

سورة الاحقاف



دانشکده کشاورزی

نام مرکز تهران مرکز

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته: بیوتکنولوژی

گروه: کشاورزی

عنوان

شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با ژن تحمل به تنش سرما در کلون های موتانت زرد آلو با

استفاده از تکنیک مولکولی SSR

زینب ناظمی

اساتید راهنما

دکتر محمدعلی ابراهیمی دکتر محمد طاهر حلاجیان

استاد مشاور

مهندس شهرام مشایخی

اسفند ۱۳۹۰

اینجانب زینب ناظمی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام. بدیهی است **مسئولیت** تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می نماید که مطالب مندرج در این پایان نامه (رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو زینب ناظمی

تاریخ و امضاء ۹۰/۱۲/۰۶

اینجانب زینب ناظمی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می نمایم چنانچه بر اساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو زینب ناظمی

تاریخ و امضاء ۹۰/۱۲/۰۶

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.

ماه و سال

اسفند ۱۳۹۰

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

آنان که وجودم برایشان همه رنج بوده و وجودشان همه برایم مهر
توانشان رفت تا به توانایی برسم و موهایشان سپید گشت تا رو سپید بمانم
آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایه های
جاودانی زندگی من است.

در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می زنم و با دلی مملو از عشق، محبت و خضوع
بر دستشان بوسه می زنم.

تقدیم به همسر عزیزم

که فروغ نگاهش و گرمی کلامش سرمایه جاودانه زندگی من است و
هر ثمره ای نتیجه همراهی، صبر و مهربانی اوست.

و به برادران و خواهرانم

سپاس گذاری

آن بی همتای بزرگ را می ستایم که همواره الطاف بی پایانش را بر من ارزانی داشته است. اکنون که به فضل خداوند منان مراحل تحقیق و نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است بر خود لازم می دانم از تمام کسانی که با بذل عنایت خویش اینجانب را یاری نموده اند سپاسگذاری نمایم .

از جناب آقای دکتر محمدعلی ابراهیمی که همیشه مورد لطف و مرحمت ایشان بوده ام و اجرای این پایان نامه بدون راهنمایی ها و مساعدت های فراوان ایشان میسر نبوده و بدون شک رفتار ایشان چراغ راهنمای این حقیر در تمام مراحل زندگی خواهد بود تشکر و سپاسگزاری می نمایم. از جناب آقای دکتر محمد طاهر حلاجیان به خاطر راهنمایی ها و حمایت‌هایشان سپاسگذارم. از استاد مشاور گرامی جناب آقای مهندس شهرام مشایخی به پاس حمایت های بی دریغشان در تمام مراحل این تحقیق قدردانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر بخشی خانیکی که زحمت داوری پایان نامه بنده را به عهده داشته اند صمیمانه تشکر می نمایم. از جناب آقای دکتر ناصر بوذری، دکتر مجید جوانمرد، محمد امیری پری و کلیه اساتید گروه بیوتکنولوژی و کشت بافت قدردانی می نمایم. از سرکار خانم سپیده جمالی و سرکار خانم شیرین کلاهی کارشناسان آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده کشاورزی کرج و سرکار خانم رحیمی کارشناس آزمایشگاه مولکولی دانشگاه پیام نور و دوستان عزیزم خانم های پاکدل و جامی به جهت همکاری در انجام آزمایشات صمیمانه سپاس گزارم.

از پدر و مادر عزیزم که در امر تحصیل همواره مشوق اینجانب بوده اند و از همسر مهربانم که در طول مدت تدوین این پایان نامه با صبر و شکیبایی فراوان و با فراهم آوردن محیطی آرام و مناسب ادامه کار را برایم امکان پذیر ساختند صمیمانه سپاس گزاری و قدردانی می نمایم .

چکیده:

شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن تحمل به تنش سرما در کلون های موتانت زردآلو با استفاده از تکنیک مولکولی SSR

زردآلو یکی از مهمترین میوه های مناطق معتدله بوده و ایران دومین تولیدکننده این محصول در جهان است. بیشتر ارقام زردآلو زودگل و حساس به سرمای دیررس بهاره هستند، بطوریکه بزرگترین خطری که کشت این محصول را تهدید می نماید، سرمازدگی شکوفه ها و میوه های تازه تشکیل شده آن در اوایل بهار می باشد. در مناطقی که سرمای بهاره در اکثر سالها موجب از بین رفتن یا صدمه زدن به محصولات درختانی نظیر زردآلو می گردد و باعث میلیاردها ریال خسارت می شود، انتخاب یا به وجود آوردن ارقامی که با داشتن سایر خواص مطلوب از خاصیت تحمل به سرما زدگی نیز برخوردار باشند، یکی از روش های عملی کاهش خسارت سرما در زردآلو محسوب می شود. جهت شناسایی نشانگر یا نشانگرهای پیوسته با ژن های کنترل کننده صفت تحمل به سرما در ارقام متحمل و حساس و کلون های موتانت ایجاد شده بر اثر پرتوتابی گاما، از آغازگرهای اختصاصی چند شکل در ژنوم زردآلو استفاده گردید. در آنالیز مولکولی ارقام شاهد (تجاری) و کلون های موتانت، از ۱۱ ترکیب آغازگری تنها ۳ ترکیب آغازگری UDP97402, UDP98412, UDP98411 آلل های چند شکل احتمالی مرتبط با ژن های تحمل به تنش سرما را ایجاد نمودند و تعداد ۳ آلل چند شکل مرتبط با تحمل به تنش سرما شناسایی گردید. بر اساس دندروگرام داده های مولکولی حاصل از آغازگرهای اختصاصی SSR مورداستفاده در این تحقیق، نمونه های مورد مطالعه کلاً به دو دسته کلون های موتانت و شاهد تقسیم بندی گردیدند. هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن تحمل به تنش سرما در کلون های موتانت زردآلو با استفاده از تکنیک مولکولی SSR بود.

واژه های کلیدی: زردآلو، تحمل به سرما، آغازگر، SSR.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول	
مقدمه.....	۲
فصل دوم مبانی نظری و پیشینه تحقیق	
۱-۲- گیاهشناسی و اهمیت زردآلو.....	۷
۱-۱-۲- کاشت.....	۸
۲-۱-۲- زمین و تکثیر.....	۸
۳-۱-۲- سطح زیر کشت.....	۹
۲-۲- تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن.....	۱۲
۳-۲- کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان.....	۱۴
۱-۳-۲- بررسی های فیلوژنتیکی.....	۱۴
۲-۳-۲- ژنتیک جمعیت.....	۱۴
۳-۳-۲- مدیریت گیاهان وحشی.....	۱۴
۴-۳-۲- مدیریت منابع ژنتیکی.....	۱۵
۵-۳-۲- کلکسیون های ذخایر ژنتیکی گیاهان.....	۱۵
۶-۳-۲- کنترل بیماری های گیاهی.....	۱۶
۴-۲- روش های ارزیابی تنوع ژنتیکی.....	۱۶
۱-۴-۲- نشانگرهای مورفولوژیک.....	۱۷
۲-۴-۲- نشانگرهای پروتینی.....	۱۸
۳-۴-۲- نشانگرهای مولکولی.....	۱۹
۴-۴-۲- نشانگرهای DNA.....	۲۰
۵-۲- نشانگرهای مبتنی بر PCR.....	۲۰
۱-۵-۲- نشانگرهای ریزماهواره.....	۲۱
۱-۱-۵-۲- مزایای ریزماهواره ها.....	۲۲

- ۲۲-۲-۱-۵-۲- معایب ریزماهواریه ها.....
- ۲۳-۲-۵-۲- فراوانی و توزیع ریزماهواریه ها در ژنوم.....
- ۲۳-۲-۵-۳- جایگاه ژنومی ریزماهواریه ها
- ۲۴-۲-۵-۴- پیدایش ریزماهواریه ها
- ۲۴-۲-۵-۴-۱- الحاق و جایگزینی نوکلئوتیدها.....
- ۲۵-۲-۵-۴-۲- عناصر متحرک و به وجود آمدن ریزماهواریه ها
- ۲۶-۲-۵-۵- چند شکلی ریزماهواریه ها.....
- ۲۶-۲-۵-۶- کاربردهای ریزماهواریه ها.....
- ۲۷-۲-۵-۷- روش های جداسازی نشانگرهای ریزماهواریه
- ۲۸-۲-۵-۷-۱- روش سنتی.....
- ۲۸-۲-۵-۷-۲- روش توسعه پرایمر.....
- ۲۹-۲-۵-۷-۳- روش هیبریداسیون انتخابی.....
- ۳۱-۲-۶-۶- تنظیم بیان ژن در تنش سرما در گیاهان.....
- ۳۱-۲-۶-۱- اثر تنش سرما.....

فصل سوم مواد و روش ها

- ۳۷-۳-۱- مواد گیاهی
- ۳۹-۳-۲- استخراج DNA.....
- ۳۹-۳-۲-۱- تهیه نمونه های برگی.....
- ۳۹-۳-۲-۲- مراحل استخراج DNA
- ۴۱-۳-۳- تعیین کیفیت و کمیت نمونه های DNA استخراج شده.....
- ۴۲-۳-۴- روش تهیه ژل آگارز
- ۴۳-۳-۵- انجام واکنش PCR.....
- ۴۷-۳-۵-۱- چرخه های دمایی واکنش.....
- ۴۸-۳-۵-۲- الکتروفورز چرخه های تکثیر.....
- ۴۹-۳-۶- تجزیه و تحلیل قطعات حاصل از تکثیر بر روی ژل
- ۴۹-۳-۷- الکتروفورز عمودی ژل پلی اکریلامید.....
- ۵۰-۳-۷-۱- طرز تهیه ژل اکریلامید ۴۰ درصد.....

- ۳-۷-۲- تهیه ژل پلی اکریلامید..... ۵۰
- ۳-۷-۳- طرز تهیه TBE(5X)..... ۵۱
- ۳-۷-۴- طرز تهیه اکریلامید ۶ درصد..... ۵۱
- ۳-۷-۵- آماده کردن شیشه های الکتروفورز عمودی..... ۵۲
- ۳-۷-۶- تزریق ژل..... ۵۳
- ۳-۷-۷- الکتروفورز..... ۵۴
- ۳-۷-۸- بارگذاری نمونه ها..... ۵۴
- ۳-۷-۹- مرحله رنگ آمیزی..... ۵۶
- ۳-۷-۹-۱- تثبیت..... ۵۶
- ۳-۷-۹-۲- مرحله پیش رنگ آمیزی..... ۵۷
- ۳-۷-۹-۳- رنگ آمیزی با نیترات نقره..... ۵۷
- ۳-۹-۶-۴- آبشویی بسیار حساس..... ۵۷
- ۳-۷-۹-۵- مرحله ظهور..... ۵۷
- ۳-۷-۹-۶- مرحله توقف..... ۵۷
- ۳-۷-۹-۷- آبشویی نمایی و خشک کردن..... ۵۸

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری

- ۴-۱- نتایج حاصل از استخراج DNA..... ۶۰
- ۴-۲- تعیین نقطه ذوب (انلینگ) آغازگرهای مورد استفاده..... ۶۲
- ۴-۳- نتایج بررسی تنوع ژنتیکی..... ۷۴
- ۴-۳-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۷۴
- ۴-۳-۲- نتایج حاصل از تکثیر آغازگرها..... ۷۴
- ۴-۳-۳- تعداد آلل های هر نشانگر..... ۷۴
- ۴-۳-۴- اندازه آلل های مشاهده شده..... ۷۴
- ۴-۴- بحث و نتیجه گیری کلی..... ۷۶
- ۴-۵- پیشنهادات..... ۷۷

فصل پنجم: منابع

- منابع..... ۷۹

فهرست اشکال و جداول

صفحه

عنوان

شکل ۱-۲- چگونگی به وجود آمدن ریزماهوره‌های دونوکلئوتیدی در اثر الحاق و جایگزینی نوکلئوتیدی.....	۲۲
جدول ۱-۳- نمونه های درختان زردآلوی مورد استفاده در تحقیق.....	۳۸
جدول ۲-۳- بافر استخراج CTAB.....	۴۰
جدول ۳-۳- اجزاء مخلوط واکنش PCR.....	۴۵
جدول ۴-۳- نام وتوالی آغازگرهای مورد استفاده.....	۴۵
جدول ۵-۳- برنامه PCR، نشانگر SSR.....	۴۷
جدول ۶-۳- ترکیبات مورد نیاز برای اکرلامید ۶٪ برای حجم ۱ لیتر.....	۵۱
جدول ۷-۳- مراحل رنگ آمیزی.....	۵۸
شکل ۱-۴- تصویر نمونه های DNA مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....	۶۰
جدول ۱-۴- تعیین نقطه ذوب (انلینگ) آغازگرهای مورد استفاده.....	۶۱
شکل ۲-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96001 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....	۶۳
شکل ۳-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96001 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....	۶۳

- شکل ۴-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98412 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۴
- شکل ۵-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98412 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکریلامید.....۶۴
- شکل ۶-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP97402 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۵
- شکل ۷-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP97402 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکریلامید.....۶۵
- شکل ۸-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96008 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۶
- شکل ۹-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96008 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکریلامید.....۶۶
- شکل ۱۰-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96005 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکریلامید.....۶۷
- شکل ۱۱-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96005 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۷
- شکل ۱۲-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98409 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکریلامید.....۶۸
- شکل ۱۳-۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98409 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۸

- شکل ۴-۱۴- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98406 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....۶۹
- شکل ۴-۱۵- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98406 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۶۹
- شکل ۴-۱۶- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98405 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....۷۰
- شکل ۴-۱۷- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98405 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۷۰
- شکل ۴-۱۸- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96003 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....۷۱
- شکل ۴-۱۹- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96003 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۷۱
- شکل ۴-۲۰- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96018 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....۷۲
- شکل ۴-۲۱- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP96018 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۷۲
- شکل ۴-۲۲- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98411 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل آگارز.....۷۳
- شکل ۴-۲۳- تصویر الگوی بانندی ترکیب آغازگری UDP98411 در نمونه های مختلف مورد استفاده بر روی ژل اکرلامید.....۷۳

شکل ۴-۲۴- نمودار خوشه ای ۲۹ نمونه زردآلو با استفاده از ۱۱ ترکیب آغازگری SSR

۷۵.....

فصل اول

کلیات

مقدمه

در سراسر دنیا زردآلو جزو لذیذترین میوه ها محسوب می شود و نقش مهمی در آداب و رسوم متعددی از فرهنگهای گوناگون بشری ایفا کرده است. از میوه ها در دو شکل تازه و خشک شده، کنسرو شده و یا فراوری شده مانند مربا، ژله یا مغز شده استفاده می شود (افشاری، ۱۳۸۸). این گیاه بومی آسیای میانه است. ایران به همراه ترکیه از تولیدکنندگان برجسته زردآلو می باشند؛ در ایران این گیاه دارای انواع و اقسام رقم های مرغوب و اصلاح شده می باشد که از مهم ترین آنها می توان شاهرودی، جهانگیری، شکرپاره، شمس، اردباد و غیره را اشاره نمود (خوشخوی، ۱۳۸۳). اکثر این ارقام، زودگل و حساس به سرمای دیررس بهاره هستند بطوریکه بزرگترین خطری که کشت این محصول را تهدید می نماید، سرمازدگی شکوفه ها و میوه های تازه تشکیل شده آن در اوایل بهار می باشد. برطبق ارزیابی های مورفولوژیکی گیاهان نسبت به تنش سرما، رقم جهانگیری نسبت به سایر ارقام تحمل بیشتری نسبت به سرمازدگی از خود نشان داده است و به نظر می رسد زمینه ژنتیکی تحمل به سرمازدگی را دارا می باشد. با توجه به این اطلاعات، این رقم انتخاب گردید تا شانس رسیدن به هدف افزایش یابد. میوه رقم جهانگیری میان رس بوده با رنگ گوشت کرم، هسته آزاد، شکل میوه کروی، نسبت مواد جامد محلول ۱۳٪ و درختان این رقم عادت شاخه دهی عمودی دارند. بطورکلی این میوه از نظر مزه، عطر، طعم و رنگ از بازارپسندی بسیار بالایی در ایران برخوردار است (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج).

عمده ترین عامل محدود کننده کشت زردآلو در ایران سرمازدگی شکوفه ها در اوایل بهار می باشد و ایجاد مقاومت در شکوفه ها و میوه های تازه تشکیل شده به سرمای دیررس بهاره از مهم ترین هدفهای اصلاح این میوه محسوب می شود.

اصلاح نباتات هنر بهبود ژنتیکی گیاهان است و هدف کلی آن بهبود خصوصیات از گیاهان است که در ارزش اقتصادی آنها نقش دارد (زینالی، ۱۳۸۳: ۱۷). تنوع ژنتیکی به منزله ی خون زندگی برای فعالیت های اصلاح نباتات است و جهش^۱ این تنوع ژنتیکی را افزایش می دهد. جهش، حاصل تغییر ناگهانی در مواد وراثتی سلول می باشد و از پدیده های مهم طبیعی به شمار می رود. موفقیت در اصلاح گیاهان به میزان تنوع ژنتیکی موجود در آنها بستگی دارد. از آن جایی که فراوانی جهش های طبیعی کمیاب می باشد، ایجاد جهش القایی وارد چرخه حیات شده و به این ترتیب تنوع ژنتیکی و سازگاری ژنوتیپی به منظور گسترش دامنه گزینش موثر افزایش یافته است. در طی ۴ دهه گذشته تحقیقات در زمینه ایجاد جهش به سرعت پیشرفت نموده است، شمار زیادی از غلات و بقولات تحت تاثیر تیمار های جهش زای فیزیکی و شیمیایی قرار گرفته و تا کنون بیش از ۶۰۰ جهش یافته بخصوص در گیاهان زینتی ایجاد شده است (یونسی، ۱۳۸۹: ۲).

در مناطقی که سرمای بهاره در اکثر سال ها موجب از بین رفتن یا صدمه زدن به محصول درختان میوه سردسیری بخصوص بادام، زردآلو، گوجه، آلو و هلو می گردد، باعث میلیاردها ریال خسارت شده و بقدری این مسئله مهم است که بروز یا عدم بروز سرما در نرخ بین المللی این قبیل محصولات بخصوص بادام و زردآلو اثر می گذارد. با توجه به آنکه سطح زیر کشت زردآلو و قیسی

^۱ . Mutation

در حدود ۴۰۰۰۰ هکتار و میزان تولید آن ۳۰۰۰۰۰ تن در ایران می‌باشد، اگر قیمت هر کیلوگرم از این محصولات در محل باغ ۱۰۰۰ تومان باشد، ارزش آنها بالغ بر ۳۰۰ میلیارد تومان خواهد بود. از طرفی برگه زردآلو نیز از صادرات خشکباری ایران محسوب شده و درآمد ارزی عاید کشور می‌نماید. انتخاب یا بوجود آوردن ارقامی که با داشتن سایر خواص مطلوب از خاصیت تحمل به سرمازدگی نیز برخوردار باشند، یکی از روش‌های عملی جلوگیری از خسارت سرما برای درختان بادام و زردآلو و نظایر آنها محسوب می‌شود (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج).

از علم بیوتکنولوژی بعنوان پلی بین کلکسیون‌های ژرم پلاسمی و برنامه‌های اصلاحی برای معرفی ذخایر ژنتیکی ارزشمند با توجه ویژه به تحمل به سرمازدگی استفاده می‌شود. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن تحمل به تنش سرما منجر به کشف مکانیسم تحمل به سرما و ژنهای دخیل در تحمل به تنش خواهد گردید. با کشف توالیهای ژنی دخیل در تحمل به تنش و کاربرد آنها در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر می‌توان فرآیندهای اصلاحی گیاه زردآلو را تسهیل و تسریع نمود. ایجاد نشانگرهای مولکولی پیوسته با یک ژن ابزاری مفید برای اصلاح گیاه می‌باشد بطوریکه بیان فنوتیپی ژن می‌تواند بدون صرف زمان مشخص شود. از طرفی اعمال تیمارهای تنش بر روی گیاهان جهت تعیین متحمل یا حساس بودن آنها، مستلزم هزینه‌ها و امکانات بسیاری است. ایجاد لاینهای متحمل به تنش سرما با صفات مطلوب چند سال بطول می‌انجامد ولی با ایجاد نشانگرهای مولکولی پیوسته می‌توان زمان این فرآیند اصلاحی را کاهش داد. هزینه‌های آماده‌سازی زمین، ایجاد کرت‌های آزمایشی، اعمال تنش سرما در مراحل مختلف رشد گیاه، ارزیابی و آنالیز فنوتیپی گیاه تحت تنش و هزینه‌های کارگران، سالانه ۵-۱۰ میلیون تومان برآورد می‌گردد.

در این پروژه از نشانگر همباز SSR برای بررسی ژنهای تحمل به تنش سرما در کلونهای موتانت استفاده شد.

ردیف های تکراری ساده (SSR و ریزماهواره ها) ابزاری برای تشخیص در بسیاری از انواع گیاهان بوده است. به خاطر اینکه آنها پایه واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) و تکرارپذیری زیاد و چندشکل و همباز در ژنوم های گیاهان هستند. آغازگرهای طراحی شده برای مکان هندسی ردیف تکراری ساده هلو در سایر محصولات همجنس نیز استفاده شده است (بادام ، زردآلو، گیلاس و آلو) و برای استفاده در نقشه مقایسه ای درون خانواده توصیه شده است. تکنیک SSR کاربردی ترین روش برای نشان دادن تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام می باشد.

از مهمترین ویژگی ها برای افزایش سطح کشت زردآلو در مناطق جدید، سازگاری به شرایط آبی و خاکی و اقلیمی است. در بیشتر مناطق ، افزایش مقاومت به سرمای دیررس بهاره مهمترین موضوع اصلاحی زردآلو می باشد.

هدف نهایی این طرح، شناسایی نشانگرهای مولکولی SSR پیوسته با ژن های کنترل کننده صفت تحمل به تنش سرمای بهاره و تشخیص گیاهان متحمل به تنش می باشد. با بهره گیری از این نشانگرهای شناسایی شده، ایجاد ارقام متحمل به سرما تسهیل شده و همچنین در سایر برنامه های اصلاحی زردآلو و تلاقی بین ارقام و گونه های آن استفاده نمود.

فصل دوم

مبانی نظری و پیشینه تحقیق

۱-۲ - گیاه شناسی و اهمیت زردآلو

زردآلو (در لاتین به معنای زود رسیده) گیاهی است چند ساله و خشبی با نام علمی *Prunus armeniaca* L. و از تیره گلسرخیان (*Rosaceae*) بوده و یکی از میوه های مهم مناطق معتدله محسوب می شود. قد درخت زردآلو به پنج متر می رسد. برگهای غیردایمی آن تقریباً به شکل قلب، رویش صاف و رنگش سبز روشن است. دنباله برگ زردآلو دراز است و شکوفه اش تک گل می باشد. گل زردآلو در اوایل بهار با گلبرگهای سفید و زیبا روی شاخه قبل از رویدن برگ می شکفت. درخت زردآلو گلهای نر و ماده و میوه ای گوشتی و کروی دارد که میوه اش به وسیله یک شیار تقسیم می شود. این میوه ها که مغزش دارای هسته بادامی است دارای رنگهای مختلفی هستند و بسته به رقم به رنگهای زرد و نارنجی و قرمز و کرک دار یافت می شوند. درخت زردآلو در پنج سالگی میوه می دهد. میوه درخت بیشتر روی شاخه های یک ساله قوی دیده می شود. آرایشی که معمولاً به درخت زردآلو می دهند شکل آزاد است. ولی در بعضی مواقع آرایش زنجیری و شکل کاسه ای و شکل مشعل به شاخه های درخت می دهند. وقتی که آرایش شکل آزاد به درخت می دهند، در دو سال اول شاخه های بی مصرف و خشکیده درخت را می برند با استخوان بندی اصلی درخت تقویت شود. هر سال تنه درخت را با کات کبود و آهک آغشته می کنند و محلی را که صمغ از آن درآمده است می تراشند و قدری گل اخرا به آن می مالند (وزیری الهی، ۱۳۸۷).

شاخه های زردآلو از هلو بزرگتر و سنگین تر هستند و به این دلیل این درخت را به شکل شلجمی تربیت می کنند. ۴ تا ۶ سال پس از کاشت، گل زردآلو به طور جانبی روی قسمت یکساله سیخک های کوتاه به وجود می آید. هر سیخک پس از سه سال باروری، خشک می شود. بنابراین