بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی
گرایش بیوتکنولوژی گیاهی

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های بادام وحشی با استفاده از نشانگرهای مولکولی (SSR, AFLP)

اساتید راهنما:
دکتر جهانگیر حیدرنژاد کریمی
دکتر سید مجتبی خیام نکوئی

استاد مشاور:
دکتر علی ایمانی

مؤلف:
زهرا دهقانی

شهریورماه ۱۳۸۹

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

گروه بیوتکنولوژی
دانشکده کشاورزی
دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو: زهرا دهقانی

اساتید راهنما:
دکتر جهانگیر حیدرنژاد کریمی
دکتر سید مجتبی خیام نکوئی

استاد مشاور: دکتر علی ایمانی

داور ۱: دکتر قاسم محمدی‌نژاد

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر شهرام پورسیدی

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

پیشگاه قطب دایره امکان حضرت مهدی ارواحنا له الفداه.

تشکر و قدردانی:

پروردگارا، ای معبود من تو را سپاس که در تاریکی راه به من نشان دادی، در تنهایی دستهایم را گرفتی و حمایتم نمودی و لذت آموختن را به من چشاندی.

اکنون که با لطف و عنایت پروردگار این پایان‌نامه به پایان رسید، بر خود لازم می‌دانم تا از زحمات پدر و مادرم و خواهران و برادرانم تشکر نمایم. همچنین از استاد راهنمای گرامی‌ام در دانشگاه شهید باهنر کرمان جناب آقای دکتر جهانگیر حیدرنژاد کریمی که صبورانه مرا راهنمایی نموده و از هرگونه همکاری در طول انجام پایان‌نامه دریغ نورزیدند تشکر و قدردانی می‌نمایم. از استاد راهنمای ارجمندم در پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان جناب آقای دکتر سید مجتبی خیام نکوئی به خاطر الطاف بی شائبه‌شان در تمامی مراحل انجام این پژوهش، سعه صدر و راهنمایی‌هایی بی‌نظیرشان خالصانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

همچنین از استاد مشاور محترم پایان‌نامه، آقای دکتر علی ایمانی که در مراحل اولیه این پژوهش زحمات فراوانی تقبل نمودند، تشکر می‌نمایم. از جناب آقای دکتر قاسم محمدی‌نژاد که داوری و بازخوانی پایان نامه را قبول فرموده و پیشنهادات ارزشمندی را در تکوین این مجموعه ارائه نمودندکمال سپاسگزاری را دارم. از اساتید بزرگوار بخش بیوتکنولوژی جناب آقای دکتر غلامرضا شریفی سیرچی، جناب آقای دکتر محمدجواد آروین، جناب آقای دکتر محمدجعفر ذوالعلی و جناب آقای دکتر شهرام پورسیدی که همواره با رفتار بزرگوارانه خود پشتیبان و مایه دلگرمی دانشجویان بوده‌اند، قدردانی می‌نمایم.

از همکاری صمیمانه معاونت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان جناب آقای اسماعیل روح الامین و کارکنان محترم آن موسسه به خصوص جناب آقای مهندس سعید کدخدایی، جناب آقای دکتر علی ساعی، سرکار خانم مهندس شهلا کیان امیری و جناب آقای مهندس امیریان صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

یاد و خاطره تمامی دوستان و همکلاسی‌هایم در دانشگاه شهید باهنرکرمان و پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان که نامی از آنها برده نشد، همواره با من خواهد بود.

چکیده

جنس بادام (*Amygdalus* L.) از خانواده گل‌سرخیان (*Rosaceae*)، دارای ۳۰-۲۵ گونه وحشی و تعداد زیادی ارقام زراعی است. از این تعداد ۲۱ گونه بادام وحشی به صورت خودروی در نقاط مختلف ایران دیده می‌شود. با توجه به وجود ذخیره ژنتیکی غنی این گیاه در کشور و بر خلاف آن سهم پائین تولید و صادرات بادام، لزوم شناسایی، حفاظت و استفاده از صفات مطلوب پایه‌های وحشی بادام در جهت اصلاح ژنتیکی بادام-های زراعی احساس می‌گردد. از آنجا که صفات ظاهری گیاهان تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد، دستیابی به روشی که بتوان با استفاده از آن به صورت کارآمد در مراحل مختلف رشد و نمو به خصوص در مراحل اولیه، امکان شناسایی را فراهم آورد، دارای اهمیت می‌باشد، بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی توده‌ها و ژنوتیپ‌های متنوع ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی چهار گونه وحشی بادام با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و AFLP انجام گردید. در مجموع ۱۳ جفت آغازگر مولکولی SSR با تکثیر مکان های ژنی مورد نظر جمعاً توانستند ۱۰۲ آلل را به کمک ژل ترادف یاب و رنگ‌آمیزی نیترات نقره شناسایی کنند. درصد چندشکلی نشان داده شده توسط نشانگر مولکولی SSR برابر ۱۰۰ درصد بود. درصد بالای مکان‌های ژنی دارای چندشکلی، نشان‌دهنده توانایی بالای این نشانگر در تفکیک ژنوتیپ‌ها و تشخیص تنوع بین و درون گونه‌های بادام می‌باشد. دندروگرام حاصل از نتایج این نشانگر جمعیت مورد مطالعه را به دو گروه عمده تقسیم نمود که تا حدودی با منشاء و طبقه‌بندی سنتی مطابقت دارد. از ده ترکیب آغازگر AFLP، جمعاً ۵۱۰ باند حاصل شد که ۹۳ درصد از آن‌هاچندشکلی نشان دادند. تعداد بالای باند چندشکل و مکانیسم شناسایی چندشکلی توسط این نشانگر که بر پایه مکان‌های برش استوار است بیانگر پوشش بالای ژنوم گونه‌های مورد مطالعه توسط این نشانگر می‌باشد که منجر به تفکیک بهتر ژنوتیپ-های هر گونه و ترسیم بهتر دندروگرام بر اساس روابط تاکسونومیکی و تکاملی شده است. به طور کلی بر اساس نتایج مطالعات مولکولی در سطح گونه احتمال وجود منشاء قدیمی‌تر گونه *A. scoparia* در مقایسه با سایر گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد. با توجه به دندروگرام ترسیم شده توسط اطلاعات حاصل از هر دو نشانگر به نظر می‌رسد سه گونه بادام وحشی (*A. hauskenchtii*، *A. eleagnifolia*، *A. corducrom*) تقریباً همزمان و از اجداد یکسانی انشقاق یافته باشند. همچنین ارتباط ژنتیکی بیشتر *P.persica* به این سه گونه نشان-دهنده تاریخ تکاملی مشابهی برای این چهار گونه در مقایسه با گونه *A. scoparia* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بادام وحشی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، SSR، AFLP

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱- مقدمه.....۱

۲- گیاه‌شناسی بادام.....٤

۱-۳- تاریخچه، منشاء و گسترش جغرافیایی درخت بادام.....٥

۱-۳-۱- تولید تجاری بادام دردنیا.....٥

۱-۳-۲-اهمیت و مصارف بادام.....٦

۱-٤-تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن.....۷

۱-٥- نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی.....۸

۱-٥-۱-نشانگرهای ژنتیکی.....۸

۱-٥-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی.....۸

۱-٥-۱-۲- نشانگرهای مولکولی.....۹

۱-٥- ۱- ۲- ۱- نشانگرهای پروتئینی.....۹

۱-٥-۱- ۲-۲ - نشانگرهای مولکولی DNA.....۹

RFLP-.....۱۰

RLGS-.....۱۱

RAPD-.....۱۱

CAP-.....۱۲

DAF-.....۱۲

ISSR-.....۱۳

SRAP-.....۱٤

TRAP-.....۱۳

SSCP-.....15

SNP-.....۱٥

AFLP-.....۱٥

-ترادف های تکراری..... ۱۹
۱-٦- داده‌های حاصل از نشانگرهای DNA..... ۲۸
۱-۷-تجزیه کلاستر..... ۲۹
۱-۷- ۱- انتخاب نوع معیار فاصله یا شباهت ژنتیکی..... ۲۹
۱-۷- ۲- انتخاب الگوریتم کلاستر..... ۳۰
۱-۷- ۳- تعداد مطلوب کلاستر..... ۳۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲- ۱- شناسایی و جمع‌آوری ارقام زراعی و گونه‌های وحشی بادام..... ۳۲
۲- ۲- مطالعات مولکولی روی بادام و گونه‌های خویشاوند..... ۳٤

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- تهیه نمونه..... ۳۹
۳- ۲- استخراج DNA..... ۳۹
۳- ۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ٤۱
۳- ٤- الکتروفورز ژل آگارز..... ٤۲
۳-۵- آغازگرهای ریزماهواره..... ٤۳
۳- ۵-۱-بهینه سازی واکنش PCR..... ٤۳
۳- ۵-۲- انجام واکنش PCR..... ٤۳
۳-۵-٤- الکتروفورز محصول PCR..... ٤٤
۳-٦-تکنیک AFLP..... ٤۸
۳-٦-۱- برش DNA ژنومی..... ٤۹
۳- ٦-۲- اتصال آداپتور..... ٤۹
۳-٦-۳-تکثیر مقدماتی..... ۵۰
۳-٦- ٤- تکثیر انتخابی..... ۵۰
۳- ٦- ۵- الکتروفورز..... ۵۱
۳-٦-٦- امتیازدهی و تجزیه و تحلیل نوارها..... ۵۱

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤- ١-استخراج DNA.....٥٢
٤- ٢- ارزیابی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی.....٥٤
٤- ٣- بررسی پارامترهای تنوع در جمعیت.....٥٨
٤- ٤- تجزیه خوشه‌ای.....٦١
٤- ٥- تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس نشانگر SSR.....٦٤
٤- ٦- تجزیه به مولفه‌های اصلی تعدیل شده (PCOA).....٦٥
٤- ٧- مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP.....٦٦
٤- ٧- ١- استخراج DNA از گونه‌های مختلف بادام.....٦٦
٤- ٧- ٢- هضم نمونه‌ها ٦٦
٤- ٧- ٣- ترکیبات آغازگری.....٦٧
٤- ٨- بررسی داده‌های حاصل از نشانگر AFLP.....٦٩
٤- ٨- ١- شباهت ژنتیکی (GS).....٦٩
٤- ٨- ٢- تقسیم‌بندی سلسله مراتب واریانس مولکولی.....٧١
٤- ٨- ٣- تقسیم‌بندی سلسله مراتب تنوع ژنی.....٧٤
٤- ٩- تجزیه خوشه‌ای.....٧٥
٤- ١٠- تجزیه به مولفه‌های اصلی در نشانگر AFLP.....٧٧
٤- ١١- ترکیب داده‌های حاصل از SSR و AFLP ٧٨
٤- ١٢- مقایسه نتایج حاصل از SSR و AFLP.....٧٨
٤- ١٣- نتیجه‌گیری کلی.....٨٢
پیشنهادات.....٨٣
فهرست منابع.....٨٤
پیوست.....٩٣

فصل اول
مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

تنوع گیاهی به مرور زمان در اثر تفاوت در اقلیم، جغرافیا و تلاقی طبیعی بین گیاهان ایجاد شده است. کشاورزان نیز با جابه‌جا نمودن بذر گیاهان و کاشت آن در محیطی جدید و انتخاب گیاهانی با خصوصیات مورد نظر باعث ایجاد تفاوت بین گیاهان و اجداد مادریشان شده‌اند. این ژنوتیپ‌های متفاوت به دلیل سازگاری به عوامل محیطی و همچنین داشتن ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها از اهمیت زیادی برخوردارند، ولی در سال های اخیر به دلیل افزایش سطح زیر کشت ارقام وارداتی اصلاح شده، از بین رفتن زمین‌های کشاورزی و ماشینی شدن آن، تنوع وسیع توده‌های بومی مورد تهدید قرار گرفته است. در حالی که کشورهای پیشرفته با پی بردن به اهمیت ارقام بومی در تلاش هستند به ذخایر توارثی بومی و محلی در تمام کره خاکی دسترسی داشته باشند تا از حداکثر تنوع موجود در جهت

اصلاح استفاده نمایند، لذا افزایش تلاش برای شناخت ارقام بومی کشور ضروری به نظر می‌رسد (کریمی نافچی، ۱۳۸۷). مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که تفاوت‌های بین افراد، جمعیت‌ها یا گروه‌ها بر اساس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات مختلف با استفاده از روش‌های آماری خاص بررسی می‌شود. از کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان به تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، مطالعه ژنتیک جمعیت، مطالعه و حفاظت ژنتیکی ذخایر ژرم‌پلاسمی می‌توان اشاره کرد (قره‌یاضی، ۱۳۷۵).

بادام خوراکی با نام علمی *Amygdalus communis* L. متعلق به تیره *Rosaceae* سطحی معادل ۱۴۹۷۷۰۲ هکتار را در جهان زیر پوشش دارد. بر اساس آمار وزرات کشاورزی سطح کشت این درخت در ایران حدود ۷۶۹۳۵ هکتار می‌باشد (مجیدی، ۱۳۸٦). جنس بادام یکی از با ارزش‌ترین رستنی‌های ایران می‌باشد که در بخش کوهستانی منطقه ایرانو – تورانی در مرکز، شرق و غرب پراکنش دارد. این جنس دارای بیش از ٤٠ گونه در پاره‌ای از نقاط جهان می‌باشدکه بیش از ۳۰ گونه از آن در ایران رویش دارند. گونه‌های جنس بادام به علت دارا بودن خواص دارویی، صنعتی و خوراکی از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌باشند. این گونه گیاهی در بسیاری از نقاط کشور، بیش از ۸۰ درصد از عرصه‌های خشک و نیمه‌خشک امکان رویش دارد. بنابراین شایسته است که برای حفظ تنوع گونه‌ای، توسعه منابع طبیعی کشور و حفظ ارزش‌های زیست محیطی، چنین گونه‌هایی موردتوجه علمی بیشتری واقع شوند (سالاریان، ۱۳۸۷).

از مشکلات عمده بادام کاری ایران تولید نامنظم و نوسان تولید بادام می‌باشد که اکثراً به دلیل زودگلدهی ژنوتیپ‌های بومی و مصادف شدن زمان گلدهی ژنوتیپ های بومی با سرمای دیررس بهاره، محصول از دست رفته و باغداران متحمل خسارت زیاد می گردند. از اهداف اساسی اصلاح بادام دستیابی به ارقام مقاوم به سرما وپرمحصول، زودبارده و بهبود کیفیت و کاهش هزینه‌های تولید است آزاد گرده‌افشانی و فقدان موانع تلاقی بین گونه‌های مختلف جنس *Prunus* در هیبریداسیون اولیه وتلاقی‌های برگشتی بعدی موجب دسترسی به یک ژرم‌پلاسم غنی جهت اصلاح بادام است. در حالیکه سودمندی این ژرم‌پلاسم غنی در گرو فرآیند انتخاب است که امری بسیار دشوار ومستلزم صرف هزینه و زمان زیادی می‌باشد. شناسایی ارقام بادام جهت فرآیند انتخاب امری ضروری است که برمبنای ویژگی‌های مورفولوژیکی پایه‌گذاری شده است. باتوجه به اینکه این قبیل صفات همیشه برای آنالیز در دسترس نیستند و ممکن است فقط در گیاهان بالغ قابل رویت باشند و از این رو به زمان

طولانی برای آنالیزشان نیاز است. مارکرهای مولکولی راه حل مناسبی برای بسیاری از این مشکلات هستند که سریع، دقیق، با قدرت تفکیک بالا و استوار بر پایه آزمون‌های محیطی جهت آنالیز تنوع، تعیین شجره‌نامه و شناسایی ارقام مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر شناسایی جنس‌ها و گونه-های گیاهی با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود که روشی بسیار کارا و تکرارپذیر می‌باشد (آرانزانا و همکاران، ۲۰۰۲).

نشانگر ریزماهواره به دلیل تنوع زیاد و سایر خصوصیات مفید از جمله اختصاصی بودن برای گیاهان یک جنس، انتقال پذیری بین گیاهان یک گونه و تشخیص هتروزیگوتی به دلیل همبارز بودن جهت شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌ها و تعیین روابط خویشاوندی آن‌ها ابزار موثری می‌باشد. در پژوهش حاضر به منظور تعیین روابط ژنتیکی چهار گونه بادام وحشی و تعدادی ژنوتیپ هلو از این نشانگر استفاده شد. اما به دلیل دگرگشنی و وجود سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی در بادام که موجب گوناگونی ژنتیکی بالا و ایجاد دورگه‌های بین گونه‌ای فراوان گردیده است، همچنین وسیع بودن انتشار جغرافیایی این گیاه و تحت تاثیر قرار گرفتن از اقلیم‌های گوناگون به نظر می‌رسید که نشانگر ریزماهواره جهت تعیین روابط خویشاوندی و بررسی تنوع جمعیت موجود کارایی ۱۰۰ درصد را نداشته باشد. بنابراین استفاده از یک نشانگر تصادفی جهت بررسی دقیق‌تر و گروه‌بندی موثر جمعیت موجود ضروری می-نمود. در سال ۱۹۹۵ نشانگر جدیدی به نام AFLP ابداع و معرفی شد که علاوه بر دارا بودن مزایای RFLP مانند دقت و تکرارپذیری، ویژگی‌های مثبت روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را نیز دارد. با استفاده از این روش تعداد زیادی از قطعه‌های حاصل از هضم، تکثیر و قابل رویت می‌شوند و این در حالی است که نیازی به دانش اولیه در مورد ردیف بازی قطعه‌هایی که تکثیر می‌شوند وجود ندارد. تفاوت و تنوع مشاهده شده به وسیله این نشانگر به صورت حضور یا عدم حضور باند و به دلیل اختلاف در جایگاه‌های برشی، کمبود یا اضافه شدن نوکلئوتید در مکان برش و بروز پدیده حذف و اضافه در محل اتصال آغازگر یا درون قطعه قابل تکثیر می‌باشد (قره‌یاضی و همکاران، ۱۳۸٦).

با رجوع به منابع و بررسی تحقیقات مشابه صورت گرفته در گیاهان مختلف به منظور بررسی تنوع درون و بین گونه‌ای از نشانگر مولکولی AFLP استفاده شده است (ایمانوئل و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین با توجه به مزایای ذکر شده برای این نشانگر، در تحقیق حاضر جهت افزایش دقت و کارایی پژوهش برای بررسی تنوع درون وبین‌گونه‌ای گونه‌های مورد مطالعه، از این نشانگر نیز استفاده شد.

۱- ۲- گیاه شناسی بادام

بادام اهلی با نام علمی *Prunus dulcis* Mill. و نام انگلیسی Almond از تیرهٔ وردسانان[۱] و زیرتیره‌ی پرونوئیده[۲] است. ارتفاع درخت بادام به شش تا هشت متر می‌رسد و دارای یک سیستم ریشه‌ای قوی و عمودی بوده که این امکان را به گیاه می‌دهد که حتی در شرایط نامساعد خاک و با کمی رطوبت نیز به خوبی رشد کند (تهرانی فر و کافی، ۱۳۷۷). در سال‌های اول رشد پوست شاخه‌ها صاف است و گاهی لکه‌های قهوه‌ای روی آن‌ها دیده می‌شود. ولی پس از چندین سال، پوست زبر، ناصاف و رنگ آن‌ها تغییر کرده و تیره می‌گردد (تهرانی‌فر و کافی، ۱۳۷۷. چایچی و همکاران، ۱۳۸۱). برگ‌های بادام کشیده، نوک تیز و ضخیم و چرمی است. بیشتر رقم‌های حوزه مدیترانه، دارای برگ‌هایی ساده و به شکل‌های نیزه‌ای، باریک و بسته به نژادگان دارای لبه صاف یا مضرس می‌باشند. در بین رقم‌های موجود در ایران و ایتالیا، رقم‌هایی با برگ‌های پهن نیز دیده می‌شود. گل‌های بادام سفید یا صورتی رنگ بوده که در بهار پیش از باز شدن جوانه‌های برگ پدیدار می‌شوند. هر گل شامل پنج کاسبرگ، پنج گلبرگ و ۲۰ تا ۳۰ پرچم است. تخمدان یک برچه‌ای و دارای دو تخمک و میوه آن شفت و به رنگ سبز و پوشیده از کرک‌های فراوان است (تهرانی‌فر و کافی، ۱۳۷۷). به طور معمول یکی از دو تخمک درون تخمدان به رشد خود ادامه نمی‌دهد، بنابراین درون میوه یک دانه به وجود می‌آید. در برخی رقم‌ها ممکن است هر دو تخمک نمو کرده و دو دانه یا مغز درون میوه به وجود آید. بادام مغز دوقلو در قدیم بسیار مورد پسند بود ولی اکنون چون بادام یکی از فرآورده‌های عمده صنعتی است تک مغزی آن بیشتر مورد توجه است (تهرانی فر و کافی، ۱۳۷۷).

بادام خویشاوند نزدیک هلو، شلیل، گوجه و آلو است و می‌تواند با آن‌ها تلقیح شود. این محصول به طور معمول دگرگرده افشان بوده و از نظر خلوص ژنتیکی، ناخالص می‌باشد. بادام دارای خودناسازگاری گامتوفیتی است که گرده گل می‌تواند روی کلاله جوانه بزند ولی به سبب رشد ضعیف لوله گرده نمی‌تواند به تخمدان برسد و آن را بارور کند. خود ناسازگاری بادام ابتدا در بادامستان‌های تک رقم کالیفرنیا دیده شد که باغداران برای باروری رقم‌های گوناگون را با هم کشت کردند. بهترین روش برای تلقیح مطلوب و مطمئن کاشت دو رقم بادام فرعی (گرده‌دهنده) متفاوت بین یک رقم اصلی (رقم تجاری) در باغ است. ترکیب رقم‌های گرده دهنده و گرده گیرنده در باغ

1- Rosaceae
2- Prunoideae

باید به گونه‌ای باشد که گل‌ها به طور همزمان با یکدیگر باز شده و سازگاری داشته باشند. در این صورت باید کندوی زنبورعسل نیز در باغ وجود داشته باشد (درویشیان، ۱۳۷۹).

۱- ۳- تاریخچه، منشاء و گسترش جغرافیایی درخت بادام

به گفته پطروشفسکی در قرن اول قبل از میلاد ایرانیان کلیه درختان میوه‌ای که در یونان وجود داشته به جز زیتون را کشت می‌کرده‌اند. در کتاب بندهشن که مربوط به زمان ساسانیان است از کشت بادام صحبت شده است، گیاه‌شناسان بادام را بومی آسیای صغیر، ایران و سوریه می‌دانند، از نظر واویلف بادام بومی ایران بوده و موطن اصلی آن آذربایجان می‌باشد وسپس به سایر نقاط دنیا و در اواسط قرن نوزدهم به آمریکا برده شده و مورد کشت قرار گرفته است. گسترش اصلی جنس بادام در ناحیه ایرانو- تورانی است در ایران گونه‌های موجود در غرب وشرق تنوع فراوانی دارند. گوناگونی در اندازه و کرک برگ‌ها و میوه در مناطق اکولوژیکی مختلف شناسایی و تفکیک گونه‌ها را از یکدیگر

مشکل می‌سازد و برای شناسایی دقیق‌تر وآسان‌تر جمع‌آوری و مطالعه دقیق میوه کاملاً رسیده ضروری

است (خاتم ساز، ۱۳۷۱). از نظر شرایط آب و هوایی بادام در مناطق خشک و نیمه‌خشک و معتدل که در مجموع بین ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌متر بارندگی را داشته باشد، به شرطی که زمین حالت باتلاقی نداشته باشد می‌روید. اکثر نقاطی که بین عرض‌های ۳۰ تا ۳۸ درجه قرار دارند شرایط مساعدی را برای کشت بادام فراهم آورده‌اند، از جمله کشورهای ایران، آسیای‌مرکزی، آسیای‌جنوب‌غربی و حاشیه مدیترانه و آمریکا دارای این شرایط می‌باشند. در ایران نیز در اکثر استان‌هایی که شرایط اقلیمی خشک، نیمه-خشک و معتدل را داشته باشد، کشت می‌گردد. تفاوت ارتفاعی این مناطق بین ۲۵۰۰ متر می‌باشد که در ارتفاعات پایین‌تر در عرض‌های بالاتر و در ارتفاع بالا در عرض‌های پایین‌تر شرایط مهیا می‌باشد (فرید نیا، ۱۳٦۷).

۱- ۳- ۱- تولید تجاری بادام در دنیا

طبق آخرین آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۵ میزان تولید بادام در دنیا ۱٦۰٤٤۰٦ تن ذکر شده است. آمریکا با تولید بیش از۵۰۰۰۰۰ تن اولین و مهمترین تولید کننده بادام در جهان می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸٤)، یک سیستم بازار فروش نسبتاً توسعه یافته برای فروش ۷۰٪ محصول بادام آمریکا

در جهان وجود دارد به طوری که نصف یا بیشتر محصول آمریکا در حدود۴۰ کشور دنیا صادر می‌گردد (ایمانی، ۱۳۷۹). دومین ناحیه مهم تولید بادام شامل کشورهای اروپائی، حاشیه دریای مدیترانه می‌باشد. اسپانیا با تولید بیش از ۲۰۰۰۰۰ تن، دومین کشور عمده تولید کننده بادام (بعدازآمریکا)، سالانه ۱۵تا ۲۰ درصد بادام دنیا را تولید می‌کند. سایر کشورهای تولید کننده بادام این ناحیه حدود ۱۸ کشور می‌باشد که ازنظر اهمیت به ترتیب شامل ایتالیا (با تولید جهانی ۵٪)، یونان (۵٪)، مراکش (۲٪)، پرتغال (۱٪)، تونس و الجزایر است. مقدار کمی بادام در نواحی بالکان شامل بلغارستان، رومانی و مجارستان تولید می‌شود (ایمانی، ۱۳۷۹).

سومین منطقه تولید بادام آسیای‌مرکزی و جنوب‌غربی است سوریه و ایران به ترتیب با تولید ۱۳۰۰۰۰ و ۸۰۰۰۰ هزار تن اولین و دومین تولید کننده بادام این ناحیه می‌باشند دیگر کشورهای تولید کننده این ناحیه ترکیه، عراق، فلسطین‌اشغالی، تاجیکستان، ازبکستان، افغانستان و پاکستان می‌باشد که دامنه این نواحی تا شمال غرب هندوستان و غرب استان سین‌یانگ (در چین) گسترش یافته است. بسیاری ازگونه‌های بادام بومی منطقه آسیا می‌باشد پرورش بادام در بیشتر نواحی منطقه آسیا اغلب به صورت سنتی است، هر چند در برخی از مناطق آسیا نظیر فلسطین اشغالی و ظاهراً در بعضی از قسمت‌های روسیه و غرب چین تولید و پرورش بادام به طور مدرن و مکانیزه انجام می‌گیرد. بادام در مقیاس کم در سایر مناطق دنیا که دارای آب و هوای مشابه مدیترانه‌ای است شامل استرالیا، قسمت‌های مرکزی شیلی، آرژانتین و آفریقای‌جنوبی کم و بیش تولید می‌گردد (ایمانی، ۱۳۷۹).

۱- ۳- ۲- اهمیت ومصارف بادام

مغز بادام اهمیت تجاری خاص دارد و علاوه بر مصارف تغذیه‌ای تقریباً از همه انواع آن‌ها، چه تلخ و چه شیرین، روغنی به همین نام با مصارف گوناگون به دست می‌آورند. نه تنها از گونه خوراکی بادام، یعنی *Amygdalus communis* و دیگر گونه‌های بادام بلکه از بذر تمام درختان مربوط به خانواده گل‌سرخ، روغن گرفته می‌شود. مغز بادام تلخ و مغز هسته عده دیگری از گیاهان این تیره، دارای ماده‌ای به نام آمیگدالین است. از هیدرولیز آمیگدالین در مجاورت آب موادی مانند قند و گلوکز و اسید سیانیدریک و اسانس بادام تلخ حاصل می‌شود. اسانس بادام تلخ یا آلدئید بنزوئیک در عطرسازی و در صنایع رنگ برای تهیه رنگ سبزی به نام مالاشیت کاربرد دارد. این ماده که تازه آن بی‌رنگ بوده ولی پس از کهنه شدن کمی زرد می‌شود، دارای بوی قوی و طعم سوزان و تلخ است و خواص طبی آن مورد توجه می‌باشد. تولید بادام در دنیا در دو دهه اخیر در حد زیادی افزایش یافته است. این

افزایش در مقدار تولید با برنامه‌های بازاریابی موفقیت‌آمیزی که باعث گسترش بازار برای جذب افزایش تولید بادام اجرا گردیده‌اند، همراه بوده است. بادام میوه‌ای است که مصارف بسیار متعددی دارد که عمده مصرف آن در بخش تبدیلی می‌باشد. صنعت بیسکویت، شکلات، وشیرینی‌سازی سالانه حدود چهار تا پنج هزار تن بادام پوست کنده مصرف دارد. بادام در آجیل فروشی‌ها به عنوان خشکبار جز بهترین تنقلات و یا در میوه فروشی‌ها به عنوان چاشنی و در ادویه فروشی‌ها به عنوان اشتهاآور و حتی در داروسازی و در داروخانه‌ها به شکل روغن بادام مصرف داروئی دارد. بادام با پوست متقاضیان محدودی دارد. پوست کنده آن گذشته از تنقل، به عنوان خلال بادام یا آرد و خمیر و غیره نیز استفاده می‌شود (درویشان، ۱۳۷۹).

۱- ٤- تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی، امری زیر بنایی و مهم در برنامه‌های به‌نژادی می باشد که نقش اساسی در مدیریت منابع ژنتیکی ایفا می‌کند. پایه و اساس تحقیقات به‌نژادی گیاهان به وجود تنوع وسیع ژنتیکی استوار است و در واقع بدون دسترسی به چنین تنوع ژنی به‌نژادگر شانس چندانی برای ایجاد و ارائه ارقام اصلاح شده جدید نخواهند داشت (وجدانی، ۱۳۷۵).

ارقام بومی محصولات مختلف و خویشاوندان وحشی آن‌ها بخش اعظم نمونه‌های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند. این ارقام به دلیل سازشی که طی دوران بسیار طولانی با شرایط و تنش‌های محیطی خود پیدا کرده‌اند حاوی ژن‌های بسیار ارزنده مانند مقاومت به تنش‌هایی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما و نیز مقاومت در برابر حمله آفات و بیماری‌های مهم گردیده‌اند که معمولاً به عنوان منابع ، مخازن ژنی[1] ارزنده و دست افزار کار به‌نژادگران گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (وجدانی، ۱۳۷۵). ذخایر گیاهی منبع ماده ژنتیکی مورد استفاده به‌نژادگران برای ایجاد ارقام جدید است. متاسفانه پیشرفت در به‌نژادی که غالباً با انتخاب و خالص‌سازی مخلوط ژنتیکی توده‌های بومی انجام می‌گیرد، سبب افزایش یکنواختی و کاهش تنوع ژنتیکی داخل رقم نسبت به آنچه در توده اولیه بوده است، می‌گردد (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷٦). با توجه به اینکه اکثر مطالعات بر گونه‌های اهلی و تجاری متمرکز شده است، بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه بندی صحیح، حذف نمونه‌های تکراری در ژرم پلاسم، شناسایی نمونه‌های جمعیتی و جمعیت‌های در حال انقراض گونه‌ها و وضعیت پایه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه امری ضروری است.

1- Gene pool

۱- ۵- نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و تنوع ژنتیکی بین و درون خزانه‌های ژنی، معمولاً بر اساس سه نوع اطلاعات بررسی می‌شود: الف) اطلاعات جغرافیایی در رابطه با منشاء ژنوتیپ‌ها، ب) اطلاعات شجره‌ای و ج) اطلاعات مربوط به خصوصیات ژنوتیپ‌ها. اطلاعات جغرافیایی بیشتر در مواردی استفاده می‌شود که اطلاعات یا داده‌های دیگر در حالت اطلاعات جغرافیایی ژنوتیپ‌ها برای گروه‌بندی اولیه آن‌ها به کار برده می‌شود. با توجه به غیر قابل دسترس بودن اطلاعات شجره‌ای، در مورد بیشتر مواد ژنتیکی، خصوصیات مربوط به خود ژنوتیپ‌ها برای گروه‌بندی و تجزیه و تحلیل ژرم‌پلاسم‌ها استفاده می‌شوند. خصوصیات خود ژنوتیپ‌ها می‌تواند از نوع مورفولوژیکی و یا مولکولی باشد. به علت محدودیت نشانگرها و داده‌های مورفولوژیکی، داده‌های مولکولی به خصوص داده‌های حاصل از نشانگرهای DNA اطلاعات کارآ و مکمل برای سایر روش‌ها می‌باشند (کارپ و همکاران، ۱۹۹۷).

۱- ۵- ۱- نشانگرهای ژنتیکی

۱- ۵- ۱- ۱- نشانگرهای مورفولوژیکی

برخی از تفاوت‌های موجود در بین ردیف بازی DNA کروموزوم‌های موجود زنده با مشاهده در ظاهر افراد قابل تشخیص است. این تفاوت‌ها را می‌توان بدون آگاهی از ترادف DNA و از طریق توارث مندلی مورد بررسی و مطالعه قرار داد، به این نوع از نشانگرها، نشانگرهای مورفولوژیکی می‌گویند. بررسی این نشانگرها نیازمند امکانات و روش‌های پیچیده مولکولی نیست، از طرف دیگر، چون اساس ژنتیکی بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیکی هنوز معلوم نیست و غالباً تحت تاثیر محیط و سن موجود قرار می‌گیرند، بنابراین برای مشاهده و ثبت آن‌ها باید منتظر ظهور صفات ظاهری ماند که برای گیاهان چندساله بسیار مشکل است. علاوه بر این، اغلب این نشانگرها جهش یافته هستند و جمع‌آوری آن‌ها در یک لاین نه‌تنها باعث بروز صفات نامطلوب در گیاهان می‌شود بلکه انجام چنین کاری دشوار، پر-هزینه و وقت‌گیر است. مشکلات یادآوری شده و محدود بودن این نشانگرها باعث شده است که محققین برای تعیین ساختار ژنتیکی گونه‌های گیاهی، به سایر نشانگرهای ژنتیکی توجه بیشتری نمایند (کاتنو انول، ۱۹۹۸).

۱- ۵- ۱- ۲- نشانگرهای مولکولی

۱- ۵- ۱- ۲- ۱- نشانگرهای پروتئینی

برخی از تفاوت‌های موجود در ردیف DNA بین دو موجود ممکن است به صورت پروتئین‌های با اندازه مختلف تجلی نمایند که با روش‌های مختلف بیوشیمیایی قابل ثبت و مطالعه می‌باشند. این نشانگرها را نشانگرهای پروتئینی می‌نامند که از جمله آن‌ها می‌توان به پروتئین‌های ذخیره‌ای و پروتئین‌های آنزیمی یا آیزوزایم‌ها[1] اشاره نمود (Caetano Anolles., 1998). برخی از نشانگرهای آیزوزایمی دارای توارث همبارزی می‌باشند و الگوهای حاصل از آن‌ها را می‌توان بر حسب مکان‌ها و آلل‌ها تشریح نمود. روش‌های رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در مورد آیزوزایم‌ها چندان زیاد نیست و همچنین تعداد آیزوزایم‌های قابل ثبت و مشاهده که می‌توان از آن‌ها به عنوان نشانگر استفاده نمود، اندک است. محدود بودن چندشکلی و تفاوت قابل ثبت در آیزوزایم‌ها و پیچیدگی امتیازدهی فنوتیپ‌های الکتروفورزی آن‌ها باعث شده است که آیزوزایم‌ها به عنوان نشانگرهای ژنتیکی در بررسی تنوع موجودات زنده کمتر مورد استفاده قرار گیرند(Caetano- Anolles., 1998).

۱- ۵- ۱- ۲- ۲- نشانگرهای مولکولیDNA

در دهه ۱۹۸۰ نشانگرهای مولکولی بر اساس چندشکلی در سطح DNA شناخته شدند. تعداد این نشانگرها عملاً نامحدود بوده وآثار پلیوتروپی نشان نمی‌دهند. نشانگرهای مولکولی از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند درجه چندشکلی، غالب یا همبارز بودن، تعداد جایگاه‌های تجزیه شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به ترادف‌یابی DNA الگو و هزینه مورد نیاز با هم متفاوت‌اند. انتخاب بهترین نشانگر به هدف مطالعه (انگشت‌نگاری، تهیه نقشه پیوستگی، ژنتیک جمعیت و روابط تکاملی) و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد. نشانگرهای مولکولی در دو دسته کلی نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون و نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبقه‌بندی می‌شوند. دسته اول بر اساس هیبریداسیون DNA هضم شده با یک آنزیم برشی با یک کاوشگر نشان‌دار انجام می‌شود، که این کاوش‌گر یک قطعه DNA با ترادف شناخته شده یا نامشخص است. در مورد نشانگرهای مبتنی بر PCR آغازگرهایی که دارای ترادف شناخته شده هستند، برای

[1]- Isozymes

تکثیر ترادف‌های ژنومی استفاده می‌شود، که در نهایت با تفکیک ژل الکتروفورز قطعات تکثیری قابل رویت خواهند بود. که شامل نشانگرهای RAPD[1] SCAR[2] ,SSR[3] , STS[4], AFLP[5], CAP[6], و ..... می‌باشند.

الف) برخی از تکنیک‌های مبتنی بر هیبریداسیون

۱- نشانگر RFLP[7]

چندشکلی در طول قطعات برش داده شده DNA توسط آنزیم‌های برشی و آشکارسازی آن‌ها در بین افراد مختلف یک جمعیت با کاوش‌گر خاص، RFLP نامیده می‌شود. آنزیم‌های برشی DNA را در نقاط خاصی برش می‌دهند، نقاطی که توسط این آنزیم‌ها شناسایی می‌شوند معمولاً حدود چهار تا شش جفت باز می‌باشند. بروز تغییرات در یکی از جفت بازهای DNA ممکن است موجب شکل‌گیری یا حذف محل‌های مورد نظر جهت برش توسط آنزیم‌های برش گردد. عمل نوترکیبی نیز ممکن است وضعیت و موقعیت محل‌های برش را دچار دگرگونی و تغییر نماید، این تغییرات موجب پدید آمدن قطعاتی با اندازه‌های مختلف از DNA می‌گردند که توسط این آنزیم‌ها بریده می‌شوند. در بیشتر مطالعات DNA برای تفکیک گونه‌ها و نژادها از RFLP استفاده می‌شود. اگرچه نتایج RFLP در بررسی‌های مقدماتی با ارزش است ولی زمانی که تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها روزانه بایستی از این طریق شناسایی شوند کاربرد آن نیازمند مقادیر زیادی DNA است و آشکار سازی باندهای حاصل از این روش نیازمند هیبریداسیون با نشانگرهای رادیواکتیو است که علاوه بر خطرناک بودن، بسیار پر زحمت بوده و زمان و هزینه زیادی را می‌طلبد (قره‌یاضی، ۱۳۷۵. باقری و همکاران، ۱۳۸۱).

1- Random amplified polymorphic DNA
2- Sequence characterised amplified region
3- Singel sequence repeat
4- Sequence-tagged-site
5 -Amplification fragment length polymorphism
6- Cleavage ampli- fied polymorphic sequence

7-- Restriction landmark genomic scanning

۲- نشانگر RLGS[1]

در سال ۱۹۹۱، هاتادا و همکارانش این روش را برای شناسایی و انگشت‌نگاری موجودات عالی ابداع و معرفی کردند. نقاط برش اختصاصی آنزیم‌های برشی می‌توانند به عنوان نشانگر و وجه تمایز ارقام و افراد به کار گرفته شوند. در این روش انتهای آزاد مولکول‌های DNA که در اثر صدمات مکانیکی در طی استخراج به وجود آمده‌اند، مسدود می‌گردد. سپس DNA توسط آنزیم برشی هضم شده و نقاط برش به طور مستقیم با فسفر رادیواکتیو نشان‌دار می‌گردند. سپس با الکتروفورز دوبعدی، قطعات هضم شده DNA از هم جدا شده و خود پرتونگاری صورت می‌گیرد. در این روش یک الگوی دوبعدی با هزاران نقطه پراکنده (قطعات نشان‌دار) به دست می‌آید که هر یک می‌توانند به عنوان نشانگر به کار گرفته شوند (قره یاضی، ۱۳۷۵). البته به دلیل پیچیدگی فوق‌العاده تکنیک و نیز دشواری قرائت و تفسیر نتایج حاصله، این روش مورد استقبال زیادی قرار نگرفته است (باقری و همکاران، ۱۳۸۱).

ب) نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR[2]

۱- نشانگر RAPD[3]

این تکنیک جهت بررسی میزان چندشکلی در DNA در سال ۱۹۹۰ ابداع گردید. آغازگرهای RAPD طولی برابر ۹ تا ۱۰ باز با حداقل ۵۰٪ GC و فاقد تکرار معکوس داخلی هستند و انتظار می‌رود به طور متوسط ۲ تا ۱۰ باند تولید کنند. چندشکلی در RAPD به دو صورت به وجود می‌آید: ۱- تفاوت‌های موجود در ترادف‌های DNA در جایگاه اتصال آغازگرها (مانند جهش‌های نقطه‌ای) که مانع اتصال آغازگرها به جایگاه اتصال می‌شود. ۲- تغییراتی که اندازه قطعه قابل تکثیر را تغییر می‌دهد (مثل وقوع حذف، اضافه یا وارونگی). بنابراین چندشکلی در RAPD می‌تواند هم به صورت حضور یا عدم حضور یک باند و هم به صورت تفاوت در طول قطعه قابل تکثیر تجلی نماید. از آنجائیکه چندشکلی‌های مربوط به حالت اول، به دلیل وجود سایر باندها و نیز نام[4] شخص بودن جایگاه ژنی در ژنوم از چند شکلی‌های حاصل از حالت دوم قابل تفکیک نمی‌باشند، همه باندها را به صورت حضور یا عدم حضور در نظر می‌گیرند و این بدین مفهوم است که نشانگرهای RAPD به صورت غالب می‌باشند. برای تجزیه ژنتیکی سیستم‌های بیولوژیکی که قبلاً نشانگرهای مولکولی دیگر در آن‌ها

1- Random fragment length polymorphism
2- Polymeras Chain Reaction
3- DNA Random amplification polymorphism
4