١١٨٤٠١

دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

عنوان

بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی

استاد راهنما

دکتر سید ابوالقاسم محمدی

استاد مشاور

دکتر سعید اهری‌زاد

۱۳۸۸/۷/۶

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

پژوهشگر

فاطمه شفائی داریان

تیر ماه ۱۳۸۸

شماره پایان نامه: ٤

۱۱۸۴۰۱

این پایان نامه با حمایت قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز انجام گردید.

۱۳۸۸/۷/۶

تقدیم به

پدر و

مادر

مهربانم

پروردگارا مرا مدد کن تا دانش اندکم ، نه نردبانی باشد برای فزونی کبر و غرور، نه حلقه‌ای برای اسارت و نه دست مایه‌ای برای تجارت، بلکه گامی باشد برای تجلی انسانیت و متعالی ساختن خود و دیگران. گذر از این راه و فائق آمدن بر مشکلات و دشواری‌ها ممکن نبود مگر به لطف و یاری آنها که از اعطای وجودشان بهره مند بوده‌ام.

اکنون بر خود واجب میدانم که مراتب امتنان و قدردانی خود را به پیشگاه این عزیزان تقدیم نمایم:

از استاد فرزانه و ارجمندم آقای دکتر سید ابوالقاسم محمدی که در نهایت صبر و شکیبایی در تمامی لحظات اجرای این پژوهش از راهنمایی‌های ارزنده‌اشان بهره‌مند شدم، سپاسگذاری می‌کنم.

از جناب آقای دکتر سعید اهری‌زاد، استاد مشاور بزرگوارم، کمال تشکر را دارم.

از داور محترم پایان‌نامه جناب آقای دکتر مصطفی ولی‌زاده که زحمت بازخوانی و داوری را تقبل نمودند، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

از تمامی اساتید بزرگوار گروه که تاکنون افتخار شاگردی در محضرشان را داشته و تمامی آموخته‌هایم را مدیون تلاش‌های مشفقانه این عزیزان هستم کمال امتنان را دارم.

از آقای دکتر علوی‌کیا که از هیچ کمکی در این زمینه دریغ نکردند، بسیار ممنونم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه مولکولی جناب آقای مهندس کهنمویی و خانم مهندس شکویی که نهایت همکاری را با بنده داشتند، تشکر می‌کنم.

از دوستان عزیزم؛ خانم‌ها آسیه فیروزی، آی‌سان حاج ابراهیمی، مریم خاکساران، رقیه شیری داریان، فهیمه صادق‌پور، سهیلا شایان، نرگس یاسین‌زاده، صونا سواری، رحیمه همتی، الناز عبداله زاده، فرزانه شریعتی و آقایان سبحان عطایی و میثم دولتی بسیار متشکرم. از تمامی دوستان و بزرگوارانی که به نوعی از لطف‌اشان در انجام این تحقیق بهره‌مند بودم ولی اسامی‌اشان در این چند خط نمی‌گنجد، بسیار ممنونم. پیمودن این راه بدون یاری، محبت و دلگرمی‌های خانواده عزیزم، به ویژه پدر و مادر مهربانم هرگز ممکن نبود. پس همواره سپاسگذارشان خواهم بود و زحمات بی‌دریغشان را ارج می‌نهم.

فاطمه شفائی داریان

نام خانوادگی: شفائی داریان **نام:** فاطمه

عنوان پایان‌نامه: بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی

استاد راهنما: دکتر سید ابوالقاسم محمدی **استاد مشاور:** دکتر سعید اهری‌زاد

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** مهندسی کشاورزی **گرایش:** اصلاح نباتات

دانشگاه: تبریز **دانشکده:** کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۸/٤/۲۰ تعداد صفحه: ۸۰

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، جو، نشانگرهای IRAP، نشانگرهای REMAP

چکیده

اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، گام اولیه و اساسی در برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد. در پژوهش حاضر تنوع و روابط ژنتیکی ٤٥ لاین و رقم جو مورد استفاده در برنامه‌های اصلاح جو کشور، با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP، بررسی شد. در تکنیک IRAP، ۱۷ ترکیب آغازگری از هفت آغازگر رتروترانسپوزونی و ترکیبات دوتایی آنها، در مجموع ۷۳٦ نشانگر تولید کردند که ۷۱٤ نشانگر چند شکل بودند (۹٤/٤۷٪). متوسط تعداد نشانگر چند شکل ایجاد شده توسط هر ترکیب آغازگری در کل نمونه‌ها (Np)، برابر٤۲ و متوسط تعداد نشانگر برای هر ترکیب آغازگر در واحد فرد ۱۰/٦۸ برآورد شد. متوسط میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب برابر ۰/۲۳ و ۹/۹۷ محاسبه شد. با استفاده از داده‌های IRAP و بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به چهار گروه منتسب شدند. اکثر لاین‌ها با کد شروع EC و لاین A1C84-7 در یک گروه جای گرفتند. ارقام تجاری سهند، آبی‌در، قره‌آرپا، ماکویی۲، گرگان ۰٤، Pamir-009، ICB-111-838، DytonRani، BC-74 و URB-81-3 یک گروه مجزا را تشکیل دادند. این ارقام در کلیه گروه‌بندی‌ها با هم طبقه‌بندی شدند. لاین A1C84-14 به تنهایی در یک گروه قرار گرفت و اکثر لاین‌ها با کد شروع A1 وA2 به همراه بقیه لاین‌ها گروه دیگری را تشکیل دادند. همچنین برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از ضریب فاصله Juke-Cantor و الگوریتم Neighbour-Joining استفاده شد که براساس این گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در پنج گروه واقع شدند. در تکنیک REMAP، از ترکیبات مختلف شش آغازگر رتروترانسپوزونی با شش آغازگر ISSR استفاده شد که از ۳٦ ترکیب ممکن، ۲۹ ترکیب آغازگری دارای تکثیر مطلوب و مناسب برای امتیازدهی بودند. در این تکنیک، ۲۰۰۵ نشانگر تولید شد که ۱۹۹٦ نشانگر چند شکل بودند (۹۹٪). میانگین تعداد نشانگر در واحد فرد برای هر ترکیب آغازگر برابر با ۱۳/۰۵ و متوسط تعداد نشانگر ایجاد شده به ازای هر ترکیب آغازگر در کل نمونه‌ها، ٦۸/۸۳ بود. میانگین PIC وMI به ترتیب برابر۰/۱۹ و ۱۲/۸۹ برآورد شد. در گروه‌بندی لاین‌ها با استفاده از داده‌های REMAP و براساس ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA، کلیه لاین‌های EC به غیر از لاین EC83-17 در یک گروه جای گرفتند. لاین‌های Aths، Schulyer و L.1242 به همراه لاین‌های EM80-7 و EM80-9 با هم گروه بندی شدند. ارقام تجاری سهند، آبی‌در، قره‌آرپا، ماکویی۲، گرگان ۰٤، Pamir-009، ICB-111-838، DytonRani، BC-74 و URB-81-3 به گروه سوم منتسب شدند. لاین‌هایEC83-17، A1C84-7 و A1C84-14 با هم یک گروه را تشکیل دادند و اغلب لاین‌های با کد شروع A1 و A2 به همراه ژنوتیپ‌های 73M4-C، CB74-2، ماکویی۱، ریحانه و کویر با هم طبقه‌بندی شدند. در بین ضرایب تکاملی مناسب‌ترین

گروه‌بندی با استفاده از ضریب فاصله P-distance والگوریتم Neighbour-Joining بدست آمد که ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه منتسب کرد. در این گروه‌بندی، بر خلاف سایر روش‌ها، اغلب لاین‌های با کد شروع A1 و A2 از یکدیگر تفکیک شدند. گروه‌بندی با استفاده از ترکیب داده‌های IRAP و REMAP نیز مطابقت بالایی با گروه‌بندی حاصل از داده‌های نشانگری منفرد نشان داد. در تجزیه به مولفه‌های اصلی، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو مولفه اصلی اول، با گروه‌بندی حاصل از تجزیه‌های خوشه‌ای مطابقت داشت. در کلیه گروه‌بندی‌ها تطابق چندانی با اطلاعات شجره‌ای موجود مشاهده نشد.

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- جو و اهمیت آن ۳

۱-۲- تنوع ژنتیکی و لزوم بررسی‌آن ٤

۱-۳- روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی ٦

۱-۳-۱- نشانگرهای DNA ٦

۱-٤- اجزای جابجاشونده ژنوم ۷

۱-٤-۱- رتروترانسپوزون‌ها ۸

۱-٤-۱-۱- انواع رتروترانسپوزون‌ها ۹

۱-٤-۱-۱-۱- رتروترانسپوزون‌های شبیه Ty1-*copia* ۱۲

۱-٤-۱-۱-۲- رتروترانسپوزون‌های شبیه Ty3-*gypsy* ۱۲

۱-٤-۱-۱-۳- LINE ۱۳

۱-٤-۱-۱-٤- SINE ۱۳

۱-٤-۱-۲- توزیع رتروترانسپوزون‌ها ۱٤

۱-٤-۱-۳- چرخه جابجایی رتروترانسپوزون‌ها ۱۵

۱-٤-۱-٤- منشأ رتروترانسپوزون‌ها و روند تکاملی آنها ۱٦

۱-٤-۱-۵- تأثیر تنش‌ها در فعالیت رتروترانسپوزون‌ها ۱٦

۱-٤-۱-٦- جهش‌های ناشی از فعالیت رتروترانسپوزون‌ها ۱۸

۱-۵- رتروترانسپوزون‌ها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی ۲۰

۱-۵-۱- تکنیک S-SAP ۲۳

۱-۵-۲- تکنیک RBIP ۲۳

۱-۵-۳- تکنیک های REMAP و IRAP ۲٤

۱-۵-٤- تکنیک IMP ۲۵

۱-٦- مروری بر تحقیقات انجام شده ۲٦

هدف ۳۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۳۲
۲-۲- استخراج DNA ۳۳
۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ۳۳
۲-٤- آغازگرهای مورد استفاده ۳٤
۲-۵- تفکیک محصولات تکثیری ۳۵
۲-٦- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳٦
۲-٦-۱- امتیاز دهی الگوهای نواری حاصل ۳٦
۲-٦-۲- تجزیه‌های آماری ۳٦
۲-٦-۲-۱- معیارهای کارایی نشانگرها ۳٦
۲-٦-۲-۲- تجزیه خوشه‌ای ۳۷
۲-٦-۲-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی ۳۷

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- تعیین کیفیت و کمیت DNA ۳۸
۳-۲- چند شکلی و اطلاعات ژنومی حاصل از نشانگرها ٤۰
۳-۲-۱- چند شکلی و کارایی نشانگرهای IRAP ٤۰
۳-۲-۲- چند شکلی و کارایی نشانگرهای REMAP ٤٤
۳-۲-۳- اطلاعات ژنومی حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP ٤۷
۳-۳- گروه‌بندی ارقام و لاین‌های جو ۵۰
۳-۳-۱- گروه‌بندی ارقام و لاین‌های جو بر اساس نشانگرهای IRAP ۵۰
۳-۳-۱-۱- گروه‌بندی ارقام و لاین‌های جو بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس ۵۰
۳-۳-۱-۲- گروه‌بندی ارقام و لاین‌های جو بر اساس الگوریتم Neighbour-Joining و
ضریب فاصله Juke-Cantor ۵۳
۳-۳-۱-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس نشانگرهای IRAP و ضریب تشابه دایس ۵٦

۳-۳-۲- گروه‌بندی بر اساس نشانگرهای REMAP..... ۵۹

۳-۳-۲-۱- گروه‌بندی ارقام و لاین‌های جو بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس..... ۵۹

۳-۳-۲-۲- گروه‌بندی لاین‌ها و ارقام جو بر اساس الگوریتم Neighbour-Joining و

ضریب فاصله P-distance ۵۹

۳-۳-۲-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از نشانگرهای REMAP و ضریب تشابه دایس..... ۶۲

۳-۳-۳- گروه‌بندی لاین‌ها و ارقام جو بر اساس ترکیب داده‌های IRAP و REMAP ۶۴

۳-۳-۳-۱- گروه‌بندی لاین‌ها و ارقام جو بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه تطابق ساده..... ۶۴

۳-۳-۳-۲- گروه‌بندی لاین‌ها و ارقام جو بر اساس الگوریتم Neighbour-Joinig و

ضریب فاصله P- distance..... ۶۴

۳-۳-۳-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از ترکیب داده‌های IRAP و REMAP و ضریب تشابه دایس ۶۵

۳-۳-۴- مقایسه نتایج گروه‌بندی انجام شده بر اساس ترکیب داده‌های IRAP و REMAP با

گروه‌بندی حاصل از IRAP..... ۶۹

۳-۳-۵- مقایسه نتایج گروه‌بندی انجام شده بر اساس ترکیب داده‌های IRAP و REMAP با

گروه‌بندی حاصل از REMAP..... ۷۰

۳-۳-۶- جمع بندی نتایج حاصل از روش‌های مختلف گروه‌بندی..... ۷۱

نتیجه گیری ۷۲

پیشنهادات ۷۳

منابع مورد استفاده ۷۴

مقدمه

مقدمه

تنوع ژنتیکی در اصلاح نباتات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در واقع اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانش و فن‌آوری‌هایی هستند، که ساختار ژنتیکی گیاه را در جهت منافع اقتصادی انسان تغییر می‌دهند. لازمه هر تغییر وجود تنوع است، پس لازمه تغییر ژنتیکی نیز وجود تنوع ژنتیکی است. تنوع ژنتیکی یک صفت معین اندازه پراکنش ارزش‌های آن صفت است، به طوری که تأثیر محیط از آنها زدوده شده باشد. تنوع، اساس برنامه‌های اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، و ماده خام ضروری برای آن است. یک به‌نژادگر در صورتی می‌تواند امید به موفقیت زیادی در برنامه‌های اصلاحی خود داشته باشد که شانس مواد مناسب برای او موجود باشد. از این روست که منابع ژنتیکی گیاهی یکی از مهم‌ترین، پرارزش‌ترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شود (وجدانی، ۱۳۷۲).

از کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان می‌توان به تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، مطالعه ژنتیک جمعیت، مطالعه و حفاظت ذخایر ژرم‌پلاسمی اشاره کرد.

هر چند در جمعیت‌های گیاهی و جانوری صفات مورفولوژیکی و روابط شجره‌ای به عنوان معیارهای مطالعه تنوع ژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما در سال‌های اخیر با پیشرفت در زمینه مولکولی و تکنولوژی نشانگرهای مولکولی، استفاده از این نشانگرها، به عنوان ابزارهای کارا و مکمل به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین افراد به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (محمدی، ۱۳۸٦).

جو از جمله گیاهان زراعی است که جایگاه خاصی در صنعت دام و طیور کشور دارد و پس از گندم، برنج و ذرت، بیشترین تولید و سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است.

مطالعات بسیاری در رابطه با تنوع ژنتیکی در جو انجام شده است. علت وجود مطالعات ژنتیکی متعدد در جو آن است که این گیاه انتشار وسیعی در نقاط مختلف دنیا دارد و جوهای زراعی تعداد کمی کروموزوم دارند. در این مطالعات از تکنولوژی‌های مولکولی مختلف استفاده شده است. از آن جمله می‌توان به مطالعات پکچونی و همکاران (۱۹۹۳) با استفاده از تکنیک RFLP و ترزی (۱۹۹۷) از طریق نشانگرهای RAPD برای برآورد تشابه ژنتیکی در برخی ژنوتیپ‌های جو اشاره نمود.

با توجه به اینکه، قسمت اعظم DNA ژنومی در بسیاری از گونه‌ها شامل نواحی غیر رمزکننده است، با اتکا به تنوع بیوشیمیایی یا مورفولوژیکی فقط قسمت محدودی از تنوع که به نواحی رمزکننده بر می‌گردد، بررسی می‌شود. تنوع در قسمت‌های بدون رمز ژنوم، خواه در نواحی بین ژنی باشد و یا در اینترون‌ها، احتمالا کمتر تحت فشار گزینش طبیعی است، بنابراین تعداد جایگاه‌های چند شکل در این نواحی ژنوم فوق‌العاده زیاد خواهد بود (کرسی، ۱۹۹۷). از جمله نشانگرهای مبتنی بر نواحی غیر رمزکننده، می‌توان از SSR، ISSR، IRAP و REMAP نام برد. در این پژوهش از نسل جدید نشانگرهای DNA یعنی نشانگرهای مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی (IRAP و REMAP)، برای بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ٤٥ رقم و لاین مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی جو در کشور استفاده شده است.

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- جو و اهمیت آن

جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) به تیره غلات (Poaceae) تعلق دارد. جو گیاهی یکساله و خود بارور می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۵). جنس *Hordeum* به طور گسترده‌ای در هردو نیم‌کره، پراکنده است و شامل ۳۳ گونه و ٤٦ تاکسا می‌باشد (نقل از ویسینت و همکاران، ۱۹۹۹b). عقیده بر این است که ارقام زراعی جو تنها متعلق به گونه *H. sativa Mjessn* یا *H. vulgare* L. می‌باشند (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۸۰).

اندازه ژنوم (هاپلوئید) در جنس *Hordeum* به طور قابل توجهی متغییر است. برای گونه‌های دیپلوئید، $۱۰^{۹}$×٤/٥-۲/۷ جفت باز و برای گونه‌های تتراپلوئید، $۱۰^{۹}$×۸/۹ جفت باز می‌باشد (کانکانپا و همکاران، ۱۹۹٦). برخلاف گندم و یولاف، گونه‌های زراعی جو دیپلوئید هستند (x=۷) (کاظمی اربط، ۱۳۷۸). هر ژنوم هاپلوئید جو زراعی $۱۰^{۹}$×٤/۸ جفت باز دارد (ویسینت و همکاران، ۱۹۹۹b).

جو یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است و از نظر تولید جهانی چهارمین غله بعد از گندم، برنج و ذرت محسوب می‌شود. بیشتر از $۱۰^{٦}$×۱۳٦ تن جو، هر ساله در جهان تولید می‌شود که در تغذیه دام، طیور و صنعت کاربرد دارد (فنگ و همکاران، ۲۰۰٦). علاوه بر این، جو یکی از محصولات غذایی مهم در بسیاری از ممالک جهان نظیر اروپای شرقی و غرب آسیا به شمار می‌رود. این گیاه به علت مقاومت در برابر ناسازگاری‌های محیطی و به سبب نیاز آبی کم و تطابق با محیط در بسیاری از نقاط دنیا کشت می‌شود (بهنیا، ۱۳۷۳).

جو در زمره شش گیاه مهم مدل در مطالعات ژنتیکی و سیتوژنتیکی گیاهان گلدار قرار دارد. کاربرد وسیع این گیاه در مطالعات ژنتیکی به علت دیپلوئید بودن، طبیعت خود گرده افشان و دورگ‌گیری نسبتاً

آسان می‌باشد. همچنین از این گیاه در مطالعات سیتوژنتیکی به علت داشتن کروموزوم‌هایی نسبتاً بزرگ و کم (x=۷) در سطح وسیع استفاده می‌شود (یزدی‌صمدی و عبدمیشانی، ۱۳۷۵).

واویلوف دو مرکز پیدایش برای جو ذکر کرده است. یک مرکز، شامل اتیوپی و افریقای شمالی و مرکز دیگر شامل چین، ژاپن و تبت می‌باشد (یزدی‌صمدی و عبدمیشانی، ۱۳۷۵). براساس مطالعات سیتوژنتیکی و سوابق باستان‌شناسی، منشا جو زراعی خاور نزدیک معرفی شده است (راشد محصل و همکاران، ۱۳۷٦). چین به عنوان مرکز پیدایش و تنوع جو، غنی از خویشاوندان وحشی و بومی این گیاه می‌باشد (نقل از هو و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۲- تنوع ژنتیکی و لزوم بررسی‌آن

به ترکیب ژنتیکی غیریکنواختی که در مقابل شرایط محیطی واکنش‌های متفاوتی ایجاد می‌کند، تنوع ژنتیکی گویند. تنوع قابلیت سازگاری دراز مدت و بقای جمعیت‌ها را تضمین می‌کند، به عبارت دیگر هر چه تنوع افراد در یک جمعیت بیشتر باشد توان زنده ماندن جمعیت در مقابل شرایط نامساعد و تغییرات محیطی بیشتر خواهد بود. بنابراین، آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد دقیق سطح آن در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی است. وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و جمعیت‌ها لازمه بهبود و کارآیی گزینش است. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها، برای انتخاب والدین جهت انجام تلاقی‌های کارآ و اتخاذ روش اصلاحی مناسب ضروری است. نشانگرهای مولکولی ابزارهایی توانمند برای شناسایی ارقام، بررسی تکامل گونه، بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها هستند (راسل و همکاران، ۱۹۹۷).

تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی ممکن است از طریق فرآیندهای متفاوتی نظیر جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده شدن ژنتیکی و گزینش ایجاد شود (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). به عقیده واویلوف و داگت (نقل از گبرو و همکاران، ۲۰۰۲) جایگاه‌های عمده تنوع ژنتیکی گیاهان، خاستگاه‌های اصلی آنها می‌باشند و مجموعه‌های تهیه شده از این مناطق منابع بسیار غنی از ژن‌های مهم به حساب می‌آیند.

به کارگیری و استفاده از تنوع طبیعی به چند دلیل مهم است (کومار، ۱۹۹۹):

- یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی باعث آسیب پذیری گیاهان در برابر اپیدمی‌ها و عوامل نامساعد محیطی می‌شود که در نتیجه آن کاهش و افت عملکرد رخ می‌دهد.

- بسیاری از خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی دارای ژن‌های مفیدی هستند که باعث تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شوند. شناسایی این ژن‌ها و انتقال آنها به ارقام تجاری از افت عملکرد جلوگیری خواهد کرد. بنابراین، شرط لازم برای اصلاح و بهبود صفات گیاهی مهم، شناخت ساختار ژنتیکی مجموعه ژرم‌پلاسم است.

با توجه به اینکه پرهزینه‌ترین بخش در برنامه‌های اصلاحی و تولید هیبریدهای پرمحصول انتخاب والدین مناسب می‌باشد، بنابراین، روشی که بتواند شناسایی مطلوب‌تری را فراهم نماید، در پیشبرد اهداف اصلاحی حائز اهمیت خواهد بود. تخمین فاصله ژنتیکی به کمک نشانگرهای DNA در سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم و گزینش افراد مناسب برای دورگ‌گیری اهمیت دارد. در این صورت شانس بدست آوردن لاین‌های مطلوب و مورد نظر افزایش می‌یابد. بنابراین، با داشتن اطلاعات کافی از روابط خویشاوندی، امکان موفقیت طرح افزایش خواهد یافت. پس هر چه اطلاعات درباره روابط ژنتیکی افراد جامع‌تر باشد، احتمال گزینش سریع و دستیابی به لاین‌های امید بخش، بیشتر خواهد بود (بوکلر و تورنسبری، ۲۰۰۲).

۱-۳- روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی

مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که تفاوت بین افراد، جمعیت‌ها و یا گروه‌ها با استفاده از روش‌های آماری خاص و بر اساس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات مختلف، بررسی می‌شود. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده علاوه بر صفات مورفولوژیک، از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای مکمل استفاده می‌شود (محمدی، ۱۳۸٦).

۱-۳-۱- نشانگرهای DNA

به طور کلی هر خصوصیتی از مولکول DNA که منحصر به فرد بوده و به آسانی در آزمایشگاه قابل ارزیابی باشد، می‌تواند به عنوان یک نشانگر DNA استفاده شود. نشانگرهای DNA تفاوت افراد را در سطح مولکول DNA نشان می‌دهند (محمدی، ۱۳۸٦). تجزیه نشانگرهای DNA، می‌تواند در هر مرحله از چرخه زندگی موجود انجام شود و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و با استفاده از هر نوع بافتی انجام می‌شود (کومار، ۱۹۹۹).

از کاربردهای نشانگرهای DNA می‌توان به موارد زیر اشاره کرد (کومار، ۱۹۹۹):

- تهیه نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی
- تجزیه مکان یابی ژن‌ها
- بررسی روابط ژرم‌پلاسمی
- گزینش با کمک نشانگر
- همسانه‌سازی بر پایه نقشه

نشانگرهای DNA به دو گروه نشانگرهای مبتنی بر PCR و نشانگرهای مبتنی بر دورگ‌گیری اسیدهای نوکلئیک تقسیم می‌شوند. از مهم‌ترین نشانگرهایی که چند شکلی آنها براساس دورگ‌گیری

تعیین می‌شود، می‌توان به RFLP[1] و VNTR[2] اشاره کرد. نشانگرهای مبتنی بر PCR، بسته به نوع آغازگرهای مورد استفاده شامل نشانگرهایی با آغازگرهای تصادفی، نیمه تصادفی یا نیمه اختصاصی و اختصاصی هستند.

از نشانگرهای تصادفی مبتنی بر PCR می توان RAPD[3]، AFLP[4]، ... اشاره کرد. از نشانگرهای اختصاصی می توان SSR[5]، IRAP[6] را نام برد. نشانگر TRAP[7] از نشانگرهایی با آغازگرهای اختصاصی و نیمه اختصاصی می‌باشد (محمدی، ۱۳۸٦).

۱-٤- اجزای جابجاشونده ژنوم

اندازه ژنوم به طور قابل توجهی بین گونه‌های گیاهی مختلف، متفاوت است. در آرابیدوپسیس حدود ۱٤٥ Mbp است، در حالیکه در سوسن 10^{5} Mbp می‌باشد (آراماجاناتان و ارل، ۱۹۹۱). با توجه به اینکه تعداد ژن‌های ساختاری خیلی زیاد نیست، تنوع موجود در محتوای ژنوم بستگی به تفاوت در مقدار توالی‌های تکراری DNA دارد (بنتزن، ۱۹۹٦). در ژنوم‌های گیاهی اجزای جابجاشونده ژنوم بخشی از DNA تکراری ژنوم را تشکیل می‌دهند (اشمیت، ۱۹۹۹). این اجزا دارای دو ویژگی اساسی هستند (بنتزن، ۲۰۰۰):

- دارای توانائی جابجایی از مکانی به مکان دیگر در ژنوم می‌باشند.
- در طی جابجایی می‌توانند تعدادی از نسخه‌های خود را در ژنوم تکثیر کنند.

مطالعات ژنومی در موجودات مختلف نشان داده است که اجزای جابجاشونده ژنوم نقش مهمی را در تکامل ژنوم‌های موجودات ایفا می‌کنند (فدروف، ۱۹۹۹).

1-Restriction Fragment Length Polymorphism
2-Variable Number of Tandem Repeat
3- Random Amplified Polymorphic DNA
4-Amplified Fragment Length Polymorphism
5-Simple Sequence Repeat
6-Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism
7-Target Region Amplification Polymorphism

ترانسپوزون‌ها[1] و رتروترانسپوزون‌ها[2] دو گروه عمده اجزای جابجاشونده ژنوم‌های گیاهی هستند. این دو گروه به وسیله ساختار و روش‌های متفاوت جابجایی از هم متمایز می‌شوند (کوکینوس، ۲۰۰۲).

رتروترانسپوزون‌ها، به وسیله یک RNA واسطه و با کمک آنزیم ترانسکریپتاز معکوس در ژنوم جابجا می‌شوند. درحالیکه ترانسپوزون‌ها، به طور مستقیم از طریق DNA به نواحی مختلف ژنومی انتقال می‌یابند (کاساکوبرتا و سانتیگو، ۲۰۰۳). ترانسپوزون‌ها برای اولین بار توسط باربارا مک‌کلینتاک (۱۹٤۸) در ذرت شناسایی شدند. این اجزا در تمامی موجودات یافت شده‌اند و بخش عمده‌ای از این اجزا در تمامی پروکاریوت‌ها وجود دارند (بنتزن، ۲۰۰۰). از جمله این اجزا می‌توان Ac/Ds، Spm/Dspm (En/I) و *Mutator* در ذرت و Tam را در گل میمون نام برد (کنز و همکاران، ۱۹۹۷؛ هیروچیکا، ۱۹۹۷).

این اجزا مسئول جهش‌های ناپایدار هستند (هیروچیکا، ۱۹۹۷). به علت اینکه سیستم جابجایی آنها به صورت برش و درج می‌باشد، یک جزء فعال از یک ناحیه ژنومی برش داده شده و در محل دیگر در ژنوم درج می‌شود. بنابراین، اندازه ژنوم چندان افزایش پیدا نمی‌کند (کنز و همکاران، ۱۹۹۷). امکان انتقال ترانسپوزون‌ها به گونه‌های گیاهی مختلف، استفاده گسترده آنها را به عنوان ابزارهای ژنتیکی مولکولی برای همسانه‌سازی و تجزیه ژن‌ها و ایجاد جهش، در گستره وسیعی از گونه‌ها ممکن کرده است (هیروچیکا، ۱۹۹۷).

۱-٤-۱- رتروترانسپوزون‌ها

رتروترانسپوزون‌ها، فراوان‌ترین و گسترده‌ترین بخش از اجزای جابجاشونده ژنوم در یوکاریوت‌ها هستند (کومار و بنتزن، ۱۹۹۹). رتروترانسپوزون‌ها برای اولین بار در ژنوم‌های جانوری و مخمرها یافت شدند. اکنون مشخص شده است که این اجزا در بسیاری از ژنوم‌های گیاهی وجود دارند و بخش بزرگی از ژنوم برخی از آنها را تشکیل می‌دهند (تودوروفسکا، ۲۰۰۷).

1.Transposons
2.Retrotransposons