به نام حق

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Aegilops triuncialis* L. با استفاده از نشانگرهای ISSR و بین رتروترانسپوزونی

از
طاهره فتحی

استادان راهنما:
دکتر محمدمهدی سوهانی
دکتر حبیب الله سمیع‌زاده لاهیجی

استاد مشاور:
دکتر علی‌اشرف مهرابی

اسفند ۱۳۹۱

سپاسگزاری

بر خود بایسته می‌دانم تا از همه عزیزانی که مرا در انجام این پژوهش یاریگر بودند، قدردانی نمایم. از اساتید راهنما جناب آقایان دکتر محمدمهدی سوهانی و دکتر حبیب‌الله سمیع زاده که نهایت حمایت و راه‌گشایی را در این کار داشتند سپاسگزاری می‌کنم و سعادت و سربلندی را برای این عزیزان از صمیم دل آرزومندم. از استاد مشاور جناب آقای دکتر علی‌اشرف مهرابی که در تمامی مراحل کار از عنایت و رهنمودهایشان برخوردار بودم و بدون حتم اتمام این مهم بدون همکاری و همیاری ایشان امکان‌پذیر نبود نیز کمال امتنان بعمل می‌آید. از دکتر حسن حسنی که در طی دوران تحصیل مقطع کارشناسی ارشد از دانش این عزیز بزرگوار بهره‌مند شدم، سپاسگزارم. از اساتید محترم جناب آقای دکتر علی اعلمی و خانم دکتر عاطفه صبوری که بازخوانی و داوری این پایان نامه را برعهده گرفتند سپاسگزاری می‌کنم. از جناب آقای مهندس محمد محسن‌زاده‌گلفزانی که از هیچ کمکی دریغ نداشتند سپاسگزارم. از خانواده عزیزم که در پیمودن مسیر زندگی، همواره مهرشان توشه راه و بزرگترین حامی زندگی من بوده است، بی نهایت سپاسگزارم.

و در پایان از تمامی دوستانی که بودن در کنارشان بر وسعت اندیشه و آگاهی‌ام افزود، سپاسگزارم.

طاهره فتحی

اسفندماه ۱۳۹۱ خورشیدی

فهرست عناوین

فهرست مطالب ..... پ
فصل اول- کلیات و مرور منابع ..... پ
فصل دوم- مواد و روش‌ها ..... پ
فصل سوم- نتایج و بحث ..... ث
فهرست جدول‌ها ..... ج
فهرست شکل‌ها ..... چ

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... ح
چکیده انگلیسی ..... خ
مقدمه ۲

فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱- ذخایر ژنتیکی یا ژرم‌پلاسم گیاهی ۶
۱-۲- تنوع ژنتیکی و ضرورت شناخت آن ۷
۱-۳- استفاده از گونه‌های وحشی در اصلاح گیاهان زراعی ۷
۱-۴- تاکسونومی، تاریخچه و ساختار ژنومی گندم ۸
۱-۵- گونه‌های آژیلوپس ۹
۱-۶- گونه گیاهی *Aegilops triuncialis* L. ۱۱
۱-۷- تعریف و تقسیم‌بندی کلی نشانگرها ژنتیکی ۱۲
۱-۸- کاربرد نشانگرهای DNA ۱۴
۱-۹- ویژگی‌های نشانگر برتر ۱۵
۱-۱۰- ردیف‌های تکراری ساده (Simple Sequence Reapeat) یا ریزماهواره‌ها ۱۵
۱-۱۱- نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ۱۶
۱-۱۲- رتروترانسپوزون‌ها (Retrotransposones) ۱۸
۱-۱۳- نشانگر IRAP(Inter-retrotransposon amplification polymorphism) ۲۰
۱-۱۴- مروری بر مطالعات انجام شده ۲۱

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری مواد گیاهی ۲۷
۲-۲- کاشت بذرهای جمع‌آوری شده ۲۸
۲-۳- نمونه‌برداری از برگ ۲۸
۲-۴- استخراج DNA ژنومی ۲۹
۲-۴-۱- مراحل استخراج DNA ۲۹

۲-۴-۲- طرز تهیه مواد لازم جهت استخراج DNA ۳۱
۲-۴-۲-۱ بافر استخراج CTAB ۳۱
۲-۴-۲-۲- محلول کلروفرم/ ایزوآمیل الکل ۳۱
۲-۴-۲-۳- بافر TE ۳۲
۲-۴-۲-۴- محلول استات آمونیوم/ الکل ۳۲
۲-۴-۲-۴-۱- تهیه محلول استات آمونیوم ۳۲
۲-۴-۲-۴-۲- تهیه محلول استات آمونیوم/ الکل ۳۲
۲-۵- تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ۳۳
۲-۶- تعیین غلظت و رقیق سازی DNA ژنومی استخراج شده ۳۳
۲-۷- بالک DNA ژنومی ۳۴
۲-۸- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ۳۴
۲-۸-۱- مواد مورد نیاز با حجم و غلظت مربوطه جهت انجام واکنش PCR ۳۴
۲-۸-۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ۳۵
۲-۸-۳- مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ۳۵
۲-۸-۴- برنامه واکنش PCR ۳۶
۲-۹- آشکارسازی DNA تکثیرشده ۳۶
۲-۱۰- الکتروفورز ۳۷
۲-۱۰-۱- تهیه ژل آگارز ۱٪ و ۱.۵٪ ۳۷
۲-۱۰-۲- بارگذاری و الکتروفورز نمونه‌ها ۳۷
۲-۱۰-۳- بافرها و محلول‌های مورد نیاز ۳۸
۲-۱۰-۳- ۱- بافر بارگیری با نام تجاری دای ۳۸
۲-۱۰-۳- ۲- محلول اتیدیوم بروماید ۳۸
۲-۱۰-۳-۳- بافرTBE ۳۸
۲-۱۱- تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری داده‌های مولکولی ۳۹
۲-۱۱-۱- امتیازدهی باندها ۳۹
۲-۱۱-۲- تفکیک توده‌های مورد مطالعه ۳۹
۲-۱۱-۳- برآورد تشابه و فاصله ژنتیکی ۴۰
۲-۱۱-۳-۱- برآورد ماتریس فاصله ژنتیکی بین توده‌ها ۴۰
۲-۱۱-۳-۲- برآورد تشابه و فاصله ژنتیکی بین گروه‌ها ۴۰
۲-۱۱-۴- روش‌های گروه بندی و کاهش داده‌ها ۴۱
۲-۱۱-۴-۱- تجزیه خوشه‌ای ۴۱
۲-۱۱-۴-۱-۱- مراحل انجام تجزیه خوشه‌ای ۴۲
۲-۱۱-۴-۱-۲- انتخاب ماتریس فاصله و الگوریتم مناسب (محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک) ۴۲
۲-۱۱-۴-۱-۳- صحت گروه‌بندی حاصل از تجریه خوشه‌ای (تجزیه تابع تشخیص) ۴۳
۲-۱۱-۴-۲- تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) ۴۳
۲-۱۱-۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۴۳
۲-۱۱-۶- معیارهای تنوع ۴۴
۲-۱۱-۶-۱- محاسبه درصد جایگاه‌های چندشکل در هر آغازگر ۴۴
۲-۱۱-۶-۲- محتوای اطلاعات چندشکل ۴۴
۲-۱۱-۶-۳- شاخص نشانگری ۴۴

۲-۱۱-۶-۴- پارامترهای ژنتیک جمعیت ۴۵

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج استخراج DNA ژنومی ۴۷
۳-۲- نتایج حاصل از PCR ۴۸
۳-۳- تعداد نوار مشاهده شده و درصد چندشکلی آغازگرهای ISSR و IRAP ۴۹
۳-۴- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگری ۵۱
۳-۵- شاخص‌های ارزیابی تنوع ژنی برای توده‌های تفکیک شده در شش گروه ۵۳
۳-۶- فاصله ژنتیکی ۵۴
۳-۶-۱- فاصله ژنتیکی بین توده‌ها با استفاده از پنج آغازگر IRAP، ۱۱ آغازگر ISSR و تلفیق آلل‌های این دو نشانگر ۵۴
۳-۶-۲- فاصله ژنتیکی بین توده‌ها تفکیک شده بر اساس فاصله جغرافیایی با استفاده از ۱۶ آغازگر ISSR و IRAP..... ۵۴
۳-۷- تجزیه خوشه‌ای ۵۵
۳-۷-۱- تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR ۵۶
۳-۷-۲- تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP ۵۷
۳-۷-۳- تجزیه خوشه‌ای بر اساس آلل‌های تلفیقی نشانگر ISSR و IRAP ۵۷
۳-۸- تجزیه تابع تشخیص ۵۹
۳-۹- تجزیه به مختصات اصلی ۶۱
۳-۱۰- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای توده‌های تفکیک شده به شش ناحیه مختلف با استفاده از نشانگر ISSR و IRAP و تلفیق آلل‌های دو نشانگر ۶۲
۳-۱۰-۱- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نشانگر ISSR ۶۲
۳-۱۰-۲- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نشانگر IRAP ۶۳
۳-۱۰-۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از مجموع آلل‌های دو نشانگر ISSR و IRAP ۶۴
۳-۱۱- تجزیه به مختصات اصلی برای توده‌های تفکیک شده به شش ناحیه مختلف با استفاده از ۱۶ آغازگر ISSR وIRAP . ۶۵
۳-۱۲- نتیجه گیری کلی ۶۶
پیشنهادها ۶۸
منابع ۷۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به بیماری، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم ۱۰
جدول ۱-۲- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به آفات، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم ۱۰
جدول ۱-۳- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به تنش‌های غیر زنده، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم..... ۱۰
جدول ۲-۱- محل جمع‌آوری *توده‌های Ae. triuncialis* مورد مطالعه ۲۷
جدول ۲-۲- اجزاء تشکیل‌دهنده بافر استخراج DNA..... ۳۱
جدول ۲-۳- محلول کلروفرم/ ایزوآمیل الکل ۳۲
جدول ۲-۴- بافر TE..... ۳۲
جدول ۲-۵- محلول استات آمونیوم/ الکل ۳۲
جدول ۲-۶- مواد مورد نیاز با حجم و غلظت مربوطه جهت انجام واکنش PCR..... ۳۴
جدول ۲-۷- مشخصات آغازگرهای ISSR و IRAP مورد استفاده در این مطالعه ۳۵
جدول ۲-۸- برنامه حرارتی برای انجام واکنش PCR..... ۳۶
جدول ۲-۹- اجزای تشکیل دهنده بافر بارگذاری 6X ۳۸
جدول ۲-۱۰- مقادیر مواد تشکیل دهنده نیم لیتر بافر TBE ۱۰X ۳۹
جدول ۲-۱۱- گروه‌ها و توده‌های مربوط به آنها ۳۹
جدول ۳-۱- غلظت DNA ژنومی، OD260، OD 260/280 برخی افراد از توده‌های *Ae.triuncialis*..... ۴۸
جدول ۳-۲- آغازگرهای مورد استفاده، درصد چندشکلی، تعداد نوار و تعداد نوار چندشکلی آن‌ها ۵۱
جدول ۳-۳- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه موثر(EMR)، شاخص نشانگری(MI)، برای نشانگرهای ISSR و IRAP ۵۲
جدول ۳-۴- درصد چندشکلی، تنوع ژنی نی و شاخص شانون برای توده‌های قرار گرفته در شش گروه..... ۵۳
جدول ۳-۵- تشابه و فاصله ژنتیکی بین شش گروه حاصل از تفکیک توده‌ها بر اساس فاصله جغرافیایی مکان جمع‌آوری..... ۵۵
جدول۳-۶- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه-ای برای آلل‌های تلفیقی نشانگرهای ISSR و IRAP..... ۶۰
جدول۳-۷- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با استفاده از تابع تشخیص..... ۶۰
جدول۳-۸- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۰ مولفه اول ۶۲
جدول۳-۹- تجزیه واریانس مولکولی برای توده‌های تفکیک شده به شش ناحیه مختلف با استفاده نشانگر ISSR ... ۶۲
جدول۳-۱۰- تجزیه واریانس مولکولی برای توده‌های تفکیک شده به شش ناحیه مختلف با استفاده از نشانگر IRAP۶۳
جدول۳-۱۱- تجزیه واریانس مولکولی برای توده‌های تفکیک شده به شش ناحیه مختلف با استفاده از ۱۶ آغازگر ISSR و IRAP ۶۴
جدول۳-۱۲- خصوصیات مولفه حاصل از تجزیه به مختصات اصلی برای شش ناحیه مختلف در مناطق شمال‌غرب، غرب و جنوب‌غرب کشور با استفاده از آغازگرهای ISSR و IRAP..... ۶۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲- تصاویری از گونه گیاهی *Aegilops triuncialis*.L که به صورت علف هرز می‌روید ۱۱
شکل ۱-۱- دامنه توزیع *Ae. triuncialis* و والدین آن [Nakai, 1981] ۱۲
شکل ۱-۳- انواع مختلف آغازگرهای تعریف شده براساس نواحی SSR ۱۷
شکل ۱-۴- چرخه زندگی رتروترنسپوزون‌های LTR در ژنوم ۲۰
شکل ۱-۵- حالات مختلف قرارگیری دو رتروترانسپوزون نسبت به همدیگر ۲۱
شکل ۲-۱- پراکنش توده‌های *Ae. triuncialis* جمع‌آوری شده از مناطق شمال‌غرب، غرب و جنوب‌غرب ایران ۲۸
شکل ۲-۲- نمونه‌برداری از برگ‌های تازه گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای حاصل از کشت بذور ژنوتیپ‌های مختلف ۲۹
شکل ۲-۳- Tissue Ruptor ۳۰
شکل ۲-۴- انواع آلودگی در استخراج DNA ۳۳
شکل ۳-۱- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از گونه گیاهی *Ae. triuncialis* ۴۷
شکل ۳-۲- الگوی نواری حاصل از تکثیر تعدادی توده‌های *Ae. triuncialis* با استفاده از آغازگر UBC817 ..... ۴۹
شکل ۳-۳- الگوی نواری حاصل از تکثیر تعدادی از توده‌های *Ae. triuncialis* با استفاده از آغازگر TRT-10 ..... ۴۹
شکل ۳-۴- دندروگرام ترسیم شده براساس الگوریتم NJ و ماتریس فاصله سوکال و اسنیث برای ۱۱ آغازگر ISSR در توده-های مورد مطالعه ۵۶
شکل ۳-۵- دندروگرام ترسیم شده براساس الگوریتم NJ و ماتریس فاصله سوکال و اسنیث برای پنج آغازگر IRAP درتوده‌های مورد مطالعه ۵۷
شکل ۳-۶- دندروگرام ترسیم شده براساس الگوریتم NJ و ماتریس فاصله سوکال و اسنیث ، به همراه پروفایل ژنومی ۱۶ آغازگر IRAP ISSR برای توده‌های مورد مطالعه ۵۸
شکل ۳-۷-گروه‌بندی ارقام بر اساس تابع تشخیص ۶۱
شکل ۳-۸- الگوی تنوع توده‌های مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه اصلی ۶۲
شکل ۳-۹- توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌ها با استفاده از نشانگر ISSR ۶۳
شکل ۳-۱۰- توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌ها با استفاده از نشانگر IRAP ۶۳
شکل ۳-۱۱- توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌ها با استفاده از نشانگر ISSR و IRAP ۶۴
شکل ۳-۱۲- نمودار دوبعدی مختصات اصلی شش ناحیه مختلف در مناطق شمال‌غرب، غرب و جنوب‌غرب کشور بر اساس آلل‌های تلفیقی نشانگرهای ISSR و IRAP ۶۶

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Aegilops triuncialis* L. با استفاده از نشانگرهای ISSR و بین‌رتروترانسپوزونی

طاهره فتحی

یکی از مراکز پیدایش گونه *Aegilops triuncialis* L. ایران می‌باشد لذا مطالعه تنوع ژنتیکی این گونه در این ناحیه از اهمیت تکاملی به‌سزایی برخوردار است. تنوع این گونه به دلیل خویشاوندی نزدیک با گندم زراعی (*Triticum eastivum*) اهمیت زیادی در مطالعات ژنتیکی و اصلاحی آن دارد. در این راستا تنوع ژنتیکی ۴۰ توده از گونه *Ae. triuncialis*، جمع‌آوری شده از مناطق شمال غربی، غرب و جنوب غربی ایران بررسی شد. پس از استخراج DNA و یکسان‌سازی غلظت‌ها، ۵ نمونه از هر توده به صورت بالک درآمده و تنوع ژنتیکی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR و ۵ آغازگر IRAP مطالعه شد. چندشکلی بالایی در هر دو نشانگر ISSR و IRAP مشاهده شد. میانگین چندشکلی برای هر دو نشانگر ۸۹/۱ به‌دست آمد. نشانگر IRAP تنوع بالاتری را نشان داد. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرها از ۰/۲۳ تا ۰/۴۴ متغیر بود. بالا بودن معیارهای تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی، شاخص شانون برای آغازگرهای ، UBC824، RTR-10، UBC811 و RTR-7 و میزان PIC برای آغازگرهای RTR-10، RTR-2 و UBC816 نشان‌دهنده کارآیی بالای این آغازگرها در تمایز توده‌های *Aegilops triuncialis* L. در این تحقیق بود. در تجزیه واریانس مولکولی حدود ۹ درصد از واریانس کل، جزء واریانس بین توده و ۹۱ درصد نیز جزء واریانس درون توده برآورد شد. سه دندروگرام بر اساس معیار فاصله ژنتیکی Sokal & Sneath و الگوریتم Neighbor Joining ترسیم شد. سه دندروگرام ۴۰ توده مورد مطالعه را به سه گروه مجزا تفکیک کردند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۱۰۰ درصد تائید شد. میانگین فاصله ژنتیکی بین توده‌ها ۴۵ درصد بود که نشان‌دهنده تنوع بالا این گونه در مناطق مورد بررسی می‌باشد. نتایج حاصل از گروه‌بندی‌ها نشان داد که بین واگرایی ژنتیکی و منشأ جغرافیایی این گونه ارتباط کمی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه تابع تشخیص، تجزیه واریانس مولکولی، میزان اطلاعات چند شکلی

Abstract

genetic diversity among *Aegilops triuncialis* L. genotypes using ISSR and IRAP markers.

Tahere Fathi

Iran is considered as one of the center of diversity for *Aegilops triunsialis*. This species is a genetic resource for wheat cultivar (*Triticum eastivum*) improvement. therefore, study of its genetic diversity in this area is extremely important regarding evolution and breeding of this plant. The genetic variation among 40 accessions of *Ae. triunsialis* collected from northwest, west and southwest of Iran, were analysed using 12 ISSR and 5 IRAP markers. Five plants from each accession were choosen, DNA extracted, concentrations adjusted and bulked. A high polymorphism was observed for both ISSR and IRAP markers with an average polymorphism of 89.1 for both markers. IRAP marker showed highest variation. The PIC value varied from 0.23 to 0.44. The high value of PIC for RTR-10, RTR-2 and UBC816 primers confirmed a high efficiency of these primers. AMOVA (Analysis of Molecular Variance) indicated that the major proportion (91%) of the total variation was within accessions. In contrast, 9% of the variation was between accessions. Three dendrograms based on Sokal & Sneath coffecient of dissimilarity and NJ placed the 40 accessions in three clusters. Discriminate Function via Fisher's linear confirmed the validity of clustering analysis result with (100%). The average genetic distance was 45 percent that means this species have a high diversity in this area. The result of classification show that there was low relationship between genetic divergence and geographical origins.

Key words: Analysis of Molecular Variance, Discriminant Function Analysis, Polymorphism Information Content

مقدمه

اساساً ژنتیک‌دانان و اصلاح گران گندم، تمامی گونه‌هایی را که در سه جنس تاکسونومیکی تریتیکوم، آژیلوپس و آمبلیوپایروم قرار می‌گیرند (به عبارتی گندم‌های زراعی و کلیه خویشاوندان نزدیک آنها) را گندم می‌نامند [Van Slageren, 1994].گندم (*Triticum eastivum* L.) اولین غله و مهمترین گیاه زراعی دنیاست. تنوع محصولات و کیفیت انباری گندم، آن را غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان ساخته است [Ibro Vjollca et al., 2010]. گونه *Aegilops triuncialis*.L با نام رایج Barb goatgrass یک علف‌هرز یکساله زمستانه، متعلق به خانواده *Poaceae Barnhart* است. این گونه به دلیل خویشاوندی نزدیک با گندم زراعی (*Triticum eastivum* L.) واجد اهمیت است [Cenkci Suleyman et al., 2008; Peters, 1994]. این گونه یک آلوتتراپلوییید با ژنوم UUCC است که همیولوگ ژنوم *Triticum eastivum* (AABBDD)است و قابلیت تلاقی با آن را دارد [Martin-Sanchez et al. 2003; Davy et al., 2008]. این گونه دارای دامنه توزیع وسیعی از شرق اطلس تا نزدیک غرب و مرکز آسیا می‌باشد. اگرچه اولین‌بار در اوایل سال ۱۹۰۰ در کالیفرنیا شناسایی شد. اولین‌بار به‌همراه واردات گاوهای مکزیکی وارد کالیفرنیا شد [Nakai, 1981; Davy et al., 2008].

ایران یکی از غنی‌ترین مراکز دنیا از نظر ذخایر ژنتیکی گیاهی محسوب می‌شود. به عقیده گیاه‌شناسان ایرانی، حدود ۱۰ الی ۱۲ هزار گونه گیاهی در ایران وجود دارد که آن را یکی از غنی‌ترین مراکز تنوع ذخایر توارثی گیاهی در جهان ساخته است به‌طوری‌که تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی کشورمان بیش از تنوع گیاهی کل قاره اروپا تخمین زده می‌شود [منصوری، ۱۳۸۹]. گونه‌های وحشی به‌لحاظ داشتن ژن‌های مفید برای مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و گسترش سازگاری ژنتیکی در برابر تغییرات محیطی دارای اهمیت می‌باشند. این منابع ژنی ارزشمند با اعمال روش‌های سیتوژنتیکی و بیوتکنولوژی (انتقال ژن)، قابل انتقال به گونه‌های زراعی می‌باشند که در پیشرفت برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی نقش مهمی دارند [Hegde et al., 2002; Mcintosh et al.,1998]. به لحاظ اینکه بخش قابل توجهی از اراضی زیر کشت گندم در ایران در مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار گرفته و همچنین این مناطق دارای دامنه‌ای از تنش‌های زیستی (از جمله آفات، بیماری‌ها) و تنش‌های غیرزیستی (از جمله خشکی، شوری و ...) می‌باشند، استفاده از اجداد وحشی گندم از جمله آژیلوپس‌ها که دارای منابع غنی ژنی برای اصلاح گندم زراعی هستند، می‌تواند بسیار مفید باشد [Senyaninova-karoczagina et al., 1932]. ژن‌های

مقاومت به زنگ برگ، زنگ ساقه، سفیدک سطحی، مقاومت به سرما، خشکی و شوری از ژن‌هایی هستند که تاکنون در جنس آژیلوپس شناسایی شده‌اند [Monneveux et al., 2000].

آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی تامین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد [عبدالهی‌مندولکانی و همکاران، ۱۳۸۲]. در صورت فقدان تنوع ژنتیکی، اختلاف ژنتیکی بین رقم‌های اصلاح شده کم‌شده و شناسایی افراد با استفاده از روش‌های موجود مشکل می‌شود. تنوع مبنای همه گزینش‌هاست بنابراین، حفظ ذخایر ژنتیکی و امکان انتخاب مواد گیاهی متنوع، موفقیت به‌نژادگران گیاهی را تضمین می‌کند [Hedric, 1998]. اطلاعات مربوط به‌مقدار تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم و ارتباطات ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای بررسی و طراحی برنامه‌های به‌نژادی مهم می‌باشد و می‌تواند برای کمک به شناسایی و توسعه ژنتیکی ژرم‌پلاسم به‌کار رود . بنابراین جهت مدیریت و کاربرد موثر منابع ژرم‌پلاسم، درک کامل دامنه و ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت موردنظر ضروری است [Giarrocco et al., 2007].

به تفاوت‌های موجود بین ردیف DNA[1] کروموزوم‌های هر موجود که از افراد به نتاج آن‌ها منتقل می‌شود، نشانگر ژنتیکی گفته می‌شود. به عبارتی هر آنچه میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف تفاوت داشته باشد و سبب تمایز آن‌ها از یکدیگر گردد نشانگر ژنتیکی است. چند شکل بودن (تنوع) و توارث پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی است [Bircheler, 2003]. نشانگرهای مولکولی از ابزارهای مهم و ارزشمندی هستند که در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند [Ritschel et al., 2004]. از سال ۱۹۹۴ تاکنون، نشانگر مولکولی جدیدی به نام ISSR[2] مورد استفاده قرار می‌گیرد. آغازگرهای این نشانگر نیمه اختیاری بوده و به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور یک آغازگر مکمل با یک توالی ریزماهواره در ژنوم تکثیر می‌شود [Bornet, 2001]. نشانگرهای ISSR از نشانگرهای مبتنی بر PCR[3] هستند که تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های یک گونه را نشان می‌دهند. دهند. در این روش برای انگشت‌نگاری DNA از آغازگرهای مبتنی بر نواحی SSR[4] (توالی‌های ریزماهواره‌ها) که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند استفاده می‌شود [Yang et al., 2007]. این تکنیک نیازی به توالی یابی DNA ندارد و به راحتی برای هر گونه گیاهی استفاده می‌شود [Aga et.al., 2005]. رتروترانسپوزن‌ها[5] عناصر اصلی متحرک در ژنوم گیاهان هستند و از طریق

[1] - Desoxyribonucleicacid acid
[2] - Inter-Simple Sequence Repeat
[3] - polymerase chain reaction
[4] - Simple Sequence Repeat
[5] - Retrotransposon

یک RNA[1] حدواسط در ژنوم جابه‌جا می‌شوند. آن‌ها در گیاهان به‌وفور دیده شده و نسبت بالای از DNA ژنومی گیاه را به خود اختصاص داده‌اند و به خاطر گستردگی و فراوانی آن‌ها در ژنوم‌های گیاهی می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای ملکولی استفاده کرد [Flavell et al., 1992]. نشانگر IRAP[2]، پلی‌مورفیسم را با تکثیر قطعات DNA بین نواحی رتروترانسپوزونی نشان می‌دهد. این تکنیک در مطالعات زیادی در زمینه تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است [Smy´kal et al., 2011]. با توجه به اهمیت شناسایی و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم‌های موجود در کشور و عدم آگاهی دقیق از تنوع موجود در آنها، در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۴۰ توده *Aegilops triuncialis* L. جمع‌آوری شده از ۱۳ استان واقع در مناطق غرب، شمال‌غرب و جنوب‌غرب کشور با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR و ۵ آغازگر IRAP مورد بررسی قرار گرفت.

این تحقیق جهت اهداف زیر انجام گرفته است:

- تعیین روابط ژنتیک توده‌های وحشی *Aegilops triuncialis* L. در مناطق غرب، شمال‌غرب و جنوب‌غرب کشور ایران.
- شناسایی و تجزیه تحلیل تنوع ژنتیکی بین توده‌های *Aegilops triuncialis* L. در سطح مولکول DNA به کمک نشانگرهای مولکولی ISSR و IRAP.
- بررسی اهمیت نشانگرهای مولکولی ISSR و IRAP در آشکار نمودن تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای.

[1] - Ribonucleicacid acid
[2] - Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- ذخایر ژنتیکی یا ژرم‌پلاسم گیاهی

ذخایر ژنتیکی در مفهوم عام به تنوع ژنتیکی در هر موجود زنده گفته می‌شود و در دنیای گیاهی عبارت‌است از تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و گونه‌های وحشی خویشاوند آن‌ها. انواع ذخایر ژنتیکی عبارتند از گونه‌های وحشی، ارقام بومی[1]، اشکال ابتدایی گیاهان زراعی در مراکز تنوع اولیه آن‌ها، گیاهان مهاجرت کرده به مراکز ثانویه که ممکن است تنوع آن‌ها در این مراکز بیشتر باشد و بالاخره واریته‌های زراعی [منصوری، ۱۳۸۹].

از بین رفتن ذخایر توارثی را فرسایش ژنتیکی می‌نامند. عواملی که باعث فرسایش ژنتیکی می‌گردند عبارتند از:

- استفاده از واریته‌های پرمحصول و اصلاح شده یکنواخت به‌جای ارقام بومی

- اعمال روش‌های مدرن زراعی، مانند استفاده از سموم علف‌کش به‌صورت وسیع برای از بین بردن علف‌های هرز یعنی اجداد و خویشاوندان گیاهان زراعی

- ایجاد مراتع، چراگاه‌ها و مزارع یکنواخت

- رشد شهرها، راه‌ها و مراکز صنعتی

برای جلوگیری و پیشگیری از فرسایش ژنتیکی می‌توان اعمال زیر را انجام داد:

- کشف، جمع‌آوری، نگهداری و ذخیره ژرم‌پلاسم

- ارزیابی ژرم‌پلاسم

- بهره‌برداری مناسب از ژرم‌پلاسم [فارسی و باقری، ۱۳۸۳].

[1] - Landrace

۱-۲- تنوع ژنتیکی و ضرورت شناخت آن

مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند [Miller, 1987]. حفاظت موثر و استفاده از ژرم پلاسم گیاهی برای فرآیندهای کشاورزی امری ضروری است [Zhang et al., 1995]. تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقای موجودات از جمله گیاهان زراعی در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است [فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲].

وجود تنوع در بین گونه‌ها رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از حیث صفت مورد بررسی می‌باشد و همچنین به ژنتیک‌دانان در درک بهتر تکامل کمک می‌کند. علاوه بر این ، اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم پلاسم‌ها برای تشخیص تکرارها در بانک‌های ژنی، غنی‌سازی ذخایر ژنتیکی از طریق اینتروگرسیون ژن‌های مطلوب و شناسایی ژن‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد [محمدی، ۱۳۸۵ ;Saeidi et al., 2008]. تنوع در میان ارگانیسم ها نتیجه ای از تنوع در توالی DNA و اثرات محیطی است و تنوع در توالی DNA در نتیجه جایگزینی یک نوکلئوتید (SNP[1])، ورود و یا حذف یک قطعه از DNA در طولهای مختلف (از چندین تا هزار نوکلئوتید)، یا دو برابر شدن یا وارونگی قطعات DNA رخ می دهد [Smith, 2002].

۱-۳- استفاده از گونه‌های وحشی در اصلاح گیاهان زراعی

خویشاوندان وحشی محصولات مختلف زراعی بخش مهمی از نمونه‌های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند و به‌دلیل سازشی که طی دوران بسیار طولانی با محیط و تنش‌های مختلف پیدا کرده‌اند، حاوی ژن‌های بسیار ارزنده برای بروز خصوصیات مهم گیاهی به ویژه مقاومت به تنش‌هایی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما و مقاومت به آفات و امراض گردیده‌اند که معمولاً به‌عنوان خزانه ژنی[2] دست‌افزار کار به‌نژادگران گیاهی می‌باشند. کشور ایران از نظر موقعیت جغرافیایی در منطقه بسیار مناسبی قرار دارد و یکی از مناطق مهم تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی و زراعی گندم است [Vojdani & Meybodi, 1993].

[1] - Single nucleotide polymorphism
[2] - Gene pool

۱-۴- تاکسونومی، تاریخچه و ساختار ژنومی گندم

اساساً ژنتیک‌دانان و اصلاح گران گندم، تمامی گونه‌هایی را که در سه جنس تاکسونومیکی تریتیکوم، آژیلوپس و آمبلیوپایروم قرار می‌گیرند (به عبارتی گندم‌های زراعی و کلیه خویشاوندان نزدیک آنها) را گندم می‌نامند [Van Slageren, 1994]. گندم نان مهم‌ترین گونه در بین گندم‌هاست و به همین دلیل گندم معمولی[1] نیز نامیده می‌شود. طبقه‌بندی این گیاه عبارت است از: سلسله[2]: گیاهان؛ بخش[3]: دانه‌داران[4]؛ شاخه[5]: نهان‌دانگان[6]؛ رده[7]: تک‌لپه‌ایها[8]؛ راسته: Graminales؛ تیره[9]: گرامینه[10] یا پواسه[11]؛ طایفه: تریتیسه[12] (شامل گندم‌ها، جو و چاودار)؛ زیر طایفه: تریتیسینه[13]؛ جنس: تریتیکوم[14] و گونه: آئستیووم[15] (گندم نان) [مهرابی، ۱۳۸۶].

تاریخچه پیدایش گندم به ۱۰۰۰۰ سال پیش می‌رسد. مبدا پیدایش *Triticum* جنوب غربی آسیا نزدیک به منطقه (دجله و فرات) می‌باشد. در این ناحیه *Triticum* دیپلوئید و پلی پلوئید تنوع فوق العاده بالایی از نظر مورفولوژیکی و اکولوژیکی نشان می‌دهند [Monneveux et al., 2000]. گندم نان با نام علمی *T. aestivum* یک گونه آمفی پلوئید طبیعی می‌باشد که از ترکیب ۳ ژنوم A، B و D به دست آمده است. در ابتدای قرن ۲۰ این تئوری که گندم معمولی از هیبریداسیون طبیعی بین *T. turgidum* و گونه‌های آژیلوپس به دست آمده است بنا نهاده شد [Badaeva et al., 2002]. ارتباط بین گندم هگزاپلوئید و اجدادش سالها مورد مطالعه قرار گرفته است. به نظر می‌رسد دهنده ژنوم A گندم، *T. urartu* و دهنده ژنوم D گندم، *Ae. Tauschii* می‌باشد و دهنده ژنوم B گندم هنوز به طور کامل مشخص نشده و تحت مطالعه می‌باشد و چندین گونه آژیلوپس شامل *Ae. Speltoides*، *Ae. Bicornis*، *Ae. Sharonesis*، *Ae. Longissima* و *Ae. Searsii* به عنوان دهنده ژنوم B پیشنهاد شده‌اند [Karagoz et al., 2006; Monneveux et al., 2000].

---

[1] - Common wheat
[2] - Kingdom
[3] - Division
[4] - Spermatophytae
[5] - Phylum
[6] - Angiosperms
[7] - Order
[8] - Monocotyledonaeae
[9] - Family
[10] - Gramineae
[11] - Poaceae
[12] - Triticeae
[13] - Triticineae
[14] - Triticum
[15] - Aestivum

۱-۵- گونه‌های آژیلوپس

ژنوم آژیلوپس شامل ۱۱ گونه دیپلوئید، ۱۰ گونه تتراپلوئید و ۲ گونه هگزاپلوئید است که تنوع ژنتیکی بالایی را نشان می-دهند و فرمول ژنتیکی آن شامل ژنوم‌های D، S، U، C، N و M می‌باشد. بعضی از گونه‌های آژیلوپس حداقل در یکی از ژنوم-های خود با گندم مشترک هستند که اجازه می‌دهد صفات مطلوب آن به وسیله تلاقی‌های منظم و یا روش‌های نوترکیبی طبیعی به گندم انتقال پیدا کند [Schneider & Molnar 2007]. گونه‌های آژیلوپس به عنوان دهنده بسیاری از صفات مفید زراعی مانند مقاومت به آفات و بیماری‌ها شناخته شده است. از این بیماری‌ها زنگ ساقه، زنگ برگ و زنگ نواری مهمترین بیماری‌های جهانی هستند. تا کنون تعداد ۶۰ ژن برای زنگ برگ، ۴۰ ژن برای زنگ نواری و ۴۵ ژن برای زنگ ساقه به دست آمده است که از آن‌ها ۳۰ ژن برای زنگ برگ، ۱۲ ژن برای زنگ نواری و ۱۸ ژن برای زنگ ساقه از طریق دهندگان وحشی و غیر وحشی به گندم انتقال یافته است [McIntosh, 2007].

آژیلوپس‌ها همچنین به عنوان منابع مقاومت به بیماری‌های قارچی نیز شناخته شده‌اند [Olivera et al., 2007]. این گونه‌های وحشی تا کنون بیشتر به عنوان دهنده ژن‌های مقاومت به آفات و بیماری‌ها شناخته شده‌اند تا به عنوان یک منبع تنوع که تغییرات عمده در گونه‌های زراعی مرتبط ایجادکند [Monneveux et al., 2000]. به علت ارتباط نزدیک بین گونه-های آژیلوپس و گندم، تلاقی بین این دو جنس به طور طبیعی رخ می‌دهد، همچنین می‌توان ژن‌های فوق را به طرق مختلف همانند تکنیکهای نجات جنین، بک کراس، تولید لاین‌های با کروموزوم اضافه شده، تلاقی‌های بین گونه‌ای و استفاده از روش-های مولکولی به گندم انتقال داد [Schneider & Molnar 2007]. در تلاقی‌های بین آژیلوپس و گندم نان به نظر می‌رسد که ژنوم U در تمایز طبیعی رویان‌های هیبرید نقش موثری دارد [آقایی و همکاران، ۱۳۸۱].

اهمیت انتقال صفات مفید از آژیلوپس‌ها به گندم را نمی‌توان نادیده گرفت. تلاش‌های مداوم برای انتقال این صفات در حال انجام است. بنابراین احتمالا در آینده مواد ژنتیکی جدید حاوی صفات مطلوب این گونه‌ها در دسترس خواهد بود. توسعه نشانگرهای مولکولی جدید، مکان‌یابی بازوی های کروموزوم گندم و قطعات حامل ژن‌های مقاومت نشات گرفته از آژیلوپس را تسهیل می‌کند. بسیاری از این گونه‌ها با وجود اینکه تعداد زیادی از توده‌های آنها در بانک‌های ژنی موجود هستند، بلا استفاده باقی مانده‌اند [Schneider & Molnar 2007].

فهرستی از ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها (جدول ۱-۱) و آفات (جدول ۱-۲) مهم که از گونه‌های آژیلوپس به گندم نان منتقل شده‌اند و همچنین گونه‌هایی که به تنش‌های غیرزنده (خشکی، شوری و سرما) مقاومت بالایی دارند در جدول ۱-۳ وجود دارد [Monneveux et al., 2000; Schneider & Molnar 2007].

جدول ۱-۱- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به بیماری، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم

بیماری	گونه دهنده	ژن مقاومت	منبع
زنگ برگی (*Puccinia recondita*)	*Ae. umbellulata*	*Lr9*	Sears (1956)
	Ae. speltoides	*Lr28, Lr35, Lr36*	Dvorak (1977) McIntosh (1988) McIntosh et al. (1991)
	Ae. tauschii	*Lr21, Lr22, Lr32, Lr39, Lr41*	Kerber and Dyck (1969) Dyck and Kerber (1970) Kerber (1987) Cox and Gill (1992)
	Ae. triuncialis	*LrTr*	Aghaee_Sarbarzeh et al (2002)
زنگ ساقه (*Puccinia graminis*)	*Ae. speltoides*	*Sr32*	McIntosh (1988)
	Ae. comosa	*Sr34*	McIntosh et al. (1982)
زنگ نواری (*Puccinia striiformis*)	*Ae. comosa*	*Yr8*	Riley et al. (1968)
	Ae. tauschii	*Yr28*	McIntosh et al. (1988)
سفیدک پودری (*Erysiphe graminis*)	*Ae. speltoides*	*Pm12*	Miller et al. (1988)
	Ae. longissima	*Pm13*	Ceoloni et al. (1988)

جدول ۱-۲- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به آفات، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم

آفات	گونه دهنده	ژن مقاومت	منبع
نماتد سیست غلات (*Heterodera avenae*)	*Ae. ventricosa*		Dosba and Rivoal (1981) Rivoal et al. (1986, 1993)
	Ae. triuncialis	*Cre7*	Romero et al. (1998)
نماتد گره ریشه (*Meloidogyne naasi*)	*Ae. peregrina*	*Mn1*	Yu et al. (1990)
مگس گندم (*Mayetiola destructor*)	*Ae. triuncialis*	*H30*	Cox & Hatchett (1994)
	Ae. tauschii	*H13, H22, H23, H24*	Raupp et al. (1993)
شته سبز گندم (*Schizaphis graminum*)	*Ae. speltoides*	*Gb5*	Tyler et al. (1987)

جدول ۱-۳- نمونه‌هایی از ژن‌های مقاومت به تنش‌های غیر زنده، انتقال یافته از گونه‌های آژیلوپس به گندم

تنش غیر زنده	گونه دهنده	ژنوم	منبع
شوری	*Ae. tauschii*	D	Farooq et al. (1989), Gorham
	Ae. umbellulata	U	(1990), Xu et al. (1993),
	Ae. triuncialis	UUCC	Farooq (1994)
سرما	*Ae. tauschii*	D	Barashkova (1981),
	Ae. umbellulata	U	Limin and Fowler (1981),
	Ae. neglecta	UM	Barashkova and Vavilov (1991)
	Ae. triuncialis	UUCC	
خشکی	*Ae. tauschii*	D	Damania et al. (1992),
	Ae. kotschyi	SU	Waines et al. (1993),
	Ae. geniculata	MU	Rekika et al. (1998b)
	Ae. triuncialis	UUCC	