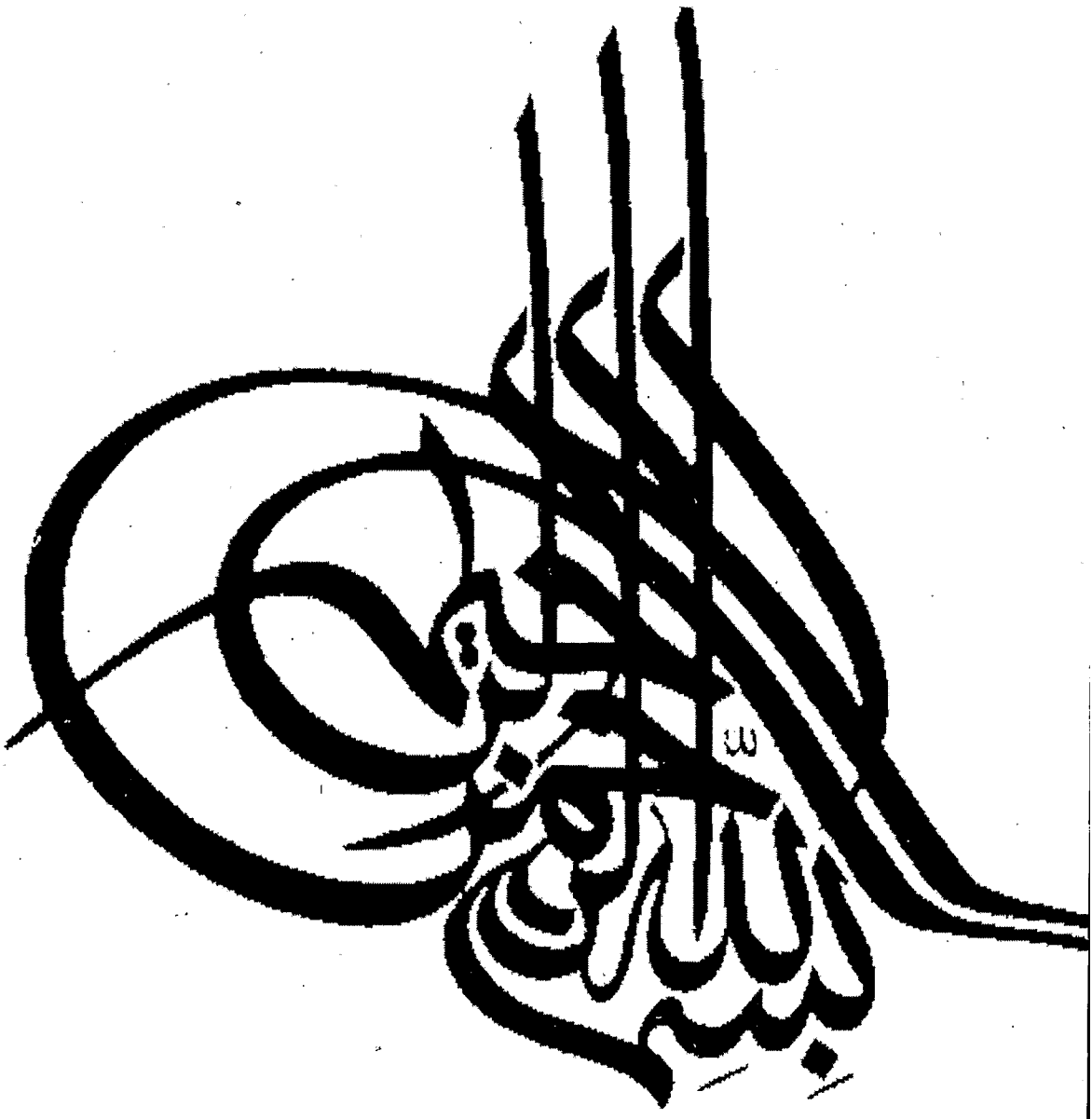
بسم الله الرحمن الرحيم

٧١٦٧

دانشگاه زابل

تحصیلات تکمیلی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات

عنوان

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه خلر با استفاده از بررسی‌های مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی تصادفی و نیمه تصادفی

تحقیق و نگارش

عباسعلی وهابی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی دانشگاه زابل
تاریخ ثبت مدارک
۱۳۸۸ /۲/ ۱۵

اساتید راهنما

دکتر محمود سلوکی

دکتر احمد ارزانی

استاد مشاور

مهندس عباسعلی امام‌جمعه

مهرماه ۸۴

۱۱۱۶۱۶

بسمه تعالی

وزارت علوم ، تحقیقات و فنّاوری

دانشگاه زابل

مدیریت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دکتر حسین مهرابی

تاریخ :.....

شماره :.....

پیوست:.....

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان: **ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه خلر با استفاده از بررسی های مورفولوژیکی و نشانگرهای ژنتیکی تصادفی و نیمه تصادفی** قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد **کشاورزی** گرایش **اصلاح نباتات**

توسط دانشجو **عباسعلی وهابی** تحت راهنمائی استاد پایان نامه آقای **دکتر محمود سلوکی – دکتر احمد ارزانی** تهیه شده است . استفاده از مطالب آن بمنظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز میباشد.

امضاء دانشجو

این پایان نامه ۶ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ **۸۴/۷/۲۳** توسط هیئت داوران بررسی و نمره و درجه **عالی** به آن تعلق گرفت .

نام و نام خانوادگی	امضاء	تاریخ

۱– استاد راهنما : دکتر محمود سلوکی

۲– استاد راهنما : دکتر احمد ارزانی

۳– استاد مشاور : مهندس عباسعلی امام جمعه

۴– داور ۱ : دکتر عیسی جرجانی

۵– داور۲ : دکرت محمد حسین سنگتراش

زابل : ص . پ ۵۳۸–۹۸۶۱۵ تلفن : ۲۲۲۳۷۰۷ « ۰۵۴۲ » نمابر : ۲۲۲۶۷۶۵

Research_go@Zabol.ac.ir Post_grad@Zabol.ac.ir

"دوست خوب آن است که دیدارش انسان را به یاد خدا اندازد"

تقدیم به دوستان عزیزم

جناب آقای جواد طائی

و

جناب آقای محسن جبل عاملی

تقدیر و تشکر

سپاس خداوندی را سزاست که توفیق درک عظمت وجودیش را از راه تفکر و غور در پیچیده‌ترین و شگفت-انگیزترین لوح محفوظ الهی نصیب بنده حقیر خود گردانید و دانستم که این ما نیستیم که زراعت می‌کنیم.

"أأنتم تزرعونه ام نحن الزارعون"

و سپاس خدای را که در این مسیر دشوار هدایتم نمود تا این مهم زنگیم را به سرانجام برسانم.

بدون پیرایه بایستی گفت بی وجود همراهی و همدلی عزیزان و با توجه به موانع و مشکلات ، پایان بردن این تحقیق غیرممکن می‌نمود.

از اساتید راهنمای بزگوار **جناب آقای دکتر محمود سلوکی** و **جناب آقای دکتر احمد ارزانی** و استاد مشاورگرامی **جناب آقای مهندس عباسعلی امام‌جمعه** که الفبای کار در آزمایشگاه را به من آموخت سپاسگزاری می-نمایم.

از دوستان و همکاران عزیزم در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه زابل **جناب آقای مهندس محمدرضاخلف‌باغی** و بویژه **سرکار خانم مهندس نفیسه ریگی‌نژاد** که ایام سخت و در عین حال فرح‌بخشی را در محضرشان سپری نمودم تشکر کرده و توفیقات روزافزون برای این عزیزان آرزومندم.

از خانم‌ها سمیه هنری‌مهر ، مریم استوارپور ، فاطمه طاهری ، اعظم نیک‌فطرت ، لیلا حلاجی ، فاطمه مصری و مهشید خاتمی‌راد و آقایان علی حیدری ، مجتبی ملایی ، محمد فضل آبادی ، علیرضا اصغری ، مجید طاهریان ، سعید الهیاری ، فرامرز سهرابی ، وهب میرباقری ، محمود هاشمی‌تبار ، رضا اسکندری ، آرش احمدیان ، حجت نیکخواه ، مجتبی عباسیان ، عیسی طهماسبی ، حسین نعیمی و علی جهان تیغ به خاطر همه محبتهایشان صمیمانه سپاسگزارم.

چکیده

استفاده از گیاه خلّر در ایران با دارا بودن خصوصیات مطلوب از نظر کیفیت علوفه و سازگاری به خاکهای شور، همچنین ژرم پلاسم غنی جهت توسعه کشت و استفاده از بذر و علوفه خشک مفید به نظرمی‌رسد.در این آزمایش ۱۴توده بومی خلّر جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان از لحاظ صفات مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تنوع ژنتیکی این ۱۴ توده با استفاده از دو نظام نشانگری تصادفی(RAPD) و نیمه تصادفی(ISJ) با استفاده از ۳۲ آغازگر در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی مرکز زیست پژوهشی علوم سلولی و مولکولی ((بیوسنتر)) دانشگاه زابل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ۱۴ توده از نظر هفت صفت مورفولوژیک مورد ارزیابی، اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد علوفه و هر یک از صفات تعداد غلاف در بوته، تعداد شاخه فرعی و ارتفاع بوته وجود داشت. کمترین همبستگی را نیز صفت وزن صد دانه با عملکرد داشت. تجزیه ضرایب مسیر جهت تفکیک ضرائب همبستگی به آثار مستقیم و غیرمستقیم هر جز موثر بر عملکرد حاکی از آن بود که صفت ارتفاع بوته بیشترین اثر مستقیم و مثبت را برروی عملکرد دارد. با استفاده از ۱۵ آغازگرتصادفی RAPD، میانگین درصد پلی مورفیسم ۷۳/۹٪ بدست آمد. ۱۲ آغازگر، چندشکلی نشان داده و ۵۶ باندچند شکل در ارقام مورد مطالعه مشاهده گردید. روابط ژنتیکی بین ارقام با محاسبه ضرایب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای روش UPGMA بررسی گردید. بیشترین تشابه در بین توده های جعفرآباد و سرچهان با ضریب تشابه ۶۶٪ و کمترین تشابه بین خرم آباد۲ و خرم آباد۷ با ضریب تشابه ۳٪ مشاهده گردید. از مجموع ۱۷ آغازگر نیمه‌تصادفی ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتید مورد بررسی، ۱۴ آغازگر مجموعاً ۷۰ باند چندشکل تولید نمودند که ۵۶٪ درصد از کل ۱۲۶ عدد باند حاصله را شامل گردید. ضمن اینکه متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۴/۸۶ عدد بود. با توجه به داده‌های بدست آمده از قطعات DNA حاصل از روش نیمه تصادفی و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، بیشترین تشابه مربوط توده‌های سرچهان و جعفرآباد با ضریب تشابه ۰/۵۵و کمترین تشابه به توده‌های خرم‌آباد۶ و ۴ با توده خرم‌آباد ۲ با ضریب تشابه ۰/۱۲اختصاص یافت. نتیجه این تحقیق امکان استفاده از آغازگر RAPD و ISJ در تعیین میزان تنوع ژنتیکی، ارزیابی ذخایر توارثی و روابط خویشاوندی ارقام خلر در ایران را نشان داد.

دانشگاه زابل
دانشکده کشاورزی - گروه زراعت و اصلاح نباتات

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه وبررسی منابع

مقدمه ۱

۱)کلیاتی درباره گیاه خلر ۱

۱-۱) خاستگاه و منشاء ۳

۱-۲) اهلی شدن وتکامل ۴

۱-۳)گیاه شناسی ۴

۱-۴) خصوصیات زراعی و اکولوژیکی ۵

۱-۵)ارزش غذایی خلر ۶

۱-۶) بازدارنده‌های مواد غذایی و مواد سمی موجود در گونه‌های خلر ۶

۱-۷) راهکارهای بیوتکنولوژی برای ایجاد ارقام غیر سمی خلر ۷

۱-۸)تثبیت نیتروژن ۸

۱-۹) کاربردها ۸

۱-۱۰) موقعیت خلر در ایران ۹

۲)تنوع ژنتیکی ۹

۲-۱) اهمیت تنوع ژنتیکی ۱۰

۲-۲) آسیب‌پذیری ژنتیکی ۱۱

۲-۴)حفاظت از ذخائر ژنتیکی ۱۲

۲-۵)نقش توده های بومی در اصلاح نباتات ۱۲

) نشانگرهای ژنتیکی ۱۳

۳-۱)نشانگرهای مورفولوژیک ۱۴

۳-۲) نشانگرهای مولکولی ۱۵

۳-۳) نشانگرهای بیوشیمیائی ۱۵

۳-۴) نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ۱۵

۳-۵) نشانگرهای DNA مبتنی بر هیبریداسیون ۱۶

فهرست مطالب

۳-۶) نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۱۷
۱) واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۷
۴-۱) ساختمان DNA ۱۷
۴-۲) روش PCR ۱۸
۴-۳) آنزیمهای مورد استفاده در PCR ۱۹
۴-۴) روش بهینه سازی واکنش PCR ۲۰
۵) نشانگر RAPD ۲۲
۵-۱)کاربرد RAPD در اصلاح نباتات ۲۳
۵-۱-۱) نقشه یابی ژنتیکی ۲۴
۵-۱-۲)انتخاب به کمک نشانگر ۲۴
۵-۱-۳)برآورد تنوع ژنتیکی ۲۴
۶) PCR با آغازگرهای نیمه تصادفی ۲۶
۶-۱)کاربرد نشانگرهای نیمه تصادفی در برآورد تنوع ژنتیکی ۲۹

مواد و روشها

۲-۱)مشخصات محل اجرای عملیات زراعی طرح ۳۱
۲-۲)مواد ژنتیکی و طرح آماری مورد استفاده ۳۱
۲-۳)عملیات کاشت و داشت ۳۲
۲-۴) صفات مورد بررسی و نحوه اندازه گیری آنها ۳۲
۲-۴-۱) ارتفاع بوته ۳۲
۲-۴-۲) عملکرد علوفه درهکتار ۳۲
۲-۴-۳) تعداد ساقه اصلی در بوته ۳۲
۲-۴-۴) تعداد غلاف در بوته ۳۲
۲-۴-۵) تعداد دانه در غلاف ۳۲
۲-۴-۶) وزن صد دانه ۳۳
۲-۴-۸) طول غلاف ۳۳
۲-۴-۷)عملکرد علوفه تک بوته ۳۳
۲-۴-۶) وزن صد دانه ۳۳

فهرست مطالب

۲-۴-۷) طول غلاف..... ۳۳

۲-۴-۸)عملکرد علوفه تک..... ۳۳

۲-۵) محاسبات آماری..... ۳۳

۲-۶) زمان و مکان انجام آزمایش..... ۳۳

۲-۷)استخراج DNA..... ۳۳

۲-۸)محلول های مورد استفاده..... ۳۴

۲-۹) نکات مهم در استخراج DNA..... ۳۵

۲-۸) شرایط استخراج DNA..... ۳۸

۲-۱۰)تعیین کمیّت و کیفیت DNA..... ۳۸

۲-۱۱) واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز (PCR)..... ۳۸

۲-۱۲)محاسبات آماری..... ۴۱

۲-۱۴) روش‌های آماری تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی..... ۴۲

نتایج و بحث

۳-۱) ارزیابی صفات زراعی و مورفولوژیکی..... ۴۵

۳-۱-۱)تجزیه واریانس صفات..... ۴۸

۳-۱-۲)ضریب همبستگی..... ۵۴

۳-۱-۳)تجزیه و تحلیل ضرایب مسیر..... ۵۵

۳-۱-۴)تجزیه خوشه ایی..... ۵۸

۳-۲)ارزیابی نتایج نشانگرهای مولکولی..... ۶۰

۳-۲-۱) نشانگر RAPD..... ۶۰

۳-۲-۲) نشانگر با آغازگرهای نیمه تصادفی..... ۶۵

۳-۲-۳) مقایسه آغازگرهای تصادفی ونیمه‌تصادفی..... ۶۸

۳-۲-۴) مقایسه بین گروه‌بندیهای حاصل از صفات مورفولوژیکی و داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی..... ۷۰

فصل اول

مقدمه

و بررسی منابع

مقدمه:

امروزه، اگر چه افزایش سریع جمعیت همراه با پیشرفتهای قابل توجه در زمینه استفاده هر چه بیشتر و بهتر از تمامی منابع آبی، خاکی، گیاه و نیروی انسانی موجب افزایش کمیّت و کیفیّت تولید و تنوع فراورده‌های غذایی در سطح جهانی شده است، با این حال هر روز نیاز به تولید بیشتر غذا احساس می‌شود .

در سطح کشور ما نیز با توجه به افزایش قابل توجه جمعیت، نیاز به افزایش تولید محصولات زراعی جهت تغذیه انسان و دام وجود دارد. چنانچه جیره غذایی هر واحد دامی به طور متوسط دو کیلوگرم علوفه خشک در روز در نظر گرفته شود، هر واحد دامی سالانه به حدود ۷۰۰ کیلوَ گرم علوفه خشک نیازمند است. از طرفی طبق آمار موجود سطح کل مراتع کشور ۱۰۰ میلیون هکتار برآورد شده است که در سه گروه خوب، متوسط و مخروبه قرار دارند و مساحت این سه گروه از مراتع ۲۵،۵۶،۲۰ میلیون هکتار می باشد . متوسط تولید این مراتع نیز به ترتیب ۴۵۰، ۱۵۰و ۳۰ کیلوگرم علوفه خشک در هکتار است که مجموع تولید علوفه خشک کل مراتع کشور سالانه حدود ۱۴ میلیارد کیلوگرم می باشد و لذا این مقدار علوفه با توجه به نیاز سالانه یک واحد دامی، فقط قادر تغذیه ۲۰ میلیون واحد دامی می باشد(۱۷).

حدود ۱۰ میلیون واحد دامی دیگر نیز از طریق علوفه حاصل از زراعت گیاهان علوفه‌ای تغذیه می‌شوند؛ این در حالی است که ۷۰ میلیون واحد دامی باقی مانده بایستی از طریق مراتع مصنوعی و منابع غذایی متفرقه تغذیه شوند که این امکان در ایران وجود ندارد و لذا زنده‌ماندن و تعلیف این تعداد دام به بهای تخریب مراتع تمام می‌گردد. طبق گزارشات موجود متوسط فرسایش خاک در واحد سطح در ایران از همه کشورها بیشتر است و سالانه مقدار زیادی از اراضی حاصلخیز تخریب می گردد (۱۷).

با توجه به موارد ذکر شده، لزوم حفاظت خاک در اراضی زراعی و مرتعی، افزایش تولید در واحد سطح به منظور تولید علوفه مورد نیاز، حفظ دام موجود جهت تولید پروتئین مورد نیاز کشور و توجه ویژه به بهنژادی و بهزراعی گیاهان علوفه‌ای باید در اولویت قرار گیرند.

خلر با نام علمی *Lathyrus sativus* L. متعلق به خانواده بقولات (نیامداران) و طایفه Vicieae می‌باشد. تمامی گونه‌های جنس *Lathyrus* دارای 2n=2x=14 کروموزوم با تعداد کروموزوم پایه n=x=7 می‌باشند(۲۱). خلر به لحاظ

دارابودن ارزش غذایی زیاد بویژه محتوای پروتئین بالا در دانه (۳۴-۱۸ درصد) و در برگهای بالغ (۱۷ درصد) و نیز محتوای لایسین بالا گیاهی بعنوان یک گیاه علوفه ای ارزشمند شناخته می شود(۲۴)تنوع بالای درون جوامع توده‌ها یا ارقام بومی موجب انعطاف‌پذیر بودن و سازگار شدن آنها به شرایط نامساعد محیطی گردیده است. با وجود اینکه ارقام بومی در مقایسه با ارقام جدید از پایداری عملکرد بهتری برخوردارند و در شرایط نامساعد محیطی آسیب‌پذیری کمتری نسبت به ارقام جدید دارند، اما عملکرد پائین این ارقام موجب جایگزینی آنها توسط ارقام اصلاح شده گردیده است (۲). با این وجود ارقام محلی به لحاظ داشتن ژنهای مفید از جمله ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها و آفات، کیفیت مواد غذائی، سازگاری به شرایط نامساعد محیطی و یا ژن‌هایی که تاکنون ناشناخته مانده‌اند و در آینده می‌توانند بسیار ارزشمند باشند، حائز اهمیت هستند(۲۷). گیاه خلّر در جنوب آسیا و اتیوپی بیش از ۲۵۰۰ سال به عنوان تغذیه انسان و دام بکار گرفته شده است (۲۱).

خلّر به لحاظ دارا بودن ویژگیهایی منحصر به فرد به عنوان محصولی جذاب در مناطق خشک و مناطق با کیفیّت خاک پایین و شرایط دشوار محیطی شناخته می شود (۲۱). سیستم ریشه‌ای پایدار و مناسب داشته و بنابراین در دامنه وسیعی از خاکها شامل خاک بسیار فقیر تا رس سنگین کشت می شود. مقاومت کیاه خلر به خشکی و فقر خاک به همراه توانایی آن در تثبیت نیتروژن جو، این گیاه را برای کشت در شرایط نامساعد مناسب ایده آل نموده است(۲۱). با توجه به اینکه کشور ایران احتمالاً از مراکزاصلی تنوع این گیاه در جهان است (۲۷) و از لحاظ پژوهشی این گیاه مورد بی توجهی بوده است ، بنابراین جنبه های مختلف تحقیقاتی این گیاه ضروری می‌باشد .

افزایش عملکرد اقتصادی از جمله عملکرد دانه و عملکرد علوفه از اهداف مهم اصلاحی گیاه خلر می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم یک گونه زراعی هم در طرح‌های به نژادی و هم حفاظت از منابع ژنتیکی کاربرد دارد(۵). در این پژوهش توده‌های بومی کشت شده در نواحی مختلف کشور جمع‌آوری و تنوع ژنتیکی آنها را از لحاظ صفات مورفولوژیک و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

۱)کلیاتی درباره گیاه خلر

خلر گیاهی است با نام علمی *Lathyrus sativus* L. که متعلق به خانواده بقولات[1](نیامداران) و طایفه Vicieae می باشد. نامهای دیگر این گیاه عبارتند از: خلر(فارسی) ،*خل* ماش (فارسی) گینه (کردی) ، پولیک و پولکه (آذری) ، grass pea، chickling pea ، chikling vetch، Common chikling (انگلیسی). تمامی گونه‌های جنس *Lathyrus* دارای 2n=2x=14 کروموزوم با تعداد کروموزوم پایه n=x=7 است (۲۱).

۱-۱) خاستگاه و منشاء

اعتقاد بر این است که جنس *Lathyrus* از جنوب‌غربی آسیا و آسیای مرکزی منشا یافته است.گزارشهایی از خلر وحشی در عراق ارائه شده است. اما به طور دقیق مشخص نیست که این موارد بومی هستند یا از مناطقی دیگر به این منطقه وارد شده اند. گزارشی توسط جکسون و یونس (۱۹۸۴) ارائه شده است مبنی بر آنکه که برخی شواهد دیرینه شناسی از منطقه جامور در کردستان عراق حکایت از وجود این گیاه در ۸ هزارسال پیش از میلاد دارد(۴۲). باقیمانده‌هایی ازگونه‌های خلر در علی کوش(۹۵۰۰تا۷۶۰۰ سال قبل از میلاد)و تپه سادز در ایران [2] (۷۵۰۰ تا ۵۷۰۰ سال قبل از میلاد) یافت شده است (۴۲) در بلغارستان اطلاعاتی از ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد وجود دارد که گونه *L. cicera* در آن کشور موجود بوده است. همچنین بقایای خلر در سارویت هندوستان مربوط به ۲۰۰۰ تا ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد گزارش شده است که نشان دهنده انتشار این محصول در جنوب غرب آسیا است. واویلف در سال (۱۹۵۱) آسیا مرکزی، شامل شمال غرب هند ،افغانستان،جمهوری تاجیکستان و ازبکستان وغرب تیان-شان را به عنوان مرکز تنوع خلر شناخته است. در ضمن تلفیق شواهد باستان شناسی و فیتو جغرافیایی، این نظریه را که شبه جزیره بالکان به عنوان خاستگاه این گیاه مطرح باشد را منتفی دانسته است(۷۳). کیسلف پیشنهاد کرد که کشاورزی هر ساله برای غلات و لگوم هایی مثل نخود وعدس که از خاور نزدیک در ۶۰۰۰ سال پیش معرفی شده توانسته است که خلر را در این مناطق به حالت اهلی تبدیل کند(۴۸) . در این گیاه تنوع مورفولوژیکی فراوانی زیادی به خصوص در برخی خصوصیات رویشی مانند طول برگ در این گیاه وجود دارد(۴۱). در حال حاضر ایجاد اشکالی با برگهای بزرگتر ممکن

1- Fabaceae
2- tepe sadz

است در نتیجه انتخاب برای فرم‌های علوفه‌ای به وقوع پیوسته باشد. بنابراین واضح است که ژرم پلاسم پایه فراوانی در بسیاری از کشورها وجود دارد که می‌تواند توسط بهنژادگران در جهت تولید لاین‌های سازگار با هر منطقه به کار گرفته شود.

۱-۲) اهلی شدن وتکامل

به احتمال زیاد گونه *Lathyrus sativus* L. از گونه وحشی نزدیک به خود یعنی *L. cicera* مشتق شده است. این گیاه با بذرهای مشابه خلر از یونان تا ایران یافت می شود (۲۷).

فسیلهای بذور خلر در برخی مکان‌های ماقبل تاریخ یافت شده است. همچنین خلر در ایتالیا و جنوب شرقی فرانسه نیز مشاهده گردیده است .اولین نمونه مکشوف آن مربوط به عصر برنز در پرتغال است. اکثر نمونه‌های یافت شده در شمال اروپا مربوط به مجارستان می‌باشد. هیبرید بین گونه‌ای در گیاه خلر به دشواری حاصل می‌شود . توانایی *L. sativus* و *L. cicera* برای هیبریداسیون توسط لویین توصیف شده است(۵۱)، او کشف کرد که رابطه‌ایی نزدیک بین این دو گونه وجود دارد. هیبریداسیون بین دو گونه *L. sativus* و *L. amphicarpus* در ترکیه نیز صورت گرفته است.

۱-۳)گیاه شناسی

خلر گیاهی است یکساله، علفی، با ساقه‌های غیرخشبی که دارای انشعابات زیاد می‌باشد و خزنده یا بالا رونده است گیاه تازه سبز شده به صورت موقت حالت برافراشته دارد. عمق ریشه آن از ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی متر متغیر است. ریشه‌های جانبی به خوبی توسعه یافته‌اند و درکل گیاه خلر دارای سیستم ریشه‌ای قوی می‌باشد. گره‌های ریشه (ریزوبیوم ها) هم بر روی ریشه اصلی و هم بر روی ریشه فرعی ظاهر می شوند. اندازه گره‌ها کوچک و به شکل استوانه‌ای، منشعب و متراکم است که به صورت مجتمع دیده می‌شوند. رنگ کلی اندام هوایی، سبز متمایل به آبی با ساقه های نواری ، چهارگوش و با لبه‌های تیز است. در برخی از واریته‌های قدیمی، طول ساقه در طی رشد بالغ بر ۹ متر نیز می‌رسد. برگها بلند و تا حدودی پهن می‌باشند. دمبرگ آنها ناودانی شکل و یا لبه‌دار است. برگهای قسمتهای تحتانی گیاه دارای پیچک بلند و بدون انشعاب مب باشد و حال آنکه، برگهای قسمت فوقانی دارای پیچک‌های منشعب

است. گلها مانند سایر لگومها دارای ناو و درفش بوده و رنگ آن ممکن است آبی خالص، سفید خالص یا بینابین باشد(۲۱).

علاوه بر این رنگ گلها ممکن است بنفش، قرمز و صورتی بوده و رنگ گلبرگها به طرف دمگل، سفید و شیری شود. معمولاً طول برگچه‌ها، بیشتر از طول دمبرگ اصلی یا فاصله بین دو گره است. طول برگچه‌ها در حدود ۱۵ تا ۶۰ میلیمتر و عرض آنها معادل ۳ تا ۷ میلیمتر و یا بیشتر است. گوشوارک به شکل نیزه‌ای سرتیز است که در قاعده دارای چند برجستگی است. نیام ، اندازه‌های مختلفی داشته و دارای بذرهایی با رنگ مختلط و در برخی موارد سفید یا تیره است. وزن هزار دانه در دامنه بین ۳۰۰-۳۰ گرم متغیر است.(۲۱)

۱-۴) خصوصیات زراعی و اکولوژیکی

خلر نسبت به شرایط خشکی بسیار مقاوم بوده و در مناطقی با متوسط بارندگی سالانه۲۵۰ تا ۵۰۰ میلیمتر با موفقیت کشت شده است(۲۱). علاوه بر مقاومت به خشکی، این گیاه به شرایط غرقابی نیز مقاوم است. گیاه خلر سیستم ریشه‌ایی قوی و نافذی داشته و می‌تواند در دامنه وسیعی از خاکها، شامل خاکهای خیلی فقیر و خاک‌های رسی سنگین رشد نماید. قوی بودن ریشه، این گیاه را برای کشت در شرایط نامساعد مناسب ساخته است.

خاک‌های آهک‌دار و سبک که تا حدودی دارای رطوبت نسبی متوسطی باشند ، مناسب رشد و نمو خلر هستند.طی آزمایشی در ایتالیا معلوم شد که شخم پاییزه برای کاشت این گیاه برای عملکرد دانه و ماده خشک مناسب است(۲۱). این گیاه در مناطق گرم کمتر کشت می شود و در صورت کشت، عملکرد ناچیزی را داراست. خلر در هند ۱۵ روز پس از برداشت برنج در شالیزارها تحت شرایط بارندگی کشت می‌شود. در سیستمهای کشاورزی قدیمی، معمولاً فرمهای کوچک بذر سازگار شده‌اند، در حالیکه در مناطق مرتفع انواع دانه‌درشت آن کاشته می‌شود. عملکرد بذر در شالیزارها کم می‌باشد (۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار)، در صورتیکه متوسط عملکرد در مناطق مرتفع بین ۶۰۰-۵۰۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است. این گیاه همچنین به صورت مخلوط با جو، گندم و نخود نیز کاشته می‌شود(۲۰).

۱-۵)ارزش غذایی خلر

مطالعات اندکی در رابطه با ارزش غذایی خلر صورت گرفته است. با این وجود خلر به لحاظ ارزش غـذایی زیـادش بویژه محتوای پروتئین بالای۳۴-۱۸ واحد وزن خشک دانه‌ها و ۱۷ درصد برگهای بالغ و محتـوای لایسـین بـالای آن شناخته شده است(۶۷). جدول ۱-۱ ترکیبات مختلف مربوط به چهار نمونه خلر کاشته شده در مونتینیـا کانـادا را نشـان می دهد.

آلتور و همکاران در سال ۱۹۹۴ از چند گونه جنس لاتیروس لاینهایی را گزینش کردند و در نهایت دریافتند میانگین پروتئین خام۳۲/۵٪ در ماده خشک *L. sativus* و ۲۹/۵٪ در *L. cicera* بوده است (۶۷).

جدول۱-۱) ترکیبات چهار نمونه از دانه گیاه خلر

	نوع ماده	محتوای دانه		نوع ماده	محتوای دانه
۱	آب (درصد)	۷/۵-۸/۲	۶	کلسیم(mg/kg)	۰/۰۷-۰/۱۲
۲	نشاسته(درصد)	۴۸-۵۲/۳	۷	فسفات(mg/kg)	۰/۳۷-۰/۴۶
۳	پروتیین(درصد)	۲۵/۶-۲۸/۳	۸	لایزین(mg/kg)	۱۸/۴-۲۰/۴
۴	ADF(درصد)	۴/۳-۷/۳	۹	ترونین(mg/kg)	۱۰-۱۱/۵
۵	چربی(درصد)	۰/۵۸-۰/۸	۱۰	سیستئین(mg/kg)	۳/۸-۴/۳

۱-۶) بازدارنده‌های مواد غذایی و مواد سمی موجود در گونه‌های خلر

مطالعه دشپاندا و کامپیل (۱۹۹۲) بر روی فاکتورهای ضد تغذیه ایی ۱۰۰ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم خلر نشـان داد کـه همبستگی قوی بین مصرف خلر و یک بیماری عصبی بنام لاتیریسم وجود دارد(۳۲). این سم عصبی در حقیقت ماده‌ای بنام بتا-ان-اکسالیل- ال- ا و یا بتا-دی آمینوپروپونیک اسـید (بـا علائـم اختصـاری ODAP ویـا BOAA) اسـت و درتمام قسمت‌های گیاه یافت می‌شود(۳۲). ODAP اولین بار توسط بل (۲۳) هنگامی تشخیص داده شد کـه اجـزای واکنش نین‌هیدرین را در بسیاری از گونه های خلر شناسایی گردید. در استرالیا رقمی از گونه *L. cicera* آزاد شده کـه محتوای ODAP بالایی داشته و برای مناطق با بارندگی پایین (دیم) توصیه شده است(۲۳). بیشترین میزان ODAPدر برگ در مرحله رویشی و در مرحله تولید مثل در جنین مشاهده شده است.

۱-۷) راهکارهای بیوتکنولوژی برای ایجاد ارقام غیر سمی خلر

با وجود ماده سمی ODAP در خلر، کشت آن در هندوستان متداول بوده زیرا کشت این محصول نیازمند هیچگونه هزینه اولیه نبوده و گیاه به شرایط دشوار خشکی و غرقابی مقاوم است. بیماری ناشی از تغذیه این محصول به صورت رایج در ایالت ماهایاپرادش مشاهده می‌شود، زیرا مردم از آن به عنوان یک غذای اصلی بویژه در شرایط قحطی بهره می‌برند. بیماری نئرولاتیرسم هنگامی شایع می‌شود که از خلر به عنوان غذایی اصلی به مدت طولانی استفاده شود. تلاشهای به‌نژادگران در طول دو تا سه دهه اخیر منجر به دستیابی به لاینهایی مانند P24 و LSD3 شده که محتوای اندکی از ODAP ۰/۲ تا ۰/۳ درصد در مقایسه با ارقام متداول و تجاری که ۰/۶ تا ۰/۷ درصد است، جالب توجه می باشد. میزانODAP دارای توزیع متفاوتی در قسمت‌های مختلف گیاه است (جدول۱-۲)(۲۱).

جدول۱-۲) توزیع بتا-ان-اکسالیل- ال- ا در بافتهای مختلف گیاه خلّر

عضو گیاهی	میزان ODAP (mg/100gr)
ریشه	۱۴
ساقه	۶۴
برگ	۶۰
غلاف	۲۴
پوسته بذر	۸۱
جنین	۴۰۰
لپه	۱۲۶

با بکارگیری تکنیکهای جدید بیوتکنولوژی گیاهی، گیاهان تراریخته با استفاده از کلون کردن ژنها و خاموش کردن ژنهای سازنده ODAP امکان پذیر شده است. با توجه به اهمیت این گیاه از لحاظ کمیت و کیفیت پروتئین، تاکنون تکنیک‌های بیوتکنولوژی مختلفی در جهت حذف ODAP از خلر مورد استفاده قرار گرفته است. این هدف به منظور نیل به راهکارهای اصلاحی مشتمل بر سه روش اصلی زیر بوده است :

الف- بهره برداری از تنوع سوماکلونی

ب- جداسازی ژن باکتری که توانایی نابودی ODAP را دارد و کلون کردن این ژن باکتری و انتقال آن به خلر

جاستفاده از روش آنتی سنس/ ریبوزوم برای خاموش کردن ژنی که در سنتز ODAP موثر است.

ODAP توسط دو پایانه آنزیمی درگیر با نامهای oxalyl coA synthetase و ODAP synthetase ساخته می‌شود. خاموش کردن هر یک از این دو آنزیم توسط مهندسی آنتی سیس/ریبوزوم منجر به سنتز کمتر ODAP می‌گردد.

۱-۸)تثبیت نیتروژن

با توجه به اینکه خلر از خانواده بقولات است و نیتروژن اتمسفر را تثبیت می‌نماید در بسیاری از موارد خلر را در تناوب کشت ،قبل از محصول برنج یا همراه برنج قرارمی‌دهد. رشد محسوسی کـه بواسـطه تثبیـت ازت توسـط خلـر صـورت می‌گیرد نه تنها برای افزایش عملکرد خود گیاه بلکه برای کشاورزی ارگانیک و پایدار نیز حایز اهمیت می باشد. بـدین منوال این گیاه به خوبی خود را برای نظام های کشاورزی پایدار وفق داده است (۲۱).

۱-۹)کاربردها

خلر از بقولات یکساله است که عموماً برای تولید دانه کشت می‌شود. همچنین در تعلیف دام از آن به صورت علوفه سبز استفاده می گردد . انواع رویشی آن در تولید علوفه و خوراک دام برای حیوانات به کار می‌رود. گیاه جوان به عنوان علوفه برای گاو یا برای چراگاه در کشورهایی مثل بنگلادش استفاده می‌شود. عموماً برداشت اول آن بصورت چراگاه مورد استفاده قرار گرفته و سپس اجازه رشد مجدد به آن داده و در نهایت بذر آن را برداشت می‌کنند (۲۷).

گوادا و کوییل عملکرد علوفه ۷ تا ۱۰ تن در هر هکتار را طی کشت مخلوط با ذرت بدست آورند، بدون اینکه تاثیری بر عملکرد دانه ذرت گزارش نمودند(۳۵). باقیمانده کاه و کلش بعد از برداشت اغلب مهمترین فاکتور برای تولید محصول در جنوب شرقی آسیا است. در ایالت سند پاکستان از بذر خلر برداشت شده ۶۰ درصد به مصرف دام و ۴۰ درصد به مصرف انسان می‌رسد.در اروپا و استرالیا از این گیاه بصورت چند منظوره برای تولید دانه جهت تغذیه دام، علوفه و سیلوی علوفه برای تغذیه دام و کود سبز استفاده می‌شود (۲۷).

۱-۱۰) موقعیت خلر در ایران

این گیاه چندین دههٔ پیش سطح کشت نسبتاً زیادی را در ایران به خود اختصاص داده بود، در حالی‌که امروزه سطح کشت این گیاه کاهش یافته است این گیاه در مناطق مختلف کشور در قسمتهای شمال شرقی، جنوب، غرب و شمال‌غربی با اهدافی از قبیل مصرف دانه ، علوفه و اصلاح خاک کشت می‌شود. در کل، آمار دقیقی در مورد سطح زیر کشت و عملکرد آن در گذشته و حال در دسترس نیست. خلر در قسمتهای جنوبی کشور به عنوان گیاهی برای اصلاح خاک بکار می‌رود. بذرپاشی به صورت دستی صورت گرفته و متوسط ۱۵۰ تا ۲۰۰ کیلوگرم بذر در هکتار کاشته می‌شود. میزان کود مصرفی در این مناطق، ۲۰ کیلو اوره و ۱۵۰ تا ۲۰۰ کیلوگرم سوپرفسفات به ازای هر هکتار می‌باشد.کشت آن در آذربایجان به صورت خالص یا مختلط همراه با برخی غلات صورت می‌گیرد (۲۱).

۲)تنوع ژنتیکی

موفقیت در اصلاح یک گیاه زراعی در درجه اول به وجود تنوع ژنتیکی در آن گیاه بستگی دارد. ضمن اینکه تنوع ژنتیکی یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار است و وجود تنوع ژنتیکی در نظام‌های زراعی با الهام گرفتن از طبیعت باید همواره مد نظر قرار گیرد(۳). اصلاح‌نباتات بر پایه روش‌هایی استوار است که در جهت تغییر ساختار ژنتیکی گیاه نیل به اهداف انسان صورت می گیرد. در این راستا میزان موفقیت به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاه بستگی دارد. وجود تنوع ژنتیکی برای یک صفت، ارزش متفاوت افراد یا ژنوتیپ‌ها برای آن صفت می‌باشد(۳).

منابع ژنتیکی گیاهی، علاوه بر زیربنائی برای توسعه کشاورزی، بعنوان سپری در برابر تغیرات محیطی عمل می‌کنند. این منابع تامین کننده مواد خام ژنتیکی هستند که در صورت بهره‌برداری صحیح از آنها، ارقام جدید و مطلوب‌تر گیاهی را می‌توان تولید کرد. ذخائر توارثی از خصوصیات مطلوبی نظیر مقاومت به بیماری‌ها و آفات و تنش‌های غیر زنده و سایر صفات مطلوب برخوردار می‌باشند(۳).

۲-۱) اهمیت تنوع ژنتیکی

هنگامی یک اکوسیستم از نظر اکولوژیدر حالت تعادل و تکامل است که از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد. این تنوع باعث تامین قابلیت سازگاری درازمدت و پایداری اکوسیستم می گردد(۱۱). اصلاح‌نباتات یکی از مهمترین راه‌های افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی می‌باشد که بخش مهمی از موفقیت آن به استفاده از یک تنوع وسیع ژنتیکی بستگی دارد(۱). اختلاف اندک ژنتیکی بین والدینی که برای دورگ‌گیری و ایجاد جوامع مورد استفاده قرار می‌گیرند، موجب ایجاد تنوع ژنتیکی اندک در جوامع در حال تفکیک می‌شود. در نتیجه، اصلاح صفات با مشکل مواجه می‌شود(۱۰). مدیریت تنوع طبیعی موجود در ارقام اهلی و خویشاوندان وحشی یک گونه گیاهی در انجام یک برنامه موثر به منظور اصلاح گیاه زراعی بسیار مهم است. یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی نامطلوب می‌باشد، زیرا آنها را نسبت به اپیدمی بیماریها و عوامل محیطی آسیب‌پذیر کرده و در نهایت موجب کاهش عملکرد و عدم پایداری آنها می‌شود(۲۰).

تولیدات کشاورزی کنونی دنیا به استفاده از ژنوتیپ‌های گیاهی پرمحصول متکی است. روش‌های متداول اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ‌های مورد علاقه از تنوع ژنتیکی موجود و دست‌ورزی همه یا برخی از صفات مورد نظر در یک ژنوتیپ به منظور تولید یک رقم تجاری جدید پایه‌گذاری شده اند(۳). کشور ایران با وسعت زیاد و تنوع آب و هوای از جمله مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه‌های گیاهی نیز به حساب می آید. در حال حاضر حدود ۱۲۰۰۰ گونه گیاهی در کشور ما وجود دارد که حدود ۸۰۰۰ گونه آن شناخته شده است. این تنوع به عقیده گیاهشناسان ایرانی، بیش از کل تنوع گیاهی قاره اروپا می‌باشد(۱۵) ذخائر توارثی گیاهی به عنوان باارزش‌ترین و حیاتی‌ترین منابع هر کشور محسوب می‌شوند و ادامه روند افزایش تولید و بهبود کیفیت مواد غذائی بستگی به حفاظت و بکارگیری موثر منابع ژنتیکی گیاهی دارد. بدین منوال نیل به این هدف مستلزم حفاظت، ارزیابی، ثبت و تبادل این منابع است(۱۷).