بسم الله الرحمن الرحیم

**دانشکده کشاورزی**

**گروه زراعت واصلاح نباتات**

**پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زراعت واصلاح نباتات**

## عنوان:

# ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام ولاینهای گندم نان (*Triticum aestivum*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

**اساتید راهنما**

**دکتر بابک عبدالهی مندولکانی** **دکتر رضا درویش زاده**

**استاد مشاور**

**دکتر ایرج برنوسی**

**تحقیق و نگارش**

**سحر داشچی**

**بهمن ۱۳۹۰**

**حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.**

تقدیم به

پدر و مادر مهربانم

که به واژه ایثار و مهربانی معنایی تازه بخشیدند

تقدیم به نازنین هایی که اشکهای شوقشان، زیباترین لحظه های عمر مرا شکل می دهد،

و با توصیه های زیبایشان، ناجی لحظه های سخت زندگیم بودند.

تقدیم به خواهر و برادر نازنینم

اسوه های عشق و دوستی،

عزیزانی که با بودنشان همپایه ثانیه های زندگی من بودند

# تشکر و قدردانی

سپاس خداوندی که با فرزانگی و محبت خویش مرا در مسیری جای داد که ذره ای از بودنم را معنی دهم. او بود که در هر زمان و هر مکان مرا در پناه خویش گرفت تا استوار و قوی، از موانع عبور نمایم. خوب می دانم که ابتدای راه، ستم و از او می خواهم همچنان درهای رحمت و برکت خود را در این مسیر پیش رویم بگشاید. خدای راهزاران بار سپاس می گویم که مرا در مراحل این تحقیق، نگارش وتدوین این پایان نامه عنایت فرمود.

در ابتدا از استاد راهنمای گرامی و بزرگوارم آقای دکتر بابک عبدالهی مندولکانی که راهنمایی اینجانب را بر عهده گرفته و در انجام امور پایان نامه زحمات بسیاری را متحمل شده و مرا یاری نموده اند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از استاد راهنمای دوم، جناب آقای دکتر رضا درویش زاده که بزرگوارانه و دلسوزانه با نظرات ارزشمند و مساعدت های بی دریغ و در راهگشای انجام تحقیق شدند نهایت تقدیر را دارم.

از جناب آقای دکتر ایرج برنوسی که مشاوره این تحقیق را بر عهده داشتند و در ابتدای راه در انجام این پایان نامه مرا همراهی و مساعدت نمودند سپاسگزاری می نمایم.

همچنین از اساتید محترم آقای دکتر مرتضی قدیم زاده و خانم دکتر فاطمه رحمانی که داوری این پایانامه را متقبل شدند بسیار سپاسگزارم.

از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر نیکبخت که نهایت همکاری را با اینجانب نمودن سپاسگذاری میکنم..

از مسؤلین محترم پژوهشکده زیست فناوری به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم کمال تشکر را دارم.

از زحمات و همکاری تمامی دوستان عزیزم که در مسیر این پژوهش مرا یاری نمودند. بخصوص هم اتاقی های عزیزم مهندس زینب محسنی، مهندس سمانه عابدی، مهندس سهیلا قلی زاده و دوست عزیزم مهندس شیلان نصری و همکلاسی های عزیزم و دوست خوبم مهندس بهاره جعفری نژاد نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

## چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت خاصی برخوردار است. به این منظور تنوع ژنتیکی ۱۰۱ رقم و لاین گندم نان (*Triticum aestivum* L. ) با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. ۲۳ آغازگر مورد استفاده ۲۶۷ مکان قابل امتیازبندی تولید کردند که از این تعداد ۲۲۵ مکان چندشکل بودند. بیشترین درصد مکان‌های چند شکل مربوط به آغازگرهای 441، A12 و UBC 820 (۱۰۰ درصد) و کمترین آن متعلق به آغازگر UBC808 (۵۴ درصد) بود. میانگین مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برای آغازگرهای مورد استفاده برابر با ۰/۳۶ بود، بیشترین و کمترین مقدار آن به ترتیب برای آغازگرA12 , 441 (۰/۴۸) و UBC808، A14 وUBC827 (۰/۲۶) محاسبه شد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Complete linkage مبتنی بر ضرایب فاصله ژنتیکی دایس، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه اصلی قرار داد. He و شاخص شانون (I) در لاین‌ها بیشتر از ارقام بود. متوسط میانگین ضرایب تشابه دایس ۰/۸۵ بود. با توجه به فاصله‌ی ژنتیکی دو لاین ۱۵۱و ۱۲۱ ،این دو لاین می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی به عنوان والدین بالقوه جهت ایجاد هیبریدهای برتر بیشتر استفاده شوند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های مورد مطالعه زیاد نبوده و بایستی نسبت به توسعه پایه ژنتیکی ذخایر توارثی گندم اقدام شود.



**واژه‌های کلیدی**: تنوع ژنتیکی، شاخص شانون، گندم (*Triticum aestivum L.*)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار

# فهرست

فصل اول: مقدمه----------۱

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱-منشأ و ژنتیک گندم ----------۳

۲-۲-توالی یابی گندم ----------۳

۲-۳-خصوصیات گیاه شناسی گندم----------۴

۲-۴- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی و روش های ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان----------۴

۲-۵- نشانگرهای ژنتیکی----------۶

۲-۵-۱-نشانگرهای مورفولوژیکی ----------۶

۲-۵-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی (پروتئینی) ----------۷

۲-۵-۳-نشانگرهای مولکولی ----------۷

۲-۵-۳-۱-نشانگر های مبتنی بر دورگ گیری اسید های نوکلئیک----------۹

۲-۵-۳-۱-۱ نشانگر RFLP ----------۹

۲-۵-۳-۱-۲ تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری ( VNTR) ---------- ۱۰

۲-۵-۳-۲- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ---------- ۱۰

۲-۵-۳-۲-۱- نشانگر RAPD ---------- ۱۱

۲-۵-۳-۲-۲- نشانگر AFLP---------- ۱۱

۲-۵-۳-۲-۳- نشانگر SSR ---------- ۱۱

۲-۵-۳-۲-۴- نشانگرهای مبتنی بر PCR توالی‌های ویژه---------- ۱۲

۲-۵-۳-۲-۵- تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی ---------- ۱۳

۲-۵-۳-۲-۶- رتروترنسپوزون‌ها ---------- ۱۳

۲-۵-۳-۲-۶-۱- نشانگرهای IRAP---------- ۱۴

۲-۵-۳-۲-۶-۲- نشانگرهای REMAP ---------- ۱۴

۲-۵-۳-۲-۷-نشانگر مولکولی ISSR ---------- ۱۵

۲-۶-۱ -منابع چندشکلی نشانگر ISSR---------- ۱۷

۲-۶-۱-۱- DNA الگو ---------- ۱۷

۲-۶-۱-۲- نوع آغازگر مورد استفاده---------- ۱۷

۲-۶-۱-۳-روش آشکارسازی باندها ---------- ۱۹

۲-۷-۱- کاربردهای نشانگرهای ISSR ---------- ۱۹

۲-۷-۱-۱- انگشت نگاری ژنومی ---------- ۱۹
۲-۷-۱-۲- بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ---------- ۱۹
۲-۷-۱-۳- نقشه یابی ژنتیکی ---------- ۲۰
۲-۷-۱-۴- نشاندار کردن ژن و انتخاب با کمک نشانگر ---------- ۲۰
۲-۷-۱-۵- تعیین فراوانی توالی های کوتاه ریزماهواره ای ---------- ۲۰
۲-۸-۱-مروری بر پژوهش های انجام شده ---------- ۲۱

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- مواد گیاهی ---------- ۲۵
۳-۲- استخراج DNAی ژنومی از نمونه های گیاهی مورد بررسی ---------- ۲۶
۳-۳- کیفیت و کمیت DNA ---------- ۲۷
۳-۴- دستورالعمل ISSR ---------- ۲۸
۳-۴-۱- آغازگرها ---------- ۲۹
۳-۴-۲- تهیه ژل الکتروفورز ---------- ۳۱
۳-۴-۳- تهیه بافر TBE (۱۰X) ---------- ۳۱
۳-۴-۴- الکتروفورز محصول PCR ---------- ۳۱
۳-۵- تجزیه آماری داده ها ---------- ۳۲

فصل چهارم: نتایج

۴-۱ -اطلاعات آغازگر ---------- ۳۴
۴-۲-ارتباط و فاصله ژنتیکی جمعیتها بر اساس تجزیه خوشهای ---------- ۳۹
۴-۳- تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) ---------- ۴۲

فصل پنجم: بحث

۵-۱-مطالعه چند شکلی با آغازگرهای ISSR ---------- ۴۳
۵-۲-روابط ژنتیکی بین ارقام ولاین ها ---------- ۴۴

پیشنهادات ---------- ۴۷
منابع ---------- ۴۸

## فهرست: اشکال

شکل ۲-۱ نشانگر ISSR با آغازگرهای مبتنی بر توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی AG.....۱۸
شکل ۴-۱ نمودار تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط هر آغازگر .....۳۵
شکل ۴-۲ نمودار درصد چندشکلی تولید شده توسط هر آغازگر .....۳۵
شکل ۴-۳ نمودار هتروزیگوسیتی تولید شده توسط هر آغازگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گندم نان.....۳۷
شکل۴-۴ الگوی باندی، قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس آغازگر A13.....۳۷
شکل۴-۵ الگوی باندی، قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس آغازگر UBC811.....۳۸
شکل ۴-۶ الگوی باندی، قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس آغازگر UBC857.....۳۸
شکل ۴-۷ دندروگرام ۱۰۱ لاین و رقم گندم نان با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم Complete linkage .....۴۰
شکل ۴-۸ الگوی دو بعدی پراکنش ۱۰۱ لاین و رقم گندم نان با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی.....۴۲

## فهرست: جداول

جدول ۳-۱ ارقام ولاین های مورد مطالعه و مشخصات آنها.....۲۵
جدول ۳-۲ آغازگرها، توالی و دمای اتصال آنها.....۲۹
جدول ۳-۳ اجزاء تشکیل دهنده‌ی واکنش PCR.....۳۰
جدول۴-۱ نام آغازگر، توالی، دمای اتصال، تعداد کل باند، تعداد مکان چندشکل، درصد مکان‌های چندشکل و اندازه باندی..... ۳۴
جدول۴-۲ هتروزیگوسیتی مورد انتظار ، ضریب شانون، تعداد آلل های موثر برای هر آغازگر.....۳۶
جدول۴-۳ میانگین و انحراف استاندارد ضریب شانون،هتروزیگوسیتی، تعداد آلل های موثر برای کل افراد، ارقام و لاین ها.....۳۹
جدول۴-۴ گروه های ارقام و لاین های گندم نان بر بر اساس ضرایب تشابه دایس و الگوریتم Complete linkag.....۴۱

# فصل اول

# مقدمه

# فصل اول

## مقدمه

گندم به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، مهمترین گیاه زراعی است که از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید سالیانه نسبت به سایر غلات در درجه‌ی اول اهمیت می‌باشد. در ایران نیز گندم نسبت به سایر محصولات بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است. بیشترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیشترین میزان تولید (۹۴ درصد) مربوط به گندم نان (*Triticum aestivum* L. ) می‌باشد. سطح زیر کشت گندم در دنیا بالغ بر ۲۰۰ میلیون هکتار می‌باشد. میزان تولید جهانی آن ۶۰۰ میلیون تن است (Shaista *et al*., 2010). هر چند این گیاه خاص مناطقی با شرایط آب وهوای معتدل است ولی به دلیل داشتن قدرت سازگاری بالا در حال حاضر کشت آن در اکثر نقاط دنیا حتی سیبری امکان پذیر می‌باشد (Pena *et al*., 2002). گندم در مناطق وسیعی از جهان و در محدوده عرض جغرافیایی ۶۷ درجه شمالی در نروژ، فنلاند و روسیه تا ۴۵ درجه عرض جنوبی در آرژانتین کشت می‌شود و این قدرت تطابق موجب گسترش سطح زیر کشت و فراگیر شدن آن در جهان گردیده است (خدابنده و همکاران، ۱۳۷۲). تقاضا برای گندم در جهان در سال ۲۰۲۰ میلادی به مقدار ۴۰ درصد بیش از سطح فعلی تقاضا پیش بینی شده می‌رسد. گندم به عنوان عمده‌ترین محصول زراعی کشور بطور متوسط سطحی معادل ۶/۶۵ میلیون هکتار از اراضی کشور را به خود اختصاص داده است که ۳۶/۷۵درصد آن آبی و ۶۵/۲۵ درصد بقیه دیم می‌باشد. میانگین تولید سالیانه کشور حدود ۱۳/۴۸ میلیون تن بوده است که ۶۶/۵ درصد آن آبی و مابقی دیم می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۸). گندم همواره در طول تاریخ و احتمالاً در یک دوره طولانی یک غذای اساسی برای انسان بوده است و در مقیاس جهانی بیشتر از هر منبع دیگری تأمین کننده غذا برای انسان است. گندم مهمترین منبع کربوهیدرات‌ها در اکثر کشورهای مناطق معتدله می‌باشد. گندم یک منبع غذایی عالی است، اگرچه دانه‌ی آن در برخی از اسیدهای آمینه‌ی ضروری بویژه لایسین فقیر است (Briggle *et al*., 1987). در خصوص اهمیت گندم در کشور ما باید گفت که به عنوان منبع عمده‌ی تأمین کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت کشور بوده، بطوریکه ۷۵ درصد پروتئین مصرفی و ۶۵ درصد کالری دریافتی هر فرد از نان تأمین می‌شود (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۸).

امروزه با تمایل به کشت‌های خالص گیاهان، دامنه‌ی تنوع ژنتیکی در اکوسیستم‌های کشاورزی کاهش یافته است (کوچکی ،۱۳۸۳). از طرفی ارقام و واریته‌های اصلاح شده با تاریخ مصرف محدود افزایش یافته است (والتر آر، ۱۳۸۳). علی‌رغم تعداد بسیار زیاد واریته‌های تجاری که در چند دهه‌ی اخیر اصلاح شده‌اند، در بسیاری از مناطق جهان تولید محصولات زراعی بر کشت تعداد اندکی از واریته‌های زراعی استوار است (کوچکی، ۱۳۸۳). با وجود اینکه کشور ایران از غنای ژنتیکی بالایی برخوردار است و تنوع ژنوتیپ‌ها و نژادها و جمعیت‌های گیاهان زراعی در گذشته در آن زیاد بوده است، ولی در حال حاضر این تنوع به شدت کاهش یافته است و ارقام زراعی

اندکی بخش عمده تولید هر محصول را به خود اختصاص می‌دهند. با توجه به اهمیت اقتصادی و زراعی این گیاه و ارزش استراتژیک آن، اولین قدم برای ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی و دامنه‌ی تنوع گندم‌های نان ایران و نیز برنامه‌ریزی هدفمند برای کارهای اصلاحی، اطلاع از تنوع ژنتیکی و خویشاوندی ارقام و لاین‌های مناطق مختلف است. (سبزه علی، ۱۳۸۸)

تا به امروز واریته‌های اولیه و خویشاوندان وحشی یک منبع با ارزش و گاهی اوقات تنها منبع موجود ژن‌های مقاومت به حشرات، بیماری‌ها، سازگاری به شرایط نامساعد محیطی و سایر صفات زراعی مانند پاکوتاهی در برنج و گندم و سایر محصولات دانه‌ای بوده‌اند که سهم آنها در انقلاب سبز و در بسیاری از قسمت‌های دنیا بر کسی پوشیده نیست. با جایگزین کردن و به دنبال آن از بین رفتن واریته‌های اولیه، تنوع ژنتیکی موجود در آنها نیز از بین می‌رود. برای جلوگیری از چنین زیان‌هایی، ذخیره کردن واریته‌های اولیه ضروری می‌نماید (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۶). در سالهای اخیر با اپیدمی شدن بیماری زنگ خسارت زیادی به مزارع گندم کشور وارد شد (FAO., 2006). بنابراین برای حفظ ژن‌های ارزشمند زراعی گندم بررسی تنوع ژنتیکی ضروری می-باشد. به همین منظور تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های گندم نان مورد بررسی قرار گرفت تا ضمن آگاهی از تنوع ژنتیکی، افرادی با فاصله ژنتیکی مناسب جهت تولید هیبرید و جمعیت‌های نقشه‌یابی شناسایی شوند.

# فصل دوم

# کلیات و بررسی منابع

## ۲-۱- منشأ و ژنتیک گندم

گندم نان (*Triticum aestivum L.*) متعلق به خانوادهی *Poaceae* و جنس تریتیکوم است و از لحاظ ژنتیکی گیاهی آلوهگزاپلوئید که دارای 2x=6n=42 کروموزم و شامل سه ژنوم متفاوت A، B و D که هر ژنوم از ۷عدد کروموزم تشکیل شده است. از سال ۱۹۱۸ تحقیقات برای یافتن گونههای دیپلوئید که ژنومهای A، B و D را ایجاد کرده بودند شروع شد. مشخص شد که ژنوم A مربوط به گونهی monococcum است. در سال ۱۹۴۴ معلوم شد که گونهی دیپلوئید *Aegilops squarrosa* ژنوم D را تشکیل میدهد که در ایجاد گندم هگزاپلوئید و همچنین در گونهی تتراپلوئید نقش دارد. در سال ۱۹۵۴ ساکارا و استبینز بیان داشتند که منشأ ژنوم B گونه *Aegilops speltoides* است، این گونه خصوصیات مورفولوژیکی مناسبی برای انتقال از وضعیت گندمهای Einkorn (AA) به وضعیت تتراپلوئیدی گندمهای امر (AABB) داشت. بدلیل اینکه دورگ آمفی دیپلوئید حاصل از تلاقی تریتیکوم مونوکوکوم با آجیلوپس اسپلتوئیدس که قبلاً وجود داشت پس آمیزش با گندم امر نتایج یکنواخت و قطعی بدست نمیداد، از اینرو گونهی آجیلوپس اسپلتوئیدس به عنوان منبع ژنوم B پذیرفته نشد. دانشمندان اصلاح نباتات و ژنتیک تاکنون موفق نشدهاند که میزان قرابت کروموزمهای ژنوم B در گندم-های تتراپلوئید و هگزاپلوئید را با کروموزمهای ژنوم B در آجیلوپس اسپلتوئیدس تعیین کنند (یزدی صمدی، ۱۳۷۳).

## ۲-۲-توالی یابی گندم

ژنوم گندم بزرگ بوده و دارای حدود ۱۶ میلیون کیلو باز در هر سلول هاپلوئید میباشد و بیش از ۸۰ درصد ژنوم آن توالیهای تکراری با متوسط ۸۱۰ مگا جفت باز در هر کروموزم با طول ۱۰ میکرومتر است (Segman *et al.*, 2006). طبق این گزارش ۷۱۰۴ توالی EST در گندم شناسایی شد. بیشتر ESTها در ژنوم B (۵۷۷۴) و بقیه در ژنوم A (۵۱۷۳) و ژنوم D (۵۱۴۶) یافت شدند. در واقع چگالی ESTها با زیاد شدن فاصله از سانترومر افزایش مییابد. بسیاری از ژنهای مهم کشاورزی در نواحی که ESTها به صورت متراکمند قرار دارند. ESTهای نقشهیابی شده در کروموزم یک منبع بینظیری برای تجزیه SNPها، نقشهیابی مقایسهای، آنالیزهای ساختاری و عملکردی تکامل پلیپلوئیدی هستند (Qi *et al.*, 2004).

## ۲-۳- خصوصیات گیاه شناسی گندم

گندم گیاهی است تک لپه، خودگشن و یک‌ساله، از تیره‌ی غلات و جنس تریتیکوم که دارای گونه‌های بسیار زیادی است. ریشه‌های اصلی و فرعی از محل طوقه خارج شده و همگی هم قطر می‌باشند. علاوه بر ساقه‌ی اصلی اغلب ارقام گندم دارای ساقه‌های ثانوی است که اصطلاحاً پنجه نامیده می‌شود. ارقام مقاوم به خشکی سیستم ریشه‌ای متراکم و گسترده‌تری از ارقام حساس به خشکی دارند.

سنبل یا سنبله‌ی گندم چندین سنبلچه یا سنبل فرعی دارد که هر کدام معمولاً از یک تا چند گل تشکیل شده است. گل‌های یک سنبل فرعی معمولاً در مراحل مختلف رشد قراردارند، گل‌های داخلی دیرتر می‌رسند. هر گل معمولا از یک گلوم، دو گلومل بنام‌های لما و پالئا و سه پرچم و یک مادگی درست شده است مادگی آن یک خامه دو شاخه شبیه پر دارد. در موقع گل کردن، گلوم‌ها باز و ریزش مقداری گرده به خارج موجب می‌شود که گندم گیاهی صد در صد خودبارور نباشد، در این گیاه یک تا چهار درصد عمل دگرگشنی انجام می‌شود (تاجبخش، ۱۳۸۲).

## ۲-۴- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی و روش های ارزیابی تنوع آن در گیاهان

منابع ژنتیکی، علاوه بر زیر بنای توسعه‌ی کشاورزی به عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی همچون سپری در برابر تغییرات محیطی عمل می‌کند. فرسایش منابع مذکور امنیت غذایی در جهان را با تهدید مواجه می‌کند. نیاز به حفظ و به‌کارگیری منابع ژنتیکی گیاهی به عنوان محافظی در برابر مشکلات غیر قابل پیش بینی در آینده بر همگان روشن است و چشم انداز تضعیف تنوع ژنتیکی به همراه تقاضای روز افزون به این منابع آن‌ها را در مرکز توجه جهانی جای داده است (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۶). این منابع تأمین کننده‌ی مواد خام ژنتیکی (ژن) هستند. این ژن‌ها در واریته‌های بومی و جوامع گیاهی طبیعی پراکنده هستند. متخصصین به-نژادی، از ذخایر گیاهی به عنوان منبع ماده‌ی ژنتیکی برای ایجاد ارقام جدید استفاده می‌کنند. تنوع مبنای همه‌ی گزینش‌ها است. یک برنامه‌ی اصلاحی زمانی موفق است که دو عامل تنوع و انتخاب در گیاه مورد آزمایش وجود داشته باشد. معمولاً واریته‌های محلی و توده‌های بومی دارای سطوح مناسبی از تنوع ژنتیکی می-باشند (عبد میشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۷).

یکی از پیامدهای اجتناب ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. اگر چه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیر ممکن می‌نماید اما در اینکه تعداد بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته‌اند، ذخائر

ژنتیکی با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته‌اند و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار گرفته‌اند، تردیدی نیست. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزاء مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌گردند. همچنین کسب اطلاع از فاصله‌ی ژنتیکی نسبی موجود در بین افراد یا جمعیت‌ها در برنامه‌های اصلاحی اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا امکان سازماندهی ژرم پلاسم و نمونه‌گیری ژنوتیپ بطور مؤثرتر فراهم می‌شود. در آغاز یک برنامه اصلاحی، آگاهی از خویشاوندی ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، تکمیل کننده‌ی اطلاعات فنوتیپی در پیش‌برد اصلاح جمعیت‌ها است. همچنین اطلاع از شباهت‌های ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها موجب می‌شود انتخاب والدین در یک تلاقی به طور ساده انجام و هتروزیس بخوبی نمایان گردد (قره یاضی، ۱۳۷۵؛عبدالهی مندولکانی و همکاران، ۱۳۸۲).

علی‌رغم اهمیت حیاتی ذخایر ژنتیکی، تنوع ژنتیکی بسیاری از محصولات زراعی از جمله گندم در طول دهه‌های گذشته کاهش یافته است (Nevo *et al.*, 1982; Metakovsky *et al.*, 1992). کاهش تنوع علاوه بر کاهش بازدهی برنامه‌های اصلاحی باعث ایجاد یکنواختی در مزارع و آسیب‌پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی می‌گردد. یکی از این بیماری‌ها زنگ گندم است که در سال‌های اخیر مزارع گندم را با خطر جدی مواجه کرده است (FAO, 2006).

مدیریت تنوع طبیعی موجود در ارقام اهلی و خویشاوندان وحشی یک گونه‌ی گیاهی در انجام برنامه‌های اصلاح نبات بسیار مهم است. یکنواختی ژنتیکی در برابر گسترش آفات و بیماری‌ها و متغیرهای محیطی موجب افزایش آسیب پذیری شده و این باعث کاهش عملکرد گیاهان می‌شود. بسیاری از خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی حاوی ژن‌هایی هستند که سبب ایجاد مقاومت به تنش‌های غیر زنده مانند خشکی، سرما و شوری می‌شوند. پس، می‌توان این ژن‌ها را به واریته‌های تجاری منتقل کرد و از کاهش شدید عملکرد جلوگیری نمود. قدم اول در اصلاح خصوصیات گیاهی، فهم ساختار مجموعه‌ی ژرم پلاسم است که این موضوع به نوبه خود نمونه‌گیری سیستماتیک ژرم پلاسم را برای مقاصد اصلاحی و حفاظتی، امکان پذیر می‌سازد (Kumar, 2009).

مزایای بررسی تنوع ژنتیکی عبارتند از: داشتن شناسنامه‌ای از گیاهان مورد نظر، بررسی درجه‌ی تغییرات تکاملی و استفاده از آن حفاظت گیاهی با شناخت و حفظ تنوع، امکان دستیابی به یک مخزن ژنتیکی مطلوب، گزینش ژنوتیپ‌های مورد علاقه از بین تنوع ژنتیکی موجود، انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی و از بین بردن یکنواختی ژنتیکی در جهت افزایش پایداری تولید می‌باشد.

ارزیابی تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌ها معمولاً در سطح مولکولی و با استفاده از چندین روش آزمایشگاهی انجام می‌گیرد که از آن میان می‌توان به آلوزایم‌ها[1] و تجزیه‌ی DNA[2] اشاره کرد که قادرند ارزیابی دقیقی از تنوع ژنتیکی را فراهم نمایند. همچنین تنوع ژنتیکی ممکن است با استفاده از صفات مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

## ۲-۵- نشانگرهای ژنتیکی

تفاوت موجود بین کروموزوم‌های دو فرد که به نتاج آنها منتقل می‌گردد می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی بکار گرفته شود. این تفاوت می‌تواند به طرق مختلفی تظاهر یابد. برخی از این تفاوت‌ها در صفات قابل روئیتی مانند رنگ گل، وجود یا عدم وجود ریشک در گلچه غلات و... تجلی می‌نماید. این گونه نشانگرها را نشانگرهای مورفولوژیکی می‌نامند. برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد باید حداقل واجد دو ویژگی زیر باشد: ۱- در بین دو فرد متفاوت باشد و ۲- به توارث برسد.

### ۲-۵-۱-نشانگرهای مورفولوژیکی

بررسی صفات مورفولوژیکی به تکنولوژی گرانی نیاز ندارد ولی اغلب این فعالیت‌ها به زمین وسیعی نیاز دارند که این امر می‌تواند سبب شود که این روش نسبت به روش‌های مولکولی هزینه بیشتری داشته باشد (Mondini *et al*., 2009) این نشانگرها شامل تعداد زیادی از ژن‌های کنترل کننده صفات فنوتیپی می‌باشند( Dvork *et al*., 1998) نشانگرهای مورفولوژیک عمدتاً متناظر با صفات کیفی هستند که به صورت عینی قابل مشاهده و رتبه‌بندی هستند. اکثراً از توارث غالب و مغلوبی تبعیت می‌کنند و اثرات اپیستازی[3] و پلیوتروپی[4] دارند. دلایل عمده محدودیت استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی عبارتند از: تعداد این نشانگرها کم بوده، وابسته به سن و مرحله رشدی گیاه هستند و غالباً از شرایط محیطی تأثیر می‌پذیرند و درضمن اساس ژنتیکی بسیاری از آن‌ها هنوز مشخص نشده است (قره یاضی، ۱۳۷۵).

[1]. Allozym
[2]. DNA Analysis
[3]. Epistasy
[4]. Poliotropy

### ۲-۵-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی[1] (پروتئینی)

این نوع نشانگرها در واقع فرآورده‌ی نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع انعکاسی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم می‌باشد. از مهمترین انواع نشانگرهای بیوشیمیایی می‌توان به آیزوزایم‌ها[2] و آلوزایم‌ها اشاره کرد. آیزوزایم‌ها شکل‌های مختلف یک آنزیم را نشان می‌دهند. نشانگرهای پروتئینی تغییرات را در سطح ردیف و عمل ژن، به صورت نشانگرهای همبارز نشان می‌دهند. عمده‌ترین معایب این نشانگرها محدودیت و همچنین متأثر بودن این نشانگرها از تغییرات پس از ترجمه می‌باشد. تظاهر کم برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها که تحت تأثیر مرحله رشد گیاه قرار می‌گیرد که در نهایت نوعی محدودیت زمانی برای استفاده از سیستم‌های آیزوزایمی است. از معایب دیگر، محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آیزوزایم‌ها است. پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزوی آیزوزایم‌ها نیز که بعضاً مشاهده شده است، از معایب دیگر این قبیل نشانگرها است (قره یاضی، ۱۳۷۵؛ نقوی و همکاران، ۱۳۸۴). با این وجود از آیزوزایم‌ها به صورت گسترده‌ای در بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی گیاهان استفاده شده است (قره یاضی، ۱۳۷۵). گروه دیگر از نشانگرهای بیوشیمایی، آلوزایم‌ها هستند. هر جایگاه وراثتی مربوط به یک آیزوزایم واحد، می‌تواند مجموعه آلل‌های رمز کننده انواع مختلف یک آنزیم را در خود جای دهد که به آن آلوزایم آن آنزیم گفته می‌شود (رحیمی نژاد، ۱۳۷۵).

### ۲-۵-۳-نشانگرهای مولکولی

نشانگرهای مولکولی مکان‌های ژنومی خاصی هستند که بوسیلهٔ کاوشگر یا آغازگر مشخص می‌شوند (Barcaccia *et al*., 2000). با توجه به اهمیت روزافزون تولید واریته‌ای برتر و نیاز به شناسایی و استفاده از آلل-ها و ژن‌هایی که صفات مطلوبی را کنترل می‌نمایند، استفاده از نشانگرهای DNA روزافزون خواهد بود (قاسمی یزدی، ۱۳۸۷). این نشانگرها ممکن است با نواحی ژنومی که فنوتیپ خاصی بروز می‌دهند، پیوسته باشند یا نباشند. نشانگرهای مولکولی نسبت به روش‌های فنوتیپی قدیمی دارای چندین مزیت هستند. این نشانگرها اغلب پایدارند و در همهٔ بافت‌ها صرف نظر از مرحله رشد، تمایز، توسعه یا حالت دفاعی سلول قابل تشخیص هستند. به‌علاوه آنها تحت تأثیر پلیوتروپی، محیط و تأثیرات اپیستازی قرار نمی‌گیرند. یک نشانگر مولکولی ایده‌آل باید دارای مزیت‌های زیر باشد:

۱- چندشکل بوده و توزیع نسبتاً یکسانی در ژنوم داشته باشد.

[1] . Biochemical markers
[2] .Isozymes

۲- تفاوت ژنتیکی را بطور دقیق نشان دهد.
۳- نشانگرهای مستقل و قابل اعتماد تولید کند.
۴- ساده، سریع و ارزان باشد.
۵- به مقدار کم از نمونه‌ی بافت و DNA نیاز داشته باشد.
۶- با صفات فنوتیپی خاصی پیوسته باشد.
۷- به اطلاعات اولیه از ژنوم ارگانیسم نیاز نداشته باشد.

با این وجود نشانگر مولکولی که همه‌ی این مزایا را داشته باشد وجود ندارد. روش‌های مختلف ارزیابی مولکولی بواسطه‌ی داشتن ویژگی‌های مهم مانند: فراوانی در ژنوم، میزان چندشکلی، مکان اختصاصی بودن، تکرارپذیری، تکنیک‌های مورد نیاز و هزینه از همدیگر تفکیک می‌شوند. نیازهای متفاوت در زمینه‌های تحقیقاتی امروز، باعث شده است که تغییراتی در نشانگرهای پایه بوجود آمده و نسل دوّم و پیشرفته نشانگرهای مولکولی بوجود آیند (Mondini *et al*., 2009). روش‌های مولکولی امکانات ویژه‌ای را برای ارزیابی تنوع زیستی ارائه می‌دهند که می‌توانند یک روش کلیدی مناسب برای ایجاد راهبردهای حفاظتی ژرم پلاسم‌ها ارائـه می‌نمایند (Paterson *et al*., 1991). نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، تفاوت‌های قابل توارث و تنوع افراد در سطح ماده ژنتیکی یعنی DNA را نـشان می‌دهند (قره‌یاضی، ۱۳۷۵). نشانگرهای مولکولی بر اساس آشکارسازی تفاوت (چندشکلی[1]) موجود در بین اسیدهای نوکلئیک افراد مختلف عمل می‌کنند. این تفاوت‌ها شامل پدیده‌های حذف، اضافه، جابجایی، دو برابر شدن و جهش‌های نقطه‌ای است. نشانگرهای مولکولی تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند. این نشانگرها دارای مزایایی از جمله پوشش تمام قسمت‌های ژنوم اگزون‌ها، اینترون‌ها و نواحی تنظیم کننده، عدم تأثیر پلیوتروپی و اپیستازی، قادر به شناسایی تفاوت‌هایی هستند که تنوع فنوتیپی آن‌ها را نشان نمی‌دهند و بعضی از آنها هم‌بارز هستند.

روش‌های مختلف مورد استفاده شامل: هضم و هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک، روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و یا ترکیبی از دو روش ذکر شده هستند. بعلاوه روش‌های مختلف نشانگری می‌توانند یک مکان یا چندمکان ژنومی را مورد بررسی قرار دهند. به طوری‌که نشانگرهای چندمکانی[2] قادرند بطور همزمان چندین مکان ژنومی را مورد بررسی قرار دهند. این نشانگرها مبتنی بر تکثیر تصادفی DNA بواسطهٔ آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی با توالی‌های انتخابی هستند، این گونه نشانگرها را نشانگرهای غالب

[1].Polymorphism
[2].Multi-locus markers

نیز می‌نامند. بنابراین امکان تشخیص حضور یا عدم حضور باند برای هر مکان وجود دارد ولی امکان تشخیص حالت‌های هتروزیگوت (A/-) یا هموزیگوت (a/a) برای آلل‌های مشابه وجود ندارد. در حالی که نشانگرهای یک مکانی[1] از کاوشگرها یا آغازگرهای ویژه برای مکان‌های ژنی استفاده می‌کنند و قادر به تکثیر یا دورگ گیری DNA با توالی‌های شناخته شده هستند. این نشانگرها را نشانگرهای هم‌بارز نیز می‌نامند که امکان تشخیص مکان‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را به ما می‌دهند (Mondini *et al*., 2009).

روش‌های نشانگری مبتنی بر DNA مانند چندشکلی‌های حاصل از قطعات هضم شده (RFLP)، DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD)، توالی‌های تکراری ساده (SSR) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر(AFLP) در حال حاضر به طور گسترده برای مطالعات اکولوژیکی، تکاملی، رده بندی، فیلوژنتیکی و ژنتیکی در علوم گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند و مزایا و محدودیت‌های این روش‌ها کاملاً شناخته شده است (Ayad *et al*., 1995; Barcaccia *et al*., 2000; Aguiar *et al*., 2008; Mondini *et al*., 2009 )؛این نشانگرها بسته به این که به چه روشی تفاوت را نشان می‌دهند به دو گروه مبتنی بر هیبریداسیون و نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR[2] تقسیم می‌شوند.

## ۲-۵-۳-۱-نشانگر های مبتنی بر دورگ گیری اسید های نوکلئیک[3]

### ۲-۵-۳-۱-۱ نشانگر RFLP[4]

تکنیک RFLP (تفاوت طول قطعات حاصل از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی) در اوایل دهه ۱۹۸۰ توسط Botstein و همکاران برای بررسی مستقیم DNA و برای مطالعه مستقیم تفاوت افراد در سطح DNA معرفی شد. تکنیک RFLP شامل برش DNA توسط آنزیم‌های برشی، جداسازی قطعات DNA بوسیله ژل الکتروفورز و هیبریداسیون قطعات با کاوشگرهای[5] نشاندار می‌باشد (Caetano-Anolles and Gresshoff., 1998; Li and Cordes, 2004 ) نشانگر RFLP در نقشه‌یابی ژنتیکی و بررسی تنوع درسطح درون و بین گونه-ای استفاده می‌گردد (Old and Primros, 1998). این نشانگر هم‌بارز بوده و در برنامه‌های اصلاحی و گزینش افراد هموزیگوت و هتروزیگوت استفاده می‌شود تکنیک RFLP به دلیل هزینه نسبتاً بالای نگهداری

[1].Single-locus markers
[2] .Polymerase chain reaction (PCR)
[3]. Hybridization-based molecular markers
[4] .Restriction fragment length polymorphism
[5]. Probe

کـاوشگرهـا و ریز سازواره‌ها، زمان بر بودن واکنش و همچنین پیچیدگی و خطرناک بودن استفاده‌ی محدودی دارد (Botstein *et al*., 1980; Winter and Kahl, 1995).

### ۲-۵-۳-۱-۲ تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری (VNTR)[1]

این نشانگر بر اساس تفاوت در تعداد ردیف‌های با تکرار متوسط در DNA ژنومی موجودات مورد مقایسه ابداع شده‌اند و از نظر تکنیکی مبتنی بر استفاده از کاوشگرهای مصنوعی و کاربرد مواد پرتوزا و روش سادرن می‌باشد. کلیه‌ی مراحل اجرای کار از مرحله‌ی استخراج DNA تا هضم آن و انجام الکتروفورز و انتقال سادرن گرفته تا مراحل نشاندار کردن کاوشگر و دورگ گیری DNA و نمایان سازی تفاوت‌ها به طور کامل شبیه RFLP مبتنی بر سادرن (ژنوم‌های بزرگ) است. تنها تفاوت RFLP و VNTR در تعداد باندهاست که در VNTR معمولاً به بیش از ده و تا صدها باند می‌رسد. نیاز به DNA زیاد، نامعلوم بودن سیستم آللی، دشواری زیاد قرائت، امتیازبندی و تفسیر نتایج که به دلیل وجود تعداد زیادی باند بر روی خود پرتو نگارهاست، موجب عدم کاربرد وسیع این نشانگر شده‌اند.

### ۲-۵-۳-۲- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)[2]

این روش در اواسط دهه ۱۹۸۰ توسط Karry Mollis (۱۹۸۷) معرفی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک روش آزمایشگاهی است که به منظور تولید انبوه قطعه‌ی خاصی از DNA (با طول و توالی مشخص) به کار می-رود. این روش فوق‌العاده حساس و سودمند در بسیاری از رشته‌ها نظیر زیست‌شناسی ملکولی، بیماری‌شناسی، ژنتیک جامعه و قانون قابل بکارگیری است. PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانندسازی DNA دارد. برای انجام PCR هر ناحیه از ملکول DNA به شرطی که توالی‌های دو طرفه‌ی آن شناخته شده باشد قابل انتخاب است. توالی‌های اطراف این قطعه به این دلیل باید شناخته شود که برای انجام یک PCR بایستی دو الیگونوکلئوتید کوتاه با ملکول DNA هیبرید گردند، یعنی هر کدام به یکی از رشته‌های مارپیچ دوتائی DNA متصل شود. این الیگونوکلئوتیدها که به عنوان آغازگر برای واکنش‌های سنتز DNA بکار می‌روند ناحیه‌ای را که بایستی تکثیر شود را تعیین حدود می‌نمایند (قاسمی یزدی، ۱۳۸۷).

[1].Variable Number of Tandem Repeats
[2].PCR- based molecular markers