بسم الله الرحمن الرحیم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی کشاورزی

گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی

عنوان پایان نامه

ژنومیکس مقایسه‌ای در حبوبات

استادان راهنما:

دکتر کیانوش چقامیرزا

دکتر علیرضا زبرجدی

نگارش:

مریم قربانی

شهریور ماه ۱۳۹۲

دانشگاه رازی
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی

نگارش: مریم قربانی

تحت عنوان
ژنومیکس مقایسه‌ای در حبوبات

در تاریخ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

استاد راهنما	دکتر عبداله نجفی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
استاد مشاور	دکتر محسن سعیدی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
استاد داور داخلی اول	دکتر عزت‌اله فرشادفر	با مرتبه علمی استاد	امضاء
استاد داور داخلی دوم	دکتر علیرضا زبرجدی	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز. . . بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجَل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی‌شائبه‌ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تأمین می‌کند و سلامت امانت‌هایی را که به دستش سپرده‌اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ" : از **پدر و مادر** عزیزم، این دو معلم بزرگوارم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت‌هایم گذشته‌اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یاوری بی چشمداشت برای من بوده‌اند؛ از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای **دکتر کیانوش چهامیرزا** که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ همچنین از استاد راهنمای دیگرم جناب آقای **دکتر علیرضا زبرجدی** بابت راهنمایی‌های ارزنده و دلسوزانه‌شان قدردانم. از استاد صبور و باتقوا، جناب آقای **دکتر محسن سعیدی**، مدیریت محترم گرسی گروه، بابت زحمات بی‌دریغ، بی‌وقفه و دلسوزانه‌شان؛ و از استادان فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای **دکتر هومن سالاری** و **عبداله نجفی** که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ و تمامی اساتید محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات علی الخصوص سرکار خانم **دکتر لیلا زارعی** که بدون راهنمایی‌ها و مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خرده‌ترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

در پایان از تمامی دوستان خوبم که مراد اجرای این رساله یاری نمودند خصوصا" خانم هانوشین محمودی، نگین نوروزی، طیبه شهبازی و آزاده شیبانی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم به

بانوی دو عالم

خانم فاطمه زهرا (س)

چکیده

ژنومیکس علم جدیدی است که به کشف توالی‌ها و مطالعه عملکرد آنها در ژنوم کامل یک موجود خاص می‌پردازد. از انواع ژنومیکس، نوع مقایسه‌ای است که ابزاری ارزشمند در گسترش منابع مولکولی برای گیاهان زراعی و شناسایی ژن‌های کلیدی در توسعه این گیاهان و مطالعه تکامل خانواده‌های ژنی است. پیشرفت‌های فوق‌العاده در فناوری توالی‌یابی، راهی جدید به ژنومیکس مقایسه‌ای باز کرده و محققان را برای انجام مقایسات گسترده ژنومی قادر ساخته است. در این پژوهش سعی در بررسی توالی نواحی ژنومی در چند لوکوس محدود با استفاده از نشانگرهای TuFM، APx1، PGIp و ENOL از نوع سیستم نشانگری STS در گیاهان لوبیا، نخود و نخودفرنگی بود. پس از آمپلی فیکاسیون قطعات STS و سپس توالی‌یابی نمونه‌ها، بررسی نواحی حفاظت شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و نرم‌افزار DNAStar و مقایسه توالی‌های خاص اطلاعات مفیدی به دست آمد. از بین نشانگرهای مورد بررسی تنها نشانگر TuFM در تمامی گیاهان مورد نظر تکثیر و قطعات تک باند تولید شد. البته این قطعات به جز ارقام لوبیا در بقیه به صورت مونومورف بودند که بعدا" با توالی‌یابی که صورت گرفت، اختلافاتی بین آنها مشاهده شد. نشانگر ENOL در مقایسه با سایر نشانگرها بیشترین چندشکلی را نشان داد. نتایج نشان داد که قطعات به دست آمده، علی‌رغم داشتن نواحی حفاظت شده مشترک با هم، اختلافاتی را در سطح نوکلئوتیدی داشتند که می‌تواند ناشی از عوامل مختلف از جمله وقوع جهش‌های مختلف در طی تکامل باشد. همچنین اختلافات درون جنسی بیش از اختلافات بین جنسی مشاهده شد که می تواند تأثیر آن بر میزان عملکرد ژن خاص در گونه‌های مورد مطالعه در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. طبق این بررسی‌ها تمامی ارقام چه در مقایسات دو به دو و چه در مقایسات گروهی اختلافات قابل توجهی را نشان دادند.

کلیدواژه: حبوبات، نشانگر STS، ژنومیکس مقایسه‌ای، حفاظت ژنومی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱-۱- مقدمه..... ۲

فصل دوم : کلیات و بررسی منابع

۲-۱- ژنومیکس..... ۷

۲-۱-۱- ژنومیکس ساختاری..... ۸

۲-۱-۲-ژنومیکس عملکردی..... ۸

۲-۱-۳-ژنومیکس ژنتیکی..... ۸

۲-۱-۴-ژنومیکس مقایسه‌ای..... ۸

۲-۱-۴-۱- ژنومیکس مقایسه‌ای به عنوان ابزاری جدید برای جداسازی ژن..... ۹

۲-۲- لگوم‌ها..... ۹

۲-۲-۱- لوبیا..... ۱۰

۲-۲-۲- نخودفرنگی..... ۱۱

۲-۲-۳- نخود زراعی..... ۱۳

۲-۳- نشانگرها..... ۱۶

۲-۳-۱- نشانگر STS..... ۱۷

۲-۳-۲- نشانگر SCAR..... ۱۸

۲-۳-۳- نشانگر EST..... ۱۸

۲-۴- توالی‌یابی DNA..... ۱۹

فصل سوم : مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی..... ۲۱

۳-۲- مراحل آزمایش..... ۲۱

۳-۲-۱- استخراج DNA ژنومی از مواد گیاهی..... ۲۱

۳-۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی..... ۲۲

۳-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها..... ۲۵

فصل چهارم : نتایج و بحث

۴-۱- نتایج حاصل از تعیین غلظت DNA ژنومی..... ۲۷

۴-۲- بهینه سازی شرایط واکنش..... ۲۷

۴-۳- نتایج استفاده از نشانگرهای اختصاصی ۲۷

۴-۳-۱- نشانگر TuFM ۲۸

۴-۳-۲- نشانگر ENOL ۲۸
۴-۳-۳- نشانگر APx1 ..... ۲۹
۴-۳-۴- نشانگر PGIp ۲۹
۴-۴- نتایج حاصل از توالی‌یابی ۳۰
۴-۴-۱- مقایسه توالی‌ها ۳۰
۴-۴-۱-۱- نشانگر TuFM ۳۰
۴-۴-۱-۲- نشانگر ENOL ۴۶
۴-۴-۱-۳- نشانگر ApX1 ..... ۴۹
۴-۴-۱-۴- نشانگر PGIp ۵۲
۴-۴-۲- نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های مورد نظر با سایر توالی‌ها ۵۵
۴-۴-۲-۱ نشانگر TuFM ۵۵
۴-۴-۲-۲- نشانگر APx1 ..... ۶۱
۴-۴-۲-۳- نشانگر PGIp ۶۳
۴-۴-۳- نتایج حاصل از بررسی نقاط حفاظت شده بین ژن‌ها ۶۶
۴-۴-۳-۱- نشانگر APx1 ..... ۶۶
۴-۴-۳-۲- نشانگر PGIp ۶۸
۴-۴-۳-۳- نشانگر TuFM ۷۰
۴-۴-۴- بررسی تشابه بخشی از ژن با گیاهان دیگر ۷۳
۴-۴-۴-۱- ژن TuFM ۷۳
۴-۴-۴-۲- ژن APx1 ..... ۷۸
۴-۵- نتیجه‌گیری کلی ۷۹
۴-۶- پیشنهادات ۸۰
منابع ۸۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱- الگوی تکثیری حاصل از جفت آغازگر اختصاصی TuFM ۲۸
شکل ۴-۲- الگوی تکثیری حاصل از جفت آغازگر اختصاص ENOL ۲۹
شکل ۴-۳- الگوی تکثیری حاصل از جفت آغازگر اختصاصی APx1 ۲۹
شکل ۴-۴- الگوی تکثیری حاصل از جفت آغازگر اختصاصی PGIp ۳۰
شکل ۴-۵- نواحی تطابق داده شده بین ارقام لوبیا با استفاده از نشانگر TuFM ۳۱
شکل ۴-۶- نواحی تطابق داده شده بین ارقام نخود با استفاده از نشانگر TuFM ۳۳
شکل ۴-۷- میزان تشابه و تفاوت ارقام نخود با استفاده از نشانگر TuFM ۳۳
شکل ۴-۸- نواحی تطابق داده شده بین ارقام نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM ۳۴
شکل ۴-۹- میزان تشابه و تفاوت ارقام نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM ۳۴
شکل ۴-۱۰- نواحی تطابق داده شده بین ارقام لوبیا و نخود با استفاده از نشانگر TuFM ۳۶
شکل ۴-۱۱- میزان تشابه و تفاوت ارقام لوبیا و نخود با استفاده از نشانگر TuFM ۳۶
شکل ۴-۱۲- نواحی تطابق داده شده بین لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM ۳۷
شکل ۴-۱۳- میزان تشابه و تفاوت ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM ۳۸
شکل ۴-۱۴- نواحی تطابق داده شده بین نخود و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM ۴۲
شکل ۴-۱۵- میزان تشابه و تفاوت ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از TuFM ۴۲
شکل ۴-۱۶- نقاط تطابق داده شده بین تمامی جنس‌ها با استفاده از نشانگر TuFM ۴۵
شکل ۴-۱۷- میزان تشابه و تفاوت بین تمامی جنس‌ها با استفاده از نشانگر TuFM ۴۶
شکل ۴-۱۸- نواحی تطابق داده شده بین ارقام لوبیا با استفاده از نشانگر ENOL ۴۷
شکل ۴-۱۹- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام لوبیا با استفاده از نشانگر ENOL ۴۷
شکل ۴-۲۰- نواحی تطابق داده شده بین لبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگرENOL. ۴۸
شکل ۴-۲۱- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر ENOL ۴۸
شکل ۴-۲۲- نواحی تطابق داده شده بین ارقام لوبیا با استفاده از نشانگرAPx1 ۴۹
شکل ۴-۲۳- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام لوبیا با استفاده از نشانگر APx1 ۴۹
شکل ۴-۲۴- نواحی تطابق داده شده بین ارقام نخودفرنگی با استفاده از نشانگر APx1 ۵۰
شکل ۴-۲۵- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام نخودفرنگی با استفاده از نشانگر APx1 ۵۰
شکل ۴-۲۶- نواحی تطابق داده شده بین لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر APx1 ۵۱
شکل ۴-۲۷- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر APx1 ۵۱
شکل ۴-۲۸- تطابق داده شده بین ارقام نخود با استفاده از نشانگر PGIp ۵۲
شکل ۴-۲۹- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام نخود با استفاده از نشانگر PGIp ۵۳
شکل ۴-۳۰- نواحی تطابق داده شده بین نخود و لوبیا با استفاده از نشانگر PGIp ۵۴
شکل ۴-۳۱- میزان تشابه و تفاوت بین ارقام نخود و لوبیا با استفاده از نشانگر PGIp ۵۴
شکل ۴-۳۲- میزان تشابه رقم بیونیج با رقم نخود (XM_004493582.1) ۵۵
شکل ۴-۳۳- میزان تشابه رقم بیونیج با رقم دیگری از گیاه نخود (XM_004515333) ۵۶
شکل ۴-۳۴- میزان تشابه رقم بیونیج با گیاه عدس (AK337936.1) ۵۶

شکل ۴-۳۵- میزان تشابه رقم بیونیج با گیاه *Brachypodium distachyon* (XM_003562233.1) ۵۶
شکل ۴-۳۶- میزان تشابه رقم بیونیج با گیاه *Glycine max* (XM_003562233.1)..... ۵۷
شکل ۴-۳۷- میزان تشابه رقم بیونیج با گیاه *Hordeum vulgare* (AK368535.1)..... ۵۷
شکل ۴-۳۸- میزان تشابه رقم بیونیج با گیاه *Triticum aestivum* (AK331391.1)..... ۵۷
شکل ۴-۳۹- میزان تشابه رقم ILC-482 با رقم دیگری از نخود (004493582)..... ۵۸
شکل ۴-۴۰- میزان تشابه رقم ILC-482 با رقم دیگری از نخود (XM_004515333.1)..... ۵۸
شکل ۴-۴۱- میزان تشابه رقم ILC-482 با *Lotus japonicas* (AK337936.1)..... ۵۸
شکل ۴-۴۲- میزان تشابه رقم ILC-482 با *Brachypodium distachyon* (XM_003562233.1).....۵۹
شکل ۴-۴۳- میزان تشابه رقم ILC-482 با *Glycine max* (AK285995.1)..... ۵۹
شکل ۴-۴۴- بمیزان تشابه رقم ILC-482 با *Hordeum vulgare* (AK285995.1)..... ۵۹
شکل ۴-۴۵- میزان تشابه رقم ILC-482 با *Triticum aestivum* (AK332140.1)..... ۶۰
شکل ۴-۴۶- میزان تشابه رقم محلی گرگان با رقمی از نخود (AK332140.1) ۶۰
شکل ۴-۴۷- میزان تشابه رقم محلی گرگان با *Lotus japonicas* (AK332140.1)..... ۶۰
شکل ۴-۴۸- میزان تشابه رقم گلی با رقم دیگری از لوبیا (KF033563.1)..... ۶۱
شکل ۴-۴۹- میزان تشابه رقم گلی با *Lotus japonicas* (KF033563.1)..... ۶۱
شکل ۴-۵۰- میزان تشابه رقم گلی با *Brachypodium distachyon* (XM_003577950.1).....۶۱
شکل ۴-۵۱- میزان تشابه رقم گلی با *Oryza sativa* (AC1244151.4)..... ۶۲
شکل ۴-۵۲- میزان تشابه رقم AND1007 با رقم دیگری از لوبیا (KF033563.1) ۶۲
شکل ۴-۵۳- میزان تشابه رقم AND1007 با *Vigna luteola* (EU652948.1)..... ۶۳
شکل ۴-۵۴- میزان تشابه رقم AND1007 با *Glycine max* (L10292.1)..... ۶۳
شکل ۴-۵۵- تشابه رقم بیونیج با رقم دیگری از نخود (XM_004514416.1)..... ۶۳
شکل ۴-۵۶- میزان تشابه رقم بیونیج با رقم دیگری از نخود (XM_004514417.1)..... ۶۴
شکل ۵-۵۷- میزان تشابه رقم بیونیج با رقم دیگری از نخود (XM_004514417.1)..... ۶۴
شکل ۴-۵۸- میزان تشابه رقم بیونیج با *Medicago sativa* (XM_004514417.1)..... ۶۴
شکل ۴-۵۹- میزان تشابه رقم بیونیج با *Brachypodium distachyon* (XM_003579410.1).....۶۵
شکل ۴-۶۰- میزان تشابه رقم بیونیج با *Vitis vinifera* (AM473839.1)..... ۶۵
شکل ۴-۶۱- میزان تشابه رقم بیونیج با *Arabidopsis thaliana* (AM473839.1)..... ۶۵
شکل ۴-۶۲- میزان تشابه رقم بیونیج با *Gossypium hirsutum* (JX583633.1)..... ۶۵
شکل ۴-۶۳- میزان تشابه رقم بیونیج با *Cucumis sativus* (XM_004141868.1)..... ۶۶
شکل ۴-۶۴- نواحی تطابق داده شد در رقم لوبیا گلی با استفاده از نشانگر APx1 با برخی گیاهان دارای توالی مشترک ۶۶
شکل ۴-۶۵- میزان تشابه و تفاوت رقم لوبیا گلی با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده از نشانگرAPx1.....۶۷
شکل ۴-۶۶- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم گلی با برخی گیاهان حاوی توالی مشرک با استفاده از نشانگر APx1 .....۶۷

شکل ۴-۶۷- نواحی تطابق داده شده در رقم لوبیا AND1007 با استفاده از نشانگر APx1 با برخی گیاهان دارای توالی مشترک..... ۶۷
شکل ۴-۶۸- میزان تشابه و تفاوت رقم لوبیا AND1007 با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده از نشانAPx1 ..... ۶۸
شکل ۴-۶۹- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم AND1007 با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده ازنشانگر APx1..... ۶۸
شکل ۴-۷۰- نواحی تطابق داده شده در رقم نخود بیونیج با استفاده از نشانگر PGIp با برخی گیاهان دارای توالی مشترک..... ۶۹
شکل ۴-۷۱- تشابه و تفاوت رقم نخود بیونیج با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده از نشانگر PGIp..... ۷۰
شکل ۴-۷۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم بیونیج با برخی گیاهان دارای توالی مشرک با استفاده از نشانگر PGIp ۷۰
شکل ۴-۷۳- نواحی تطابق داده شده در رقم نخود بیونیج ابا استفاده از نشانگر TuFM با برخی گیاهان دارای توالی مشترک..... ۷۱
شکل ۴-۷۴- میزان تشابه و تفاوت رقم نخود بیونیج با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده از نشانگر PGIp ۷۱
شکل ۴-۷۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نخود رقم بیونیج با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با استفاده از نشانگر TuFM ۷۲
شکل ۴-۷۶- نواحی تطابق داده شده در رقم نخودفرنگی محلی گرگان با استفاده از نشانگر TuFM با برخی گیاهان دارای توالی مشترک..... ۷۲
شکل ۴-۷۷- تشابه و تفاوت رقم نخودفرنگی محلی گرگان با برخی گیاهان دارای توالی مشترک با TuFM ۷۲
شکل ۴-۷۸- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نخودفرنگی رقم محلی گرگان با برخی گیاهان دارای توالی مشرک با استفاده از نشانگر TuFM ۷۳
شکل ۴-۷۹- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن TuFM در رقم نخود بیونیج با نخود رقم کابلی..... ۷۴
شکل ۴-۸۰- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن TuFM در رقم نخود بیونیج با سویا رقمWilliams 82..... ۷۴
شکل ۴-۸۱- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن TuFM در رقم نخود بیونیج با رقمی از سویا..... ۷۴
شکل ۴-۸۲- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن TuFM در رقم نخود بیونیج با از *Brachypodium distachyon* از نژاد Bd21..... ۷۵
شکل ۴-۸۳- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با *Vigna radiata* رقم T44..... ۷۵
شکل ۴-۸۴- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با *Vigna luteola*..... ۷۶
شکل ۴-۸۵- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با *Vigna mungo*..... ۷۶
شکل ۴-۸۶- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با سویا رقم Paldal..... ۷۷
شکل ۴-۸۷- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با سویا رقم Hokkaihadaka. ۷۷
شکل ۴-۸۸- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با سویا رقم Hobbit..... ۷۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- مشخصات بقولات مورد استفاده..... ۲۱
جدول ۳-۲- مشخصات مربوط به ژن یا آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در ژنوم بقولات..... ۲۳
جدول ۳-۳- دمای اتصال مطلوب مربوط به هر آغازگر (^{o}C)..... ۲۴
جدول ۴-۱- مقدار غلظت DNA مورد استفاده (ng)..... ۲۷
جدول ۴-۲- مقایسه ارقام لوبیا و نخود با استفاده از نشانگر TuFM..... ۳۶
جدول ۴-۳- مقایسه ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM..... ۳۸
جدول ۴-۴- مقایسه ارقام نخود و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM..... ۴۲
جدول ۴-۵- مقایسه تمامی ارقام با استفاده از نشانگر TuFM..... ۴۶
جدول ۴-۶- مقایسه ارقام لوبیا و نخودفرنگی با استفاده از نشانگر TuFM..... ۵۲
جدول ۴-۷- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن TuFM در رقم نخود بیونیج ببا برخی از گیاهان..... ۷۵
جدول ۴-۸- بررسی درصد تشابه بخشی از ژن APx1 در رقم لوبیا AND1007 با برخی از گیاهان..... ۷۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

یکی از چالش‌های جهانی قرن بیست و یکم تولید کافی غذا برای جمعیت رو به رشد جهانی می‌باشد. بنابر بعضی گزارشات اخیر، جمعیت جهان برای حدود نه بیلیون نفر در اواسط قرن حاضر رو به رشد است و جهان نیازمند افزایش بیشتر از ۷۰ تا ۱۰۰ ٪ غذا مطابق با رشد جمعیت است. تولیدات کشاورزی نیازمند افزایشند در حالیکه مسائل مربوط به کمبود زمین زراعی و آب، درجه تغییرات اقلیم و حفاظت از منابع طبیعی مواردی هستند که باید به آنها پرداخته شود. بهبود محصولات زراعی بر روی زمین‌های کشاورزی در دسترس، نیازمند تلاش‌های هماهنگ با استفاده از علوم مدرن و پیشرفت‌های فناوری در رشته‌های چندگانه می‌باشد. دو مبحثی که در بهبود محصولات زراعی در دهه اخیر انقلابی به پا کرده اصلاح مولکولی و ژنومیکس گیاهی می‌باشد (کومپاتلا و همکاران، ۲۰۱۲).

نزدیکترین خویشاوند به خانواده فاباسه [1]تا مدت‌های طولانی به صورت ناشناخته باقی مانده بود. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی اخیرا" نزدیکترین خویشاوند به آنها یعنی سوریاناسه [2]و پلی گالاسه [3]را نشان دادند. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی را در شناسایی روابط به صورت کلی در سراسر خانواده و در زیر شاخه‌ها درون خانواده شاهد هستیم. همچنین تجزیه و تحلیل‌های اخیر، نزدیکترین خویشاوندهای چندین جنس گیاهی مهم از جمله یونجه و نخودفرنگی نشان داده است (سولتیز و همکاران، ۲۰۰۳).

بتازگی دانشمندان در قالب حوزه جدیدی از علم با عنوان ژنومیکس به مطالعه این دستورالعمل‌های ژنتیکی پرداخته‌اند. در حقیقت ژنومیکس واژه جدیدی است که به مطالعه همه ژن‌های موجود در بدن یک ارگانیسم (ژنوم) و نیز تعامل این ژن‌ها با یکدیگر و با محیط اطراف او می‌پردازد و به عبارتی توالی، ساختار و عملکرد ژنوم را مطالعه می‌کند. در واقع ژنومیکس درکی از میزان اطلاعات ژنوم موجودات از جمله دانش بیوشیمایی را به ما می‌دهد. ژنومیکس، ساختار و عملکرد ژن‌ها و همچنین به صورت همزمان همه ژن‌های ژنوم را می‌تواند مطالعه کند. بررسی الگوهای بیان ژن، یکی از بخش‌های مهم در ژنومیکس است (دی زیودا، ۲۰۱۰). تمرکز این شاخه علمی نوین بر مطالعه و تفسیر اطلاعات ژنتیکی یا همان ژنوم ارگانیسم است.

اولین توالی‌یابی در حوزه ژنومیکس مربوط به گیاه مدل *آرابیدوپسیس تالیانا* [4]بود که همراه با سایر پروژه-های ژنوم از مخمر گرفته تا انسان، در حال انجام و کامل‌شدن هستند (ترین و همکاران، ۱۹۹۹). تاکنون بیش

[1] -Fabaceae
[2] -Surianaceae
[3] -Polygalaceae
[4] -*Arabidopsis thaliana*

از سه هزار ژنوم از جمله تعداد زیادی ژنوم گیاهی توالی‌یابی شده است. با این حال، تفسیر آنها هنوز هم توسط بسیاری از ژن‌های حفاظت شده با عمکلرد مشخص، مشکل‌ساز است (لاگرکراتز و لایدیت، ۱۹۹۶). روش‌های مقایسه‌ای پایه و اساس مطالعاتی است که مفاهیمی درباره عملکرد و تکامل سطوح متنوع سازماندهی گیاهی را بیان می‌دارد. در چند سال گذشته شاهد ظهور ژنومیکس مقایسه‌ای به عنوان ابزاری برای پاسخ‌گویی به سوالات در زمینه‌های گوناگون تحقیقات گیاه‌شناسی هستیم. ژنومیکس مقایسه‌ای نه تنها ابزاری ارزشمند برای درک مفاهیم زیست‌شناسی مانند تشریح الگوها و فرآیندهای تکاملی ژنوم است بلکه نشان‌دهنده جنبه‌های عمکلردی ژن هم می‌باشد (کایسدو و پیروگانان، ۲۰۰۵).

اگرچه در حوزه ژنومیکس، اولین منبع کارشده بر روی اطلاعاتی از نقشه‌یابی ژنوم بوده است، واژه "ژنومیکس مقایسه‌ای" از زمانی که پیش‌بینی شد توالی‌یابی DNA به مقدار زیادی در موجودات مدل عملی می‌شود، به صورت گسترده‌ای در بین گونه‌های مقایسه‌ای با سطح بالاتر از ژن‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. ژنومیکس مقایسه‌ای با شکل‌گیری دو یا چند توالی شروع می‌شود و حضور توالی‌های ارتولوگ در ژنوم مرتب شد و میزان حفاظت این توالی‌ها مشخص می‌شود. به عبارتی معنای جدیدی برای درک تکامل توسط انتخاب طبیعی فراهم می‌کند و به اهمیت نسبی انتخاب طبیعی و رانش ژنتیکی برای مطالعه بر روی میزان بالای تلاقی ژنوم اشاره دارد (الگرن، ۲۰۰۸).

یکی از چالش‌های کلیدی در ژنومیکس مقایسه‌ای، گروه‌بندی قابل اعتماد ژن‌های همولوگ گرفته شده از یک جد مشترک و ژن‌های ارتولوگ در خانواده‌های ژنی می‌باشد (وانبل و پروست، ۲۰۱۲).

این نوع از ژنومیکس در مقیاس بزرگ شامل نوع داده‌هایی است که به درک ارتباط عملکردی از میان ژن‌ها، بین ژن‌ها و فنوتیپ‌ها و بین ژنوتیپ / فنوتیپ و متغیرهای محیطی مربوط می‌باشد (ژیا، ۲۰۱۳) و به طور معمول پایه و اساس نقشه‌های ژنتیکی و توالی‌ها و مطالعات مقدماتی ژنوم‌های پیچیده‌ای مثل گراس‌ها است. تلاش‌های ژنومیکس مقایسه‌ای امکان یافتن ارتباط بین خانواده‌ها در سراسر ژنوم آنها را فراهم می‌کند. همچنین اطلاعات نقشه‌یابی بعضی داده‌های مقدماتی توالی‌ها میزان حفاظت ژنی بین ژنوم گیاهان از همان خانواده یا از خانواده خویشاوند دیگر را نشان می‌دهد.

نقشه‌یابی ژنتیکی مقایسه‌ای تشابهات و تفاوت‌ها را در ژنوم و بین جنس‌های متعلق به طبقه‌بندی‌های مختلف را مطالعه می‌کند (سرس و همکاران، ۲۰۰۶). نقشه‌یابی ژن‌ها و تهیه نقشه‌های ژنتیکی کاری اساسی در علم ژنتیک محسوب می‌شود زیرا بخش عمده‌ای از علم ژنتیک با درک توارث صفات ویژه و دست-ورزی آنها در ارتباط است.

پیشرفت‌های اخیر در نقشه‌یابی ژن‌ها منجر به کامل‌تر شدن نقشه‌های ژنتیکی مدل در بسیاری از گونه‌ها شده است. در ابتدا، این نقشه‌ها به منظور فراهم کردن منابعی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی در گونه‌های خاص ایجاد شدند.

اخیرا" با استفاده از این نقشه‌ها مشخص شده که نه تنها در بین گونه‌های نزدیک به‌هم (مانند غلات) بلکه حتی بین گونه‌های دور از هم نیز ترتیب ژن‌ها تا حد زیادی حفظ شده است (بی‌نام، ۱۳۸۹؛ الیز و همکاران، ۱۹۹۲).

پیشرفت‌های اخیر در نقشه‌یابی ژن‌ها منجر به کامل‌تر شدن نقشه‌های ژنتیکی مدل در بسیاری از گونه‌ها شده است. در ابتدا، این نقشه‌ها به منظور فراهم کردن منابعی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی در گونه‌های خاص ایجاد شدند.

در واقع نقشه‌یابی مقایسه‌ای به ایجاد نقشه‌های ژنتیکی با داده‌های به دست آمده از یک طیف وسیعی از گونه‌های مختلف کمک می‌کند (چاگن و همکاران، ۲۰۰۳). نقشه‌یابی مقایسه‌ای ژنومی متشکل از مطالعه محتوای ژنی حفاظت شده (سین‌تنی[1]) و ترتیب آنها (هم‌خطی[2]) در ژنوم گونه‌های بسیار به‌هم نزدیک است. یکی از نتایج نقشه‌یابی مقایسه‌ای، دانش و اطلاعات درباره تکامل ژنوم گونه‌ها یا جنس‌های موردنظر می‌باشد.

هرچند که فهم زیربنای توسعه‌ای و ژنتیکی تغییرات خاص تکاملی با پایگاه‌های اطلاعاتی ناکافی آناتومی تکاملی و فقدان ابزارهای محاسباتی برای شناسایی ژن‌های موردنظر اساسی و تنظیم‌کننده دارای مشکل است. نقشه‌های ژنتیکی گونه‌های مهم گیاهی، بررسی و مقایسه شده است. نتایج نشان داده است که محتوای ژنی و ترتیب آنها می‌تواند حفظ شود و تفاوت‌ها در ساختار ژنوم اساسا" در نتیجه بازآرایی کروموزومی مثل دو برابر شدن، وارونه شدن، انتقال، حذف و یا پدیده پلی‌پلوئیدی می‌باشد. هدف دیگر نقشه‌یابی مقایسه‌ای، انتقال اطلاعات بین گونه‌ها است. قابلیت در نظر گرفتن تعدادی از گونه‌ها، مثل گراس‌ها، به عنوان یک سیستم ژنتیکی واحد، دارای کاربرد زیادی از جمله پیش‌بینی مکان نشانگرها، ژن‌های کاندید و جایگاه صفات کمی (QTL[3]) در گونه‌های غیر مدل می‌باشد (چاگن و همکاران، ۲۰۰۳؛ مابی و همکاران، ۲۰۰۷). محققان در حال حاضر از یک کیت (بسته آزمایشگاهی برای یک منظور خاص) رایانه‌ای و روش‌های ریاضی که در مجموع بیوانفورماتیک گفته می‌شود برای تفسیر، دستکاری و آنالیز این اطلاعات استفاده می‌کنند.

بنابراین اهداف پژوهش حاضر عبارت بودند از:

۱- تعیین میزان حفاظت ژنومی در بین گونه‌های مختلف حبوبات با استفاده از چند مکان ژنی محدود که نشان‌دهنده ارتباط تکاملی بین این گونه‌ها است.

۲- شناسایی روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مختلف حبوبات.

---

[1] – Synteny
[2] - Colinerity
[3] - Quantitative Trait Loci

۳- افزایش دانش ما در خصوص ژنوم حبوبات زراعی مهم با استفاده ازاطلاعات به دست آمده از ژنوم سایر حبوبات خصوصا" حبوبات مدل.

۴- نقشه یابی مقایسه‌ای و کمک به ایجاد نقشه ژنتیکی در حبوبات مهم زراعی با استفاده از اطلاعات به دست آمده در سایر حبوبات.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- ژنومیکس

ژنتیک مولکولی و ژنومیکس به عنوان ابزارهایی برای شناسایی ژنتیکی ارگانیسم‌ها معرفی شده‌اند (لورز و ویدهولم، ۲۰۰۵). ژنومیکس در دهه ۷۰ میلادی در حالی که دانشمندان به دنبال توالی DNA موجودات ساده بودند، شروع شد (بی‌نام، ۲۰۱۰). ژنومیکس علم جدیدی است که به کشف توالی‌ها در ژنوم کامل یک ارگانیسم خاص می‌پردازد. ژنوم می‌تواند به عنوان سری کامل ژن‌های داخل یک سلول تعریف شود. بنابراین ژنومیکس مطالعه آرایش ژنتیکی ارگانیسم‌ها است. با این حال، تنها راه شروع ژنومیکس همین توالی‌های ژنومیکی است. در گیاهان زراعی، هدف اصلی کاربرد ژنومیکس، به دست‌آوردن فهم بهتری از ژنوم گیاهان است. اهمیت ژن‌های زراعی ممکن است برای تولید بیشتر مواد مغذی و غذای سالم در حالیکه همزمان محیط هم حفظ شود، شناسایی و هدف‌گذاری شده باشد. اطلاعات موجود در ژن‌های یک ارگانیسم (ژنوتیپ‌شان) مسئول عمده آرایش فیزیکی نهایی ارگانیسم‌ها است و به فنوتیپ اشاره دارد. با این حال محیط هم تا حدی بر فنوتیپ تأثیر می‌گذارد (بی نام، ۲۰۰۵). ژنومیکس زمینه‌ای برای مطالعه ژنوم و تولید نقشه‌های ژنتیکی در مقیاس خرد، سنجش‌های ریزتراشه‌ای با جمع‌آوری تنوعات ژنتیکی در یک جمعیت و محقق شدن کنترل ژن‌های رونویسی، و به کار گیری فناوری دیجیتال و آنالیز متمرکز محاسباتی برای درک ساختاری، عملکردی و ارزیابی گوناگونی ارگانیسم‌ها می‌باشد. ژنومیکس ابزارهای لازم برای تسریع کار متخصصین ژنتیک مولکولی مرسوم را فراهم می‌کند و اکنون یک نظم علمی در خود دارد. کاربرد فناوری-های ژنومیکس در همه نواحی بیولوژی کاهش موانعی که جدا کننده جوامع تحقیقاتی گیاهان، حیوانات و موجودات میکروبی را داشته است، می‌باشد (وارما وشریواستاوا، ۲۰۰۸).

در بخش تحقیقات ژنومیکس با استفاده ازروش‌های نوین بیوتکنولوژی، ژنوم گیاهان، ریزسازواره‌ها و آفات مهم مرتبط با کشاورزی در سطح ساختاری و عملکردی مورد بررسی قرار می‌گیرد. عمده‌ترین فعالیت‌های این بخش بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان، سوش‌های مختلف عوامل بیماری‌زای گیاهی و حشرات، مکان‌یابی و نشانمندکردن ژن‌های کنترل کننده تنش‌های زیستی و غیر زیستی، تشخیص روابط فیلوژنتیک با استفاده از نشانگرهای DNA، تهیه نقشه‌های ژنتیک و اشباع مولکولی، جداسازی، دست‌ورزی و همسانه سازی ژن‌های مفید، ساخت پلاسمید و همچنین تهیه کیت‌هایی به منظور تسهیل و تسریع شناسایی عوامل بیماری‌زا در گیاهان می‌باشد.