١١٤٥٧

۸۷/۱/۱۰۷۷۸۶
۸۸۱/۲۵

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی گرایش

اصلاح نباتات

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های نخود زراعی (*Cicer arietinum*) در ایران با استفاده از صفات زراعی (فیزیولوژیک، مورفولوژیک و فنولوژیک) و نشانگرهای مولکولی

۱۳۸۸/۱۱/۲۱

استاد راهنما:

دکتر کیانوش چقامیرزا

نگارش:

فرزانه فاضلی

بهمن ماه ۱۳۸۷

۱۱۰۴۵۶

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است .

دانشگاه رازی

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

نگارش:

فرزانه فاضلی

تحت عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های نخود زراعی (*Cicer arietinum*) در ایران با استفاده از صفات زراعی (فیزیولوژیک، مورفولوژیک و فنولوژیک) و نشانگرهای مولکولی

در تاریخ ۱۳۸۷/۱۱/۱۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی.. به تصویب نهایی رسید.

استاد راهنما:

دکتر کیانوش چقامیرزا با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء ۱۳۸۸/۲/۲۱

اساتید داور:

استاد داور داخل گروه:

دکتر عزت الله فرشادفر با مرتبه‌ی علمی استاد امضاء

استاد داور خارج از گروه:

دکتربهمن بهرام‌نژاد با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

سپاس و قدر دانی

مهربان آفریدگار یکتا را سپاس می گویم و بر درگاه حضرتش سجده شکر می‌سایم.

پس از حمد و ثنای یگانه خالق هستی، بر خود لازم می‌بینم که از اولین و بزرگترین معلمان زندگی‌ام، **پدر و مادر عزیزم** که همچون دو فرشته سبکبال، بال‌های پرمهر خود را بر لحظه لحظه زندگی من گستردند و بعد از خدای مهربان درتنگنای زندگی یگانه حامی من بودند و نیز خواهران و برادران بزرگوارم از صمیم قلب تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین بر خود بایسته می‌دانم که از زحمات استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای **دکتر کیانوش چقامیرزا** به خاطر راهنمایی‌های ارزشمند و مستمرشان در مسیر اجرای این تحقیق صمیمانه تشکر و سپاسگذاری کنم.

- از داوران بزرگوارم جناب آقای دکتر بهمن بهرام‌نژاد و دکتر عزت الله فرشادفر که زحمت بازخوانی پایان نامه مرا به عهده گرفتند کمال تشکر و سپاس را دارم.
- از مدیریت محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی جناب آقای دکتر بهرامی‌نژاد و کلیه اساتید ارجمندی که دانسته‌های علمی خویش را مدیون وجود با ارزش این عزیزان هستم و در تمام طول تحصیل از محضرشان استفاده‌های فراوان بردم تشکر و قدردانی می‌نمایم.
- از راهنمایی‌های اساتید محترم دوره کارشناسی‌ام در دانشگاه شهرکرد به ویژه جناب آقای دکتر بهروز شیران که همواره از راهنمایی‌های ارزشمندشان بهره مند بوده ام کمال تشکر و قدردانی را دارم.
- از زحمات آقایان دکتر کریم سرخه، مهندس شهرام چقامیرزا ، مهندس مهدی آقایی نژاد و مهندس سعید ترکش اصفهانی برای راهنمایی‌ها و همکاری بی‌دریغشان با اینجانب کمال تشکر و قدردانی را دارم.
- از دوستان عزیزم خانم‌ها لیلا زارعی، زینب چقاکبودی، بتول زارعی، ندا سبحانیان، مریم کارونی، خدیجه عباسی، آسیه مرادی، مهستی عباسی، لیلا اکبری، بیتا جمشیدی، پردیس نجفی، زینب خوب بخت، سمیه سجادی، شهلا مشایخی، فرحناز توکلی، حدیث خسروی، نسیم خاکسار، پارمیس زاهدی مقدم، کژال سرسیفی، فریبا بیگی‌پور مطلق، فرشته صمدی، لیلا عثمانی، عاقله افشاری، آنیتا یاقوتی‌پور، نسرین محمودی، فاطمه آقابابایی، هاجر قراخانی، الهه ربیعی، سمیرا وره زردی، الهه ملکی، راحله قاسمی، آمنه امیری و الهام میکائیلی، که در طی دوره کارشناسی ارشد از همراهی‌ها و مساعدتهایشان بهره‌مند بودم صمیمانه تشکر و سپاسگذاری می کنم.
- در پایان از زحمات دانشجویان دوره کارشناسی که در انجام این پایان نامه به اینجانب کمک شایانی نمودند کمال تشکر را دارم.

فرزانه فاضلی

تقدیم به

او به پاس لطف و عنایات بی پایان و بی دریغش.

پدر و مادر مهربان و فداکارم

و خواهران و برادران عزیزم

چکیده

تنوع ژنتیکی اساس اصلاح گیاهان زراعی است، از این رو ارزیابی تنوع ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاح نباتات از اهمیت زیادی برخوردار است. در مطالعه حاضر، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین ۹۹ توده مختلف نخود تیپ کابلی دریافت شده از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ۵ رقم شاهد (آرمان، جم، بیونیج، هاشم و ILC-482) از صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR استفاده گردید. کلیه آزمایش‌ها در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال زراعی ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ انجام شد. صفات مورفولوژیک، فنولوژیک، فیزیولوژیک و همچنین اجزاء عملکرد دانه در توده‌های مورد بررسی اندازه گیری شدند. در بخش مطالعات زراعی نتایج تجزیه واریانس ارقام نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای برای صفات مورد بررسی در بین توده‌ها و ارقام وجود دارد و نتایج مقایسه میانگین توده‌ها نیز تفاوت‌های معنی‌داری را در تمام صفات ارزیابی شده، بجز سه صفت عرض کانوپی، درصد باروری و میزان کلروفیل برگ مشخص نمود. تجزیه ضریب همبستگی بین صفات مختلف نشان داد که عملکرد دانه همبستگی مثبت و معنی داری با صفت کانوپی (r=۰/۲۳۲*) و شاخص برداشت (r=۰/۴۵۹**) و همچنین همبستگی منفی و معنی داری با تاریخ ۵۰٪ گل‌دهی (r= -۰/۲۰۸*) و تاریخ ۵۰٪ غلاف‌دهی (r= -۰/۲۰۱*) داشت. نتایج تجزیه عاملی حاکی از آن بود که شش عامل اول ۷۵/۸۲۵ درصد تنوع بین داده‌ها را توجیه نمودند. از این عامل‌ها می‌توان تحت عنوان صفات فنولوژیک، ویژگی‌های بذر ، قامت و معماری گیاه، باروری و عملکرد نام برد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تابع تشخیص بر اساس صفات زراعی نشان داد که توده‌های مورد بررسی در دو گروه قرار گرفتند. در بخش مطالعات مولکولی، جهت بررسی پلی‌مورفیسم در بین توده‌های مورد مطالعه از ۲۶ آغازگر تصادفی RAPD و ۲۱ آغازگر ISSR استفاده گردید. در مجموع ۵۶۴ باند توسط نشانگر RAPD تولید شد که از بین آنها حدود ۳۲۱ باند چند شکل بود و درصد چند شکلی کل برابر ۵۶/۵۵٪ بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر T18 به میزان ۹۶/۲۹٪ و کمترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگر D12 به میزان ۳۰/۴۳٪ بود. با ۲۱ آغازگر ISSR حدود ۳۶۱ باند تولید شدکه ۲۵۷ باند چند شکل بود. درصد چند شکلی در این آغازگر حدود ۷۰/۰۶٪ بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای UBC873، UBC811 و UBC864 به میزان ۱۰۰٪ و کمترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگر UBC884 به میزان ۳۸/۸۸٪ بود. در ارتباط با تعیین تعداد مطلوب کلاسترها، نقطه برش دندروگرام RAPD و ISSR به ترتیب مربوط به نقاطی با بالاترین میزان متوسط شاخص F (۸۱/۵۷) و (۳۵/۸۷) بود که چهار و شش گروه حاصل شد. شباهت و تفاوت‌های به دست آمده بر اساس تجزیه خوشه‌ای در توده‌ها و ارقام مورد مطالعه، با دقت مناسبی توسط روش بوت‌استراپ تأیید شدند. بر اساس نشانگر RAPD، ضریب تشابه جاکارد، از ۰/۹۷۷- ۰/۶۸۵ و به طور متوسط ۰/۸۸۱ بود. بر اساس ضریب تشابه جاکارد بیشترین شباهت ژنتیکی بین توده‌های شماره ۸۵ و ۸۶ به میزان ۰/۹۷۷ و کمترین آن بین توده شماره ۲۰ و رقم ILC-482 به میزان ۰/۶۸۵ بود. بر اساس نشانگر ISSR ضریب تشابه جاکارد از ۰/۹۶۹- ۰/۵۴۳ متغیر و به طور متوسط ۰/۷۵۰ بود. بر اساس ضریب تشابه جاکارد بیشترین شباهت ژنتیکی بین توده‌های شماره ۹۳ و ۹۴ به میزان ۰/۹۶۹ و کمترین آن بین توده‌های شماره ۱۰ و ۶۶ به میزان ۰/۵۴۳ بود. نتایج به دست آمده نشان دهنده میزان تنوع ژنتیکی متوسط در توده‌های مورد مطالعه می‌باشد. آزمون همبستگی مانتل بین ماتریس های تشابه نشانگرهای مولکولی با هم و همچنین نشانگرهای مولکولی با صفات زراعی انجام گرفت که نتایج بیانگر وجود همبستگی معنی‌دار بین نشانگرهای مولکولی و همچنین نشانگرهای مولکولی بجز نشانگرهای RAPD با صفات زراعی بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی دو نشانگر RAPD و ISSR نشان داد که اغلب توده‌های ناشناخته متعلق به منطقه فارس هستند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱- مقدمه ۲
۱-۱- حبوبات ۴
۱-۲- اهمیت نخود ۴
۱-۳- منشأ نخود ۵
۱-۴- سطح زیر کشت و تولید نخود ۶
۱-۵- گیاه‌شناسی نخود ۶
۱-۶- خصوصیات اکولوژیکی نخود ۷
۱-۷- ژنتیک نخود ۷
۱-۸- اصلاح نخود ۸
۱-۹- عملکرد و اجزای آن ۹
۱-۱۰- معرفی ژرم پلاسم ۱۵
۱-۱۱- اهمیت تنوع ژنتیکی در اصلاح نباتات ۱۶
۱-۱۲- روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷
۱-۱۳- نشانگرهای ژنتیکی ۱۸
۱-۱۳-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی ۱۸
۱-۱۳-۲- نشانگرهای پروتئینی ۱۹
۱-۱۳-۳- نشانگرهای DNA ۲۱
۱ -۱۳-۳-۱- عوامل مؤثر در انتخاب سیستم نشانگر مولکولی مؤثر ۲۲
۱-۱۴- کاربرد نشانگرهای DNA ۲۴
۱-۱۵- انواع نشانگرهای DNA ۲۷
۱-۱۵-۱- نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون ۲۷
۱-۱۵-۱-۱- تکنیک RFLP ۲۸
۱-۱۵-۱-۲- مزایای RFLP ۲۹
۱-۱۵-۱-۳- معایب RFLP ۲۹
۱-۱۶- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۹
۱-۱۶-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۹
۱-۱۶-۲- بازدارنده‌ها و تقویت کننده‌های PCR ۳۱
۱-۱۶-۳- مزایای تکنیک PCR ۳۱
۱-۱۶-۴- کاربردهای تکنیک PCR ۳۱
۱-۱۷- انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR ۳۲
۱-۱۷-۱- تکنیک AFLP ۳۳

عنوان | صفحه

۱-۱۷-۲- تکنیک SSR ۳۶
۱-۱۷-۳- تکنیک RAPD ۳۹
۱-۱۷-۳-۱- عوامل بوجود آورنده چند شکلی در RAPD ۴۶
۱-۱۷-۳-۲- فاکتورهای مؤثر بر تکرارپذیری تکنیک RAPD ۴۶
۱-۱۷-۳-۳- مزایای تکنیک RAPD ۴۹
۱-۱۷-۳-۴- معایب نشانگر RAPD ۴۹
۱-۱۷-۳-۵- کاربرد نشانگر RAPD ۵۰
۱-۱۷-۴- تکنیک ISSR ۵۰
۱-۱۸- روش‌های تجزیه چند متغییره ۵۹
۱-۱۸-۱- اهداف استفاده از روش‌های آماری چند متغیره ۵۹
۱-۱۸-۱-۱- تجزیه خوشه‌ای ۵۹
۱-۱۸-۱-۱-۱- اهداف تجزیه خوشه‌ای ۶۰
۱-۱۸-۱-۱-۲- انواع تجزیه خوشه‌ای ۶۰
۱-۱۸-۱-۲- تجزیه به مؤلفه‌های متعادل ۶۱
۱-۱۸-۱-۳- مقایسه کارایی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۶۲
۱-۱۸-۱-۴- تجزیه همبستگی ۶۲
۱-۱۸-۱-۵- تجزیه تابع تشخیص ۶۲
۱-۱۸-۱-۶- تجزیه به عامل‌ها ۶۳
۱-۱۹- ضرایب تشابه ۶۳
۱-۲۰- ضریب همبستگی کوفنتیک ۶۵
۱-۲۱- روش‌های نمونه‌برداری مجدد ۶۶

فصل دوم

مواد و روش ها

۲-۱- مطالعات مزرعه‌ای ۶۹
۲-۱-۱- موقعیت محل اجرای آزمایش ۶۹
۲-۱-۲- مواد گیاهی ۶۹
۲-۱-۳- طرح آزمایشی و عملیات زراعی ۷۳
۲-۱-۳-۱- آزمون مقدماتی مقایسه عملکرد ۷۳
۲-۱-۴- اندازه‌گیری صفات ۷۳
۲-۲- مطالعات آزمایشگاهی ۷۵
۲-۲-۱- مواد گیاهی ۷۵
۲-۲-۲- استخراج DNA ۷۵
۲-۲-۳- روش تغییر یافته CTAB ۷۵
۲-۲-۴- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA ۷۷
۲-۲-۵- تعیین کیفیت و کمیت DNA ۷۷

عنوان | صفحه

۲-۲-۵-۱- تعیین کیفیت نمونه‌های DNA ۷۷
۲-۲-۵-۲- تعیین کمیت نمونه‌های DNA ۷۸
۲-۲-۶- واکنش PCR ۷۹
۲-۲-۷- الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل آگاروز ۸۰
۲-۳- تجزیه و تحلیل‌های آماری ۸۰
۲-۳-۱- آماره‌های تک متغییره ۸۰
۲-۳-۱-۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ۸۰
۲-۳-۲- آماره‌های چند متغییره ۸۱
۲-۳-۲-۱- تجزیه همبستگی ۸۱
۲-۳-۲-۲- تجزیه تابع تشخیص ۸۱
۲-۳-۲-۳- تجزیه به عامل‌ها ۸۱
۲-۳-۲-۴- تجزیه خوشه‌ای ۸۲
۲-۳-۳- تجزیه و تحلیل‌های مولکولی ۸۲

فصل سوم

نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از بررسی صفات زراعی ۸۴
۳-۱-۱- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه ۸۴
۳-۱-۲- نتایج حاصل از همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه ۱۰۲
۳-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۰۶
۳-۱-۴- نتایج حاصل از تجزیه به عامل‌ها ۱۱۰
۳-۲- نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی ۱۱۴
۳-۲-۱- نتایج حاصل از نشانگر RAPD ۱۱۴
۳-۲-۱-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد و دایس بر اساس نشانگر RAPD ۱۱۷
۳-۲-۱-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس نشانگرRAPD ۱۲۲
۳-۲-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگر RAPD ۱۲۵
۳-۲-۲- نتایج حاصل از نشانگر ISSR ۱۲۷
۳-۲-۲-۱- بررسی ماتریس تشابه دایس و جاکارد بر اساس نشانگر ISSR ۱۳۰
۳-۲-۲-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس نشانگرISSR ۱۳۵
۳-۲-۲-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگرISSR ۱۳۷
۳-۲-۳- نتایج حاصل از ترکیب دو نشانگر ISSR وRAPD ۱۳۹
۳-۲-۳-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد و دایس بر اساس ترکیب نشانگرهای ISSR وRAPD ۱۳۹
۳-۲-۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس ترکیب نشانگرهای ISSR و RAPD ۱۴۴
۳-۲-۳-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس ترکیب نشانگرهای ISSR و RAPD ۱۴۶

عنوان | صفحه

۳-۳- بررسی محتوای اطلاعاتی چند شکلی نشانگرهای ISSR و RAPD ۱۴۸
۳-۴- نتایج حاصل از تکنیک‌های نمونه‌برداری مجدد ۱۵۱
۳-۵- تقسیم بندی سلسله مراتب واریانس مولکولی ۱۵۵
۳-۵-۱- تقسیم بندی تنوع ژنتیکی ۱۵۶
۳-۵-۱-۱- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام ۱۵۶
۳-۵-۱-۲- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس پراکندگی جغرافیایی ۱۵۸
۳-۶- آزمون منتل ۱۶۰
۳-۷- نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۷۰
فهرست منابع ۱۷۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- لیست اسامی و محل جمع آوری توده‌ها و ارقام مورد مطالعه ۶۹
جدول ۲-۲- صفات ارزیابی شده طرح ۷۴
جدول ۳-۱- مقایسه میانگین صفت طول غلاف ۸۷
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین صفت قطرغلاف ۸۸
جدول ۳-۳- مقایسه میانگین صفت تعداد دانه درغلاف ۸۹
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین صفت تعداد شاخه‌های اولیه ۹۰
جدول ۳-۵- مقایسه میانگین صفت میزان کلروفیل برگ ۹۱
جدول ۳-۶- مقایسه میانگین صفت ارتفاع اولین غلاف از سطح زمین ۹۲
جدول ۳-۷- مقایسه میانگین صفت ارتفاع بوته ۹۳
جدول ۳-۸- مقایسه میانگین صفت وزن صد دانه ۹۴
جدول ۳-۹- مقایسه میانگین صفت عملکرد بوته ۹۵
جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین صفت شاخص برداشت ۹۶
جدول ۳-۱۱- مقایسه میانگین صفت درصد باروری ۹۷
جدول ۳-۱۲- مقایسه میانگین صفت تاریخ ۵۰٪ گل دهی ۹۸
جدول ۳-۱۳- مقایسه میانگین صفت تاریخ ظهور ۵۰٪ غلاف دهی ۹۹
جدول ۳-۱۴- مقایسه میانگین صفت تاریخ ۹۰٪ رسیدگی ۱۰۰
جدول ۳-۱۵- مقایسه میانگین صفت عرض کانوپی ۱۰۱
جدول ۳-۱۶- ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد بررسی ۱۰۵
جدول ۳-۱۷- میانگین صفات مورد بررسی برای کلاسترها در توده‌ها و ارقام مختلف نخود ۱۰۹
جدول ۳-۱۸- نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص به منظور گروه‌بندی توده‌ها بر اساس عملکرد دانه.. ۱۰۹
جدول ۳-۱۹- ماتریس عامل‌های چرخش یافته (چرخش واریماکس) برای صفات زراعی ۱۱۳
جدول ۳-۲۰- نتایج حاصل از بررسی ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی با استفاده از نشانگر RAPD ۱۱۵
جدول ۳-۲۱- ماتریس ضریب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر RAPD ۱۱۸
جدول ۳-۲۲- ماتریس ضریب تشابه دایس بر اساس نشانگر RAPD ۱۲۰
جدول ۳-۲۳- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگرRAPD ۱۲۷
جدول ۳-۲۴- نتایج حاصل از بررسی ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی با استفاده از نشانگر ISSR ۱۲۸
جدول ۳-۲۵- ماتریس ضریب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر ISSR ۱۳۱
جدول ۳-۲۶- ماتریس ضریب تشابه دایس بر اساس نشانگر ISSR ۱۳۳
جدول ۳-۲۷- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگر ISSR ۱۳۹

عنوان	صفحه
جدول ۳-۲۸- ماتریس ضریب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر ISSR وRAPD	۱۴۰
جدول ۳-۲۹- ماتریس ضریب تشابه دایس بر اساس نشانگر ISSR وRAPD	۱۴۲
جدول ۳-۳۰- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگر ISSR وRAPD	۱۴۸
جدول ۳-۳۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای چند شکل حاصل از نشانگر RAPD در توده‌ها و ارقام نخود زراعی	۱۴۹
جدول ۳-۳۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای چند شکل حاصل از نشانگر ISSR در توده ها و ارقام نخود زراعی	۱۵۰
جدول ۳-۳۳- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس ۳۲۱ نشانگر RAPD	۱۵۶
جدول ۳-۳۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس ۲۵۷ نشانگر ISSR	۱۵۷
جدول ۳-۳۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس لوکوس‌های چند شکل برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس نشانگر RAPD	۱۵۷
جدول ۳-۳۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس لوکوس‌های چند شکل برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس نشانگر ISSR	۱۵۸
جدول ۳-۳۷- تجزیه واریانس مولکولی برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس میانگین نشانگرهای RAPD و ISSR حاصل از مقایسه بین نمونه‌های ایرانی و ناشناخته از لحاظ پراکندگی جغرافیایی	۱۵۸
جدول ۳-۳۸- تجزیه واریانس مولکولی برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس میانگین نشانگرهای RAPD و ISSR حاصل از مقایسه بین نمونه‌های خارجی و ناشناخته از لحاظ پراکندگی جغرافیایی	۱۵۸
جدول۳-۳۹- تجزیه واریانس مولکولی برای ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی بر اساس میانگین نشانگرهای RAPD و ISSR حاصل از مقایسه بین نمونه‌های ایرانی و ناشناخته از لحاظ پراکندگی جغرافیایی	۱۶۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱- تجزیه خوشه‌ای برای توده‌های مورد بررسی بر اساس عملکرد دانه ۱۰۸

نمودا ر ۳-۲- الگوی باندی RAPD با استفاده از آغازگرهای A : C9 ، B :UBC9، C :UBC52: D, M :UBC18 سایز مارکر، C : کنترل ۱۱۶

شکل ۳-۳- دندروگرام نشانگر RAPD بر اساس ضریب جاکارد ۱۲۴

شکل ۳-۴- پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر RAPD بر اساس ضریب جاکارد ۱۲۵

شکل ۳-۵- پراکندگی افراد در اطراف سه مؤلفه ابتدایی در تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگر RAPD..... ۱۲۶

شکل ۳-۶- الگوی باندی ISSR با استفاده از آغازگرهای A :UBC811، B :UBC873، C : UBC86..... ۱۲۹

نمودار ۳-۷- دندروگرام حاصل از ISSR بر اساس ضریب جاکارد ۱۳۶

نمودار ۳-۸- پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب جاکارد ۱۳۷

شکل ۳-۹- نمودار پراکندگی افراد در اطراف سه مؤلفه ابتدایی در تجزیه به مؤلفه های متعادل بر اساس نشانگر ISSR ۱۳۸

شکل ۳-۱۰- دندروگرام حاصل از نشانگرهای ISSR وRAPD بر اساس ضریب جاکارد ۱۴۵

شکل ۳-۱۱- پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بر اساس ضریب جاکارد ۱۴۶

نمودار ۳-۱۲- پراکندگی افراد در اطراف سه مؤلفه ابتدایی در تجزیه به مؤلفه‌های متعادل براساس نشانگرهایRAPD و ISSR ۱۴۷

شکل ۳-۱۳- گروه بندی توده‌ها و ارقام نخود زراعی با استفاده از نشانگر RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد به روش بوت استراپ ۱۵۲

شکل ۳-۱۴- گروه بندی توده‌ها و ارقام نخود زراعی با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش بوت استراپ ۱۵۳

شکل ۳-۱۵- گروه‌بندی توده‌ها و ارقام نخود زراعی با استفاده ازترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش بوت استراپ ۱۵۴

شکل ۳-۱۶- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضرایب تشابه نشانگر RAPD با ISSR ۱۶۲

شکل ۳-۱۷- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر RAPD با ISSR ۱۶۲

شکل ۳-۱۸- نمایش همبستگی ماتریس های ضرایب تشابه نشانگر RAPD با داده‌های زراعی ۱۶۴

شکل ۳-۱۹- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر RAPD با داده‌های زراعی ۱۶۵

شکل ۳-۲۰- نمایش همبستگی ماتریس های ضرایب تشابه نشانگر ISSR با داده‌های زراعی ۱۶۷

شکل ۳-۲۱- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر ISSR با داده‌های زراعی ۱۶۷

شکل ۳-۲۲- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضرایب تشابه ترکیب نشانگرRAPD و ISSR با داده‌های زراعی ۱۶۹

شکل ۳-۲۳- هیستوگرام آزمون منتل ترکیب نشانگرهای RAPD وISSR با داده‌های زراعی ۱۶۹

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱- مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت، توسعهٔ مناطق مسکونی و به دنبال آن کاهش سطح زیر کشت گیاهان زراعی مشکل کمبود غذا را هر روز بغرنج تر می‌نماید. رژیم غذایی عمدهٔ مردم در اکثرکشورهای جهان را غلات و حبوبات تشکیل می‌دهد(۱۷). در اکثر کشورهایی که با کمبود مواد غذایی روبرو هستند، کمیت و کیفیت پروتئین مسئله اساسی تغذیه می‌باشد. لذا ترکیب مناسبی از پروتئین گیاهی می‌تواند سوء تغذیه و کمبود پروتئین را مرتفع سازد و قسمتی از کمبود پروتئین را می‌توان به وسیله مصرف حبوبات جبران کرد(۴۹). حبوبات، دانه‌های خشک خوراکی هستند که به تیرهٔ بقولات[1] تعلق دارند. بذور رسیده و خشک خوراکی دارای ارزش غذایی زیاد و قابلیت نگهداری خوبی هستند و یکی از مهم‌ترین منابع غذایی سرشار از پروتئین (۱۸ تا ۳۲ درصد) می‌باشند(۱۷). از طرف دیگر به دلیل قابلیت همزیستی با باکتری‌های تثبیت کنندهٔ نیتروژن مولکولی جو، در برقراری تعادل عناصر معدنی خاک در اکوسیستم‌های زراعی حائز اهمیت هستند و قرار دادن آنها در تناوب، به پایداری سیستم‌های زراعی کمک می‌کند(۱۷، ۴۲ و ۱۱۵). یکی از مهم‌ترین حبوباتی که کشت آن در ایران رواج دارد و در تغذیه مردم ایران مصرف زیادی دارد، نخود زراعی[2] می‌باشد(۵۰). از نظر سطح زیر کشت در جهان، در بین حبوبات در ردهٔ سوم قرار می‌گیرد ولی در ایران، در بین انواع حبوبات چه از نظر سطح زیر کشت و چه از نظر تولید در درجهٔ اول اهمیت قرار دارد(۸). به نظر می‌رسد میانگین عملکرد سالانه جهانی نخود زراعی (۰/۷۸ تن در هکتار)، کمتر از عملکرد بالقوه‌اش باشد(۱۴۳ و ۱۵۱) و طبق نتایج به دست آمده، میزان تولید نخود زراعی به اندازهٔ کافی پاسخگوی نیاز افزایش جمعیت بشری نیست(۱۴۳). به دلیل آسیب پذیری ژنتیکی این گیاه زراعی، تنش‌های زنده و غیر زنده باعث کاهش شدید عملکرد می‌شوند(۱۵۱). از دیگر دلایل عمدهٔ کاهش میزان تولید نخود زراعی، محدود بودن پایهٔ ژنتیکی آن و ناسازگاری با گونه‌های دیگر وحشی نخود در تلاقی‌های بین گونه‌ای می‌باشد(۱۴۳). با توجه به افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی، افزایش عملکرد در واحد سطح می‌تواند به عنوان یک راهبرد اساسی در حل این مشکل به شمار آید. انتخاب ارقام مطلوب و تعیین همبستگی بین صفات مختلف، به ویژه با عملکرد بوته و تعیین روابط علت و معلول آنها، به اصلاحگر این توانایی را می‌دهد که مناسب‌ترین و منطقی‌ترین نسبت بین اجزاء را که منتهی به عملکرد بیشتر می‌گردد، انتخاب نماید(۶۱). بنابراین تعداد زیادی از برنامه‌های

1- Fabaceae
2- *Cicer arietinum*

اصلاحی روی اصلاح پتانسیل ژنتیکی هم به منظور افزایش عملکرد و هم برای حفاظت در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده متمرکز شده اند(۱۴۳). حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی برای بقاء و حتی بهبود تولیدات محصولات زراعی ضروری بوده و نیازی اساسی در توسعهٔ پایدار وکاهش فقر در جهان محسوب می‌شود(۱۳). ذخایر توارثی (ژرم پلاسم)[1]، با داشتن تنوع طبیعی از سرمایه‌های بسیار ارزشمند هر کشور هستند و شناخت ماهیت ژنتیکی آنها، از موضوعات مهم و زیر بنایی در فعالیت‌های بهنژادی می‌باشد. آگاهی از میزان شباهت و تفاوت ژنتیکی بین ذخایر توارثی راهنمای خوبی برای بهنژادگران خصوصاً در انتخاب والدین مناسب جهت انجام تلاقی‌ها می‌باشد. ارزیابی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی همچنین می‌تواند برای شناسایی نمونه‌های تکراری و آسان نمودن مدیریت حفظ منابع ژنتیکی استفاده شود(۶۲). پیشرفت در زمینه فناوری نشانگرهای DNA بهنژادگران و محققین ژنتیک گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه‌بندی و حفاظت ذخایر ژنتیکی کمک کرده است(۱۵). از آنجایی که نخودهای موجود در ایران دارای تنوع بسیار بالایی از نظر صفات کیفی و کمی هستند و با توجه به اهمیت مطالعهٔ تنوع ژنتیکی در اصلاح گیاهان و گسترش روز افزون کشت و تولید نخود، بررسی تنوع ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۸). علی‌رغم اهمیت نخود در ایران به عنوان یکی از خاستگاه‌های این گیاه زراعی و به خصوص اهمیت آن در استان کرمانشاه، متأسفانه این گیاه تا کنون مورد کم توجهی قرار گرفته و مطالعات تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم آن، بسیار محدود بوده است. از این رو هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی نخود در ایران با استفاده از داده‌های حاصل از مطالعات زراعی و مولکولی، جهت استفاده در تحقیقات بعدی بود.

1- Germplasm

۱-۱- حبوبات

دومین منبع مهم غذایی بشر، پس از غلات، حبوبات هستند(۵۰). این گیاهان متعلق به خانوادهٔ بقولات[1] و زیر خانوادهٔ پروانه آسایان[2] می‌باشند(۵۰ و۱۵۴). گل‌های این گیاهان اغلب خودگشن بوده و استثنائاً در بعضی از جنس‌ها که دارای گلبرگ‌های نسبتاً بزرگ و رنگی هستند، به میزان زیادی دگرگشنی هم مشاهده می‌شود. بذرهای گیاهان این خانواده از نظر اندازه، شکل و رنگ با هم فرق دارند و تمامی آنها فاقد آندوسپرم هستند(۵۰). یکی از خصوصیات تقریباً منحصر به فرد در بقولات، تشکیل گره روی ریشه‌های آنها می‌باشد و باکتری‌های موجود در این گره‌ها قادرند ازت هوا را تثبیت کنند و در اختیار گیاه قرار دهند(۴۹). اندام‌های رویشی و دانه‌های حبوبات سرشار از پروتئین هستند و ۲۰ تا ۳۰ درصد وزن دانه‌های حبوبات را پروتئین تشکیل می‌دهد (۲ تا ۳ برابر غلات و ۱۰ تا ۲۰ برابر پروتئین گیاهان غده‌ای)(۵۰).

حبوبات مناطق خشک را می‌توان بر اساس نیاز حرارتی آنها طبقه‌بندی نمود: دستهٔ اول، آنهایی که هوای سرد نیاز دارند. مانند نخود فرنگی، باقلا، عدس و غیره، دستهٔ دوم، آنهایی که به آب و هوای گرم احتیاج دارند. مانند لوبیا، لوبیا چشم بلبلی و غیره و دستهٔ سوم آنهایی که از این نظر حد واسط هستند. مانند نخود معمولی(۴۹).

انواع حبوبات مهم که در ایران کشت می‌شوند، عبارتند از: لوبیا (سفید، قرمز و چیتی)، لوبیا چشم بلبلی، نخود(سیاه و سفید)، عدس، ماش و باقلا. طبق آمار موجود سطح زیر کشت کل حبوبات دردنیا ۳۷ میلیون هکتار است که بیش از نصف آن لوبیا و بقیه از انواع دیگر حبوبات تشکیل می‌شود(۶۸). سطح زیر کشت حبوبات در کشور ۹۶۵ هزار هکتار و تولید آن ۶۵۰۴۱۰ تن (فائو[3]، ۱۹۹۵) است (۱۷). اهمیت حبوبات در ایران، پس از گندم و برنج است. در ایران، حدود ۲۰۰۰۰۰ تن حبوبات در سال مصرف می‌شود که معادل ۴۰۰۰۰ تن پروتئین است. با توجه به مطالب فوق، اصلاح این گونه گیاهان زراعی و تهیهٔ واریته‌های مطلوب آنها اهمیت زیادی دارد(۶۸).

۱-۲- اهمیت نخود

نخود زراعی، سومین لگوم دانه‌ای مهم فصل سرد در جهان، بعد از لوبیای خشک و نخود فرنگی زراعی می‌باشد(۹۴). این گیاه زراعی به طور گسترده در ۳۳ کشور دنیا در آسیای جنوبی، غربی و مرکزی، شمال و شرق آفریقا، اروپای جنوبی، آمریکای شمالی و جنوبی، حوزهٔ مدیترانه و اخیراً در استرالیا کشت می‌شود(۷۲، ۷۳، ۱۴۲، ۱۴۶ و ۱۵۱). نخود به عنوان یک محصول کم هزینه در سیستم‌های زراعی مناطق گرمسیری نیمه خشک کشت شده و به خاطر قابلیت سازگاری با طیف وسیعی از شرایط محیطی و خاک از قبیل اراضی

1- Fabaceae or Leguminosae
2- Papilionoideae
3- FAO

حاشیه‌ای ، برای کشت دیگر محصولات حائز اهمیت می‌باشد(۳۷). عموماً این گیاه در بهار کشت می‌شود و از رطوبت ذخیره شده در خاک استفاده می‌کند. استفاده از نخود زراعی در تناوب با غلات، می‌تواند سیکل زندگی آفات و بیماری‌ها را بشکند و تولید آن را افزایش دهد(۱۸۰). نخود به خاطر استفاده‌های گوناگون و مصارف متنوع و همچنین توانایی آن برای رشد و نمو در نظام‌های زراعی با نهادهٔ کم و تحت شرایط نامناسب از نظر خاک و محیط‌های خشک، نسبت به سایر گیاهان زراعی به عنوان جزء مهمی از نظام‌های زراعی کشاورزی معیشتی در آمده است. همچنین به خاطر نقش آن در حاصلخیزی خاک، ضمن داشتن جایگاه ویژه‌ای در تناوب با سایر محصولات، عامل مهمی در ثبات تولید غلات در مناطق خشک و دیمزارهای کشورهای در حال توسعه می‌باشد(۵۲).

۱-۳- منشأ نخود

حدود ۱۱۰۰۰ سال پیش انسانها بسیاری از گونه های گیاهی را در خاورمیانه به خاطر تأمین احتیاجاتشان اهلی و مهارکردند. به نظر می رسد که کشاورزی با یک گروه هفت تایی از گیاهان دانه‌ای (گندم اینکورن دیپلوئید[1]، گندم امر تتراپلوئید[2]، جو، نخود زراعی، نخود فرنگی، عدس و ماش تلخ) و کتان (یک گیاه فیبری) شروع شده است، که بستهٔ گیاهان بنیانگذار[3] نامیده شدند(۱۱۸). نخود زراعی هم یکی از گیاهان لگوم دنیای قدیم است که به احتمال زیاد از نواحی جنوب شرقی ترکیه و مناطق مجاور آن در سوریه منشأ گرفته است(۱۵۳). از آنجایی که گیاه شناسان اولیه، موفق به تشخیص ارتباط دقیقی بین گونه‌های مختلف آن نشدند، منشأهای مختلفی برای این گیاه پیشنهاد شده است و بیشتر، منشأ آن را به منطقهٔ جنوب قفقاز و شمال ایران نسبت می دهند. واویلوف یک مرکز اولیه در جنوب غربی آسیا و مدیترانه و یک مرکز ثانویه ابتدایی را به عنوان مراکز منشأ نخود معرفی نمود(۱۷). واندرمیسن (۱۹۸۷)، منابع موجود در مورد تاریخچهٔ اهلی شدن و پراکنش نخود را مورد بررسی قرار داده است. قدیمی‌ترین نشانه‌ای که در مورد نخود به دست آمده، مربوط به۵۴۵۰ سال قبل از میلاد در ناحیه هاسیلر[4] در نزدیکی بوردور[5] ترکیه است. در منطقه جریکو[6] نمونه‌هایی از بذر نخود پیدا شده که مربوط به ۳۲۰۰ سال قبل از میلاد است. آخرین نمونه به ۲۰۰۰ سال قبل تعلق دارد که در هند به دست آمده بود(۱).

1- Diploid Einkorn Weath
2- Tetraploid Emmer Weath
3- Founder Crops Package
4- Haciler
5- Burdur
6- Jericho