت گرفته‌است، مربوط می‌گردد. به‌نژادگران معمولاً برای تولید ارقامی که جهت برداشت مکانیزه در مزرعه، خیلی کوتاه نباشند و جهت جلوگیری از ورس (Lodging)، بلند نباشند، برنامه ریزی می‌کنند (اسمیث و دیلدَی، ۲۰۰۳). این مفاهیم و اهداف به‌نژادی، تمامی برنامه‌های به‌نژادی جدید را تحت تأثیر قرار داده است، به نحوی که توسعه و سازگارکردن ارقام بهبود یافته، عملکرد جهانی برنج را طی سال‌های ۱۹۶۶ تا ۱۹۹۰ دو برابر کرده‌است (خاش، ۱۹۹۷).

بعد از عملکرد، کیفیت دانه به عنوان دومین هدف مهم به‌نژادی برنج در نظر گرفته می‌شود (جولیانو و داف، ۱۹۹۱). بر اساس گفته‌های آماراواتی و همکاران (۲۰۰۸)، ویژگی‌های کیفی برنج، که تعیین کننده پذیرش و مقبولیت آن توسط مصرف کننده نهایی می‌باشند، می‌توانند به دو گروه اصلی: الف) ظاهر دانه و ب) کیفیت پخت