بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

گروه تولیدات گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته کشاورزی

گرایش بیوتکنولوژی

تعیین نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات زراعی در گندم

علی گلی

اساتید راهنما:

دکتر حسین صبوری

دکتر عیسی جرجانی

استاد مشاور:

مهندس حسین‌علی فلاحی

۱۳۹۳

تقدیر و سپاسگزاری

«سپاس گذار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند. از یکی زاده می‌شوم و از دیگری جاودانه. استادی که سپیدی را بر تخته‌سیاه زندگی‌ام نگاشت و مادری که تار مویی از او به‌پای من سیاه نماند.»

تقدیم به:

مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت‌نامه دلم، **پدرومادرعزیزم** که زندگی‌ام را مدیون مهر و عطوفت آنان می‌دانم.

همسر عزیزم، مهربانی مشفق، بردبار و حامی.

برادر و خواهرم همراهان همیشگی و پشتوانه‌های زندگی‌ام

و استاد عزیزم **دکتر حسین صبوری** که راهنمایی‌هایشان چراغ راهم بوده است.

از زحمات، راهنمایی‌ها و مشاوره‌های ارزشمند اساتید علم و ادب و اخلاق جناب آقای **دکتر عیسی جرجانی** و جناب آقای **دکتر حسین‌علی فلاحی** که با راهنمایی‌ها و نظرات گوهربار خود راه‌گشای این جانب بوده‌اند، کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای مهندس جعفر زاده و خانم‌ها مهندس کاتوزیان و ممی‌زاده کمال تشکر و قدردانی را دارم.

دانشگاه گنبدکاووس

تعهدنامه چاپ پایان نامه

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه گنبدکاووس مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات و امکانات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به‌منظور رعایت حقوق مجتمع، کلیه دانش‌آموختگان نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب مجوز نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه در قالب مقالات، مجلات علمی پژوهشی، همایش‌ها و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه گنبدکاووس، اساتید راهنما و مشاوران الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه به هر شکلی (مقاله، کتاب، ثبت اختراع و ابداع) باید با کسب اجازه استاد راهنما صورت گیرد.

این‌جانب **علی گلی** دانشجوی رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه گنبدکاووس تعهدات فوق را قبول کرده و ملزم به رعایت کلیه مفاد آن هستم.

نام و نام خانوادگی دانشجو: **علی گلی**

تاریخ: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

امضاء

دانشگاه گنبد کاووس

دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولـوژی آقـای علی گلی به شماره دانشجویی ۹۱۱۴۶۶۳۱۰۲ تحت عنوان " تعیین نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات زراعی در گندم " در ساعت ۱۰ روز دوشنبه ۱۳۹۳/۱۱/۲۰ در آمفی تئاتر دانشـگاه بـا حضـور هیـأت داوران به شرح زیر برگزار و پایان نامه با نمره ۱۹/۶ و کیفیت عالی پذیرفته شد.

اعضاء هیأت داوران:	مرتبه علمی	امضاء
۱ – استاد راهنمای اول: دکتر حسین صبوری	دانشیار	
۲ – استاد راهنمای دوم: دکتر عیسی جرجانی	استادیار	
۳ – استاد مشاور: دکتر حسین‌علی فلاحی	استادیارپژوهشی	
۴– استاد داور: دکتر حسین حسینی مقدم	استادیار	
۴– استاد داور: دکتر علی راحمی کاریزکی	استادیار	
۶– نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر ابراهیم غلامعلی پورعلمداری	استادیار	

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی یکی از فعالیت‌های مهم درزمینه‌ی به نژادی و حفظ ذخـایر ژنتیکـی در گیاهان است. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۴۸ ژنوتیپ گندم، تکثیر مکان‌هـای ژنـی بـا اسـتفاده از ۱۰ آغـازگر ISSR در آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. از تعداد ۶۲ قطعه‌ای که در کل ارقام تولید شد، ۴۱ قطعه چند شکل بودند. تعداد باندهای چند شکل از ۲ تا ۸ به ازای هـر آغـازگر متفـاوت بـود. بیشترین باندهای چند شکل مربوط به آغازگر PRI-10 بود. مقادیر PIC بین ۰/۳۷۵ تا ۰/۴۹۸ و شاخص نشانگری MI هم بین ۱۸/۷۵ تا ۳۹/۸۴ در هر آغازگر متغیر بود. بیشترین درصد چندشکلی به آغازگرهای PRI-4 و PRI-10 با ۸۰ درصد و کمترین درصد چندشکلی بـه آغازگرهـای (PRI-2+PRI-4)، (PRI-3+PRI-4) و PRI-5 بـا ۵۰ درصـد تعلـق داشـت. آغـازگر (PRI-3+PRI-4) بیشترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۶۶۶ و آغازگر PRI-5 با ۰/۵۰۲ کمترین میزان شاخص شانون را نشان دادند. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی در آغازگر (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۰/۴۷۴ و کمترین میزان تنوع ژنتیکی نی در آغازگر PRI-5با مقدار ۰/۳۳۶ مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر (PRI-3+PRI-4) با مقدار ۱/۹۰۸ و کمترین تعـداد آلل مؤثر برای آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/۵۸۴ به دست آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری مربوط به آغازگرPRI-4 با مقدار ۳۹/۸۴ به دست آمد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت بـه سـایر آغازگرهـا اسـت و کمتـرین شـاخص نشانگری در آغازگر PRI-5 با مقدار ۱۸/۷۵ مشاهده شد. تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGAM و با استفاده از ضریب تشابه ژاکارد، ۴۸ ژنوتیپ را در چهار گروه مجزا گروه‌بندی کرد. تجزیه‌ی ارتباط نتایج حاصل نشان داد نشانگر ISSR یک سیسـتم نشانگری قابل‌اطمینان برای آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و می‌توان از آن به‌عنوان ابزار مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در گندم استفاده نمود.

کلمات کلیدی :تنوع ژنتیکی، چندشکلی، گندم، نشانگر ISSR.

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۱
۱-۱-کلیات ۲
۱-۲-اهداف تحقیق ۶
۲-بررسی منابع ۷
۲-۱- منشأ و ژنتیک گندم ۸
۲-۲- طبقه‌بندی و رده‌بندی گندم ۸
۲-۲-۱- رده‌بندی ژنتیکی گندم از روی کروموزوم‌ها ۸
۲-۲-۲- طبقه‌بندی زراعی گندم ۸
۲-۳- خصوصیات گیاه‌شناسی گندم ۹
۲-۴- اندام شناسی گندم ۱۰
۲-۴-۱- ریشه ۱۰
۲-۴-۲- ساقه ۱۰
۲-۴-۳- پنجه ۱۰
۲-۴-۴- برگ ۱۰
۲-۴-۵- سنبل ۱۱
۲-۴-۶- تراکم سنبل ۱۱
۲-۵- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی و روش‌های ارزیابی تنوع آن در گیاهان ۱۱
۲-۵-۱- اهمیت تنوع ژنتیکی ۱۱
۲-۵-۲- روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۴
۲-۵-۳- نشانگر و ویژگی‌های آن ۱۵
۲-۵-۳-۱- نشانگرهای ژنتیکی ۱۵
۲-۵-۳-۲- نشانگرهای مورفولوژیکی ۱۶
۲-۵-۳-۳- نشانگرهای بیوشیمیایی (پروتئینی) ۱۶
۲-۵-۳-۴- نشانگرهای سیتولوژیکی ۱۷
۲-۵-۳-۵- نشانگرهای بیولوژیکی ۱۷
۲-۵-۳-۶- نشانگرهای مولکولی ۱۷
۲-۵-۳-۶-۱- نشانگرهای مولکولی DNA ۲۰
۲-۵-۳-۶-۱-۱- نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۲۰
۲-۵-۳-۶-۱-۲- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۲۱
۲-۵-۳-۶-۲- نشانگر RFLP (تفاوت در طول قطعات حاصل از هضم) ۲۱
۲-۵-۳-۶-۳- نشانگر RAPD (دی. ان. ای چندشکلی تکثیرشده تصادفی) ۲۱

۲-۵-۳-۶-۴- AFLP یا چندشکلی طولی قطعات تکثیر برش یافته..... ۲۲
۲-۵-۳-۶-۵- نشانگر CAP..... ۲۲
۲-۵-۳-۶-۶- نشانگر SNP..... ۲۲
۲-۵-۳-۶-۷- تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری یا VNTR..... ۲۳
۲-۵-۳-۶-۸- ریز ماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSR)..... ۲۳
۲-۵-۳-۶-۹- نشانگر ISSR..... ۲٤
۲-۵-۳-۷- طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تجزیه‌وتحلیل تنوع ژنتیکی..... ۲۹
۲-۵-۳-۸- روش‌های آماری برای محاسبه تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد..... ۲۹
۲-۵-۳-۸-۱-تجزیه خوشه‌ای..... ۲۹
۲-۵-۳-۸-۲-تجزیه مختصات اصلی (PCO)..... ۳۱
۲-۵-۳-۱۰- تجزیه‌وتحلیل داده‌ها برای مطالعه تنوع ژنتیکی..... ۳۳
۲-۵-۳-۱۰-۱- تخمین فاصله و شباهت ژنتیکی..... ۳۳
۲-۵-۳-۱۰-۱-۱- ضریب نی و لی (GD NL)..... ۳۳
۲-۵-۳-۱۰-۱-۲- ضریب جاکارد (GDJ)..... ۳۳
۲-۵-۳-۱۰-۲- محاسبه ضریب کوفنتیک..... ۳۴
۲-۵-۳-۱۰-۳- محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC)..... ۳۴
۲-۵-۳-۱۱- رابطه بین داده‌های مولکولی و صفات..... ۳۵
۳-مواد و روش‌ها..... ۳۶
۳-۱- ارزیابی صفات فنوتیپی..... ۳۷
۳-۱-۱- زمان و موقعیت جغرافیایی محل اجرا..... ۳۷
۳-۱-۲- طرح آماری..... ۳۷
۳-۱-۳- آنالیز داده‌های مورفولوژیک..... ۳۹
۳-۲- ارزیابی ژنوتیپی..... ۳۹
۳-۲-۱- استخراج DNA..... ۳۹
۳-۲-۲- تعیین کیفیت و کمیت DNA..... ٤۰
۳-۲-۳- تکثیر DNA ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ISSR..... ٤۲
۳-۲-۴- الکتروفورز محصولات PCR..... ٤۳
۳-۲-۵- تحلیل آماری داده‌های مولکولی..... ۴۳
۳-۲-۶- امتیازدهی باندها..... ۴۴
۳-۲-۷- میزان محتوای چندشکلی..... ۴۴
۳-۲-۸- شاخص نشانگری..... ۴۵
۳-۳- تجزیه ساختار..... ۴۵
۳-۴- تجزیه ارتباط..... ۴۵
۴-نتایج و بحث..... ۴۷

۴-۱- نتایج ارزیابی صفات فنوتیپی.....۴۸
۴-۱-۱-تعیین ضرایب تغییرات فنوتیپی.....۴۸
۴-۱-۲-تجزیه واریانس.....۴۹
۴-۱-۳-مقایسه میانگین.....۴۹
۴-۱-۴-بررسی همبستگی صفات فنوتیپی.....۵۵
۴-۱-۵- تجزیه علیت.....۵۵
۴-۱-۶-تجزیه رگرسیون.....۵۷
۴-۱-۷-تجزیه‌ی خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها.....۵۸
۴-۲- ارزیابی‌های مولکولی.....۶۲
۴-۲-۱-شناسایی نشانگرهای مناسب بر اساس معیارهای تنوع.....۶۲
۴-۲-۲- تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس آلل‌های ISSR.....٦٦
۴-۲-۳- تعیین ژنوتیپ‌های تأثیرگذار و بحرانی.....۶۷
۴-۲-۴-تجزیه‌ی خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها.....۶۹
۴-۳-بررسی ارتباط نشانگرهای ISSR با صفات فنوتیپی.....۷۱
۴-۳-۱-تجزیه‌ی ساختار ژنتیکی.....۷۱
۴-۳-۲- تجزیه‌ی ارتباط.....۷۶
۴-۴- نتیجه‌گیری.....۸۵
۴-۵-پیشنهادت.....۸۷
منابع.....۸۸

فهرست جداول

جدول ۲-۱-جدول همبستگی صفات کیفی.....۳۱
جدول ۲-۲-میزان نکویی برازش بر اساس ضریب کوفنتیک.....۳۴
جدول ۳-۱- ژنوتیپ‌های موردبررسی در آزمایش.....۳۷
جدول ۳-۲- ترکیبات موردنیاز در بافر استخراج.....۳۹
جدول ۳-۳- مشخصات آغازگرهای مورداستفاده.....۴۲
جدول ۳-۴-برنامه حرارتی چرخه‌های PCR.....٤٣
جدول ۳-۵- چهار مدل آماری استفاده‌شده برای انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای ISSR و صفات فنوتیپی.....۴۵
جدول ۴-۱- مقادیر پارامترهای آماری صفات مختلف ژنوتیپ های گندم.....۴۹
جدول ۴-۲- تجزیه واریانس صفات موردبررسی در ژنوتیپ های مختلف گندم.....۵۲
جدول ۴-۳- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی درژنوتیپ‌های مختلف گندم.....۵۳
جدول ۴-۴- ماتریس ضرایب همبستگی بین صفات موردبررسی در ژنوتیپ‌های گندم.....۵۵
جدول ۴-۵-تجزیه ضرایب علیت.....۵۷
جدول ۴-۶-نتایج رگرسیون.....۵۷

جدول ۴-۷- مقایسه بین گروه‌های تفکیک یافته از تجزیه کلاستر با استفاده از کلیه صفات موردبررسی.....۵۹
جدول ۴-۸- مقادیر ویژه درصد تبیین واریانس هرکدام از توابع.....۶۰
جدول ۴-۹- ضریب استانداردشده صفات در تابع تشخیص اول و دوم.....۶۰
جدول ۴- ۱۰- نتایج تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و ضرایب تنوع صفات در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۴۸ژنوتیپ گندم بر اساس صفات مرفولوژیک.....۶۱
جدول ۴-۱۱-نتایج حاصل از بررسی ۴۸ ژنوتیپ گندم با استفاده از نشانگر ISSR.....۶۵
جدول ۴-۱۲-مقادیر ویژه، نسبت واریانس تجمعی عامل‌های استخراج‌شده.....۶۸
جدول ۴-۱۳-آماره‌های محاسبه‌شده برای تعیین مقدار بهینه k برای ژنوتیپ های گندم.....۷۳
جدول ۴-۱۴-عضویت ژنوتیپ ها بر اساس نتایج مستخرج از نرم‌افزار STRUCTURE.....۷۵
جدول ۴-۱۵-نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات مختلف.....۸۲

فهرست اشکال

شکل ۳-۱ تصاویری از نحوه کشت ۴۸ ژنوتیپ گندم و اندازه‌گیری صفات فنوتیپی و مورفولوژیکی.....۳۸
شکل ۳-۲ مراحل استخراج .DNA.....۳۹
شکل ۳-۳ مراحل PCR.....۴۱
شکل ۳-۴ مراحل الکتروفورز برای تعیین کمیت و کیفیت .DNA.....۴۱
شکل ۳-۵- دستگاه Geldoc.....۴۳
شکل ۳-۶- تصاویری از باندها.....۴۴
شکل ۴-۱-دیاگرام تجزیه مسیر برای تجزیه عملکرد دانه در مترمربع.....۵۶
شکل ۴-۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف گندم.....۶۱
شکل ۴-۳- موقعیت گروه‌ها بر اساس مقادیر حاصل از تابع تشخیص.....۶۲
شکل ۴-۴- نمودار دو بعدی برای تعیین آلل‌های بحرانی و تأثیرگذار.....۶۶
شکل ۴-۵-گروه‌بندی ژنوتیپ‌های موردبررسی بر اساس آلل‌های ISSR.....۶۷
شکل ۴-۶- نمودار دو بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ژنوتیپ‌ها.....۶۹
شکل ۴-۷- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های موردبررسی برای مارکر.....۷۱
شکل ۴-۸-نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد بهینه k.....۷۳
شکل ۴-۹- بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از structure و نشانگر .ISSR.....۷۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

گروهی از دانشمندان مبدأ خاستگاه گندم را سرزمین فلسطین یا شام و دشت‌های آسیای باختری و بین‌النهرین دانسته‌انـد. از کاوش‌های باستان شناسی برمی‌آید که گندم از ۶۰۰۰ سال پیش شناخته شد. در سده نوزدهم گندم‌کاری در آمریکا گسترش یافت. یونان در ۳۰۰ سال پیش از میلاد مسیح کشت انواع گندم را در اطراف دریای مدیترانه گزارش نموده‌اند. گنـدم گیـاهی است تک‌لپه و یک‌ساله و از گونه تریتیکوم و از تیره غلات گرامینه که دارای گونه‌های زیادی است که مهم‌ترین گونه‌های آن *Triticum aestivum* و *Triticum vulgare* است که به گندم نانوایی معروف است (ایران‌نژاد و شهبازیان، ۱۳۸۳). طول عمـر تک‌تک دانه‌های غلات مشخص نیست؛ اما عمر متوسط گندم ۷۰۰۰ سال پیش‌بینی‌شده است. گندم گیاهی است یـک‌سـاله از گروه تک‌لپه‌ای که انواع بسیار خودرو و پرورش‌یافته دارد. گونه‌های خودروی آن بیشتر علـف هـرز بـوده و ارزش خـوراکی چندانی ندارد. گندم از تیره غلات و جنس تریتیکوم است و دارای گونه‌های بسیار زیادی می‌باشد که مهم‌ترین گونه‌ی زراعی آن به *Triticum vulgare* یا *Triticum aestivum* است که به گندم نانوایی نیز مرسوم است. حدود ۶۰ درصد سطح مزارع دنیا زیر کشت غلات بوده که بیشتر آن زیر کشت گنـدم اسـت (علـی‌اکبـر نیـا و آذر بـاد، ۱۳۸۱). گنـدم بـه دلیـل ویژگـی‌هـای منحصربه‌فرد، مهم‌ترین گیاه زراعی است که ازنظر سطح زیر کشت و میزان تولید سالیانه نسبت به سایر غلات در درجـه اول اهمیت می‌باشد. در ایران نیز گندم نسبت به سایر محصولات بیشترین سطح زیـر کشـت را بـه خـود اختصـاص داده اسـت. بیشترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیشترین میزان تولید (۹۴ درصد) مربوط به گندم نان (*Triticum aestivum. L*) است. سطح زیر کشت گندم در دنیا بالغبر ۲۰۰ میلیون هکتار است. میـزان تولیـد جهـانی آن ۶۰۰ میلیـون تـن اسـت (شائیسـتا[1] و همکاران، ۲۰۱۱). گندم بین ۶۰-۳۰ درجه عرض شمالی و ۴۰-۲۷ درجه عرض جنوبی قابل‌کشت است. در ضـمن گنـدم تـا ارتفاع ۳۵۰۰-۳۰۰۰ متری از سطح دریا و در تبت تا ارتفاع ۴۵۷۰-۴۲۷۰ متری کشت می‌شود. حداقل درجه حـرارت جهـت رویش گندم ۴-۳ درجه سانتی‌گراد است. ارقام گندم می‌توانند در مناطقی رشد کنند کـه میـزان بارنـدگی سـالانه آن‌هـا بـین ۱۷۵۰-۲۵۰ میلی‌متر باشد ولی حدود سه‌چهارم سطح زیر کشت گندم در مناطقی قرار دارند که بارنـدگی سـالیانه آن‌هـا بـین ۸۷۵-۳۷۵ میلی‌متر است. مناسب‌ترین نواحی کشت گندم در جهان در نیم‌کره شمالی و در نـواحی نیمـه‌خشـک بـا بارنـدگی ۵۰۸-۲۵۴ میلی‌متر و در نواحی نیمه مرطوب با ۷۶۲-۵۰۸ میلی‌متر بارندگی سالیانه دیده می‌شـود (نورمحمـدی و همکـاران، ۱۳۸۹). جمعیت جهان در پایان نیمه اول قرن ۲۱ از مرز ۶ میلیارد نفر کنونی گذشته و به بیش از ۱۰ میلیارد نفر خواهد رسید.

[1] .Shaista

یکی از معایب این افزایش جمعیت استفاده بی‌رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی است. در بسیاری از این 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 است و به‌عنوان نیاز اساسی در توسعه پایدار، خلق واریته‌های جدید و کاهش فقر محسوب می‌شود. در ابتدا فرآیندهای تکاملی بر روی زمین صرفاً از طریق انتخاب طبیعی اعمال می‌شد. درصورتی‌که در حال حاضر، انتخاب طبیعی توأم با انتخاب مصنوعی وارد عمل شده و تکامل بیشتر گونه‌های مطلوب به‌وسیله بشر هدایت می‌شوند (عبد میشانی و بوشهری، ۱۳۷۶). از طرفی واریته‌های بومی و محلی اغلب قادر به استقامت در شرایطی هستند که واریته‌های مدرن در آن شرایط به‌شدت آسیب می‌بینند. بالاترین ارزش ارقام محلی در حال و آینده به خاطر ژن‌هایی است که آن‌ها دارند. چه ژن‌های مقاومت به بیماری، کیفیت مواد غذایی و سازگاری به شرایط نامساعد را کنترل می‌کنند و چه آن‌هایی که در حال حاضر ناشناخته و در آینده می‌توانند ارزشمند باشند (عبد میشانی و بوشهری، ۱۳۷۶). تقاضا برای گندم در جهان در سال ۲۰۲۰ میلادی به مقدار ۴۰ درصد بیش از سطح فعلی تقاضا پیش‌بینی‌شده می‌رسد. گندم به‌عنوان عمده‌ترین محصول زراعی کشور به‌طور متوسط سطحی معادل ۶/۶۵ میلیون هکتار از اراضی کشور را به خود اختصاص داده است که ۳۶/۷۵ درصد آن آبی و ۶۵/۲۵ درصد بقیه دیم می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۸). سطح برداشت‌شده گندم کشور در سال زراعی ۹۰- ۱۳۸۹ حدود ۶/۴ میلیون هکتار برآورد شده که ۳۸/۷ درصد آن آبی و ۶۱/۳ درصد بقیه دیم بوده است. بیشترین عملکرد آبی گندم با ۵۶۳۳/۷ کیلوگرم در هکتار متعلق به استان تهران و کمترین آن با ۲۰۹۰/۷ کیلوگرم در هکتار به استان بوشهر تعلق دارد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰). تحقیقات زیادی در ایران و جهان در مورد افزایش محصول آن صورت می‌گیرد. توسعه‌ی سطح زیر کشت و افزایش عملکرد محصول در واحد سطح دو استراتژی مهم برای بالا بردن میزان تولید هر گیاه می‌باشد. عملکرد دانه گندم توسط اجزای آن (تعداد سنبله در مترمربع، تعداد دانه در سنبله و وزن دانه) که روابط پیچیده با یکدیگر دارند تعیین می‌شود. برای به دست آوردن حداکثر عملکرد دانه باید تمام اجزای عملکرد در حد مطلوب باشد، به همین دلیل در تجزیه‌وتحلیل نتایج آزمایش‌ها ازنظر عملکرد باید به اجزای عملکرد و اثر متقابل آن‌ها با یکدیگر نیز توجه کرد (سرمدنیا و کوچکی، ۱۳۶۸). در گندم تعداد بیشتر گیاهان سبز شده، تعداد سنبله بیشتری را در واحد سطح فراهم می‌آورد و تعداد سنبله به‌صورت بالقوه عملکرد را افزایش می‌دهد زیرا با تغییر تعداد سنبله، سطح برگ یا منبع فتوسنتز کننده و هم‌چنین ظرفیت مخزن یا محل ذخیره مواد در گیاه افزایش می‌یابند. ارقام گندم توانایی زیادی در تنظیم تعداد سنبله‌های خود به‌منظور سازگاری با محیط دارند (کوچکی و همکاران، ۱۳۷۹؛ راشد محصل و همکاران،

۱۳۸۰). امروزه با تمایل به کشت‌های خالص گیاهان، دامنه‌ی تنوع ژنتیکی در اکوسیستم‌های کشاورزی کاهش‌یافته است (کوچکی و همکاران، ۱۳۸۳). از طرفی ارقام و واریته‌های اصلاح‌شده با تاریخ‌مصرف محدود افزایش‌یافته است (والتزآر، ۱۳۸۳). علی‌رغم تعداد بسیار زیاد واریته‌های تجاری که در چند دهه‌ی اخیر اصلاح‌شده‌اند، در بسیاری از مناطق جهان تولید محصولات زراعی بر کشت تعداد اندکی از واریته‌های زراعی استوار است (کوچکی و همکاران، ۱۳۸۳). تا به امروز واریته‌های اولیه و خویشاوندان وحشی یک منبع باارزش و گاهی اوقات تنها منبع موجود ژن‌های مقاومت به حشرات، بیماری‌ها، سازگاری به شرایط نامساعد محیطی و سایر صفات زراعی مانند پاکوتاهی در برنج و گندم و سایر محصولات دانه‌ای بوده‌اند که سهم آن‌ها در انقلاب سبز و در بسیاری از قسمت‌های دنیا بر کسی پوشیده نیست. با جایگزین کردن و به دنبال آن از بین رفتن واریته‌های اولیه، تنوع ژنتیکی موجود در آن‌ها نیز از بین می‌رود. برای جلوگیری از چنین زیان‌هایی، ذخیره کردن واریته‌های اولیه ضروری می‌نماید (عبد میشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۶)؛ بنابراین برای حفظ ژن‌های ارزشمند زراعی گندم بررسی تنوع ژنتیکی ضروری می‌باشد. به همین منظور تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های گندم نان موردبررسی قرار گرفت تا ضمن آگاهی از تنوع ژنتیکی، افرادی بافاصله ژنتیکی مناسب جهت تولید هیبرید و جمعیت‌های نقشه یابی شناسایی شوند. گندم از جنس *Triticum* و یک‌ساله می‌باشد و ازنظر کروموزومی به سه دسته: دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید تقسیم می‌شود در گندم دیپلوئید در هر سنبلچه‌ی خوشه فقط یک‌دانه وجود دارد که به آن‌ها گندم‌های تک‌دانه می‌گویند. گندم‌های تتراپلوئید زراعی در سطح وسیعی در مصر به‌عنوان گندم نان کشت می‌شود و گندم‌های دوروم که بیشتر برای تهیه‌ی ماکارونی، شیرینی‌پزی و مصارف صنعتی مورداستفاده قرار می‌گیرد از دسته گندم‌های تتراپلوئید می‌باشند. مهم‌ترین گندم‌های هگزاپلوئید، گندم نان بوده و گونه‌ی غالب تجارتی دنیا محسوب می‌شود. گل‌آذین گندم سنبله مرکب است، هر سنبله (Spike) از چند سنبلچه یا سنبله فرعی (Spikelet) تشکیل‌شده که درروی محور اصلی گل‌آذین (Rachis) قرارگرفته است. گل‌ها نیز بر روی محورهای فرعی (Rachilla) قرار می‌گیرند. معمولاً سنبلچه‌های وسطی زودتر گل می‌دهند. هر گل گندم دارای تخمدان منفردی است که در قسمت فوقانی آن دو میله کوتاه به نام خامه (Style) و درروی هر میله یک عضو پر مانند به نام کلاله (Stigma) قرارگرفته است. از قاعده‌ی تخمدان سه پرچم (Anther) یا عضو نر خارج می‌شود، تخمدان به‌وسیله پوشینه‌های گلوم، لما و پالئا محافظت می‌شود. برگ گندم شامل دو قسمت: غلاف و پهنک می‌باشد. غلاف، ساقه را در برگرفته و طول هر غلاف از گره تحتانی تا گره فوقانی امتداد دارد. در انتهای گره فوقانی غلاف که به قاعده‌ی برگ منتهی می‌شود، اعضاء ظریفی به نام زبانک (Ligule) دیده می‌شود. لیگول گندم بی‌رنگ و با کرک‌های ظریفی پوشیده

شده است. دو زائده‌ی گوشواره مانند و خمیده نیز وجود دارد که به طرفین قاعده‌ی پهنای هر برگ متصل بوده و گوشوارک نام دارد. ساقه ساده، ماسوره‌ای یا نی نما، بدون انشعاب، روی ساقه گره‌هایی وجود دارد و در کنار هر گره یک برگ وجود دارد. ریشه‌ی آن افشان و سطحی است (امام، ۱۳۸۲). یک اصلاح‌گر در صورتی شانس موفقیت در برنامه‌های اصلاحی دارد که امکان انتخاب مواد مناسب را داشته باشد و این مواد نیز دارای تنوع کافی باشند. تنوع مبنای همه‌ی گزینش‌هاست و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع است. با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه، حدود انتخاب هم در طبیعت و هم به‌طور مصنوعی وسیع می‌شود. با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی در آن رابطه‌ی مشابهی نیز بین کارایی بهبود ژنتیکی اصلاح یک جامعه و تنوع ژنتیکی برای صفت موردعلاقه موجود است. تمایل به حذف تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی اولیه، واریته‌های سازگار به نیازهای غیرقابل‌پیش‌بینی آینده را به خطر می‌اندازد بنابراین حفظ و نگهداری ذخایر توارثی ضروری می‌باشد (صالحی جوزانی، ۱۳۷۸). به دلیل گسترش سطح زیر کشت ارقام اصلاح‌شده غیربومی، روند فرسایش ژنتیکی ارقام بومی افزایش‌یافته است. این می‌تواند میراث چندین هزارساله را در معرض خطر نابودی قرار دهد (فابریکی اورنگ و همکاران، ۱۳۸۸). تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (لاوی[1] و همکاران، ۱۹۹۴). بر این اساس مطالعه تنوع ژنتیکی نه‌تنها برای سازمان‌دهی و حفاظت مواد گیاهی بلکه برای پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید نیز اهمیت دارد (فابریکی اورنگ و همکاران، ۱۳۸۸). تنوع ژنتیکی اساس اصلاح نباتات است که از تکامل طبیعی ناشی شده و از اجزای مهم پایداری نظام‌های بیولوژیکی می‌باشد. تنوع و انتخاب، دو رکن اصلی هر برنامه‌ی اصلاحی بوده و انجام انتخاب منوط به تنوع مطلوب از حیث هدف موردبررسی می‌باشد. برای بهره‌مندی از تنوع موجود و ایجاد تغییرات جدید، ارزیابی ذخایر ژرم‌پلاسم به نظر می‌رسد (امینی، ۱۳۸۲؛ ایروانی و همکاران، ۱۳۸۷). یکی از مطالعات بنیادین که اساسی برای مطالعات بیشتر در گیاهان می‌باشد، بررسی تنوع ژنتیکی بوده که به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد. امروزه با ابداع نشانگرهای DNA، از آن‌ها به‌عنوان ابزارهایی مکمل و دقیق برای بررسی ساختار ژنتیکی گونه‌ها استفاده می‌شود (محمدی، ۱۳۸۹). بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان با خواص دارویی در سال‌های اخیر با استفاده از نشانگرهای DNA، افزایش یافته ولی در مقایسه با گیاهان زراعی و باغی این مطالعات بسیار اندک می‌باشد (محمدی، ۱۳۸۹). نشانگر ISSR ازجمله نشانگرهای نیمه تصادفی می‌باشد که با آغازگرهای واجد نوکلئوتیدهای تکراری مانند GT، AC، AGاست به همین

[1].Lavi

دلیل MPPCR[1] نیز نامیده می‌شود. استفاده از تکنیک ISSR نیاز به داشتن آگاهی‌های ابتدایی در مورد توالی ژنوم ندارد و الگوهای چندشکلی زیاد و چند مکانی ایجاد می‌کند. هر نوار تولیدشده مربوط به قسمتی از توالی DNA می‌باشد که با دو ریز ماهواره‌ی معکوس شده پوشیده شده است. از نشانگر ISSR در انگشت‌نگاری ژنومی، گوناگونی ژنتیکی، آنالیز فیلوژنتیکی، نقشه یابی ژنوم، مشخص نمودن فراوانی توالی‌های ریز ماهواره‌ها، بررسی در جمعیت‌های طبیعی و جداسازی گونه‌ها استفاده می‌گردد (قبادی، ۱۳۸۴).

۱-۲- اهداف تحقیق

اهداف این تحقیق را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه کرد:

۱-بررسی تنوع در سطح فنوتیپی بین ژنوتیپ‌های گندم

۲-بررسی تنوع در سطح مولکولی بین ژنوتیپ‌های گندم

۳-بررسی رابطه‌ی بین تنوع مولکولی و تنوع فنوتیپی بین ژنوتیپ‌های گندم

[1].Microsatellite-primed PCR

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- منشأ و ژنتیک گندم

گندم نان (*Triticum aestivum L.*) متعلق به خانوادهی *Poaceae* و جنس تریتیکوم است و ازلحاظ ژنتیکی گیاهی آلوهگزاپلوئید که دارای 2x=6n=42 کروموزوم و شامل سه ژنوم متفاوت A، B و D که هر ژنوم از ۷ عدد کروموزوم تشکیل‌شده است. از سال ۱۹۱۸ تحقیقاتی برای یافتن گونه‌های دیپلوئید که ژنوم‌های A، B و D را ایجاد کرده بودند شروع شد. مشخص شد که ژنوم A مربوط به گونهی *monococcum* است. در سال ۱۹۴۴ معلوم شد که گونهی دیپلوئید *Aegilops squarrosa* ژنوم D را تشکیل می‌دهد که در ایجاد گندم هگزاپلوئید و هم‌چنین در گونهی تتراپلوئید نقش دارد. در سال ۱۹۵۴ ساکارا و استبینز بیان داشتند که منشأ ژنوم B گونه *Aegilops speltoides* است، این‌گونه خصوصیات مورفولوژیکی مناسبی برای انتقال از وضعیت گندم‌های Einkorn (AA) به وضعیت تتراپلوئیدی گندم‌های امر (AABB) داشت. به دلیل این‌که دو رگ آمفی دیپلوئید حاصل از تلاقی تریتیکوم مونوکوکوم با آجیلوپس اسپلتوئیدس به‌عنوان منبع ژنوم B پذیرفته نشد. دانشمندان اصلاح نباتات و ژنتیک تاکنون موفق نشده‌اند که میزان قرابت کروموزوم‌های ژنوم B در گندم‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید را با کروموزوم‌های ژنوم B در آجیلوپس اسپلتوئیدس تعیین کنند (یزدی صمدی و پوستینی، ۱۳۷۳).

۲-۲- طبقه‌بندی و رده‌بندی گندم

گندم از خانواده گرامینه (*Poaceae*) و رده تک‌لپه‌ای (*Monocotyledon*)، طایفه (*Triticeae*)، زیر طایفه (*Triticineae*) و جنس (*Triticum*)، می‌باشد. گندم معمولی (*T.aestivum*)، بیشترین پراکندگی را در دنیا دارد و تقریباً ۹۰ درصد از اراضی را شامل می‌شود و به گندم نان معروف است. گندم دوروم (*T.durum*)، بعد از گندم معمولی بیشترین اهمیت را دارد و برای شیرینی‌پزی و ماکارونی کاربرد دارد. گندم دوروم دارای وزن هزار دانه زیاد (بیش از ۵۰ گرم)، بوده و گلوتن آن بیش از ۳۰ درصد است. مناسب‌ترین PH برای گندم بین ۵/۷-۶ می‌باشد (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۲-۲-۱- رده‌بندی ژنتیکی گندم از روی کروموزوم‌ها

۱- گندم‌های دوتایی (دیپلوئید ۲n-۱۴) مانند گندم‌های تک‌دانه یا اینکورن.

۲- گندم‌های ۴ تایی (تتراپلوئید ۲n-۲۸) مانند گندم‌های دو دانه (امر)، سنگی (دوروم)، لهستانی (بلند)، مرغدانه، تیموفیوی.

۳- گندم‌های ۶ تایی (هگزاپلوئید ۲n-۴۲) مانند گندم‌های سفت، تابستانی، ترد، ماشا، اسفروکوکوم.

۲-۲-۲- طبقه‌بندی زراعی گندم

ازنظر خواص زراعی می‌توان گندم‌ها را به سه گروه زمستانه، بهاره و زمستانه-بهاره تقسیم نمود. بهاره و زمستانه بودن

مربوط به زمان کشت گندم است. گندم زمستانه در نقاطی که فصل زمستان در آنجا خیلی سرد نمی‌شود در اوایل پاییز کشت می‌شود و تا رسیدن زمستان جوانه می‌زند ولی در طی زمستان به علت سرمای زیاد رشد نمی‌کند بلکه در اوایل بهار رشد می‌نماید و بسته به شرایط اقلیمی و اواسط بهار تا اواسط تابستان برداشت می‌شود. درحالی‌که گندم بهاره ویژه مناطقی است که زمستان سخت و سرد و طولانی دارند. در این نقاط گندم پس از اتمام یخبندان های شدید کاشت و قبل از رسیدن زمستان محصول برداشت می‌شود (پایان، ۱۳۸۵).

۲-۳- خصوصیات گیاه‌شناسی گندم

گندم گیاهی است تک‌لپه، خودگشن و یک‌ساله، از تیره‌ی غلات و جنس تریتیکوم که دارای گونه‌های بسیار زیادی است. ریشه‌های اصلی و فرعی از محل طوقه خارج‌شده و همگی هم‌قطر می‌باشند. علاوه بر ساقه‌ی اصلی اغلب ارقام گندم دارای ساقه‌های ثانوی است که اصطلاحاً پنجه نامیده می‌شود. ارقام مقاوم به خشکی سیستم ریشه‌ای متراکم و گسترده‌تری از ارقام حساس به خشکی دارند. سنبل یا سنبله‌ی گندم چندین سنبلچه یا سنبل فرعی دارد که هرکدام معمولاً از یک تا چند گل تشکیل‌شده است. گل‌های یک سنبل فرعی معمولاً در مراحل مختلف رشد قرار دارند، گل‌های داخلی دیرتر می‌رسند. هر گل معمولاً از یک گلوم، دو گلومل به نام‌های لما و پالئا و سه پرچم و یک مادگی درست‌شده است، مادگی آن یک خامه دو شاخه شبیه پر دارد. در موقع گل کردن، گلوم‌ها باز و ریزش مقداری گرده به خارج موجب می‌شود که گندم گیاهی صددرصد خود بارور نباشد، در این گیاه یک تا چهار درصد عمل دگرگشنی انجام می‌شود (تاج‌بخش، ۱۳۸۲). هر برگ گندم از دو قسمت غلاف و پهنک تشکیل‌شده است. برگ‌ها در روی ساقه به‌صورت منفرد و در دو ردیف به‌طور متناوب قرار دارند. در انتهای ساقه گندم، سنبل گندم به وجود می‌آید. بر روی هر بند سنبل فرعی و یا سنبله با دم گل بسیار کوتاهی وجود دارد. تعداد سنبله‌ها درروی محور اصلی بین ۲۰-۱۵ عدد می‌باشد. در داخل هر سنبله از ۷-۱ گل ممکن است وجود داشته باشد که حداکثر ۵ گل بارورشده و بقیه عقیم می‌مانند. طول سنبله بین ۱۸-۶ سانتی‌متر در ارقام و شرایط اکولوژیکی ممکن است تغییر کند. گل گندم دوجنسی، دارای سه پرچم و یک مادگی که دارای دو کلاله پر مانند است، می‌باشد. هر سنبله به ترتیب از خارج به داخل از دو پوسته به ترتیب به نام‌های پوشه و پوشینه احاطه‌شده است. تعداد پوشه‌ها در هر سنبله دو عدد و تعداد پوشینه‌ها در اطراف هر گل دو عدد باشد. پوشینه‌ی خارجی (تحتانی) را لما و پوشینه‌ی داخلی (فوقانی) را پالئا نامند. ریشک عبارت است از زائده‌ای است خار مانند که معمولاً در انتهای آزاد یکی از پوشینه‌ها که در سمت خارج دانه قرار دارد ممکن است بروید. احتمال دارد برخی از نژادهای گندم فاقد ریشک و یا دارای ریشک کوتاهی باشند. معمولاً گندم‌های ریشک دار

از گندم‌های بدون ریشک عملکرد بیشتری دارند. حتی کیفیت گندم‌های ریشک دار از بدون ریشک برتر است. دانه گندم درواقع میوه گندم است، میوه گندم را در اصطلاح گیاه‌شناسی کاریوپسیس یا گندمه نامند. دانه به سختی به پریکارپ و یا درواقع دیواره و یا پوست دانه چسبیده است. جدا کردن پریکارپ فقط با آسیاب کردن میسر است (بهنیا، ۱۳۷۶؛ پایان، ۱۳۸۵).

۲-۴- اندام شناسی گندم

۲-۴-۱- ریشه

گندم گیاهی با ریشه‌ی افشان است که در ابتدا دارای دو نوع ریشه است که یکی ریشه‌های اولیه است که بلافاصله بعد از جوانه زدن بذر از گیاهک تولید می‌شود و دیگری ریشه‌های تاجی یا اصلی که از محل قاعده‌ی گره‌های گیاه خارج‌شده و ریشه‌های دائمی را تشکیل می‌دهند. عمق ریشه‌های گندم پاییزه بیشتر از بهاره است و حداکثر عمقی که ریشه گندم ممکن است در خاک نفوذ کند حدود یک متر است بذر گندم معمولاً سه ریشه اولیه تولید می‌کند.

۲-۴-۲- ساقه

ضخامت ساقه‌ی گندم از یک گره تا یک‌سوم ارتفاع به گره دیگر افزایش یافته و سپس نازک می‌شود. ضخامت ساقه از پایین به بالا افزایش می‌یابد.

۲-۴-۳- پنجه

پنجه دهی یعنی ایجاد انشعاب از جوانه‌های جانبی ساقه‌ی اصلی از جوانه اولیه رشد به وجود می‌آید. پنجه دهی در زاویه اولین برگ یعنی بالای اهرم ساقه انجام می‌گیرد و هر چه کشت دیرتر انجام شود به همان نسبت هم قابلیت پنجه دهی کاهش می‌یابد. تعداد مناسب پنجه برای غلات بهاره دو و برای غلات پاییزه سه عدد می‌باشد؛ و معمولاً ارقام زودرس پنجه کمتری از ارقام دیررس تولید می‌کنند.

۲-۴-۴- برگ

برگ گندم از دو قسمت غلاف و پهنک تشکیل‌شده است. غلاف ساقه را بین دو گره در برمی‌گیرد به‌طوری‌که طول آن از گره تحتانی تا فوقانی امتداد می‌یابد و حدفاصل پهنای برگ و غلاف دو زائده‌ی کوچک قرار دارد که برای تشخیص گندم از جو و چاودار و یولاف درزمانی که هنوز خوشه‌ها ظاهر نشده‌اند استفاده می‌شود. یکی از زائده‌ها گوشوارک نام دارد و زائده‌ی دیگر لیگول یا زبانک نام دارد. که در جو گوشوارک‌ها بلندتر است و بدون کرک می‌باشد ولی در گندم کوچک و کرک دار است.