بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده: کشاورزی تهران

گروه علمی: بیوتکنولوژی

عنوان پایان نامه:

مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های گندم دیم (*Triticum aestivum*) با استفاده از نشانگر RAPD

نگارش:

علی درویشیان

اساتید راهنما:

دکتراحمد اسماعیلی

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

استاد مشاور:

دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

آبان ۱۳۸۸

دانشگاه پیام نور

دانشکده: کشاورزی تهران

گروه علمی: بیوتکنولوژی

عنوان پایان نامه:

مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های گندم دیم (*Triticum aestivum*) با استفاده از نشانگر RAPD

نگارش:

علی درویشیان

اساتید راهنما:

دکتراحمد اسماعیلی

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

استاد مشاور:

دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

آبان ۱۳۸۸

تقدیم به

پدر و مادر فداکارم

بهرام و احسان عزیزم

سپاسگزاری

منت خدای را عز و جل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت.

اکنون که با یاری خدای متعال این تحقیق را به پایان رسانده ام بر خود لازم میدانم از استادان و دوستانی که مرا به نحوی یاری رسانده اند تشکر و قدردانی نمایم.

از اساتید عزیزم آقایان دکتر احمد اسماعیلی و دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی که لطف کردند و راهنمایی پایان نامه را به عهده گرفتند بی نهایت سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی که به عنوان مشاور پایان نامه مرا یاری رساندند تشکر می کنم.

از دوست عزیزم جناب آقای مهندس کامران سمیعی که در تمامی مراحل انجام پایان نامه مشوق و همراه بنده بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اعضای محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان که به بنده اجازه دادند تحقیقات خود را در آزمایشگاه بیوتکنولوژی آن دانشگاه به پایان برسانم و تمامی امکانات را در اختیار بنده قرار دادند تقدیر و تشکر می نمایم.

چکیده:

آگاهی از میزان تنوع موجود در بین ارقام و خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی در مدیریت برنامه های اصلاحی نقش مهمی ایفا می نماید. با به کار گیری نشانگرهای مولکولی اصلاح گیاهان با سرعت و سهولت بیشتری انجام می گیرد و انتخاب والدین برای تلاقی های بعدی در برنامه های اصلاحی با اطمینان بیشتری انجام می گیرد. گندم مهمترین گیاه زراعی ایران و استان لرستان به شمار می رود و در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم و لاین گندم (شامل ۹ رقم هگزاپلوئید، ۲ رقم تتراپلوئید و ١٤ لاین پیشرفته هگزاپلوئید) مورد استفاده در پروژه های تحقیقاتی اصلاحی گندم دیم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۱۹۸۳) استخراج و الگوی باننددهی آنها با ۳۰ آغازگر RAPD مورد مطالعه قرار گرفتند. در مجموع ۲۰۰ باند قابل امتیازدهی به دست آمد که از این تعداد ۱۳۰ باند (٦٥٪) چندشکلی نشان دادند. آغازگر F٤ بیشترین تعداد باند و آغازگر A١٨ کمترین تعداد باند را تولید نمودند. تجزیه خوشه ای براساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) باند با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و مبتنی بر روش UPGMA با نرم افزار NTSYS انجام گرفت. دامنه ضرایب تشابه از ۰/۲۲ تا ۰/۸۷ متغیر بود. میانگین ضرایب تشابه ۰/٦٤ بود. میانگین ضرایب تشابه لاین ها (۰/٦۳) بیشتر از ارقام (۰/٦۰) بود. بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۷) بین ارقام آذر۲ و سرداری که جزو ارقام با تیپ رشد زمستانه هستند و کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۲۲) بین رقم سیمره با لاین BAVICORA مشاهده شد. با برش دندروگرام در نقطه ۰/۷۲، ٦ گروه اصلی به دست آمده و بقیه ارقام و لاین ها به تنهایی هر یک تشکیل یک گروه جداگانه را دادند. همچنین ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام r = ۰/۹٤ به دست آمد که برازش مناسب دندروگرام به ماتریس تشابه را نشان داد. باتوجه به میانگین ضرایب تشابه ارقام و لاین ها، وجود چنین تنوعی در بین آنها از جذابیت مطلوبی برخوردار نبوده و لازم است نسبت به گسترش ژرم پلاسم و تنوع ژنتیکی آنها اقدام شود. نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از نشانگر RAPD برای طبقه بندی و گروه بندی ژنوتیپ های گندم سودمند بوده و از نتایج به دست آمده می توان برای سایر برنامه های اصلاحی گندم بهره جست.

واژه های کلیدی: گندم، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه..... ۲

۱-۲- اهمیت گندم..... ٤

۱-۳- گیاهشناسی گندم..... ۵

۱-٤- ویژگی های گندم نان..... ۵

۱-۵- تکامل ژنوم گندم..... ٦

۱-٦- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن..... ٦

۱-۷- نشانگرهای ژنتیکی..... ۸

۱-۷-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی..... ۹

۱-۷-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی..... ۱۰

۱-۷-۳- نشانگرهای مولکولی..... ۱۰

۱-۷-۳-۱- نشانگرهای پروتئینی..... ۱۱

۱-۷-۳-۲- نشانگرهای مولکولی مبتنی برDNA ۱۱

۱-۷-۳-۲-۱- نشانگرهای DNA مبتنی بر دورگ گیری..... ۱۲

۱-۷-۳-۲-۱-۱- چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP)..... ۱۳

۱-۷-۳-۲-۱-۲- تعداد متفاوت ردیف تکراری یاVNTR و ماهوارک ها.....۱۳

۱-۷-۳-۲-۱-۳- پویش ژنومی نشانه های هضم (RLGS).....۱٤

۱-۷-۳-۲-۲- نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۱٤

۱-۷-۳-۲-۲-۱- ریزماهواره ها (SSR).....۱۵

۱-۷-۳-۲-۲-۲- چند شکلی طولی قطعات تکثیر شده (AFLP).....۱۵

۱-۷-۳-۲-۲-۳- نشانگر RAPD..... .....۱٦

فصل دوم: مرور منابع.....۱۹

فصل سوم: مواد و روش ها.....۳۸

۳-۱- مواد گیاهی.....۳۹

۳-۲- استخراج DNA.....۳۹

۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA.....٤۲

۳-٤- انجام واکنش PCR.....٤۳

۳-۵- الکتروفورز فرآورده های تکثیری.....٤۷

۳-٦- محاسبات آماری.....٤۸

۳-٦-۱- تجزیه خوشه ای.....٤۸

۳-٦-۲- ضریب همبستگی کوفنتیک.....۵۰

۳-٦-۳- تجزیه مؤلفه های اصلی.....۵۰

۳-٦-٤- تجزیه هماهنگ اصلی.....۵۱

فصل چهارم: نتایج و بحث.....۵۲

٤-۱- نتایج حاصل از الکتروفورز DNA ژنومی.....۵۳

٤-٢- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از آغازگرهای تصادفی.....٥٣

٤-٣- مقایسه بین قطعات تولید شده توسط آغازگرها..... ٥٦

٤-٤- نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای.....٥٨

٤-٥- گروه بندی ارقام مورد بررسی.....٦٠

٤-٦- محاسبه ضریب کوفنتیک.....٦١

٤-٧- تجزیه هماهنگ اصلی.....٦٢

٤-٨- تجزیه مؤلفه های اصلی.....٦٤

٤-٩- نتیجه گیری کلی و پیشنهادات.....٦٤

منابع.....٦٦

فصل اول

مقدمه و کلیات

بنام خدا

۱-۱- مقدمه

کمبود مواد غذایی و افزایش روزافزون جمعیت جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه، نگرانی‌های جدی را در رابطه با آینده تولید غذا به وجود آورده است. برای تغذیه جمعیت جهان، تا سال ۲۰۳۰ میلادی باید تولید غذا به مقدار ٪۵۰ میزان فعلی افزایش یابد. جمعیت جهان با رشدی بالغ بر ۸۰ میلیون نفر در هر سال رو به افزایش است که ٪۹۰ از این رشد در کشورهای در حال توسعه از جمله آسیا به وقوع می‌پیوندد [صنعتی و اسماعیل زاده، ۱۳۸۱؛ Khush,۱۹۹۹]. گیاهان زراعی منبع عمده تأمین غذای بشر می‌باشند که در این بین غلات از اهمیت بیشتری برخوردارند. غلات در عین دارا بودن اصلی‌ترین جایگاه تأمین انرژی، نقش ارزنده‌ای در تأمین پروتئین داشته و حدود ٪۶۰ مزارع جهان به کشت این گروه از گیاهان اختصاص دارد [بهنیا، ۱۳۷۶]. گندم نان (*Triticum aestivum*) شاید اولین گیاه زراعی باشد که اهلی شده و توسط انسان مورد کشت و کار قرار گرفته است. این فرایند احتمالاً بین ۱۲ تا ۱۸ هزار سال قبل از میلاد مسیح شروع شده است و در حال حاضر بیشتر جمعیت دنیا وابسته به این گیاه زراعی می‌باشد [راشدمحصل، ۱۳۷۶]. همچنین گیاهی است که به مقدار زیاد و در مساحت وسیعی از زمین های کشاورزی دنیا کشت می شود. این گیاه از نظر تولید و سطح زیر کشت مهمترین محصول کشاورزی ایران است [مندولکانی و همکاران، ۱۳۸۲]. در سال های اخیر، پیشرفت های تحسین برانگیزی که در زمینه زیست شناسی مولکولی و زیست فناوری صورت گرفته است، ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی گیاهان در اختیار متخصصین قرار داده است. فناوری نشانگرهای مبتنی بر DNA، اصلاح گران گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه بندی و حفاظت ژرم پلاسم گیاهی حمایت کرده است [فولاد، ۱۳۷۲؛ قره یاضی، ۱۳۷۵].

شاید بتوان گفت که از مهمترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی DNA در اصلاح نباتات، تخمین تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی مختلف بوده است. اطلاع از این تنوع برای انتخاب دقیق والدین مناسب جهت تولید هیبریدهای قوی، دارای اهمیت فراوان است. همچنین از تنوع ژنتیکی ارزیابی شده توسط نشانگرهای DNA در مطالعات شناسایی ارقام و تجزیه و تحلیل های فیلوژنیک و اکولوژیکی استفاده می‌شود [Sharma *et al*., ۲۰۰۲؛ Kumar, ۱۹۹۹].

فناوری RAPD یکی از فناوری هایی است که به طور گسترده در بررسی های ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد زیرا قادر است با استفاده از مقادیر کم DNA اختلافات موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی کند و نیاز به اطلاعات قبلی در مورد ژنوم ندارد [Garcia *et al*., ۲۰۰۲]. این خصوصیت که در RAPD از آغازگرهای تصادفی استفاده می شود و نیاز به DNA کمی دارد باعث شده به روشی ساده برای تجزیه و تحلیل سریع تبدیل گردد [Heun and Helentjaris, ۱۹۹۳]. بنابراین از این روش می توان به طور گسترده در ژنتیک گیاهی و به منظور ساخت نقشه های نشانگری اشباع در کوتاه مدت استفاده کرد [Williams *et al*., ۱۹۹۰]. مشخص شده که فناوری RAPD روشی مناسب برای مطالعات طبقه بندی گیاهان، بررسی روابط ژنتیکی، بررسی ساختار ژنتیکی جامعه، برنامه ریزی تولید هیبرید و شناسایی والدین افراد است [Mace *et al*., ۱۹۹۹]. از این روش به طور گسترده برای بررسی تنوع ژنتیکی در گونه های گندم استفاده شده است [رامشینی، ۱۳۸۳؛ Joshi and Nguyen, ۱۹۹۳]. اطلاعات به دست آمده از روش RAPD در مطالعات تنوع ژنتیکی در سطح درون گونه ای با نشانگرهای دیگر تطابق داشته و به علت پائین بودن هزینه برای تجزیه ژنتیکی جمعیت ها در مقیاس بزرگ مناسب می باشد [موسوی زاده وهمکاران، ۱۳۸۵]. همچنین ثابت شده در گیاهان خودگشن که تنوع درون گونه ای کمی دارند مثل گندم هگزاپلوئید، RAPD یکی از نشانگرهای مفید است. کاربرد این نشانگر در گندم ابتدا از تکرارپذیری کمی برخوردار بود و مقدار چندشکلی به دست آمده ناچیز بود. محققین این مشکلات را ناشی از اندازه بزرگ ژنوم و وجود DNA تکراری می دانستند. مطالعات بعدی نشان داد که به کارگیری دقت کافی و کنترل دقیق شرایط برای کاربرد موفق این

روش در گندم نان ضروری است از آن زمان به بعد مطالعات گسترده ای برای بررسی تنوع ژنتیکی در گندم نان صورت گرفته است [Fahima *et al*., ۱۹۹۹]. افراد دیگری نیز نشان داده اند که بخش زیادی از باند های RAPD در صورت رعایت دقت لازم برای تهیه یک دستورالعمل استاندارد که در تمام واکنش ها یکسان باشد، دارای تکرارپذیری بالایی هستند [Garcia *et al*., ۲۰۰۲]. علاوه بر گندم تاکنون به کارگیری این روش برای بررسی چندشکلی در بسیاری از گونه های گیاهی انجام گرفته است [فرهادی و همکاران، ۱۳۸٦؛ لطفی و همکاران، ۱۳۸٦؛ قهرمان زاده و همکاران، ۱۳۸٤؛ پژمان مهر و همکاران، ۱۳۸٦؛ منیری فر و رزبان حقیقی، ۱۳۸٦؛ رمضانی مقدم و همکاران، ۱۳۸٦؛ زمانی و همکاران، ۱۳۸٦؛ زاهدی و همکاران، ۱۳۸٦؛ مهدیخانی و همکاران، ۱۳۸٦؛ موسوی زاده وهمکاران، ۱۳۸۵؛ فارسی و همکاران، ۱۳۸۲؛ طالبی بداف و همکاران، ۱۳۸۲].

کشور ایران دارای اقلیم خشک و نیمه خشک بوده، کاهش بارندگی در برخی سال ها در اکثر مناطق منجر به بروز تنش خشکی به خصوص در مراحل انتهایی رشد اکثر گیاهان می‌گردد [کوچکی، ۱۳۷٦]. به همین دلیل در حال حاضر نیاز ضروری به تحقیقات در زمینه شناسایی، جمع‌آوری و تولید ژنوتیپ های متحمل و مقاوم به خشکی در گندم (گندم دیم) در کشور احساس می‌گردد و استفاده از روش‌های مولکولی از جمله نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری کارا در این جهت، حائز اهمیت فراوان است. در این تحقیق ۲۵ ژنوتیپ گندم (۲۳ ژنوتیپ از گروه گندم های هگزاپلوئید و ۲ ژنوتیپ از گروه گندم های تتراپلوئید) شامل ارقام و لاین‌های گندم دیم که در ایران و بیشتر در منطقه غرب کشور کشت می گردند به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین آنها با استفاده از نشانگر RAPD مورد آزمایش قرار گرفتند.

۱-۲- اهمیت گندم

گندم از مهمترین گیاهان زراعی بوده و گیاه زراعتی اصلی ایران به شمار می‌رود [یزدی صمدی

و عبدمیشانی، ۱۳۷۳]. دانه های غلات ٪۶۸ از فرآورده های غذایی مورد نیاز بشر را فراهم می کنند و در این میان گندم غله اصلی در تأمین غذا برای مردم جهان است که نیازهای انرژی و پروتئینی را فراهم می کند. کشت گندم هزاران سال قبل از میلاد مسیح شروع شد و سبب اسکان دایمی بشر در کنار کشت زارها و توسعه تمدن های بشری در خاورمیانه شد و سپس به اروپا گسترش یافت. بنابراین تخمین زده می شود که فرآیند اهلی شدن گندم احتمالا بین ۱۲ تا ۱۸ هزار سال قبل از میلاد شروع شده است [Bushuk and Rasper, ۱۹۹٤]. گندم عمدتاً بین ۳۰ تا ٦۰ درجه عرض جغرافیایی در منطقه نیمکره شمالی و ۲۵ تا ٤۰ درجه عرض جغرافیایی در منطقه نیمکره جنوبی تولید می شود [مجنون حسینی، ۱۳۸۳]. سازگاری و انعطاف‌پذیری، معیارهایی از گندم هستند که آن را به عنوان یک منبع غذایی، معتبر ساخته است [راشدمحصل و همکاران، ۱۳۷٦]. تنوع محصولات و کیفیت های انباری گندم نان آن را غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان ساخته است [پولمن و اسلیپر، ۱۳۸۰]. تولید گندم در دنیا در درجه اول برای تغذیه انسان و در درجه دوم برای تغذیه دام و مصارف صنعتی می‌باشد. از کل گندم تولیدی جهان، بیش از ٪۷۰ آن برای تهیه نان به مصرف می‌رسد [خدابنده، ۱۳۷۱]. گندم محصولی است که در مناطق مختلف دنیا گشت می‌گردد. این گیاه در جایی که متوسط بارندگی سالانه ۲۵۰ تا ۱۷۵۰ میلی متر باشد کشت می‌گردد. اما حدود سه چهارم از زمین هایی که به کشت گندم اختصاص دارند، دارای متوسط بارندگی ۳۷۵ تا ۸۷۵ میلی متر هستند [راشدمحصل و همکاران، ۱۳۷٦]. کشت گندم از پائین تر از سطح دریا تا ارتفاع ۳۰۵۰ متری از سطح دریا در کنیا و ٤۵۷۲ متری در تبت انجام می گیرد. درضمن گندم در شرایط آب و هوایی نیمه استوایی معتدل گرم و معتدل سرد رشد می نماید [بهنیا، ۱۳۷٦]. حداقل درجه حرارت برای رشد آن ۳ تا ٤ درجه سانتی گراد و درجه حرارت مناسب برای رشد آن ۲۵ درجه سانتی گراد است [راشدمحصل و همکاران، ۱۳۷٦]. گندم از نظر ارزش غذایی با سایر غلات عمده قابل رقابت بوده و پروتئین محتوی آن بیش از آنهاست. در ایران نان حاصل از گندم مهمترین منبع غذایی روزانه مردم است و بالغ بر ٪٤۰ کل انرژی مورد احتیاج مردم را تأمین می نماید [مجنون حسینی، ۱۳۸۳]. سطح زیر

کشت گندم در ایران، براساس گزارش اداره کل آمار و اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی در سال ۸۴ – ۸۳ بالغ بر ۶/۹۵ میلیون هکتار که ٪۳۷/۹ آبی و ٪۶۲/۱ آن به صورت دیم بوده است و میزان تولید گندم در کشور ۱۴/۳۱ میلیون تن بوده که از این مقدار ٪۶۹/۷ از کشت آبی و ٪۳۰/۳ آن از کشت دیم تولید شده است [آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۵].

۱-۳- گیاهشناسی گندم

گندم متعلق به جنس *Triticum.sp* و خانواده غلات Gramineae است. گندم گیاهی تک‌لپه، علفی، یک ساله و دارای گونه های فراوانی است که تنها ۳ گونه آن دارای ارزش اقتصادی هستند که مهمترین آنها گندم نان *T.aestivum* می‌باشد که در سراسر جهان کشت می‌گردد [خدابنده، ۱۳۷۱]. ریشه گندم افشان و سطحی است و ساقه آن مانند تمامی گیاهان تیره غلات بندبند و توخالی (ماشوره‌ای) است. در روی هر ساقه گندم معمولاً ۷ تا ۸ برگ به طور متناوب از محل گره های ساقه خارج شده و در انتهای هر ساقه گندم یک سنبله وجود دارد که دارای یک محور اصلی است و در روی محور اصلی، سنبلچه ها به وجود می‌آیند که هر یک دارای ۳ الی ۵ گل می‌باشند. هر گلچه شامل یک مادگی و ۳ پرچم است. گندم گیاهی خودگشن بوده و میزان خودگشنی در آن بیش از ٪۹۵ می‌باشد. با این حال در این گیاه حدود یک تا چهار درصد عمل دگرگشنی صورت می‌گیرد [خدابنده، ۱۳۷۱؛ بهنیا، ۱۳۷۶].

۱-۴- ویژگی های گندم نان

این گندم از گروه گندم های هگزاپلوئید با ۴۲ کروموزوم (۲n = ۶x = ۴۲) است و به گندم های نرم یا معمولی یا نان معروفند. ژنوم آن AABBDD است و ۶ دسته کروموزومی آن در زمان های قدیم از تلاقی گندم های دیپلوئید و ترا پلوئید به وجود آمده اند. از مشخصات این گندم می توان به موارد زیر اشاره کرد: سنبله آن طویل، باریک و نسبتاً صاف است، قسمت رویی سنبله

(قسمتی که پوشه قرار گرفته است) از قسمت پهلویی خیلی عریض تر نیست (مقطع خوشه به مربع نزدیک تر است)، این گندم ها در صورتی که دارای ریشک باشند، ریشک با سنبله تشکیل زاویه می دهد، همچنین طول ریشک ها معمولاً کوتاهتر از طول سنبله است. گلوم دارای برآمدگی است ولی تا انتهای گلوم ادامه پیدا نمی کند و قبل از رسیدن به آخر گلوم محو می شود. سطح گلوم محدب است ولی نرسیده به انتهای گلوم فرورفتگی پیدا می کند. پوشه کوتاهتر از پوشینه است. نوک گلوم ممکن است دندانه ای رشد کرده و تا حد ریشک برسد. ساقه ها عموماً ماشوره ای هستند. تعداد دانه در هر سنبلچه ۲ تا ۸ عدد است و تعداد سنبلچه در خوشه ممکن است به ۲۸ عدد برسد [خدابنده، ۱۳۷۱؛ کریمی، ۱۳۷۱].

۱-۵- تکامل ژنوم گندم

مطالعات باستان شناسی نشان می دهد که در حدود ۱۰۰۰۰ سال قبل از میلاد گندم های اینکورن[۱] وحشی در خاور نزدیک کشت می شده اند. این گندم ها دارای ساقه نازک تر و بسیار ظریف تری بودند و بذور و ساقه های آنها در شمال سوریه پیدا شده اند. از تلاقی این گندم ها با هم فرم های تترا پلوئید گندم امر[۲] وحشی به وجود آمدند که از نظر کشت قدمتی در حدود گونه های دیپلوئید دارند. در اثر گزینش و انتخاب توسط بشر گندم های امر اهلی از فرم های وحشی به وجود آمدند که بذور درشتی داشتند و در هنگام برداشت ریزش نمی کردند. از تلاقی گندم های تترا پلوئید امر و فرم های دیپلوئید گونه های هگزاپلوئید گندم به وجود آمدند که فرم های اولیه آنها گندم هگزاپلوئید اسپلتا[۳] است و در اثر گزینش و انتخاب گندم های نان امروزی به وجود آمدند [کریمی، ۱۳۷۱]. گندم یک آلوپلوئید قطعه ای است که شامل ۳ ژنوم A و B و C است که از لحاظ ژنتیکی همیولوگ[۴] هستند. DNA هاپلوئید گندم تقریبا شامل $۱/۷\times۱۰^{۱۰}$ جفت باز است. دلیل بزرگ بودن ژنوم گندم پلی پلوئیدی و مضاعف شدن های زیاد است. بیش از

---

۱ - Einkorn
۲ - Emmer
۳ - Spelta
۴ - Homeologous

۸۰٪ ژنوم گندم شامل توالی های تکراری است. این مشخصات گندم را برای مطالعات سیتوژنتیکی مناسب کرده است، ولی تهیه نقشه های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی را در آن مسأله ساز کرده است، یعنی بسیاری از نشانگرهای مولکولی قادر به کشف چندشکلی کافی در گندم نیستند [Gupta *et al*., ۱۹۹۹].

۱-۶- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن

موفقیت گذشته، حال و آینده اصلاح گران نبات به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها بستگی دارد [Kumar, ۱۹۹۹]. کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه های موردنظر در برنامه های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و نمونه گیری مؤثر از ژنوتیپ ها را فراهم می سازد [عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۱]. در آغاز یک برنامه اصلاحی، آگاهی از روابط خویشاوندی و فیلوژنی در میان ژنوتیپ ها تکمیل کننده اطلاعات فنوتیپی در پیشبرد اصلاح جمعیت ها است [فارسی و همکاران، ۱۳۸۲]. موفقیت در اصلاح یک گیاه زراعی در درجه اول به دسترسی تنوع ژنتیکی موجود در آن گیاه بستگی دارد. ضمن اینکه تنوع ژنتیکی یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار است و وجود تنوع ژنتیکی در نظام های زراعی باید همواره مد نظر قرار گیرد. اصلاح نباتات به کمک زیست فناوری گیاهی، با تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان به دنبال افزایش پایدار عملکرد می‌باشند. لازمه هر تغییر و گزینشی، وجود تنوع است. تنوع ژنتیکی یک صفت، ارزش متفاوت افراد یا ژنوتیپ ها برای آن صفت می‌باشد [باقری و همکاران، ۱۳۷۵]. تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقا موجودات از جمله گیاهان زراعی در برابر تغییرات شرایط آب و هوایی و آفات است [چاولا، ۱۳۸۲]. تنوع ژنتیکی به طور کلی به عنوان یک شاخص جهت انتخاب والدین در برنامه های اصلاحی و دورگ گیری مورد نظر قرار می گیرد. گزارشات زیادی در مورد استفاده از تعیین فاصله ژنتیکی جهت انتخاب والدین مناسب در مورد گندم و دیگر گیاهان

زراعی گزارش شده است [فرشادفر، ۱۳۷۵]. منابع ژنتیکی گیاهی، علاوه بر زیربنایی برای توسعه کشاورزی، به عنوان سپری در برابر تغییرات محیطی عمل می‌کنند. این منابع تأمین کننده مواد خام ژنتیکی هستند که در صورت بهره برداری صحیح از آنها، واریته های جدید و مطلوب تر گیاهی را می‌توان تولید کرد. ذخایر توارثی از خصوصیات غیر قابل جایگزینی نظیر مقاومت به بیماری‌ها و آفات و تنش‌های غیر زنده و سایر صفات مطلوب برخوردار می‌باشند [عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۱]. یکی از پیامدهای اجتناب ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از ارقام اصلاح شده با بیشترین عملکرد و کیفیت قابل قبول است کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی است. اگرچه تخمین کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و در برخی موارد غیر ممکن است، اما در اینکه بسیاری از ژن های مفید از دست رفته اند، ذخایر ژنتیکی با سرعت فزاینده ای کاهش یافته اند و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش های زیستی و غیر زیستی قرار گرفته اند تردیدی نیست. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی اهمیت بسیار دارد [نقوی و همکاران، ۱۳۸٤]. ایران با دارا بودن وسعت زیاد و آب و هوای بسیار متنوع، جزء مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه های گیاهی است [وجدانی، ۱۳۷۵]. در نتیجه چنین تنوع می تواند از نظر دستیابی به بعضی از ژن های مهم برای اصلاح محصولات ضروری باشد [طالبی بداف و همکاران، ۱۳۸۲]. عموماً روش های متداول برای شناسایی و بررسی های ژنتیکی مبتنی بر مشاهدات فنوتیپی بوده و از این جهت فاقد الگوهای تنوع ژنتیکی در سطح ژنوم می باشند. به دلیل ماهیت پلی ژنی بسیاری از صفات و اثر عوامل محیطی، نیاز به جمع آوری داده های فراوان در مکان های مختلف بوده و در بعضی موارد میزان چندشکلی برای برخی صفات مورفولوژیکی بسیار محدود می باشد، از این لحاظ سایر روش ها علاوه بر روش های مبتنی بر صفات مورفولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند [فارسی و همکاران، ۱۳۸۲]. در کل به طور تاریخی تخمین تنوع ژنتیکی بر اساس زیست شناسی اندام های جنسی، داده های اکوجغرافیایی، رنگیزه ها، شجره نامه، ارزیابی صفات زراعی و نشانگرهای پروتئینی مانند آیزوزایم ها صورت می گرفته است. اگرچه این نشانگرها و روش های متناظر

تخمین تنوع ژنتیکی در جای خود بسیار مفید و بعضاً بسته به هدف محقق کافی می نمود، اما باتوجه به پیشرفت های چشمگیر در زمینه زیست شناسی مولکولی امکانات بیشتری فراهم شده است که بتوان اطلاعات بیشتری به دست آورد [عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۱؛ قره یاضی، ۱۳۷۵]. از جمله این نشانگرها، نشانگرهای DNA است. مطالعات در سطح جمعیت نشان می دهد که نشانگرهای DNA کارآیی زیادی در تشخیص تنوع دارند و اطلاعات زیادی را فراهم می آورند. این نشانگرها گروه های ژنتیکی و تشابه بین آنها را مشخص می سازند و در تخمین تنوع درون گروه ها و مطالعه روابط تکاملی آنها با خویشاوندان وحشی نیز بسیار موثر هستند [Kumar, ۱۹۹۹].

۱-۷- نشانگرهای ژنتیکی

فنوتیپ هر گیاه توسط ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی تعیین می‌گردد. انتخاب و اصلاح ارقام گیاهی برای صفات مورد نظر، همواره با مشکلاتی رو به رو بوده است و از مدت‌های طولانی، متخصصین اصلاح‌نباتات در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی بوده‌اند که با صفات موردنظر لینکاژ داشته باشند تا بدین ترتیب از آنها به عنوان معیار غیر مستقیمی در انتخاب ارقام استفاده نمایند. برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد باید حداقل از دو خصوصیت یعنی متفاوت بودن بین دو فرد (چندشکلی) و توارث برخوردار باشد. نشانگری در اصلاح نباتات مفید است که لینکاژ نزدیکی با ژن‌های مورد نظر داشته، توارث‌پذیری آن بالا بوده و اندازه‌گیری آن نیز آسان باشد [وجدانی، ۱۳۷۵؛ فصیحی هرندی و همکاران، ۱۳۷٦؛ Paterson *et al.*, ۱۹۹۱].

نشانگرهای ژنتیکی به طور کلی به ۳ گروه نشانگرهای مورفولوژیکی (براساس صفات ظاهری گیاه)، نشانگرهای مولکولی (مبتنی بر DNA یا پروتئین) و نشانگرهای سیتوژنتیکی تقسیم بندی

می‌شوند [Mohan *et al*., ۱۹۹۷, Li and Nelson, ۲۰۰۲]. در زیر به طور خلاصه هر گروه از این نشانگرها توضیح داده می شود.

۱-۷-۱- نشانگرهاي مورفولوژيكي

برخی از تفاوت های موجود در بین ردیف های بازی DNA کروموزم های موجود زنده، با مشاهده در ظاهر افراد قابل تشخیص است. نشانگرهای مورفولوژیکی تظاهر فنوتیپی آن بخشی از اطلاعات موجود در DNA است که به آسانی قابل ارزیابی باشند. این نشانگرها از ساده‌ترین نشانگرها بوده و وراثت آنها به صورت مشاهده‌ای و بدون استفاده از روش های بیوشیمیایی خاص یا مولکولی، ارزیابی می‌شوند [Paterson *et al*., ۱۹۹۱]. این نشانگرها عمدتاً متناظر با صفات کیفی بوده که به صورت عینی قابل رتبه بندی می باشند [چاولا، ۱۳۸۲]. این نشانگرها که پیامد جهش های قابل رویت در مورفولوژی سازواره اند از ابتدای این سده مورد استفاده بوده اند. صفات مورفولوژیکی که عمدتاً توسط یک ژن کنترل می گردند می توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. این نشانگرها شامل دامنه وسیعی از ژن های کنترل کننده صفات فنوتیپی هستند و جزو نخستین نشانگرها به شمار آمده و از زمان های بسیار دور یعنی از زمانی که محل ژن ها بر روی کروموزوم مشخص شد مورد استفاده قرار می گرفتند [نقوی و همکاران، ۱۳۸٤]. در گذشته صفات مورفولوژی به عنوان نشانگرهایی برای نقشه یابی ژنوم گندم مورد استفاده قرار گرفته اند اما اغلب این صفات تحت تأثیر محیط بوده و غیر قابل اطمینان هستند [Igbal *et al*., ۲۰۰۷]. امروزه استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی به دلایل زیر متداول نمی باشد:

۱- محدودیت تعداد نشانگر (فراوانی و تعداد کمی دارند)

۲- وجود اثرات غالبیت و اپیستازی