١٠١٨٢٩

دانشگاه پیام نور- کتابخانه مرکزی
بخش نشریات

شماره ثبت	QH
شماره مدرک	۹۹۶
شماره رکورد	۸۶/۲/۲۲

دانشگاه پیام نور

مرکز تهران

دانشکده: علوم پایه

گروه: زیست شناسی

عنوان:

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه بومی Phytolacea Americana (سرخاب) در مازندران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

پایان نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی (علوم گیاهی)

مولف:

رقیه پورباقر

اساتید راهنما:

جناب آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی و جناب آقای دکتر سیدکمال کاظمی تبار

مرداد - ۱۳۸۵

۱۳۸۷ /۲/ ۱۳

۱۰۱۸۲۹

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام‌نور
مرکز تهران

شماره: ۱۰۰۰
تاریخ:
پیوست:

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای ..... دانشجوی رشته ..... تحت عنوان ..... با حضور اساتید نامبرده در ذیل در روز ..... مورخه ..... ساعت ..... در محل ساختمان تحصیلات تکمیلی برگزار شد و پس از بحث و بررسی پایان نامه مذکور با نمره به عدد ..... به حروف ..... و با درجه ..... مورد قبول واقع شد / نشد.

۱- استادراهنما : سرکارخانم / جناب آقای دکتر .....

۲- استادراهنمای همکار : سرکارخانم / جناب آقای دکتر .....

۳- استادمشاور : سرکارخانم / جناب آقای دکتر .....

٤- استادداورخارجی : سرکارخانم / جناب آقای دکتر .....

۵- استادداورداخلی : سرکارخانم / جناب آقای دکتر .....

۶- نماینده محترم گروه : سرکارخانم /جناب آقای دکتر .....

امضاء استادراهنما | امضاء استادراهنمای همکار | امضاء استادمشاور

امضاء نماینده گروه | امضاء استادداورخارجی | امضاء استادداورداخلی

تهران - خیابان استاد نجات‌الهی (ویلا سابق) خیابان شهید فلاح‌پور پلاک ۳۵ - تلفن ۸۸۰۹۲۶۵ - دورنگار ۸۸۰۸۲۰۳

تقدیر و تشکر

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم به پاس تعبیر عظیم و انسانیشان از کلمه محبت

به پاس عاطفه سرشارشان و به پاس محبت بی دریغشان

که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به

عاشقانه ترین نام زندگی ام همسر مهربانم

محمد

تقدیم به

اساتید ارجمند جناب آقای دکتر بخشی خانیکی و جناب آقای دکتر کاظمی تبار و تقدیر و تشکر از ایشان که با راهنمائی های ارزنده شان مرا در تهیه، تدوین و مراحل مختلف انجام پایان نامه یاری نمودند.

تقدیم به

هیئت محترم داوران جناب آقای دکتر قمری زارع و

جناب آقای دکتر بیدکی که افتخار شاگردی آنها را داشتم.

تقدیم به

پرسنل زحمتکش و مهربان دانشکده کشاورزی ساری خصوصا

آقای دکتر علی دهستانی مهندس شاهواری و به تمام دوستانی

که در جمع آوری این پایان نامه مرا یاری نمودند.

فهرست مطالب و پیوستها و جداول و اشکال

عنوان	صفحه
۱-۱ مقدمه	۲-۳
۱-۲- اهداف پژوهش	۳
۱-۳- کلیات	۶
۱-۴- گیاه شناسی	۶-۷
۱-۵- سیستماتیک گیاه	۷-۹
۱-۶- ترکیبات شیمیایی	۱۰
۱-۷- موارد کاربرد فیتولاکا	۱۰-۱۳
۱-۸- گروه بندی توسط نشانگرها	۱۳-۱۴
۱-۹- گروه بندی توسط نشانگرهای مولکولی (ژنتیکی)	۱۴
۱-۱۰- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)	۱۴-۱۶
۱-۱۱- الکتروفورز	۱۶
۱-۱۲- الکتروفورز ژل آگارز به منظور ...	۱۶-۱۷
۱-۱۳- نشانگرهای مولکولی DNA	۱۸
۱-۱۳-۱ نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR	۱۸
۱-۱۳-۱-۱- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم	۱۸-۱۹
۱-۱۳-۱-۲- پوشش ژنومی نشانه های هضم	۱۹
۱-۱۳-۱-۳- تعداد متفاوت ردیفهای تکراری یا ماهوارکها	۱۹

فهرست مطالب و پیوستها و جداول و اشکال

عنوان	صفحه
۱-۱ مقدمه	۲-۳
۱-۲- اهداف پژوهش	۳
۱-۳- کلیات	۶
۱-۴- گیاه شناسی	۶-۷
۱-۵- سیستماتیک گیاه	۷-۹
۱-۶- ترکیبات شیمیایی	۱۰
۱-۷- موارد کاربرد فیتولاکا	۱۰-۱۳
۱-۸- گروه بندی توسط نشانگرها	۱۳-۱۴
۱-۹- گروه بندی توسط نشانگرهای مولکولی (ژنتیکی)	۱۴
۱-۱۰- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)	۱۴-۱۶
۱-۱۱- الکتروفورز	۱۶
۱-۱۲- الکتروفورز ژل آگارز به منظور ...	۱۶-۱۷
۱-۱۳- نشانگرهای مولکولی DNA	۱۸
۱-۱۳-۱ نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR	۱۸
۱-۱۳-۱-۱- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم	۱۸-۱۹
۱-۱۳-۱-۲- پوشش ژنومی نشانه های هضم	۱۹
۱-۱۳-۱-۳- تعداد متفاوت ردیفهای تکراری یا ماهوارکها	۱۹

صفحه

عنوان

۳-۶-۳- دزوکسی ریبونوکلئوتید تری فسفاتها..... ۳۹

۳-۶-۴- taq پلیمراز..... ۳۹

۳-۶-۵- کلرید منیزیم..... ۴۰

۳-۶-۶- آب مقطر دوبار استریل..... ۴۰

۳-۷- واکنشهای زنجیره ای پلیمراز تحقیق..... ۴۰

۳-۷-۱- استاندارد کردن واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۴۱-۴۲

۳-۷-۲- انجام PCR..... ۴۲

۳-۷-۳- پروفیل حرارتی واکنش..... ۴۲

۳-۸- الکتروفورز محصولات PCR..... ۴۳-۴۴

۳-۹- نشانگر مورد استفاده در تحقیق..... ۴۶

۳-۱۰- تجزیه آماری داده های آزمایش..... ۴۶-۴۷

۳-۱۰-۱- تشکیل ماتریس تشابه..... ۴۷

۳-۱۰-۲- ضرائب تشابه..... ۴۷-۴۸

۳-۱۰-۲-۱- ضریب تشابه جاکارد..... ۴۹

۳-۱۰-۲-۲- ضریب تشابه نی..... ۴۹

۳-۱۱- تنوع ژنی..... ۴۹-۵۰

۳-۱۲- تجزیه خوشه ای..... ۵۰

فصل چهارم – نتایج و بحث..... ۵۱-۶۵

۴-۱- نتایج حاصل از استخراج..... ۵۱

۴-۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR..... ۵۲

عنوان	صفحه

۴-۳- تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزار POPGENE32 ..... ۵۶-۶۱

۴-۴- بحث ۶۱-۶۴

پیشنهادات ۶۵

فصل پنجم – منابع ۶۶-۸۵

فهرست جداول:

عنوان صفحه

جدول (۳-۱): جمعیت های منطقه ای نمونه های جمع آوری شده .....

جدول (۳-۲): غلظت و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۴۱

جدول (۳-۳). پروفیل حرارتی واکنش..... ۴۳

جدول (۳-۴). مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش های زنجیره ای پلیمراز..... ۴۵

جدول (۴-۱). اطلاعات مربوط به قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف..... ۵۵

جدول (۴-۲). فاصله بین جمعیتهای منطقه ای..... ۵۷

جدول (۴-۳). متوسط تنوع ژنی، تعداد آلل های موثر و ۵۸

جدول (۴-۴). تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی ۶ جمعیت منطقه ای فیتولاکا امریکانا..... ۵۹

جدول (۴-۵). میزان آلل های مشاهده و آلل موثر و ۶۰

فهرست اشکال:

عنوان | صفحه

شکل (۱-۱). ساختار رویشی گیاه فیتولاکاآمریکانا..... ۴

شکل (۱-۲). ساختار زایشی گیاه فیتولاکاآمریکانا..... ۵

شکل (۴-۱). نمونه ای از DNA ژنومی استخراجی ۵۲

شکل (۴-۲). الگوی باند پرایمر OPA9..... ۵۳

شکل (۴-۳). الگوی باندی پرایمر OPA9..... ۵۳

شکل (۴-۴). الگوی باندی پرایمر OPA6..... ۵۳

شکل (۴-۵). الگوی باندی پرایمر OPQ5..... ۵۴

شکل (۴-۶). الگوی باندی پرایمر BIO8..... ۵۴

شکل (۴-۷). دندروگرام حاصل از شش جمعیت منطقه ای ۵۶

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه بومی فیتوکاامریکانا (سرخاب) در مازندران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

چکیده

فیتولاکا امریکانا بومی استانهای مازندران، گلستان و گیلان است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۵۵ نمونه مازندران با استفاده از ۵۱ نشانگر مولکولی RAPD ۱۰ نوکلئوتیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد ۱۴ نشانگر، تولید ۱۰۱ باند کردند که ۶۶ نوار بین نمونه های مورد مطالعه چند شکلی و ۳۵ نوار یک شکل بدست آمد و درصد قطعات چند شکلی ۶۵/۳۴ درصد برآورد شد. اندازه باندها ۱۴۰bp تا ۳۱۰۰bp متغییر بودند. میانگین تعداد باندها برای هر آغازگر ۷/۲۱ بوده است. استخراج DNA ژنومی به روش ساده انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و به صورت چشمی انجام گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز با ترکیب مواد آزمایشگاهی مورد نیاز در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف آلمان) انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۴ درصد ران گردید. خوشه بندی نمونه ها با استفاده از نرم افزار POPGENE32 انجام گردید. تنوع ژنی بین نمونه ها براساس شاخص نی به طور متوسط ۰/۰۹۰۱ برآورد شد. ۶ جمعیت منطقه ای از نتایج آنالیز خوشه ای براساس نشانگرها مشخص شدند. نتایج نشان داد که قسمتی از پلی مورفیسم RAPD می تواند نتیجه تاثیر تغییر شرایط اکولوژیکی و پاسخی برای انتخاب محیطی و یا تغییر در ژنوم گیاه باشد.

واژه های کلیدی: چند شکلی، فیتولاکاامریکانا، رپید، تنوع ژنتیکی، بومی.

۱-۱- مقدمه

امروزه از نشانگرها برای مطالعه ساختار جمعیت موجودات زنده[1]، بررسی های فیلوژنی[2]، مطالعات شجره نامه ی[3] گیاهان و جانوران، شناسایی ژنهای مناسب، شناسایی جنسیت قبل از بلوغ، فسیل شناسی[4]، اصلاح[5] گیاهان و جانوران و غیره استفاده می شود. در سالهای اخیر پیشرفت های تحسین برانگیزی که در زمینه زیست شناسی مولکولی و تکنولوژی زیستی صورت گرفته است، ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده است. اساسی ترین و مفیدترین این ابزار نشانگرهای DNA هستند که تفاوت های قابل ثبت اطلاعات ژنتیکی (ردیف های بازی DNA) موجود بین دو یا چند نمونه می باشند. تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم های هر ارگانیسم که از افراد به نتاج آنها منتقل می گردد می تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شود. این تفاوت می تواند به طرق مختلف تظاهر یابد. برخی از این تفاوتها به صورت عرضی بوده و در صفات قابل رویتی مثل رنگ گل تجلی می یابند، اینگونه نشانه ها را نشانگرهای ریخت شناسی می نامند(۱۶، ۴۸، ۱۰۳، ۱۱۱).

تنوع ژنتیکی در جمعیت های طبیعی در اثر جهش و نوترکیبی، دورگ گیری بین گونه ها و القا پلی پلوئیدی ایجاد می شود. با روی دادن جهش ها و تغییرات و تجمع آنها در طول زمان در جوامع مختلف تفاوتهایی از نظر ماده

---

[1] Population studies
[2] Phylogenetic studies
[3] Pedigree analysis
[4] Archaeology
[5] Breeding

ژنتیکی به وجود می آید که تنوع ژنتیکی نامیده می شود. تنوع ژنتیکی پایه و اساس کارهای اصلاح نبات بوده و بدون تنوع، انتخاب و اصلاح معنی نخواهد داشت. بنا به اهمیت تنوع ژنتیکی روش های متعددی جهت برآورد آن ابداع شده است که مارکرهای مولکولی از مهمترین ابزارهای بررسی تنوع می باشند (۴۱، ۵۳، ۷۷ و ۱۰۱).

با استفاده از انواع مارکرها (نشانگرها) می توان تنوع ژنتیکی را در سطح وسیع تر و دقیق تر بررسی نمود. نشانگرها شامل انواع مختلف مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می باشند. ساده ترین نوع نشانگرها انواع مورفولوژیکی هستند که اساس آن تفاوتهای ظاهری افراد مختلف می باشد. سپس نشانگرهای سیتوژنتیکی (برحسب تفاوت در سطح کروموزم ها) و مارکرهای بیوشیمیایی که شامل پروتئین های ذخیره ای، شکل های مختلف آنزیمی (ایزوزایم ها، آلوزایم ها و ...) بودند (۱۰۶، ۱۰۷)، مورد استفاده قرار گرفتند. با ابداع مارکرهای مولکولی کاربرد این نوع مارکرها محدود شده است (۲۰).

مارکرهای مولکولی که براساس تفاوت در توالی های DNA طراحی شده اند در بررسی تنوع ژنتیکی و چند شکلی های بین گونه ای و نیز داخل جمعیت های یک گونه کاربرد وسیعی پیدا کرده است. این مارکرها تفاوتهای کوچک در سطح DNA (مثلاً حذف، اضافه و تغییر یک یا چند باز که دراثر عوامل مختلف بوجود آمده اند) را منعکس کرده و به همین دلیل پلی مورفیسم بالایی ایجاد می کنند و جهت بررسی تنوع و گوناگونی جمعیت ها کاربرد گسترده تری دارند (۱۶، ۵۳، ۵۵).

روشهای مارکرهای مولکولی شامل انواع متعددی از مارکرها بوده که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. در طی دو دهه گذشته استفاده از مارکرهای مولکولی مبتنی بر PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) به دلیل کارآیی بالا، سهولت کاربرد و نیز تنوع قابل ملاحظه، بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. در این تحقیق از مارکر RAPD که مبتنی بر PCR است استفاده شده است (۴۸، ۱۰۳، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۴).

Phytolacea Americana گیاهی علفی، چندساله (پایا)، دارای ریشه ای ضخیم و ساقه ای منشعب، گوشتدار، به ارتفاع ۲-۱ متر می باشد. در حاشیه مزارع و جاده ها، بیشتر زیر نور آفتاب شدید می روید اما در جائیکه تبخیر و تعرق بالاست در اماکن مرطوب و سایه دار، برای جلوگیری از آفتاب زدگی ضروری می باشد. در نواحی متروک و اطراف آبادیها در جنگل یا مناطق طبیعی دارای علف هرز، در مناطق تخریب شده، ردیفهای پرچین، زمین پست، قطعه زمین صاف شده در جنگل ها نیز می روید (۵، ۱۱، ۴۵، ۱۱۶، ۱۲۲).

اعضای هوایی آن دارای رنگ سبز با لکه هایی به رنگ بنفش و قرمز است از این جهت غالبا به رنگ سبز مایل به قرمز جلوه می کند (۱۱).

منشا اولیه این گیاه در امریکای شمالی بوده است ولی امروزه به علت پراکندگی وسیعی که در کره زمین پیدا نموده، در غالب نواحی مخصوصا مناطق گرم و معتدل بدان برخورد می شود. بومیان آمریکایی آنرا پوکون می نامیدند و به عنوان دارویی برای ایجاد استفراغ و برای مصرف خارجی در بیماریهای پوستی از آن استفاده می کردند. سرخپوستان منطقه دلاور آنرا مقوی قلب می دانستند و در ویرجینیا یک مسهل قوی تلقی می شد. حتی امروزه هم بومیان آپاچی دانه و میوه آنرا برای درمان التهاب مفاصل می جوند. این گیاه در قرن نوزدهم وارد اروپا شد و اکنون از آن بعنوان یک پاک کننده مجاری لنفاوی استفاده می شود (۵، ۱۱، ۱۷، ۴۰، ۴۵).

۱-۲- اهداف پژوهش

- جمعیت های مختلف این گیاه دارویی درصدهای متفاوتی از مواد موثره را دارا می باشند. پس باید بین جمعیتهای مناطق مختلف بررسی شود تا جمعیت با ماده موثره بالا شناسایی و انتخاب شود.
- آیا تفاوتهایی بین محیط های انتخابی وجود دارد و در نتیجه تنوع ژنتیکی بین آنها بررسی شود.
- با توجه به اطلاعات ژنتیکی بدست آمده می توان از جمعیت دارای ماده موثره بالا انتخاب انجام داد.

- با توجه به اینکه مارکرهای مبتنی بر PCR دو نوعند یکسری دارای توالی مشخص وگروهی فاقد توالی مشخص می باشند بخاطر کمبود اطلاعات در زمینه ژنتیک و ژنوم این گیاه، استفاده از مارکر مولکولی RAPD (تصادفی) به دلیل هزینه کمتر در مقایسه با سایر مارکرها، عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو، مختص گونه ای نبودن پرایمرها، امکان بررسی همزمان چندین لوکوس درژنوم نمونه ها و عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA برای طراحی و ساخت پرایمر به عنوان نقطه شروع تحقیقات روی این گیاه دارویی و صنعتی در نظر گرفته شد.

۱-۳- کلیات

امروزه زیست شناسی مولکولی به ابزار پرقدرتی برای حل مشکلات ایجاد شده در تمام شاخه های علوم زیستی و پزشکی تبدیل شده است. به جرات می توان ادعا نمود که در حال حاضر هیچ شاخه ای از علوم زیستی بی نیاز از زیست شناسی مولکولی نیست. اگر قرار باشد که در آینده علمی پاسخگوی نیازهای زیستی بشر باشد، بدون شک آن علم زیست شناسی مولکولی خواهد بود. به بیان دیگر زیست شناسی در آینده تنها با زبان فناوری زیستی[1] صحبت خواهد کرد و محققان ناآشنا به این زبان فرقی با افراد بیسواد نخواهند داشت. زیست شناسی مولکولی مملو از زمینه های تحقیقاتی جذاب برای محققان است. یکی از بحث های جالب دراین شاخه از علوم زیستی نشانگرها هستند که هر روزه انواع جدیدتری از آنها ابداع شده و مورد استفاده قرار می گیرند. هر صفتی که با استفاده از آن بتوان صفات مشکل تری را بررسی کرد، نشانگر نام دارد. کشف نشانگرها گام بلندی در راستای حل دشواری های تحقیقاتی در زمینه های مختلف علوم زیستی بوده است.

[1] Biotechnology