بسم الله الرحمن الرحیم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و

نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه رازی است.

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی

گرایش بیوتکنولوژی درکشاورزی

عنوان پایان نامه:

ارزیابی تنوع ژنتیکی و واکنش به کشت بافت ارقام و لاین‌های مختلف گندم ایرانی

استاد راهنما:

دکتر کیانوش چقامیرزا

دکتر محسن سعیدی

نگارش:

هادی هاشم‌زاده

بهمن‌ماه ۱۳۹۱

چکیده

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و واکنش به کشت جنین ارقام مختلف گندم ایرانی، تحقیقی طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی وکشت بافت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده برای مطالعه صفات القاء کالوس در ۵۶ رقم گندم ایرانی، طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ده نمونه در هر تکرار بود. در این آزمایش نه صفت زراعی به منظور آزمون همبستگی با سایر صفات مولکولی و حاصل از کشت جنین مورد بررسی قرار گرفت. تنوع ژنتیکی ارقام با استفاده ازنشانگرهای مولکولی ISSR وRAPD مورد ارزیابی قرارگرفت. از ۳۰ آغازگر ISSR موجود ۱۳ آغازگر نوارهای متعدد و چند شکل را تکثیر کردند. میزان چندشکلی حاصل از نشانگر ISSR برابر با (۷۳٪) بود. تجزیه خوشه‌ای با روش CENTROIDبراساس نشانگر مولکولی ISSR ارقام را در هشت خوشه گروه‌بندی کرد. از ۳۵ آغازگرRAPD ۲۰ آغازگر نیز نوارهای متعدد و چند شکل تکثیر نمودند. میزان چندشکلی حاصل از نشانگر RAPD (۸۵٪) و ترکیب داده‌های مولکولی(۸۶/۵۵٪) بود. الگوریتم گروه‌بندی FLEXI براساس RAPD ارقام را در پنج گروه اصلی دسته-بندی کرد. محتوای چند شکلی اطلاعات، میانگین شاخص نشانگر، نسبت چند شکلی مؤثر و قدرت تفکیک آغازگرهایRAPD بیشتر از آغازگرهای ISSR بود. گروه‌بندی براساس داده‌های مولکولی تا حد زیادی ارقام را بر اساس منطقه جغرافیایی و آب و هوایی تفکیک نمود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس کشت جنین نشان داد که بین ارقام مورد مطالعه از نظر صفات درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که درصد القاء کالوس بین ۱۰۰-۷۵ درصد بوده و رقم شماره ۴۴ (کراس البرز) بیشترین رشد نسبی کالوس (۲/۶۹۱) و سرعت رشد نسبی کالوس (۰۶/.) را دارا بود. تجزیه همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که همبستگی بسیار معنی‌داری بین صفات رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس وجود دارد. آزمون مانتل بین نشانگرهای ISSR و RAPD حاکی از همبستگی معنی‌دار بین این دو نشانگر بود. در نتیجه می‌توان گفت که هر دو نشانگر ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی ارقام ارائه نمودند. همچنین نتایج آزمون مانتل نشان داد که بین داده‌های مولکولی ISSR و داده‌های زراعی (بدون تنش خشکی) همبستگی معنی‌داری وجود دارد اما بین RAPD و داده‌های زراعی (بدون تنش خشکی و تنش) همبستگی معنی‌داری نبود. بین صفات القاء کالوس و داده‌های زراعی (بدون تنش خشکی)،ISSR و ترکیب داده‌های مولکولی همبستگی معنی‌داری مشاهده شد. بطورکلی نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از داده‌های زراعی، القاء کالوس و نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR می‌تواند جهت شناسایی وگروه‌بندی ارقام مختلف گندم مفید باشد.

کلید واژه: گندم، تنوع ژنتیکی، کشت جنین، نشانگرهای ISSR و RAPD

فهرست مطالب

فصل اول

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- گندم ۳

۱-۳- تنوع ژنتیکی و اهمیت بررسی آن ۳

۱-۳-۱- نشانگر ژنتیکی و انواع آن ۴

۱-۴-کشت سلول و بافت گیاهی ۷

۱-۴-۱- کشت جنین و القاء کالوس ۸

فصل دوم

۲-۱-کلیات اجرای آزمایش ۱۱

۲-۲- مطالعات مولکولی ۱۱

۲-۲- ۱- شاخص‌های مولکولی ۱۳

۲-۳- مطالعات کشت بافت ۱۴

۲-۳-۱- ضدعفونی ۱۴

۲-۳-۲- کشت ریزنمونه ۱۴

۲-۳-۳- تهیه‌ی محیط کشت پایه ۱۵

۲-۳-۴- صفات اندازه‌گیری شده ۱۵

۲-۴- تجزیه و تحلیل‌های آماری ۱۶

فصل سوم

۳-۱- نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی ۱۹

۳-۱-۱- نتایج حاصل از نشانگر ISSR ۱۹

۳-۱-۲- نتایج حاصل از نشانگر RAPD ۲۶

۳-۱-۳- نتایج به دست آمده از ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۳۱

۳-۱-۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس تجزیه خوشه‌ای ۳۵
۳-۲- نتایج حاصل از کشت جنین بالغ گندم..... ۳۶
۳-۲-۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه درکشت جنین بالغ ۳۶
۳-۲-۲- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه کشت جنین..... ۳۷
۳-۲-۳-تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات اندازه‌گیری شده کالوس..... ۴۰
۳-۲-۴- تجزیه همبستگی صفات در کشت جنین بالغ..... ۴۲
۳-۳-آزمون همبستگی داده‌ها (آزمون مانتل)..... ۴۳
۳-۴- نتیجه‌گیری و پیشنهادات:..... ۴۶
منابع ۴۸

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۲-۱- نام ارقام گندم مورد مطالعه در تحقیق حاضر.....۱۱
جدول ۲-۲- غلظت و ترکیب مواد استفاده شده در واکنش **PCR**.....۱۲
جدول ۲-۳- توالی و مشخصات ۱۳ آغازگر **ISSR** استفاده شده.....۱۲
جدول ۲- ۴-توالی و مشخصات ۲۰ آغازگر **RAPD** استفاده شده.....۱۳
جدول ۳- ۱- نتایج حاصل از آغازگرهای **ISSR** مورد استفاده در ارقام مختلف گندم.....۲۰
جدول ۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر **ISSR** در ۵۶ رقم گندم ایرانی.....۲۵
جدول ۳-۳- نتایج حاصل از ۲۰ آغازگر **RAPD** مورد استفاده در ۵۶ رقم گندم نان ایرانی.....۲۷
جدول ۳-۴- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی ۵۶ رقم گندم ایرانی بر اساس نشانگر **RAPD**.....۳۰
جدول ۳- ۵- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس ترکیب نشانگر **ISSR** و **RAPD**.....۳۵
جدول ۳- ۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام تجزیه خوشه‌ای برای ۵۶ رقم گندم با استفاده از.....۳۶
جدول ۳-۷- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کشت جنین بالغ در ارقام گندم.....۳۷
جدول ۳- ۸- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های گندم برای صفات مورد بررسی در آزمایش.....۳۹
جدول ۳-۹- رتبه‌بندی و انتخاب بهترین گروه از ارقام گندم بر اساس صفات مورد مطالعه ۴۱
جدول ۳-۱۰- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در ۵۶ رقم گندم ایرانی.....۴۳
جدول ۳-۱۱-همبستگی بین ماتریس تشابه داده‌های مولکولی، زراعی در شرایط.....۴۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱- نام ارقام گندم مورد مطالعه در تحقیق حاضر به همراه شماره‌های آنها ۱۱
جدول ۲-۲- غلظت و ترکیب مواد استفاده شده در واکنش PCR ۱۲
جدول ۲-۳- توالی و مشخصات ۱۳ آغازگرISSR استفاده شده ۱۲
جدول ۲- ۴-توالی و مشخصات ۲۰ آغازگر RAPD استفاده شده ۱۳
جدول ۳- ۱- نتایج حاصل از آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ارقام مختلف گندم ۲۱
جدول ۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر ISSR در ۵۶ رقم گندم ایرانی ۲۵
جدول ۳-۳- نتایج حاصل از ۲۰ آغازگر RAPD مورد استفاده در ۵۶ رقم گندم نان ایرانی ۲۷
جدول ۳-۴- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی ۵۶ رقم گندم ایرانی بر اساس نشانگر RAPD ۳۰
جدول ۳- ۵- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس ترکیب نشانگر ISSR و RAPD ۳۵
جدول ۳- ۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام تجزیه خوشه‌ای برای ۵۶ رقم گندم ۳۶
جدول ۳-۷- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کشت جنین بالغ در ارقام گندم ۳۷
جدول ۳- ۸- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های گندم برای صفات مورد بررسی در آزمایش کشت بافت ۳۹
جدول ۳-۸- رتبه‌بندی و انتخاب بهترین گروه از ارقام گندم بر اساس صفات مورد مطالعه ۴۱
جدول ۳-۹- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در ۵۶ رقم گندم ایرانی ۴۳
جدول ۳-۱۰- همبستگی بین ماتریس تشابه داده‌های مولکولی، زراعی در شرایط تنش ۴۳

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* جزء اولین غلات محسوب شده و بدون شک مهمترین گیاه زراعی دنیا می‌باشد (ارزانی، ۱۳۸۳). همچنین این گیاه یکی از عمده‌ترین محصولات کشاورزی تامین‌کننده نیاز غذایی انسان‌ها درکشورهای مختلف می‌باشد (متوالی و همکاران، ۲۰۱۰).

در سال‌های اخیر با افزایش تمایل به کشت‌های خالص گیاهان، دامنه‌ی تنوع ژنتیکی در اکوسیستم‌های کشاورزی کاهش یافته است. کاهش تنوع ژنتیکی، ما را متوجه خطرات بزرگی از جمله آسیب‌پذیری ژنتیکی و در نتیجه اپیدمی برخی بیماری‌ها و ضررهای جبران ناپذیر حاصل از آن می‌کند (سبزه‌علی و همکاران، ۱۳۸۸). ارزیابی تنوع ژنتیکی از نظر مدیریت مؤثر وحفظ منابع ژرم‌پلاسم دارای اهمیت زیادی می‌باشد (رائو و همکاران، ۲۰۰۷). گندم از حیث خصوصیات مختلف کمی وکیفی، سازگاری با عوامل محیطی و انواع مقاومتها دارای تنوع ژنتیکی وسیعی است (ارزانی، ۱۳۸۳). پایه و اساس اصلاح‌نباتات تنوع ژنتیکی می‌باشد. تنوع ژنتیکی از عوامل موثر در ایجاد تنوع و تکامل طبیعی بوده و از اجزای مهم پایداری نظامهای بیولوژیکی می‌باشد (فراهانی و ارزانی، ۱۳۸۵). بیشتر به‌نژادگران اعتقاد بر این مهم دارند که در آینده کاهش تنوع ژنتیکی پیشرفت‌های اصلاحی را مختل می‌کند (راجارم، ۲۰۱۰). با توجه به زمان‌بر بودن اصلاح با روش‌های کلاسیک و سنتی، روش‌ها و تکنیک‌های نوین می‌توانند جایگزین مناسبی برای این روش‌ها در جهت کاهش هزینه و زمان باشند.

کشت بافت گیاهی به عنوان یک تکنیک دارای اهمیت زیادی است. اهمیت آن را می‌توان در حوزه‌های بیولوژی مولکولی گیاهی و مهندسی ژنتیک به منظور تولید گیاهان تراریخت که یکی از موارد رایج در اصلاح مولکولی است بیان نمود و انجام این امر بستگی زیادی به باززایی گیاهان از طریق کشت بافت دارد (واسیل، ۱۹۹۴؛ وی لی و همکاران، ۲۰۰۳). از طرف دیگر تحقیقات صورت گرفته نشان داده که نه تنها ارتباط تنگاتنگی میان تنوع ژنتیکی به دست آمده از تجزیه‌ی مولکولی در سطح سلول با صفات مزرعه‌ای و تنوع‌های حاصل از کشت بافت وجود دارد بلکه میان تنوع‌های سوماکلونالی[1] و صفات متعدد عملکرد و اجزای عملکرد نیز ارتباط موجود است. تنوع‌های سوماکلونالی در گیاهان به عنوان یک ابزار تکمیلی مناسب در اصلاح گیاهان مختلف می‌تواند مورد توجه قرار گیرند (آلووالیا، ۱۹۸۲؛ چنج و همکاران، ۱۹۹۲؛ ایوانوفوف و همکاران ۱۹۹۸). کشت گیاهان کامل (مثل کشت بذر در ارکیده ها و کشت گیاهچه)، کشت

[1] -Somaclonal Variations

جنین (مانند کشت جنین نارس و بالغ)، کشت اندام (مثل کشت مریستم، کشت جوانه جانبی، کشت نوساقه، کشت ریشه، کشت برگ)، کشت کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و کشت تک سلول، کشت و امتزاج پروتوپلاست و کشت بافت‌های گامتوفیتی (به منظور تولید گیاهان هاپلوئید) (کهریزی و همکاران، ۱۳۹۰) از جمله کاربردهای کشت بافت می‌باشد.

تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در سطح برخی صفات مولکولی، زراعی و همچنین واکنش به کشت بافت ارقام مختلف گندم ایرانی، مقایسه نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی، صفات حاصل از کشت بافت و زراعی با هم، غربال ارقام برتر از لحاظ زراعی و کالوس زایی جهت انجام کارهای اصلاحی، پی بردن به روابط خویشاوندی بین ارقام و به کارگیری آنها به منظور انتخاب هرچه بهتر والدین در تلاقی‌ها، توسعه برنامه‌های به‌نژادی و در نهایت به کارگیری این ارقام در اهداف اصلاحی انجام شد.

۱-۲- گندم

گندم معمولی یا گندم نان که در بیش از ۲۵۰ میلیون هکتار از اراضی جهان کشت می‌شود (رایو و همکاران، ۲۰۰۵) و غذای اصلی بیش از ۳۵ ٪ جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد، مهم‌ترین غله و گیاه زراعی دنیا است. وضعیت تولید آن در هر کشوری به طور مستقیم با امنیت جامعه مرتبط است (دای و لی، ۲۰۰۴). گندم دارای گونه‌های زیادی است که در مناطق مختلف دنیا و تحت شرایط اقلیمی متفاوت کشت می‌شوند (خدابنده، ۱۳۸۴) ولی در بین گونه‌های مختلف، بیشترین سطح زیر کشت و بیشترین میزان تولید مربوط به گندم نان است (امام، ۱۳۸۶).

۱-۳- تنوع ژنتیکی و اهمیت بررسی آن

با وجود اینکه کشور ایران از غنای ژنتیکی بالایی در ارتباط با گیاهان مختلف برخوردار است. متاسفانه تا به حال از تنوع ژنتیکی موجود در جهت اصلاح گیاهان زراعی به طور موثری استفاده نشده است. تنوع ژنوتیپ‌ها، نژادها و جمعیت‌های گیاهان زراعی مورد کشت در گذشته بیشتر بوده است، ولی در حال حاضر این تنوع به دلیل اینکه ارقام زراعی اندکی بخش عمده تولید هر محصول را به خود اختصاص می‌دهند به شدت کاهش یافته است. با توجه به اهمیت اقتصادی و زراعی گندم و ارزش استراتژیک این گیاه، اولین قدم برای ارزیابی میزان تفاوت ژنتیکی و دامنه تنوع بین گندم‌های نان ایران و نیز برنامه‌ریزی هدفمند برای کارهای اصلاحی، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ارقام و لاین‌های مختلف است (سبزه‌علی و همکاران، ۱۳۸۸). همچنین وجود تنوع ژنتیکی از عوامل مهم موفقیت به‌نژادگران در برنامه‌های اصلاحی در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها است. به‌نژادگران از این تنوع در تولید ارقام جدید، انتقال ژن-

های مطلوب و تولید پایه‌های ژنتیکی قوی بهره می‌برند. تنوع ژنتیکی عبارت از تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین ژنوتیپ‌های متفاوت یک گونه می‌باشد (روستایی و همکاران،۱۳۸۳). بنابراین می‌توان گفت اساس برنامه‌های اصلاحی، تنوع ژنتیکی بوده و وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از نظر ویژگی‌های مورد بررسی، لازمه گزینش می‌باشد (محمدی، ۱۳۸۵). از کاربردهای مهم تنوع ژنتیکی می‌توان به جلوگیری از یکنواختی ژنتیکی، استفاده از منابع ژنی مفید خویشاوندان وحشی گیاهان زارعی (شارما و همکاران، ۱۹۹۶)، امکان سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم‌ها و نمونه‌گیری موثر از ژنوتیپ‌ها (عبدمیشانی وهمکاران،۱۳۷۷) اشاره نمود.

یکی از راه‌های جلوگیری از انقراض گیاهان خویشاوند گیاهان زراعی، شناسایی آنها و حفظ این گونه‌ها می‌باشد. همچنین برای بهره‌وری از منابع ژنتیکی با حداکثر کارآیی، شناخت مواد ژنتیکی نگهداری شده ضروری است. به این منظور انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاح‌گران گیاهی برای تخمین آن ارائه شده‌اند.

۱-۳-۱- نشانگر ژنتیکی و انواع آن

وجود صفات متنوع در بین افراد ناشی از تفاوت بین ردیف بازهای DNA کروموزوم آنهاست و این تفاوت‌ها به نتاج منتقل می‌شوند. بنابراین می‌توانند به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. تنوع ژنتیکی می تواند به وسیله تخمین فاصله ژنتیکی با استفاده از اطلاعات شجره یا به طور مستقیم با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی ارزیابی شود (استاچل وهمکاران، ۲۰۰۰). عموماً جهت ارزیابی تنوع بین موجودات، از نشانگرها استفاده می‌شود. به طور کلی یک نشانگر باید دست کم دو ویژگی چند شکلی[1] بودن و به توارث رسیدن را داشته باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸). از جمله انواع این نشانگرها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی اشاره کرد (سلوکی و همکاران، ۲۰۰۸). روش‌هایی که در سطح سلول و براساس ماده ژنتیکی صورت می‌گیرد، جدیدتر، آسان‌تر، سریع‌تر و شاید قابل اعتمادتر از سایر روش‌ها باشند (سبزه‌علی و همکاران، ۱۳۸۸). علاوه بر روش‌های مولکولی مطالعه پروتئین‌ها، روش‌های مولکولی دیگری براساس DNA برای مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان وجود دارد. برخی از این روش‌ها عبارتند از: AFLP[2], RFLP[3], RAPD[4], ISSR[5], EST[6] و غیره می‌باشند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸).

1 -Polymorphism
2 - Amplified Fragment Length Polymorphism
3 - Restriction Fragment Length Polymorphism
4 -Random amplified plomorphism DNA
5 -Inter Simple Sequence Repeat
6 -Expressed Sequence Tags

۱-۳-۱-۱- نشانگرهای DNA

اساس این دسته از نشانگرها تجزیه و تحلیل مستقیم DNA می‌باشد. اصول و کاربرد نشانگرهای DNA تقریباً مشابه سایر نشانگرهای ژنتیکی است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸). این نشانگرها دارای توارث ساده و چند شکلی بالا بوده و تشخیص آنها بسیار راحت می‌باشد (عبدمیشانی وشاه‌نجات بوشهری، ۱۳۷۷). بدون تردید، کشف واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازPCR[1] بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. به طور کلی نشانگرهای DNA به دو دسته‌ی عمده تقسیم می‌شوند: ۱) نشانگرهای مبتنی بر PCR (مثل AFLP، ISSR و RAPD)، ۲)نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون (مثل RFLP). در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزار قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان اسفاده شده‌اند (کریمی‌شهری و همکاران، ۱۳۹۱). در بین نشانگرهای موجود، نشانگرهای RAPD و ISSR برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به طور گسترده مورد استفاده قرارگرفته وکارآمد گزارش شده‌اند (ویلیامز و همکاران؛۱۹۹۰و سیکارد و همکاران، ۲۰۰۵). روش ISSR شامل تکثیر نواحی بین ریزماهواره‌ای با استفاده از آغازگرهای SSR دو، سه، چهار و پنج نوکلئوتیدی می‌باشد، با این مزیت که نیازی به دانستن توالی DNA نواحی مورد نظر نمی باشد. در این روش از قطعات تکراری SSR همراه با باز-های انتخابی در انتهای آنها به عنوان آغازگر استفاده می‌شود. بنابراین آغازگرهای ISSR از روی توالی‌های ریز ماهواره‌ای موجود در ژنوم برای هر گونه یا نژاد طراحی می‌شوند (قره‌یاضی، ۱۳۸۴). آغازگرهای RAPD یا DNA چندشکلی تکثیرشده تصادفی، طولی در حدود۱۰-۸ نوکلئوتید داشته و ردیف بازی آن‌ها به طور قراردادی تعیین می‌گردد (ویلیامز و همکاران، ۱۹۹۰). بیشتر قطعات RAPD از تکثیر یک جایگاه نتیجه می‌شوند و دو نوع از چند شکلی اتفاق می‌افتد. به این صورت که باند ممکن است وجود داشته باشد یا وجود نداشته باشد و شدت باند هم ممکن است متفاوت باشد. تفاوت‌ها در شدت باند ممکن است ناشی از تعداد کپی یا فراوانی نسبی توالی باشد (سماگن و همکاران ۲۰۰۶). RAPD یکی از گسترده‌ترین روش‌ها برای مطالعات تنوع ژنتیکی است (گوپتا و راستجی، ۲۰۰۴). کارلیر و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی نقشه‌های ژنتیکی از این نوع نشانگر استفاده کردند. RAPD بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA ژنوم استوار بوده و نیازی به اطلاع دقیق از توالی DNA الگو ندارد. بر اساس یافته‌های سوفرامانین و گوپال کریشنا (۲۰۰۴) که مبتنی بر مقایسه بین نشانگرهای RAPD و ISSR بوده است، مشخص شد که نشانگرهای ISSR کارایی بیشتری دارند. نشانگرهای ISSR به دلیل ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تکرارپذیری، تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا به طورگسترده‌ای به خصوص در گیاهان به کار گرفته شده است. به عنوان مثال توسط بلیر و همکاران (۲۰۰۴) در برنج، گنزالس و همکاران (۲۰۰۵)، صادقی و چقامیرزا (۲۰۱۲) در لوبیا و هائو و همکاران (۲۰۰۵) در جو

1. Polymerase Chain Reaction

به کار رفته و تمامی آن ها بر سودمند بودن این نشانگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی تأکید کرده‌اند. استفاده از نشانگر RAPD برای مطالعه تنوع در بین ارقام انگور رومانی نیز گزارش شده است (بودیا وهمکاران ۲۰۰۹). ژوآنگ و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از نشانگرEST-SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گندم‌های ایرانی جمع‌آوری شده از پانزده کشور جهان، طبق نتایج خود گزارش کردند که این نشانگر نه تنها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مناسب بوده، بلکه استفاده از آن به منظور بررسی بیان ژن‌ها نیز می‌تواند مثمر ثمر واقع گردد. نجفی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین ۳۰ رقم و لاین پیشرفته گندم از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده کردند و میزان چندشکلی در این تحقیق برابر با ۸۰/۲٪ بود. دمبلیدوس و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی ۳۲ نمونه گیاه جعفری (متعلق به خانواده چتریان) را با استفاده از ۶ آغازگر ISSR بررسی کردند و به طور متوسط ۱۰/۲ باند پلی‌مورف مشاهده کردند. آنها نشان دادند این نشانگر از کارایی بالایی برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه برخوردار است. مرادی و چقامیرزا (۱۳۸۶) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ-های مختلف گندم دوروم را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی نمودند و نشان دادند که نشانگرهای ISSR تنوع بیشتری را با ۸۶/۴۴٪ نسبت به نشانگرهای RAPD با ۶۴/۹۱٪ نشان می‌دهند. آنها نتیجه گرفتند که هر دو نشانگر، روشی سریع و ارزان قیمت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی تعداد زیادی نمونه می‌باشند.

گاجیرا و همکاران (۲۰۱۱) در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گونه گیاهی *Mangifera indica* از ۲۱ آغازگر ISSR استفاده نمودند و نتایج آنها نشان داد که این ژنوتیپ‌ها دارای ۹۴/۴ درصد چندشکلی می-باشند. در مطالعه دشتی و همکاران (۱۳۸۸) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای RAPD، در مجموع ۱۰۵ مکان ژنی تکثیر و۹۵۳ باند تولیدگردید. در تحقیقی دیگر سفالیان و همکاران (۲۰۰۹) ۲۷ ژنوتیپ گندم (شامل ۱۸ توده و ۹ رقم رایج گندم) را مورد مطالعه قرار دادند آنها با ۱۵ آغازگر ISSR مجموعاً ۱۰۸ نوار قابل امتیاز تکثیر کردند که ۷۸ نوار (۷۲/۲ درصد) چندشکل بودند. پژمان‌مهر و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP تنوع ژنتیکی ۲۰ جمعیت زیره ایرانی را بررسی کردند و به ترتیب۸۶ و ۷۵ درصد چندشکلی را برای این نشانگرها مشاهده کردند. هانگ و همکاران (۲۰۰۹) از ۱۲ آغازگر RAPD جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ توده گون (*Astragalus adsurgens*) استفاده کردند و به طور متوسط ۶۵ درصد چندشکلی در میان توده‌های نامبرده مشاهده کردند. رای چادوری و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ارقام مختلف لوبیای سودانی (*Cajanus cajan*) توسط ۷۶ آغازگر RAPD، ۷۳/۷ درصد چندشکلی مشاهده کردند.

یافته‌های رینا و همکاران (۲۰۱۲) در مورد شناسایی نشانگرهای RAPD و ISSR برای مقاومت به خشکی در گندم نشان دادکه از بین ۱۴ نشانگر RAPD تنها یک عدد و از ۹۰ نشانگر ISSR فقط ۳ عدد نشانگر در ارتباط با نواحی ژنومیک کنترل‌کننده صفات مقاومت به خشکی بودند. ارزیابی نقوی وهمکاران (۲۰۰۴) از ژنوتیپ‌های گندم نان با استفاده از نشانگرهای SSR و RAPD نشان داد که از ۱۷ پرایمر انتخاب شده

RAPD و ۳۵ جفت پرایمر انتخاب شده برای SSR، سطح چندشکلی ۸۸٪ برای RAPD و ۱۰۰٪ برای SSR بود. همچنین میانگین تشابه ژنتیکی بر اساس RAPD و SSR به ترتیب ۸۸ و ۸۵ درصد بود. بوتا و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم پاکستانی با به کارگیری ۲۵ نشانگرRAPD تعداد ۱۹۰ قطعه DNA تولیدکردند و اذعان داشتندکه نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آینده مفید باشد. مارتوس و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ارزیابی فرسایش ژنتیکی واریته‌های گندم دوروم ایتالیایی و اسپانیایی آزاد شده در طول قرن بیستم دریافتند که درجه‌ی بالایی از شباهت ژنتیکی بین واریته‌ها وجود داشته و تنوع ژنتیکی در طول قرن اخیر حفظ گردیده است. مطالعه‌ی سید طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۸۰ روی ۱۶ واریته‌ی گندم در ایران مشخص نمود که پایه‌ی ژنتیکی محدودی بین واریته‌ها وجود دارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۴۰ ژنوتیپ گندم مربوط به نقاط مختلف دنیا توسط امید بخش و همکاران (۱۳۸۶) با استفاده از ۴۸ جفت نشانگر ریزماهواره نشان داد که ۳۷ جفت نشانگر دارای چند شکلی می‌باشند و در نهایت با استفاده از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در دو گروه مجزا که یک گروه شامل ژنوتیپ-های ایرانی و دیگری مخلوطی از ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی، قرارگرفتند. در مطالعه‌ای دیگر که توسط سبزه‌علی و همکاران (۱۳۸۸) روی ۳۴ رقم و لاین پیشرفته‌ی گندم به‌منظور تعیین روابط خویشاوندی و بررسی تنوع ژنتیکی صورت گرفت در طی آزمایش خود چهار گروه اصلی را بین ۳۴ رقم و لاین مورد مطالعه‌ی مشخص کردند و تجزیه و تحلیل PCA نیز آنها را تأیید کرد.

۱-۴-کشت سلول و بافت گیاهی

موفقیت در مهندسی ژنتیک غلات بستگی به سیستم موثر باززایی گیاه دارد (آیدین و همکاران، ۲۰۱۱). کشت سلول و بافت گیاهی می‌تواند ابزار موثری در اصلاح و توسعه گیاهان باشد (فاضل زاده ۱۳۸۵). در صد سال گذشته به دلیل گسترش اطلاعات بشر از فرآیندهای بیولوژیکی و به‌کارگیری این اطلاعات در برنامه‌های به‌نژادی، افزایش زیادی در تولید اغلب گیاهان زراعی ایجاد شده است. اصلاح ژنتیکی گیاهان به روش‌های معمول در موارد متعدد با موانعی مواجه بوده و یا پیشرفت آن چندان سریع نبوده است. لذا به-کارگیری روش‌های نوین از قبیل کشت بافت‌های گیاهی می‌تواند بعضی از این موانع را مرتفع نماید (پیریک، ۱۳۷۶).

کشت بافت گیاهی به رشد مواد گیاهی عاری از میکروب در شرایط عاری از میکروارگانیسم‌ها مانند محیط غذایی استریل، اطلاق می‌شود و شامل کشت پروتوپلاست، سلول، بافت و اندام گیاهی می‌باشد. برای کاربرد کامل فناوری ژنتیک مولکولی و متداول شدن آن در یک طرح به‌نژادی، به طور معمول روش‌های اختصاصی نیاز است که به ماده ژنتیکی و محیط کشتی که اصلاح کننده با آن کار می‌کند، سازگار باشد (پولمن و اسلیپر، ۱۳۸۳). نگهداری بلند مدت ژرم پلاسم و ذخیره مواد گیاهی، انتخاب موتانت‌های مفید از

بین جهش‌های خود به خودی و القایی، تکثیر سریع کلونی یک گیاه مادری برتر از لحاظ ژنتیکی، حذف پاتوژن‌ها، تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار از گونه‌های زینتی چوبی سخت ریشه‌زا، بازیابی هیبریدها از گونه‌های ناسازگار، تولید گیاهان هاپلویید از طریق کشت بساک از مهم‌ترین کاربردهای کشت بافت گیاهی است. در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای دخالت دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ، ریز نمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود. به منظور دست‌ورزی ژنتیکی و تولید گیاهان زراعی با خصوصیات جدید، به تولید و کشت بافت‌های این گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای نیاز می‌باشد (کهریزی و همکاران، ۱۳۹۰).

۱-۴-۱- کشت جنین و القاء کالوس

در روش کشت جنین بالغ، جنین‌های بالغ جدا شده از بذرهای رسیده، کشت می‌شوند. یکی از کاربردهای کشت جنین بالغ، حذف عامل بازدارنده جوانه‌زنی بذر می‌باشد. با بکارگیری روش‌های کشت جنین، می‌توان گیاهچه‌هایی با توانایی حفظ حیات از آنها تولید نمود. جنین‌های جدا شده از بذر کاملاً رسیده و یا تقریباً رسیده، اتوتروف بوده و در یک محیط کشت ساده مواد معدنی به همراه منبع انرژی به خوبی رشد می‌نمایند (چاولا ۱۳۸۲).

مندوزا و همکاران (۲۰۰۲) اثر قند و اکسین را بر القاء کالوس و باززایی جنین بالغ گندم نان مورد مطالعه قرار داد و اثر چهار نوع اکسین شامل: توفوردی[1]، دای‌کامبا[2]، پیکلورام[3] و پروپیونیک اسید[4] و دو نوع قند ساکارز و مالتوز را بررسی نمودند. اثر نوع اکسین بر القاء کالوس و تولید گیاهچه معنی‌دار شد. وجود یا عدم وجود آندوسپرم به همراه جنین کشت شده می‌تواند اختلالاتی در کالوس‌زایی به وجود آورد. در این رابطه در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای توسط چن و همکاران صورت گرفت، نتایج به دست آمده توسط آنها نشان دادند زمانی که جنین به همراه آندوسپرم کشت می‌گردد به طور معنی‌داری درصد کالوس‌زایی کاهش می‌یابد. همچنین گزارش کردند که فعالیت آنزیمی اکسالات اکسیداز[5] در کشت جنین به همراه آندوسپرم بیشتر از جنین‌های بدون اندوسپرم بوده است و پیشنهاد دادندکه فعالیت آنزیم مذکور می‌تواند به عنوان یک شاخص کالوس-زایی مورد استفاده قرارگیرد.

الحسین و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه جنین‌زایی سوماتیکی و ظرفیت باززایی گیاهان در کشت جنین گندم دوروم، نشان دادندکه پارامترهای اندازه‌گیری شده از جمله ظرفیت مورفوژنتیکی کالوس تحت تاثیر ژنوتیپ و منبع ریزنمونه می‌باشد. یکی از کاربردهای کشت جنین شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در محیط

1- 2,4-D
2- Dicamba
3- Picloram
4- 2- propionic acid
5-oxalate oxidase

آزمایشگاهی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول می‌باشد. در مطالعه‌ای توسط الیاسی و همکاران (۲۰۱۲) مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات تحت مطالعه روی کالوس‌زایی وجود دارد. قابلیت کالوس‌زایی و باززایی گندم‌های سیاه در مطالعه ایمران و همکاران (۲۰۱۲) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آنها نشان دادند که القاء کالوس تا حد زیادی تحت تاثیر رقم و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است.در آزمایشی که توسط آیدین و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد آنها محیط پایه‌ی موراشیگ و اسکوگ را به همراه ۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیکامبا و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA را به عنوان بهترین محیط با بیشترین باززایی گیاه از کشت جنین گندم معرفی کردند.

کشت جنین بالغ و نابالغ سه رقم گندم مقاوم به شوری ایرانی (نیک نژاد، روشن و طبسی) در تیمارهای NaClو ABA[1] نشان دادکه رقم طبسی از نظر رشد کالوس‌ها و نیز القاء کالوس دارای فراوانی کمتری نسبت به دو رقم دیگر می‌باشد (فاضلی‌نسب و همکاران، ۲۰۱۲). یان و همکاران (۲۰۱۰)، مطالعه قابلیت کشت بافت جنین‌های بالغ رقم‌های مختلف برنج را انجام دادند. نتایج مطالعه نشان داد که بیشترین درصد القاء کالوس در رقم ژاپنی برنج زمانی که سیتوکینین در غلظت ۰/۳ گرم در لیتر باشد تشکیل شد. رحمان و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از جنین‌های بالغ سه رقم گندم اقدام به القاء کالوس نموده و گزارش دادندکه بیشترین تعداد کالوس تشکیل شده در سطح هورمونی ۶ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D ولی بزرگترین کالوس‌ها در محیط حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D به دست آمد. وانگ و همکاران (۱۹۸۸) تکنیک‌های تشکیل کالوس و باززایی گیاهچه از پروتوپلاست کشت سوسپانسیون گندم نیمه زمستانه را توسعه دادند. اوزگن و همکاران(۱۹۹۸) نیز برای القاء جنین‌زایی در کالوس گندم از درصدهای بالای توفوردی (۸ میلی‌گرم در لیتر) استفاده و اثر ژنوتیپ را در آن بررسی کردند. وی لی و همکاران (۲۰۰۳) ارتباط بین کشت بافت و صفات زراعی را از طریق کشت جنین بالغ بررسی نمودند. آنها دریافتند که فراوانی باززایی از کالوس‌های به دست آمده از جنین بالغ را می‌توان از طریق دانه در هر سنبلچه و تعداد پنجه تخمین زد. این صفات در مورد جنین نابالغ کمتر تأثیر می‌گذارند. همچنین ثابت شده است که هر چه اندازه جنین رسیده بزرگتر باشد، کالوس‌زایی و باززایی آن بهتر خواهد بود (بیرسن و اوزگن.، ۲۰۰۴). اوزگن و همکاران (۱۹۹۶) با مطالعه‌ی جنین‌های بالغ و نابالغ هفت ژنوتیپ گندم دوروم زمستانه بر روی محیط کشت موراشیک و اسکوگ محتوی توفوردی گزارش نمودند که فراوانی القاء کالوس در جنین‌های بالغ پایین‌تر در حالی که از ظرفیت باززایی آنها بالاتر بود. کهریزی و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه القاء کالوس در گندم نان با استفاده از میدان مغناطیسی به نتیجه مشابهی دست یافتند.

گیاهان باززا شده از کالوس‌های جنینی گندم تنوعات زیادی در مورد خصوصیات زراعی وکیفی نظیر ارتفاع گیاه، ضخامت ساقه، اندازه برگ، باروری گرده‌ها، شکل سنبله، ذخیره پروتئینی گلیادین، حضور یا عدم

[1]-Abscisic acid

حضور ریشک، بلوغ، نوع گیاه و غیره نشان دادند(آلووالیا، ۱۹۸۲؛ مادوک و همکاران، ۱۹۸۵؛ کارور و جانسون، ۱۹۸۹ ؛ چنگ و همکاران، ۱۹۹۲). همچنین تنوع حاصل از کشت بافت برای صفات متعددی از جمله وزن هزار دانه، محتوی پروتئینی، مقادیر رسوب‌گذاری، سختی دانه (هانسون و همکاران، ۱۹۹۴)، ارتفاع گیاه، طول سنبله، طول جوانه اصلی (ایوانوف و همکاران، ۱۹۹۸ ؛ سایمیلیدز و همکاران، ۱۹۹۵)، دانه در خوشه و وزن دانه (رایان و همکاران، ۱۹۸۷ ؛ موهماند و نابورس، ۱۹۹۰)، مقاومت به زنگ قهوه‌ای (رانا و همکاران، ۱۹۹۶)، بلوغ اولیه جنین، عملکرد بالا (لیانگ و همکاران، ۱۹۹۶)، تحمل به سرما (دورفلینگ و ملز، ۱۹۹۷)، و عملکرد بیشتر و زودرسی (آرون و همکاران، ۲۰۰۳) اختلاف نشان داده شده‌اند.

فصل دوم

مواد و روش‌ها

۲-۱-کلیات اجرای آزمایش

این مطالعه در سه بخش مجزا انجام شد. مطالعات مزرعه‌ای در سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹در مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی صورت گرفت. مطالعات مولکولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مطالعات مربوط به کشت جنین در آزمایشگاه کشت بافت گروه زراعت و اصلاح نباتات در طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ به انجام رسید. در این پژوهش ۵۵ رقم و لاین (شماره‌های ۵۰، ۵۳، ۵۴ و ۵۵) گندم نان ایرانی و یک رقم گندم دوروم (شماره ۴۸، زردک) دریافت شده از موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج استفاده شدند (جدول ۲-۱). برای سهولت کار این ارقام از ۵۶-۱ شماره‌گذاری گردیدند.

جدول ۲-۱- نام ارقام گندم مورد مطالعه در تحقیق حاضر به همراه شماره‌های آنها

شماره و نام رقم	شماره و نام رقم	شماره و نام رقم	شماره و نام رقم	شماره و نام رقم	شماره و نام رقم
۱. نیک نژاد	۱۱. کویر	۲۱. ارگ	۳۱.شهریار	۴۱. سیمره	۵۱. چمران
۲. الوند	۱۲. البرز	۲۲. داراب۲	۳۲. هیرمند	۴۲. بهرنگ	۵۲. پارسی
۳. شیرودی	۱۳. بهار	۲۳. سیوند	۳۳. کرج۲	۴۳. آذر۲	۵۳. ۳۱۸
۴. باز	۱۴. اترک	۲۴. طوس	۳۴. رسول	۴۴. کراس البرز	۵۴. ۳۳۰
۵. هامون	۱۵. بزوستایا	۲۵. اروم	۳۵. ارتا	۴۵. ساجی	۵۵. ۳۴۱
۶. الموت	۱۶. نوید	۲۶. پیشتاز	۳۶. مغان۱	۴۶. اوحدی	۵۶. مرودشت
۷. سرداری	۱۷. فلات	۲۷. زرین	۳۷. مغان۲	۴۷. رسد	
۸. زارع	۱۸. پیشگام	۲۸. تجن	۳۸. مغان۳	۴۸. زردک	
۹. شیراز	۱۹. قدس	۲۹. گلستان	۳۹. گوهر	۴۹. کوهدشت	
۱۰. نیشابور	۲۰. مهدوی	۳۰. رز	۴۰. پاستور	۵۰. UN-11	

۲-۲- مطالعات مولکولی

بعد از نمونه‌برداری در اوایل رشد از برگچه‌های جوان و انتقال آنها به دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد (دمای ۷۰-) به دلیل توقف فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده، استخراج DNA از نمونه‌های برگی جوان به روش CTAB (موری و تامپسون، ۱۹۸۰) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. بدین صورت که در دستگاه اسپکتروفتومتری دو طول