بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده تولید گیاهی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی‌ارشد در رشته
بیوتکنولوژی در کشاورزی

شناسایی آلل‌های ژن بهاره‌سازی *Vrn-A1* در توده‌های گندم نان ایرانی به روش اکوتیلینگ

پژوهش و نگارش:
مریم فروغ

اساتید راهنما:
دکتر خلیل زینلی‌نژاد
دکتر سعید نواب‌پور

اساتید مشاور:
دکتر محمدهادی پهلوانی
دکتر مسعود سلطانی نجف آبادی

تابستان ۱۳۹۳

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه انجام فعالیت‌های پایان‌نامه‌های تحصیلی با بهره‌گیری از حمایت‌های علمی، مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت می‌پذیرد، به منظور رعایت حقوق دانشگاه، نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می‌شوم:

۱. این گزارش حاصل فعالیت‌های علمی- پژوهشی و دانش و آگاهی نگارنده است مگر آنکه در متن به نویسنده یا پدید آورنده اثر ارجاع داده شده باشد.

۲. چاپ هر تعداد نسخه از پایان‌نامه با کسب اجازه کتبی از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه خواهد بود.

۳. انتشار نتایج پایان‌نامه به هر شکل (از قبیل کتاب، مقاله و همایش) با اطلاع و کسب اجازه کتبی از استاد راهنما خواهد بود. نام کامل دانشگاه:

به فارسی: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

و به انگلیسی: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

در بخش آدرس‌دهی درج خواهد شد.

٤. در انتشار نتایج پایان‌نامه در قالب اختراع، اکتشاف و موارد مشابه، نام کامل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به عنوان عضو حقوقی در انتهای فهرست اسامی درج گردد.

۵. تعیین ترتیب اسامی نویسندگان در انتشار نتایج مستخرج از پایان‌نامه و هر گونه تفاوت احتمالی در آن با فهرست مصوب اسامی هیات راهبری پایان‌نامه با تایید استاد راهنمای اول خواهد بود.

اینجانب **مریم فروغ** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی در کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

مریم فروغ

تشکر و قدردانی از تیم تحقیقاتی:

از استاد راهنمای فاضل و بسیار مهربان، **دکتر خلیل زینلی نژاد**، به پاس تمام راهنمایی هایشان در طول اجرای این پایان نامه و بخاطر تمام خوبی هایشان در طی این دو سال از ژندگیم سپاسگذارم.

بی شک هیچ گاه توان جبران اندکی از زحمات ایشان و **همسر مهربانشان** را نخواهم داشت.

از **پروفسور برد تیل** (Brad Till) پژوهشگر بخش تحقیقات بیوتکنولوژی IAEA بخاطر تمام حمایت ها و راهنمایی هایشان سپاسگذارم.

از **دکتر سعید نواب پور**، **دکتر محمدهادی پهلوانی** و **دکتر مسعود سلطانی نجف آبادی** بخاطر تمام همکاری هایشان در طی اجرای این پژوهش کمال سپاسگذاری را دارم.

از دوستان خوبم **مریم اسماعیل زاده**، **اسماعیل دستورانی** و **مصطفی آهی** کمال تشکر را دارم و از خداوند متعال برایشان موفقیت روز افزون را خواستارم.

از خانم **مهندس سمانه نیکدل** و خانم **مهندس حدیثه پاسندی** بخاطر تمام راهنمایی ها و کمک های ارزنده شان سپاسگزارم.

تشکر و قدردانی از تیم داوری:

از **دکتر سیده ساناز رمضانپور** و **دکتر سید نصرالله نژاد قمی** که با کمال دقت زحمت بازخوانی این پایان نامه را داشتند بسیار سپاسگذارم.

تشکر و قدردانی از اساتید بزرگوارم:

از آقای **دکتر حسن سلطانلو** و **دکتر احد یامچی** که در طی این دوره ی تحصیلی ام، انگیزه هایم را برای برداشتن قدم های بعدی محکم نمودند کمال تشکر را دارم.

از **دکتر حامد پنجه** و **دکتر محمد فرشباف مقدم** که همیشه راهنمایی ها و خاطرات خوبشان را در ذهن خواهم داشت کمال سپاسگذاری را تقدیمشان دارم.

نهایت سپاسم را تقدیم به بزرگترین سرمایه های زندگی ام می کنم

پدر عزیزم (دکتر عبدالرزاق فروغ) و مادر مهربانم

که وجودشان در کنار هم برایم دنیایی سرشار از آرامش و صلح است

و

دکتر مرضیه

دکتر زهرا

مهندس زهره

مهندس پویا

و یگانه محمدرضای زندگیم.

و در نهایت پایان نامه ام را تقدیم به کسانی می دارم که هر کدامشان در گوشه ای از این جهان با تلاش و ایمانشان عمری را در مزرعه گندم سپری کردند و افسوس که هیچ گاه بودن در کنارشان را احساس نکردم . .

باشد تا روح پاکشان شاد شود و بخود ببالم که از نسلشان هستم . . . . .

تقدیم به

پدر بزرگ هایم

که هر دو کشاورزانی مهربان و زحمت کش بودند . . .

چکیده

گندم‌های زمستانه برای گلدهی نیاز به قرار گرفتن در سرمای زمستان دارند (نیاز بهاره سازی). در گندم نیاز بهاره‌سازی با ژن *VRN1* کنترل می‌شود. *VRN1* به عنوان یک عامل محرک گلدهی است و با دمای پایین بیان این ژن فعال می‌شود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ گندم بهاره ایرانی و یک ژنوتیپ به نام گندم بهاره‌ی چینی بر اساس صفات مورفولوژیک و نشانگر ISSR بررسی شد. همچنین تکنیک اکوتیلینگ برای یافتن SNP از ژن *VRN-A1* و تنوع آللی با نشانگرهای اختصاصی آللهای *VRN-A1* برای این ژنوتیپ‌ها انجام شد. در آزمایش مزرعه‌ای، لاین‌های خالص (ژنوتیپ‌ها) کاشته شدند. ده صفت کمی (روز تا گلدهی، طول برگ پرچم، ارتفاع گیاه، طول پدانکل، طول ریشک، طول سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه، طول دانه، عرض دانه) و چهار صفت کیفی (نوع سنبله، رنگ سنبله، کرک‌دار بودن سنبله و رنگ گوشوارک) اندازه‌گیری شدند. آمار توصیفی برای صفات مورفولوژیکی نشان داد که بیشترین ضریب تغییرات مربوط به طول ریشک و کمترین ضریب تغییرات مربوط به روز تا گلدهی بود. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. بیشترین همبستگی مثبت بین وزن هزار دانه و عرض دانه مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. هشت آغازگر ISSR بکار رفته، ۷۰ باند با چند شکلی خوبی را نشان دادند. بیشترین و کمترین مقادیر چند شکلی، ۰/۱۹ و ۰/٤۷ را بترتیب داشتند. گروه‌بندی بر اساس نشانگرهای ISSR ژنوتیپ‌ها را به دو دسته‌ی تقریبا مساوی تقسیم کرد. تنوع آللی در مکان ژنی *VRN-A1* نشان داد که چهار ژنوتیپ آلل غالب *VRN-A1a* را دارا بودند در حالیکه ۲۹ ژنوتیپ آلل مغلوب *vrn-A1* را داشتند. دو آلل غالب دیگر، *VRN-A1b* و *VRN-A1c* در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. با استفاده از تکنیک اکوتیلینگ، ۳۲ ژنوتیپ گندم نان بهاره‌ی ایرانی به دو دسته‌ی هاپلوتایپ تقسیم شدند. نتایج بیانگر وجود تنوع SNP در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود.

کلمات کلیدی: گندم نان، ژن *VRN-A1*، تنوع ژنتیکی، ISSR، تنوع آللی، اکوتیلینگ.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ اهمیت مطالعه گندم ٤

۱-۳ گیاهشناسی گل و روند گل‌دهی گندم ٤

۱-٤ تکامل گندم ٦

۱-۵ گیاه مدل گندم ۸

۱-٦ پروژه‌ی توالی‌یابی ژنوم گندم ۹

۱-۷ گلدهی ۱۰

۱-۷-۱ نیاز بهاره‌سازی ۱۱

۱-۷-۲ تاثیر بهاره‌سازی در فرآیند گلدهی گندم در سطح ژن‌ها ۱۲

۱-۷-۳ تاثیر و نقش ژن *VRN1* در بهاره‌سازی گندم ۱۷

۱-۷-٤ کلونینگ مکان ژنی *VRN1* ۲۰

۱-۸ چند شکلی تک نوکلئوتیدی ۲۰

۱-۸-۱ هاپلوتایپ ۲٤

۱-۸-۲ روش‌های یافتن چند شکلی تک نوکلئوتیدی ۲٤

۱-۸-۲-۱ کشف کلی چند شکلی تک نوکلئوتیدی ۲۵

۱-۸-۲-۲ تکنیک‌هایی برای کشف هدفمند SNP در یک قطعه DNA ۲۵

۱-۸-۲-۳ تکنیک‌هایی برای ژنوتایپینگ SNP شناخته شده ۲۸

۱-۹ ژنتیک معکوس ۲۹

۱-۹-۱ RNA اخلال‌گر ۲۹

۱-۹-۲ T-DNA ۳۰

۱-۹-۳ تیلینگ ۳۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۹-٤ اکوتیلینگ ۳٦
۱-۹-٤-۱ آنزیم نوکلئاز CEL1 ..... ٤۰

فصل دوم- بررسی منابع

۲-۱ اکوتیلینگ ٤٤
۲-۲ تنوع آللی ٤۷
۲-۳ آغازگر اختصاصی ژن *VRN-A1* ٤۸

فصل سوم- مواد و روش‌ها

۳-۱ زمان و مکان اجرای آزمایش ۵۰
۳-۲ مواد گیاهی ۵۰
۳-۲-۱ تهیه بذر ۵۰
۳-۲-۲ کاشت بذر و طرح آزمایشی ۵۱
۳-۳ بخش مورفولوژیک ۵۱
۳-۳-۱ اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک ۵۱
۳-۳-۲ تجزیه و تحلیل داده‌های صفات مورفولوژیک ۵٤
۳-٤ بخش مولکولی ۵٤
۳-٤-۱ استخراج DNA ۵٤
۳-٤-۲ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۵
۳-٤-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های ISSR ۵۸
۳-٤-٤ تکنیک اکوتیلینگ ژن *VRN-A1* ۵۹
۳-٤-۵ بررسی تنوع آللی ژن *VRN-A1* ٦۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-١ بخش مورفولوژیک ٦٦

٤-١-١ تجزیه واریانس ارقام شاهد..... ٦٦

٤-١-٢ بررسی تنوع ژنتیکی صفات مورفولوژیک ٦٦

٤-٢ بخش مولکولی..... ٧٥

٤-٢-١ بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر مولکولی بین ریزماهواره‌ای (ISSR)..... ٧٥

٤-٢-٢ بررسی تنوع آللی در مکان ژنی *VRN-A1*..... ٧٩

٤-٢-٣ اکوتیلینگ مکان ژنی *VRN- A1*..... ٨٢

٤-٣ نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات..... ٨٥

منابع ٨٨

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ فراوانی SNP در گونه‌های مختلف گیاهی ۲۳
جدول ۱-۲ پروژه‌های اجرا شده با تیلینگ..... ۳۶
جدول ۱-۳ مقایسه ویژگی‌های دو روش ژل آگارز و Li-Core در نشان دادن قطعه حامل SNP دراکوتیلینگ..... ٤۰
جدول ۳-۱ اسامی ژنوتیپ‌های گندم بهاره مطابق بانک ژن گیاهی کشور آلمان (IPK-Gatersleben)....۵۳
جدول ۳-۲ مشخصات آغازگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ گندم بهاره مورد مطالعه ...٥٦
جدول ۳-۳ مواد مورد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ISSR..... ٥٦
جدول ۳-٤ برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای استفاده شده برای تکثیر نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای..... ٥۷
جدول ۳-۵ توالی آغازگر *VRN-A1*..... ٦۰
جدول ۳-٦ مواد مورد استفاده (مستر میکس) برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن *VRN-A1* در اکوتیلینگ با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر ٦۱
جدول ۳-۷ مواد تشکیل دهنده‌ی آنزیم CEL1 5X..... ٦۲
جدول ۳-۸ آغازگرهای مورد استفاده و پارامترهای PCR در بررسی تنوع آللی *VRN-A1*..... ٦۲
جدول ۳-۹ مواد مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز *VRN-A1*..... ٦۳
جدول ۳-۱۰ برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای برای نشانگرهای آلل اختصاصی *VRN-A1*..... ٦۳
جدول ٤-۱ تجزیه واریانس برای ارقام شاهد بر اساس چهار صفت ٦٦
جدول ٤-۲ نتایج آمار توصیفی برای صفات کمی در ۳۳ ژنوتیپ‌گندم بهاره مورد مطالعه ٦۸
جدول ٤-۳ نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای هر یک از چهار صفت..... ٦۹
جدول ٤-٤ ضرایب همبستگی ساده (اسپیرمن) بین چهار صفت کیفی در ۳۳ ژنوتیپ گندم بهاره مورد مطالعه..... ۷۰
جدول ٤-۵ ضرایب همبستگی ساده (پیرسون) بین ده صفت کمی در ۳۳ ژنوتیپ گندم بهاره مورد مطالعه..... ۷۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ٤-٦ تجزیه علیت همبستگی صفات وزن هزار دانه شامل اثرات مستقیم و غیرمستقیم..... ٧١
جدول ٤-٧ نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی برای ده صفت کمی بر اساس داده‌های صفات مورفولوژیک در ٣٣ ژنوتیپ گندم بهاره مورد مطالعه..... ٧٤
جدول ٤-٨ کد آغازگر، تعداد مکان‌های تکثیر شده، تعداد باندهای تکثیر شده، تعداد مکان‌های چند شکل، درصد چند شکلی، PIC، E، MIE..... ٧٥
جدول ٤-٩ مولفه‌ی اول، مقادیر ویژه، درصد واریانس توجیه شده و درصد تجمعی واریانس توجیه شده در تجزیه به مولفه‌های اصلی برای داده‌های بین ریزماهواره‌ای..... ٧٧

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ ساختار گیاه شناسی گل در گندم ٦
شکل ۱-۲ شکل ظاهری سنبله انواع گندم ۷
شکل ۱-۳ تکامل گندم ۷
شکل ۱-٤ گیاه *B. distachyon* ۹
شکل ۱-۵ تاثیر فصول مختلف بر توسعه جوانه انتهایی در غلات معتدل ١٤
شکل ۱-٦ وظایف خاص *VRN1* در بافت‌های مختلف برگ و جوانه راسی در گیاهان بهاره‌سازی شده ١٦
شکل ۱-۷ مقایسه فرآیند مولکولی گلدهی در غلات معتدل و آرابیدوپسیس ١٦
شکل ۱-۸ ارتباط حالت کروماتینی (هتروکروماتینی و یوکروماتینی) در پاسخ بهاره‌سازی غلات .. ۱۹
شکل ۱-۹ تصویری شماتیک از چندشکلی تک نوکلئوتیدی ۲۱
شکل ۱-۱۰ نمایی از روش چند شکلی حاصل از شکل فضایی مولکول‌های تک رشته‌ایی DNA.....٢٦
شکل ۱-۱۱ نمایی شماتیک از الکتروفورز ژل همراه با شیب دینچر ۲۸
شکل ۱-۱۲ پیدا کردن موتاسیون نقطه‌ایی ایجاد شده در تیلینگ ۳۵
شکل۱-۱۳ نمایی شماتیک از مرحله مخلوط نمودن DNA نمونه‌ها در تیلینگ ۳٦
شکل ۳-۱ تصویری از ژنوتیپ‌های کاشته شده در مزرعه درالف) مرحله پنجه زنی ب) مرحله‌ی رسیدگی ۵۱
شکل ۳-۲ نمایی از بساک‌های بیرون آمده از سنبله در زمان گرده افشانی ۵۲
شکل ۳-۳ نمایی از نحوه‌ی اندازه‌گیری طول (سمت راست) عرض (سمت چپ) ده دانه گندم.. ۵۳
شکل ۳-٤ بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با بافر TAE... ۵۵
شکل ٤-۱ هیستوگرام ده صفات کمی و نمودار ستونی چهار صفت کیفی ٦۷
شکل ٤-۲ دندروگرام ۳۳ ژنوتیپ گندم بهاره حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تفاوت مربع فاصله‌ی اقلیدوسی و به روش وارد برای ده صفت مورفولوژیک کمی ۷۲
شکل ٤-۳ نمودار ccc پلات برای تعیین تعداد گروه‌ها در تجزیه خوشه‌ای ۷۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ٤-٤ دندروگرام حاصل از ٣٣ ژنوتیپ بر اساس نشانگرهای ISSR با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA ٧٦
شکل ٤-٥ نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی بر اساس داده‌های نشانگرهای ISSR ٧٧
شکل ٤-٦ نمودار سه بعدی تجزیه به مختصات اصلی بر اساس داده‌های نشانگرهای ISSR ٧٨
شکل ٤-٧ الگوی نواربندی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر VRN1AF و VRN1- INT1R با اندازه باندهای ٨٧٦+٩٦٥، ٧٣٤، ٧٣٤ و ٧١٤ جفت باز ٨٠
شکل ٤-٨ الگوی نواربندی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر Intr1/A/F2 و Intr1/A/R3 با اندازه باند ١١٧٠ جفت باز ٨١
شکل ٤-٩ الگوی نواربندی حاصل از PCR برای جفت آغازگر Intr1/C/F و Intr1/AB/R با اندازه باند ١٠٦٨ جفت باز ٨٢
شکل ٤-١٠ الگوی نواربندی محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکتیر ژن *VRN-A1* با طول ١٥١١ جفت باز ٨٣
شکل ٤-١١ الگوی نواربندی پس از برش دهی آنزیم CEL1 در تکنیک اکوتیلینگ ٨٤

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در بین عرض جغرافیایی ٦٠ درجه شمالی و ٤٠ درجه جنوبی در محدوده‌ی دمایی ملایم رشد می‌کند (ناتونسون، ۱۹۵۰ به نقل از کیس و همکاران، ۲۰۱٤). در این مناطق تغیرات اقلیمی، باعث شده ژنوتیپ‌های بسیار گوناگون برای سازگاری با این شرایط محیطی بوجود آیند.

پی‌بردن به فاکتورهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی موثر بر شروع دوره گلدهی در برنامه‌های اصلاحی ژنوتیپ‌ها برای سازگاری بیش‌تر با تغییرات محیطی کنونی و آینده بسیار مهم می‌باشد (کیس و همکاران، ۲۰۱٤). گندم زمستانه برای گلدهی در بهار، نیاز به قرار گرفتن در دمای پایین یا نیاز بهاره سازی دارد، به همین دلیل در پاییز کاشته می‌شود. در حالیکه گندم بهاره این نیاز سرمایی را ندارد و در بهار یا پاییز کاشته می‌شود (یان و همکاران، ۲۰۰٤b). مکان ژنی *VRN1* در گندم دیپلوییید (A^m *T. monococcum* (2n=2x=14, A^m کلون شده است (یان و همکاران، ۲۰۰۳). ارتولوگ ژن *VRN-A^m1* در برگ و مریستم گندم‌هایی که نیاز بهاره سازیشان تامین شده است، بیان می‌شود. در گیاه آرابیدوپسیس ژن *AP1*[1] ارتولوگ ژن *VRN1* است که در مریستم گیاه بیان می‌شود. چون *VRN1* در بهاره‌سازی نقش اصلی را دارد و برای گلدهی کافی و ضروری است از این رو پی بردن به ویژگی‌های ژنتیکی مناطق تنظیم کننده در پروموتور و اولین اینترون این ژن در تنظیم و آغاز گلدهی بسیار مهم است (دیستفیلد و دابکوسکی، ۲۰۰۹). آلل‌های فعال ژن *VRN1* نیاز بهاره‌سازی را کاهش می‌دهند و محصولات را به مناطق مختلف سازگار می‌کنند. گندم و جو اغلب در مناطقی با زمستان ملایم کاشته می‌شوند که بهاره‌سازی اتفاق نمی‌افتد. در دیگر مناطق برای جلوگیری از یخبندان زمستانه، محصولات در بهار کاشته می‌شوند و بنابراین بهاره‌سازی را تجربه نمی‌کنند. برای سازگاری این گیاهان با مناطق مختلف متخصصین اصلاح نباتات در پی تولید واریته‌هایی هستند که بدون نیاز به بهاره‌سازی، گلدهی داشته باشند.

نشانگرهای ژنتیکی که تنوع ژنتیکی را ارزیابی و اندازه‌گیری می‌کنند برای تحقیقات ژنتیکی جمعیت ابزار بسیار مهمی محسوب می‌شوند. نشانگر چند شکلی تک نوکلئوتیدی به دلیل فراوانی بالا و کارایی بالایش در غربالگری تنوع نوکلئوتیدی، باعث توسعه استفاده از این نشانگر شده است. در بسیاری از موجودات اطلاعات اندکی از ژن‌ها یا ژنوم در دسترس است که در نتیجه SNPهای اندکی

1- APETAL1

در این موجودات شناسایی شده‌اند. روش‌های معمول کشف SNP بر اساس اطلاعات حاصل از توالی‌یابی در مجموع هزینه‌ی زیادی را می‌طلبد (گاروین و گارت، ۲۰۰۷). از اینرو کاربرد روش‌های کشف SNP بجز روش توالی‌یابی، بسیار در حال توسعه است.

تیلینگ یک روش پربازده و مناسب از نظر هزینه در بین تکنیک‌های ژنتیک معکوس محسوب می‌شود که در یک جمعیت موتانت بزرگ حاصل از مواد شیمیایی جهش‌زا یا پرتوها بطور دقیق SNPها را غربالگری می‌کند. اولین پروژه‌ی تیلینگ بر روی گیاه آرابیدوپسیس اجرا شد (کالوم و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از تیلینگ برای بررسی تنوع طبیعی موجود در ژن مورد نظر، اکوتیلینگ خوانده می‌شود. آنزیم CEL1 بکار رفته در این تکنیک باعث برش در مناطق عدم جفت بازی در DNA هترودوپلکس می‌شود و در نتیجه باعث نشان دادن چند شکلی و مکان آن می‌شود. در این دو تکنیک توالی‌یابی تنها به یک فرد از افراد مربوط به یک هاپلوتایپ محدود می‌شود که در نتیجه باعث کاهش هزینه‌ها می‌شود (تیل و همکاران، ۲۰۰٦). تیلینگ و اکوتیلینگ قابل اجرا برای همه‌ی موجودات از جمله موجودات پلی‌پلوئید و هتروزیگوس می‌باشند (کومای و همکاران، ۲۰۰٤).

فرضیات و اهداف تحقیق به صورت زیر می‌باشند:

فرضیات

- تنوع ژنتیکی برای صفات مورفولوژیک و نشانگر ISSR در بین توده‌های گندم نان ایرانی وجود دارد.
- تنوع آللی در بین ژرم‌پلاسم توده‌های گندم نان بومی ایران از نظر ژن *VRN-A1* وجود دارد.
- تکنیک اکوتیلینگ مورد استفاده قادر به کشف چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ژن *VRN-A1* در ژرم‌پلاسم گندم‌های نان بومی ایران می‌باشد.

اهداف تحقیق

- بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های گندم نان بهاره‌ی بومی ایران بر اساس صفات مورفولوژیک.
- بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گندم نان بهاره‌ی ایرانی با نشانگرهای ISSR.
- بررسی تنوع آللی در توده‌های گندم نان بهاره‌ی بومی ایران برای ژن *VRN-A1*.
- بررسی وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی در توده‌های گندم نان بهاره‌ی بومی ایران برای ژن *VRN-A1* با تکنیک اکوتیلینگ.

۱-۲ اهمیت مطالعه گندم

گـندم یک غـله جـهانی در دنیای بزرگ کـشاورزی و بیشترین محـصول جهانی است که بعد از آن برنـج و ذرت قرار دارنـد. ارقـام امروزی گندم زراعی به دو گونه، گندم نان هگزاپلوییید (2n=6x=42 AABBDD) و گندم تتراپلوییید یا گندم دوروم[1] (2n=4x=28, AABB) که برای تهیه ماکارونی استفاده می‌شود، برمی‌گردد. گندم نان، نود و پنج درصد و گندم دوروم، پنج درصد از تولید گندم را در جهان دارا هستند. گندم رتبه اول را در تولید محصولات دانه‌ایی دارد و روزانه ۲۰ درصد از کالری مورد نیاز انسان را تامین می‌کند. گندم یک مدل خوب برای فرضیه پلی‌پلوییدی، سازگاری و اهلی‌سازی در گیاهان محسوب می‌شود. اهلی‌سازی گندم باعث وقوع یک فرسایش ژنتیکی در آن شده است و این فرآیند با برنامه‌های اصلاحی بیشتر شده است و افزایش آسیب پذیری از استرس‌های محیطی، بیماری‌ها، آفات از عواقب آن است. بنابراین بهبود ژنتیکی گندم برای تامین غذای جمعیت در حال افزایش مردم جهان از برنامه‌های مهم محسوب می‌شود. اهمیت اقتصادی گندم باعث افزایش مطالعات ژنتیکی و سیتوژنتیکی در راستای تولید رقم‌هایی با عملکرد بالا، کیفیت بیشتر و افزایش تحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده شده است. در مقابل، ژنومیکس گندم به دلیل بزرگی اندازه ژنوم (۱۵،۹۶۱ مگاباز برای گندم نان و ۱۱،۶۶۰ مگاباز برای گندم دوروم) و پیچدگی بالای ژنوم در مقایسه با دیگر گیاهان، سرعت کم‌تری در مطالعه و تحقیق داشته است. ولی اکنون به دلیل پیشرفت در تکنولوژی‌های مربوطه، پیشرفت در پروژه‌های ژنومیکس گندم روند خوبی دارد و در نتیجه ظرفیت‌های خوبی را برای مطالعه بهتر درباره تکامل و بهبود صفات زراعی را ایجاد کرده است (پنگ و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۳ گیاهشناسی گل و روند گل‌دهی گندم

گل آذین گندم یک سنبله است که تعدادی سنبلچه را روی گره‌ها شامل می‌شود. به ازای هر سنبلچه روی محور ساقه یک گره وجود دارد. هر سنبلچه یک تا شش گلچه را دارد. هر گلچه شامل لما، پالئا، سه تا پرچم، کلاله و تخمدان می‌شود (شکل ۱-۱). گرده افشانی یا پخش شدن دانه گرده سه تا ده روز پس از ظهور سنبله‌ها از برگ پرچم اتفاق می‌افتد. قبل از شروع گرده افشانی لودیکول متورم

1- T. durum

می‌شود و باعث باز شدن لما از پالئا می‌شود و با بلند شدن میله‌ی پرچم دانه گرده پخش می‌شود، که این پروسه در مدت زمان پنج دقیقه صورت می‌گیرد. گرده افشانی از ابتدای صبح آغاز و در طول روز ادامه می‌یابد. گرده افشانی از گلچه‌ی سنبلچه‌ایی که در دو سوم بالایی سنبله قرار دارد شروع می‌شود. برای هر سنبله مدت گرده افشانی چهار تا هفت روز طول می‌کشد. در روز بعد، گرده افشانی از گلچه‌ی انتهایی شروع تا به گلچه‌ی بالایی ختم شود. در یک گیاه گندم ابتدا گرده افشانی در ساقه اصلی انجام می‌شود. سپس در طی سه چهار روز گرده افشانی در دیگر پنجه‌ها نیز روی می‌دهد. یک گیاه کامل گندم با توجه به شرایط محیطی در طی ده روز یا کم‌تر گرده افشانی را تکمیل می‌کند. ارقام مختلف گندم در میزان باز شدن لما از پالئا متفاوت هستند. این امکان نیز وجود دارد گرده خارجی داخل گلچه شود و نتیجه‌اش یک تا دو درصد دگر گرده افشانی شود. هنگامی که لودیکول تورم خود را از دست می‌دهد، گلچه پس از یک ساعت باز ماندن بسته می‌شود و همچنین لودیکول تجزیه می‌شود اما تخمدان متورم خواهد شد و گلچه ممکن است دوباره باز شود. کلاله‌ی گلچه‌ی بارور نشده به مدت پنج روز پس از گرده افشانی به عنوان گیرنده‌ی دانه گرده باقی خواهد ماند.

چندین مقیاس برای کد گذاری مراحل رشدی قابل رویت در گندم وجود دارد. مقیاس هان[1] برای مراحل رشد رویشی و مقیاس فیک[2] برای مراحل رشد زایشی و رویشی هستند. مقیاس زادوکس[3] یک مقیاس جامع و فراگیر است که استفاده از آن آسان و دارای ده مرحله‌ی رشدی (۰: جوانه زنی، ۱: رشد گیاهچه، ۲: پنجه زنی، ۳: بلند شدن ساقه، ٤: ظهور برگ پرچم، ۵: ظهور سنبله، ٦: گلدهی، ۷: مرحله شیری دانه ۸: مرحله خمیری دانه، ۹: رسیدگی) است. گلدهی گندم در مرحله شش زادوکس قرار دارد و دارای سه زیرمرحله (٦۰: ابتدای گلدهی، ٦۵: نیمه گلدهی، ٦۹: اتمام گلدهی) است. (زادوکس و همکاران، ۱۹۷٤).

1- Huan
2- Feeke
3- Zadoks