بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه صنعتی اصفهان**

دانشکده کشاورزی

# ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین چند توده تره ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی SRAP و اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی

**مهرنوش میرحکاک**

اساتید راهنما

**دکتر مجید طالبی**

**دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی**

**۱۳۹۳**

**دانشگاه صنعتی اصفهان**

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی خانم مهرنوش میرحکاک

تحت عنوان

# ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین چند توده تره ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی SRAP و اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

در تاریخ ۹۳/۹/۱۱ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

| | |
|---|---|
| ۱- استاد راهنمای پایان نامه | دکتر مجید طالبی |
| ۲- استاد راهنمای پایان نامه | دکتر بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی |
| ۳- استاد مشاور پایان نامه | دکتر مریم حقیقی |
| ۴- استاد داور | دکتر مسعود بهار |
| ۵- استاد داور | دکتر مهدی رحیم ملک |
| سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده | دکتر محمد مهدی مجیدی |

سپاس و ستایش مر **خدای** را **جل و جلاله** که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

سپاسگزار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند.از یکی زاده میشوم و از دیگری جاودانه.استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت و مادری که تار مویی از او بپای من سیاه نماند

## سپاسگزارم

از مادر و پدرم

که دستان پرمهرشان، استوارترین تکیه گاه و نگاه سبزشان، سبزترین نگاه زندگیم است

مادرم؛ هرچه آموختم در مکتب عشق تو آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیت را سپاس نتوانم بگویم

امروز هستی ام به امید تو و فردا کلید باغ بهشتم رضای تو

بوسه بر دستان پرمهرت عزیزم

از همسر مهربانم

که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم

از نوگل باغ زندگیم

که با تمام کوچکی اش از کمک به مادر پرمشغله اش دریغ نکرد

از پدربزرگ و مادربزرگم

که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و به جای دستگیری هنوز زحمتم بر گرده ایشان است

از پدرشوهر و مادرشوهرم

که بسیار مدیون ایشانم

از همه نزدیکان و دوستان

که در جای جای زندگی همراهم بوده و دستم را گرفتند و در عبور از گردنه های سخت زندگیم، با تمام وجود یاری ام کردند

از استادان بزرگوارم

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست

واز همه دوستان و همکلاسی هایم

که آشنایی با ایشان مایه افتخار من است

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این

پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است

**تقدیم به** مادرم، پدرم، همسرم، مادربزرگ و پدربزرگم

که با به دوش کشیدن مسئولیت های من، فرصت اشتغال به تحصیل را برایم فراهم آوردند

ر ه آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم،

باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه، غبار خستگیتان را بزداید

و **تقدیم به** علی؛ فرزند عزیزم

این کاغذپاره بسیار کوچک و حقیر است. به امید آنکه تو آثار ارزشمندت را تقدیم مادرت کنی

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت

فهرست اشکال ..... یازده

فهرست جداول ..... دوازده

فهرست نمودارها ..... سیزده

چکیده ..... ۱

**فصل اول: مقدمه و بررسی منابع**

۱-۱- اهمیت پژوهش ..... ۲

۱-۲- گیاهشناسی تره ایرانی ..... ۴

۱-۳- نشانگرهای ژنتیکی ..... ۵

۱-۳-۱ نشانگرهای مرفولوژیک ..... ۵

۱-۳-۲ نشانگرهای بیوشیمیایی ..... ۵

۱-۳-۳ نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ..... ۶

۱-۴- چگونگی انتخاب نشانگر ..... ۸

۱-۵- نشانگر SRAP ..... ۸

۱-۶- آنتی اکسیدان ها و اهمیت آن ها ..... ۹

۱-۷- طبقه بندی آنتی اکسیدان ها..... ۱۱

۱-۸- اثرات فیزیولوژیکی آنتی اکسیدان ها ..... ۱۲

۱-۹- آنتی اکسیدان های موجود در غذا ..... ۱۲

۱-۱۰- آنتی اکسیدان های سنتزی و مضرات استفاده از آن ها ..... ۱۴

۱-۱۱- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی توسط مدل سیستم DPPH ..... ۱۵

۱-۱۲- نگرشی بر مطالعات انجام شده ..... ۱۵

۱-۱۳- اهداف پژوهش ..... ۱۷

**فصل دوم: مواد و روش ها**

۲-۱- جمع آوری و نگهداری نمونه های گیاهی ..... ۱۸

۲-۲- استخراج DNA های ژنومی از نمونه های گیاهی ..... ۱۹

۲-۲-۱- روش استخراج بهینه سازی شده موری و تامپسون ..... ۱۹

۲-۲-۲- روش استخراج DNA از برگ نارون ..... ۲۰

۲-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA ..... ۲۲

۲-۴- انجام آزمایش های SRAP ..... ۲۲

۲-۴-۱- مواد لازم جهت واکنش PCR ..... ۲۲

۲-۴-۲- تهیه واکنش PCR ..... ۲۳

۲-۴-۳- الکتروفورز محصولات PCR ..... ۲۴

۲-۵- تجزیه و تحلیل داده های SRAP ..... ۲۵

۲-۶- انجام آزمایشات مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی ..... ۲۶

۲-۶-۱- تهیه عصاره ..... ۲۶

۲-۶-۲- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی ..... ۲۶

۲-۶-۳- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی ..... ۲۷

**فصل سوم: نتایج و بحث**

۳-۱- استخراج DNA ژنومی ..... ۲۸

۳-۲- نتایج و آنالیزهای مربوط به نشانگر SRAP ..... ۲۹

۳-۲-۱- چندشکلی جفت آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش ..... ۲۹

۳-۲-۲- تجزیه خوشه ای داده های SRAP ..... ۳۲

۳-۲-۳- تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) ..... ۳۵

۳-۲-۴- آنالیز ژنتیکی جمعیت ..... ۳۶

۳-۳- نتایج و آنالیزهای مربوط به اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی ..... ۳۹

۳-۳-۱- اندازه گیری کل ترکیبات فنولیک ..... ۳۹

۳-۳-۲- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی از روش DPPH ..... ۴۱

**فصل چهارم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادها**

۴-۱- نتیجه گیری کلی ..... ۴۴

۴-۲- پیشنهادها ..... ۴۶

فهرست منابع ..... ۴۸

## فهرست اشکال

**عنوان** **صفحه**

شکل ۳-۱- نمونه های DNA استخراجی از برگ های تره با روش استخراج DNA از برگ نارون ..... ۲۹

شکل ۳-۲- الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر Ee18-Me4 در توده های مورد مطالعه. M نشانگر اندازه ۱۰۰bp ... ۳۰

شکل ۳-۳- الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر Ee18-Me4 در توده های مورد مطالعه. M نشانگر اندازه ۱۰۰bp ... ۳۰

شکل ۳-۴- الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر Ee18-Me4 در توده های مورد مطالعه. M نشانگر اندازه ۱۰۰bp... ۳۱

شکل ۳-۵- الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر Ee18-Me4 در توده های مورد مطالعه. M نشانگر اندازه ۱۰۰bp... ۳۱

شکل ۳-۶- گروهبندی توده های تره مطالعه شده در این پژوهش بر اساس الگوهای نواری SRAP ، با استفاده از ماتریس شباهت دایس و روش UPGMA توسط نرم افزار NTSYS pc 2.02e ..... ۳۴

شکل ۳-۷- نمایش توزیع مناسب نشانگرهای SRAP استفاده شده در سطح ژنوم ..... ۳۶

شکل ۳-۸- دندروگرام حاصل از ماتریس فاصله محاسبه شده توسط نرم افزار POPGENE Ver 3.2..... ۳۹

## فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**

جدول ۲-۱- توده های تره مورد استفاده در این پژوهش ..... ۱۹

جدول ۲-۲- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش ..... ۲۳

جدول ۲-۳- مواد و محلول های ترکیب شده در واکنش PCR ..... ۲۳

جدول ۲-۴- برنامه PCR برای آغازگرهای SRAP ..... ۲۴

جدول ۳-۱- پارامترهای مرتبط با ترکیب آغازگرهای نشانگر SRAP ..... ۳۲

جدول ۳-۲- ضرایب کوفنتیک محاسبه شده برای داده های SRAP برای رسم دندروگرام ..... ۳۲

جدول ۳-۳- تجزیه به مؤلفه های اصلی تعدیل شده در نشانگر SRAP ..... ۳۵

جدول ۳-۴- شاخص های تنوع ژنتیکی توده های تره در سطح جمعیت براساس تفکیک میان توده ها ..... ۳۷

جدول ۳-۵- مقدار شباهت ژنتیکی (بالا) و فاصله ژنتیکی (پایین) در میان توده های تره ..... ۳۸

جدول ۳-۶- میزان جذب نوری غلظت های مختلف مربوط به محلول اسیدتانیک در طول موج ۷۶۵ نانومتر ..... ۳۹

جدول ۳-۷- میزان کل ترکیبات فنولیک در نه توده تره ..... ۴۰

## فهرست نمودارها

**عنوان** **صفحه**

نمودار ۳-۱- مقایسه میزان کل ترکیبات فنولیک (میلی گرم تانیک اسید/ گرم ماده خشک) در توده های تره ..... ۴۰

نمودار ۳-۲- درصد ممانعت کنندگی رادیکال DPPH (محور عمودی) در غلظت های ppm ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ترکیبات فنولیک (محور افقی) توده های تره و نمونه های استاندارد BHT و آسکوربیک اسید ..... ۴۱

## چکیده

تره (*Allium ampeloprasum*) گیاهی تک لپه و از خانواده لیلیاسه می باشد. از نظر گیاهشناسی دوساله محسوب شده ولی در تولید تجاری به عنوان گیاهی یکساله با طول عمر کوتاه کشت می گردد. تره ایرانی یک سبزی برگی پرمصرف با خواص غذایی و دارویی است. بخشی از این خواص به محتوای فنول کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آن نسبت داده می شود. علیرغم اهمیت اقتصادی و دارویی این گیاه، مطالعات مولکولی بسیار محدودی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تره ایرانی صورت گرفته است. به نظر می رسد ارزیابی روابط مولکولی توده های اهلی و وحشی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، می تواند در شناسایی ویژگی های ارزشمند این گیاه بومی اثرگذار باشد. علاوه بر این، اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاه به انضمام مقایسه های مولکولی، دیدگاهی جامع تر و درکی عمیق تر راجع به این گیاه فراهم می آورد. در پژوهش حاضر، توده های زراعی دستگرد، زاینده رود، شادگانی و شهرضا، و توده های وحشی ایلام، بابل، ساری و جهرم و یک توده تره فرنگی به عنوان توده خارج گروهی با استفاده از نشانگر SRAP مورد ارزیابی قرار گرفت. ده ترکیب آغازگری استفاده شده در این توده ها ۳۹۷ نوار تکثیر کرد که همگی چندشکل بودند. میانگین محتوی اطلاعات چندشکل برای کل ترکیبات آغازگری ۰/۲۳۲ محاسبه شد. تجزیه خوشه ای با استفاده ازماتریس تشابه دایس و روش UPGMA با ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۹۱۶ انجام گرفت. نمودار خوشه ای حاصل، توده های زراعی و وحشی را به خوبی از هم تفکیک کرد و توده وحشی ایلام نیز از همه توده ها جدا شد. با توجه به اینکه توده های زراعی و وحشی ایرانی هرکدام از زیرگونه ای متفاوت معرفی شده اند، می توان احتمال داد که توده ایلام زیرگونه متمایزی داشته باشد. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) توزیع یکنواخت نشانگر در سراسر ژنوم را نشان داد. به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در این تحقیق پس از استخراج عصاره متانولی توده های مذکور، اندازه گیری کل ترکیبات فنولی توسط اسپکتروفوتومتری با روش فولین – سیوکالتو انجام شد و خاصیت آنتی اکسیدانی توسط مدل سیستم DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ارزیابی گردید. میزان ترکیبات فنولی در توده های تره ایرانی چندان بالا نبود و از ۶/۵۳۵ تا ۱۹/۷۱۶ میلی گرم تانیک اسید/ گرم ماده خشک متغیر بود. توده دستگرد و پس از آن توده ساری و توده ایلام بیشترین مقدار فنول کل را به خود اختصاص دادند. نتایج DPPH به صورت درصد ممانعت کنندگی رادیکال آزاد DPPH گزارش شد. توده ایلام بیشترین فعالیت را از این منظر به خود اختصاص داد. توده وحشی ایلام که در تجزیه خوشه ای داده های SRAP از سایر توده ها به طور جداگانه دسته بندی شده بود، بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را به خود اختصاص داد؛ بطوریکه فعالیت آنتی اکسیدانی آن تفاوت زیادی با استاندارد BHT نداشت. نتایج حاصل نشاندهنده ویژگی های خاص و منحصربفرد این توده وحشی است.



**واژه های کلیدی**: تره ایرانی، تنوع ژنتیکی، نشانگر SRAP ، آنتی اکسیدان، DPPH.

# فصل اول
# مقدمه و بررسی منابع

## ۱-۱- اهمیت پژوهش

ارقام بومی و خویشاوندان وحشی آنها بخش اعظم ذخایر ژنتیکی هر کشور را تشکیل می دهند. این ارقام به دلیل سازشی که طی دوران های بسیار طولانی با محیط و تنش های محیطی خود پیدا کرده اند، حاوی ژن های بسیار ارزنده ای مانند مقاومت به تنش هایی همچون خشکی، شوری، سرما، گرما مقاومت در برابر آفات و بیماری های مهم می باشند [۱۲]. این منابع تأمین کننده ماده خام ژنتیکی هستند که در صورت بهره برداری صحیح از آنها واریته های جدید و مطلوب تر گیاهی را می توان تولید کرد. [۷].

گاهی انتقال حتی یک ژن مفید و با ارزش از منابع بومی و یا خویشاوندان وحشی آنها چه از طریق روش های معمول اصلاح نباتات و چه از طریق تکنیک های جدید و پیشرفته مهندسی ژنتیک می تواند تحولی عظیم در سرنوشت و وضع آن محصول در یک کشور و یا مناطق وسیعی از جهان ایجاد نماید. این ژن ها عمدتاً در ارقام بومی و خویشاوندان وحشی آنها طی قرن های متمادی بوجود آمده و ذخیره گردیده است [۱۲ و ۶۹]. بخش عمده ای از این منابع ارزشمند به دلیل سیستم های ضعیف دفاعی گیاهان و عوامل طبیعی و مصنوعی فرساینده ژنتیکی مورد آسیب شدید و حتی نابودی قرار گرفته اند.

به نظر می رسد اولین گام در حفاظت ذخایر ژنتیکی، شناخت ارقام بومی و گونه های وحشی باشد. [۱۲] پیشرفت در زمینه فناوری نشانگرهای DNA ، بهنژادگران و زیست شناسان گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مسائل موجود در زمینه طبقه بندی و حفاظت ذخایر ژنتیکی کمک کرده است [۷]

ایران با دارا بودن وسعت زیاد و آب و هوای بسیار متنوع، جزء مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه های گیاهی است. بررسی های مربوط به رده بندی گیاهی نشان می دهند که رویشگاه طبیعی برخی از گونه های گیاهان پیازی مانند تره ایرانی نیز در این سرزمین می باشد. تره ایرانی یکی از مهم ترین سبزیجات برگی در ایران محسوب شده و به علت بومی بودن آن و کمبود اطلاعات، مطالعات همه جانبه در زمینه های مختلف به زراعی و به نژادی این گیاه ارزشمند ضرورت دارد. در دسترس بودن تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های آن می تواند کمک مؤثری به برنامه های اصلاحی این گیاه با ارزش نماید [۹].

پژوهشگران گیاه تره و خصوصاً تره ایرانی را کمتر مورد توجه قرار داده اند. مطالعات محدود انجام شده بر روی تره ایرانی بیشتر بر مبنای صفات مورفولوژی و سیتولوژی بوده است. نشانگرهای مورفولوژی و سیتولوژی اگر چه پایه اصلی برآورد تنوع در عالم گیاهی بوده اند، ولی کاربرد آنها دارای محدودیت و معایبی می باشد. این نشانگرها که تعداد آن ها محدود است، اکثراً متأثر از سن گیاه می باشند و برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر مرحله خاصی از بلوغ گیاه بود و ممکن است قسمت بسیار کمی از سطح واقعی تنوع ژنتیکی در بین گیاهان را نشان دهند. بنابراین حرکت به سمت استفاده از نشانگرهای مولکولی فزونی یافت [۴]. بیولوژی مولکولی ابزارهای مناسبی را برای تجزیه و تحلیل جامع تر موجودات زنده فراهم می آورد. یکی از بنیادی ترین این ابزارها، نشانگرهای مولکولی و اختصاصاً نشانگرهای وابسته DNA است [۶۹ و ۹۰] .

تره یک سبزی برگی پرمصرف با خواص غذایی و دارویی متعددی همچون درمان چاقی، درد مفاصل، تصلب شرایین، یبوست و حالات التهابی حاد و مزمن دستگاه تنفس می باشد. بنابراین مطالعات همه جانبه اصلاحی و تلاش در زمینه تولید ارقام با کیفیت بهتر برای کشت در مناطق مختلف آب و هوای ضرورت دارد. تحقیقات مولکولی و کاربرد نشانگرها به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و توده های این گیاه می تواند کمک مؤثری به برنامه های اصلاحی آن نماید.

در مورد تره ایرانی تاکنون تنها کاربرد یک نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی آن گزارش شده است. در گزارش یاد شده ۲۸ توده زراعی ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD[۱] مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت اعلام شد که توده های تره ایرانی فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر ندارند و به جز تعداد کمی از آنها، اکثراً در یک دسته قرار می گیرند [۴].

نشانگر RAPD اغلب نواحی غیر کد شونده ژنوم را تکثیر می نماید که بروز فنوتیپی ندارند. به نظر می رسد که استفاده از نشانگرهایی که بخش های کد شونده ژنوم را تکثیر می نمایند، می تواند کمک بیشتری در بررسی تنوع موجود بین توده های مختلف تره ایرانی نماید [۵]. به علاوه نشانگر RAPD نسبت به نشانگرهای جدیدتر نظیر SRAP[۲] تعداد نوار کمتری تولید می کند [۱۰]. گزارش شده است که

[۱] Random Amplified Polymorphic DNA
[۲] Sequence Related Amplified Polymorphism

اطلاعات بدست آمده از نشانگرهای SRAP تطابق زیادی با تنوع مورفولوژیکی دارد [۲۹]. این نشانگر تکرارپذیری نسبتاً خوبی دارد و برای مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان مختلفی استفاده شده است [۴۵]. از آنجا که نشانگر SRAP ترکیبی از سادگی، قابلیت اطمینان بالا، پوشش متوسط سرتاسری ژنوم و قابلیت تکثیر نواحی عملکردی ژنوم را دارد [۲۲ و ۳۲]، به نظر می رسد که در بررسی تنوع در سطح مولکولی در توده های مختلف تره ایرانی مفید باشد.

آنتی اکسیدان ها با خنثی سازی رادیکال های آزاد از یک طرف باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری های قلبی، عروقی و سکته می شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطان ها که موجب آسیب به DNA می شود جلوگیری می کنند. [۶۱]. علیرغم وجود آنتی اکسیدان های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تأمین آنتی اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق منابع غذایی تأمین می شود [۹۶]. بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی اکسیدان های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه جات و سبزیجات را توصیه می نمایند، زیرا معمولاً مصرف آنتی اکسیدان های گیاهی عوارض جانبی کمتر و درمان بهتری ایجاد می نمایند [۳۱]. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است [۴۳].

جنس آلیوم[۱] که حدود ۷۰۰ گونه و از جمله تره را شامل می شود ، به عنوان منبعی از متابولیت های ثانویه و آنتی اکسیدان ها شناخته شده اند. اطلاعات کمی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی تره در دست است [۶۰]. در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی تره ایرانی هیچگونه پژوهشی یافت نشد. در این پژوهش ضمن اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی توده ها و معرفی تره ایرانی به عنوان منبعی غنی از فعالیت آنتی اکسیدانی، مقایسه ای بر این مبنا نیز بین توده های مورد مطالعه انجام شد.

### ۱-۲- گیاهشناسی تره ایرانی

تره ایرانی (*Allium ampeloprasum*) گیاهی تک لپه و از خانواده لیلیاسه[۲] و جنس آلیوم می باشد. از نظر گیاهشناسی دو ساله محسوب شده و با گذراندن دوره سرمایی مورد نیاز در سال دوم ساقه گلدهنده ایجاد می کند. در کشت تجاری به عنوان گیاهی یکساله با طول عمر کوتاه کشت می گردد. تعداد ساقه های گلدهنده و میزان تولید بذر در کشت بهاره بیشتر از کشت پاییزه است. در مقایسه با سایر محصولات خانواده آلیوم، تره بیشتر به هوای سرد مقاوم است. تره ایرانی دارای برگ های نواری شکل، نسبتاً پهن و با غلاف دراز است. قاعده نسبتاً ضخیم آن در داخل پیاز جای دارد. گل های آن مجتمع و به

---

[۱] *Allium*
[۲] Liliaceae

صورت چتر بزرگ کروی است. قسمت مورد استفاده این گیاه برگ و پیاز کوچک آن است که به حالت خام یا پخته مصرف می شود. [۴و ۸ و ۶۰].

### ۱-۳- نشانگرهای ژنتیکی

به نژادی یک رقم جدید به زمان و نیروی کار زیادی از سوی به نژادگر نیازمند است، در حالیکه هر بهنژادگر تمایل دارد تا این زمان طولانی را تا حد امکان کاهش دهد. در دو دهه گذشته، کاربرد نشانگرهای ژنتیکی سبب کاهش زمان، هزینه و امکانات مورد استفاده شده است [۴۶ و ۴۷].

نشانگر ژنتیکی صفتی قابل توارث است که در جامعه مورد بررسی دارای چند شکلی باشد [۶۹]. چند شکلی موجود در بین افراد را می توان توسط نشانگرهای مختلف در سه سطح فنوتیپی (مورفولوژیک)، بیان پروتئین ها در اندازه های مختلف (بیوشیمیایی) و توالی نوکلئوتیدهای DNA (مولکولی) مشاهده کرد [۸۸]. نشانگرهای ژنتیکی اطلاعات مفیدی را در تعیین خصوصیات منابع ژنتیکی گیاهی فراهم می آورند. این نشانگرها می توانند در مطالعات مربوط به تنوع زیستی، شناسایی واریته ای و آنالیز فیلوژنی، اکولوژی گیاهی، تهیه کلکسیون و مطالعات اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند.

#### ۱-۳-۱ نشانگرهای مورفولوژیک

نشانگرهای مورفولوژیک تمایز بین افراد مورد مطالعه را با ارزیابی در تظاهر فنوتیپی افراد که توسط بخشی از اطلاعات موجود در DNA به وجود آمده، ممکن ساخته است. تفاوت بین افراد را می توان بدون آگاهی از توالی DNA و از طریق توارث مندلی مورد بررسی و مطالعه قرار داد. این نشانگرها دارای معایب و محدودیت های زیادی می باشند. اساس و توجیه ژنتیکی بسیاری از آنها هنوز معلوم نیست. این نشانگرها غالباً تحت تأثیر محیط و سن موجود قرار می گیرند و گاهی برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر ظهورشان ماند که برای گیاهان چند ساله بسیار مشکل است. از سوی دیگر اغلب این نشانگرها جهش یافته هستند و جمع آوری آنها در یک لاین نه تنها باعث بروز صفات نامطلوب در گیاهان می شود بلکه انجام چنین کاری دشوار، پر هزینه و وقت گیر است. به علاوه تعداد نشانگرهای مورفولوژیک محدود می باشد. چنین محدودیت هایی موجب گرایش محققین به سوی سایر نشانگرهای ژنتیکی شده است [۶۹].

#### ۱-۳-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی

چند شکلی بین افراد ممکن است به صورت بیان پروتئین هایی با اندازه های مختلف آشکار شود. در بررسی این نشانگرها نیاز به استفاده از روشهای مختلف بیوشیمیایی است، لذا به این نوع نشانگرها، نشانگرهای بیوشیمیایی گویند. معمول ترین این نشانگرها آیزوزایم ها هستند که به صورت فرم های

مختلف یک آنزیم واکنش های یکسانی را کاتالیز می کنند. این دسته از نشانگرها دارای وراثت پذیری هم بارزند و در بررسی های تاکسونومیک ژنتیکی و تکاملی گیاهان زراعی و هم چنین مطالعات اکولوژیک کاربرد دارند [۴۴ و ۸۸].

نشانگرهای بیوشیمیایی نیز معایب خاص خود را دارا می باشند. با توجه به اینکه روشهای رنگ آمیزی پروتئین ها در مورد آیزوزایم ها چندان زیاد نیست، تعداد آیزوزایم های قابل ثبت و مشاهده که بتوان از آنها به عنوان نشانگر استفاده نمود، محدود می باشد. این محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم از عمده ترین معایب آنها محسوب می شود و موجب کاهش کارایی این نشانگرها می گردد. از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آیزوزایم هاست. به عبارت دیگر، آیزوزایم ها نه تنها کم هستند، بلکه چند شکلی و تفاوت قابل ثبت نیز در آنها چندان زیاد نیست. پیچیدگی فنوتیپ های الکتروفورزی آیزوزایم ها نیز که بعضاً مشاهده شده است از دیگر معایب این قبیل نشانگرهاست. این پیچیدگی که به دلیل دخیل بودن آنزیم های مرکب از چند پلی پپتید مستقل در ترکیب برخی از آیزوزایم هاست، امتیاز بندی را دشوار می کند [۴۶، ۶۹ و ۹۲].

البته پیشرفت هایی در زمینه الکتروفورز دو بعدی با قدرت تفکیک زیاد تجزیه و تحلیل همزمان هزاران پروتئین را میسر ساخته و موجب شده که این نشانگرها جایگاه از دست رفته خود را دوباره باز یابند [۱۱].

**۱-۳-۳- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA**

برخی از تفاوت های موجود در سطح DNA ممکن است هیچ نوع تظاهر مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نداشته باشند. اینگونه تفاوت ها فقط از طریق بررسی DNA قابل ثبت هستند و به همین دلیل به آنها نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA اطلاق می شود. نشانگرهای ژنتیکی بیانگر تفاوت های بین افراد هستند و معمولاً نماینده یک ژن خاص نیستند، بلکه به عنوان یک علامت یا راهنما برای ژن ها عمل می کنند. این نشانگرها به دلیل فراوانی زیاد و عدم تأثیرپذیری آنها از شرایط محیطی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند[۱۱]. معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[۱]) بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. به دلیل اهمیت و نقش مؤثر PCR در تحول و تکامل روزافزون تکنولوژی نشانگرهای DNA، این نشانگرها به دو گروه مبتنی بر کاربرد PCR و غیر مبتنی بر کاربرد PCR طبقه بندی می شوند [۴۶]. نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR ، از طریق دو رگ گیری (هیبریداسیون) قطعات DNA به کار گرفته می شوند. نشانگر شاخص این گروه RFLP یا تفاوت طول قطعات حاصل از هضم توسط آنزیم های برشی می باشد. این روش شامل برش DNA توسط آنزیم های برشی، جداسازی قطعات DNA بوسیله ژل الکتروفورز و هیبریداسیون قطعات با کاوشگرهای[۲] نشاندار می باشد [۴۶ و ۶۴].

---

[۱] Polymcrase Chain Reaction

[۲] Probs

این نشانگر بر اساس عملکرد آنزیم های محدود کننده که الگوهای متفاوتی از اندازه و تعداد در قطعات DNA موجودات زنده نشان می دهند، پایه گذاری شده است [۶۹].

از بین نشانگرهای مولکولی DNA، نشانگرهای RFLP اولین نشانگرهایی بودند که برای نقشه یابی ژنوم انسان و پس از آن برای نقشه یابی ژنوم های گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند [۶۴]. RFLP در موارد شناسایی ارقام، تهیه نقشه های ژنتیکی، ارزیابی ژرم پلاسم و گزینش غیر مستقیم قابل استفاده بوده و هنوز هم از قدرتمندترین و معتبرترین نشانگرهای DNA محسوب می شود.RFLP دارای محاسن زیادی از جمله تکرارپذیری بالا و قابلیت اعتماد زیاد، همبارز بودن، بالا بودن فراوانی آن و متأثر نبودن از محیط می باشد ولی به علت داشتن معایبی نظیر نیاز به هیبریداسیون و لکه گذاری ساترن[۱]، نیاز به استفاده از مواد خطرناک رادیواکتیو و مواد شیمیایی گران قیمت، پیچیدگی کار و طولانی بودن تجزیه و تحلیل آنها از لحاظ زمانی، نگهداری میکرو ارگانیسم ها برای تهیه کاوشگر و عدم تشخیص ارقام نزدیک به هم؛ کاربرد وسیع آنها محدود گردیده است [۴۶ و ۶۹ و ۷۱].

واکنش زنجیره ای پلیمراز در اواسط دهه ۱۹۸۰ توسط مولیس به منظور تکثیر قطعه ای از DNA ابداع و به کار گرفته شد. این روش در ژنتیک مولکولی انقلاب عظیمی ایجاد کرد. در این روش در حضور آغازگر، نوکلئوتیدها و آنزیم DNA پلیمراز دو رشته DNA الگو در اثر حرارت (۹۴ درجه سانتیگراد) از یکدیگر جدا می شوند (مرحله واسرشته سازی). سپس مخلوط واکنش را به منظور اتصال آغازگرها به DNA الگوی تک رشته ای سرد می نمایند (مرحله اتصال). دمای این مرحله بسته به نوع آغازگرهای مورد استفاده متفاوت است. آنزیم DNA پلیمراز به بسط رشته از گروه 3'-OH انتهایی هر آغازگر می پردازد. این آنزیم در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت را داراست؛ بنابراین دمای مخلوط واکنش را در این مرحله به ۷۲ درجه سانتیگراد افزایش می دهند. جهت گیری آغازگرها طوری است که این گروه ها (3'-OH) در مقابل یکدیگر قرار می گیرند. این موضوع سبب می شود تا سنتز DNA از هر آغازگر به سوی آغازگر مقابلش انجام گیرد و قطعه مورد نظر تکثیر شود. این چرخه (واسرشت، اتصال، بسط) بارها تکرار می شود و ازآنجاییکه محصول هر چرخه از واکنش، به عنوان الگو برای چرخه بعدی به کار می رود، چرخه های متوالی مقدار محصول را زیاد می کند[۶۹]. از جمله مزایای نشانگرهای مبتنی بر PCR می توان به نیاز به مقدار DNA اولیه کم، حذف رادیو ایزوتوپ ها، چند شکلی بالا در زمان کوتاه و نیاز به زمان و هزینه کمتر برای نقشه یابی مولکولی اشاره کرد [۹۴ و ۱۱].

نشانگرهای مبتنی بر PCR بسته به نوع آغازگر به دو دسته تقسیم می شوند:

۱- روش های مبتنی بر آغازگرهای اختیاری که در این روش ها نیازی به اطلاعات اولیه از توالی DNA نیست مانند ISSR، AFLP، RAPD، DAF و SRAP.

[۱] Sothern blotting

۲- روش های مبتنی بر آغازگرهای اختصاصی که با هدف تکثیر قطعه خاصی از DNA انجام می شود و نیازمند اطلاع از توالی DNA است مانند SSR، SCAR، STS و CAPS.

هر کدام از این روش ها مزایا و معایبی دارند و بسته به هدف کار در پروژه های مختلف قابل استفاده اند. اکنون باید پرسید که در یک پروژه از کدام نشانگر استفاده شود؟

### ۱-٤- چگونگی انتخاب نشانگر

نشانگرهای مولکولی اهمیت بسزایی در تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان دارند. از این نشانگرها در تهیه نقشه های ژنتیکی، شناسایی ارقام و تعیین منشأ جغرافیایی گونه ها و مطالعات جهت طبقه بندی گیاهان استفاده های فراوانی می شود. نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای ارزشمندی برای بهنژادی در گونه های مختلف مورد توجه بوده است. برخی بر این باورند که نشانگرهای DNA نقش مهمی در افزایش تولید جهانی از طریق افزایش کارایی برنامه های بهنژادی ایفا خواهند کرد. نشانگرهای مبتنی بر آغازگرهای اختیاری جهت تنوع ژنتیکی و ترسیم سریع نقشه های ژنتیکی، و نشانگرهای مبتنی بر آغازگرهای اختصاصی برای مطالعات ژنتیک جمعیت، نقشه یابی مقایسه ای گونه ها و افزایش دقت نقشه ها مناسب ترند [۷۱ و ۹۰].

انتخاب سیستم نشانگر به هدف، امکانات آزمایشگاهی، سطح پلوئیدی موجود، پیچیدگی روش، قابلیت انتقال پذیری، تکرار پذیری، چگونگی تفسیر نتایج، هزینه و زمان بستگی دارد [۴۶]. هر نشانگر مولکولی مزایا و معایبی دارد که خود محقق بسته به درجه اهمیت و هدف پژوهش، در دسترس بودن سیستم نشانگر، اندازه و ساختار جمعیت مورد مطالعه، در دسترس بودن مهارت و امکانات کافی و دقیق نشانگر مورد نظر را انتخاب می نماید. از جمله مشخصات نشانگر مولکولی برتر، داشتن تکرارپذیری و قابلیت انتقال بالا، اطلاعات چند شکلی بالا، دسترسی آسان و سریع، هزینه کم و توزیع مناسب و یکنواختی در طول ژنوم می باشد [۶۹].

### ۱-۵- نشانگر SRAP

تکنیک SRAP اولین بار در سال ۲۰۰۱ توسط لی و کوییرس معرفی شد [۴۵]. این نشانگر که به گزارش لی و کوییرس عمدتاً چارچوب قرائت باز (ORF[۱]) را مورد هدف قرار می دهد، بر اساس تکثیر توسط دو آغازگر پایه گذاری شده است. آغازگرها ۱۷- ۱۸ نوکلئوتیدی هستند و از سه قسمت تشکیل شده اند. توالی مرکزی، شامل ۱۳- ۱۴ نوکلئوتید، که ۱۱- ۱۰ نوکلئوتید اول از سمت '۵ آن دارای توالی اختصاصی نیستند و به آن توالی پرکننده می گویند و توسط توالی CCGG در آغازگرهای رفت و AATT در آغازگرهای برگشت ادامه پیدا می کنند. این آغازگرها با سه نوکلئوتید اختصاصی در انتهای

[۱] Open Reading Frame