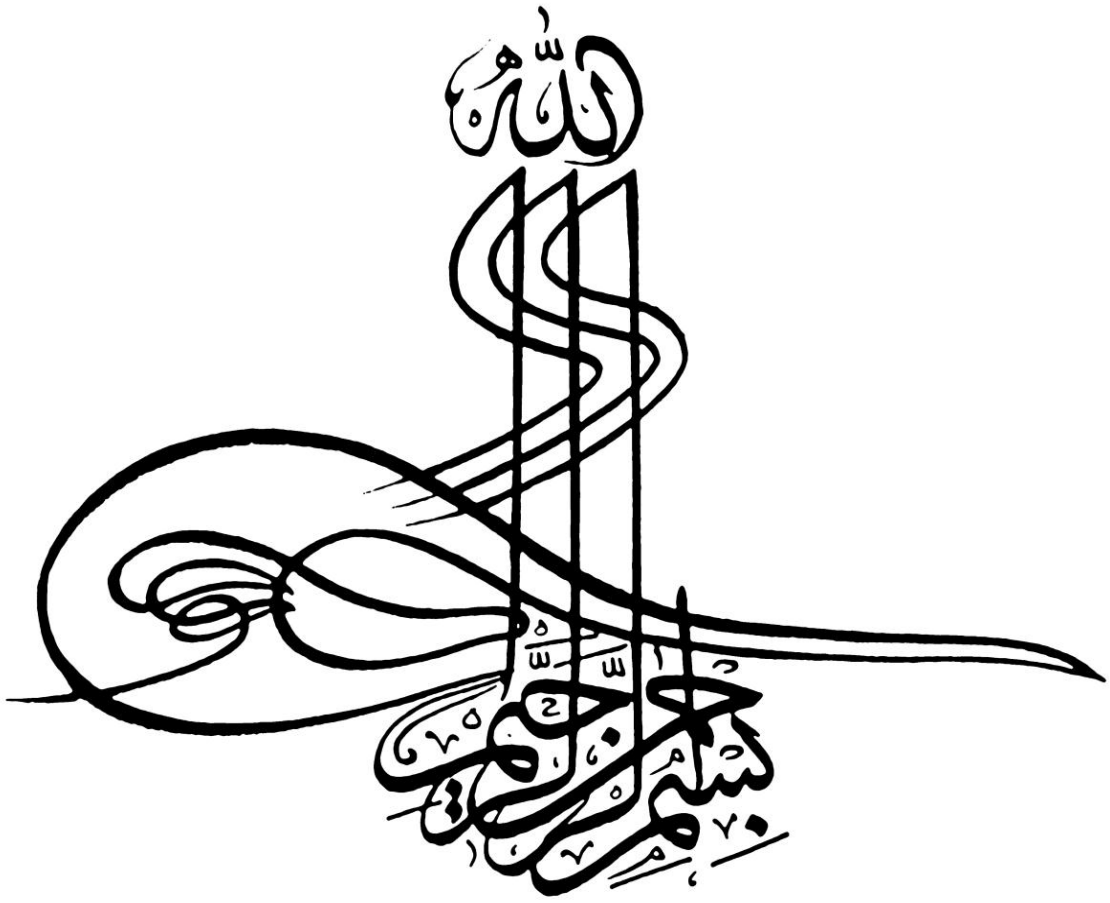
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

عنوان:

بررسی ویژگی‌های کروموزومی و تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در چند جمعیت از *Aegilops cylindrica*

اساتید راهنما

دکتر رسول اصغری زکریا

دکتر ناصر زارع

استاد مشاور

دکتر امید سفالیان

محقق

تورج خبیری

دانشگاه محقق اردبیلی

بهمن ۱۳۹۰

تشکر و قدرانی

چه شیرین است رسیدن به چیزی که زمانی می‌پنداشتی چقدر بالاست و چه شیرین‌تر است بعد از رسیدن، فهمیدن این‌که هنوز اول راهی و آن چیز آن قدر هم بالا نبود و باید تلاش را دو چندان کرد. اکنون که به لطف و یاری خداوند متعال، مراحل نگارش و تدوین پایان‌نامه به اتمام رسیده است لازم می‌دانم مراتب قدردانی خویش را تقدیم عزیزانی نمایم که ارائه پایان‌نامه حاضر مرهون مساعدت‌های بی‌شائبه آنان بوده است. در درجه اول سپاس‌گذار پدر و مادر عزیزم هستم که تا این مرحله از زندگی‌ام همواره مشوق و حامی بنده بوده‌اند. از استاد راهنمای خود جناب آقای **دکتر رسول اصغری‌زکریا** صمیمانه سپاسگزم چرا که نه تنها از علم ایشان بلکه از اخلاق و مردانگی‌شان فراوان آموختم و سعی می‌کنم لیاقت شاگردی ایشان را داشته باشم. از استاد راهنمای دیگرم، جناب آقای **دکتر ناصر زارع** که همیشه لطفشان شامل حالم بوده و بزرگوارانه با مساعدت‌های خویش راه‌گشای کارهایم و انجام این تحقیق شدند، کمال تشکر را دارم. از جناب آقای **دکتر امید سفالیان** که مشاوره اینجانب را بر عهده داشتند نیز، تشکر می‌کنم.

در پایان حاصل این تحقیق را به مادر عزیزم تقدیم می‌کنم که بعد خداوند متعال همه داشته‌هایم از اوست. وجودم برایش همه رنج است و وجودش برایم همه مهر. عزیزی‌که فروغ نگاهش، دعاهای شبانه‌اش و مرواریدهایی که از پس هر شادی‌ها و ناراحتی‌هایم از چشمان مهربانش برایم جاری شده، سرمایه‌های گرانبهای زندگیم می‌باشد. در برابر مقام بلندش زانوی ادب بر زمین می‌نهم و با دلی مملو از عشق و محبت از خداوند ممنان برایش صحت بدن و طول عمر مسئلت دارم.

نام خانوادگی دانشجو: **خبیری**		نام: **تورج**
عنوان پایان نامه: بررسی ویژگی‌های کروموزومی و تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در چند جمعیت از *Aegilops cylindrica*		
اساتید راهنما: **دکتر رسول اصغری زکریا و دکتر ناصر زارع**		
استاد مشاور: **دکتر امید سفالیان**		
مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد**	رشته: **اصلاح نباتات**	دانشگاه: **محقق اردبیلی**
دانشکده: **کشاورزی**	تاریخ فارغ التحصیلی: **۹۰/۱۱/۲۱**	تعداد صفحات:**۱۰۸**
کلید واژه: **تنوع ژنتیکی، کاریوتیپ، گلیادین، زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین** و *Aegilops cylindrica*		

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی در زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین و گلیادین‌ها، مقایسه الگوی نوارهای گلیادینی در گونه *Ae. cylindrica* و بزوستایا و همچنین مطالعه ویژگی‌های کاریولوژیکی این گونه، آزمایشی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. نتایج نشان داد که از لحاظ زیرواحدهای HMW، هیچ تنوعی در بین اکوتیپ‌ها وجود ندارد. از لحاظ زیرواحدهای LMW بیشترین و کمترین تنوع مشاهده شده در ناحیه B به ترتیب مربوط به جمعیت اهر و اکوتیپ‌های شبستر۱، مغان و نمین بود که هیچ تنوعی در این اکوتیپ‌ها در ناحیه B مشاهده نشد. در ناحیه C بیشترین و کمترین تنوع مشاهده شده به ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های بناب و مغان به میزان ۰/۱۸۷۵ و اکوتیپ‌های اهر-هوراند، اهر، شبستر۱، شبستر۲، اردبیل، مرند، ماکو، تبریز-کرکج و اردبیل-نمین به میزان ۰/۰۶۲۵ بود. به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تنوع در کلیه مکان‌های ژنی، ۰/۰۹۷۸ و مربوط به جمعیت مشکین و اکوتیپ شبستر۱ به میزان ۰/۰۱۶۳ بود. از لحاظ پروتئین‌های گلیادینی، میزان تنوع ژنتیکی کل، تنوع بین و درون برای این اکوتیپ‌ها، به ترتیب ۰/۱۸۳۷، ۰/۱۳۴۱، ۰/۰۴۹۶ بدست آمد. در این آزمایش در ناحیه آلفا فقط یک باند در برخی از اکوتیپ‌ها مشاهده شد. کمترین و بیشترین تنوع ژنتیکی به ترتیب در ناحیه ω=۰/۱۰۹۶ و β=۰/۲۱۲۶ بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش همبستگی کامل نیز، اکوتیپ‌ها را به ۲ گروه مجزا تقسیم کرد. و نشان داد که تنوع ژنتیکی از توزیع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند. همچنین یک نوار مشابه با نوار γ=۴۵ که با کیفیت بالای گلوتن در ارتباط است، در همه اکوتیپ‌های مورد مطالعه، مشاهده شد. مطالعه الگوی نواربندی گلیادین در گیاه *Ae. cylindrica*، نشان داد که در این گونه پنج نوع بلوک از ژن‌های کدکننده گلیادین وجود دارد که در بلوک اول الل‌هایی مانند *Gli-A1g* وجود دارند که دقیقا شبیه گندم بودند. بلوک دوم الل‌هایی مانند *Gli-B1h* بودند که احتمال دارد در اثر جهش در یک ژن کدکننده گلیادین که روی سیالیت الکتروفورزی آن اثرگذار است، به وجود آمده باشند. بلوک سوم الل‌هایی مانند *Gli-A1o/A1d* بودند که می‌توانند در اثر نوترکیبی درون لوکوسی الل‌ها ناشی شوند. چهارمین گروه شامل الل‌هایی مانند *Gli-D1i* بودند که در نتیجه از دست دادن اجزای گلیادین با سیالیت الکتروفورزی کند یا سریع ناشی می‌شوند و بالاخره آخرین گروه شامل الل‌های نول بود. کاریوگرام هر جمعیت، در ٦ فرد با استفاده از رنگ آمیزی استو-فریک-هماتوکسیلین تهیه ویژگی‌های مختلف کروموزومی تعیین شد. نتایج نشان داد که در مجموعه کروموزومی این گونه، ۷ جفت متاسنتریک، ۳ جفت ساب متاسنتریک، ۲جفت ساب تلوسنتریک و ۲ جفت کروموزوم تلوسنتریک وجود دارد که یک جفت از آن‌ها دارای فرورفتگی ثانویه و کروموزوم ماهواره‌دار بود (کروموزوم شماره ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کروموزوم‌های شماره ۳، ٤، ٦، ۸، ۹، ۱۱، ۱۳ و ١٤ از نظر طول نسبی کروموزوم در بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری دارند. از نظر شاخص نسبت بازو نیز اختلاف معنی‌داری در کروموزوم‌های شماره ۲، ٤، ٥، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ١٤ در بین جمعیت‌ها مشاهده شد.

فهرست مطالب

مقدمه ۲

فصل اول- مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته ۳

۱-۱- گونه ها، توزیع جغرافیایی و اکولوژی جنس *Aegilops* ۳

۱-۱-۲- گیاهشناسی جنس *Aegilops* ٤

۱-۱-۳- گیاهشناسی و اکولوژی گونه *Ae. cylindrica* ٥

۱-۲- تکامل *Aegilops* و گندم ٦

۱-۲-۱- روابط فیلوژنیکی درون و بین گروه *آژیلوپس*_گندم ۸

۱-۳- مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتیپی ۹

۱-۳-۱- روابط ژنتیکی گندم_*آژیلوپس* از طریق جفت شدگی کروموزومی ۹

۱-۳-۲- اندازه ژنوم در *آژیلوپس_تریتیکوم* ۱۰

۱-۳-۳- جریان ژنی بین *آژیلوپس* و *تریتیکوم* ۱۱

۱-۳-٤- هیبریداسیون خودبه خودی بین خویشاوندان وحشی گندم و گندم نان ۱۲

۱-٤- نقش گونه های *Aegilops* در ایجاد ذخایر سیتوژنتیکی و کاربردشان ۱۳

۱-٤-۱- لاین‌های اضافی و جانشین در ژنوم *تریتیکوم*: ۱۳

۱-٥- نقش گونه های *Aegilops* در اصلاح گیاهان زراعی از طریق ابزار پیشرفته و سنتی ۱٥

۱-٥-۱- روش‌های انتقال ژن از *Aegilops* به گندم ۱٦

۱-٥-۱-۱- انتقال ژن از گونه های *Aegilops* دارای ژنوم D ۱٦

۱-٥-۱-۲- انتقال ژن از از ژنوم های مختلف گونه های *Aegilops* به غیر از ژنوم D ۱۷

۱-٥-۱-۳- القای جفت شدگی هومیولوگی ۱۸

۱-٦- استفاده های دیگر از گونه های *Aegilops* ۱۹

۱-٦-۱- سیتوپلاسم گونه های *Aegilops* به عنوان القاءکننده نرعقیمی در گندم ۱۹

۱-٦-۲- القای تولید هاپلوئید در گندم ۲۱

۱-٦-۳- تولید لاین‌های حذفی توسط ژنهای گامتوسیتی ۲۱
۱-۷- مطالعات انجام شده روی گونه *Aegilops cylindrica* ۲۱
۱-۸- مطالعه پروتئین های ذخیره ای آندوسپرم بذر ۲٤
۱-۸-۱- الکتروفورز ۲۸
۱-۸-۲- فرآیند تشکیل ژل های پلی آکریل آمید ۲۹
اهداف تحقیق ۳۱

فصل دوم- مواد و روشها ۳۳
۲-۱- مواد گیاهی ۳۳
۲-۲- مطالعه پروتئینهای ذخیرهای آندوسپرم بذر ۳۳
۲-۲-۱- مطالعه الگوی نواربندی گلیادین ها به روش A-PAGE (متاکوفسکی و همکاران۱۹۹۱) ۳۳
۲-۲-۱-۱- مراحل استخراج پروتئین ۳۵
۲-۲-۲- مطالعه زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و پایین (LMW-GS) به روش SDS-PAGE (سینگ و همکاران ۱۹۹۱) ۳٦
۲-۲-۲-۱- تهیه ژل‌های مورد نیاز برای الکتروفورز ۳۷
۲-۲-۲-۲- محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج پروتئین ۳۹
۲-۲-۲-۳- مراحل استخراج پروتئین از بذر ٤۰
۲-۲-۲-۳-۱- استخراج پرولامین‌های احیاء نشده و حذف آنها ٤۱
۲-۲-۲-۳-۲- استخراج پرولامین‌های احیاء شده و حذف آنها ٤۱
۲-۲-۲-۳-۳- استخراج گلوتنین و زیرواحدهایش ٤۱
۲-۲-۲-٤- انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل‌ها ٤۲
۲-۲-۲-۵- روش‌های آماری استفاده شده در مطالعه پروتئینهای ذخیرهای آندوسپرم بذر ٤۳
۲-۳- بررسی کاریولوژیکی جمیعت‌ها ٤۳

۲-۳-۱- اندازه‌گیری صفات کروموزومی ٤٥
۲-۳-۱-۱- پارامترهای مختلف برای سنجش تقارن کاریوتیپی ٤٥

فصل سوم- نتایج و بحث ٤٧
۳-۲- مطالعه تنوع پروتئینهای گلیادین در گونه *Ae. cylindrica* ٤٧
۳-۳- مقایسه الگوی نواربندی ژنهای کدکننده گلیادین در گونه *Aegilops cylindrica* با گندم ٥١
۳-٤- مطالعه تنوع زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین در گونه *Ae. cylindrica* ٥٦
۳-۲- بررسی سیتوژنتیکی جمعیتهای گونه *Ae. cylindrica* ٦٢
۳-۲-۱- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت اردبیل ٦٣
۳-۲-۲- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت اردبیل-نمین ٦٣
۳-۲-۳- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت اهر ٦٤
۳-۲-٤- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت ماکو ٦٤
۳-۲-٥- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت مرند ٦٥
۳-۲-٦- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت مغان ٦٥
۳-۲-۷- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت میاندوآب ٦٥
۳-۲-۸- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت شبستر۱ ..... ٦٦
۳-۲-۹- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت شبستر۲ ..... ٦٦
۳-۲-۱۰- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت ورزقان ٦٧
۳-۲-۱۱- وضعیت تقارن کاریوتیپ در جمعیتهای مورد مطالعه ۸۹
۳-٥- نتیجه گیری کلی ۹۷
۳-٦- پیشنهادات ۹۹
منابع ۱۰۰

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه ۳۱

جدول ۲-۲- تهیه ژل جداگر به صورت ۱۰٪ : ۳۶

جدول ۲-۳- تهیه ژل متراکم کننده به صورت ٤٪ : ۳۷

جدول ۳-۱- تعداد نوار، تنوع ژنتیکی و چندشکلی در نوارهای A-PAGE در اکوتیپ‌های *Ae. cylindrica* ٤۸

جدول ۳-۲- تنوع مشاهده شده در بین و درون اکوتیپهای مورد بررسی در گونه *Ae. cylindrica* ٤۸

جدول ۳-۳- فاصله ژنتیکی نی در ۱۷ جمعیت مورد بررسی از *Ae. cylindrica* در محیط A-PAGE ٥٤

جدول ۳-٤- تعداد نوار، تنوع ژنتیکی و چندشکلی در نوارهای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین در اکوتیپهای *Ae. cylindrica* ٥٥

جدول ۳-٥- تنوع ژنتیکی مشاهده شده در نوارهای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین ٥٥

جدول ۳-٦- فاصله ژنتیکی نی در ۱۷ جمعیت مورد برسی از *Ae. cylindrica* در محیط SDS-PAGE ٥۸

جدول ۳-۷- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت اردبیل از گونه *Ae. cylindrica* ٦٥

جدول ۳-۸- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت اردبیل-نمین از گونه *Ae. cylindrica* ٦۷

جدول ۳-۹- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت اهراز گونه *Ae. cylindrica* ٦۹

جدول ۳-۱۰- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت ماکواز گونه *Ae. cylindrica* ۷۱

جدول ۳-۱۱- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت مرند از گونه *Ae. cylindrica* ۷۳

جدول ۳-۱۲- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت مغان از گونه *Ae. cylindrica* ۷٥

جدول ۳-۱۳- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت میاندوآب از گونه *Ae. cylindrica* ۷۷

جدول ۳-۱٤- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت شبستر۱ از گونه *Ae. cylindrica* ۷۹

جدول ۳-۱٥- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت شبستر۲ از گونه *Ae. cylindrica* ۸۱

جدول ۳-۱٦- ویژگی‌های کروموزومی جمعیت ورزقان از گونه *Ae. cylindrica* ۸۳

جدول ۳-۱۷- میانگین ویژگی‌های کروموزومی در ۱۰ جمعیت از گونه *Ae. cylindrica* ۸۵
جدول ۳-۱۸- شاخص‌های تقارن در ۱۰ جمعیت از گونه *Ae. cylindrica* ۸۶
جدول ۳-۱۹- تجزیه واریانس کروموزومها بین ۱۰ جمعیت مورد بررسی از نظر خصوصیات کاریولوژیکی در گونه *Aegilops cylindrica*..... ۹۲
جدول ۳-۲۰- مقایسه میانگین طول نسبی جفت کروموزوم‌های گونه *Aegilops cylindrica* به روش دانکن ۹۳
جدول ۳-۲۱- مقایسه میانگین شاخص نسبت بازوی جفت کروموزوم‌های گونه *Aegilops cylindrica* به روش دانکن ۹۵

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- پروتئین‌های ذخیرهای آندوسپرم در گندمیان ۲۶
شکل ۳-۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشهای در ۱۷ جمعیت مورد بررسی در محیط A-PAGE به روش Complete Linkag ۴۷
شکل۳-۲- تجزیه به مولفه های هماهنگ اصلی در ۱۷ اکوتیپ از گونه *Ae. cylindrica* در محیط A-PAGE ۴۹
شکل ۳-۳- الگوی الکتروفورزی الل‌های کدکننده گلیادین در بزوستایا و *Ae. cylindrica*..... ۵۲
شکل ۳-۴- الل‌های کدکننده بلوک‌های گلیادینی مشابه با بلوک‌های *Ae. cylindrica* ۵۳
شکل ۳-۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشهای در ۱۷ جمعیت مورد برسی در محیط SDS-PAGE به روش Complete Linkag ۵۶
شکل ۳-۶- الگوی الکتروفورزی زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین در گونه *Ae. cylindrica* در محیط SDS-PAGE ۵۸
شکل۳-۷- تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی در ۱۷ اکوتیپ از گونه *Ae. cylindrica* در محیط SDS-PAGE..... ۵۹
شکل ۳-۸- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت اردبیل..... ۶۶

شکل ۳-۹- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت اردبیل-نمین.....٦٨
شکل ۳-۱۰- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت اهر ۷۰
شکل ۳-۱۱- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت ماکو.....۷۲
شکل ۳-۱۲- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت مرند ۷٤
شکل ۳-۱۳- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت مغان ۷٦
شکل ۳-۱٤- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت میاندوآب.....۷۸
شکل ۳-۱٥- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت شبستر۱ .....۸۰
شکل ۳-۱٦- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت شبستر۲ .....۸۲
شکل ۳-۱۷- گستره متافازی، کاریوگرام و ایدیوگرام کروموزوم‌های متافازی جمعیت ورزقان ۸٤
شکل ۳-۱۸- دندروگرام ۱۷ جمعیت از گونه *Ae. cylindrica* مربوط ویژگی‌های کاریولوژیکی به روش دورترین همسایه‌ها.....۸۸
شکل ۳-۱۹- تجزیه به مولفه‌های اصلی در ارتباط با ویژگی‌های کاریولوژیکی ۱۷ جمعیت از گونه *Ae. cylindrica*.....۸۹

فصل اول- مقدمه و مروری

بر تحقیقات **گذشته**

مقدمه

تنوع ژنتیکی اساس اصلاح نباتات و برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود. یک اصلاح‌گر در صورتی در برنامه‌های اصلاحی خود موفق خواهد بود که شانس انتخاب مواد مناسب برای او وجود داشته باشد. علیرغم این اهمیت حیاتی، تنوع ژنتیکی بسیاری از محصولات از جمله گندم در طول دهه‌های گذشته کاهش یافته است (نوو و پاین، ۱۹۸۷؛ متاکوفسکی و بابو، ۱۹۹۲). کاهش تنوع علاوه بر اینکه بازده برنامه‌های اصلاحی را می‌کاهد، باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب‌پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات، بیماریها و تنشهای محیطی نیز می‌گردد. بنابراین، محققین به دنبال یافتن منابع جدید ژنتیکی هستند تا بر این مشکلات غلبه نمایند (متاکوفسکی و بابو، ۱۹۹۲؛ سایافی و همکاران، ۱۹۹۳).

خویشاوندان وحشی محصولات زراعی، یک منبع بالقوه مفید و با ارزش تنوع ژنتیکی هستند که مورد توجه اصلاح‌گران بوده و حتی برخی معتقدند که موفقیت آینده اصلاح نباتات در استفاده از منابع ژنتیکی وحشی نهفته است (ژیانگ و همکاران، ۱۹۹٤). گونه‌های وحشی موجود در یک منطقه، نقش مهمی در استمرار جریان ژنی و پایداری فعالیت‌های مختلف کشاورزی داشته و همچنین در تامین ژنهای لازم برای ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی بسیار موثر هستند. از این جهت مطالعه ژنوم گونه‌های وحشی و اجداد وابسته به محصولات زراعی در انتقال ژنهای مفید به گیاهان زراعی، کمک بسزایی در اصلاح صفات کمی و کیفی آنها خواهد کرد (وجدانی، ۱۳۷۵).

ژنوم D، یکی از سه ژنوم اصلی درگندم نان، نقش مهمی در بسیاری از خصوصیات مطلوب زراعی آن از جمله مقاومت به بیماری‌ها (آسفا و فرمن، ۲۰۰٤)، تحمل در برابر تنش‌های محیطی (اسکاتچمن و همکاران، ۱۹۹۲)، کیفیت نانوایی (پاین و همکاران، ۱۹۸۱؛ گوپتا و مکریچی، ۱۹۹٤) و همچنین عملکرد (دلبلانکو و همکاران، ۲۰۰۰) دارد. این ژنوم نه تنها در گندم، بلکه در چندین گونه تتراپلوئید و هگزاپلوئید جنس *Aegilops*، از جمله *Ae. cylindrica* نیز یافت می‌شود که همگی آن را از گونه دیپلوئید *Ae. tauschii* به ارث برده‌اند (ژائـو و کیمبر، ۱۹۸٤).

یکی از راه‌حل‌های موجود برای ایجاد تنوع ژنتیکی، انتقال ژن‌های مفید از خویشاوندان وحشی به گونه‌های زراعی می‌باشد. بنابراین شناسایی ژن‌ها و سایر عوامل مربوطه (پروتئین‌ها، ساختار کروموزومی و...) در اجداد وحشی، نیاز اساسی برای این کار محسوب خواهد شد (باقری و فارسی، ۱۳۸۳).

فصل اول- مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- گونه‌ها، توزیع جغرافیایی و اکولوژی جنس *Aegilops*

Aegilops از گونه‌های آسیای‌غربی و مدیترانه‌ای است که شامل گونه‌هایی می‌شود که هم در نواحی مدیترانه‌ای و هم در نواحی ایرانی_تورانی وجود دارد. این جنس از ۱۰ درجه غرب تا ۸۲ درجه شرق و از ۲٤ تا ٤۷ درجه شمالی یافت می‌شود. *Aegilops* در اروپای مدیترانه‌ای و اوکراین جنوبی، شبه جزیره کریما و همچنین در سراسر بخش‌های قفقاز، آفریقا در شمال صحرای ساهاری و در آسیای غربی و مرکزی، همچنین در ناحیه مرزی نزدیک صحراهای واقع در شبه جزیره عربی در جنوب، و در شرق نزدیک کوههای تیان شان در آسیای مرکزی رشد می‌کند.

چندین گونه *Aegilops* در ایالات متحده نیز دیده شده است که *Ae. cylindrica* در حال حاضر گونه شایع این جنس در این منطقه است. چندین گونه نیز به صورت خودرو در شمال و شمال غربی اروپا و در جزایر قناری رشد کرده‌اند و بومی این مناطق نیستند. پراکنش این جنس از لحاظ ارتفاع از سطح دریا از ٤۰۰ متر تا ۲۷۰۰ متر متنوع می‌باشد اما اکثراً در بین گونه‌های مختلف، متفاوت است (هژ و همکاران، ۲۰۰۲).

وان اسلاجرن (۱۹۹٤) اظهار داشت که بیشترین تنوع در جنس *Aegilops* را در هلال حاصلخیز که محدوده آن از فلسطین اشغالی ، لبنان، سوریه، جنوب شرقی ترکیه، شمال عراق تا شمال غربی ایران می‌باشد، می‌توان یافت. در این ناحیه، بخش مرکزی هلال حاصلخیز، منطقه بین رودخانه دجله و فرات از دامنه‌های جنوبی کوههای تاروس (واقع در جنوب ترکیه) تا زمین‌های پست مجاور رودها، این جنس بیشترین تنوع را دارد.

نقشه‌یابی از مکان‌هایی که دارای گونه‌های غنی از *Aegilops* هستند، نشان می‌دهد که شمال غربی اردن، فلسطین اشغالی، لبنان، غرب سوریه، عراق و ترکیه از جمله نواحی هستند که بیش از ۹ گونه *Aegilops* در

این مناطق یافت می‌شود. دو ناحیه اصلی وجود دارد که در آن مناطق ۱۴-۱۲ گونه *Aegilops* یافت شده‌اند که این مناطق عبارتند از : ۱) غرب سوریه- شمال شرقی لبنان ۲) شمال عراق (وان اسلاجرن، ۱۹۹۴؛ مکستد و همکاران، ۲۰۰۸).

گونه‌های *Aegilops* به مناطقی با شرایط نامساعد محیطی مثل چراگاهها، کنار جاده‌ها، بوته‌زارها و بیشه‌زارها، شن‌زارها، پارک‌های جنگلی متعدد و همچنین در حاشیه و داخل مزارع سازگاری نشان می‌دهند. بنابراین، می‌توان گفت که *Aegilops* هم به مناطقی با پوشش گیاهی و هم نواحی پوشیده از علف هرز سازگار است. گونه‌های *Aegilops* همراه با گراس‌ها و درختچه‌ها رشد می‌کند و به ندرت بر پوشش گیاهی فائق می‌آیند. عادت رشدی یکساله و خودبارور بودن گونه‌های *Aegilops* از استراتژی‌های ممتاز زندگی این جنس در ناحیه‌هایی با بارندگی‌های فصلی و تابستان گرم محسوب می‌شود (هامر، ۱۹۸۲؛ ساکاموتو، ۱۹۸۲). در جنس *Aegilops* در شکل سنبله و نحوه ریزش دانه تنوع زیادی نشان می‌دهند. سه نوع ریزش متفاوت سنبله شامل قطعه قطعه شدن سنبله ها و ریزش آنها ۲) ریزش به صورت قطعاتی متشکل از چند سنبلچه و ۳) ریزش به صورت سنبله کامل مشاهده شده است. اشکال اصلاح شده یا زراعی از گونه‌های *Aegilops* وجود ندارد (وان اسلاجرن، ۱۹۹۴).

۱-۱-۲- گیاه‌شناسی جنس *Aegilops*

این جنس از خانواده *Poaceae* (*Graminea*) می‌باشد که به پنج بخش درون جنسی تقسیم شده است. سه بخش آن عبارتند از: ۱) *Aegilops* (گونه‌های با ژنوم U وترکیبی از سایر ژنوم‌ها با ژنوم U)، ۲) سیلیندیروپیروم[1] (گونه‌های حاوی ژنوم‌های C- و DC-) و ۳) ورتبراتا[2] (گونه‌های حاوی ژنوم D و ترکیبی از سایر ژنوم‌ها با ژنوم D) که این سه بخش، هم شامل گونه‌های دیپلوئید و هم پلی‌پلوئید هستند. دو بخش دیگرعبارتند از: ٤) کوموپیروم[3] (گونه‌هایی با ژنوم‌های N- یا M-) و ۵) سیتوپسیس[4] (با ژنوم S) که این دو بخش فقط شامل گونه‌های دیپلوئید هستند.

[1] *Cylindropyrum*
[2] *Vertebrata*
[3] *Comopyrum*
[4] *Sitopsis*

جنس *Aegilops* شامل ۲۱ گونه یکساله و دارای ژنوم پایه n=x=۷ است که ۱۱ گونه آن دیپلوئید (۲n=۱٤) و ۱۲ گونه آن پلی‌پلوئید (تتراپلوئید: ۲n=۲۸، هگزاپلوئید ۲n=٤۲) می‌باشد (وان اسلاجرن، ۱۹۹٤).

۱-۱-۳- گیاه‌شناسی و اکولوژی گونه *Ae. cylindrica*

گیاهی یکساله و پاییزه، دارای سنبله‌های باریک، اتوگام و آلوتتراپلوئید با ساختار ژنومی ($2n=4x=28,C^cC^cD^cD^c$) بوده که جزو خویشاوندان وحشی و علف هرز غالب مزارع گندم نان محسوب می‌شود. گیاهان به طول (۸۰)٤۰-۲۰ سانتی‌متر، سنبله‌ها بدون ریشک‌ها به (۱۰)۷-۵ سانتی‌متر می‌رسد که دارای (۹)-۷-۵ سنبلچه می‌باشند. پوشینه‌ها به طول ۹-۸ میلی‌متر، پوشینه‌های موجود در سنبلچه‌های انتهایی بدون شاخک بوده و هر چه به سمت بالای سنبله‌ها نزدیک می‌شود به طور محسوس از ضخامت آنها کاسته می‌شود. بالاترین سنبلچه دارای ٤-۳ ریشک کوچک بوده و از پوشینه‌ها و پوشینک‌های درونی ناشی می‌شوند. پوشینه بیرونی در قاعده ریشک دارای دو شاخک می‌باشد. در این گونه کل سنبله به طور کامل و یا اکثراً به صورت سنبلچه‌های استوانه‌ای شکل از هم جدا شده و ریزش دارند. دارای ۲-۱ سنبلچه ناقص می‌باشد. چهار اختلاف از نظر گیاه‌شناسی توسط هامر (۱۹۸۲) برای این گونه نشان داده می‌شود که اکثراً بر اساس وجود و عدم وجود ریشک می‌باشد. دارای ژنوم DC است. این گونه شایع و فراوان بوده و به عنوان یک علف هرز مطرح می‌باشد. نواحی پراکنش این گونه عبارتند از: متمایل به غرب، از ترکیه تا بلغارستان، رومانی، نواحی بالکان و مجارستان، به طرف شمال در نواحی قفقاز و در امتداد ساحل دریای سیاه و به طرف شرق در آسیای مرکزی یافت می‌شود. در هلال حاصلخیز، عمدتاً در بخش‌های شمالی حضور دارد و در ایالات متحده در بسیاری از ایالت‌ها به چشم می‌خورد. گونه‌ای است که بیشتر در مکان‌های پوشیده از علف هرز، سراشیبی کوهستان‌ها و تپه‌های خشک، چمن‌زارها، حاشیه و داخل مزارع می‌روید. بستر خاک مناسب برای این گونه، آهکی و بازالتی می‌باشد ولی ندرتا بر روی خاک شنی رشد می‌کند. ساختار خاک برای این گونه عمدتاً رسی و لومی بوده که علاوه بر آن شن‌های با خلوص زیاد هم شامل این ساختار می‌شوند. میزان بارندگی سالیانه از ٤۵۰ تا ۸۰۰ میلی‌متر متفاوت می‌باشد. از ارتفاع ۲۸ تا تقریباً ۲۰۰۰ متری

رشد می‌کند (تیوتن و هامفریس، ۱۹۸۰؛ کیمبر و فلدمن، ۱۹۸۷؛ وان اسلاجرن، ۱۹۹٤؛ سولر و همکاران، ۱۹۹۷).

ساختار ژنومی *Ae. cylindrica* به وسیله آنالیز جفت‌شدگی کروموزومی (کیهارا، ۱۹۳۱؛ سیرز، ۱۹٤٤؛ مک فادن و سیرز، ۱۹٤٦) و مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای (جانسون، ۱۹٦۷؛ ماسی و همکاران، ۱۹۹۲) مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعات نشان داده که این گیاه در نتیجه آمفی‌پلوئیدی هیبرید حاصل از تلاقی گونه‌های دیپلوئید *Ae. tauschii* (۲n=۲x=۱٤, DD) و *Ae. caudata* (۲n=۲x=۱٤, CC) بوجود آمده است، که *Ae. caudata* به عنوان بخشنده ژنوم C^c و *Ae. tauschii* به عنوان بخشنده ژنوم D^c به این گونه محسوب می‌شوند. همچنین گونه *Ae. cylindrica* سیتوپلاسم خود را از گونه *Ae. tauschii* دریافت کرده است (مان، ۱۹۷٦؛ تونئوکی، ۱۹۸۹؛ ۱۹۹٦).

۱-۲- تکامل *Aegilops* و گندم

مطالعات در زمینه تکامل *Aegilops* و گندم توجه زیادی را در طول بیش از ۱۵۰ سال گذشته به خود معطوف کرده است. تنوع مورفولوژیکی وسیع در داخل بسیاری از گونه‌های گروه آژیلوپس_تریتیکوم، سبب ایجاد نظرات متعددی در زمینه خویشاوندی این دو جنس شده و منجر به ایجاد سیستم‌های مختلف طبقه-بندی این گونه‌ها گردیده است (هامر، ۱۹۸۲؛ وان اسلاجرن، ۱۹۹٤). آخرین مونوگراف در زمینه طبقه‌بندی *Aegilops* توسط وان اسلاجرن (۱۹۹٤) منتشر شده است. وی ضمن بیان خلاصه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیکی، *Aegilops*، آمبلیوپیروم و تریتیکوم را در جنس‌های مجزا قرار داد. وان اسلاجرن (۱۹۹٤) ۲۲ گونه *Aegilops*، ۱ گونه برای آمبلیوپیروم و ٤ گونه برای تریتیکوم توصیف کرده است. ساکس و ساکس (۱۹۲٤) و کیهارا (۱۹۳۱) با استفاده از مطالعات سیتوژنتیکی، انواع ژنوم‌های A، B، C، D، G، M، N، S، T و U را شناسایی نمودند که هنوز هم در تحقیقات مربوط به آژیلوپس/گندم مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مطالعات در زمینه ساختار ژنومی، قابلیت تلاقی بین گونه‌ها، اندازه ژنوم و روابط فیلوژنی اطلاعاتی را فراهم آورده است.

اساساً می‌توان گفت که در بین گندمیان، گندم هگزاپلوئید هیچ جد وحشی هگزاپلوئید مستقلی ندارد. این گیاه دارای سه گروه از کروموزوم‌های هومیولوگ می‌باشد که با نام‌های BBA^uA^uDD مشخص شده‌اند (اولین جایگاه برای کروموزوم‌های B نشان می‌دهد که سیتوپلاسم این گیاه توسط بخشنده ژنوم B تامین شده است) که منشاء این ژنوم با قطعیت کامل مشخص نشده است. در نام‌گذاری ژنوم A^u، u در بالای A، حاکی از این است که ژنوم A از نوع ژنوم موجود در *Triticum urartu* Thum. ex Gandil می‌باشد. ژنوم D از گونه دیپلوئید *Ae. tauschii* در نتیجه آلوپلی‌پلوئید با *T. dicoccom* (BBA^uA^u) تتراپلوئید اهلی شده، منشاء یافته است، که خود *T. dicoccom* نیز از طریق *T. dicoccoides* اهلی شده است. کروموزوم‌های B و A^u از هیبریداسیون بین *T. urartu* دیپلوئید با ژنوم A^uA^u و یک بخشنده ژنوم B دیپلوئید به‌وجود می‌آیند (هانگ وهمکاران، ۲۰۰۲؛ کیلیان و همکاران، ۲۰۰۷). مکرراً گزارش شده که این بخشنده ژنوم B، متعلق به بخش *Aegilops Sitopsis* بوده و شامل ۵ گونه می‌باشد. شواهد محکمی اشاره به تلاقی بین *Ae. speltoides* با ژنوم SS یا گونه‌های مشابه ناشناخته به عنوان والد مادری همه گندم‌های تتراپلوئید (پترسون وهمکاران، ۲۰۰۶؛ کیلیان و همکاران، ۲۰۰۷) با *T. urartu* (A^uA^u) به عنوان والد پدری را دارد (کیلیان و همکاران، ۲۰۰۷).

ایجاد گندم‌هایی با ژنوم BBA^UA^U، ممکن است در ۰/۲۵ تا ۱/۳ میلیون سال قبل مطابق با برخی تخمین ها اتفاق افتاده باشد (موری و همکاران، ۱۹۹۵؛ هانگ و همکاران، ۲۰۰۲). در حالی‌که رویدادی که منجر به ایجاد گندم هایی با ژنوم GGA^UA^U می‌شود احتمالاً بعداً به وقوع پیوسته است، هر چند که با وجود تحقیقات جامع و گسترده منشاء ژنوم B گندم در ابهام بزرگی باقی مانده می ماند (هانگ و همکاران، ۲۰۰۲). از میان همه ژنوم های آنالیز شده، ژنوم *Ae. speltoides* بیشتر به ژنوم B گندم شباهت دارد. امروزه مطالعات مولکولی، همچنین آنالیز اندازه ژنوم حاکی از این است که *Ae. speltoides* می‌تواند به عنوان بخشنده ژنوم B گندم مورد استفاده قرار گیرد (ایلام و همکاران، ۲۰۰۷). متداول‌ترین عقیده این است که ژنوم B توسط سایر گونه های خویشاوندی که هنوز یافت نشده یا منقرض شده اند، به گندم بخشیده شده است. یا اینکه ژنوم B گندم یک ژنوم نوترکیبی است که از مشارکت ژنتیکی چندین گونه‌های دیپلوئید که با هم ترکیب شده اند، به وجود آمده است (زوهاری و فلدمن، ۱۹۶۲؛ جانسون، ۱۹۷۵). برای مطالعه خاستگاه ژنومی در

گندم، ٤ کلون کروموزومی مصنوعی باکتریایی، در بر گیرنده مکان ژنی SPA[1](مکان ژنی فعال کننده پروتئین های ذخیره ای) در ژنوم‌های A، B، D و S استخراج، توالی یابی و با هم مقایسه شدند. بر اساس طول توالی محافظت شده و همچنین شباهت نواحی عناصر غیر ترانسپوزونی مشترک و توالی کدکننده SPA در *Ae. speltoides* نشان داده شد که از لحاظ تکاملی، شباهت بیشتری به ژنوم B موجود در *T. aestivum* در مقایسه با ژنوم های A و D دارد (سالس و همکاران، ۲۰۰۸). *Ae. tauschii* به عنوان بخشنده ژنوم D به گندم، به لحاظ مورفولوژیکی، به دو زیرگونه *Tauschii* و *Strangulata* تقسیم می شود (کیهارا و همکاران، ۱۹٦۵؛ هامر، ۱۹۸۲). مطالعات متعدد نشان می دهد که زیر گونه *Strangulata*، ژنوم D گندم را فراهم آورده است. اما، مشارکت هایی از هر دو زیر گونه در تامین ژنوم D گندم نیز مورد بحث و مطرح است (نیشیکاوا و همکاران، ۱۹۸۰؛ تالبرت و همکاران، ۱۹۹۸). اگر تنها تعداد کمی از ژنوتیپ های *Ae. tauchii* در ایجاد *T. aestivum* شرکت داشته باشند، این پلی‌پلوئیداسیون باید با کاهش تنوع گندم همراه بوده باشد (هادری و همکاران، ۲۰۰۷). اما نرخ های بالای جهش، همراه با اثرات مداخله کننده ناشی از پلی‌پلوئیدی، باعث افزایش تنوع گندم های هگزاپلوئید می‌شود (دابکووسکی و وراک، ۲۰۰۷).

۱-۲-۱- روابط فیلوژنیکی درون و بین گروه *آژیلوپس*_گندم

تلاشهای زیادی برای مطالعه بخشنده‌های ژنوم گندم صورت گرفته و همچنان نیز این مطالعات در حال انجام است. تحقیقات اساساً روی گونه های بخش *Aegilops Sitopsis*، به عنوان بخشنده های بالقوه ژنوم B، *Ae. tauchii* به عنوان بخشنده ژنوم D و همچنین روی *T. urartu* به عنوان بخشنده ژنوم A گندم متمرکز است (وان اسلاجرن، ۱۹۹٤). پترسون و همکاران (۲۰۰٦) دو تا از ژن‌های تک نسخه ای هسته ای (cDNA با میوز مختل، DMC1: و فاکتور تداوم ترجمه G، EF –G) و مکان‌ژنی کلروپلاستی ndhf را دوباره توالی‌یابی کردند. این محققین مدارک مستدلی را یافتند که ژنوم B گندم از *Ae. speltoides* گرفته شده است. مطالعه تکاملی نژادی این گونه‌ها حاکی از این است که *تریتیکوم* و *Aegilops* از یک جد مشترک نیستند. *Ae. speltoides* در جایگاه اصلی یا تحتانی شجره همراه با سایر ژنوم‌های B گندم در یک گروه قرار

[1] Storage Protein Activator

می گیرد، بنابراین، موضوع تک نیایی یا مشترک بودن جد *Aegilops* و تریتیکوم منتفی می شود. در اینجا موضوع دیگری توسط این محققین مطرح می شود و آن این‌است که موضوع تک نیایی زمانی می تواند صحت داشته باشد که *Ae. speltoides* باید از بخش *Aegilops* حذف شده و به جنس *Sitopsis* منتقل شود. یامان و کاواهارا (۲۰۰۵) مطالعاتی را در زمینه ارتباطات درون و بین گونه ای در میان گونه‌های دیپلوئید آژیلوپس_تریتیکوم انجام دادند. مطالعه این افراد روی چهار ناحیه ژنومی کلروپلاستی غیرکدزا متمرکز شد (ناحیه بین ژنی trnC-rpoB، ناحیه بین ژنی trnF-ndhJ، ناحیه بین ژنی ndhF-rpl32 و ناحیه بین ژنی atpI-atPH). این محققین اطلاعات توالی موجود برای هر نمونه (که ۲۷٤۰ جفت باز بدون حذف و اضافه، میکروساتلایت ها یا ریزماهواره‌ها و وارونگی‌ها بودند) را جمع‌آوری کرده و تنوع توالی DNA هر یک را مورد مطالعه قرار دادند و در نتیجه در ۱۱۵ نمونه موجود در ۱۳ گونه دیپلوئید حدود ٦۲ هاپلوتیپ کشف کردند. این محققین شواهدی را یافتند که این شواهد حاکی از این است که گونه‌های *Aegilops* و تریتیکوم به صورت جنس‌های مجزا در نظر گرفته شوند. پس *Ae. speltoides* باید در یک جنس واحد در نظر گرفته شود. در هر کدام از گونه‌ها چندین نمونه مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند . در این بررسی، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که چندین گونه‌های *Aegilops* که در بخش سیتوپسیس *Aegilops* (به استثنای *Ae. speltoides*) قرار دارند، دستخوش گونه‌زایی شده‌اند. این محققین متذکر شده‌اند که *Ae. mutica* در شجره Aegilops–تریتیکوم جایگاه اصلی یا تحتانی را اشغال نمی‌کند و ممکن است به طور نسبیً به تازگی به‌وجود آمده باشد. بنابراین، آن‌ها *Ae. mutica* را در بخش *Aegilops* قرار دادند. در بررسی آن‌ها، *Ae. speltoides* در جایگاه اصلی و تحتانی شجره قرار گرفت و با اختلاف بیشتری از سایر گونه‌های سیتوپسیس متفاوت بود. همچنین به نظر می‌رسد که *Ae. markgrafii* چند نیایی باشد و در بخش *Comopyrum* که دارای اجداد متفاوتی هستند، قرار بگیرد.

۱-۳- مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتیپی

۱-۳-۱- روابط ژنتیکی گندم_*آژیلوپس* از طریق جفت شدگی کروموزومی

هیبرید بین گندم و گونه‌های مختلفی از *Aegilops* توسط محققین مختلف ایجاد و ثبت شده است (کیمبر و ابوبکر، ۱۹۷۹؛ شارما و ژیل، ۱۹۸۳). کیمبر و ابوبکر (۱۹۷۹) یک پایگاه اطلاعاتی مهمی را در زمینه جفت شدگی کروموزومی در هیبرید بین گندم و خویشاوندانش در طول فرایند میوز، ایجاد کرده اند. این پایگاه اطلاعاتی برای ارزیابی قرابت ژنومی و تعیین ارتباطات گونه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (کیمبر و همکاران، ۱۹۸۱؛ ژیل و چن، ۱۹۸۷). بر اساس اطلاعات حاصل از جفت شدگی کروموزومی، روش‌های عددی برای ارزیابی قرابت ژنومی یا شباهت ژنوم‌های A، B و D گندم به ژنوم‌های مربوطه در سایر گونه‌ها، ایجاد شده‌اند (کیمبر و آلونسو، ۱۹۸۱، کیمبر و همکاران، ۱۹۸۱). قرابت ژنومی تک تک کروموزوم‌ها نیز می‌تواند توسط نواربندی متوالی و هیبریداسیون درجا مبتنی بر ژنوم[1] تعیین شود (ژیانگ و ژیل، ۱۹۹٤). تکنیک‌های رنگ‌آمیزی کروموزومی[2] برای ایجاد یک کاریوتیپ سیتوژنتیکی گندم و آنالیز کروموزوم‌های گندمیان مورد استفاده قرار گرفتند (ژیل و کیمبر، ۱۹۷٤؛ ژیل و همکاران، ۱۹۹۱).

روش‌های مبتنی بر مواد غیر رادیواکتیو به منظور مکان یابی درجای توالی‌های DNA روی کروموزوم‌ها، برای ایجاد کاریوتیپ مولکولی گندم، مورد استفاده قرار گرفتند (ریبرن و ژیل، ۱۹۸۵؛ ژیانگ و ژیل، ۱۹۹٤). این روش‌ها تاحدود زیادی به آنالیز سیتوژنتیکی در گندم و گونه‌های خویشاوند و همچنین به انتقال عمودی کروموزوم‌ها یا قسمت‌هایی از کروموزوم‌ها در بین و درون گونه‌ها، سهولت بخشیده‌اند (فریب و همکاران، ۱۹۹٦). اطلاعات حاصل از این رویکردهای متفاوت، اجازه می‌دهد تا توصیف و درک بهتری را در زمینه ارتباطات ژنومی بین گندم و *Aegilops* در اختیار داشته باشیم.

[1] Genomic In Situ Hybridization (GISH)
[2] Chromosome Painting