دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

مهندسی کشاورزی- اصلاح نباتات

تنوع برخی ارقام گندم نان با استفاده از نشانگر ریزماهواره (SSR)، میزان پرولین و فروکتان تحت تنش سرمای بهاره

پژوهش و نگارش

سولماز نادی

استاد راهنمای اول

دکتر سیدرضاقلی میرفخرایی

استاد راهنمای دوم

دکتر علیرضا عباسی

خرداد 93

تقدیم به

پدرم

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی،

مادرم

سنگ صبوری که الفبای زندگی به من آموخت،

خواهر و برادرانم

که وجودشان شادی‌بخش

همسرم

که صفایش مایه آرامش من است.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز... بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی‌شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم.

اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تأمین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب " من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر آلله عزّ و جلّ" :ازپدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوارم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند؛از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر سیدرضاقلی میرفخرایی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛از استاد صبور و با تقوا ، جناب آقای دکتر علی‌رضا عباسی که زحمت مشاوره این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید و از اساتید فرزانه جناب آقایان دکتر محمدرضا نقوی و دکتر سجاد رشیدی‌منفرد که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

چکیده

تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی عامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات زراعی می‌باشند. در فصل بهار، همزمان با شروع رشد مجدد زراعت گندم، تحمل گیاه به دماهای پایین به‌تدریج کاهش پیدا می‌کند و هریک از مراحل رشد آن ممکن است با این کاهش دما مواجه گردد و صدمه ببیند. این نوع از مدل‌های تنش سرما را کاهش ناگهانی دما را در فصل بهار و یا به‌عبارت دقیق‌تر "سرمای دیررس بهاره" می‌نامند. بنابراین پرورش و دسترسی به ارقام متحمل از طریق برنامه‌های به‌نژادی ضروری می‌باشد. آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین آن‌ها، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد. در این تحقیق که بخشی از یک برنامه به‌نژادی می‌باشد، تنوع ژنتیکی 22 رقم گندم نان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش سرمای بهاره، میزان اسیدآمینه پرولین و مقدار کمی قند فروکتان، در شرایط کنترل‌شده بررسی گردید. به این منظور آزمایشی با 22 رقم گندم نان همراه با 4 تیمار سرمایی 8+ (شاهد)، 2+، 0 و$^{\circ}$C 2- در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی اجرا گردید. نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های فیزیولوژیک نشان داد که اثرمتقابل رقم در سرما در هر دو صفت در سطح 1% معنی‌دار بود. بر اساس نتایج به‌دست آمده در صفت پرولین در تنش $^{\circ}$C 2- بالاترین سطح پرولین، متعلق به رقم مغان2 و کمترین مقدار مربوط به رقم گلستان بود. همچنین در صفت فروکتان در تنش شدید، بالاترین میزان فروکتان متعلق به رقم اوحدی و کمترین مقدار مربوط به رقم دز بود که ارقام فوق در برنامه‌های به‌نژادی و تشکیل جمعیت‌های نقشه‌یابی برای شناسایی QTLهای مربوطه قابل استفاده می‌باشند. برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی از 21 جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد که 11 جفت توانستند چندشکلی مطلوبی را نشان دهند و در مجموع 19 آلل را شناسایی کردند. تعداد آلل‌های تولید شده با میانگین 1/727 آلل در هر مکان ژنی، از 1 تا 4 آلل متغیر بود. میانگین سطح اطلاعات چندشکلی برابر 0/531 و از 0/089 تا 0/98 متغیر بود. ژنوتیپ‌ها با ضریب تشابه دایس و با استفاده از روش الگوریتم متوسط در 5 گروه قرار گرفتند که حاکی از توانایی این نشانگر مولکولی در شناسایی تنوع ژنتیکی مطلوب بین ژنوتیپ‌های انتخابی بود. نتایج حاصل از رگرسیون گام‌به‌گام ارتباط معنی‌داری 2 نشانگر را به‌ترتیب با عناوین Xgwm174 و مرتبط با صفت پرولین در شرایط تنش شدید و Xgwm642 را با صفت فروکتان در شرایط شاهد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: گندم، تنش سرمای بهاره، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، پرولین، فروکتان

فهرست مطالب

فصل اول

1- مقدمه 1

1-1- اهمیت غلات ۲

1-2- تاریخچه و گیاه‌شناسی گندم ۲

1-3- اهمیت گندم ۲

1-4- اهمیت عوامل محیطی ۳

1-5- اهمیت تنوع ژنتیکی ۳

1-6- اهمیت نشانگرها ٤

1-7- اهداف تحقیق ٥

1-8- سوالات تحقیق ٥

1-9- فرضیه‌ها/ پیش فرض‌ها ٦

فصل دوم

2- بررسی منابع 8

2-1- تنش سرما ٨

2-1-1- انواع تنش سرما 9

2-1-1-1- سرمای دیررس بهاره 9

2-1-2- تأثیر تنش سرما در مرحله رشد زایشی در گندم 11

2-1-3- علایم آسیب‌های یخزدگی بهاره 13

2-1-3-1- مرحله پنجه‌زنی 13

2-1-3-2- مرحله ساقه‌رفتن 14

2-1-3-3- مرحله حبس سنبله در برگ پرچم.....15
2-1-3-4- مرحله خوشه‌دهی.....16
2-1-3-5- مرحله گل‌دهی 17
2-1-3-6- مرحله شیری‌شدن.....18
2-1-3-7- مرحله خمیری‌شدن.....19
2-2- نقش پروتئین‌ها، قندها واسمولیت‌ها در مقاومت به تنش سرما.....۱۹
2-2-1- فروکتان و ارتباط آن با تنش‌های غیرزیستی در گیاهان 22
2-2-1-1- نقش فروکتان در برابر تنش سرمایی.....23
2-2-2- پرولین و ارتباط آن با تنش‌های غیرزیستی در گیاهان.....24
2-2-2-1- تغییرات اسیدآمینه پرولین در اثر تنش‌های سرمایی 25
2-3- تنوع ژنتیکی ۲۶
2-3-1- نقش تنوع ژنتیکی در برنامه‌های به نژادی 27
2-3-2- نشانگرهای ژنتیکی و کاربرد آن‌ها در بررسی تنوع ژنتیکی 28
2-4- انواع نشانگرها ۳۰
2-4-1- نشانگرهای مورفولوژیکی.....30
2-4-2- نشانگرهای سیتوژنتیکی 30
2-4-3- نشانگرهای مولکولی.....31
2-4-3-1- نشانگرهای دارای وزن مولکولی کم.....32
2-4-3-2- نشانگرهای پروتئینی.....32
2-4-3-3- نشانگرهای DNA.....33
2-4-3-4- نشانگرهای ریزماهواره.....34
2-5- بررسی پژوهش‌های انجام‌گرفته ۳۸

2-5-1- تغییرات مقدار فروکتان و پرولین در اثر تنش سرمای بهاره 38
2-5-2- کاربرد نشانگر ریزماهواره در بررسی تنوع ژنتیکی گندم 41

فصل سوم

3- مواد و روش‌ها.....45
3-1- بخش اول: بررسی اثر تنش سرمای بهاره در مرحله زایشی گندم ٤٥
3-1-1- مواد ژنتیکی 45
3-1-2- تهیه بستر گلدان‌ها.....47
3-1-3- ضدعفونی و کاشت بذور 47
3-2- اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک ٤٨
3-2-1- سنجش پرولین.....48
3-2-1-1- مواد مورد نیاز.....48
3-2-1-2- روش استخراج پرولین.....49
3-2-2- سنجش فروکتان 50
3-2-2-1- تهیه بافر سدیم‌فسفات 50 mM 50
3-3- بخش دوم: بررسی تنوع ژنتیکی از طریق نشانگر ریزماهواره.....٥١
3-3-1- استخراج DNA ژنومی از ارقام گندم 51
3-3-1-1- روش استخراج.....52
3-3-2- تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراج‌شده 53
3-3-2-1- روش اسپکتروفتومتری 53
3-3-2-2- روش الکتروفورز ژل‌آگارز.....53
3-3-3- تکثیر ژنوم ارقام گندم با انجام واکنش‌های زنجیره‌ای‌پلیمراز (PCR).....54
3-3-3-1- انتخاب نشانگرهای ریزماهواره‌ی گندم.....54

3-3-3-2- تکثیر نوارها به کمک PCR 56
3-3-3-3- الکتروفورز محصولات PCR 57
3-4- روش‌های آماری ۵۸
3-4-1- نرم افزارها و روش‌های مورد استفاده برای تجزیه وتحلیل داده‌های فیزیولوژیک 58
3-4-2- نرم افزارها و روش‌های مورد استفاده برای تجزیه وتحلیل داده‌های مولکولی 59
فصل چهارم
4- تجزیه و تحلیل‌های صفات فیزیولوژیک و مولکولی..... 61
4-1- تجزیه و تحلیل‌های صفات فیزیولوژیک ٦١
4-1-1- بررسی اثر تنش سرمای بهاره بر میزان پرولین 61
4-1-2- بررسی اثر تنش سرمای بهاره بر میزان فروکتان 73
4-2- تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی ارقام گندم بر اساس نشانگرهای مولکولی ریزماهواره ٨٤
4-2-1- ارزیابی آغازگرهای ریزماهواره بر اساس چندشکلی 84
4-2-2- تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد مطالعه 90
4-2-3- تجزیه به مختصات اصلی 92
4-2-4- تعیین فاصله ژنتیکی بین افراد 94
4-2-5- تجزیه ارتباطی صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای ریزماهواره 97
4-3- نتیجه‌گیری ٩٩
4-4- پیشنهادها ١٠٠
5- منابع 102

فهرست جداول

جدول 2-1- دماها، علائم و اثرات یخ‌زدگی بهاره بر عملکرد گندم 12
جدول 3-1- مشخصات ارقام گندم نان مورد مطالعه 46
جدول 3-2- ترکیبات کیت استخراج DNA 51
جدول 3-3- مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TBE 50X - 54
جدول 3-4- مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده 55
جدول 3-5- اجزا واکنش PCR 57
جدول 4-1- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) پرولین 61
جدول 4-2- نتایج مقایسه میانگین‌های ارقام × سطوح تنش دمایی در پرولین 63
جدول 4-3- روند تغییرات مقادیر پرولین در 22 ژنوتیپ در 4 سطح دمایی 66
جدول 4-4- ارقام دارای بیشترین و کمترین میزان پرولین در سطوح دمایی چهارگانه 67
جدول 4-5- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فروکتان 73
جدول 4-6- نتایج مقایسه میانگین‌های ارقام × سطوح تنش دمایی در فروکتان 75
جدول 4-7- روند تغییرات مقادیر فروکتان در 22 ژنوتیپ در 4 سطح دمایی 77
جدول 4-8- ارقام دارای بیشترین و کمترین میزان فروکتان در سطوح دمایی چهارگانه 78
جدول 4-9- اطلاعات مربوط به چندشکلی آللی 86
جدول 4-10- تجزیه به مختصات اصلی مربوط به نشانگرهای ریزماهواره 93
جدول 4-11- فاصله ژنتیکی 22 رقم گندم نان به‌دست آمده از نشانگرهای SSR بر اساس ماتریس دایس 96
جدول 4-12- تعداد نشانگرهای آگاهی‌بخش پیوسته با صفات فیزیولوژیک 98

فهرست شکل‌ها

شکل 2-1- زرد و سفیدشدگی قسمت داخلی برگ‌ها و چروکیدگی گیاهچه‌ها در اثر آسیب‌های شدید یخ‌زدگی 13
شکل 2-2- یک نقطه مرسیتمی سالم به‌صورت متورم و به رنگ سبز روشن و از دست‌دادن تورم و رنگ‌پریدگی یک نقطه مریستمی صدمه‌دیده چند روز بعد از یخ‌زدگی 14
شکل 2-3- گرفتار شدن سنبله‌های پیچ‌خورده در داخل غلاف‌ها و شکافته شدن اطراف سنبله‌ها، آسیب‌دیدن سنبله‌ها در مرحله حبس سنبله، آسیب قسمت بالای سنبله بعد از یخ‌زدگی 15
شکل 2-4- زردی و پر آب شدن گلوم‌ها و قهوه‌ای ارغوانی شدن محور سنبلچه از علائم آسیب‌های یخ‌زدگی بهاره، پیچ‌خوردگی و سفیدشدگی ریشک‌های سنبله در اثر آسیب‌های کم یخ‌زدگی بهاره 16
شکل 2-5- آسیب به قسمت‌های مختلف سنبله در اثر سرمای دیررس بهاره 17
شکل 2-6- توقف سریع رشد دانه‌ها بعد از یخ‌زدگی و خاکستری و چروکیده شدن آن‌ها 18
شکل 4-1-روند تغییرات 22 رقم گندم نان در صفت پرولین بر اساس جدول مقایسه میانگین 69
شکل 4-2- نمودار حاصل از عملکرد نسبی مقدار اسیدآمینه پرولین با استفاده از نرم افزار GGE BIPLOT 72
شکل 4-3- نمودار رتبه‌بندی 22 رقم گندم نان برای صفت پرولین با استفاده از نرم‌افزار 72
شکل 4-4- روند تغییرات 22 رقم گندم نان در صفت فروکتان بر اساس جدول مقایسه میانگین 80
شکل 4-5- نمودار حاصل از عملکرد نسبی مقدارکمی قند فروکتان با استفاده از نرم افزار GGE BIPLOT 82
شکل 4-6- نمودار رتبه‌بندی 22 رقم گندم نان برای مقدار کمی قند فروکتان با استفاده از نرم‌افزار 82
شکل 4-7- محصول PCR ژل متافور 3% در 22 رقم گندم نان: وجود چندشکلی در آغازگر XGWM261 84
شکل 4-8- دندروگرام ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس الگوهای نواری 92
شکل 4-9- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ضریب تشابه دایس 94

فصل اول

مقدمه

1- مقدمه و اهمیت اجرای تحقیق

1-1- اهمیت غلات

غلات در تعریف کلی شامل گیاهان یک‌ساله از خانواده گندمیان می‌باشند. غلات به‌عنوان ارزان‌ترین منبع انرژی برای انسان و همچنین به‌دلیل دارا بودن قابلیت نگه‌داری بلندمدت و نیز ارزش غذایی بالا، یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین منابع تغذیه در جهان به‌شمار می‌روند که دامنه سازگاری وسیعی را برای کشت در تمام نقاط جهان دارند (خدابنده، 1384).

1-2- تاریخچه و گیاه‌شناسی گندم

گندم بعد از جو یکی از قدیمی‌ترین گیاهانی است که به‌دست انسان کشت شده است. گمان می‌رود مبدأ گندم جنوب‌غربی آسیا باشد. گندم به شاخه گیاهان گلدار[1]، زیرشاخه نهاندانگان[2]، رده گیاهان تک‌لپه[3]، راسته گلومی‌فلورا[4]، تیره گرامینه[5] و جنس تریتیکوم[6] تعلق دارد. این نبات زراعی گیاهی است یک‌ساله، با ساقه نازک بندبند و توخالی، دارای برگ‌های بدون دمبرگ و با رگبرگ‌های موازی و نیام‌دار که ساقه را در محل گره می‌پوشاند. گندم از لحاظ ژنتیکی دارای گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید بوده که به‌ترتیب دارای 14، 28 و 42 کروموزومی می‌باشند (بهنیا، 1373).

1-3- اهمیت گندم

جمعیت جهان به‌طور روز افزون در حال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود در پایان سال 2050 میلادی به حدود 10 میلیارد نفر برسد (Anonymous, 2007). از طرفی تولید محصولات کشاورزی با انواع مختلف تنش‌های محیطی مواجه است. بنابراین، مهم‌ترین هدف کلیه دولت‌ها در رابطه با تولید مواد غذایی برای مردم به حداقل رساندن خسارات ناشی از این تنش‌ها است (Mahajan and Tutejan, 2005). از محصولاتی که در این ارتباط اهمیت به‌سزایی برخودار است، گندم می‌باشد.

[1] Spermatophyta
[2] Angiosperm
[3] Monocotyledon
[4] Glumiflora
[5] Poaceae
[6] Triticum

گندم به‌عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی و منبع غذایی مردم جهان به‌شمار می‌رود که حدود 20% کالری و حدود 22% پروتئین مورد نیاز انسان را تأمین می‌کند (خدابنده، 1384). فائو از افزایش تولید گندم ایران به 14 میلیون تن در سال 2013 خبر داد و ایران دوازدهمین تولیدکننده بزرگ جهان در این سال معرفی کرد (Anonymous, 2013).

1-4- اهمیت عوامل محیطی

عوامل محیطی، عوامل مهم در رشد و بقا هستند و نقش مهمی درتوزیع و پراکنش اکولوژیک موجودات دارند. در این بین سرما، شوری وخشکی از جمله عوامل نامساعد محیطی هستند که سبب آسیب‌های جبران‌ناپذیری بر رشد و تولید گیاهان می‌شوند. تاثیر عوامل تنش‌زا برگیاه، معمولا فراگیر نبوده، بلکه بخش خاصی از موجود را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. به‌طور کلی، تنش‌ها شامل تنش‌های زیستی مانند پاتوژن‌ها و یا رقابت با سایر موجودات زنده و همچنین تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، تابش شدید نور، دمای بالا، سرما و غیره می‌باشند. تنش باعث تغییراتی درعملکرد فیزیولوژیک گیاهان، ازجمله گیاهانی که به لحاظ اقتصادی حائز اهمیت هستند، مانند غلات، می‌شود. پتانسیل برخی از ارقام گندم برای عملکرد بسیار بیشتر از تولید فعلی آن‌ها می‌باشد، ولی آنچه را که این ارقام فاقد هستند، سازگاری و تحمل مطلوب آن‌ها در مقابله با تنش‌های زنده و غیرزنده است. در این شرایط عملکرد ارقام مذکور در برخورد با تنش‌های محیطی شدیدا کاهش می‌یابد (عزیزی و همکاران، 1387).

1-5- اهمیت تنوع ژنتیکی

شناخت سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی از اهمیت بسیار زیادی در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار است. اصلاح‌نباتات بر پایه تنوع ژنتیکی که خود از تکامل طبیعی منشاء گرفته استوار است. تنوع ژنتیکی مهم‌ترین جزء در پایداری نظام بیولوژیک است و سازگاری درازمدت و بقای جمعیت را تضمین می‌کند. حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی برای بقاء و بهبود تولیدات گیاهی ضروری می‌باشد و به‌عنوان نیاز اساسی در توسعه پایدار محسوب می‌شود. در بررسی تنوع ژنتیکی از توده‌های بومی استفاده زیادی می‌شود. توده‌های بومی حاوی ژن‌های مفید مانند مقاومت به تنش‌های محیطی و

مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها هستند (Ohm and Machenzie, 1992). یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی نامطلوب است، زیرا اولا گیاهانی تولید می‌شوند که نسبت به اپیدمی‌ها و متغیرهای محیطی آسیب‌پذیرند و این موضوع باعث کاهش عملکرد می‌شود، ثانیا خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی که دارای منابع ژنی مفید هستند، از دست می‌روند (مجیرشیبانی و همکاران، 1392). موفقیت اصلاح‌گران در گرو انتخاب مواد مناسب و وجود تنوع ژنتیکی بوده است (عثمانی و سی‌وسه‌مرده، 1388). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازمان‌دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد (مجیرشیبانی و همکاران، 1392). گندم به‌عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی در جهان و ایران دارای ژنوتیپ‌های زیادی است که در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین لازمه استفاده کارآ و صحیح از آن‌ها، شناسایی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و تعیین سطح تنوع موجود می‌باشد. علاوه‌براین، در سال‌های اخیر تأکید روی تولید ارقام هیبرید در گندم از طریق شناسایی والدین مناسب جهت بهره‌برداری از پدیده هتروزیس، اهمیت این مسئله را بیشتر می‌کند (Zhang *et al.*, 2002).

1-6- اهمیت نشانگرها

در گیاهان مختلف نشانگرهای مورفولوژیکی، نشانگرهای بیوشیمیایی شامل آیزوزایم‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای و نشانگرهای مولکولی، توالی‌های نوکلئوتیدی، برای بررسی تنوع و تعیین روابط ژنتیکی افراد استفاده شده‌اند. ولی به‌دلیل تأثیر عوامل محیطی و یا وابستگی به مراحل رشدی و نیز محدویت تعدادی از نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزارهای کارآتری برای تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Zhang *et al.*, 2005). در حال حاضر نشانگرهای مولکولی این امکان را فراهم می‌سازند که بررسی تنوع ژنتیکی مستقیما در سطح DNA انجام گیرد، بنابراین می‌توانند به‌عنوان ابزاری تکمیلی برای تأیید یا عدم تأیید فرضیه وجود تنوع ژنتیکی در میان ارقام گندم مورد استفاده قرار گیرند. یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره (SSR[1]) هستند. توزیع مناسب در سطح

[1]Simple Sequence Repeats; SSR

ژنوم، سهولت استفاده، طبیعت چندآللی و هم‌بارزبودن از مزایای این نشانگرهاست (کرمی و همکاران، 1390). نشانگرهای ریزماهواره عموما سطوح بالاتری از چندشکلی را نشان می‌دهند و با توجه به فراوانی تعداد آلل در لوکوس‌ها حتی قادر به تمایز بین رگه‌های بسیار مشابه نیز هستند. نشانگرهای SSR در مطالعات جمعیت، بررسی روابط خویشاوندی و مطالعات مربوط به حذف یا اضافه‌شدن ژن‌ها استفاده می‌شوند. وجود تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی مواد گیاهی از نظر انتخاب ترکیب والدینی مناسب برای تولید جمعیت‌های مطلوب، طراحی برنامه‌های اصلاحی مؤثر، پاسخ به گزینش طولانی‌مدت و کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشند (Nachit *et al.*, 2001).

1-7- اهداف تحقیق

- بررسی تنوع ژنتیکی در بین ارقام گندم مورد بررسی با استفاده از 11 جفت نشانگر ریزماهواره
- بررسی تنوع ژنتیکی در بین ارقام گندم از طریق اندازه‌گیری دو صفت فیزیولوژیک پرولین و فروکتان
- بررسی همبستگی داده‌های مولکولی و فیزیولوژیکی تحت سرمای دیررس بهاره

1-8- سوالات تحقیق

- آیا صفات فیزیولوژیک میزان پرولین و فروکتان برای بررسی تنوع ژنتیکی در بین ارقام گندم کارائی لازم را دارند؟
- آیا همبستگی مطلوبی بین داده‌های مولکولی و مقادیر بیوشیمیایی پرولین و فروکتان در بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام گندم در این تحقیق دیده می‌شود؟

1-9- فرضیه‌ها/ پیش فرض‌ها

- تنوع ژنتیکی در ارقام گندم مورد بررسی از نظر دو صفت فیزیولوژیک پرولین و فروکتان و نشانگرهای ریزماهواره وجود دارد.

- بین داده‌های مولکولی و فیزیولوژیکی پرولین و فروکتان در ارقام گندم مورد بررسی همبستگی وجود دارد.

فصل دوم

بررسی منابع

2- بررسی منابع

2-1- تنش سرما

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی هستند که این تنش‌ها اثرات نامطلوبی بر رشد ، بقاء ، کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی دارند. احتمالا تنش سرما، معمول‌ترین و رایج‌ترین تنش محیطی دوران جوانه‌زنی گیاه محسوب می‌شود. دمای پایین نه تنها باعث کاهش جوانه‌زنی، بلکه به دنبال آن باعث کاهش میزان رشد گیاهچه‌ها و میزان تجمع ماده خشک در آن‌ها می‌گردد (بیرانوند و همکاران، 1384). دو نوع درجه حرارت پایین شناخته شده است:

الف: تنش سرمایی[1] که در دمای حدود°C 10- 0 اتفاق می‌افتد.

ب: تنش یخبندان[2] که معمولا در دماهای زیر صفر اتفاق می‌افتد.

بسته به طول مدت و شدت استرس، تنش دماهای پایین می‌تواند آسیب‌های زیادی به گیاهان وارد کند. تنش سرما یک فاکتور عمده محیطی می‌باشد که گسترش زراعی گیاه را محدود می‌کند. دمای پایین تأثیر بزرگی بر روی زنده‌مانی و گسترش جغرافیایی گیاه دارد. گیاهان در تحمل به سرما (°C 15- 0) و یخزدگی (°C 8 >) متفاوت می‌باشند. مقاومت یا حساسیت به این تنش‌ها بستگی به گونه، ژنوتیپ و مرحله رشدی گیاه دارد. به فرم‌های شدید تنش سرمایی، تنش انجماد گفته می‌شود که باعث تشکیل یخ در سلول‌ها شده و در نهایت منجر به دهیدراسیون و مرگ سلولی می‌گردد (Miura and Tada, 2014). تنش سرما در فرم‌های سرمازدگی، انجماد و افت ناگهانی دما عموم کشت‌ها از جمله زراعت‌های گندم را در اراضی واقع در اقلیم‌های مربوط تهدید می‌کند، به‌طوری که متوسط خسارت این تنش در سال‌های 89- 1384 در حدود 3% تولید سالیانه را به خود اختصاص داده است. بر این اساس تلاش برای دسترسی به ارقام متحمل به سرما توأم با افزایش و پایداری عملکرد در واحد سطح ضروری است. همچنین نیاز به دیگر اراضی واقع در اقلیم‌های سرد و فراسرد

[1] Chilling stress
[2] Freezing stress

که تاکنون بایر مانده‌اند، اهمیت این بخش از پژوهش‌های به‌نژادی را برجسته‌تر می‌سازد (میرفخرایی و همکاران، 1389). به‌عبارت دقیق‌تر تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه تنش سرما و یخزدگی یکی از عوامل عمده محدودکننده تولید محصولات گیاهی در سطح کل دنیا می‌باشد و تحت‌تأثیر این تنش، محصول غلات به حد بیشینه خود نمی‌رسد (سی‌وسه‌مرده و همکاران، 1388).

محققانی مانند، Gusta و همکاران (1997)، Storlie و همکاران (1998)، Fowler و Limin (1993)، اهمیت تنش یخزدگی را درمحدودیت رشد غلات پاییزه خاطر نشان کرده اند. درکشور ایران نیز محصول هزاران هکتار از اراضی زیر کشت گندم و جو بر اثر خسارات یخزدگی و سرمای دیررس بهاره در مناطق سرد و حتی سرد معتدل از بین می‌روند که نشان‌دهنده نقش مهم انواع این تنش در زراعت غلات و سایر گیاهان می‌باشد (سی‌وسه‌مرده و همکاران، 1388).

2-1-1- انواع تنش سرما

دما یکی از عوامل مهم محیطی در رشد، گسترش و پراکنش گیاهان می باشد (Masoumi *et al.*, 2013). خطرات دمایی معمولا مربوط به مراحل دوره رشد زراعت هنگام مواجهه، شدت و طول مدت تنش است. تنش سرما در اشکال سرمازدگی[1]، انجماد[2] و سرمای دیررس بهاره[3]، زراعت گندم را در اراضی واقع در اقلیم‌های سرد و فراسرد با آسیب‌های جدی مواجه می‌سازد (Mirfakhraei *et al.*, 2010).

2-1-1-1- سرمای دیررس بهاره

کاهش شدید دما پس از عبور از سرمای یخبندان زمستانه، در مراحل حساس رشدی اغلب موجب بروز خسارات سنگین می‌شود. گرم شدن هوا در واقع خطر سرمازدگی و یخبندان بهاره را در گیاهان افزایش می‌دهد. فرضیه اساسی این است که در زمستان‌های معتدل و گرم و همراه با افزایش دما، بهار زودرس اتفاق می‌افتد و باعث القاء رشد سریع در گیاهان گردیده و بافت‌های گیاهی

[1] Frost
[2] Freezing
[3] Chilling