۱۱۱۴۹۲

دانشگاه زابل

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نبات

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ های گندم سرداری با استفاده از مارکر AFLP

استادان راهنما:

دکتر عادل سی و سه مرده

دکتر براتعلی سیاه سر

استادان مشاور:

مهندس خبات وهابی

دکتر علیرضا شهریاری

تهیه و تدوین:

ژیلا عثمانی

۱۳۸۸ /۲/ ۱۵

دی ۸۶

۱۱۱۴۹۲

بأسمه تعالی

وزارت علوم ، تحقیقات و فناوری

دانشگاه زابل

تاریخ:.....

شماره:.....

پیوست:.....

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان: ((**بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری با استفاده از مارکر AFLP**)) قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد **مهندسی کشاورزی** گرایش **اصلاح نباتات** توسط دانشجو **ژیلا عثمانی** تحت راهنمایی استادان پایان نامه آقایان **دکتر عادل سی‌وسه‌مرده و دکتر براتعلی سیاه‌سر** و استادان مشاور **مهندس خبات وهابی و دکتر علیرضا شهریاری** تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضا دانشجو

این پایان نامه ٦ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ **۱۳۸٦/۱۰/۲۲** توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۸۵ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی	**امضا**	**تاریخ**
۱– استاد راهنما: دکتر عادل سی‌وسه‌مرده		
۲– استاد راهنما: دکتر براتعلی سیاه‌سر		
۳– استاد مشاور: مهندس خبات وهابی		
۴– استاد مشاور: دکتر علیرضا شهریاری		
۵– داور: دکتر محمود رمرودی		
۶– نماینده تحصیلات تکمیلی: مهندس ولی الله سادات		

دانشگاه زابل
اداره تحصیلات تکمیلی

تقدیم به:

سمبل ایثار و تلاش

پدرم

الهه عطوفت و فداکاری

مادرم

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس بی‌کران خداوندی را که یاریم گردانید تا با بهره از گستره بی‌انتهای لطفش گذر از مرحله‌ای دیگر از زندگانیم را تجربه نمایم. خداوندی را که بر هر نعمت حق سپاسی برای بندگان مقرر فرموده لذا این تقریر را ابتدا با قدردانی از زحمات پدر و مادر عزیزم که نفسم با نفسشان گرم و قلبم با تپش قلبشان در تپش است آغاز می‌کنم، وجودم بر ایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر، مویشان سپیدی گرفت تا رویم سپید بماند، و راستی قامتم در خمیدگی قامتشان تجلی یافت.

بر خود لازم می‌دانم ازهمه کسانی که در انجام این مهم مرا یاری دادند، تشکر و قدردانی نمایم.

از اساتید راهنمای پایان نامه آقایان دکتر عادل سی و سه مرده و دکتر براتعلی سیاه سر که همواره از رهنمودهای ارزنده ایشان بهره‌مند بوده‌ام، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

از استاد ارجمندم مهندس خبات وهابی بدلیل تمام زحماتی که در انجام رساندن این پایان نامه متقبل شدند و بیش از یک مشاور در حق من استادی نمودند متشکرم.

از آقای دکتر علیرضا شهریاری که مشاورت این پایان نامه را تقبل نمودند صمیمانه متشکرم.

آقای دکتر محمود رمرودی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده گرفته، آقای دکتر مقدم نیا نماینده محترم تحصیلات تکمیلی که حداکثر تلاش شان را برای مساعدت و همکاری با دانشجویان کارشناسی ارشد مبذول می‌دارند،

از آقای دکتر بهمن بهرام‌نژاد که زحمت بازخوانی این پایان‌نامه را به عهده گرفتند، سپاسگزارم.

همچنین از کلیه دوستان دوران تحصیل و همراهان خوبم مهندس فرهاد کریمی، مهندس مسعود گریوانی، مهندس روناک روشنگر، مهندس مرضیه شاه‌نظری، مهندس نازنین نایب‌یزدی و مهندس فاطمه آصالح که آشنایی و همراهیشان فرصتی تکرارناشدنی بود و از هریک به فراخور حال نکات زیادی آموختم صمیمانه سپاسگزارم. برای همه این یاوران از خداوند متعال کامیابی و سلامتی خواستارم. ایزد منان را شاکرم که مرا توفیق اعطا فرمود تا بتوانم در طی این مسیر، سرافراز بیرون آیم. این موفقیت را مدیون عزیزانی هستم که خالصانه مرا یاری نمودند و از همکاری صمیمانه آنان، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

ژیلا عثمانی

دی ماه ۱۳۸۶

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپهای گندم سرداری با استفاده از مارکر AFLP

چکیده:

برآورد تنوع ژنتیکی دارای اهمیت است زیرا کاهش تنوع ژنتیکی ممکن است موجب آسیب‌پذیری شدید محصولات زراعی در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماریها و در نتیجه کاهش عملکرد شود. اولین گام در زمینه اصلاح گندم سرداری دسترسی به منابع ژنتیکی آن و بررسی تنوع ژنتیکی موجود می‌باشد ولی تاکنون اطلاعات موجود درگندم سرداری از طریق بررسی‌های مورفولوژیکی که متأثر از محیط هستند، و نمی‌تواند نماینده کامل ژنوم باشد بدست آمده است. لذا به نظر می‌رسد استفاده از نشانگرهای DNA که چندشکلی را در سطح DNA آشکار می‌کنند می‌تواند به عنوان روش‌های مکمل داده‌های مورفولوژیکی، روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری را به طور کارآتر تعیین کند. به همین دلیل تنوع ژنتیکی ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری با استفاده از نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA طبق روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران انجام گرفت. در مجموع ۱۱ ترکیب آغازگر مورد آزمایش قرار گرفت که ۳ مورد از آنها تولید الگوهای چندشکل میان اکوتیپ‌ها نمودند. از ۳ ترکیب آغازگر مورد استفاده مجموعاً ۱۰۸۶۳ قطعه چندشکل تولید شد که ۷۰۷۲ مورد آن پلی‌مورفیسم نشان داد (با میانگین پلی‌مورفیسم ۷۳/۹۷ درصد). تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سطح تشابه ۰/۶۲ در هشت گروه قرار داد. دامنه تشابه در بین ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری از ۰/۵۰ تا ۰/۸۹ می‌باشد. چون تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی دارای رابطه معکوس است، لذا دو اکوتیپ ۱۶ و ۱۷ که بیشترین تشابه ژنتیکی را نشان داده است دارای کمترین فاصله یا اختلاف ژنتیکی می‌باشند. همچنین اکوتیپ‌های ۲۳ و ۲۴ کمترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند چون در سطح تشابه ۵۰ درصد با سایر گروه‌ها مرتبط می‌گردند. تجزیه خوشه‌ای برای صفات کمی بر اساس فاصله اقلیدوسی و روش UPGMA انجام گرفت و تطابق بسیار کمی (۰/۰۲) بین گروه‌بندی بر اساس صفات کمی با نشانگر مولکولی AFLP دیده شد. نتایج بدست آمده از مقدار درصد پلی‌مورفیسم در این پژوهش نشان دهنده تنوع ژنتیکی بسیار زیاد میان این اکوتیپ‌ها می‌باشد، در نتیجه می‌توان از این اکوتیپ‌ها جهت معرفی ژن‌های جدید در داخل خزانه ژنی گندم نان استفاده کرد. همچنین به دلیل تنوع ژنتیکی بالای بدست آمده در بین این اکوتیپ‌ها نتیجه گرفته شد که گندم سرداری احتمالاً یک رقم نبوده بلکه توده‌ای از اکوتیپ‌ها می‌باشد و در پژوهش‌های آینده می‌توان اکوتیپ‌های برتر را شناسایی کرده و جایگزین این توده از اکوتیپ‌ها کرد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، گندم سرداری، AFLP و PCR.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... أ
فهرست جدول‌ها ..... ج
فهرست شکل‌ها ..... ه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- کلیات ۱
۱-۲- فرضیات تحقیق ۳
۱-۳- اهداف تحقیق ۴
۱-۴- جنبه جدید و نوآوری طرح ۴

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- گندم ۵
۲-۲- تنوع ژنتیکی و ضرورت شناخت آن ۶
۲-۳- نشانگرهای ژنتیکی ۹
۲-۳-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی ۹
۲-۳-۲- نشانگرهای مولکولی ۹
۲-۴- نشانگر AFLP ۱۰

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- مواد گیاهی ۲۳
۳-۲- کشت مواد گیاهی ۲۳
۳-۳- استخراج DNA ۲۴
۳-۴- اندازه‌گیری کیفیت و غلظت DNA ۲۶
۳-۵- تکنیک AFLP ۲۷
۳-۵-۱- برش DNA ژنومی ۲۷
۳-۵-۲- اتصال آداپتور ۲۹
۳-۵-۳- تکثیر پیش انتخابی ۳۱
۳-۵-۴- تکثیر انتخابی ۳۲
۳-۶- الکتروفورز ۳۵
۳-۶-۱- ترکیب ژل کوچک ۳۶
۳-۶-۲- رنگ آمیزی ژل ۳۶
۳-۶-۳- آماده‌سازی شیشه‌ها جهت الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید توالی‌یاب ۳۷
۳-۶-۴- آماده‌سازی ژل اکریل‌آمید توالی‌یاب ۳۸

۳-۶-۵- الکتروفورز مقدماتی ۴۰
۳-۶-۶- رنگ‌آمیزی ژل ۴۱
۳-۷- تجزیه و تحلیل مشاهدات ۴۵
۳-۷-۱- تشکیل ماتریس صفر و یک ۴۵
۳-۷-۲- تجزیه خوشه‌ای ۴۵
۳-۷-۳- محاسبه ضریب کوفنتیک ۴۷
۳-۷-۴- تجزیه مؤلفه اصلی و تجزیه مختصات اصلی ۴۸
۳-۷-۵- آزمون مانتل ۴۹
۳-۷-۶- روش‌های آماری مطالعه تنوع ژنتیکی ۵۰
۳-۷-۷- شاخص تنوع شانن ۵۳
۳-۷-۸- شاخص نشانگری و نسبت چندگانه ۵۴

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج تجزیه داده‌ها ۵۵
۴-۱-۱- تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی ۵۹
۴-۱-۲- تجزیه تابع تشخیص داده‌های مولکولی ۶۲
۴-۱-۳- تجزیه مؤلفه اصلی و تجزیه مختصات اصلی داده‌های مولکولی ۶۵
۴-۱-۴- تجزیه خوشه‌ای داده‌های کمی ۷۴
۴-۱-۵- تجزیه تابع تشخیص داده‌های کمی ۷۷
۴-۱-۶- تجزیه مؤلفه اصلی داده‌های کمی ۸۱
۴-۲- پیشنهادات ۹۱

فهرست منابع ۹۳

پیوست ۱۰۳

فهرست نشانه‌های اختصاری I

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱ نامگذاری ۲۱ کروموزوم گندم هگزاپلوئید توسط گروه همیولوگی و ژنوم ۶
جدول ۲-۲ مقایسه بین مارکرهای مولکولی RFLP، AFLP، SSR و RAPD ۱۸
جدول ۲-۳ مقایسه سطوح پلی‌مورفیسم اینبرد لاین‌های ذرت با استفاده از مارکرهای RFLP، AFLP، SSR و RAPD ۱۹
جدول ۳-۱ اجزاء واکنش برش در تکنیک AFLP برای گندم ۲۸
جدول ۳-۲ تهیه آداپتور ۵ میکرومولار *EcoR1* ۲۹
جدول ۳-۳ تهیه آداپتور ۵۰ میکرومولار *MseI* ۳۰
جدول ۳-۴ اجزاء واکنش اتصال آداپتور ۳۰
جدول ۳-۵ برنامه PCR برای تکثیر پیش انتخابی ۳۱
جدول ۳-۶ اجزاء واکنش تکثیر پیش انتخابی ۳۲
جدول ۳-۷ اجزاء واکنش تکثیر انتخابی ۳۴
جدول ۳-۸ توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش تکثیر انتخابی ۳۴
جدول ۴-۱ نتایج امتیازبندی ژل‌های AFLP ۵۵
جدول ۴-۲ تعداد کل باندها و تعداد باندهای پلی‌مورف بدست آمده توسط نشانگر AFLP ۵۷
جدول ۴-۳ میانگین (± انحراف معیار) پارامترهای مورد بررسی در ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری ۵۸
جدول ۴-۴- مقدار شاخص تنوع شانون برای ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری ۵۹
جدول۴-۵- مقایسه نتایج آزمون مانتل ضرایب تشابه جاکارد، دایس و نی‌ولی با ۱۰۰۰ مرتبه پرمیوتیشن (تکرار) تست و $p=۰/۰۰۲$ ۶۰
جدول ۴-۶- فراوانی پراکنش اکوتیپ‌های گندم سرداری در هر کدام از کلاسترها ۶۲
جدول ۴-۷- ضرایب متغیرهای دو تابع اول حاصل از تجزیه تابع تشخیص داده‌های مولکولی ۶۳
جدول ۴-۸- میزان خطای گروهبندی کلاسترها (پایین) و فراوانی اکوتیپ‌ها در هر کلاستر (بالا) بر اساس تجزیه تابع تشخیص در ۷۳ اکوتیپ سرداری ۶۴
جدول ۴-۹- فواصل بین کلاسترها، بر اساس تجزیه تابع تشخیص ۷۳ اکوتیپ سرداری ۶۵
جدول ۴-۱۰- ریشه مشخصه، نسبت و جمع کل واریانس توجیه شده حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۷۳ اکوتیپ سرداری ۶۶
جدول ۴-۱۱- بردارهای مشخصه حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس مارکرAFLP در ۷۳ اکوتیپ سرداری ۶۸
جدول ۴-۱۲- ریشه مشخصه، نسبت و جمع کل واریانس توجیه شده حاصل از تجزیه هماهنگ اصلی ۷۳ اکوتیپ سرداری ۷۱
جدول ۴-۱۳- بردارهای مشخصه حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس مارکرAFLP در ۷۳ اکوتیپ سرداری ۷۲
.جدول۴-۱۴- مقایسه نتایج آزمون مانتل ضرایب فاصله اقلیدوسی، مربع فاصله اقلیدوسی و ضریب همبستگی با ۱۰۰۰ مرتبه پرمیوتیشن (تکرار) تست و $p=۰/۰۰۲$ ۷۵
جدول ۴-۱۵- فراوانی پراکنش اکوتیپ‌های گندم سرداری در هر کدام از کلاسترها ۷۷

جدول ۴-۱۶- ضرایب تابع تشخیص ۱۷ صفت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اکوتیپ‌های گندم سرداری ۷۹
جدول ۴-۱۷- میزان خطای گروهبندی کلاسترها (پایین) و فراوانی اکوتیپ‌ها در هر کلاستر (بالا) بر اساس تجزیه تابع تشخیص صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی ۷۳ اکوتیپ سرداری ۸۰
جدول ۴-۱۸- فواصل بین کلاسترها، بر اساس تجزیه تابع تشخیص بر اساس صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در ۷۳ اکوتیپ سرداری ۸۰
جدول ۴-۱۹- ریشه مشخصه، نسبت و جمع کل واریانس توجیه شده حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۷۳ اکوتیپ سرداری ۸۱
جدول ۴-۲۰- بردارهای مشخصه حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۱۷ صفت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اکوتیپ‌های سرداری ۸۲
جدول ۴-۲۱- همبستگی ۱۷ صفت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی با پنج مؤلفه اول حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۸۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۱ DNA استخراج شده از برگ گندم به روش Dellaporta و همکاران با استفاده از مارکر MIII..... ۲۷
شکل ۳-۲ DNA تکثیر شده در مرحله انتخابی با استفاده از ترکیب آغازگرهای E-CAC & M-CAT بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪..... ۳۵
شکل ۳-۳ الگوی نواری آغازگرهای E-CAC / M-CAT به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین اکوتیپ‌های سرداری..... ۴۲
شکل ۳-۴ الگوی نواری آغازگرهای E-GCC & M-GCG به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین اکوتیپ‌های سرداری..... ۴۳
شکل ۳-۵ الگوی نواری آغازگرهای E-CGG / M-GGA به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین اکوتیپ‌های سرداری..... ۴۴
شکل ۴-۱ دندوگرام داده‌های حاصل از AFLP با استفاده از ترکیب داده‌های سه ژل ۱، ۲ و ۳ و ضریب تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02..... ۶۰
شکل ۴-۲- نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۷۳ اکوتیپ سرداری..... ۷۰
شکل ۴-۳- نمودار چگالی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۷۳ اکوتیپ سرداری برای داده‌های مولکولی..... ۷۰
شکل ۴-۴- پلات‌های حاصل از تجزیه مختصات اصلی در ۷۳ اکوتیپ گندم سرداری با استفاده از NTSYS. VER 2/02 نرم‌افزار..... ۷۴
شکل ۴-۵- دندروگرام داده‌های حاصل از صفات فیزیولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 ..... ۷۶
شکل ۴-۶- نمودار پراکنش گروه‌ها بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۱۷ صفت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در اکوتیپ‌های سرداری..... ۸۵
شکل ۴-۷- نمودار چگالی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای ۱۷ صفت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در اکوتیپ‌های سرداری..... ۸۶

۱- مقدمه

۱-۱- کلیات

با توجه به پیشرفت‌های علمی قرن اخیر، بشر توانسته است ابتدا با افزایش سطح زیر کشت و سپس به علت محدودیت زمینهای زراعی و منابع آبیاری با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته علمی در زمینه‌های تحقیقات به‌زراعی و به ویژه به‌نژادی موفقیت‌های چشمگیری در جهت افزایش تولیدات کشاورزی از طریق بالا بردن راندمان محصول در واحد سطح کسب نماید. در این رهگذر برنامه‌های به‌نژادی به عنوان هسته مرکزی تحقیقات کشاورزی شناخته شده و بشر از طریق تهیه و معرفی ارقام، نژادها و ژنوتیپ‌های جدید و اصلاح شده، توانسته است به پیشرفت‌های چشمگیر و قابل ملاحظه‌ای در زمینه بهبود و افزایش کمی و کیفی محصولات کشاورزی دست پیدا کند.

گندم اولین غله و مهمترین گیاه زراعی دنیا است (۱). طبق آمارهای مختلف بیش از ۷۰ درصد سطح زیر کشت محصولات زراعی در جهان به کشت غلات اختصاص دارد که از این مقدار ۲۲ درصد آن را گندم در بر می‌گیرد (۱۲). اهمیت گندم به لحاظ ویژگی گلوتن گندم است که بخش چسبیده از پروتئین‌های سخت آندوسپرم می‌باشد (۱). سطح زیر کشت آن در جهان طی سالهای ۲۰۰۰-۱۹۹۸ بین

۲۱۷ تا ۲۳۱ میلیون هکتار متغیر بوده است (۳). ۹۵ درصد از کل تولید جهانی گندم به گندم نان و ۵ درصد آن به گندم دوروم اختصاص دارد (٦۰).

یکی ازمهمترین اهداف بخش کشاورزی کشور افزایش تولید گندم و حفظ خودکفایی در زمینه این محصول استراتژیک است. افزایش تولید از طریق افزایش سطح زیر کشت و تولید در واحد سطح امکان‌پذیر است اما از آنجائیکه افزایش سطح زیر کشت محصولات زراعی امکان‌پذیر نیست تنها راه افزایش تولید، افزایش عملکرد است که همواره مهمترین هدف وزارت کشاورزی بوده است. یکی از مهمترین راه‌های افزایش تولید در واحد سطح نیز شناسایی ژنوتیپ‌های با پتانسل تولید بیشتر در شرایط هدف است. و با عنایت بر این موضوع تشخیص و شناسایی تنوع ژنتیکی که در این تحقیق هدف اصلی است ما را در رساندن به این مهم یاری می‌رساند.

گندم سرداری از بین توده‌های بومی ایران انتخاب و اصلاح شده است. رقمی است با میانگین ارتفاع بوته ۱۰۵ سانتیمتر، نیمه زمستانه و مناسب کاشت در شرایط دیم، سنبله ریشک‌دار و بیضی شکل، رنگ دانه زرد، مقاوم به سرما، و حساس به سیاهک‌ها، متحمل به زنگ، کیفیت نانوایی خوب و در سالهای مرطوب حساس به ورس می‌باشد. این رقم به ریزش مقاوم بوده و میزان عملکرد آن در شرایط مطلوب ۱/۵ تا ۲ تن می‌باشد. این رقم قابل کشت در مناطق دیم و سرد کوهستانی کشور بوده (۹) و در حال حاضر با توجه به سازگاری وسیع خود، رقم غالب مورد کشت استان کردستان می‌باشد.

پایه و اساس تحقیقات به‌نژادی گیاهان به وجود تنوع وسیع ژنتیکی استوار است و در واقع بدون دسترسی به چنین تنوع ژنی، به‌نژادگر شانس موفقیت چندانی برای ایجاد و ارائه ارقام اصلاح شده جدید نخواهد داشت (۱۰). ایران کشوری است که از نظر تنوع ژنتیکی بعضی از گیاهان زراعی و نیز درختان میوه ذخائر ارزشمندی دارد و چنین تنوعی می‌تواند از نظر دستیابی به بعضی از ژن‌های مهم برای اصلاح محصولات زراعی اهمیت فراوانی داشته باشد (۹). اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانش و فن‌آوری‌هایی

هستند که ساختار ژنتیکی گیاه را در جهت منافع اقتصادی انسان تغییر می‌دهند. لازمه هر تغییر وجود تنوع است، پس لازمه تغییر ژنتیکی نیز وجود تنوع ژنتیکی است. تنوع ژنتیکی یک صفت، یعنی اندازه پراکنش ارزش‌های همان صفت که تأثیر محیط آن زدوده شده باشد. تنوع اساس کارهای اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی و ماده خام ضروری برای آن است. یک به‌نژادگر در صورتی می‌تواند امید موفقیت زیادی در برنامه‌های خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب برای او وجود داشته باشد. از اینروست که منابع ژنتیک گیاهی یکی از مهمترین، پرارزش‌ترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شوند (۱۱).

ظهور پلی‌مورفیسم DNA یک وسیله مفید برای مطالعات بیولوژی مولکولی است. بررسی تنوع ژنتیکی در سطح ژنوم دارای مزایایی است که مهمترین آنها عبارتند از: ۱- گیاهان در تمامی سلول‌ها از هر بافت و در هر مرحله از رشد دارای DNA یکسان هستند. ۲- استخراج DNA از برگ، هسته و چوب امکان‌پذیر است. ۳- امکان آنالیز داده‌ها در هر زمان از سال ممکن می‌باشد. ٤- تعداد لوکوس‌های قابل ردیابی نامحدود است. ٥- آنالیز DNA مستقل از شرایط محیطی صورت می‌گیرد (۸).

۱-۲- فرضیات تحقیق

۱. اکوتیپ‌های موجود دارای تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد و با استفاده از مارکر مولکولی AFLP می‌توان آن را تعیین کرد.

۲. تکنیک AFLP بدلیل تکرارپذیری بالا و لوکوس‌های زیادی که در یک زمان کوتاه و در یک آزمون مورد سنجش قرار می‌دهد، یک تکنیک مناسب و مفید برای شناسایی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سرداری می‌باشد.

۳. از آنجائیکه این اکوتیپ‌ها از نقاط مختلف جمع‌آوری شده‌اند، از لحاظ صفات مورفولوژیکی با یکدیگر تفاوت دارند در نتیجه تنوع بالایی بین آنها وجود دارد.

٤. تنوع ژنتیکی این اکوتیپ‌ها با تنوع حاصل از صفات مورفولوژیکی ارتباط دارند.

۱-۳- اهداف تحقیق

۱. استفاده از نتایج این تحقیق در برنامه‌های اصلاحی برای بهبود ساختار ژنتیکی و حفظ ذخایر ژنتیکی موجود در گندم سرداری

۲. معرفی گندم سرداری به عنوان رقم یا توده‌ای از اکوتیپ‌ها

۳. انتخاب درست و سریع در زمینه استفاده از لاین‌های مختلف برای کشت در مناطق مختلف

٤. تعیین چند شکلی موجود بین اکوتیپ‌ها از طریق مارکرهای مولکولی مبتنی بر PCR

٥. فراهم آوردن اطلاعات مورد نیاز به منظور به‌نژادی این گیاه

٦. ایجاد اطلاعات مورد نیاز جهت رده‌بندی و شناسایی اکوتیپ‌ها

۱-۴- جنبه جدید بودن و نوآوری طرح

مارکرهای مولکولی برای اولین بار در ایران بر روی گندم سرداری استفاده می‌شود و بر روی این اکوتیپ تاکنون کار اصلاحی صورت نگرفته است.

۲- مروری بر پژوهش‌های انجام شده

۲-۱-گندم

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* از خانواده گرامینه و دارای ٤٢ کروموزوم (٢n=٦x=٤٢) و هگزاپلوئید می‌باشد (۱۲). گونه‌های گندم به سه دسته دیپلوئید (٢n=٢x=١٤)، تتراپلوئید (٢n=٤x=٢٨) و هگزاپلوئید (٢n=٦x=٤٢) تقسیم می‌شوند. گندم نان آلوهگزاپلوئید[1] است و دارای ژنوم AABBDD می‌باشد. ژنوم A گندم هگزاپلوئید از گندم‌های تک دانه یا اینکورن[2] همانند تریتیکوم مونوکوکوم[3] منشأ یافته است (۹ و ۳۸). در مورد ژنوم B نظریات مختلفی وجود دارد و هنوز دقیقاً شناخته نشده است. به هرحال گندم‌های جفت دانه یا امر[4] همانند تریتیکوم دیکوکوئید[5] (وحشی) و تریتیکوم دیکوکوم (زراعی) تتراپلوئید بوده و دارای ژنوم AABB است. گندم نان از طریق تلاقی خودبخودی بین گندم امر با ژنوم AABB (٢n=٢x=١٤) با آجیلوپس اسکوروزا[6] با ژنوم DD بوجود آمده‌اند (۱ و ۳۸). ۲۱ کروموزوم (تعداد کروموزوم گامت) گندم هگزاپلوئید به هفت گروه که گروههای

1- Allohexaploid
2- Einkorn
3- *Triticum monoccum*
4- Emmer
5- *Triticum dicoccoides*
6- *Aegilops squarrosa*

همیولوگ[1] نامیده می‌شود، تقسیم می‌شود (جدول ۲-۱). هر گروه همیولوگی دارای سه کروموزوم جزئی همولوگ است که یک کروموزوم از هر کدام از ژنوم‌های A، B و D می‌باشد. کروموزمها با شماره گروه همیولوگی (اعداد ۱ تا ۷) و ژنومی (A، B و D) مشخص می‌گردند (۱).

جدول ۲-۱ نامگذاری ۲۱ کروموزوم گندم هگزاپلوئید توسط گروه همیولوگی و ژنوم

	شماره کروموزم		
گروه همیولوگ	A	B	D
۱	۱A	۱B	۱D
۲	۲A	۲B	۲D
۳	۳A	۳B	۳D
٤	٤A	٤B	٤D
٥	٥A	٥B	٥D
٦	٦A	٦B	٦D
۷	۷A	۷B	۷D

۲-۲- تنوع ژنتیکی و ضرورت شناخت آن

یکی از پی‌آمدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخائر ژنتیکی بوده است. اگر چه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیرممکن می‌نماید اما در اینکه تعداد بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته‌اند و ذخائر ژنتیکی با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گرفته‌اند، تردیدی نیست.

[1]- Homoeologous groups

بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان اجزاء مهم پروژه‌های اصلاح نباتات تلقی می‌گردند (۸).

مدیریت تنوع طبیعی موجود در ارقام اهلی و خویشاوندان وحشی یک گونهٔ گیاهی در انجام یک برنامهٔ مؤثر به منظور اصلاح گیاه زراعی بسیار مهم است. استفاده از تنوع طبیعی به چند دلیل اهمیت دارد، یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی نامطلوب می‌باشد چون گیاهانی تولید می‌شوند که نسبت به اپیدمی‌ها و متغیرهای محیطی آسیب‌پذیرند و این باعث کاهش عملکرد می‌شود. بسیاری از خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی حاوی ژن‌هایی می‌باشند که باعث ایجاد مقاومت به استرس‌های غیر زنده مانند خشکی، سرما و شوری می‌شوند بنابراین می‌توان این ژنها را به واریته‌های تجاری منتقل کرد و از کاهش شدید عملکرد جلوگیری نمود. قدم اول در اصلاح خصوصیات گیاهی، فهم از ساختار کلکسیون ژرم پلاسم است که این موضوع به نوبهٔ خود نمونه‌گیری سیستماتیک ژرم پلاسم را برای مقاصد اصلاحی و حفاظتی، امکان‌پذیر می‌سازد (۷۸).

در سطح گونه، شناسایی واحدهای طبقه‌بندی و تعیین یکنواختی گونه، اطلاعاتی را فراهم می‌آورد که می‌توان از آن در مطالعات مربوط به حفاظت، سیستماتیک، اکولوژی و تکامل گونه استفاده کرد. در سطح جمعیت، تنوع جمعیت‌های مصنوعی یا کشت شده را در نظر می‌گیرند که از جمله این جمعیت‌ها می‌توان توده‌ها، کلکسیون‌ها، لاین‌های ژرم پلاسم و اصلاحی را نام برد. مطالعهٔ تنوع در ارتباط با جمعیت‌های طبیعی، اساس محافظت در محل[1]، جنگل‌داری، اکولوژی، بیولوژی جمعیت و مطالعات رفتاری محسوب می‌شود (۱۲).

تنوع ژنتیکی از ملزومات اصلاح نباتات است که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است و سازگاری درازمدت و بقای جمعیت را تضمین می‌کند. افزایش جمعیت، عامل اصلی استفاده بی‌رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی می‌باشد. در

[1]- *In situ*

بسیاری از موارد، این افزایش تولید با تخریب منابع زیستی و فرسایش شدید ذخایر توارثی همراه بوده است. حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی برای بقاء و بهبود تولیدات زراعی ضروری می‌باشد و نیازی اساسی، در توسعهٔ پایدار و کاهش فقر محسوب می‌شود. پیشرفت در زمینه تکنولوژی نشانگرهای DNA، اصلاح کنندگان و ژنتیکدان‌های گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینهٔ طبقه‌بندی و حفاظت ژرم پلاسم گیاهی کمک کرده است (۱۰).

هم اکنون آزمایشگاه‌های زیادی در کشورهای در حال توسعه و از جمله ایران برای این منظور احداث شده‌اند. تاکنون گیاهان مختلفی مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفته‌اند اصلاح گیاهان و از جمله گندم درپی کشف دوباره قوانین مندل در سال ۱۹۰۰ بر مبنای علمی استوار شد. برنامه افزایش عملکرد گندم مکزیک با همکاری متخصصین مؤسسات تحقیقاتی در سال ۱۹۴۳ شروع گردید و بعد از پایان پروژه‌های اصلاحی ارقام پیشرفته‌ای تولید شدند که سبب تحول در کشاورزی و اقتصاد کشورهایی از قبیل هندوستان و پاکستان گردید. به همین جهت به این تحول انقلاب سبز گفته شد (۲)

پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی، امیدهای تازه‌ای در به‌نژادگران بوجود آورده است که از جمله این پیشرفت‌ها می‌توان به ابداع انواع نشانگرهای مولکولی اشاره کرد. یکی از مهمترین موارد کاربرد این نشانگرها در اصلاح نباتات ارزیابی پتانسیل ذخائر توارثی است. متخصصین به‌نژادی، از نشانگرهای مولکولی برای حل مشکلاتی که روشهای مرسوم در اصلاح نباتات از پاسخ به آن قاصرند، کمک می‌گیرند (٦).

۲-۳- نشانگرهای ژنتیکی

تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم‌های هر موجود زنده (ژنوتیپ) که از افراد به نتاج آنها، مطابق با قوانین مندلی به ارث می‌رسند می‌تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی بکار گرفته شود برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد باید حداقل واجد دو ویژگی زیر باشد:

۱- قادر به تمایز افراد و یا به عبارت دیگر چند شکل باشد.

۲- حد الامکان بدون تغییر و یا تغییرات کم از نسلی به نسل دیگر منتقل شود (۸).

نشانگرها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند:

۲-۳-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی

اگرچه اولین نقشه‌های پیوستگی بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی به وجود آمده‌اند ولی این نشانگرها دارای محدودیت‌های اساسی هستند که موجبات توجه محققین به انواع دیگر نشانگرها را فراهم آورده است. این نشانگرها غالباً تحت تأثیر محیط قرار دارند و تعداد آنها کم می‌باشد (۸).

۲-۳-۲- نشانگرهای مولکولی

به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- نشانگرهای بیوشیمیایی (پروتئینی)

در دهه ۱۹۵۰، نشانگرهای مولکولی قابل مشاهده توسط الکتروفورز پروتئین‌ها تحول شگرفی را ایجاد نمودند. این نوع نشانگرها فرآورده نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع انعکاسی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم می‌باشند. از مهمترین انواع نشانگرهای بیوشیمیایی می‌توان به آیزوزایم[1]ها و آلوزایم[2]ها اشاره کرد (۸).

تا اواخر دهه ۱۹۷۰ نقشه‌های ژنتیکی تلفیقی (آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مورفولوژیکی) در بسیاری از گونه‌های مهم تهیه شد. آیزوزایمها دارای معایبی می‌باشند که از آن جمله محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم و محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آن‌ها است (۸).

۲- نشانگرهای مبتنی بر DNA

---

[1]- Isozyme
[2]- Allozyme