

الحمد لله الرحمن الرحيم



دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

کارایی رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگر مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های زردآلو

(*Prunus armeniaca* L.)

آناهیتا پنجی

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک - دکتر ناصر فرّخی

اساتید مشاور:

دکتر بابک عبدالهی مندولکانی - دکتر محمد عابدینی اسفهلانی

پایان‌نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

تابستان ۱۳۹۳

این تلاش کوچک را با تمام عشق و اشتیاق به وجود با عظمتشان، تقدیم می کنم به:

مهرباترین پدر و صبورترین مادر، آنانکه توانشان رفت تا به توان برسم و موهانشان سپید کشت تا رویم سپید بماند.

برادر عزیزم، دوست تمام دوران زندگیم

پویندگان علم

و نیز دوستان عزیزم که سخطات زیبای باهم بودنمان، هرگز از یاد نخواهد رفت....

تشکر و قدردانی:

ستایش پرودگار را، که جهان را بر اساس علم و عدل و حکمت آفرید.

نخست از خانواده عزیزم که در سختی ها و دشواری های زندگی، همواره یاری دلسوز و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده اند، صمیمانه قدردانی می نمایم. خالصانه ترین مراتب تشکر خود را محضر اساتید راهنمای کرامت دارم، آقایان دکتر شایخ قریحیک و دکتر ناصر فرخی که بر انگیزه هایم جامه عمل با امید های طلایی پوشاندند و باینده چتر آگاهی بر پهنه ای از زمین سبز علم، فرصت ناب کل شدن در گلستان علم را بر من عطا فرمودند، تقدیم می کنم. بنابر وظیفه خود لازم می دانم از حسن توجه اساتید مشاور، دکتر بابک عبدالمی مندو لکانی و مهندس محمد عبدینی اسفهلانی که با ارائه نظرات ارزشمند خویش به غنای بیشترین پایان نامه کمک شایانی کرده اند، تشکر نمایم. از داوران محترم، خانم دکتر پارسیان و آقای دکتر رضایی که با پیشنهاد های سازنده شان در هر چه بهتر نمودن این پایان نامه کمک کرده اند، صمیمانه سپاسگزارم. همچنین جناب آقای مهندس رحیمی که به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی قدم رنج فرموده و هدایت این جلسه را بر عهده گرفتند قدردانی می نمایم. از مساعدت و همکاری مسئولین محترم بخش اصلاح بذرو نهال مرکز تحقیقات کشاورزی شاهر و کمال تشکر را دارم. در پایان از کارشناس محترم آزمایشگاه مهندس حسین مطهری نژاد و تمام دوستان و عزیزان خانم ها مهندس عصمت اشعار قدیم، مرضیه حسنی، مینا عبدالمی، مسابهرامی و آقای مهندس کشاورز خوب (و سایر عزیزانی که مجال نام بردن از همه آنها نیست) که سختی راه را همواره برای من آسان نمودند کمال تشکر را دارم. موفقیت، سلامت و طول عمر این عزیزان را از خداوند متعال مسئلت دارم.

تعهدنامه

اینجانب **آناهیتا پنجی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **کارایی رتروترانسپوزون ها به عنوان نشانگر مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ- های زردآلو (*Prunus armeniaca*)** تحت راهنمایی آقایان دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر ناصر فرخی متعهد می-شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آن ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

امضای دانشجو:

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

رتروترنسپوزون‌ها فراوان‌ترین و رایج‌ترین عناصر قابل جابجایی در ژنوم یوکاریوت‌ها به‌ویژه گیاهان هستند. توزیع گسترده رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم گیاهان استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانگر مولکولی ایده‌آل ساخته است. در این تحقیق از چندشکلی تکثیر شده نواحی بین رتروترنسپوزون‌ها (IRAP) و چندشکلی تکثیر شده رتروترنسپوزون‌ها و ریزماهواره‌ها (REMAP) برای بررسی سطوح تنوع ژنتیکی و فعالیت رتروترنسپوزون‌های LTR در ۲۳ رقم زردآلو استفاده شد. در این مطالعه از ۱۶ ترکیب پرایمری مورد بررسی، ۹ ترکیب آغازگر بر اساس میزان تشکیل باند، چندشکلی و نیز تکرارپذیری باندها انتخاب شد. ۹ آغازگر مذکور، مجموعاً ۱۶۸ باند تولید کردند که همگی چندشکلی قابل قبولی ایجاد کردند. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۲۶ عدد مربوط به REMAP(LTR6+P9) و کمترین آن ۱۱ و مربوط به پرایمر *LTR10* بود. بیشترین مقدار ضریب شانون و هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به آغازگر *LTR23* از سری آغازگرهای IRAP بود که مبین این است که نشانگر IRAP نسبت به REMAP تنوع بین ارقام مورد مطالعه را بهتر نشان داده است.

واژگان کلیدی: زردآلو، رتروترنسپوزون، تنوع ژنتیکی، REMAP، IRAP، تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی.

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

۱- بهینه سازی استخراج DNA (با خلوص بالا) از نمونه های برگ گیاه زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) هفتمین همایش ملی یافته های پژوهشی کشاورزی- کردستان- اردیبهشت ۱۳۹۳.

آناهیتا پنجی، شاهرخ قرنچیک، ناصر فرخی، بابک عبدالهی مندولکانی، محمد عابدینی اسفهلانی

۲- مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ های زردآلو (*Prunus armeniaca*) با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی IRAP. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار - همدان - شهریور ۱۳۹۳.

آناهیتا پنجی، شاهرخ قرنچیک، ناصر فرخی، بابک عبدالهی مندولکانی، محمد عابدینی اسفهلانی

فصل اول - مقدمه و کلیات.....	۱
۱-۱- ضرورت و هدف انجام تحقیق.....	۲
۲-۱- زردآلو، گیاه‌شناسی و منشاء.....	۳
۳-۱- باغبانی.....	۵
۴-۱- مشخصات درخت زردآلو.....	۶
۵-۱- تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت.....	۷
۱-۵-۱- نشانگرهای مورفولوژیک.....	۸
۲-۵-۱- نشانگرهای پروتئینی.....	۹
۳-۵-۱- نشانگرهای مولکولی.....	۱۰
۱-۳-۵-۱- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA.....	۱۱
۱-۱-۳-۵-۱- نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون.....	۱۲
۲-۱-۳-۵-۱- نشانگرهای مبتنی بر PCR.....	۱۲
۶-۱- رتروترانسپوزون‌ها.....	۱۳
۱-۶-۱- انواع رتروترانسپوزون‌ها.....	۱۴
۱-۱-۶-۱- رتروترانسپوزون‌های واجد LTR.....	۱۴
۱-۱-۱-۴-۱- گروه <i>Ty1-copia</i>	۱۴
۲-۱-۱-۴-۱- گروه <i>Ty3-gypsy</i>	۱۵
۲-۶-۱- چگونگی تکثیر رتروترانسپوزون‌ها.....	۱۶
۳-۶-۱- توزیع رتروترانسپوزون‌ها در کروموزوم.....	۱۸

۱-۶-۴	فراوانی رتروترنسپوزون‌ها در گیاهان نسبت به سایر یوکاریوت‌ها.....	۱۹
۱-۶-۵	رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم اندامک‌ها.....	۱۹
۱-۶-۶	فعالیت رتروترنسپوزون‌ها به‌وسیله استرس‌های زنده و غیر زنده.....	۲۰
۱-۶-۷	مبدأ و تکامل رتروترنسپوزون‌های گیاهی.....	۲۰
۱-۶-۸	نقش و کاربرد رتروترنسپوزون‌ها.....	۲۱
۱-۷	استفاده از رتروترنسپوزون‌ها به عنوان نشانگر مولکولی.....	۲۲
۱-۸	توسعه و کاربرد نشانگرهای رتروترنسپوزونی.....	۲۳
۱-۸-۱	IRAP.....	۲۵
۱-۸-۲	REMAP.....	۲۵
۱-۹	روش‌های آماری تعیین فاصله ژنتیکی.....	۲۶
۱-۹-۱	اندازه‌گیری فواصل و تشابه ژنتیکی.....	۲۶
۱-۹-۲	تجزیه چند متغیره آماری.....	۲۷
۱-۹-۲-۱	تجزیه خوشه‌ای.....	۲۷
۱-۹-۲-۲	ضریب کوفنتیک.....	۲۸
۱-۹-۲-۳	تجزیه به مولفه‌های اصلی.....	۲۹
۱-۹-۳	شاخص شانون.....	۳۰
۱-۹-۴	هتروزیگوسیتی.....	۳۰
	فصل دوم – مروری بر منابع.....	۳۱
۲-۱	مروری بر پژوهش‌های زردآلو.....	۳۲
	فصل سوم – مواد و روش‌ها.....	۳۸

۳-۱- مواد.....	۴۲
۳-۲- تجهیزات	۴۲
۳-۳- استخراج DNA از بافت برگ‌گی به روش CTAB.....	۴۳
۳-۳-۱- مراحل استخراج DNA.....	۴۳
۳-۳-۲- بافر TBE	۴۴
۳-۴- بررسی کمیت و کیفیت DNA	۴۴
۳-۴-۱- بررسی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری.....	۴۴
۳-۴-۲- بررسی کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز.....	۴۴
۳-۵- PCR	۴۵
۳-۵-۱- الگوی دمایی	۴۶
۳-۵-۲- بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز.....	۴۶
۳-۶- تجزیه داده‌ها	۴۷
فصل چهارم – نتایج و بحث	۴۸
۴-۱- تجزیه داده‌های مولکولی	۴۹
۴-۱-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای	۴۹
۴-۱-۲- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP.....	۴۷
۴-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های IRAP.....	۵۱
۴-۱-۴- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر REMAP.....	۵۴
۴-۱-۵- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر REMAP+IRAP.....	۶۰

۶۱ ۴-۲- نتیجه گیری

۶۲ ۴-۳- پیشنهادات

۶۳ منابع

فهرست جداول ذکر شده در پایان نامه

جدول ۱-۳- ارقام زردآلوی مورد مطالعه.....	۴۰
جدول ۲-۳- خصوصیات ارقام مورد بررسی.....	۴۱
جدول ۳-۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده.....	۴۶
جدول ۱-۴- نتایج حاصل از آنالیز IRAP.....	۵۱
جدول ۲-۴- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی IRAP.....	۵۴
جدول ۳-۴- نتایج حاصل از آنالیز REMAP.....	۵۸
جدول ۴-۴- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی REMAP.....	۶۱
جدول ۵-۴- تخمین ضرایب همبستگی کوفنتیک.....	۶۴

فهرست شکل‌ها و نمودارهای قید شده در پایان‌نامه

- شکل ۱-۱- شمای کلی یک رتروترنسپوزون..... ۱۵
- شکل ۲-۱- مراحل مختلف همانندسازی در رتروترنسپوزون‌ها..... ۱۷
- شکل ۳-۱- شکل‌های مختلف نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها..... ۲۲
- شکل ۱-۴- دندروگرام حاصل از داده‌های IRAP برای ارقام مورد مطالعه..... ۴۹
- شکل ۲-۴- الگوی باندی IRAP..... ۵۰
- شکل ۳-۴- پلات تجزیه مولفه‌های اصلی نشانگر IRAP..... ۵۲
- شکل ۴-۴- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های IRAP..... ۵۳
- شکل ۵-۴- دندروگرام حاصل از داده‌های REMAP..... ۵۶
- شکل ۶-۴- الگوی باندی حاصل از نشانگر REMAP..... ۵۷
- شکل ۷-۴- دندروگرام حاصل از نشانگر IRAP+ REMAP..... ۵۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- ضرورت و هدف انجام تحقیق

براساس اطلاعات سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (F.A.O) تولید جهانی زردآلو در سال ۲۰۱۱، ۲۴۷۳۵۴۳ تن بوده که ایران با ۵۰۱۷۷ هکتار اراضی زیر کشت زردآلو و تولید ۴۵۲۹۸۸ تن، بعد از کشور ترکیه مقام دوم را در جهان به خود اختصاص داده است.

ژرم پلاسما زردآلوهای ایرانی یک جمعیت ژنتیکی غنی است. هاف و بیلی (۱۹۷۵)^۱ گزارش کردند که ایران به عنوان یکی از مراکز تنوع زردآلوهای وحشی و اهلی است. در گذشته اغلب درختان زردآلو در ایران به وسیله بذر تکثیر شده‌اند، بنابراین تنوع ژنتیکی بالایی در زردآلوی ایران وجود دارد (Arzani et al., 2005). به دلیل آسانی در دورگ گیری بین گونه‌ای، طبقه‌بندی گیاه‌شناسی گونه‌ها در داخل جنس *Prunus* دشوار شده است، بنابراین تنوع بین گونه‌ای قابل توجهی در صفات رویشی، به ویژه بخش برگ و میوه وجود دارد که تشخیص ژنوتیپ‌ها تنها بر اساس صفات مورفولوژیکی خارجی‌شان را مشکل می‌کند (Casas et al., 1999). اغلب رقم‌های امروزی زردآلوهای کشت شده به وسیله گزینش تصادفی به دست آمده‌اند. به علاوه، اهدافی مثل تولید میوه خوب برای خشک کردن، عادت دیرگلدهی، سازگاری به مناطق مختلف، طولانی کردن فصل رسیدگی میوه، سازگاری محلی و استفاده از گزینش‌های سازگار شده محلی به عنوان عوامل اصلی اصلاحی برای زردآلوه‌ها مورد رسیدگی و بررسی قرار گرفته‌اند (Balta et al., 2002). براساس صفات مورفولوژیکی و خصوصیات پومولوژیکی، اغلب زردآلوهای کشت شده به یک گونه *P. armeniaca* نسبت داده شده‌اند. تعیین هویت و طبقه‌بندی رقم‌های زردآلو به خاطر داشتن اسامی فراوان و یکسان پیچیده است. احتمالاً چندین رقم به وسیله اسامی یکسانی شناخته شده‌اند که با هم متفاوتند یا رقم‌های یکسان که اسامی متفاوتی در نواحی محیطی مختلف دارند با نام‌های مختلف شناخته می‌شوند (Zhebentyayeva et al., 2000).

۱- Bailey and Hough

بررسی تنوع ژرمپلاسسم زردآلو در ایران به کمک نشانگرهای ژنتیکی می‌تواند قدم اولیه و بسیار مهم در راستای بهبود ژنتیکی و پرورش آن در ایران باشد. نشانگرهای مورفولوژیک که مبتنی بر خصوصیات ظاهری و ویژگی‌های رشد و نمو و فنولوژیکی هستند، همواره اهمیت زیادی در ارزیابی ذخایر ژنتیکی داشته‌اند.

سازگاری اقلیمی، افزایش کیفیت میوه، خودسازگاری و مقاومت به بیماری‌ها از مهمترین اهداف اصلاحی زردآلو می‌باشند (Hormaza et al., 2007). در سال‌های اخیر در ارتباط با دو هدف مهم اصلاحی در زردآلو توجه بیشتری به وجود آمده است. هدف اول معرفی و توسعه ارقامی است که قابلیت کشت در مناطق گسترده‌تری را داشته باشند، چرا که بیشتر ارقام زردآلو مختص مناطق اکولوژیکی خاص هستند (Layne et al., 1996) و در نتیجه تولید تجاری محدود به مناطق خاصی است که معمولاً یک یا دو رقم بخش زیادی از تولید را به خود اختصاص داده است. هدف اصلاحی دیگر که در کشورهای حوزه مدیترانه، که ۵۰٪ از تولید جهانی زردآلو را این منطقه به خود اختصاص داده است، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است مقاومت به ویروس آبله آلو (*plum pox virus*) است (Hormaza et al., 2007). این برنامه‌های اصلاحی و توسعه ارقام جدید نیازمند روش‌های سریع و مطمئن برای ارزیابی تنوع موجود در ژرمپلاسسم و حفاظت از ارقام معرفی شده است (Badenez et al., 1998).

۱-۲- زردآلو، گیاه‌شناسی و منشاء

زردآلو از محصولات مهم سردرختی مناطق معتدله در ایران بالاخص در استان‌هایی نظیر آذربایجان شرقی، تهران و سمنان می‌باشد. سابقه کشت و کار این محصول و تولید محصولات خشکباری و جنبه‌های صادراتی آن، جایگاه این محصول را در ایران روشن می‌سازد. اهمیت اقتصادی این محصول در کشور به-

گونه‌ای است که در برخی از شهرها به عنوان محصولی زودرس با ارزش اقتصادی و درآمدزایی بالا کشت و کار می‌گردد (Dejampoor., 2006).

زردآلو جایگاهی بین آلو و هلو دارد و قابلیت پیوند و تلاقی با هر دو گونه را دارا می‌باشد. بیش از ۱۷ قرن زردآلوه‌ها به عنوان فرم هلوی زودرس مطرح بودند. امروزه زردآلو را متعلق به تیره Rosaceae، زیر تیره Prunoideae، سرده Prunus L.، زیر سرده Prunophora (Neck.) Focke و بخش Armeniaca (Mill.) Koch می‌دانند.

در حال حاضر گونه‌های شناخته شده در سرده *Prunus* عبارتند از:

P. holocericea، *P. dasycarpa*، *P. mume*، *P. brigantica*، *P. armeniaca* موجودیت *P. holocericea* هنوز مورد سوال است و *P. brigantica* ممکن است متعلق به آلوها باشد (Hormaza, 2002).

تاریخ زردآلو به حداقل ۵۰۰۰ سال در چین و ۲۰۰۰ سال در جهان غرب بر می‌گردد. بر اساس گزارش منتسب به امپراتور یو (۲۱۹۸-۲۱۰۵ قبل از میلاد) زردآلو در زمان او در چین کشت می‌شده است. زردآلوی زراعی را در سه مرکز پیدایش اصلی

مرکز چینی: (از شمال شرقی، مرکز و جنوب چین تا ایالت گانسو و شمال شرقی تبت)،

مرکز آسیای مرکزی: (ناحیه کوهستانی که از جنوب تین-شان، هندوکش تا کشمیر گسترده شده است و شامل افغانستان، تاجیکستان و ازبکستان می‌باشد) و

مرکز آسیای صغیر، (کوه‌های شمال شرقی ایران تا قفقاز و ترکیه مرکزی و ترکمنستان) قرار می‌دهند (Vavilov., 1951).

۱-۳- باغبانی

درصد زیادی از زردآلوهای وحشی جهان گوشت نازک دارند و به همین دلیل میوه آنها خوراکی نیست و تنها بذر آنها مصرف می‌شود. در مقابل برخی دیگر دارای گوشتی ضخیم با میوه لذیذ هستند که رنگ، غلظت و استحکام بافت میوه با شکل آن تغییر می‌کند. به علت ویژگی‌های متغیر میوه، انواع زردآلو از نقطه نظر باغبانی نیز در چهار گروه

Dasycarpa: (میوه بلند قرمز، دانه تلخ، برگ نوکدار بلند)،

Alberga: (میوه زرد کوچک، زودرس، دانه تلخ)،

Chrisomera: (میوه بزرگ زرد رنگ با لکه‌های قرمز، دانه تلخ، برگ‌های بزرگ) و

Marilla: (تقریباً شبیه *Chrisomera* با دانه شیرین) طبقه‌بندی شده‌اند.

طبقه‌بندی دیگر توسط کوستینا (۱۹۷۰)، زردآلو را به ۵ گروه بذر تلخ یا شیرین، پوست میوه صاف یا کرکدار، میوه هسته آزاد یا هسته چسبیده، گوشت میوه سفید تا کرم رنگ یا زرد تا پرتقالی و اندازه میوه، کوچک، متوسط یا بزرگ طبقه‌بندی شده و بر این اساس ۴۸ ترکیب پایه را شناسایی نمود. از آنجایی که طبقه‌بندی بر اساس خصوصیات میوه، محققان باغبانی را ناامید نمود، سعی شد زردآلوها را بر اساس برگ طبقه‌بندی کنند. تفاوت‌های بزرگتری بر اساس برگ‌ها در مقایسه با میوه‌ها به دست آمد. (Hurtado et al., 2002).

۱-۴- مشخصات درخت زردآلو

زردآلو (۲n=۱۶) درختی خزان‌کننده است که تا ارتفاع ۱۵-۱۰ متر رشد می‌کند. زردآلو به خشکی و در صورت خواب به سرمای سخت زمستان مقاومت نشان می‌دهد. پوست تنه قهوه‌ای تیره و ناصاف و در

رشد جدید صاف‌تر و به رنگ قهوه‌ای روشن، غالباً با انتهای قرمز و لکه‌های سفید ظاهر می‌شود. گل‌ها که قبل از برگ‌ها ظاهر می‌گردند، سفید یا صورتی رنگ، منفرد یا پنج کاسبرگ و گلبرگ منظم و تعدادی پرچم می‌باشند. برگ‌ها صاف، بزرگ، نسبتاً گرد، با یک نوک در راس و حاشیه‌ای صاف هستند. دمبرگ ۳-۱ سانتی‌متر طول و غالباً انتهای آن قرمز می‌باشد (Sánchez-Pérez et al., 2006).

در هر گره یک شاخه یکساله زردآلو، معمولاً سه جوانه در محور برگ رشد می‌کند. جوانه وسطی رویشی و دو جوانه کناری، جوانه‌های گل هستند. تعداد جوانه گل موجود در هر واحد رشد یا در هر گره، بسته به رقم متفاوت می‌باشد. واحدهای ثانویه رشد طولی (که بعد از برداشت تشکیل می‌شود) تعداد گل بیشتری نسبت به واحدهای اولیه رشد طولی (که طی گلدهی و میوه‌دهی ایجاد می‌شود) تولید می‌کنند و احتمال تبدیل یک گل به میوه در واحدهای ثانویه رشد بیشتر می‌باشد. به عبارت دیگر شیب تعداد گل‌ها در شاخه‌های بلند از پایین به سمت نوک شاخه افزایش و گل‌ها به صورت تدریجی در جهتی مشابه باز می‌شوند. زمان گلدهی زردآلو به رقم و تعداد ساعات سرمای بین صفر و ۷ درجه سانتی‌گراد در طی فصل خواب بستگی دارد و طول مدت گلدهی با توجه به رقم و شرایط جوی تغییر می‌کند. (Faust et al., 1998).

۱-۵- تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها

به غیر یکنواختی ساختار ژنوتیپی جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی گفته می‌شود. این غیر یکنواختی باعث واکنش‌های متفاوت جمعیت‌ها در محیط‌های مختلف می‌شود و توانایی زنده‌مانی و سازگاری جمعیت در مقابل شرایط نامساعد را افزایش می‌دهد. تنوع ژنتیکی لازمه برنامه‌های به‌نژادی گیاهی است و ماده اولیه مطالعات ژنتیک جمعیت، تکامل و فیلوژنتیک می‌باشد. همچنین تعیین سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی، اطلاعات مفیدی برای برنامه‌های اصلاحی آن‌ها فراهم می‌کند (Mehlenbacher SA et al., 1991). علاوه بر این در مدیریت و حفاظت گونه‌ها، اطلاع از تنوع ژنتیکی ضروری است. یکنواختی ژنتیکی در

گیاهان باعث آسیب‌پذیری آن‌ها در برابر اپیدمی‌ها و عوامل نامساعد محیطی می‌شود که در نتیجه باعث کاهش و افت عملکرد می‌گردد. همچنین شناسایی روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و افراد امکان شناسایی ژن‌های عامل تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را از خویشاوندان وحشی فراهم می‌کند. بنابراین شرط لازم برای اصلاح و بهبود صفات گیاهی مهم، شناخت ساختار ژنتیکی مجموعه ژرم‌پلاسماست (Wang et al., 2007).

در فرآیند مطالعه تنوع ژنتیکی 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. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونه‌های گیاهی می‌تواند اطلاعات اساسی برای برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت منابع ژنتیکی فراهم کند. برای انتخاب والدین جهت انجام تلاقی‌های مطلوب و انتخاب روش‌های اصلاحی مناسب نیز اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها الزامی است (Kumar et al., 1999).

هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم‌های آنهاست که به نتاج نیز منتقل می‌شود. حتی صفاتی که تحت تأثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می‌کنند، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیک به کار گرفته شوند. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسان‌های نخستین، حتی آن‌هایی که هنوز کشاورزی را فرانگرفته بودند و برای ادامه زندگی مجبور به جمع‌آوری بذر و میوه گیاهان بودند، بدون آنکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناختن و تمایز انواع بذر، میوه و جانوران وحشی استفاده کرده و برخی را بر برخی دیگر ترجیح می‌دادند. اما به-

صورت علمی، شاید مندل نخستین کسی بود که از نشانگرهای مورفولوژیک یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ^۱ برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۵-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

خصوصیات مورفولوژیکی از جمله اولین نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده در ارزیابی تنوع بین و میان جمعیت‌ها به شمار می‌آید. آن دسته از صفات مورفولوژیکی که تنها یک مکان ژنتیکی کنترل می‌شوند ممکن است به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا تظاهر این دسته از صفات حتی در شرایط محیطی متفاوت نیز نسبتاً ثابت است (Kumar., Bennetzen, 1999). ارزیابی این صفات معمولاً کم‌هزینه و آسان است اما عوامل متعددی با نشانگرهای مورفولوژیکی مرتبط هستند. اولین عامل وابستگی بالای این صفات به شرایط محیطی است. اغلب شرایطی که گیاهان در آن رشد می‌کنند، می‌تواند تظاهر این نشانگرها را تحت تاثیر قرار داده و منجر به ارزیابی‌های نادرست شود. علاوه بر شرایط محیطی تظاهر این نشانگرها به وسیله برهم‌کنش‌های ناشی از اپیستازی و پلیوتروپی تغییر کرده و در مورد صفات کمی نیز به وسیله ژن‌های متعددی کنترل می‌شوند. در مجموع در صورتی که این صفات از توارث‌پذیری بالایی برخوردار باشند نشانگرهای مورفولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی به شمار می‌آید، زیرا توارث این صفات می‌تواند بدون نیاز به روش‌ها و تکنیک‌های پیشرفته مانند تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شود (Staub., Sequen, 1996).

^۱ - Phenotype based markers

۱-۵-۲- نشانگرهای پروتئینی

نشانگرهای پروتئینی محصول نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع بازتابی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم هستند. آلل‌های گوناگون ژن‌ها ممکن است پروتئین‌هایی با ترکیبات اسیدآمینه‌ای مختلف تولید کنند که به راحتی از طریق الکتروفورز روی ژل از یکدیگر جدا شده و شناسایی می‌شوند و بنابراین می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی از آنها استفاده کرد. از آن جایی که محصولات از روی قسمتی از توالی DNA ساخته می‌شوند، لذا در برگیرنده همه تغییرات در تنوع ژنتیکی در سطح DNA نیستند و نمی‌توانند نماینده کل ژنوم باشند (گروسی و وجدانی، ۱۳۷۱).

معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی، آیزوایم‌ها هستند که فرم‌های مختلف یک آنزیم را نشان می‌دهند. نشانگرهای پروتئین، تفاوت‌ها را در سطح ردیف و عمل ژن و به صورت نشانگرهای هم‌بارز نشان می‌دهند. از معایب این نشانگرها محدود بودن آنهاست. همچنین این نشانگرها تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه بوده و تظاهر کمی برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تحت تاثیر مرحله رشد گیاه قرار می‌گیرد. از آنجا که فراوانی این نوع از نشانگرها محدود است، از این‌رو نقشه‌های تهیه شده از این نشانگرها طوری بود که فقط چند نشانگر در یک کروموزوم قرار می‌گرفتند. بنابراین نشانگرهای پروتئینی نیز معایب ویژه خود را دارند. با توجه به اینکه روش‌های رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در مورد آیزوایم‌ها چندان زیاد نیست، آیزوایم‌های قابل ثبت و مشاهده که می‌توان از آنها به عنوان نشانگر استفاده کرد، به یک‌صد عدد هم نمی‌رسد. محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوایم، از عمده‌ترین معایب آنها بوده و موجب کاهش کارایی آنها می‌شود. از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آیزوایم‌هاست. به عبارت دیگر، آیزوایم‌ها نه تنها کم هستند، بلکه چندشکلی و تفاوت قابل ثبت در آنها چندان زیاد نیست. پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزی آیزوایم‌ها نیز که گاهی مشاهده شده است، از دیگر معایب این قبیل

نشانگرهاست. این پیچیدگی که به دلیل دخیل بودن آنزیم‌های مرکب از چند پلی‌پپتید مستقل، در ترکیب برخی از آیزوزایم‌هاست، امتیاز بندی را دشوار می‌کند (دشتی، ۱۳۷۹).

۱-۵-۳- نشانگرهای مولکولی

با وجود اینکه بهره‌مندی از علم ژنتیک و اصلاح نباتات، بیشترین نقش را در افزایش محصول و تولید فراآورده‌های غذایی به عهده داشته است ولی به دلیل رشد روزافزون جمعیت، برای چیرگی بر شرایط نامساعد محیطی (اعم از عوامل زیستی و غیرزیستی) و افزایش کیفیت محصول تلاش بیشتری لازم است. پیشرفت علوم و فناوری موجب بهره‌مندی متخصصان اصلاح‌نباتات از ماشین‌های پیشرفته‌ی کشاورزی، ابزار دقیق آزمایشگاهی، روش‌های برتر جمع‌آوری اطلاعات و تجزیه و تحلیل رایانه‌ای آنها شده است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های تحسین‌برانگیزی که در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته است، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش‌های ژنتیک تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای DNA باشند که همان تفاوت-های قابل ثبت ردیف‌های بازی DNA موجود بین دو یا چند نمونه‌اند. امروزه اطلاعات به‌دست آمده از نشانگرهای DNA کاربردهای زیادی دارند، که عمده‌ترین آن‌ها در پزشکی قانونی، تشخیص بیماری‌های گیاهی و انسانی، قرنطینه گیاهی، پژوهش‌های ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح‌نباتات است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۵-۳-۱- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA

نشانگرهای مولکولی مکان‌های خاصی در DNA هستند که توارث موجود در سطح ژنوم را آشکار می‌کنند. این نشانگرها ممکن است با ژن یا ژن‌های کنترل کننده صفات، پیوسته یا ناپیوسته باشند (Agrawal et al., 2008). نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی چندین مزیت دارند: آن‌ها پایدارند و به سن، بافت، و مرحله رشدی گیاه، وابسته نیستند، تمام قسمت‌های ژنوم را پوشش می‌دهند

(اگزون‌ها، اینترون‌ها و نواحی تنظیم‌کننده)، همچنین تحت تاثیر محیط، اثرات غالبیت، اپیستازی و پلیوتروپی قرار نمی‌گیرند. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی معرفی شده‌اند و در تجزیه‌های ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند درجه چند-شکلی، غالب یا هم‌بارز بودن، تعداد جایگاه‌های تجزیه شده در آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرار-پذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی DNA و هزینه مورد نیاز از یکدیگر متفاوت‌اند. انتخاب بهترین نشانگر به هدف مطالعه (انگشت‌نگاری، تهیه نقشه‌ی پیوستگی، ژنتیک جمعیت و روابط تکاملی) و سطح پلئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۷).

نشانگرهای مولکولی بر اساس آشکارسازی چندشکلی موجود در بین اسیدهای نوکلئیک افراد مختلف عمل می‌کنند. این تفاوت‌ها شامل پدیده‌های حذف، اضافه، جابجایی، دو برابر شدن و جهش‌های نقطه‌ای است و تنها ژن‌های خاص و فعال را شامل نمی‌شود (Agarwal et al., 2008).

روش‌های مختلف مورد استفاده شامل هضم و هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک، روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و یا ترکیبی از این دو روش هستند. به علاوه روش‌های مختلف نشانگری می‌توانند یک یا چند مکان ژنومی را مورد بررسی قرار دهند. به طوری که نشانگرهای چندمکانی قادرند به طور همزمان چندین مکان ژنومی را مورد ارزیابی قرار دهند. بنابراین، امکان تشخیص حضور یا عدم حضور باند برای هر مکان وجود دارد ولی امکان تشخیص حالت‌های هتروزیگوت برای آلل‌های مشابه وجود ندارد. در حالی که نشانگرهای یک‌مکانی از کاوش‌گرها یا آغازگرهای ویژه برای مکان‌های ژنی استفاده می‌کنند و قادر به تکثیر یا دورگ‌گیری DNA با توالی‌های شناخته شده هستند. این نشانگرها را نشانگرهای هم‌بارز می‌نامند که امکان تشخیص مکان‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را می‌دهند (Mondini et al., 2009). روش‌های نشانگری پایه را می‌توان به دو دسته روش‌های غیر مبتنی بر PCR یا روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون و روش‌های مبتنی بر PCR تقسیم کرد (Agrawal et al., 2008).

۱-۵-۳-۱- نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون

روش‌های مولکولی مبتنی بر هیبریداسیون از اولین نشانگرهایی بودند که در مطالعات گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. چندشکلی طولی قطعات برش یافته (RFLP)^۱ و تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری (VNTR)^۲، نمونه‌هایی از نشانگرهای مبتنی بر هضم و هیبریداسیون هستند. این نشانگرها دارای چند-شکلی نسبتاً زیادی می‌باشند، توارث هم‌بارز داشته و تکرارپذیری بالایی نشان می‌دهند. با این وجود به دلیل وقت‌گیر بودن، نیاز به مواد رادیواکتیو، گرانی قیمت و سمی و نیاز به DNA با کیفیت بالا به طور وسیع مورد استفاده واقع نمی‌شوند. این محدودیت‌ها سبب شده است که روش‌هایی با پیچیدگی کمتر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند (Mondini et al., 2009).

۱-۵-۳-۲- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

پس از کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط Mullis و همکارانش (۱۹۸۷) نشانگرهای زیادی توسعه پیدا کردند. این تکنیک شامل تکثیر چندین قطعه DNA مجزا است که توالی‌های اطراف آنها بسیار مشابه آغازگر می‌باشد، این نواحی باید به قدر کافی به یکدیگر نزدیک باشند تا تکثیر انجام گیرد (Mondini et al., 2009).

اخیراً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها معرفی شده‌اند که به علت گستردگی، داشتن توالی‌های حفاظت شده، تولید چندشکلی‌های جدید و پایدار و پوشش ژنومی وسیع در کروموزوم-های گیاهی، استفاده از آن‌ها را برای انجام مطالعات مختلف مانند بررسی تنوع ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، انگشتنگاری ژنوتیپ‌ها، تعیین روابط تکاملی و تعیین نقشه‌های پیوستگی بسیار ایده‌آل می‌سازد (Sabot and Scholman., 2007).

1- Restriction Fragment Length Polymorphism
2- Variable Number Tandem Repeat

۱-۶- رتروترانسپوزون‌ها

DNA تکراری بخش اعظم DNA هسته‌ای گیاهان عالی را تشکیل می‌دهد و بر اساس سازماندهی آن به زیرگروه‌هایی تقسیم می‌گردد. DNAهای تکراری پشت سر هم که شامل، ماهوارک‌ها، ماهواره‌ها و ریز-ماهواره‌ها است. گروه دوم شامل DNAهای تکراری پراکنده در سراسر ژنوم می‌باشد. اکثریت این توالی‌های پراکنده، عناصر جابجا شونده هستند که بر اساس نحوه انتقال به ۲ گروه اصلی تقسیم می‌شوند. عناصر جابجا شونده گروه اول شامل رتروترانسپوزون‌ها و دیگر رتروالمنت‌ها هستند، که ابتدا در ژنوم جانوران و مخمر مشاهده شدند. جابجایی آن‌ها توسط یک RNA حدواسط و ساخته شدن DNA مکمل با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و درج مجدد در ژنوم رخ می‌دهد. عناصر گروه دوم به صورت نسخه‌های DNA جابجا می‌شوند و شامل ترانسپوزون‌هایی مانند Ac/Dc، En/spm، Mu و ... می‌باشند. ترانسپوزون‌هایی کوتاه‌تر مانند MITEsها بیشتر شبیه ترانسپوزون‌های غیر خود جابجا شونده هستند. گزارش شده است که رتروترانسپوزون‌ها در تکامل گیاهان نقش دارند و امروزه از آن‌ها به عنوان نشانگرهای DNA برای کاربردهای مختلف استفاده می‌شوند. (Kumar et al., 1999; Lodish et al., 2003).

۱-۶-۱ انواع رتروترانسپوزون‌ها

از لحاظ ساختاری، رتروترانسپوزون‌ها به دو گروه رتروترانسپوزون‌های واجد LTR^۲ و فاقد LTR تقسیم می‌شوند. رتروترانسپوزون‌های واجد LTR شامل *Ty1-copia* و *Ty3-gypsy* هستند و در کلیه رتروترانسپوزون‌های فاقد LTR به دو دسته LINEs^۳ و SINEs^۴ تقسیم می‌شوند که LINEها در ژنوم

۱- Retrotransposons

2-Long Terminal Repeat

3-Long interspersed repetitive elements

4- Short interspersed repetitive elements

کلیه گیاهان وجود دارند اما SINE ها در معدودی از نهاندانگان و بازدانگان یافت می‌شوند (Lander et al., 2001, SanMiguel.,1998).

۱-۱-۶-۱- رتروترانسپوزون‌های واجد LTR

به‌طوریکه از نامشان مشخص است، دو انتهای رتروترانسپوزون‌ها با LTR احاطه شده است که تاثیر زیادی در ترکیب و درج رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم دارد. این توالی بین ۱۰۰ جفت باز تا یک کیلو باز طول دارد. این توالی‌های LTR هیچ پروتئینی را رمز نمی‌کنند، بلکه دارای توالی شروع و خاتمه جهت نسخه برداری رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد.

۱-۱-۶-۱-۱- گروه *Ty1-copia*

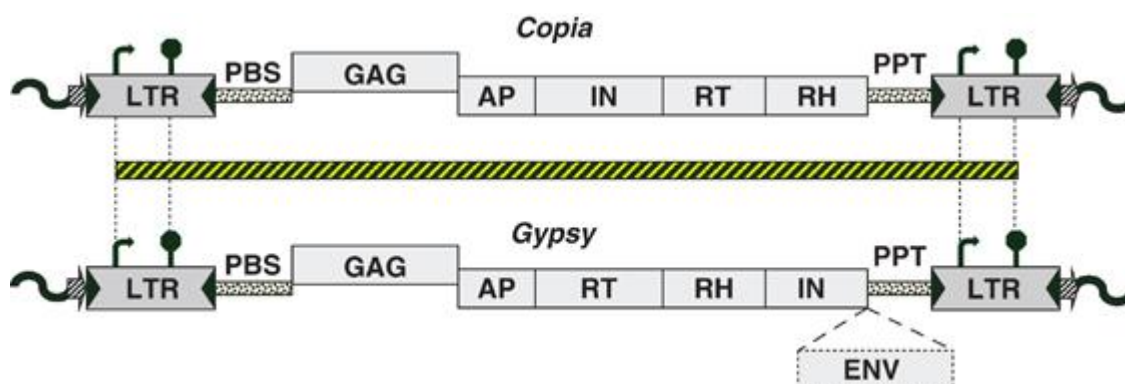
این رتروترانسپوزون‌ها به یک توالی معکوس کوتاه ختم می‌شوند که معمولاً به صورت 5'-TG-3' و 5' CA-3' هستند و دارای سه چارچوب قرائت آزاد gag، pol و Int می‌باشند. این ژن‌ها و پروتئین‌های آن‌ها همگی محصول یک مولکول mRNA هستند. بدین ترتیب که پروتئین‌های رمز شده توسط این ژن‌ها به صورت یک پلی‌پروتئین هستند و این پلی‌پروتئین توسط یک پروتئاز رمز شده توسط توالی pol شکسته می‌شود. ژن gag پروتئینی را رمز می‌کند که هم در تمایز ژن pol موثر بوده و همچنین یک آنزیم رونویسی کننده معکوس برای همانندسازی رتروترانسپوزون‌ها را رمز می‌نماید. این آنزیم همچنین نقش ریبونوکلازای (RNAaseH) را دارد که باعث تجزیه RNA در زمان تولید cDNA می‌شود. ژن Int پروتئینی را رمز می‌کند که به cDNA حاصل از رتروترانسپوزون‌ها در عمل الحاق به ژنوم کمک می‌نماید. در برخی مواقع پروتئین‌های Int، gag و pol در یک چارچوب قرائت ترجمه‌ای^۱ (TRF) رمز می‌شوند. اما برخی مواقع دو یا بیشتر از دو چارچوب وجود دارد که در چارچوب و آغاز ترجمه تغییر ایجاد می‌کند و این

۱- Translational reading frame

تغییر باعث ایجاد اختلاف در بیان ژن‌های مختلف یک رتروترنسپوزون واحد خواهد شد. رتروترنسپوزون-های واجد LTR ابتدا در هسته به صورت mRNA نسخه‌برداری شده و سپس برای انتقال به نقاط دیگر ژنوم به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌گردند. این رتروترنسپوزون‌ها درصد بالایی از ژنوم را به خود اختصاص داده‌اند (Kumar et al., 1999).

۱-۶-۱-۱-۲- گروه Ty3- gypsy

این گروه بسیار شبیه گروه اول است و تفاوت اساسی آن‌ها در ترتیب ژن‌های pol و Int می‌باشد. اغلب شبیه به رتروویروس‌ها می‌باشند و مقایسه توالی آنزیم رونویسی معکوس نشان داد که این گروه از رتروترنسپوزون‌های دارای LTR از منشا رتروویروس‌های جانوری هستند و در واقع رتروویروس‌ها از این رتروترنسپوزون‌ها با تکامل کسب ژن env (envelope) که پوشش پروتئینی ویروس را ایجاد می‌کند، به-وجود آمده‌اند (Kumar et al., 1999).



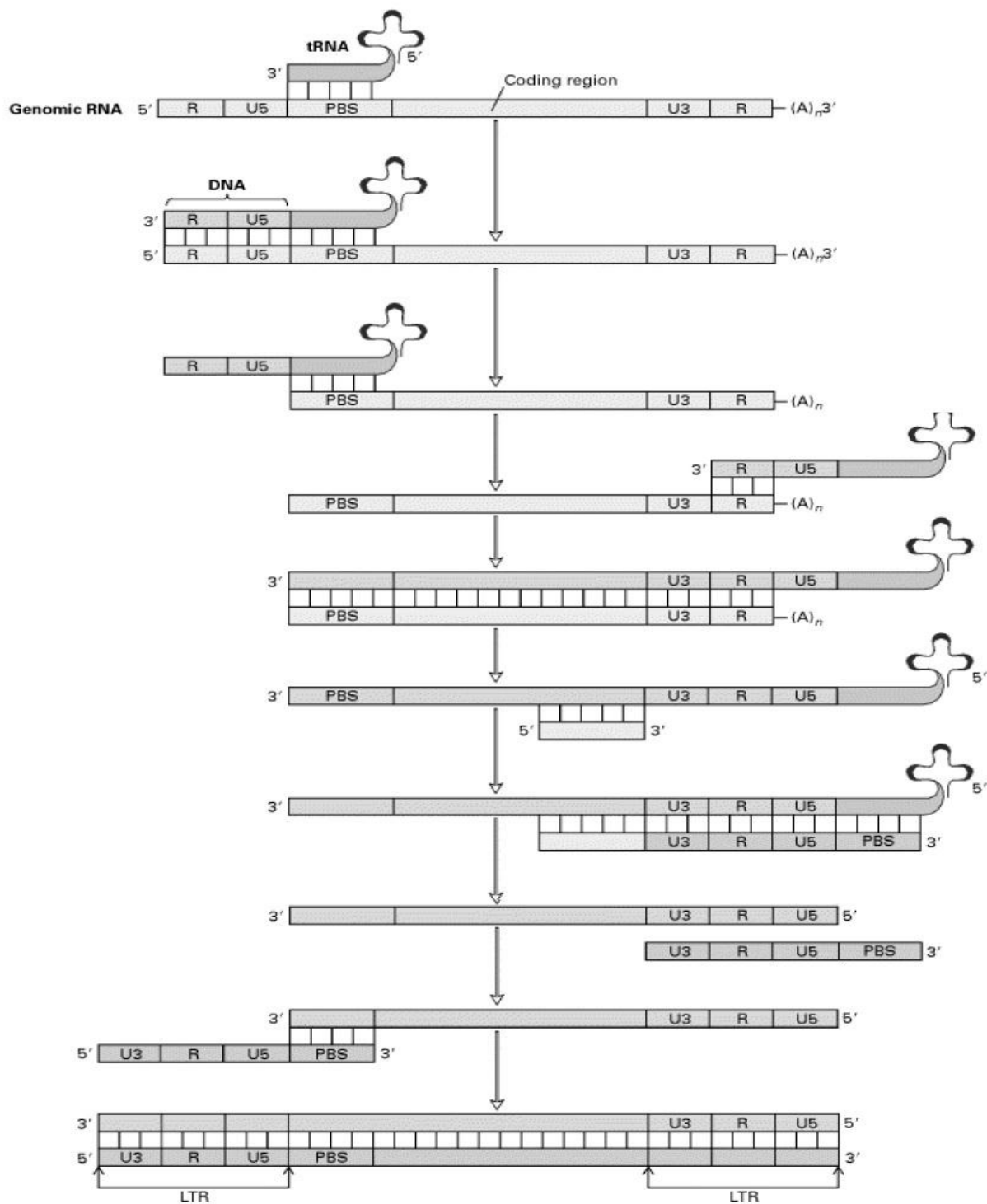
شکل ۱-۱- شمای کلی یک رتروترنسپوزون (Kuykeundall, D., 2009).

۱-۶-۲- چگونگی تکثیر رتروترانسپوزون‌ها

همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شد ابتدا مولکول mRNA توسط آنزیم پلیمراز II از DNA رتروترانسپوزون تولید می‌شود، که این مولکول mRNA دارای نواحی ذیل می‌باشد: 3'-PPT-U₃-R- - ناحیه کد شونده - 5-R-U₅-PBS، سپس یک مولکول tRNA^۱ از سلول میزبان که قسمت انتهایی 3' آن مکمل ناحیه PBS در قسمت انتهایی 5' mRNA رتروترانسپوزون است به آنجا متصل می‌گردد.

بعد از آن آنزیم رونویسی کننده معکوس با عمل پلیمرازی خود، قسمت مکمل U₅ و R در انتهایی 5' رتروترانسپوزون را به 3-OH انتهایی tRNA می‌افزاید. بعداً این آنزیم با فعالیت ریبونوکلازی خود قسمت RNA مکمل را هضم می‌کند و در مرحله بعد ترکیب tRNA - 3'-U₅-R به ناحیه 3' رتروترانسپوزون (mRNA) منتقل می‌شود و از طریق توالی R موجود در 3' رتروترانسپوزون به آنجا متصل می‌شود و آنزیم رونویسی کننده معکوس با استفاده از انتهایی 3' ناحیه mRNA به عنوان آغازگر، ناحیه مکمل DNA تازه سنتز شده‌ی متصل به tRNA یعنی U₅، R و U₃ را سنتز می‌نماید.

۱- transfer RNA (tRNA)



شکل ۱-۲: مراحل مختلف همانندسازی در رتروترانسپوزون‌ها، توضیح کامل در قسمت ۱-۶-۲،

(رشیدی منفرد و همکاران، ۲۰۰۸).

در واقع این عمل همراه با هضم RNA مکمل می‌باشد. یعنی اینکه همانندسازی در دو جهت ادامه پیدا می‌کند. در مرحله بعد tRNA از DNA جدا می‌شود و سپس قطعه‌ی کوتاه DNA که دارای توالی -های PBS، U₅، R و U₃ است به ناحیه 3' DNA تازه سنتز شده از طریق توالی PBS خود که مکمل انتهای 3' DNA است، متصل می‌گردد. سپس آنزیم رونویسی کننده معکوس، DNA مکمل این قطعه را به انتهای 3' DNA که تازه سنتز شد، می‌افزاید و بعد به انتها 3' این قطعه DNA مکمل را افزوده و رتروترانسپوزون تکمیل می‌گردد. بعد از این DNA دو رشته‌ای، توسط آنزیم اینتگراز که رشته DNA هدف را به صورت اریب برش داده الحاق می‌یابد و همین برش اریب باعث تشکیل توالی‌های تکراری مستقیم در دو انتهای رتروترانسپوزون می‌شود. طول این توالی تکراری مستقیم بین ۳ الی ۵ نوکلئوتید می‌باشد.

۱-۶-۳- توزیع رتروترانسپوزون‌ها در کروموزوم

در بسیاری از موارد رتروترانسپوزون‌ها در سراسر کروموزوم گیاهان پخش شده‌اند. البته هر گروه رتروترانسپوزون‌ها خانواده‌ای داشته که در نقاط خاصی از ژنوم تجمع پیدا کرده و در نقاط دیگری از کروموزوم در ژنوم وجود ندارند. رتروترانسپوزون‌ها در نواحی سازماندهنده‌های هستکی در گیاهان وجود ندارند. بسیاری از رتروترانسپوزون‌ها به صورت ترجیحی در نواحی یوکروماتینی که اکثر ژن‌های گیاهان وجود دارند، قرار گرفته‌اند. تجزیه و تحلیل توالی کلون‌های ژنومی بزرگ در ذرت نشان داد که این رتروترانسپوزون‌های یوکروماتینی اکثراً در نواحی بین ژنی هستند. همچنین نتایج حاصل از هیبریداسیون در محل (In Situ Hybridization) کروموزوم‌های متافاز و پروفاز نشان داد که *Ty1-copia* در سراسر

نواحی یوکروماتینی توزیع گردیده‌اند و گاهی اوقات این توزیع یکنواخت و گاهی غیر یکنواخت بوده که بستگی به گونه گیاهی دارد (Antonio et al., 2005).

۱-۶-۴- فراوانی رتروترنسپوزون‌ها در گیاهان نسبت به دیگر یوکاریوت‌ها

اندازه ژنوم گیاهان، با میزان کل رتروترنسپوزون‌ها و تعداد خانواده‌های رتروترنسپوزونی موجود در ژنوم همبستگی دارد. برای مثال ساکارومایسس دارای ۵ خانواده رتروترنسپوزونی LTR است که حدود ۳٪ کل ژنوم را به خود اختصاص داده است. در آرابیدوپسیس هم رتروترنسپوزون‌های واجد LTR که شامل *Ty1-copia* و *Ty3- gypsy* و هم رتروترنسپوزون‌های فاقد LTR که عناصر LINE می‌باشد، وجود دارد. در مجموع ۱۰-۴٪ کل ژنوم را به خود اختصاص داده در حالی که در ذرت هزاران خانواده مختلف رتروترنسپوزون‌های LTR دار و فاقد LTR وجود دارد که حدود ۸۵-۵۰٪ کل ژنوم این گیاه را به خود اختصاص داده که در گندم این میزان به ۹۰٪ هم می‌رسد. در ژنوم اکثر پستانداران مانند ژنوم انسان SINE و LINEها عناصر اصلی متحرک می‌باشند که چیزی حدود ۳۵٪ کل ژنوم را تشکیل داده‌اند. ژنوم گیاهان هم از لحاظ تنوع و هم از لحاظ فراوانی رتروترنسپوزون‌ها با جانوران فرق داشته و در ژنوم گیاهان بر خلاف ژنوم جانوران، رتروترنسپوزون‌های کارکردی در صورت وجود دارای تعداد کمی می‌باشند (Thomas et al., 2005).

۱-۶-۵- رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم اندامک‌ها

هیچ گزارشی مبنی بر وجود رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم کلروپلاست‌ها دیده نشده است، ولی ژنوم میتوکندری حاوی تعداد بسیار زیادی از رتروترنسپوزون‌های *Ty1-copia*، *Ty3-gypsy* و LINE است. حدود ۴٪ ژنوم میتوکندری آرابیدوپسیس حاوی این قطعات رتروترنسپوزونی است. ممکن است این

قطعات در نواحی تکراری ژنوم میتوکندری از طریق کسب این توالی‌ها از ژنوم هسته تجمع پیدا کرده باشند (SanMiguel et al., 1996).

۱-۶-۶- فعالیت رتروترانسپوزون‌ها به وسیله استرس‌های زنده و غیر زنده

بسیاری از رتروترانسپوزون‌های گیاهی، تحت تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده فعال می‌شوند. بیان Tnt1 و Tnto1 توتون به‌وسیله چندین تنش غیر زنده از جمله ایزولاسیون پروتوپلاست، کشت سلولی، زخم شدن بافت‌ها و سالیسیلیک اسید صورت می‌گیرد. تنش‌های زنده مختلف مانند عفونت‌های زنده ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها باعث فعالسازی رتروترانسپوزون‌ها می‌شود. رتروترانسپوزون‌های Tos17 در مقایسه با Tnt1 و Tnto1 تنها به‌وسیله کشت بافت فعال شده، این نتایج نشان می‌دهد که رتروترانسپوزون‌ها دارای توالی‌های cis-acting می‌باشند که الگوهای بیان‌شان را در میزبان کنترل می‌کند (Wesseler et al., 1995, Wesseler., 1996).

۱-۶-۷- مبدا و تکامل رتروترانسپوزون‌های گیاهی

مقایسه توالی ژنی LINE و LTR رتروترانسپوزون‌ها نشان می‌دهد که اولین رتروترانسپوزون‌ها LINE‌ها بوده‌اند و بعداً رتروترانسپوزون‌های LTR از آن‌ها از طریق کسب توالی تکراری مستقیم مشتق شده‌اند. رتروویروس‌ها ظاهراً در جانوران از رتروترانسپوزون‌های Ty3-gypsy از طریق کسب ژن تشکیل دهنده پوشش پروتئینی ویروس تکامل پیدا کرده‌اند.

بعضی عقیده دارند که رتروترانسپوزون‌ها از زمان شروع تبدیل ژنوم‌های RNA دار به DNA منشا گرفته‌اند. فراوانی رتروترانسپوزون‌ها و هتروژن بودن بسیاری از توالی‌هایشان نشان می‌دهد که آن‌ها در گیاهان اولیه حضور داشته‌اند و یا ممکن است که رتروترانسپوزون‌ها بعد از تشکیل اولین سلول یوکاریوتی به‌وجود آمده باشند و از طریق انتقال افقی و عمودی در بین موجودات پراکنده شده باشند. آن‌ها به‌طور

موفقیت آمیزی در بین موجودات یوکاریوتی آلی تکثیر پیدا کرده‌اند. سهم آن‌ها در تکامل موجودات یوکاریوتی هم هم غیر قابل انکار است.

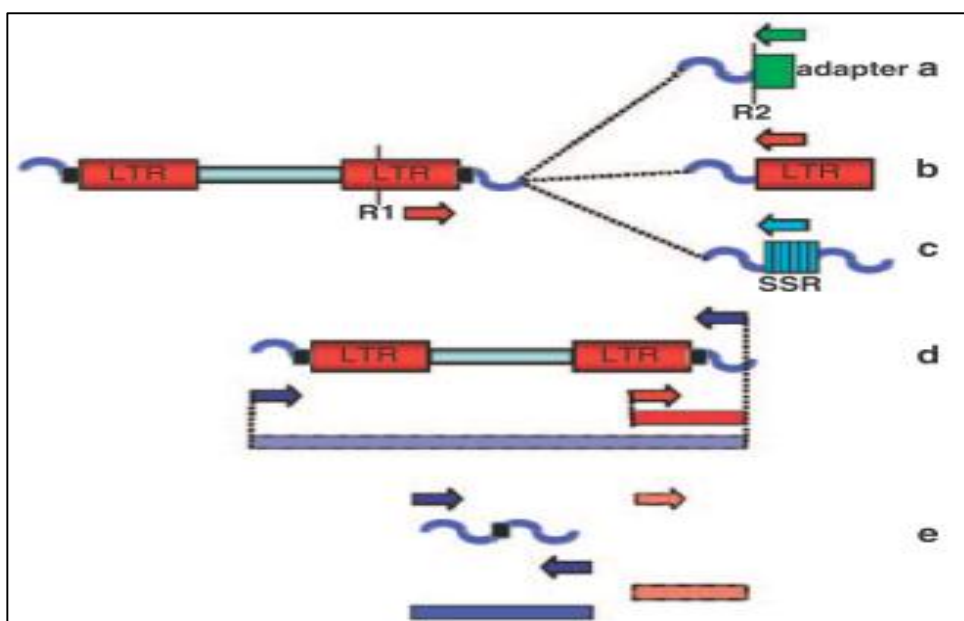
در واقع حضور این عناصر می‌تواند برای ژنوم مفید باشد. یعنی در اثر فشار انتخاب ژنوم‌هایی که دارای رتروترانسپوزون هستند می‌توانند موتاسیون‌های مختلف را کسب نموده و این یک مزیت برای ژنوم می‌باشد. همچنین این عناصر می‌توانند به عنوان پروموتور برای ژن‌های وحشی موجود در گیاهان عمل کنند و در نتیجه باعث بیان آنان شوند (Wilhelm and Wilhelm ., 2001).

۱-۶-۸- نقش و کاربرد رتروترانسپوزون‌ها

در اکثر یوکاریوت‌ها تعداد بسیار زیادی از رتروترانسپوزون‌ها در نواحی هتروکروماتینی، سانترومر، تلومر و دیگر نواحی هتروکروماتینی کروموزوم‌ها قرار دارند که این توزیع آن‌ها، یک نقش کارکردی و ساختاری را برای آن‌ها به وجود آورده است. مثلاً نقش HET-A و TART (رتروترانسپوزون)، در بافرینگ و کوتاه‌سازی انتهای کروموزوم‌های مگس سرکه به‌خوبی معلوم گشته است. وجود توالی‌های حفاظت شده‌ای از این عناصر در همه نواحی سانترومری گراس‌ها نشان می‌دهد که این عناصر در عملکرد سانترومر نقش داشته و همچنین حضور آن‌ها در نواحی تنظیمی ژن‌ها بیان می‌دارد که آن‌ها نقش تنظیمی را در بیان ژن‌های خاص دارند. زیرا LTR رتروترانسپوزون‌ها دارای دو آغازگر است که الحاق آن در نزدیکی یک ژن خاص باعث تغییر الگوی بیان آن ژن می‌شود. نوترکیبی یکی دیگر از مزایای این عناصر برای ژنوم‌ها می‌باشد. در واقع مشخص شده که پدیده برخوردن اگزون‌ها (Exon shuffling) توسط این عناصر صورت گرفته است. این عناصر از این طریق می‌توانند ژن‌های جدیدی را در طی پروسه تکامل ایجاد نمایند (Nina., 2000, Grzebelus., 2006).

۷-۱- استفاده از رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای مولکولی

وجود و عدم وجود یک ترانسپوزون در یک مکان ژنی می‌تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی برای انگشت نگاری ژنوتیپ‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین روابط تکاملی و همچنین در تهیه نقشه‌های پیوستگی استفاده شود. به واسطه پراکندگی گسترده، حضور در همه جای ژنوم و فراوانی این عناصر ژنتیکی متحرک، در سال‌های اخیر چندین نشانگر مولکولی بر پایه این عناصر ژنتیکی متحرک معرفی شده است (Schulman et al., 2004).



شکل ۱-۳: روش‌های مختلف نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها: (a) روش S-SAP^۱ می‌-

باشد. که در آن یک قطعه DNA برش یافته توسط دو آنزیم محدودگر (E2, E1)، دارای یک LTR رتروترانسپوزونی (سایه زده) و یک سازگارساز (منقوط) تکثیر می‌شود. آغازگرهای مورد استفاده با سازگارساز (P_A) و رتروترانسپوزون (P_T) جفت می‌شوند. (b) روش IRAP^۲ می‌باشد. که در آن تکثیر نواحی

۱- Sequence-specific amplified polymorphism

۲- Inter Retrotransposon amplified polymorphism

بین رتروترانسپوزون‌های نزدیک به هم در داخل ژنوم و با استفاده از آغازگرهای رتروترانسپوزونی (P_T) صورت می‌گیرد. (c) روش REMAP را نشان می‌دهد که تکثیر بین یک دامنه ریزماهواره‌ای (خطوط عمودی) و یک رتروترانسپوزون، و با استفاده از آغازگرهای اتصال یافته به نواحی مجاور ریزماهواره (P_M) و آغازگر رتروترانسپوزونی (P_T) صورت می‌گیرد. (d) روش *RBIP* است، در این حالت تکثیر بین یک آغازگر در DNA ژنومی احاطه‌گر (در اینجا، آغازگر P_{FL} به سمت چپ متصل شده است) و یک آغازگر رتروترانسپوزونی (P_T) صورت می‌گیرد (Kalendar., et al 2011).

۱-۸- توسعه و کاربرد نشانگرهای رتروترانسپوزون

نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌های دارای LTR، برای محدوده وسیعی از موجودات نظیر غلات و گراس‌ها، نارگیل، گوجه فرنگی، نخود، درختان میوه، قارچ‌ها و حشرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از این نشانگرها جهت بررسی رتروترانسپوزون‌ها و تحرک‌پذیری آنها، تا مطالعات تنوع زیستی و تکامل ژنوم، نقشه‌یابی ژن‌ها و تخمین فاصله ژنتیکی، ارزیابی و تشخیص اشتقاق واریته‌ها استفاده می‌شود. از آنجایی که رتروترانسپوزون‌های LTR به صورت گسترده در ژنوم گیاهان وجود دارند، لذا استفاده از این نوع نشانگرها در گیاهان عمومیت دارند. همچنین در گیاهان از تکنیک‌هایی با رتروترانسپوزون‌های غیر LTR، به‌خصوص عناصر $SINE^1$ (نوعی دیگر از رتروترانسپوزون‌های یوکاریوتی) استفاده شده است (prieto et al., 2005). الگوی الحاق قطعه *Alu* انسانی، ترانسپوزونی متعادل در ژنوم انسانی، نه تنها به‌عنوان وسیله‌ای در بیشتر مطالعات ساختار جمعیتی عمل می‌کند، بلکه با بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی نیز پیوستگی دارد. *Alu* توالی‌هایی از نوع رتروترانسپوزون‌های *SINE* می‌باشند که چون دارای جایگاه تشخیص برای آنزیم برشی *AluI* می‌باشند، به این نام خوانده می‌شوند. در واقع، نشانگرهای مولکولی

مبتنی بر رتروویروس‌ها یا رتروترانسپوزون‌ها می‌توانند در حیوانات شامل پستانداران و پرندگان نیز مفید واقع شوند (Schulman et al., 2004). استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی در گونه‌هایی که این نشانگرها قبلاً در آنها استفاده نشده‌اند، نیازمند شناسایی رتروترانسپوزون و یا توالی‌های دوطرف آنها (در تکنیک RBIP) جهت طراحی آغازگرهای PCR نیاز می‌باشد. در اکثر مطالعات صورت گرفته، آغازگرهای LTR می‌توانند به صورت مشترک در لاین‌های گونه‌ها، در میان جنس‌های نزدیک به هم و حتی بعضی از اوقات بین خانواده‌های گیاهی استفاده شوند. در گونه‌های مختلف، یکسری رتروترانسپوزون‌ها شناسایی شده‌اند که می‌توانند توسط آغازگر هترولوگ تکثیر شوند. این رتروترانسپوزون‌ها از اعضای خانواده‌های قدیمی رتروترانسپوزون‌های موجود قبل از اشتقاق گیاه، مورد مطالعه می‌باشند. خانواده‌های قدیمی‌تر ترانسپوزون‌ها نسبت به خانواده‌های جدیدتر، در ایجاد الحاق‌های جدیدتر تمایل بیشتری به خاموشی و سکون دارند. از طرفی هم، اگر شخصی بخواهد که واریته‌های نسبتاً نزدیک به هم یا لاین‌های اینبرد را مطالعه کند، باید از یک سیستم رتروترانسپوزون بومی^۱ (رتروترانسپوزون‌هایی که براساس ژنوم ارقام بومی طراحی شوند) استفاده نماید. این فرآیند نیازمند همسانه‌سازی و توالی‌یابی ترانسپوزون‌ها از گونه‌های جدید می‌باشد. بدین منظور، ابتدا بایستی قطعات بین نواحی رتروترانسپوزونی که دارای توالی حفاظت شده می‌باشند، تکثیر و همسانه‌سازی شوند و سپس از روی آنها آغازگرهای جدید اختصاصی جهت شناسایی خانواده‌های رتروترانسپوزون طراحی گردیده است و در نهایت کارایی این آغازگرها به عنوان یک نشانگر مورد بررسی قرار گیرد. در نشانگرهای IRAP، S-SAP و REMAP باندهای تفکیک شده در الکتروفورز، حاصل تکثیر از یک سمت الحاق رتروترانسپوزون می‌باشند. توالی‌یابی باندهای استخراجی، اطلاعات زیادی را به همراه داشته است و با استفاده از آنها می‌توان یک آغازگر PCR مطابق با DNA ژنومی مجاور یک طرف الحاق طراحی کرد. به هر حال لازم است که توالی ژنومی طرف دیگر

۱- Native

رتروترانسپوزون‌ها جهت نمره‌دهی جایگاه خالی مشخص شود. بدین منظور می‌توان ژرم‌پلاسماها را برای باند اصلی^۱ چندشکل غربال کرد و سپس تکنیک S-SAP را روی آنها انجام داد که در این تکنیک آغازگر LTR با یک آغازگر طراحی شده برای سمت شناخته شده‌ای که جایگاه الحاق را به سمت جلو پیش می‌برد، جایگزین شده است (Shirasu et al., 2000).

۱-۸-۱- چندشکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون‌ها (IRAP)

در این روش دو آغازگر بر اساس توالی تکراری انتهایی (LTRها) طراحی شده و جهت تکثیر قطعات بین دو رتروترانسپوزون به کار برده می‌شوند و چندشکلی بر اساس تفاوت در طول توالی بین توالی‌های تکراری انتهایی دو رتروترانسپوزون، آشکار می‌گردد. از آنجایی که تعدادی از خانواده رتروترانسپوزون‌ها به صورت تصادفی الحاق نمی‌یابند، بلکه تمایل دارند که با یکدیگر در داخل ژنوم الحاق یابند، بنابراین در بسیاری از موارد امکان تکثیر وجود خواهد داشت (یعنی فاصله دو رتروترانسپوزون در حدی است که آنزیم DNA پلیمراز می‌تواند آن را تکثیر کند). البته انجام این روش نیازمند دانش کامل در مورد توالی‌های تکراری انتهایی رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد (Kalendar et al., 1999).

۱-۸-۲- چند شکلی در تکثیر بین ریزماهواره‌ها و رتروترانسپوزون‌ها (REMAP)

در این روش یکی از آغازگرها به بر اساس توالی‌های تکراری انتهایی رتروترانسپوزون‌ها طراحی شده و آغازگر دیگر بر اساس توالی‌های تکراری ریزماهواره‌ها تعیین می‌شود. قطعات بین دو آغازگر تکثیر شده و چندشکلی بر اساس تفاوت در طول این قطعات آشکار می‌گردد. این روش ساده‌تر از روش IRAP بوده به مقدار کمی اطلاعات در مورد توالی‌های تکراری انتهایی نیاز دارد.

در نشانگرهای IRAP و REMAP آشکارسازی قطعات تکثیر شده در PCR روی ژل آگارز صورت می‌گیرد، در حالی که در روش S-SAP به علت زیاد بودن قطعات تکثیری، از ژل‌های توالی‌یابی استفاده می‌شود. با این حال ژل‌های توالی‌یابی را در نشانگرهای IRAP و REMAP نیز می‌توان استفاده کرد. در نشانگرهای رتروترانسپوزونی در هر واکنش تکثیری، بسته به هم‌بارزی یا غالب بودن خانواده رتروترانسپوزون و سازماندهی ژنوم گیاهی تحت مطالعه، ده‌ها تا صدها محصول تولید می‌شود. تعداد محصولات تکثیری می‌توانند با اضافه کردن بازهای انتخابی به آغازگر سازگار ساز یا آغازگر LTR کاهش یابد. در IRAP، بازهای انتخابی می‌توانند به آغازگر LTR اضافه گردند. در REMAP، آغازگر LTR یا آغازگر ریزماهواره می‌توانند با خاصیت انتخابی بیشتری طراحی شوند (Kalendar et al., 1999).

۹-۱- روش‌های آماری تعیین فاصله ژنتیکی

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، وجود و عدم وجود نوار با اعداد یک و صفر مشخص شدند. استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بسیار موثر باشد. ضرایب تشابه از صفر تا یک متغیر است. در این ارزیابی زمانی که نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت باشند (Wolf et al., 1998).

۹-۱-۱- اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی

هر تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری در سطح توالی ژن‌ها یا فراوانی‌های آللی که بین افراد، جمعیت‌ها یا گونه‌ها قابل ثبت باشد تفاوت ژنتیکی بوده که تعیین آن و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهی و جانوری است. فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را می‌توان بسته به نوع داده‌ها از روش‌های آماری گوناگونی محاسبه کرد. به منظور اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بر مبنای داده‌های نشانگرهای ملکولی چندین روش مختلف معرفی گردیده است. معمول‌ترین

روش‌های اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی که برای داده‌های نشانگرهای ملکولی به کار می‌روند شامل ضریب تشابه جاکارد (Jakard, 1912)، تطابق ساده (Sokal et al., 1958) و دایس می‌باشند.

۱-۹-۲- تجزیه‌های چند متغیره آماری

با افزایش اندازه نمونه، شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد مشکل‌تر می‌شود. یکی از بهترین راهکارهای طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بین افراد استفاده از الگوریتم‌های آماری چند متغیره است. در تکنیک‌های تجزیه و تحلیل چند متغیره از تجزیه هم زمان چندین متغیر برای بررسی روابط بین افراد استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها امروزه به طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی داده‌های مختلف از قبیل داده‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی یا نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند از بین این الگوریتم‌ها، تجزیه خوشه‌ای^۱ و تجزیه به مولفه‌های اصلی^۲ بیشتر از بقیه کاربرد دارند.

۱-۹-۲-۱- تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای به گروهی از تکنیک‌های چند متغیره که هدف اولیه آن گروه‌بندی افراد می‌باشد اطلاق می‌شود. در این نوع تجزیه افراد مشابه از نظر صفات مورد بررسی در یک خوشه واحد کنار هم قرار می‌گیرند. در نتیجه دسته‌بندی کردن، افرادی که در یک خوشه قرار می‌گیرند دارای شباهت‌های زیاد و افرادی که در خوشه‌های جداگانه قرار می‌گیرند ناهمگن‌تر هستند. بنابراین اگر طبقه‌بندی به طور صحیح انجام گرفته باشد، افرادی که در یک خوشه قرار دارند در نمایش هندسی در کنار هم قرار گرفته و افرادی که در خوشه‌های جدا قرار دارند از هم دورتر خواهند بود. گروه‌بندی یا تجزیه خوشه‌ای جدا از روش‌های طبقه‌بندی دیگر از قبیل تجزیه تابع تشخیص می‌باشد.

۱- Cluster Analysis

۲- Prinicipal Component Analysis (PCA)

در روش‌های طبقه‌بندی جهت گروه‌بندی، چند گروه از قبل تعیین شده، توسط داده‌های مورد مطالعه، مورد بررسی قرار می‌گیرند و یک فرد جدید بر اساس داده‌ها به یکی از گروه‌ها منتسب می‌شود. ولی در تجزیه خوشه‌ای هیچ اطلاعی از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها وجود ندارد. در بین روش‌های تجزیه خوشه‌ای، بیشتر از الگوریتم‌های مبتنی بر فاصله در تجزیه تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود. روش‌های مبتنی بر فاصله‌ها، ماتریس فاصله به عنوان ورودی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند و خروجی به صورت درختی قابل ارایه می‌گردد. روش UPGMA^۱ و روش حداقل واریانس^۲ بیشترین کاربرد را برای تجزیه خوشه‌ای دارند. سایر روش‌ها نیز مانند نزدیک‌ترین همسایه و دورترین همسایه توسط برخی از محققین برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به کار برده می‌شود.

۱-۹-۲- ضریب کوفنتیک^۳

یکی از روش‌های مقایسه کارایی الگوریتم‌های مختلف خوشه‌بندی، تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک می‌باشد که در آن همبستگی بین ماتریس شباهت یا فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه‌ای با ماتریس کوفنتیک که بر اساس دندروگرام که به عنوان خروجی تجزیه می‌باشد برآورد می‌گردد. روشی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد می‌تواند به عنوان مناسب‌ترین روش تجزیه و تحلیل تلقی گردیده و به کار رود. ضریب همبستگی را با r نشان می‌دهند. درجه برازش می‌تواند در دامنه $0/7$ و $0/9$ متغیر باشد. اگر $r \geq 0/9$ باشد برازش خیلی خوب، $0/8 \leq r < 0/9$ برازش خوب، $0/7 \leq r < 0/8$ برازش ضعیف و $r \leq 0/7$ برازش خیلی ضعیف می‌باشد.

۱- Unweighted Paris Group Method Alitmetic Average

۲- Ward

3- Cophenetic coefficient

۱-۹-۲-۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی

تجزیه به مولفه‌های اصلی مانند تجزیه خوشه‌ای یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است که دارای کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. PCA به عنوان روشی برای کاستن حجم داده‌ها به منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه به وسیله تعداد محدودی از متغیرهای جدید مستقل به نام مولفه‌های اصلی می‌باشد. این نوع دسته بندی اجازه نمایان شدن تفاوت‌ها را در بین افراد داده و مشاهده هم گروه را ممکن می‌سازد.

کاسته شدن حجم داده‌ها به وسیله تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدیدی که به عنوان مولفه‌های اصلی شناخته می‌شوند انجام می‌گیرد. به طوری که اولین مولفه بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کند و مولفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقیمانده را بعد از مولفه اول توجیه می‌کند. لازم به ذکر است که هر مولفه تغییراتی را توجیه می‌کند که توسط مولفه‌های قبلی بیان نشده است. به علت اینکه مولفه‌ها به صورت متعامد^۱ و مستقل از یکدیگر می‌باشند هر مولفه نشان دهنده خصوصیات متفاوتی از داده‌های اصلی می‌باشند و به صورت مستقل از یکدیگر باید تفسیر شوند (Mohammadi, et al., 2003).

هر چه همبستگی میان متغیرها بیشتر باشد، ۲ تا ۳ مولفه نخست تغییرات بیشتری را توجیه می‌کنند و هر چه همبستگی پایین‌تر باشد نشان دهنده تصادفی بودن این متغیرها است. نبود همبستگی در میان این متغیرها برای داده‌های مولکولی ویژگی سودمند است زیرا نشان می‌دهد این متغیرها جنبه‌های گوناگونی از داده‌ها را اندازه‌گیری می‌کنند که در این صورت به تعداد بیشتری مولفه اصلی برای توجیه

۱- Orthogonal

تغییرات داده‌های اولیه نیاز می‌باشد. اگر سه مولفه نخست کمتر از $0/25$ تغییرات را توجیه نمایند بهره‌گیری از نمودارهای ۲ و ۳ بعدی برای گروه‌بندی داده‌ها ناکارآمد می‌شود چرا که همبستگی میان این سه مولفه اندک است و بخش بسیاری از تغییرات را مولفه‌های دیگر توجیه کرده‌اند و نمودارهای ۲ و ۳ بعدی دسته‌بندی مورد پذیرشی را انجام نمی‌دهند ولی این رویداد نشان دهنده پراکنش خوب آغازگرهای به کار رفته روی ژنوم است (Mohammadi et al., 2003).

۱-۹-۳- شاخص شانون

شاخص تنوع یک معیار ریاضی برای نشان دادن تنوع گونه‌ها می‌باشد که به زیست‌شناسان برای پی‌بردن به ساختار جامعه و تنوع موجود در آن کمک می‌کند. شاخص تنوع شانون از شاخص‌های مورد استفاده برای توصیف تنوع گونه‌ها در جامعه می‌باشد. جامعه‌ی با تنوع بالا دارای شاخص تنوع شانون بالا و جامعه با تنوع کم شاخص شانون پایینی دارد.

۱-۹-۴- هتروزیگوسیتی

برای یک جایگاه ژنی به صورت فراوانی افراد هتروزیگوس برای آن جایگاه نسبت به کل افراد جمعیت تعریف می‌شود. مقدار آن با افزایش تعداد آلل‌ها، افزایش یافته و زمانی که فراوانی آللی یکسان باشد ماکزیمم می‌شود.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)، نسبت برآورد شده افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که به صورت تصادفی انتخاب شده است. یک جایگاه ژنی اگر هتروزیگوسیتی بیشتر از $0/1$ باشد، چند شکل است و اگر این مقدار بیش از $0/7$ باشد، به شدت چند شکل است.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- مروری بر پژوهش‌های انجام شده در گیاه زردآلو با استفاده از نشانگرهای مختلف

اولین بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی زردآلو به وسیله ایزوزیم‌ها انجام شد و از الگوی وراثت پذیری پنج مکان ژنی ایزوزیم برای شناسایی هیبریدها و توصیف کلی ژرم پلاسما استفاده گردید (Byrne *et al.*, 1989). همچنین از الگوی باندهی AAT برای آنالیز تلاقی آلو × زردآلو استفاده شد (Pashkoulov *et al.*, 1995).

در پژوهش دیگری از ۱۰ سیستم آنزیمی برای مطالعه ژنتیکی در ۹۴ کلکسیون زردآلوی اروپایی، شمال آمریکا و جنوب آفریقا استفاده شد (Badenes *et al.*, 1996). در یک پژوهش با استفاده از ۵ جفت آغازگر AFLP در ۴۷ رقم متعلق به دامنه جغرافیایی وسیع، بیش از ۳۵۰ باند چند شکل بدست آمد. آنالیزهای انجام شده به کمک این داده‌ها امکان گروه بندی ارقام را منطبق با منشاء جغرافیایی فراهم ساخت (Hagen *et al.*, 2002).

جنتی‌زاده و همکاران (۱۳۸۸) به بررسی ۳۹ رقم و ژنوتیپ ایرانی زردآلو با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر مولکولی RAPD پرداختند. تجزیه کلاستر داده‌های مورفولوژیک توانست ارقام مختلف را بر اساس میوه، تاریخ رسیدن و صفات مربوط به طعم تفکیک نماید. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به RAPD ژنوتیپ‌ها را در فاصله تشابه ۶۵٪ به ۶ گروه اصلی تقسیم کرد که تا حدودی با نتایج خصوصیات مورفولوژیکی و منشا جغرافیایی آن‌ها تطابق داشت.

در یک بررسی مجیدیان و همکاران (۱۳۹۰) تنوع ژنتیکی ۴۲ رقم و ژنوتیپ زردآلوی موجود در کلکسیون‌های سهند تبریز و باغ گیاهشناسی جمهوری چک را با استفاده از نشانگر AFLP نشاندار با فلورسنت ارزیابی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد ارقام و ژنوتیپ‌های زردآلوی موجود در کلکسیون‌های ایران و چک بر اساس منشا و پراکندگی جغرافیایی در گروه‌بندی‌های مجزایی قرار می‌گیرند.

در پژوهشی دیگر نیز با استفاده از ۵ جفت آغازگر AFLP در ۴۷ رقم متعلق به دامنه جغرافیایی وسیع، بیش از ۳۵۰ باند بدست آمد. آنالیزهای انجام شده به کمک این داده‌ها امکان گروه‌بندی ارقام (منطبق با منشا جغرافیایی) را فراهم ساخت (Hagen et al., 2002).

در مطالعه‌ای دیگر، ۴۰ کولتیوار زردآلو با ریشه‌ی مختلف جغرافیایی متعلق به مجموعه ژرم‌پلاسما دانشگاه بوداپست در مجارستان، و دانشگاه والنسیای اسپانیا با استفاده از نشانگر SSR مورد مطالعه قرار گرفتند. هدف از این مطالعه، تعیین روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها از گروه‌های سازگار با محیط زیست جغرافیایی آن‌ها بود. در این مطالعه ۱۶ جفت پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. که از این تعداد ۱۱ جفت آغازگر تولید باندهای واضح کردند که در مجموع ۳۴ آلل، به طور میانگین ۳/۱، هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۶ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به طور متوسط ۰/۳۲ بود. علاوه بر این الگوریتم UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی نی، نشان داد که مارکر SSR به خوبی می‌تواند ژنوتیپ‌ها بر اساس شجره جغرافیایی تفکیک کند (Romero et al., 2003).

در یک بررسی که ۴۵ ژنوتیپ زردآلو را با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر SSR مورد ارزیابی قرار داده بود. ۹ پرایمر تولید باندهایی با بیش از ۵۰٪ چندشکلی کردند. که بر این اساس ژنوتیپ‌ها به دو گروه عمده و چندین زیرگروه تقسیم شدند (Ruthner et al., 2006).

در مطالعه‌ای دیگر که بر اساس مارکر RAPD بین ۲۳ ژنوتیپ زردآلو با استفاده از ۴۰ پرایمر دکامر تصادفی انجام شد، ۱۲ پرایمر تولید ۱۲۱ باند کردند که حاصل آن ۱۱۸ باند پلی‌مورف بود. دندروگرام حاصل از UPGMA ژنوتیپ‌ها را به یک گروه اصلی و یک تک‌شاخه تقسیم کرد. که گروه اصلی به ۳ زیرگروه تفکیک شدند. همچنین نتایج نشان داد که مارکر RAPD، بهتر از مارکرهای مورفولوژیکی و آیزوایمی در شناسایی و ساخت و ساز نقشه‌های ژنتیکی عمل می‌کنند (Ercisli et al., 2008).

در یک پژوهش که رابطه فیلوژنتیکی ۳۶ ژنوتیپ از ۹ دره اطراف هیمالیا با استفاده از ۳۱ مارکر (۲۰ مارکر RAPD و ۱۱ مارکر ISSR) بررسی شد، ۱۳۶ قطعه پلی مورف از ۱۳۹ قطعه بدست آمد، که سهم هر پرایمر ۶/۸ قطعه نشان داده شد. همچنین در آنالیز ISSR ۵۶ باند چندشکل از ۵۸ باند بدست آمد که سهم هر یک از پرایمرها ۵/۰۹ قطعه می باشد. نتایج نشان می دهد کارایی RAPD بیشتر از ISSR برای گروه بندی ژنوتیپ ها یافت شد (Kumar et al., 2009).

در مطالعه ای پلی مورفیسم ژنتیکی بین ۶ رقم زردآلوی محلی با استفاده از آیزوزایم ها و تجزیه و تحلیل بر اساس مارکرهای RAPD و SSR بررسی شد. ارقام را می توان با الگوی باندهای حاصل از آیزوزایم پراکسیدازها و استرازها شناخت. همچنین تجزیه و تحلیل RAPD در مجموع ۳۳ باند از ۷۴ باند (۴۴٪) و مارکر SSR، ۱۶ آلل از ۲۲ آلل (۷۲٪) را چندشکل نشان داد. در کل این مطالعه نشان داد که انگشتنگاری مولکولی ابزاری ساده تر و سریع تر برای شناسایی درختان میوه می باشد (Sharkawy et al., 2009).

در پژوهشی رابطه فیلوژنتیکی و ژنتیکی میان ۱۶ ژنوتیپ از جنس *Prunus*، (۶ ژنوتیپ از *P. prunophora*، ۷ ژنوتیپ از *P. armeniaca*، ۲ ژنوتیپ از *plumcot*، و یک ژنوتیپ از زیر جنس *Cerasus*) بررسی شد. از ۲۰ پرایمر (ISSR، SSR، RAPD) مورد بررسی ۱۸۰ باند ایجاد شد که نرخ پلی مورفیسم، ۵۷-۱۰۰٪ بود. آنالیز UPGMA و PCoA، دندروگرام و پلات سه بعدی به ۲ گروه اصلی تقسیم شد. گروه اول شامل *Cerasus* و گروه دوم شامل *Prunus* بود. گروه ۲ به سه زیر گروه *P. plumcot*، *P. armeniaca*، *prunophor* تقسیم شد. PCoA و دندروگرام نشان دادند، کمترین تنوع ژنتیکی میان *P. armeniaca* و *plumcot* می باشد، همچنین اینکه *plumcot* از نظر ژنتیکی بیشتر از زردآلو، به آلو نزدیک است (Yilmaz et al., 2009).

محمدی‌زاده و همکاران (۱۳۹۰) در پژوهشی به بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ رقم و ژنوتیپ زردآلوی ایرانی و ۲ رقم خارجی به عنوان شاهد با استفاده از صفات مورفولوژیکی و مارکر RAPD پرداختند. در آزمایش اول روابط ۲۱ صفت کمی و کیفی میوه، درخت و گل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه همبستگی ساده و وجود همبستگی‌های مثبت و منفی معنی‌داری بین برخی صفات را نشان داد. در آزمایش دوم نشانگر RAPD به کمک ۳۵ آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کار رفت. نوارهایی با وضوح بالا که با تکرارپذیری خوبی بودند برای محاسبات انتخاب شدند. ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حدود ۰/۷۹ بدست آمد که نشان‌دهنده همبستگی مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه است. با توجه به نتایج به دست آمده ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تنوع بالایی برخوردار بودند.

در آزمایشی برای مطالعه تنوع ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنتیکی میان ۱۶ ژنوتیپ *Prunus* از نشانگر ISSR استفاده گردید (۶ ژنوتیپ *Prunophora*، ۷ ژنوتیپ *P. armeniaca*، ۲ ژنوتیپ از *plumcot* و یک ژنوتیپ از زیر جنس *Cerasus*) که در نتیجه ۱۸۰ باند پلی‌مورف مشاهده شد که این پلی‌مورفیسم در دامنه ۵۷ تا ۱۰۰ درصد بود. در دندروگرام به وجود آمده ۲ گروه اصلی وجود داشت. بر اساس آنالیز-های UPGMA و PCoA مشخص گردید که ژنوتیپ *P. armeniaca* تنوع ژنتیکی پایینی دارد و *plumcot* دارای نزدیکی بیشتری با آلو نسبت به زردآلو می‌باشد (Yilmaz et al., 2012).

در پژوهشی راجی (۱۳۹۲) و همکاران به بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ زردآلو، شامل ۴۰ ژنوتیپ ایرانی و ۷ ژنوتیپ خارجی با استفاده از نشانگر SSR پرداختند. در این بررسی DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره، تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار گرفت و تجزیه کلاستر UPGMA بر اساس ضریب تطابق ساده و در فاصله ۰/۴۷ ژنوتیپ‌ها را به ۱۲ گروه تقسیم نمود. که ژنوتیپ‌های سن استرس و تنسگل بیشترین فاصله را با ژنوتیپ‌های دیگر نشان دادند.

در سال‌های اخیر از مارکرهای REMAP و IRAP برای شناسایی ژرمپلاسم پرتقال (Bréto et al., 2005); (Guo et al., 2005); (Xiao and سیب, 2001); (Baumel et al., 2002; Kristiina et al., 2006; Xu, 2006; Jia, 2008) شناسایی و نقشه‌یابی ژنتیکی جو در مناطق مختلف، تنوع ژنتیکی بین گونه‌های برنج (Branco et al., 2007)، گندم (Georgi et al., 2010)، موز (Nair et al., 2005)، پنبه (Hafeze et al., 2006)، زیتون (Natali et al., 2007)، سلول‌های سوماتیکی جو همچنین در انتخاب به کمک مارکر در یولاف استفاده شده است.

مطالعات انجام شده روی ژنوم گیاهان خانواده گلسرخیان نشان داد که عناصر جابه‌جا شونده به فراوانی در ژنوم این خانواده حضور دارند. علاوه بر این مشخص شد که فراوانی رتروترانسپوزون‌های LTR بیشتر از رتروترانسپوزون‌های غیر LTR می‌باشد. وانگ و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که بخش وسیعی از ژنوم جنس *Prunus* را رتروترانسپوزون‌های حاوی LTR از هر دو گروه *Ty1-copia* و *Ty3-gypsy* فراگرفته است، بنابراین می‌توان از رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگر برای تفرق ژنوتیپ‌های جنس *Prunus* استفاده کرد (Wang et al., 2010).

در یک بررسی کارآیی دو نشانگر IRAP بر روی ۹ ژنوتیپ آلو مقایسه شد، که IRAP1 از LTR3' و IRAP2 از LTR5' مشتق شده بود. آنالیز محصولات PCR برای IRAP1، ۴ باند پلی مورف از ۱۰ باند کل، و برای IRAP2، ۱۰ باند پلی مورف از ۱۸ باند، نشان داد که سهم IRAP1 در پلی مورفسم ۲۳٪، و پرایمر IRAP2، ۴۱٪ می‌باشد (Senkova et al., 2012).

در یک مطالعه که بر روی زردآلوی ژاپنی در چین انجام پذیرفت، رابطه ژنتیکی ۸۴ کولتیوار زردآلوی ژاپنی (*Prunus mume*) (۴۱ زردآلوی میوه‌دار و ۴۳ ژنوتیپ گل‌دهنده) با استفاده از تکنیک‌های

REMAP و IRAP بررسی گردید و این واریته‌های زردآلو بر اساس شباهت کوفنتیکی به ۱۸ گروه تقسیم گردیدند (Yuying et al., 2011).

تاکنون بر روی ژنوتیپ‌های زردآلوی ایران به کمک نشانگرهای رتروترنسپوزونی هیچگونه مطالعه-ای صورت نگرفته است. لذا هدف این تحقیق بررسی کارایی رتروترنسپوزون‌ها به عنوان نشانگر مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف زردآلوی موجود در شاهرود می‌باشد تا در آینده بتوان جهت شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مطلوب اقدام کرد.

فصل سوم

مواد و روش ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، تهیه‌ی نمونه‌های گیاهی، مراحل استخراج DNA به روش CTAB^۱، محلول‌های مورد نیاز، روش‌های بررسی کمیت و کیفیت DNA، تکثیر DNA با استفاده از PCR، الکتروفورز افقی و تجزیه و تحلیل داده‌ها می‌باشد که در ادامه به توضیح مراحل ذکر شده در بالا می‌پردازیم.

نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود) در سال ۱۳۹۱ تهیه گردید و پس از آن در فریزر ۲۰- و سیلیکاژل تا زمان استفاده نگهداری شد.

۱- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

جدول ۳-۱ : ارقام زردآلو مورد مطالعه

نام رقم	کد رقم	نام رقم	کد رقم
قوامی	ghavami	شاهرود ۴۷	Sh47
شاهرود ۵۰	Sh50	استیوت مراغه	estiot
شاهرود ۵۵	Sh55	نوری دیررس	Ndirras
نصیری	nasiri	مورپاک	murpak
نوری پیش رس	Npish	جهانگیری	jahan
شاهرود ۸	Sh8	شاهرود ۴۰	Sh40
شاهپسند	shahpa	شاهرود ۷۲	Sh72
قیصی ۲	Gheisi2	شاهرود ۲۹	Sh29
شاهرود ۴۳	Sh43	شاهرود ۳۳	Sh33
تنسگل	tansgol	شاهرود ۱۲	Sh12
خیبه ای	kheibeie	شاهرود ۵۲	Sh52
		دیررس دیزج	Dirdeizej

جدول ۳-۲- خصوصیات ارقام مورد بررسی

کد رقم	نام رقم	منطقه جمع آوری	خصوصیت ویژه
۱	شاهرود ۴۷	شاهرود	-
۲	استیوت مراغه	آذربایجان	-
۳	نوری دیررس	شاهرود	دیررسی
۴	مورپاک	-	-
۵	جهانگیری	شاهرود	دیرگلی
۶	شاهرود ۴۰	شاهرود	-
۷	شاهرود ۷۲	شاهرود	-
۸	شاهرود ۲۹	شاهرود	-
۹	شاهرود ۳۳	شاهرود	-
۱۰	شاهرود ۱۲	شاهرود	-
۱۱	شاهرود ۵۲	شاهرود	دیررسی
۱۲	دیررس دیزج	شاهرود	دیررسی
۱۳	قوامی	شاهرود	تحمل نسبی به سرمای بهاره
۱۴	شاهرود ۵۰	شاهرود	-
۱۵	شاهرود ۵۵	شاهرود	-
۱۶	نصیری	شاهرود	طعم مناسب
۱۷	نوری پیش‌رس	شاهرود	زودرسی
۱۸	شاهرود ۸	شاهرود	شکل مناسب
۱۹	شاهپسند	شاهرود	-
۲۰	قیصی ۲	شاهرود	زودگلی
۲۱	شاهرود ۴۳	شاهرود	-
۲۲	تنسگل	شاهرود	دیرگلی
۲۳	خیبه‌ای	شاهرود	مقاومت

۳-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل: Taq DNA, 10× PCR Buffer, MgCl₂, dNTP, Tris-HCL, Loading Buffer, Ribonuclease A, DNase Free Deionized water, Polymerase, EDTA, Boric Acid که از شرکت Sinaclon (تهران، ایران) تهیه گردید. β-Mercaptoethanol, Merck از شرکت Isopropanole, Ethanol, IsoAmyl Alcohol, Chloroform, NaCl, PVP, CTAB (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد، آگارز از شرکت Invitrogen (کالیفرنیا، آمریکا) تهیه گردید و پرایمرهای LTR با استفاده از توالی کلون‌های LTR زردآلوی ژاپنی در لابراتوار وانگ (Wang et al., 2010) و نرم‌افزار پرایمر ۳ طراحی گردیدند و پرایمرهای SSR از EST‌های زردآلو مشتق شد (Shugguan et al., 2011) و از شرکت Bioneer (داجون، کره جنوبی) تهیه شدند.

۳-۲- تجهیزات

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (اتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، میکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل‌داک QUANTUM ST4 (سوئیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور Zhihat Teb Azma (تهران، ایران)، سمپلر ۱۰۰ μl و ۱۰۰۰ μl Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، یخچال، فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران)، ترازو و pH متر SARTORIUS (گوتینگن، آلمان)، الکتروفورز PADIDEH NOJEN (مشهد، ایران) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳- استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB

۳-۳-۱ مراحل استخراج DNA

نمونه‌های برگ‌های تازه از برگ‌های جوان زردآلو ژنوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شد. ۰/۵ گرم نمونه برگ‌ی در حضور ازت مایع در هاون چینی پودر، به میکروتیوب منتقل، ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (شامل ۱۰ میلی‌لیتر Tris-HCl با pH = 8 در غلظت ۱ مولار، ۴ میلی‌لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار، ۲۸ میلی‌لیتر NaCl ۵ مولار، CTAB 2% W/V، PVP40 2% W/V که توسط آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) و ۲/۵ میکرو لیتر مرکاپتواتانول به هر تیوب اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد، سپس اجازه داده شد تا در دمای اتاق خنک شوند، هم حجم مایع نمونه کلروفرم- ایزوآمیل الکل سرد (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۳۰۰ rcf و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع شناور رویی به میکروتیوب جدید منتقل و به اندازه نصف حجم آن، آمونیوم استات ۷/۵ مولار و به اندازه دوسوم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا DNA به صورت غیر محلول در آید. به منظور رسوب DNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۶۲۰ rcf سانتریفیوژ شدند. فاز محلول رویی دور ریخته شد و سپس ۸۰۰ میکرو لیتر اتانول ۹۶٪ به رسوب اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۱ دقیقه در ۹۰۰۰ rcf سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل سه بار با اتانول ۷۰٪ شستشو و به رسوب سفید DNA اجازه داده شد تا در هوای آزاد خشک شود. در نهایت ۱۰۰-۵۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل به آن اضافه گردید و در دمای فریزر تا زمان استفاده نگهداری شد.

۳-۲-۲- بافر TBE

بافر TBE (بافر الکتروفورز) به صورت استوک ۵× تهیه و نگهداری و به صورت ۱× مصرف می گردد.

برای تهیه استوک ۵×، مقدار ۰/۴۴ M Tris base، ۰/۴۴ M Boric acid، ۲۰ میلی لیتر pH= 8 EDTA 0.5M را با هم مخلوط کرده با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد (pH = 8).

۳-۴-۲- بررسی کمیت و کیفیت DNA

۳-۴-۱- بررسی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری

برای بررسی کمیت DNA، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. ابتدا با حلالی که DNA یا RNA در آن حل شده است (آب مقطر یا بافر TE) دستگاه کالیبره شد، ۲ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۹۸ میکرولیتر آب مقطر درون کووت کوارتز قرار داده شد و میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت شد. سپس مقدار کل DNA بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر بر اساس معادله زیر محاسبه گردید.

جذب برابر با یک برابر است با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر برای DNA دو رشته ای (dsDNA) است. شرط لازم در این موارد، آن است که کیفیت DNA استخراج شده (نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به جذب در طول موج ۲۸۰) ۱/۶-۱/۸ باشد.

۳-۴-۲- الکتروفورز ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز افقی

جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۴۰ دقیقه برقرار گردید.

PCR - ۵-۳

برای انجام واکنش PCR، از دستور العمل ویلیامز^۱ و همکاران (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. مخلوط ۲۵ میکرولیتر PCR محتوی: ۵۰ نانوگرم DNA الگوی تهیه شده، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۵ unit/ μl ، ۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت 10 ppm، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer دارای غلظت 10× (بافر 10× PCR شامل ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCL 1× با اسیدیته ۸/۳، ۵۰۰ میلی مولار کلرید پتاسیم (KCl)، ۱۵ میلی مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$) و ۰/۰۱٪ (حجمی/وزنی) ژلاتین^۲ (موجب پایداری Taq پلیمرز و افزایش تکثیر) می باشد) و ۱۶/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل بود. در این تحقیق تعداد ۱۶ آغازگر مورد استفاده از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. آغازگرها طبق فرمول مربوط به هریک، که شرکت تولیدکننده روی هرکدام ذکر کرده رقیق شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آغازگرهای مورد استفاده در این پایان نامه با بررسی های انجام شده در بانک ژن و مرور مقالات، طراحی و انتخاب گردیدند و سعی گردید تا آغازگرهایی که در مطالعات قبلی چندشکلی در ژنوم نشان داده بودند استفاده گردد جدول (۳-۲).

برای انجام واکنش PCR ابتدا مخلوط اولیه از تمامی مواد PCR (به جز DNA) بر اساس تعداد واکنش ها با در نظر گرفتن یک کنترل منفی (بدون DNA) تهیه گردید. سپس با تقسیم مخزن مخلوط براساس تعداد نمونه مورد بررسی، تکثیر PCR انجام شد.

۱- Williams

۲- Gelatin

جدول ۳-۳: توالی آغازگرهای مورد استفاده

آغازگر	(3' → 5') توالی	آغازگر	(3' → 5') توالی
LTR1	CGCATCCATCTAGCACGAGG	UBC815	(CT) ₈ T
LTR2	CGTCGTCTGCCAGAGTCAAACA	P1	(CT) ₈ RC
LTR23	CCGACCTTCATTCTGGCATA	P9	(TC) ₈ CA
LTR5	CGACTGTTTTGAATAGCATAGATAA	P12	(GA) ₈ YT
LTR6	GGAATAAACCCATATCTCAACA	P13	(AT) ₈ A
LTR9	GCATCCATCTAGCACGAGG	848	(CA) ₈ RG
LTR10	AGTGTTGAGATATGGGTTTC	UBC849	(GT) ₈ CG
825	(CA) ₈ CT	840	(GA) ₈ YT
857	(AC) ₈ YG	R= Purine (A/G)	Y=Pyrimidine (C/T)

۳-۵-۱- الگوی دمایی

ابتدا دمای اتصال بهینه هر آغازگر بدست آمد. برنامه دمایی همه آغازگرها مشابه هم تنظیم شد و تنها بخش متغیر آن دمای اتصال^۱ آغازگر به DNA تک رشته بود.

پروتکل PCR با ۹۴ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۴ سیکل (۹۴ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۵۵-۵۰ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد: ۹۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد: ۱۰ دقیقه ادامه یافت.

۳-۵-۲- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز

محصول PCR برای هر آغازگر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (W/V) در ۱× TBE جدا شد. برای تهیه ژل، پس از مخلوط کردن ۱/۵ گرم آگارز با ۱۰۰ میلی لیتر بافر ۱× TBE نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه با

۱- Annealing temperature

جریان ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند. آنگاه ژل درون دستگاه عکسبرداری^۱ تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل عکس تهیه شد. نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰bp) به میزان ۴ μl در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۶- تجزیه داده ها

سه ماتریس تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای گروه بندی ارقام، محاسبه شدند. هر سه ماتریس با استفاده از آزمون منتل مقایسه گردیدند و بیشترین ضریب برای ماتریس تشابه تطابق ساده، برای نشانگر های IRAP و REMAP+IRAP و جاکارد برای نشانگر REMAP به عنوان مناسب ترین ماتریس جهت ترسیم دندروگرام بدست آمد. بر اساس ماتریس تشابه و با مقایسه روش های مختلف کلاستربندی با آزمون منتل، روش UPGMA مناسب ترین گروه بندی را ایجاد نمود.

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

۴-۱- نتایج داده‌های مولکولی

برای بررسی چند شکلی DNA بین ارقام زردآلو، ۱۶ آغازگر REMAP، IRAP روی ۲۳ رقم مختلف زردآلو با خصوصیات متفاوت مورد آزمایش قرار گرفتند. با بررسی تعداد باندهای چند شکلی، آغازگرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. از ۱۶ آغازگر تعداد ۷ مورد از آنها هیچ گونه باندی تولید نکردند و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرار پذیری کافی نداشتند. ۹ آغازگر دارای باندهای چندشکل و تکرارپذیر بودند. ترکیب آغازگر فوق، مجموعاً ۱۶۸ باند تولید کردند که همگی، چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. به عبارت دیگر ۱۰۰٪ باندها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چندشکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود، بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۲۶ عدد و مربوط به آغازگرهای REMAP(LTR6+ P9) و کمترین آن ۱۱ عدد و مربوط به آغازگر LTR10 بود.

۴-۱-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای

به منظور گروه‌بندی ارقام براساس داده‌های REMAP، IRAP، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS.PC 2/02، سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای ارقام مورد مطالعه محاسبه گردید، بعد از آن با مقایسه ضریب کوفنتیک هر سه ماتریس با ضریب کوفنتیک حاصل از مقایسه میزان همبستگی میان ضرایب تشابه، ضریب تشابه تطابق ساده برای داده‌های IRAP و ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های REMAP به عنوان مناسب‌ترین ضریب برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید. براساس ماتریس تشابه حاصله روش‌های مختلف کلاستربندی مورد مقایسه قرار گرفت که با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های تشابه و ماتریس خروجی دندروگرام، کلاستربندی براساس روش UPGMA مناسب‌ترین گروه بندی را ایجاد نمود.

هر چند که به دلیل عدم دسترسی، تمام ارقام زردآلوی موجود در کشور در این مطالعه به کار گرفته نشده‌اند، ولی با این وجود ارقام به کار گرفته شده در این پژوهش نشان از وجود تنوع ژنتیکی قابل توجهی در ارقام مورد بررسی دارد.

۴-۱-۲- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP

در این تحقیق از ۹ آغازگر رتروترانسپوزونی (۴ آغازگر IRAP و ۵ آغازگر REMAP) استفاده شد که مبتنی بر توالی‌های رتروترانسپوزونی LTR دار هستند که قبلاً هلو و زردآلوی ژاپنی شناسایی شدند. از میان ۴ آغازگر استفاده شده برای IRAP همگی تولید باند کردند.

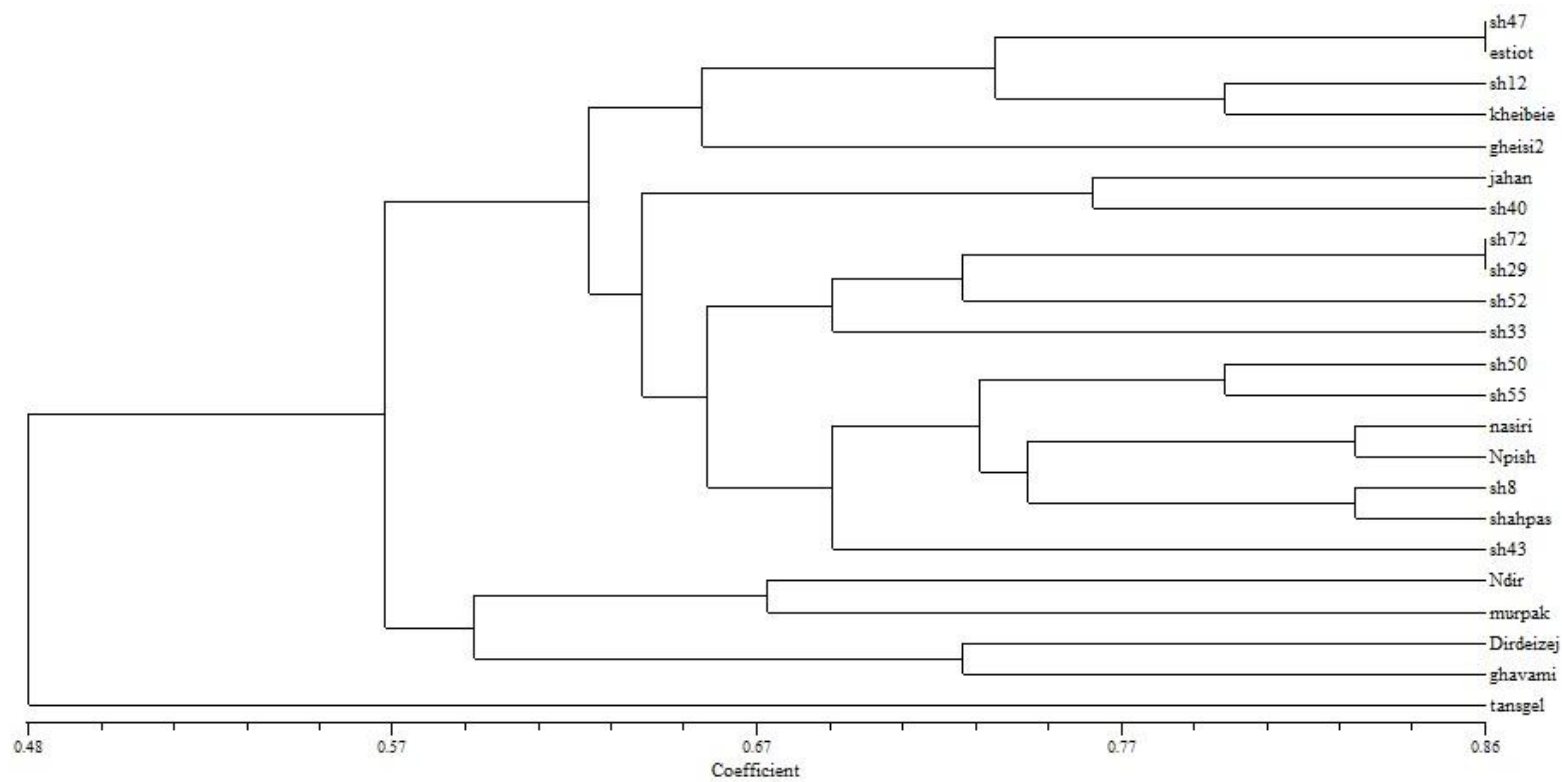
۴ آغازگر رتروترانسپوزونی IRAP به کار برده شده، در مجموع ۵۸ باند در ۲۳ رقم زردآلو تولید کردند. در نهایت ۵۸ مورد از این باندها چندشکلی نشان دادند. آغازگر *LTR1* با ۱۹ باند بیشترین تعداد باند دارای چندشکلی و آغازگر *LTR10* با ۱۱ باند کمترین باند دارای چندشکلی را نشان داد. در الگوی باندی حاصل از آغازگر *LTR23* از سری آغازگرهای IRAP در شکل ۴-۳ نشان داده شده است.

تمامی آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف زردآلو را نشان دادند و دندروگرام رسم شده با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و آنالیز خوشه‌ای UPGMA برای هر یک از نشانگر IRAP و REMAP به صورت جداگانه ترسیم شد.

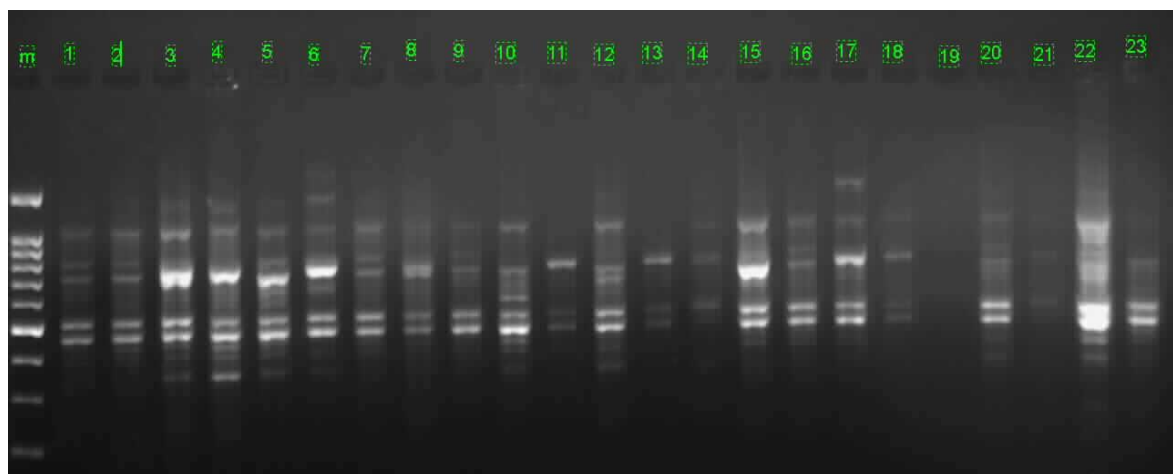
از نظر تعداد آلل‌های موثر (Ne)، آغازگر *LTR2* با مقدار $1/63$ کمترین مقدار و آغازگر *LTR23* با $1/65$ بیشترین مقدار را داشتند. همچنین از نظر هتروزیگوسیتی موردانتظار آغازگر *LTR2* با میزان $0/38$ کمترین و میزان هتروزیگوسیتی دیگر آغازگرها برابر با $0/39$ بود. آغازگر *LTR23* بیشترین مقدار شاخص شانون را به خود اختصاص داد. بنابراین این آغازگر تنوع بین ارقام مورد مطالعه را نسبت به سایر آغازگرهای IRAP بهتر نشان می‌دهد (جدول ۴-۱).

جدول ۴- ۱: نتایج حاصل از آنالیز نشانگرهای IRAP برای ارقام مورد مطالعه.

ترکیب پرایمری	دمای اتصال	نوع آغازگر	تعداد کل باند ها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	شاخص شانون (SI)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	تعداد آلل - های موثر (Ne)	تعداد آلل های متفاوت (Na)
LTR2	۴۸	IRAP	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۸	۱/۶۳	۲
LTR23	۴۶	IRAP	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۵۹	۰/۴	۱/۶۵	۲
LTR10	۴۵	IRAP	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۹	۱/۶۴	۲
LTR1	۴۸	IRAP	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۹	۱/۶۴	۲



شکل ۴-۱- دندروگرام حاصل از داده‌های IRAP برای ارقام زردآلوی مورد مطالعه. دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه تطابق ساده و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد.



شکل ۴-۲- الگوی بانندی حاصل از آغازگر LTR23 از سری آغازگرهای IRAP، تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، با ولتاژ ۱۲۰ و مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد.

بر اساس این دندروگرام ارقام مورد مطالعه در فاصله ۵۷٪ به ۳ گروه اصلی شامل شاهرود ۴۷، استیوت مراغه، شاهرود ۱۲، خیمه‌ای، قیصی ۲، جهانگیری، شاهرود ۴۰، شاهرود ۷۲، شاهرود ۲۹، شاهرود ۳۳، شاهرود ۵۲، شاهرود ۵۰، شاهرود ۵۵، نصیری، نوری پیش‌رس، شاهرود ۸، شاهپسند، شاهرود ۴۳ در گروه اول، نوری دیررس، مورپاک، دیررس دیزج و قوامی در گروه دوم و رقم تنسگل در گروه سوم قرار گرفت. طبق این طبقه‌بندی همه‌ی ارقام شاهرود در یک گروه قرار گرفتند احتمال می‌رود از آنجایی که این ارقام همگی تحت شرایط اقلیمی تقریباً یکسان بوده‌اند، الحاقات رتروترانسپوزونی واحدی در آنها پدید آمده است. طبق این تاکسونومی ارقام نوری دیررس و دیررس دیزج که هر دو دیررس می‌باشند در یک گروه قرار گرفته‌اند. همچنین اینکه رقم قیصی ۲ که زودگل‌ترین رقم موجود در کلکسیون می‌باشد و ارقام نوری پیش‌رس و جهانگیری که از ارقام زودرس هستند در فاصله ۶۷٪ در یک گروه جای دارند. رقم تنسگل که از منطقه‌ی جغرافیایی دیگری نسبت به سایر ارقام جمع‌آوری شده در گروه جداگانه‌ای نسبت به سایر ارقام قرار گرفت. با توجه به اینکه الحاقات رتروترانسپوزون‌ها یک حادثه بیولوژیکی است (Grandbastien et al., 1998) و الحاق رتروترانسپوزون‌ها غیر قابل برگشت است، (Shapiro et al., 1999) لذا نشانگرهای رتروترانسپوزونی داده‌های تاکسونومیک را فراهم می‌کنند که سازگاری بیشتری با معیارهای جغرافیایی و مورفولوژیکی دارد. علاوه بر این بررسی‌های مورفولوژیک نشان داد که ویژگی‌های ظاهری این رقم حد واسطه آلو و زردآلو است.

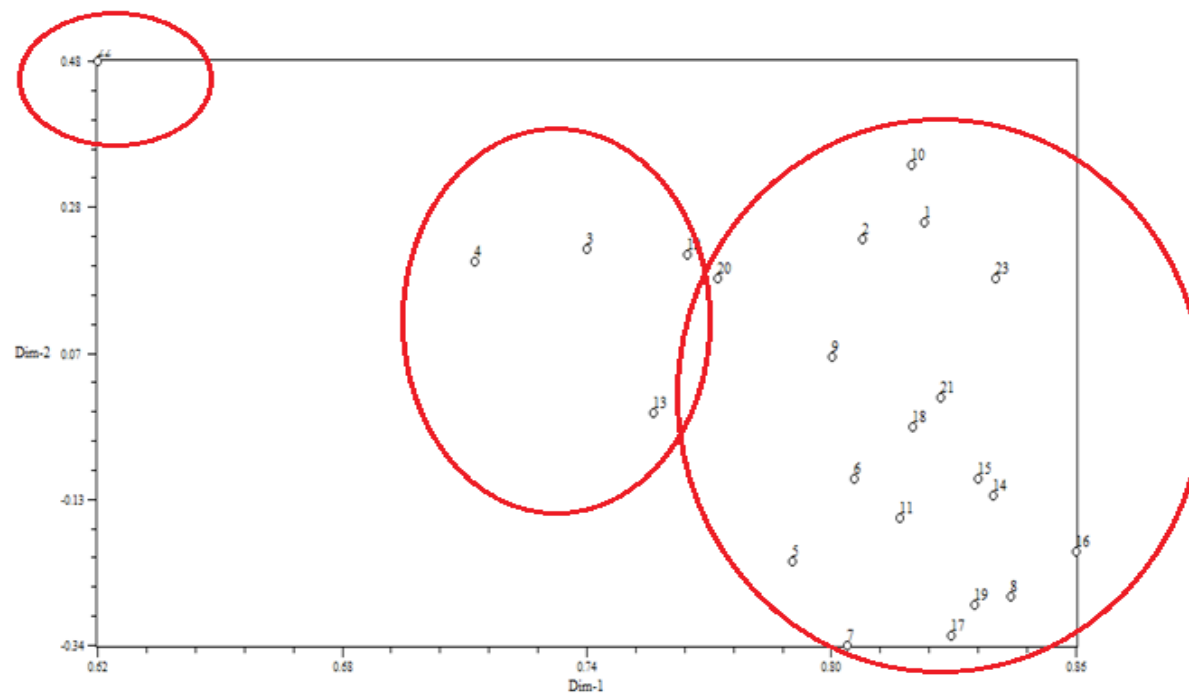
کوستینا و ریبوف خصوصیات گونه‌ای از جنس *Prunus* با نام *P. dasycarpa* را تشریح کردند (Faust et al., 1998)، که شاخص‌ترین ویژگی آن دیرگلی و ماهیت آلو× زردآلو و یا تعلق آن به گونه دیگر می‌باشد. از دیگر خصوصیات آن رنگ متفاوت پوست شاخه‌های درخت و شباهت به پوست آلو، درختان کوچک‌تر نسبت به زردآلو و میوه‌های شبیه به آلو است. به نظر می‌رسد رقم تنسگل متعلق به این گونه باشد.

۴-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

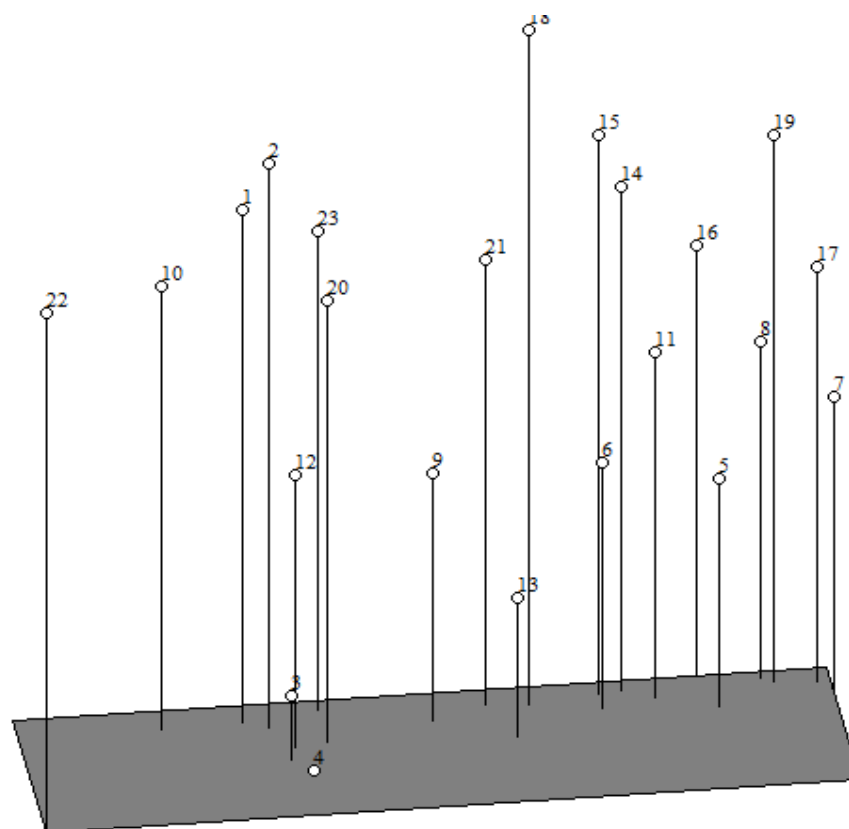
بر اساس نتایج حاصل، دو مؤلفه اول یعنی PCoA1 و PCoA2 به ترتیب ۶۳/۶۷ و ۵/۱ (مجموعاً ۶۸/۷۷٪) از واریانس کل را بیان کردند. همچنین آرایش تجمعی ارقام زردآلو با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر IRAP در شکل نشان داده شده است. توزیع ارقام در این نمودار مطابق با توزیع توده‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل در این مطالعه می‌باشد. در واقع نمودار دو بعدی مؤلفه‌ها ابزار دیگری جهت نشان دادن پراکنش ارقام است که می‌تواند به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به شمار رود. به طور کلی نتایج بدست آمده از تجزیه به روش‌های مختلف یکدیگر را تایید می‌کنند.

جدول ۴-۲- داده‌های حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی IRAP

درصد تجمعی	درصد مقادیر ویژه	مقادیر ویژه	مؤلفه‌ها
۶۳/۶۷	۶۳/۶۷	۱۴/۶۴	۱
۶۸/۷۷	۵/۱	۱/۱۷	۲
۷۲/۸۷	۴/۰۹	۰/۹۴	۳



شکل ۳-۴ پلات تجزیه مؤلفه های اصلی نشانگر IRAP. کد ارقام: ۱- شاهرود ۴۷، ۲- استیوت مراغه، ۳- نوری دیررس، ۴- مورپاک، ۵- جهانگیری، ۶- شاهرود ۴۰، ۷- شاهرود ۷۲، ۸- شاهرود ۲۹، ۹- شاهرود ۳۳، ۱۰- شاهرود ۱۲، ۱۱- شاهرود ۵۲، ۱۲- دیررس دیزج، ۱۳- قوامی، ۱۴- شاهرود ۵۰، ۱۵- شاهرود ۵۵، ۱۶- نصیری، ۱۷- نوری پیش‌رس، ۱۸- شاهرود ۸، ۱۹- شاهپسند، ۲۰- قیسی ۲، ۲۱- شاهرود ۴۳، ۲۲- تنسگل، ۲۳- خیمه‌ای. در این پلات ارقامی که با هم تشابه ژنتیکی بیشتری دارند، نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.



شکل ۴-۴- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی نشانگر IRAP. کد ارقام: ۱- شاهرود ۴۷، ۲- استیوت مراغه، ۳- نوری دیررس، ۴- مورپاک، ۵- جهانگیری، ۶- شاهرود ۴۰، ۷- شاهرود ۷۲، ۸- شاهرود ۲۹، ۹- شاهرود ۳۳، ۱۰- شاهرود ۱۲، ۱۱- شاهرود ۵۲، ۱۲- دیررس دیزج، ۱۳- قوامی، ۱۴- شاهرود ۵۰، ۱۵- شاهرود ۵۵، ۱۶- نصیری، ۱۷- نوری پیش‌رس، ۱۸- شاهرود ۸، ۱۹- شاهپسند، ۲۰- قیصی ۲، ۲۱- شاهرود ۴۳، ۲۲- تنسگل، ۲۳- خیبه‌ای. در این پلات ارقامی که با هم تشابه ژنتیکی بیشتری دارند، نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.

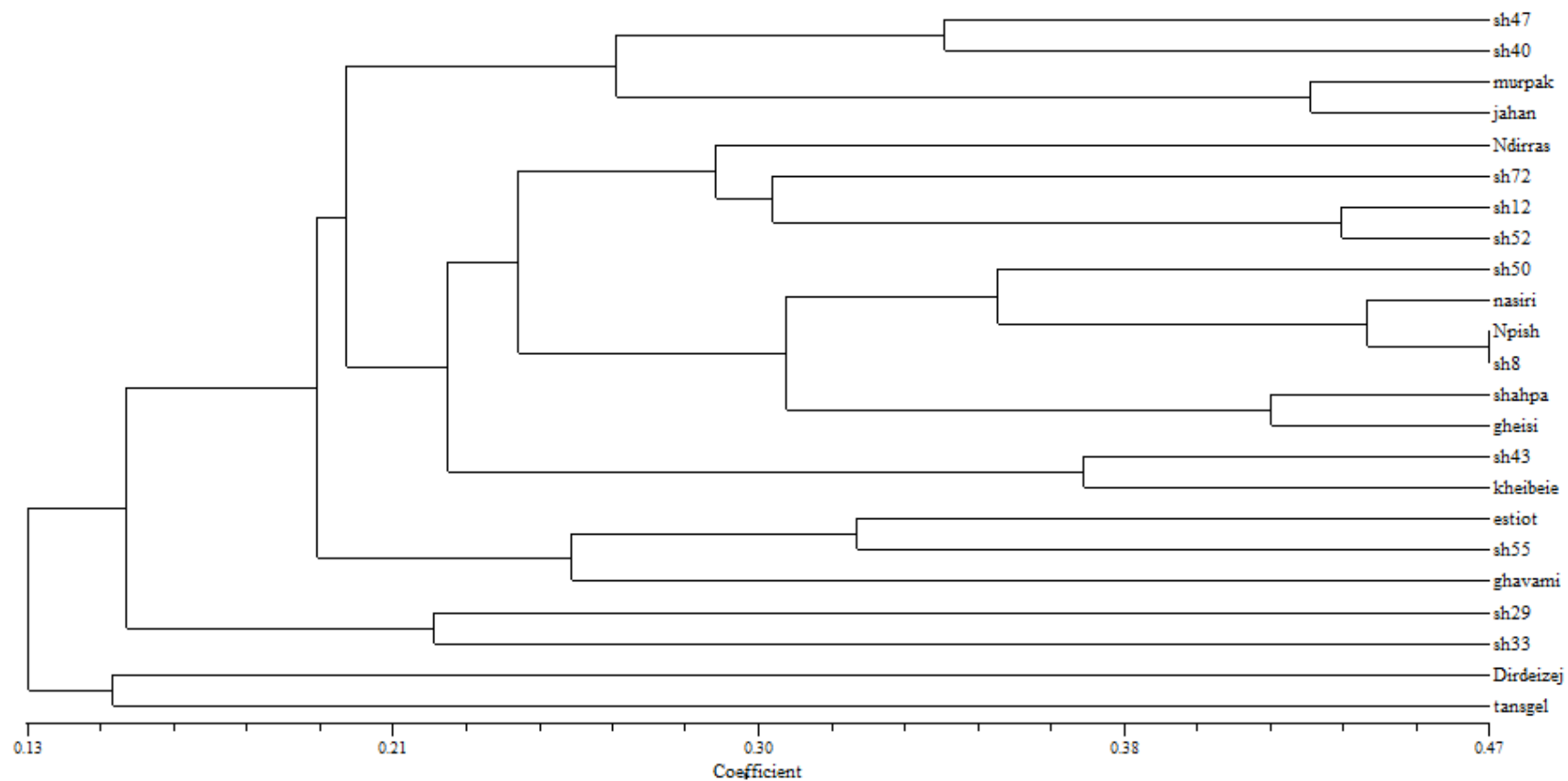
۴-۱-۴ - نتایج آنالیز خوشه ای بر اساس نشانگر REMAP

برای نشانگر REMAP ابتدا تمامی آغازگرهای ISSR روی تک نمونه DNA ارزیابی شد و آنهایی که دارای الگوی نواری مشخص و واضح بودند، در ترکیب با آغازگرهای رتروترانسپوزونی استفاده شدند. در این تحقیق از ترکیبات مختلف آغازگری REMAP استفاده کردیم که ۵ ترکیب ایجاد باندهای واضح و آشکاری نمودند.

از مجموع ۵ آغازگر تکثیر یافته، مجموعاً ۱۱۰ باند تکثیر شد که همگی باند چندشکل نشان دادند. میانگین تعداد کل باندها، ۲۲ و میانگین باندهای چندشکل نیز ۲۲ باند بود. پرایمر $LTR2+UBC849$ با ۲۶ باند چندشکل بیشترین و پرایمر $LTR1+825$ با ۱۶ باند کمترین باند چندشکل را نشان دادند (جدول ۳-۴). الگوی باندهای حاصل از آغازگر $LTR1+825$ از سری آغازگرهای REMAP در شکل نشان داده شده است. آغازگر $LTR9+P13$ از سری آغازگرهای REMAP بیشترین مقدار SI (شاخص شانون) و آغازگر $LTR1+825$ از سری آغازگرهای REMAP کمترین مقدار SI را داشتند. از نظر تعداد آللهای موثر (Ne) نیز ترکیبات آغازگری $LTR1+825$ با مقدار $1/62$ ، کمترین مقدار Ne و ترکیب آغازگری $LTR10+P12$ با مقدار $1/67$ ، بیشترین مقدار Ne را داشتند. همچنین از نظر هتروزیگوسیتی مورد انتظار، آغازگر $LTR1+825$ با میزان $0/37$ کمترین و آغازگر $LTR9+P13$ با میزان $0/4$ بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار را داشتند. بنابراین آغازگر $LTR9+P13$ نسبت به سایر آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف زردآلو را بهتر نشان داد. که دندروگرامهای مربوطه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA ترسیم شد.

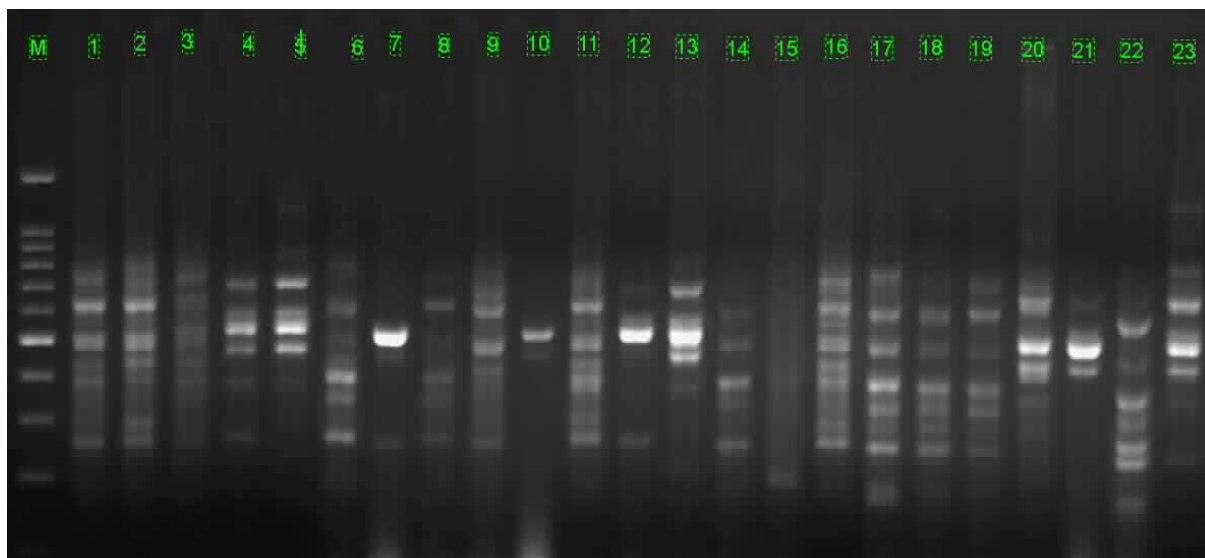
جدول ۴-۳: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای IRAP

تعداد	آل‌های	تعداد	آل‌های	هتروزیگوسیتی	شاخص	شانون	درصد	تعداد	تعداد کل	نوع آغازگر	دمای اتصال	ترکیب پرایمری
متفاوت (Na)	موثر (Ne)	مورد انتظار	(SI)	چندشکلی	چندشکل	باند‌های	باند‌ها	باند‌ها	باند‌ها			
۲	۱/۶۲	۰/۳۷	۰/۵۵	۱۰۰	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	REMAP	۴۹	LTR1+825
۲	۱/۶۶	۰/۴	۰/۵۸	۱۰۰	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	REMAP	۴۶	LTR10+P12
۲	۱/۶۷	۰/۳۹	۰/۵۸	۱۰۰	۲۳	۲۳	۲۳	۲۳	۲۳	REMAP	۴۶	LTR9+P13
۲	۱/۶۶	۰/۳۹	۰/۵۸	۱۰۰	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	REMAP	۴۹	LTR2+UBC849
۲	۱/۶۵	۰/۳۸	۰/۵۷	۱۰۰	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	REMAP	۵۲	LTR6+P9



شکل ۴-۵: دندروگرام حاصل از داده‌های REMAP برای ارقام مورد مطالعه، دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد.

بر اساس این دندروگرام در فاصله ۲۱٪ رقم‌های شاهرود ۴۷، شاهرود ۴۰، مورپاک، جهانگیری در گروه اول، ارقام نوری دیررس، شاهرود ۷۲، شاهرود ۱۲، شاهرود ۵۲، شاهرود ۵۰، نصیری، نوری پیش‌رس، شاهرود ۸، شاهپسند، قیصی ۲، شاهرود ۴۳ و خیمه‌ای در گروه دوم، استیوت مراغه، قوامی و شاهرود ۵۵ در گروه سوم، دیر رس دیزج در گروه چهارم و تنسگل در گروه پنجم جای گرفت. ارقام استیوت مراغه و قوامی که هر دو دیرگل و نسبتاً مقاوم به سرما هستند در یک گروه قرار گرفتند. ضمن اینکه رقم دیررس دیزج و دیرگل تنسگل به یک گروه متعلق گردیدند. ارقام شاهرود ۸ و نصیری که دارای شکل و طعم مناسب می‌باشند در فاصله ۳۳٪ در یک گروه جای گرفتند و ارقام شاهرود ۸ که رقمی نسبتاً پیش‌رس است و نوری پیش‌رس در فاصله ۴۵٪ هم‌گروه شدند.



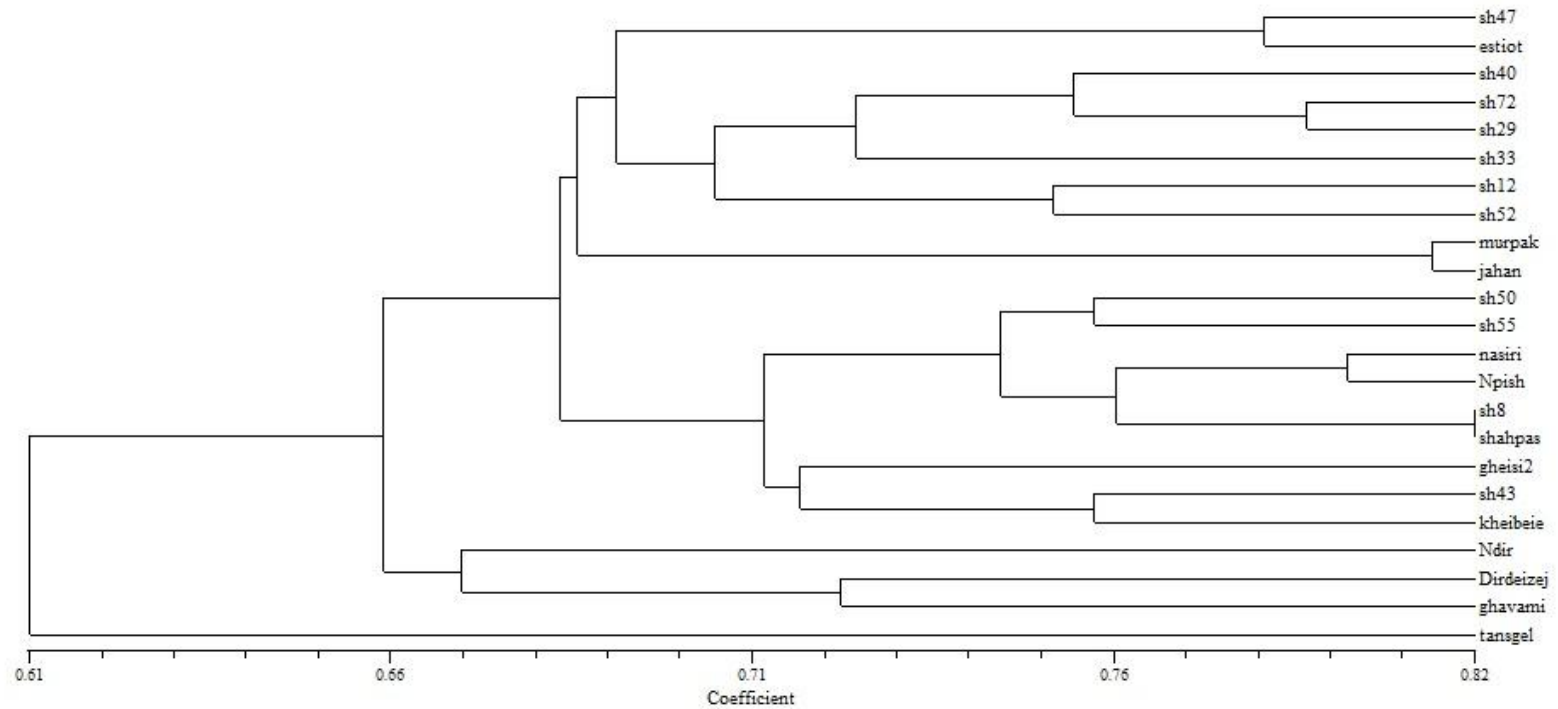
شکل ۴-۶- الگوی بانندی حاصل از آغازگر (LTR1+825)، تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، با ولتاژ ۱۲۰ ولت و مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد.

جدل ۴-۴- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی نشانگر REMAP

مؤلفه ها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۵/۴۴	۲۴	۲۴
۲	۱/۳۵	۵/۸۹	۳۰
۳	۱/۱	۴/۸	۳۴/۸
۴	۱/۰۷	۴/۷	۳۹/۵
۵	۱	۴/۳۷	۴۳/۸۵

همانطور که در نتایج حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی نشانگر REMAP مشاهده می کنید چند pc اول حداکثر ۳۰٪ تغییرات مربوط به تغییرات به تغییرات اولیه را توجیه می کنند. هر چند که این نتایج ممکن است از نقطه نظر آماری و نمایش گرافیکی مناسب نباشند ولی از نقطه نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگر ها از کل ژنوم می باشد . به این ترتیب که هر یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش های متفاوت ژنوم بوده، بنابراین دارای همبستگی کمتری هستند.

شکل ۴-۷- دندروگرام حاصل از نتایج نشانگرهای REMAP + IRAP



۴-۱-۵- تجزیه آنالیز خوشه‌ای برای نشانگر IRAP+REMAP

بر اساس این دندروگرام در فاصله ۶۷٪ ارقام شاهرود ۴۷، استیوت مراغه، شاهرود ۴۰، شاهرود ۷۲، شاهرود ۲۹، شاهرود ۳۳، شاهرود ۱۲، شاهرود ۵۲، مورپاک، جهانگیری، شاهرود ۵۰، شاهرود ۵۵، نصیری، نوری پیش‌رس، شاهرود ۸، شاهپسند، قیصی ۲، شاهرود ۴۳ و خیمه‌ایدر گروه اول، نوری دیررس، دیررس دیزج و قوامی در گروه دوم، و رقم تنسگل در گروه سوم قرار گرفت. طبق این طبقه‌بندی ارقام نصیری و خیمه‌ای که هر دو به سرمای بهاره مقاومت نسبی دارند در یک گروه جای گرفتند و رقم قیصی ۲ که زودگل‌ترین رقم کلکسیون اساس و نوری پیش‌رس که از جمله ارقام زودگل و زودرس می‌باشد هم گروه شدند. همچنین اینکه در فاصله ۶۷٪ همه ارقام شاهرودی که یک گروه قرار می‌گیرند که می‌توان احتمال داد شرایط محیطی یکسان و همچنین تنش‌های زنده و غیر زنده مشابه باعث الحاق رتروترنسپوزونی یکسان گردیده است. همچنین که ارقام شاهرود ۸ و نصیری که هر دو دارای شکل و طعم مناسب می‌باشند در یک طبقه جای گرفتند.

جدول ۴-۵- انتخاب بهترین مارکر برای گروه بندی واریته ها

	IRAP	REMAP	IRAP +REMAP
r	۰/۸	۰/۷۴	۰/۷۵
p	۱	۱	۱

تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک، که در آن همبستگی بین ماتریس شباهت یا فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه‌ای با ماتریس کوفنتیک که بر اساس دندروگرام که به عنوان خروجی تجزیه می‌باشد، برای هر نشانگر برآورد گردید. نتایج حاکی از این است که نشانگر IRAP با ضریب همبستگی ۴/۰ به عنوان مناسب‌ترین روش تجزیه و تحلیل تلقی گردید.

۴-۲- نتیجه‌گیری

نتایج حاصله نشان داد که اگرچه تنوع قابل توجهی در بین ارقام مورد مطالعه وجود دارد ولی سطح تنوع اغلب آنها نزدیک به هم می‌باشد. زیرا تمایز کمی در بین گروه‌های اصلی و فرعی در دندروگرام حاصل از ماتریس تشابه وجود دارد. این موضوع شاید ناشی از این امر باشد که به دلیل داشتن ژنوم نسبتاً کوچک، میانگین ضریب تشابه ژنوتیپ‌های زردآلو بالا می‌باشد. اندازه ژنوم *Prunus armeniaca* حدود $5/8 \times 10^8$ جفت باز است که حدود ۲ برابر اندازه ژنوم *Arabidopsis thaliana* و در حدود ژنوم دو گونه مهم دیپلوئید در جنس *Prunus* با $n=8$ یعنی هلو و گیلاس ($5/8 \times 10^8$ جفت باز) قرار دارد (Arumunganathan & Earle., 1991). اگر چه بیشتر تولید زردآلو در جهان در کشورهای تولید کننده از ارقام محلی است (Bassi., 1991)، ولی بسیاری از ارقام، به گروه اروپایی تعلق دارد که پایه ژنتیکی محدودی دارد (Mehlenbacher et al., 1991). این موضوع علاوه بر ژنوم کوچک که سبب کاهش سطح تنوع زردآلو می‌شود، ناشی از کاهش تدریجی تنوع ژنتیکی در طی روند گزینش و گسترش آن از آسیای مرکزی به طرف اروپا بوده است. بنابراین، ایران که به مرکز پیدایش زردآلو نزدیک‌تر است دارای تنوع غنی‌تری می‌باشد که لازم است با جمع‌آوری گسترده‌تری از ژنوتیپ‌ها و ارقام از مناطق مختلف ایران به این گستره ژنتیکی دسترسی بهتری پیدا نمود.

۴-۳- پیشنهادات

- بررسی‌های بیشتر سیتولوژیکی و مولکولی رقم تنسگل برای کشف هویت واقعی این رقم انجام گیرد.
- جهت بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای دیگر نیز استفاده شود و نتایج حاصل از آنها را با نتایج به دست آمده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی مقایسه شوند و نشانگرهای برتر برای بررسی روابط بین ارقام مختلف معرفی شوند.
- تنوع ژنتیکی، ارقام دیگر موجود در کشور نیز با استفاده از نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق مورد بررسی قرار گیرند.
- با توجه به وجود ارقام زیاد زردآلو در سرتاسر کشور ایران، لزوم تحقیقات بیشتر و شناسایی جنبه‌های ژنتیکی این درخت در تحقیقات گسترده‌تر و کامل‌تر حس می‌شود.
- از نشانگرها برای پیدا کردن ژن‌های مطلوب و استفاده از آنها در برنامه‌ی به‌نژادی کمک گرفته شود.
- ارتباط بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی روشن گردد.

منابع:

- باقری، ا. یزدی صمدی، ب. تائبف م. احمدی، م. (۱۳۸۰) " بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی گلرنگ ایران " مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۲، شماره ۲: ص ۲۹۵-۳۹۷.
- جنتی‌زاده، ع. فتاحی‌مقدم، م. زمانی، ذ. زراعتگر، ه. (۱۳۹۰) " بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های زردآلو با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگر RAPD " مجله علوم باغبانی ایران، جلد ۴۲، شماره ۲۵۵: ۳-۲۶۵.
- دشتی ح. (۱۳۷۹)، رساله دکتری: " بررسی ارتباط کروموزوم‌ها و مارکرهای مولکولی با صفات کمی در گندم با استفاده از رگه‌های جایگزین شده کروموزومی و هاپلوئیدهای دوبرابر شده "، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۶۸ صفحه.
- راجی، م. فتاحی مقدم، م. عبادی، ع. (۱۳۹۲). " بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام و ژنوتیپ‌های زردآلو با استفاده از نشانگر SSR " ویژه‌نامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.
- صفایی، ن. سیفی نبی آباد، ح. امینی، م. (۱۳۸۹). " نشانگرهای مولکولی در بیوتکنولوژی کشاورزی " کشاورزی (چاپ اول) نشر حق شناس.
- عبدالهی، ب. بی همتا، م. شولمن، آ. زالی، ع. نقوی، م. (۱۳۸۸). " ارزیابی رتروترانسپوزون ها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم " مجله ژنتیک نوین، دوره چهارم، شماره ۱: ص ۲۵-۱۷.
- عبدمیشانی، س. و شاه نجات بوشهری، ع. ا. (۱۳۷۷). اصلاح نباتات تکمیلی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه
- فرشادفر ع. (۱۳۷۴). " کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات " جلد اول، انتشارات طاق بستان دانشگاه رازی، صفحات ۲۷۵-۳۰۲.
- قره یاضی، ب. (۱۳۷۵). کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۳۲۸-۳۸۰.

قنادها م.، زهراوی م.، وحدتی ک. (۱۳۸۲). "اصلاح گیاهان باغبانی" چاپ اول، نشر موسسه فرهنگی هنری دیباگران، تهران، ص ۳۴۴.

گروسی ق. و وجدانی پ. (۱۳۷۱) "بررسی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی نخودهای ایرانی در رابطه با اقالیم مختلف کشور" مجله تحقیقات کشاورزی نهال و بذر، جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۷-۱۵.

مجیدی، م. ارزانی، ا. (۱۳۸۸) "مطالعه روابط بین صفات مورفولوژیک، زراعی و کیفی در توده‌های اسپرس" مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد شانزدهم، شماره دوم: ۱۵۲-۱۷۲.

محمدزاده، س. بوذری، ن. عبدوسی، و. (۱۳۹۲) "ارزیابی خصوصیات پومولوژیکی، مورفولوژیکی و ژنتیکی تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های بومی زردآلوی ایران" مجله علوم باغبانی ایران، جلد ۴۴، شماره ۲: ۱۷۹-۱۹۱.

نقوی، م. ر. قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۷. نشانگرهای مولکولی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۴۲ صفحه.

مجیدیان، پ. زین‌العابدینی، م. دژم پور، ج. ۱۳۹۰. مطالعه تنوع ژنتیکی و گروه‌های جغرافیایی برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های زردآلو با استفاده از نشانگر AFLP. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۳. شماره ۱.

Agrawal A.F. and A.D. Wang. (2008). Increased transmission of mutations by low-condition females: Evidence for condition-dependent DNA repair. *PLoS Biol.*, 6: e30. Available from PLoS here.

Antonio M, Lanacio M (2005) Retrovirus- like elements in plants. Recent Research Development of Plant Science 3: 1-10

Arumuganathan, K. & Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208-218.

Arzani, K. & Goharkhay, S. (2005). Self-compatibility and cross-compatibility studies on commercial sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars in Iran. 5th international cherry.

Badanes, M.L.; Asins, M.J.; Carbonell, E.A. & Llacer, G. (1996). Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant. Breed.* 115, 133-139.

-
- Badanes, M.L.; Martinez-Calvo, J. & Llacer, G. (1998). Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group. *Euphytica* 102, 93-99.
- Balta F., Kaya T., Yarilgac T., Kazankaya A., Balta, M.F., Koyuncu M.A. (2002): Promising apricot genetic resources from the Lake Van Region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 409-413.
- Bassi, D. (1999). Apricot culture: present and future. *Acta Horticulturae*, 488: 35-40.
- Baumel, A., Ainouche, M., Kalendar, R., Schulman, A.H., (2002). Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). *Mol. Biol. Evol.* 19: 1218–1227.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. (1996). *Ecology: Individuals, Populations, and Communities*, 3rd edition. Blackwell Science Ltd., Cambridge, MA. .
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Biology*, 32:314-331.
- Bréto, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A., Asins, M.J., (2001). The diversification of *Citrus clementine* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol. Phylogenet.* 21, 285–293.
- Branco, C.J.S., Vieira, E.A., Malone, G., Kopp, M.M., Malone, E., Bernardes, A., Mistura, C., Carvalho, F.I.F., Oliveira, C.A., (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J. Appl. Genet.* 48: 107–113.
- Byrne DH, Littleton TG (1989). Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of the American Society for Horticulture Science* 114: 674-678.
- Casas , A. , A. Valiente-Banuet , A. Rojas-Mart í nez , and P. Davila . (1999). Reproductive biology and the process of domestication of the columnar cactus *Stenocereus stellatus* in central Mexico. *American Journal of Botany* 86: 534 – 542 \.
- Castelo, J., Branco, S., Eduardo, A., Vieira, G., Malone, H., Mauricio, M., Kopp, F., Emilia, M., Albina, B., Claudete, C., Mistura, F., Fernando, I.F., Carvalho, H., Costa, A. and Oliveira, G. (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice., *J Appl Genet* 48(2):107–113.
- Dejampoor, J. (2006). Study of self-incompatibility and select the best of polynizer in some of Apricot cultivars. (Annual Report 2006). Agriculture and Natural resources institute, Azarbayjan – e – Sharghi. Iran. (In Farsi).

-
- Dwivedi SK, Kareem A and Ahmed Z (2007). Apricot in Ladakh. Field Research Laboratory, DRDO, C/o 56 APO, Leh, Ladakh.
- Dombroski, BA., Feng, Q., Mathias, SL., Sassaman, DM., Scott, AF., Kazazian, HHJr. and Boeke, JD. (1994), An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1994 Jul; 14(7):4485-92.
- El-Sharkawy, A., Youssef, M., Sawsan, S., Moghaieb, R., Sobhy, E., Mergawy, R., Mohammed, Etr H. K. (2009). Cultivar Identification and Genetic Fingerprinting of Some Apricot (*Prunus armeniaca*) Cultivars Using Biochemical and Molecular Markers. *Agriculture & Biological Sciences.* 5: 864-670.
- Ercisli, S., Agar, G., Yildirim, N., Esitken, A., Orhan, E. (2009). Identification of apricot cultivars in Turkey (*Prunus armeniaca* L.) using RAPD markers. *Romania Biotechnological Letters.* 14: 4582-4588.
- Errika, RH., Gao, X. and Voytas, DF. (2004). The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology.* 5: 225-231.
- Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman, London.
- FAO. (2011). Food Agriculture Organization statistics online. <http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq2/en>.
- Faust M, Surányi D, Nyujtó F (1998). Origin and dissemination of apricot. *Horticultural Review* 22:225-266.
- Flavell, A-J., Knox, M-R., Pearce, S-R., Ellis, T-H-N. (1998) Retrotransposonbased insertional polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J* 16:643–650.
- Foisset, N., Deloume, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S. and Renard, M. (1990). Molecular mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a double haploid progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 93:1011-1025.
- Galet, P. (1998). Cépages et Vignobles de France, Tome 1. Les Vignes Américaines, 2nd end. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France. Galet, P. Dictionnaire Encyclope'dique des Ce'pages. Hachette for reversible genome expansion. *Genome Res* 10: 908–915.
- Galleta, G.J. and Himelrick. (1999). Small Fruit Crop Management, Prentice and Hall, USA.
- Georgi, B., Sevdalin, G., Stephen, P., 2010. Retrotransposons and ethyl methanesulfonate-induced diversity in hexaploid wheat and Triticale. *Cent. Eur. J. Biol.* 5, 765–776.

-
- Ghareyazi, B. (1998). The application of DNA markers in plant breeding. Proceedings of the Fourth Conference on Agronomy and Plant Breeding. Sanati Isfahan University.; 42(2): 328-381.
- Ghasemi, K. (1999). Investigation on genetic diversity in cotton genotypes by RAPD markers. MSc thesis in plant breeding, Tehran University.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. and Smith, L.W. (1997). Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524–1528.
- Grandbastien MA (1992) Retroelements in higher plants. *Trends in Genetics* 8:103-108.
- Grandbastien MA (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Science* 3:181-187.
- Grzebelus, D (2006) Transposon insertion polymorphism as a new source molecular markers. *J. Fruit and Ornament. Plant Research* 14: 21-29.
- Guo, D.L., Zhang, H.Q., Luo, Z.R., 2005. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Sci.* 170, 528–533.
- Hafeze, E., Ghany, A.G.A.A., Zakil, E.A., 2006. LTR-retrotransposons based molecular markers in cultivated Egyptian cottons *G. barbadense* L. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 1200–1204.
- Hagen LS, Khadari B, Lambert P, Audergon JM (2002). Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics* 105:298-305.
- Hormaza, J. I. (2002). Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 321–328.
- Hormaza, J. I., Yamane, H. & Rodrigo, J. (2007). Apricot. In: *Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts.* (pp. 171-178) Springer science.
- Hurtado, M. A., Westman, A., Beek, E., Abbott, G. A., Lla'cer, G. Badenes, M.L. (2002). Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica*, 127-297.
- Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11(2):37-50.
- Jobson, J.D. (1992). *Applied Multivariate Data Analysis. Volum H, Categorical and Multivariate Methods.* Springer-Verlag, New York. 23: 65-86.

-
- Jia, H.Z., (2008). Establishment of three retrotransposon-based molecular markers and their application in identification of apple bud mutations. Nanjing Agricultural University, 38.
- Jothi, M.P. (2008) Genetic distance and phylogenetic inference, Course notes, University of Putra Malaysia.
- Kalendar, R., Flavell, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste, T., Moisy, C., and Schulman, A.H. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106, 520–530.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques., *Theor Appl Genet*, 98:704–711.
- Kalendar, R., Flavell, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman, A.H. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, *Heredity*, 106:520–530.
- Karp, A., Issac, P. and Ingram, D. (1998). Molecular tools for screening biodiversity. 1st edition. Chapman and Hall, London, UK. 528.
- Kimar, L.S. (1999). DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17:143-182.
- Kristiina, A.K., Kalendar, R., Schulman, A.H., 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theor. Appl. Genet.* 112, 999–1008.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304:982.
- Kostina KF (1970) Self-fertility studies in apricot (in Russian). *Trud Gos Nikit Botan Sada XLV*: 7-17.
- Kumar, A., Bennetzen, J. (1999). Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetic*. 33: 479-532.
- Kumar, S. (1999), DNA markers in plant improvement, An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.
- Kumar, M., Mishra, P., Singh, R., Kumar, J., Naik, K., Singh, S., (2009) Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiol. Mol plants*.15:225-236.

-
- Kuykendall, D., Shao., J, Trimmer, K. (2009). A Nest of LTR Retrotransposons Adjacent the Disease Resistance-Priming Gene NPR1 in Beta vulgaris L. U.S. Hybrid H20. International Journal of Plant Genomics, Volume, Article ID 576742.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature; 409: 860-921.
- Legendre, P. and Legendre, L. (1998). Numerical Ecology. Second English Edition. Developments in Environmental Modelling 20. Elsevier, Amsterdam.
- Levadoux, L. (1956) Les populations sauvages et cultivées de Vitis vinifera L. Ann. Ame'lior. Plantes 6: 59–117.
- Li, W., Zhang, P., Fellers, JP, Friebe, B. and Gill BS. (2004). Sequence composition, organization and evolution of the core Triticeae genome. The Plant J 40: 50-511.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, AL., Matsudaira, P., Baltimor, D. and Darnell, J. (2003). Molecular Cell Biology. 5th editions, W.H. Freeman . New york.
- Layne, R.E.C.; Bailey, C.H. & Hough, L.F. (1996). Apricots. J. Janick and J.M. Moore (Eds.) In: Fruit Breeding, 1: Tree and tropical fruits, pp. 79-111, John Willey and Sons New York.
- Mcharo, M., Labonte, D.R., Oard, J.H., Kays, S.J. and Mclaurin, W.J. (2004). Linking quantitative traits with AFLP markers in sweetpotatos using discriminant analysis, Acta Hort., Nucleic Acids Research, 637: 258-293.
- Mehlenbacher SA, Cociu V, Hough LF (1991). Apricots (*Prunus*). In: Moore, J.N., J.R. Ballington (eds) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. International Society for Horticulture Science 65-107.
- Mir, J., Ahmed, N., Rashid, R., Wani, S., Sheikh, M., Mir, H., Parveen, I., Shah, S. (2012). Genetic diversity Analyze in apricot (*Prunus armeniaca* L.) germplasms using RAPD markers. Indian journal Biotechnology. 11:187-190.
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43: 1235-1248.
- Mondini, L., Noorani, A., A. Pagnotta, M. (2009). Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools, Diversity 2009 1:19-35.
- Murry, H.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA . Nucleic Acids Research, 8:4321-4325.

-
- Nair, A.S., Teo, C.H., Schwarzacher, T., 2005. Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. *Euphytica* 144, 285–290.
- Natali, L., Giordani, T., Buti, M., Cavallini, A., 2007. Isolation of Ty1-copia putative LTR sequences and their use as a tool to analyse genetic diversity in *Olea europaea*. *Mol. Breed.* 19, 255–265.
- Nina F (2000) Transposons and genome evolution in plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97: 2002-2007.
- Ohta, T. (1992). The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 23:263-286. United States of America.
- Pashkoulov D, Givondov A, Yliev P (1995). Isozyme variability in plum (*Prunus- domestica*), and its use for cultivar and interspecific hybrid identification. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 9:33-35.
- Prieto, JL., Pouilly, N., Jenczewski, E., Deragon, JM. and Chevre, AM. (2005). Development of crop-specific transposable element (SINE) markers for studying gene flow from oilseed rape to wild radish. *Theor Appl Genet* 111: 446–455.
- Rasoulzadegan, Y. (1991). *Fruit Tree Cultivation in Moderate Climates*. 1th Ed. Sanati Isfahan University publications.
- Reddy, M.P., N. Sarla, C.N. Neeraja and Siddiq, E.A. (2000). Assessing genetic variation among Asian A-genome *Oryza* species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. *Fourth International Rice Genetics Symposium*, 22–27 October 2000, IRRI, Philippines. Abstracts p. 212.
- Rogstad, S.H. (1996). Assessing genetic diversity in plants with synthetic tandem repetitive DNA probes. *Stadler Genetics Symposium Series*, 21:1-14.
- Rohlf, F. J. 1972. An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy. *Syst. Zool.* 21: 271-280.
- Romero, C., Pedryc, A., Muñoz, V., Llácer, G., Luisa Badenes, M. (2003). Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*. 46(2): 244-252.
- Ruthner, Sz., Pedryc, A., Kriska, B. Romero, C. Badenes, M.L. (2006). Molecular characterization of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars using cross species SSR amplification with peach primers. *International Journal of Horticultural Science*, 12 (3): 53–57.

-
- Sabot, F. and Schulman, AH. (2007). Template switching can create complex LTR retrotransposon insertions in Triticeae genomes. *BMC Genomics*, 8:247.
- Saburi, H., Nahvi, M., Torabi, A. and Kanoni, M.(2008). Classification of rice varieties at different levels from the osmotic potential of sorbitol based on cluster analysis and fisher linear functions. *Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding*, August, Karadj, Iran, *Crop Science Societ.*, 7: 327-340.
- Sánchez-Pérez, R., Martínez-Gómez, M., Dicenta, F., Egea, J. & Ruiz, D. (2006). Level and transmission of genetic heterozygosity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) explored using simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 763–770.
- SanMiguel P, Tikhanov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* . 274: 765-768.
- SanMiguel, P. J. L. (1988). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergen retrotransposons., *Annals of Botany*, 37-44.
- Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Sauer, S., Gelfand, D.H., Boussicault, F., Bauer, K., Flachmeier, C., Kidd, K.K., Berrettini, W.H. and Church, G.M. (2000). A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* March 1; 28(5): 13.
- Scarano, T., Abbate, L., Ferrante, S., Tusa, N. and Lucretti, S. (2002). ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep* 20:1162–1166.
- Schulman, AH., Flavell, AJ. and Ellis, THN. (2004a), The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants, *Methods Mol Biol*, 260: 145–173.
- Schulman, AH., Gupta, PK. and Varshney, RK. (2004b). Organisation of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, in *Cereal Genomics* (eds. P.K. Gupta and R.K. Varshney), 83–118.
- Schulman, AH. (2007), Molecular markers to assess genetic diversity, *Euphytica*, 158: 313-321.
- Schulman, AH., Gupta, PK. and Varshney, RK. (2004b). Organisation of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes., in *Cereal Genomics* (eds. P.K. Gupta and R.K. Varshney), 83–118 (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands).

-
- Senkova,S., Bezo, M., LABAJOVA, M. (2012). IRAP marker trim retrotransposon slivky domacej IRAP markers of plum trim retrotransposon., Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 29-33.
- Senkova, S., Žiarovská, J., Bezo, M., Štefúnová, V., Ražná, K. (2013). Bioscience Research, 10(1): 01-07.
- Shapiro J (1999) Transposons as the key to a 21st century view of evolution. *Genetica* 107:171-179.
- Shirasu, K., Schulman, A.H., Lahaye, T., Schulze-Lefert, P. (2000). A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet* 110: 819–831.
- Spagnoletti, P.L. Qualset, C. O. (1987). Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. *Crop Science*, 27: 235-241.
- Sokal, R. R., C. D. Michner. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ, Kons. Sci. Bull.*, 38: 1409-1438.
- Thomas R, Vassiliadis C, Vassiliadis M (2005) Phenotypic impact of repetitive DNA in flowering plants. *New Phytologist*. 168 (1): 71-80.
- Vavilov NI (1951). Phytogeographic basis of plant breeding. The origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. K.S. Chester. *Chronol. Bot.* 13:13-54.
- Vicient, C.M., Kalendar, R, Ananthawat-Jonsson, K., Suoniemi, A., Schulman A. (1999). Structure, functionality, and evolution of the BARE-1 retrotransposon of barley, *Genetica* 107: 53–63.
- Wang, Z., Weber, J-L., Zhong, G., Tanksley, S-D. (1994). Survey of plant short tandem DANN repeats. *Theor Appl Genet* 88:1–6.
- Wang, F., Tong, z., Sun, J., Shen, Y., Zhou, J., Gao, Z., Zhen. (2010). Genome-wide detection of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *African Journal of Biotechnology* 9(50). 8583-8596.
- Wilhelm M, Wilhelm FX (2001) Reverse transcription of retroviruses and LTR Retrotransposons. *Cellular and Molecular Life Science*. 98:1246-1262.
- Wessler S , Bureau TE, White SE (1995) LTR retrotransposons and MITE: important players in the evolution of plant genome. *Current Biology* . 5:814-821.
- Wessler S(1996)Plant retrotransposons :turned by stress.*Current biology* 8:959-961.

-
- Xiao, B.G., Xu, Z.L., 2006. Retrotransposon-based molecular markers and their applications in crop genetics and breeding. *Biotechnol. Bull.* 4, 61–66.
- Yuying, S., Xiajun, D., Fei, W., Binhua, C., Zhihong, G., Zhen, Z. (2011). Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers. *Scientia Horticulturae* 132:50-58.
- Yilmaz, K.U., Ercisli, S., Murat Asma, B., Dog̃an, Y., Kafkas, S. (2009). Genetic Relatedness in *Prunus* Genus Revealed by Inter-simple Sequence Repeat Markers. *Hortscience* 44(2):293–297.
- Yilmaz, K.U., Paydas-Kargi, S., Dogan, Y., Kafkas, S. (2012). Genetic diversity analysis based on ISSR, RAPD and SSR among Turkish Apricot Germplasms in Iran Caucasian eco-geographical group. *Scientia Horticulturae*. 138:138-143.
- Zhebentyayeva, T.N. & Sivolap, Y.M. (2000). Genetic diversity of apricot determined by isozyme and RAPD analyses. *Acta Hort.* 538, 525-529.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zohary, D. and Hopf, M. (1993). Domestication of plants in the old world. Oxford, Clarendon Press. P.143-150.

Abstract

Retrotransposons are current component of plant genomes. Ubiquitous, activity and abundant of retrotransposons thorough the plant genome, make them useful molecular marker. We used inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) and retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers to assess genomic diversity levels and survey the activity of LTR retrotransposon elements in 23 cultivars apricot. In this study out of 11 combined primers, 9 primers produced scorable and polymorphic banding patterns. This 9 primers produced 168 bands so 168 bands showed acceptable polymorphism. The number of replicated fragments by different primers were varied, the highest number of fragments was 26 belong to REMAP (LTR6+P9) primers and the lowest of them was 11 belong to IRAP (LTR10) primer. The highest Shannon's variation coefficient and observed heterozygosis belong to LTR13 primer from IRAP primers so that probability indicated IRAP marker with regard to other studied markers was better.

Keywords: apricot, retrotransposon, genetic diversity, IRAP, REMAP, cluster analysis, Principal Component Analysis



Shahrood University of Technology

Faculty: Agricultural Biotechnology

**Evaluation of retrotransposons as molecular markers for
genetic diversity study of apricot genotypes.**

Anahita Panji

Supervisor(s):

Dr. Shahrokh Gharanjik

Dr. Naser Farrokhi

September 2014
