بسم الله الرحمن الرحيم

١١١٥٢٦

دانشگاه زابل

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

بررسی تنوع ژنتیکی سرخدار ایرانی(*Taxus baccata*) با استفاده از مارکر SSR

اساتید راهنما:

دکتر محمود رمرودی

دکتر سید مجتبی خیام نکویی

اساتید مشاور:

دکتر براتعلی سیاه‌سر

دکتر محسن مردی

تهیه و تدوین:

پروانه محمودی

بهمن ۱۳۸۷

۱۳۸۸ /۲/ ۱۵

۱۱۱۵۲۶

بأسمه تعالی

وزارت علوم ، تحقیقات و فناوری

دانشگاه زابل

تاریخ:.....

شماره:.....

پیوست:.....

فرم الف

این پایان نامه با عنوان:

«شناسایی و جداسازی نشانگر ریز ماهواره و بررسی تنوع ژنتیکی سرخدارایران (*Taxus baccata*) »

قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد **مهندسی کشاورزی** گرایش **اصلاح نباتات** توسط دانشجو **پروانه محمودی** تحت راهنمایی اساتید پایان نامه آقایان **دکتر محمود رمرودی** و **دکتر سید مجتبی خیام نکویی** و اساتید مشاور پایان نامه آقایان **دکتر براتعلی سیاه‌سر** و **دکتر محسن مردی** تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضا دانشجو

87.11.21

این پایان نامه ٦ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۸۷/۱۱/۲۱ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام ونام خانوادگی:پروانه محمودی **امضا** **تاریخ ۱۳۸۷/۱۱/۲۱**

۱- استاد راهنما: دکتر محمود رمرودی

۲- استاد راهنما: دکتر سید مجتبی خیام نکویی

۳- استاد مشاور: دکتر براتعلی سیاه‌سر

۴- استاد مشاور: دکتر محسن مردی

۵- داور: دکتر محمود سلوکی

۶- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر محمد گلوی

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه زابل
اداره تحصیلات تکمیلی

تقدیر و تشکر

با سپاس فراوان خداوند منان را که توان و قدرت به من داد تا مرحله‌ای دیگر از زندگی را با موفقیت طی کنم.

تقدیم به پدر و مادرم، دو اسطوره صبر و فداکاری که همواره پشتیبانم بودند.

به جاست که برای زحمات کسانی که مرا در طول دوران گذراندن این پایانامه یاری کردند تشکر و سپاسگزاری نمایم:

از اساتیدم در زابل دکتر رمرودی و دکتر سیاه‌سر برای راهنمایی‌هایشان سپاسگزارم.

از اساتیدم در پژوهشکده بیوتکنولوژی، از دکتر سید مجتبی خیام نکویی برای توجه و لطف‌هایشان در طول اجرای این پایان نامه بسیار سپاسگزارم.

از دکتر محسن مردی برای حمایت‌ها، پیگیری‌ها و پشتیبانی‌هایشان که همیشه دلگرمی من بود بسیار سپاسگزارم.

از مهندس پیرسیدی برای دلسوزی و راهنمایی‌های ارزنده‌شان در طول دوره کار متشکر و سپاسگزارم.

از تمامی دوستان و همکاران در بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج : خانم‌ها مهربانو کاظمی، لاله کریمی، مریم فارسی، سولماز کمیجانی، وحیده نرجسی، زهرا نعمتی، نیوشا رئوفی، سحر ولیزادگان و آقایان محمد رضا غفاری و ایمان طباطبائی و دکتر مهرشاد زیتالعابدینی برای راهنمایی‌ها و نیز ایجاد جوی دوستانه ، صمیمی و آرام در طول دوران انجام این طرح بسیار سپاسگزارم .

از همکلاسان ارجمندم حقیقت وکیلیان و سیامک اسدی برای همه کمک‌هایشان در طول حضورم در کرج سپاسگزارم.

بهمن ۱۳۸۷

پروانه محمودی

چکیده

برآورد تنوع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد چراکه، کاهش تنوع ژنتیکی منجر به کاهش قدرت پاسخگویی گیاه به تغییر شرایط محیط مثل: تغییر شرایط آب و هوایی و جمعیت پاتوژن‌ها می‌شود. نشانگر ریزماهواره (SSR) توالی‌های۱ تا۶ تایی از تکرارهای پشت سرهم هستند که درژنوم یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌های بررسی شده تاکنون، وجود دارند. ریزماهواره‌ها به دلیل پلی-مورفیسم بالا و تکرارپذیری و قابلیت استفاده در گونه‌های مشابه نشانگر مهمی در بررسی‌های تنوع ژنتیکی می‌باشند. در این تحقیق ۵۶ نشانگر ریزماهواره از سرخدار ایران با روش فیاسکو(زان و همکاران،۲۰۰۲) شناسایی و جداسازی شد. پلی‌مورفیسم ۱۸ نشانگر از این ۵۶ جایگاه روی ۱۵۰ نمونه سرخدار جمع‌آوری شده از شمال و شمال‌غرب ایران بررسی شد. تعداد آلل مشاهده شده برای این نشانگرها بین ۲ تا ۱۰ آلل و میانگین ۴/۴ آلل می‌باشد. هتروزایگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۱ تا ۰/۹۹ و هتروزایگوسیتی مورد انتظار بین ۰/۶۱ تا ۰/۹۹ می‌باشد. نشانگرهای TB15 و TB14 و TB8 با بیشترین تعداد آلل و بالاترین PIC نشانگرهای مناسب‌تری برای بررسی‌های تنوع ژنتیکی سرخدار می‌باشند. تجزیه کلاستر با ضریب جارکارد و روش UPGM نمونه‌ها را در سطح شباهت ۷۳ درصد به دو گروه مجزا تبدیل کرد و نمونه‌های شمال و شمال‌غرب ایران را در دو گروه مجزا قرار داد. تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز به طورکلی نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. نمونه‌های ۹۵ و ۱۲۲ از منطقه ارسباران شبیه‌ترین نمونه‌ها به هم و نمونه ۶۷ از مازندران و۱۴۷ از ارسباران متفاوت‌ترین نمونه‌ها می‌باشند. این نشانگرهای شناسایی شده ابزار مناسبی برای بررسی-های تنوع سرخدار ایران می‌باشند.

کلمات کلیدی: سرخدار، نشانگر ریز ماهواره ، فیاسکو، آلل

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع

۱-۲- کلیات ۷

۲-۲- خصوصیات گیاه شناسی ۷

۳-۲- پراکنش و اکولوژی ۹

۴-۲- اهمیت دارویی ۱۱

۵-۲- خواص درمانی ۱۲

۶-۲- بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴

۱-۶-۲- تنوع و انواع آن ۱۴

۲-۶-۲- منشاء تنوع ۱۵

۳-۶-۲- چگونگی پیدایش و استفاده از نشانگرها ۱۵

۴-۶-۲- تعریف نشانگر ۱۶

۵-۶-۲- خصوصیات یک نشانگر خوب ۱۶

۱-۵-۶-۲- نشانگرهای مورفولوژیک ۱۷

۲-۵-۶-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی ۱۸

۳-۵-۶-۲- نشانگرهای مولکولی ۱۸
۴-۵-۶-۲- نشانگرهای پروتئینی ۱۸
۵-۵-۶-۲- نشانگرهای دی. ان. ای ۱۹
۶-۶-۲- مبانی نشانگر ریزماهواره ۲۰
۷-۶-۲- فراوانی و توزیع ریزماهواره‌ها در ژنوم ۲۲
۸-۶-۲- مبانی تکثیر بین ریزماهواره‌ها ۲۳
۹-۶-۲- کاربرد ریزماهواره‌ها ۲۴
۱۰-۶-۲- ویژگی‌های ریزماهواره‌ها ۲۴
۱۱-۶-۲- معایب ریزماهواره‌ها ۲۵
۱۲-۶-۲- اشکال مختلف ریزماهواره‌ها ۲۶
۱۳-۶-۲- چگونگی پیدایش ریزماهواره‌ها ۲۶
۱۴-۶-۲- عوامل موثر بر میزان جهش در ریزماهواره‌ها ۲۹
۱۵-۶-۲- مرگ ریزماهواره‌ها ۲۹
۱۶-۶-۲- فعالیت بیولوژیکی ریزماهواره ۳۰
۱۷-۶-۲- مقایسه ریزماهواره‌ها با سایر نشانگرها ۳۰
۷-۲- روش های جداسازی ریزماهواره ها از موجودات مختلف ۳۱
۸-۲- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی سرخدار ۳۵

۹-۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز ۳۸
۱-۹-۲- مراحل کار واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ۳۸
۲-۹-۲- سه مرحله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل ۳۹
۱۰-۲- تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی برای مطالعه روابط تکاملی ۴۰
۱۱-۲- روش‌های گروه‌بندی داده‌ها ۴۲
۱-۱۱-۲- تجزیه خوشه‌ای ۴۲
۲-۱۱-۲- ضریب کوفنتیک ۴۵
۳-۱۱-۲- تجزیه به مختصات اصلی (PCo) ۴۵
۴-۱۱-۲- معیارهای سودمندی نشانگرها ۴۶
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۱-۳- جداسازی نشانگر ریز ماهواره ۴۸
۱-۱-۳- انتخاب نمونه گیاهی برای جداسازی نشانگر ریزماهواره ۴۸
۲-۱-۳- استخراج دی. ان. ای ۴۹
۳-۱-۳- واکنش هضم ۴۹
۴-۱-۳- اتصال سازگارساز ۴۹
۵-۱-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعات حاصل از هضم ۵۰
۶-۱-۳- مراحل دورگ سازی و جداسازی ۵۱

۳-۱-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای دو رشته‌ای شدن دی. ان. ای تک رشته‌ای ۵۵
۳-۱-۸- همسانه‌سازی ۵۶
۳-۱-۹- انتقال پلاسمید تراریخته درون باکتری ۵۶
۳-۱-۱۰- واکشت کلونی‌های سفید ۶۰
۳-۱-۱۱- استخراج پلاسمید ۶۰
۳-۱-۱۲- هضم آنزیمی ۶۲
۳-۱-۱۳- استخراج با کیت ۶۳
۳-۱-۱۴- توالی یابی ۶۳
۳-۱-۱۵- طراحی پرایمر ۶۴
۳-۱-۱۶- بهینه سازی برنامه PCR ۶۴
۳-۲- مواد گیاهی ۶۴
۳-۳- بررسی‌های مولکولی ۶۵
۳-۳-۱-۱- استخراج دی. ان. ۶۵
۳-۳-۱-۲- تعیین کیفیت وکمیت دی. ان. ای استخراج شده ۶۷
۳-۳-۲- تجزیه SSR ۶۸
۳-۳-۲-۲- جداسازی و رنگ‌آمیزی قطعات تکثیر یافته ۷۰
۳-۳-۲-۳- آماده کردن شیشه‌های سیستم الکتروفورزی ۷۰

۴-۲-۳-۳- تهیه اکریل آمید ۴۰ درصد ۷۰
۵-۲-۳-۳- ژل آکریلامید..... ۷۱
۶-۲-۳-۳- الکتروفورز نمونه ها..... ۷۲
۷-۲-۳-۳- رنگ‌آمیزی نیترات نقره..... ۷۳
۴-۳- تجزیه و تحلیل آماری ۷۴
۱-۴-۳- امتیازبندی باندها..... ۷۴
۲-۴-۳- سودمندی نشانگر ریزماهواره ۷۴
۳-۴-۳- محتوای اطلاعاتی پلی مورفیسم(PIC) ۷۴
۴-۴-۳- تعداد آلل موثر(A_e)..... ۷۵
۵-۴-۳- متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) یا تنوع ژنتیکی نی [D] ۷۵
۵-۴-۳- تجزیه خوشه‌ای ۷۶
۶-۴-۳- تخمین فاصله و شباهت ژنتیکی ۷۶
۷-۴-۳- ضریب کوفنتیک ۷۸
۸-۴-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی(PCOA) ۷۸
فصل چهارم: نتایج و بحث
۱-۴- جداسازی نشانگر ریز ماهواره با استفاده از روش فیاسکو ۸۱
۱-۱-۴- استخراج دی. ان. ای..... ۸۱

۲-۱-۴- واکنش هضم: ۸۱
۳-۱-۴- اتصال سازگارسازها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۸۲
۴-۱-۴- اتصال کاوشگر و شستشو ۸۳
۵-۱-۴- همسانه سازی ۸۵
۶-۱-۴- استخراج پلاسمید ۸۶
۷-۱-۴- هضم آنزیمی ۸۷
۸-۱-۴- انتخاب نمونه‌ها برای توالی یابی ۸۸
۹-۱-۴- استخراج با کیت ۸۹
۱۰-۱-۴- توالی‌یابی ۹۰
۱۱-۱-۴- طراحی آغازگر ۹۲
۱۲-۱-۴- بهینه سازی برنامه PCR برای هر آغازگر ۹۳
۱۳-۱-۴- نتایج و بحث کارایی روش فیاسکو در گیاه سرخدار ۹۴
۲-۴- نتایج بررسی تنوع ژنتیکی ۹۵
۱-۲-۴- استخراج دی. ان. ای ۹۵
۲-۲-۴- فاکتورهای سودمندی نشانگر ۹۵
۱-۲-۲-۴- تعداد آلل‌های هر نشانگر ۹۵
۲-۲-۲-۴- محتوای اطلاعاتی چند شکلی ۹۷

۳-۲-۴- فراوانی آلل غالب ۹۸
۴-۲-۴- هتروزایگوسیتی ۹۸
۶-۲-۴- تعداد آلل موثر ۱۰۰
۵-۲-۴ تجزیه خوشه‌ای ۱۰۰
۷-۲-۴- تجزیه PCoA ۱۰۸
۳-۴- نتیجه گیری ۱۱۱
۴-۴- پیشنهادات ۱۱۲
منابع ۱۱۴

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱- ٤	۸۳
شکل ۲- ٤	۸۳
شکل ۳- ٤ استرپتاویدین	۸۵
شکل ٤- ٤ شستشو در دستگاه میدان مغناطیسی	۸٦
شکل ۵- ٤ اسمیر در ناحیه زیر ۱۰۰۰ باز مشاهده شد	۸٦
شکل ٦- ٤ کلونی های آبی و سفید تشکیل شده پس از تراریزش	۸۷
شکل ۷- ٤ استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی	۸۸
شکل ۸- ٤ هضم آنزیمی نمونه‌های پلاسمید	۸۹
شکل ۹- ٤ انتخاب نمونه جهت ارسال برای توالی یابی. هستند	۹۰
شکل ۱۰-٤ استخراج پلاسمید با کیت	۹۱
شکل ۱۱-٤ نرم افزار *contig* , *coromas* برای مشاهده توالی نمونه ها	۹۲
شکل ۱۲-٤ میزان دی نوکلئوتیدهای موجود در توالیها	۹۲
شکل ۱۳-٤ میزان توالیهای دی و تری و تترا و هگزا	۹۳
شکل ۱٤-٤	۹٤
شکل ۱۵-٤ استخراج دی. ان. ای بوسیله کیت کیاژن	۹٦
شکل ۱٦-٤ تصویر ژل اکریل آمید حاصل از آغازگر *TB6*	۹۸

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ نام علمی *Taxus* (مصدق،۱۳۷۲)	۹
جدول ۱-۳ واکنش الحاق سازگازسازها	٤۹
جدول ۲-۳ حجم نهایی در واکنش زنجیره ای پلیمراز	٥۰
جدول ۳-۳ برنامه *PCR* پیش از اتصال کاوشگرها	٥۱
جدول ٤-۳ حجم نهایی واکنش الحاق	٥٦
جدول ٥-۳ ترکیب بافر *TEG* استخراج	٦۲
جدول ٦-۳ واکنش هضم برای جدا کردن قطعات الحاقی	٦۳
جدول ۷-۳ جمعیت ها و مشخصات مربوط به آنه	٦٥
جدول ۸-۳ حجم نهایی مواد واکنش	٦۹
جدول ۹-۳ برنامه تاچ داوون	٦۹
جدول ۱۰-۳ برنامه *PCR* ثابت	۷۰
جدول ۱۱-۳ تهیه محلول باندسیلن	۷۱
جدول ۱۲-۳ ترکیبات محلول ژل پلیآ کریلامید واسرشته ساز ٦ درصد	۷۲
جدول ۱-٤ توالی ۷ کاوشگر استفاده شده در این تحقیق	۸٤
جدول ۲-٤ برنامه *PCR* استفاده شده	۸٤
جدول ۳-٤ مقدار تعداد آلل، *PIC*، فراوانی آللی	۱۰۰
جدول ٤-٤ مقادیر ویژه	۱۱۰

شکل ۴-۱۷ چند شکلی حاصل از نشانگر *TB8* در ٤٦ نمونه سرخدار ۹۸

شکل ۴-۱۸ نمونه‌های دسته اول از گروه *A* ۱۰۳

شکل ۴-۱۹ نمونه‌های دسته دوم از گروه اول ۱۰۳

شکل ۴-۲۰ نمونه‌های دسته سوم از گروه اول ۱۰٤

شکل ۴-۲۱ نمونه‌های دسته اول از گروه دوم ۱۰۵

شکل ۴-۲۲ نمونه های دسته دوم از گروه دوم ۱۰٦

شکل ۴-۲۳ نمونه ٦۷ که نمونهای با ژنوتیپ متفاوت از سایر جمعیت بود ۱۰٦

شکل ۴-۲٤ تجزیه به مولفه‌های اصلی ۱۰۹

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

سرخدار با نام علمی *Taxus baccata L.* درختی است سایه پسند که به صورت مخلوط با سایر گونه‌های جنگلی، در اشکوب زیرین جنگل‌های مرطوب نواحی مدیترانه‌ای و برخی نقاط آسیا مثل شمال ایران یافت می‌شود، یکی از سوزنی برگان متعلق به خانواده Taxaceae است (مصدق، ۱۳۷۲) که در اروپا به صورت درختچه‌ای و زینتی مشاهده می‌شود. این گیاه دارای ارزش دارویی بسیار زیادی است و به علت وجود تاکسوییدهای مختلف قابل تبدیل به مواد فعال بیولوژیکی که به عنوان داروهای ضد نئوپلاسم استفاده می‌شوند، اهمیت خاصی دارد. مطالعات روی تاکسوییدهای مختلف جنس Taxus در چهار دهه اخیر منجر به شناسایی بیش از ۳۵۰ ترکیب تاکسوییدی از گونه‌های مختلف این جنس گردیده است. این گیاه دارای قارچ‌های اندوفایت همزیست می‌باشد که به نظر می‌رسد در تولید تاکسول موثر هستند. تاکسول در سال ۱۹۷۷ برای درمان سرطان رحم و پستان توسط سازمان غذا و دارو (FDA)[1] مورد تایید قرار گرفت. میزان این ماده در گیاه اندک می‌باشد، برای اینکه به ۱ گرم تاکسول دست یابیم، پوست سه درخت صد ساله باید برداشته شود! یک دوره درمان با آن نیاز به دو گرم تاکسول می‌باشد و به همین دلیل نیاز به تهیه تاکسول از روش‌های دیگر ضروری می‌باشد. با توجه به اهمیت بسیار زیاد این گیاه و مصارف دارویی آن انجام کارهای اصلاحی بر روی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به علت محدودیت داشتن و وقت‌گیر بودن روش‌های اصلاح سنتی و نیز با توجه به دیر زیستی این گیاه و رشد بسیار کند سالانه و درختی بودن سرخدار، در مقابل روند سریع رشد جمعیت و نیاز به این دارو، بیوتکنولوژی و ژنتیک ملکولی به عنوان یک استراتژی کلیدی و

[1] Food and Drug Administration

امیدوارکننده در زمینه افزایش تولید این دارو مطرح است. برای بررسی تنوع ژنتیکی و پیش بینی آسیب پذیری یک گونه، از بین رفتن یا زنده ماندن جمعیت‌های درون یک گونه بسیار حائز اهمیت می‌باشد (بوی و همکاران، ۲۰۰۰)، از طرفی برای اجرای موفق یک پروژه اصلاحی آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی موجود در داخل و بین جمعیت‌ها ضروری است. مسئله مهم در بررسی تنوع ژنتیکی این است که ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ ژنتیکی چقدر با یکدیگر متفاوت می‌باشند و همچنین چه مقدار تنوع در داخل گونه‌ها وجود دارد (بوتلین و تریگتزا، ۱۹۹۸). میزان و چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی، منعکس کننده بر همکنش فرایندهای تکاملی مختلف مانند جریان ژنی، موتاسیون، رانده شدن ژنتیکی و انتخاب طبیعی می-باشند. آگاهی از تنوع ژنتیکی یک گونه می‌تواند به اصلاحگر برای چکونگی جمع آوری و استفاده از منابع ژنتیکی مختلف و پیش بینی فواید ژنتیکی بالقوه، در برنامه‌های اصلاحی کمک کند. بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی همواره متداول بوده است. لیکن ارزیابی فنوتیپی به دلیل اثر محیط روی بیان ژن، ممکن است روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نباشد. برای مطالعه گیاهان می‌توان از نشانگرهای پروتئینی نیز استفاده کرد، اما این نشانگرها محدود هستند و تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه می‌باشند. در سالهای اخیر پیشرفت‌ها در زمینه زیست شناسی مولکولی قابل توجه بوده که شاید بتوان مهمترین این پیشرفت‌ها را در مورد نشانگرهای دی. ان. ای نام برد، که در واقع همان تفاوت-های قابل بررسی ردیف های بازی دی. ان. ای موجود بین دو یا چند نمونه می‌باشد. نشانگرهای مولکولی را می توان برای بررسی ژنوم هر موجودی مورد استفاده قرار داد، به طوریکه از نشانگرهای مولکولی در سالهای اخیر برای مطالعات پایه‌ای در انسان و حیوان استفاده شده است. تا کنون تعداد زیادی نشانگر دی. ان. ای معرفی شده است و در تجزیه‌های ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری ویژگی‌ها مثل میزان چندشکلی، غالب یا همبارز بودن، تعداد جایگاه های تفکیک شده، توزیع در سطح

کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی دی ان ای الگو و هزینه مورد نیاز با هم متفاوت می-باشند. بدون تردید معرفی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[2] نقش بسیار زیادی در تکامل و پیشرفت نشانگرهای دی. ان. ای داشته است (نقوی و همکاران، ١٣٨٤؛ برین، ١٩٨٠). بررسی دی. ان. ای، ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیکی را در موجودات مختلف امکان پذیر می‌سازد. مجموعه کاملی از روشهای بررسی دی. ان. ای در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان استفاده شده است که این روش‌ها شامل دو دسته می‌باشند: روش‌هایی که در آنها از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود و دیگری روش که بر پایه مقایسه توالی ژن در لوکوس خاص می-باشد. نوع روش مولکولی که برای اندازه‌گیری فواصل ژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد، بسته به میزان تفاوت‌های ژنتیکی در حال ارزیابی متفاوت است. روش‌هایی نظیر بررسی رپید[3] ممکن است برای تعیین تفاوت‌های ژنوتیپی داخل یک رقم گیاهی مفید باشد، در حالی که بررسی توالی های ریبوزومی برای بررسی گونه ها با سطح بالاتر نیز قابل استفاده است (باقری و همکاران، ١٣٨١). نشانگر ریزماهواره با توجه به هم بارز بودن و اختصاصی بودن و نیز تنوع آللی بالا نشانگر مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه سرخدار می‌باشد. انتخاب نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی سرخدار به علت توام بودن قارچ های اندوفایت با ژنوم آن گیاه که امکان جدا کردن ژنوم قارچ از ژنوم گیاه وجود ندارد، بسیار مهم می‌باشد. به دلیل وجود این قارچ‌ها همزیست با سرخدار، استفاده از نشانگر اختصاصی در بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه نتایج مطمئن‌تری همراه خواهد داشت. از آنجایی که استفاده از نشانگرهای ملکولی در سطح دی. ان. ای با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بسیار دقیق و تکرارپذیر است، در این تحقیق برای اولین بار در برای بررسی تنوع ژنتیکی سرخدار از این نوع نشانگر استفاده شد. با توجه به در دسترس نبودن و کم بودن تعداد نشانگر ریز ماهواره شناسایی شده در این گیاه، پیش از بررسی تنوع ژنتیکی شناسایی و جداسازی نشانگر برای بررسی

---

[2] PCR
[3] RAPID

تنوع لازم می باشد. روش فیاسکو [4] در جداسازی نشانگر ریزماهواره با کارایی بالایی که دارد، نسبت به روش های دیگر شناسایی ریز ماهواره ها سریع تر و آسان تر می‌باشد. کارایی این روش در جداسازی نشانگر ریزماهواره بالای ۵۰ درصد می باشد(زان، ۲۰۰۲). روش فیاسکو توسط زان و همکاران (۲۰۰۲) ابداع شد و از آن پس برای جداسازی نشانگر در موجودات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

هدف در این تحقیق شناسایی و جداسازی نشانگرهای ریز ماهواره از سرخدار بومی ایران و نیز استفاده از نشانگرهای شناسایی شده برای بررسی تنوع ژنتیکی سرخدار ایران می باشد.

[4] FIASCO