مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۱۴۸-۱۳۳)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 133-148

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم و ترانسکریپتوم در حفاظت و مدیریت ذخایر توارثی برخی از گیاهان زراعی و باغی ایران

محمدعلی ابراهیمی[۱]، مهرشاد زین‌العابدینی[۲]*
۱، استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲، استادیار بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Application of Genomic and Unigene-based Microsatellite markers in Conservation and Management of Genetic Resources of Some Iranian Crops

M. A. EBRAHIMI[1], M. ZIENALABEDINI[2]*
1, Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran;
2, Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
(Received: April 21, 2013 - Accepted August 26, 2013)

چکیده

امروزه با توجه به درک اهمیت اقتصادی، اکولوژیک، فرهنگی و اجتماعی تنوع زیستی، گام‌هایی در راستای شناسایی، تعیین کمیت، شناخت نحوه توزیع و روابط ژنتیکی برداشته شده است. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی از جنبه‌های مختلف از جمله بررسی پراکنش تنوع آللی، ساختار ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین و درون جوامع، گونه‌ها و افراد مختلف، از جمله دغدغه‌های علوم زیستی به‌شمار می‌آید. در این ارتباط و با توجه به اهمیت شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی، اطمینان از موجودیت دائمی آن‌ها و به‌کارگیری این منابع به عنوان ابزاری مناسب جهت تسهیل فرآیندهای اصلاحی و استراتژی‌های مدیریتی، کارایی برخی از روش‌های مختلف ژنتیکی و ژنومیک مانند نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم و ترانسکریپتوم، در بررسی برخی از گیاهان زراعی و باغی مانند زعفران و نیز گونه‌هایی از جنس *Prunus* و *Punica* مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین نشانگرهای به‌کار رفته در مطالعات فوق، نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم، اطلاعات پیرامون فرآیندهای مرتبط با بخش‌بندی رویشگاه‌ها و جمعیت‌های کوچک، توزیع تنوع آللی، ارایه الگوهای مدیریت ژرم‌پلاسم و روابط ژنتیکی در زمینه ژنتیک حفاظتی را بهبود بخشیده است. علاوه بر این، روش ترانسکریپتئومیک و ژنومیک، امکان مطالعه تنوع فعالیت ژن‌ها، ناشی از عملکرد حاصل از بخش‌بندی رویشگاه، تنوع میزان مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و تغییرات محیطی، و شناسایی نشانگرهای مناسب برای انجام برخی از مطالعات مانند گزینش به‌کمک نشانگر را میسر می‌کند. در این مقاله ما تشریح کرده‌ایم که چگونه تلفیق تنوع ژنومیک و ترانسکریپتوم به همراه ابزار جدید بیوانفورماتیک در برخی گونه‌های مهم زراعی و باغی می‌توانند شناسایی تأثیرات نسبی تهدیدهای ژنتیکی و محیطی را بهبود بخشیده و چشم اندازهای جدیدی را در مطالعات حفاظت از ذخایر توارثی بگشایند.

واژه‌های کلیدی: تنوع زیستی، نشانگرهای ریزماهواره، ژنومیک، ترانسکریپتومیک، روش های آماری

Abstract

Today with appropriate understanding of economical, ecological, cultural and social importance of biodiversity, significant progresses have been made toward identification, quantification, finding distribution patterns and genetic relationships of this diversity. In addition, analysis of genetic variation of various aspects such as distribution of allelic diversity, genetic structure and kinship relationships between and within populations, individuals and species is one of the main concerns in biological sciences. In this regard, and with respect to the importance of identification, preservation and maintenance of these genetic pools, to ensure the permanent existence of them and using those resources as a tool for facilitating management strategies and breeding processes, the efficiency of some different genetic and genomic methods including genome and transcriptome based microsatellites have been evaluated in some crop plants, i.e. saffron, and some species belonging to genus *Prunus* and *Punica*. Through the development of different molecular markers used in the above-mentioned studies, genome-based microsatellite markers have significantly improved our knowledge on the processes related to habitat segmentation and small populations, distribution of allelic diversity, patterns of germplasm management and finally genetic relationships in the field of genetic conservation. Recently, availability of next generation sequencing tools provided access to huge amount of transcriptomic and genomic sequences. This has allowed us to, a) investigate the diversity of gene functions caused by habitat segmentation, b) assess diversity of responses to biotic and abiotic stresses as well as environmental changes and, c) identify suitable markers to be used in studies such as marker-assisted selection. Here we discuss how the integration of genomic and transcriptomic variations backed up with new bioinformatic tools could improve the identification of relative influences of genetic and environmental threats and open up new frontiers in conservation studies.
Keywords: Biodiversity, Microsatellite markers, Genomic, Transcriptomic, Statistical methods

نویسنده مسئول: مهرشاد زین‌العابدینی
E-mail: mzeinolabedini@mail.abrii.ac.ir

مقدمه

ذخایر ژنتیکی گیاهی اساس امنیت غذایی جهانی را تشکیل می‌دهند. این ذخایر متشکل از ارقام قدیمی و جدید، خویشاوندان وحشی زراعی و سایر گونه‌های وحشی هستند. متخصصین اصلاح نباتات، از تنوع ژنتیکی برای ایجاد گیاهان جدید برخوردار از عملکرد بیشتر، از طریق گزینش و اصلاح بهره می‌برند، به‌طوری‌که این گیاهان به آفات و بیماری‌ها مقاوم و به تغییرات محیطی سازگارتر باشند. انتظار می‌رود جمعیت جهان در سال ۲۰۲۰ به ۸ میلیارد نفر برسد. بدین ترتیب تولید مواد غذایی (عمدتاً غلات) باید به بیش از دو برابر میزان کنونی، یعنی حدود ۵ میلیارد تن در سال افزایش یابد. برای نیل به این هدف، بهینه‌سازی کاربرد تنوع ژنتیکی گیاهی در جهان الزامی به‌نظر می‌رسد. علاوه بر این، پیشرفت تکنولوژی و افزایش جمعیت انسان، از بین‌رفتن جنگل‌ها و مراتع، چرای بیش از حد، تغییر در الگوی کاربری اراضی و نیز به‌کارگیری ارقام جدید و یکنواخت از لحاظ ژنتیکی به‌جای ارقام محلی و بومی بسیار متنوع در اکوسیستم‌های کشاورزی، فشار پایداری را بر زیستگاه‌های گیاهی و جانوری وارد کرده و موجب کاهش چشمگیر تنوع زیستی شده است (Zeinalabedini *et al.*, 2011a). این مسائل در بلندمدت تأثیر شدیدی را بر امنیت غذایی خواهند داشت. البته در سال‌های اخیر، با توجه به درک اهمیت اقتصادی، اکولوژیک، فرهنگی و اجتماعی تنوع زیستی، گام‌هایی در راستای شناسایی، تعیین کمیت، نحوه توزیع و روابط تنوع زیستی برداشته شده است. تنوع زیستی ممکن است در سطح اکوسیستم، گونه و ژن ارزیابی شود. گرچه اهمیت تنوع اکولوژیک و تاکسونومیک در برنامه‌های حفاظتی و اصلاحی شناخته شده است، اما ارزش تنوع ژنتیکی همواره بیشتر مدنظر قرار دارد. برای مثال، با توجه به تناسب تغییرات تکاملی و تنوع ژنتیکی، ارتباط میزان هتروزیگوسیتی و سازگاری و نقش ذخایر ژنتیکی در فرآیندهای زیستی زیست‌کره، تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای[1] از اهمیت و اولویت بالاتری برخوردار است (Shafiee *et al.*, 2011). در این راستا، تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی از جنبه‌های مختلف از جمله بررسی پراکنش تنوع آللی، ساختار ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین و درون جوامع، گونه‌ها و افراد مختلف، از جمله دغدغه‌های علوم زیستی به‌شمار می‌آید.

1. Intra-specific

تمامی مطالعات مرتبط با تنوع ژنتیکی دارای چهار مؤلفه اصلی، فرضیه تحقیق، نوع نشانگر مناسب برای پاسخگویی به سوالات زیست‌شناختی، روش مورد استفاده در ایجاد و ارزیابی نشانگر و روش مورداستفاده در آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده، هستند. اکثر سؤالات مطروحه، پیرامون تنوع ژنتیکی گیاهی در محیط طبیعی[2] و خارج از محیط طبیعی[3] در یکی از سه گروه زیر طبقه‌بندی می‌شوند. در مرحله نخست سؤالات مبتنی بر شناسایی هویت[4] نمونه‌ها مورد بحث بوده و زمانی مطرح می‌شوند که شباهت ژنتیکی دو یا چند نمونه مورد سؤال باشد. از این‌گونه اطلاعات برای پاسخگویی به سؤالاتی مانند موارد زیر استفاده می‌شود: (الف) آیا دو یا چند نمونه از نظر ژنتیکی مشابه هستند؟ (ب) آیا در نمونه‌های موجود در بانک ژن، ارقام مترادف[5] یا هم‌نام[6] وجود دارد؟ (ج) آیا جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی متفاوتند، یا تنها زیرمجموعه‌های جداشده از یک جمعیت واحد هستند؟ (د) آیا با گذر زمان تبادلات ژنتیکی بین نمونه‌ها یا جمعیت‌ها رخ داده است؟ در مقابل، سوالات مرتبط با جایگاه یا شیوه‌های تشخیص[7] یک آلل یا توالی نوکلئوتیدی خاص در یک آرایه[8]، نمونه بانک‌ژن، جمعیتی در محیط طبیعی، فرد، کروموزوم یا قطعه‌ای از DNA همسانه‌سازی شده، مطرح می‌شود. این سؤالات در مواردی مانند موارد زیر مطرح می‌شود: – شناسایی افراد یا جمعیت‌هایی که دارای صفات مطلوبی هستند؛ تعیین اینکه آیا صفات از یک جمعیت حذف شده‌اند، یا از یک جمعیت گیاهی به جمعیت دیگری منتقل شده‌اند؛ مکان‌یابی موقعیت نشانگرها بر روی نقشه‌های فیزیکی یا ژنتیکی. در نهایت، سؤالات مرتبط با روابط و ساختارها[9] مطرح می‌شود که پاسخگوی شبهات موجود در زمینه روابط خویشاوندی، میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها، میزان تنوع ژنتیکی موجود و نحوه توزیع تنوع بین افراد، جمعیت‌ها و آرایه‌ها خواهد بود. این‌گونه سؤالات، برای بررسی اختلافات موجود در کلکسیون‌های بانک‌ژن، طرح‌ریزی استراتژی صحیح نمونه‌برداری از ژرم‌پلاسم‌ها و برنامه‌های باززایی، تشکیل کلکسیون‌های پایه[10]، مطالعه جریان‌ژنی[1] و تعیین

2. *In situ*
3. *Ex situ*
4. Questions of Identity
5. Synonymous
6. Homonymous
7. Questions of location and diagnostics
8. Taxon
9. Relationship and structure questions
10. Core collections

اندازه مناسب نمونه برای محافظت و نگهداری جمعیت‌ها و نمونه‌های بانک‌ژن مطرح می‌شود (Zeinalabedini *et al.*, 2011).

بنابراین برای یافتن پاسخ‌های صحیح در زمینه‌های ذکرشده، انتخاب نشانگرها و تکنولوژی‌های متناسب امری ضروری به‌شمار می‌آید. در سه دهه اخیر، روش‌های کلاسیک ارزیابی تنوع ژنتیکی (مانند مقایسه آناتومی، مورفولوژی، جنین‌شناسی و فیزیولوژی) به‌طور چشمگیری به‌وسیله روش‌های مولکولی تکمیل شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به تجزیه ترکیبات شیمیایی [۲] اشاره کرد. امروزه، روش‌های مولکولی مبتنی بر پروتئین یا DNA، در تحقیقات فیلوژنی، تاکسونومیک، اکولوژیک، ژنتیک و اصلاح، کاربرد وسیعی دارند. ابداع نشانگرهای مولکولی و آزمون‌های مرتبط با آن‌ها، از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و تا به امروز نیز ادامه دارد (Callow *et al.*, 1997). بعد از معرفی ایزوزایم‌ها به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی، استفاده از آن‌ها به سرعت افزایش یافت. با ظهور روش‌های توالی‌یابی DNA و آنالیز قطعات برشی از سال ۱۹۷۰، کاربرد نشانگرهای اسیدنوکلئیک به‌طور گسترده‌ای رایج شد. با معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۳] (PCR) در اواخر سال ۱۹۸۰، تعداد نشانگرهای مولکولی مختلف به‌طور روز افزونی افزایش یافت. همچنین با افزایش ابداع و معرفی نشانگرها و آزمون‌های مختلف، از هزینه به‌کارگیری آن‌ها کاسته شد و همزمان، دامنه سطوح مختلف رده‌بندی و بافت‌های گیاهی که می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند، افزایش یافت. بنابراین احتمال یافتن حداقل یک نشانگر برای پاسخگویی به سوالات مرتبط با تنوع در هر یک از سطوح رده‌بندی وجود دارد. دست‌یابی به فرصت‌های جدید ضرورتاً با دشواری‌هایی نیز روبرو است. البته، هیچ‌کدام از این معضلات مختص مطالعات مولکولی نیست، اما با افزایش تعداد نشانگرهای موجود، بر میزان این معضلات نیز افزوده خواهد شد. در تقابل با طیف وسیعی از تکنولوژی‌های مولکولی، انتخاب نوع نشانگر و روش تحقیقی که متناسب با سوال تحقیق، سطوح رده‌بندی موردنظر و محدودیت‌های خاص باشد، امری دشوار است. در این راستا، بهترین گزینه برای تأمین نظر محقق، استفاده از نشانگرها و روش‌هایی است که به‌وسیله سایر محققان مورد بررسی قرار گرفته و توصیه شده‌اند. همچنین با توجه به اینکه نشانگرهای مولکولی در اکثر سطوح رده‌بندی گیاهی و با حداقل مقدار بافت موردنیاز، قابل ارزیابی هستند، باید به گزینش روش اتخاذ شده توجه ویژه‌ای مبذول داشت. نظر به اینکه نشانگرهای مولکولی در سطح وسیعی قابل استفاده بوده و همواره تعیین محدودیت‌های آن‌ها میسر نیست، برنامه‌ریزی هوشمندانه در زمان طرح مطالعات مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهد بود.

مواد و روش‌ها

در راستای مقدمه ارائه‌شده و با توجه به اهمیت شناسایی ذخایر ژنتیکی در جهت حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی و اطمینان از موجودیت دائمی آن‌ها، به‌کارگیری این منابع به‌عنوان ابزاری مناسب جهت تسهیل فرآیندهای اصلاحی و استراتژی‌های مدیریتی، کارایی برخی از روش‌های مولکولی مختلف ژنتیکی و ژنومیک در بررسی برخی از گونه‌های زراعی مانند زعفران، و نیز گونه‌هایی از جنس *Prunus* و *Punica* مورد ارزیابی و مقایسه قرار می‌گیرد. همان‌گونه که اشاره شد، برای پاسخگویی مناسب به سوال تحقیق، انتخاب نشانگر متناسب در درجه اول اهمیت قرار دارد. این انتخاب به ویژگی‌های خاص هر نشانگر (تعداد، میزان چند شکلی و فرم)، منابع ژنتیکی، زمان و میزان بودجه تحقیقاتی بستگی دارد (Leveque and Mounolou. 2004). در این مطالعات، با توجه به اثبات کارایی نشانگرهای ریزماهواره به‌عنوان وسیله ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف و با هدف بررسی برخی از ایده‌های موجود در ژنتیک و ژنومیک حفاظتی، از نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم و ترانسکریپتوم موجود و یا شناسایی‌شده در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران استفاده شد. به‌عنوان مثال به‌منظور جداسازی و تعیین مشخصات نشانگرهای ریزماهواره زعفران، وجود توالی‌های تکرار دو و سه نوکلئوتیدی (GT)، (AC)، (AT)، (CT)، (ATT) و (CTT) در ژنوم تعدادی از ژنوتیپ‌های برتر با استفاده از روش FIASCO مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین تعداد دفعات تکرار توالی‌های ریزماهواره‌ها، توالی دو طرف آن‌ها شناسایی، مشخصات آن‌ها تعیین، آغازگرهای مناسب طراحی و با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران ارزیابی شد (Hinter and Markert. 1975). علاوه بر این، در پروژه دیگری RNA زعفران و لیمو، استخراج و سپس توالی‌یابی توسط دستگاه تعیین توالی سریع ایلومینا (Illumina Hiseq 2000, USA) انجام شد. از پشت‌سر

1. Gene flow
2. Metabolomics
3. Polymerase Chain Reaction

هم قراردادن این قرائت‌ها با کمک نرم‌افزار، با توجه توالی‌های مشترک انتهایی آن‌ها کانتیگ‌ها[1] و اسکفولدها [2] در نهایت یونی‌ژن‌ها[3] (توالی‌های با طول بلندتر) ایجاد گردید. پس از این مراحل، نواحی دارای توالی‌های تکراری توسط نرم‌افزار Primer 3 شناسایی و برای بررسی‌های فیلوژنی آغازگر طراحی گردید (Thomson *et al.*, 2010). به‌عنوان مثال، در زعفران تعداد ۸۶۰ آغازگر از یونی‌ژن‌های شناسایی‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی شناسایی شد که از میان آن‌ها ۴۰ آغازگر برای بررسی‌های فیلوژنی انتخاب شدند و در مراحل بعدی پروژه مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت. در موارد دیگر مانند *Prunus* و *Punica* نیز از روش مشابه یا از سایر آغازگرهای موجود استفاده شد (Nemati *et al.*, 2012; Zeinalabedini *et al.*, 2008b).

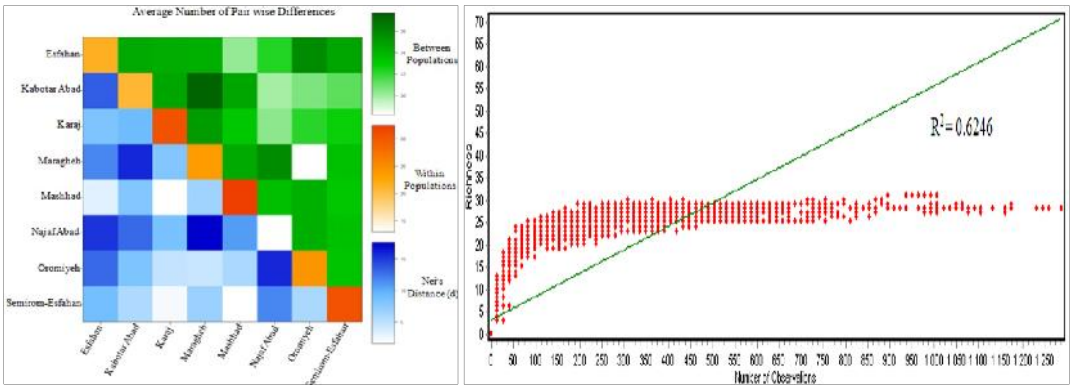
نتایج و بحث

از بین نشانگرهای شناسایی شده یا به‌کار رفته در مطالعات فوق، با به‌کارگیری نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم، در این گیاهان و بررسی منابع در ارتباط با تحقیقات مشابه، اطلاعات ما پیرامون فرآیندهای مرتبط با بخش‌بندی رویشگاه‌ها و جمعیت‌های کوچک در زمینه ژنتیک حفاظتی افزایش یافته است. این پیشرفت‌ها را می‌توان در چهار بخش طبقه‌بندی کرد.

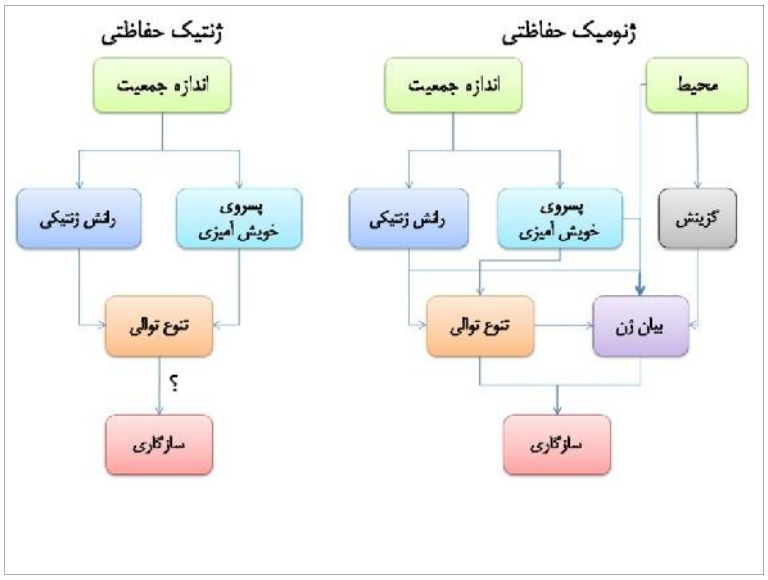
بخش اول: به‌کارگیری گسترده نشانگرهای مولکولی مانند ریزماهواره‌ها حجم وسیعی از اطلاعات را پیرامون تأثیرات اندازه کوچک جوامع بر میزان و توزیع تنوع ژنتیکی خنثی ایجاد کرده است. گرچه ممکن است، به‌جز موارد استثناء، عموماً جوامع کوچک، شاخص مناسبی برای سطوح پایین تنوع آللی بوده و سطوح هموزیگوتی را افزایش می‌دهند. ایده اصلی در ژنتیک حفاظتی این است که پویایی تنوع ژنتیکی در معیار مکان و زمان در جمعیت‌های کوچک و ایزوله، ممکن است توسط عوامل مختلفی مانند رانش ژنتیکی[4] و پسروی خویش‌آمیزی[5] تهدید شود. رانش ژنتیکی (نوسان تصادفی در فراوانی‌های آللی طی زمان) منجر به از دست‌رفتن برخی از آلل‌ها و تثبیت برخی دیگر از آن‌ها می‌شود؛ با توجه به ماهیت تصادفی رانش ژنتیکی، ممکن است برخی از آلل‌های موثر در سازگاری حذف شده و آلل‌های مضر در جمعیت تثبیت شوند. پسروی خویش‌آمیزی در ژنتیک حفاظتی، اغلب تحت عنوان پسروی خویش‌آمیزی دو والدی شناخته شده و فراوانی هموزیگوتی را در جمعیت افزایش می‌دهد. با توجه به این موارد، رانش ژنتیکی و پسروی خویش‌آمیزی حداقل سه نتیجه در بر خواهد داشت: الف) افزایش هموزیگوتی و نیز افزایش فراوانی آلل‌های مضر، منجر به رکود پسروی خویش‌آمیزی[6] شده و در نتیجه ممکن است قابلیت زنده‌مانی کوتاه‌مدت جمعیت را کاهش دهد. ب) از دست‌رفتن تنوع ژنتیکی توان سازگاری تکاملی جمعیت را کاهش داده و از این‌رو پتانسیل زنده‌مانی طولانی‌مدت جمعیت خصوصاً در شرایط محیطی متغیر را کاهش دهد. ج) و یا با توجه به رانش ژنتیکی مستقل در هر جمعیت، تمایز ژنتیکی جمعیت‌های کوچک ایزوله به‌شدت افزایش یافته و انجام تلاقی بین افراد این جمعیت منجر به رکود دگرگشنی[7] شود (Pirseyedi *et al.*, 2010; Frankham *et al.*, 2002). گرچه بر اساس ملاحظات تئوریک مطرح شده در فرضیه ژنتیک جمعیت، تأثیر این فرآیندها بر جوامع کوچک قابل پیش‌بینی می‌باشد، ارایه فناوری‌های مبتنی بر PCR، امکان شبیه‌سازی ژنتیک حفاظتی را فراهم ساخته است. وجود نشانگرهای مولکولی خنثی مانند ریزماهواره‌ها و AFLP، امکان ارزیابی رابطه میان اندازه جمعیت، سطح تنوع ژنتیکی و پسروی خویش‌آمیزی را میسر ساخته است (شکل ۱). در این شکل ارتباط مستقیم بین اندازه جمعیت گونه‌های مختلف جنس *Prunus* و میزان تنوع ژنتیکی موجود مشاهده می‌گردد. با بررسی‌های مولکولی انجام‌شده در هر یک از این جمعیت‌ها در می‌یابیم که میزان پتانسیل و تنوع‌ژنتیکی در جمعیت‌هایی که از تعداد کمتری افراد برخوردارند، پایین‌تر از جمعیت‌های بزرگتر بودند (Ouborg *et al.*, 2010). با بررسی منابع، در بسیاری از تحقیقات انجام‌شده نیز رابطه مستقیم بین اندازه جمعیت و تنوع ژنتیکی و ارتباط غیرمستقیم بین اندازه جمعیت و سطح پسروی خویش‌آمیزی درون جمعیت به اثبات رسیده است (Zeinalabedini. 2008). البته با توجه به محدودیت‌های موجود در زمینه تعداد نشانگرهای مولکولی خنثی مورد استفاده، هنوز مسائل حل‌نشده متعددی بدون جواب باقی مانده است. استفاده از این نشانگرها از ارزیابی انتخابی تنوع ژنتیکی ممانعت کرده و

1. Contig
2. Scaffold
3. Unigene
4. Genetic drift
5. Inbreeding
6. Inbreeding Depression
7. Outbreeding Depression

مطالعه برهمکنش میان اثرات ژنتیکی و محیطی بر سازگاری را دشوار می‌کند. اگرچه نشانگرهای به‌کار رفته در روش‌های تعیین همبستگی، تلاش می‌کنند تا ارتباط میان تنوع ژنتیکی، اندازه جمعیت و نیز سازگاری را شناسایی کنند، اما ابزاری را برای مطالعه مکانیسم‌های موجود در فرآیندهای مهمی نظیر رکود پسروی خویش‌آمیزی و سازگاری محلی فراهم نمی‌سازند. با ایجاد روش‌های نوین ژنومیکس و در دسترس قرارگرفتن منابع ژنومیک جدید، حتی برای گونه‌های اکولوژیک مدل، فرصت‌های تازه‌ای برای پاسخگویی به این سوالات ایجاد شده است (شکل ۲) (Leimu *et al.*, 2006). از جمله مواردی که با به‌کارگیری ژنتیک حفاظتی بی‌پاسخ مانده است، می‌توان به این موارد اشاره نمود: الف) در جمعیت‌های ایزوله کوچک چه میزان از تنوع ژنتیکی انتخابی تحت تأثیر قرار می‌گیرد؟ ب) مکانیسم‌هایی که پویایی تنوع ژنتیکی را با مباحث سازگاری ارتباط می‌دهد، کدامند؟ ج) چگونه و چه میزان برهم‌کنش اثرات محیطی و ژنتیکی بر تنوع ژنتیکی و سازگاری اثر می‌کنند؟ د) چگونه پسروی خویش‌آمیزی و رانش ژنتیکی بر فعالیت ژن‌ها اثر می‌گذارند؟



شکل ۱- بررسی همبستگی بین اندازه جمعیت و تنوع ژنتیکی برآورد شده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در برخی از گونه‌های *Prunus*



شکل ۲- مقایسه روش ژنتیک و ژنومیک حفاظتی. در ژنتیک حفاظتی، روابط بین اندازه جمعیت و تنوع توالی‌های خنثی ارزیابی می‌گردد؛ ارزیابی سازگاری مبتنی بر این فرض هستند که تنوع نشانگرهای خنثی شاخصی از تنوع گزینشی می‌باشد. در مقابل، در ژنومیک حفاظتی روابط بین اندازه جمعیت و تنوع خنثی و گزینشی از نظر تنوع توالی و بیان ژن، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. علاوه براین، ژنومیک حفاظتی تأثیر شرایط محیطی بر تنوع توالی و تنوع بیان ژن را نیز در ارزیابی‌ها دخیل می‌کند. بنابراین استنتاج بهتری از سازگاری ارایه می‌دهد.

بخش دوم: علاوه بر مزایای متعددی که این روش‌ها در اختیار محققین قرار می‌دهد، با انجام مطالعات ژنتیک حفاظتی، پیشرفت‌های مهمی در زمینه تبدیل الگو نشانگرهای خنثی در فضا به تفاسیر مرتبط با دموگرافی، جریان ژنی، اندازه مؤثر جمعیت (*Ne*)، ساختار جمعیت و فیلوجغرافیایی به‌دست آمده است (Ouborg *et al*., 2010; Excoffier and Heckel. 2006; Shabani *et al*., 2012). در بسیاری از مطالعات ژنتیک حفاظتی، اطلاعات موجود در الگوی نشانگرها یکی از بهترین روش‌های ارزیابی وضعیت موجود و گذشته جمعیت‌های در خطر انقراض بوده و می‌تواند به ارایه راهکارهای مدیریتی حفاظتی منجر شود. به‌عنوان مثال مقایسه هتروزیگوتی مشاهده شده بین جوامع کوچک و بزرگ یک گونه می‌تواند اطلاعاتی را در ارتباط با تأثیر پسروی خویش‌آمیزی در جوامع کوچک فراهم نماید. همچنین تجزیه و تحلیل تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های موجود در یک محدوده جغرافیایی، امکان بررسی سطوح تفکیکی آن‌ها را میسر می‌سازد.

بخش سوم: آگاهی از ساختار ژنتیکی کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم، در برنامه‌های حفاظت و به‌کارگیری از منابع ژنتیکی جمع‌آوری‌شده در بانک‌های ژن، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. با توجه به ماهیت متنوع مواد گیاهی موجود در کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم (ارقام بومی، لاین‌های گزینش‌شده از نژادهای بومی، لاین‌های اصلاحی منتخب، ارقام اصلاح‌شده، خویشاوندان وحشی و ذخایر ژنتیکی از نواحی مختلف)، از این طریق تنوع آللی ضروری و مرتبط با اهداف اصلاحی، در دسترس محققان قرار دارد (Zeinalabedini *et al*., 2008b). همچنین، می‌توان از این مواد در تحقیقات مختلف از جمله تهیه نقشه‌های ارتباطی استفاده نمود. لازم به ذکر است، تعداد زیاد نمونه موجود در بانک‌های ژنی از کارایی و اثربخشی برنامه‌های گزینش این منابع ژنتیکی می‌کاهد. بنابراین، می‌توان از تشکیل کلکسیون‌های پایه برای گیاهان زراعی و باغی به‌عنوان راه‌حلی در این زمینه استفاده کرد. در این کلکسیون‌ها، با حفظ بخش اعظمی از تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون اولیه، نمونه‌های تکراری و مشابه حذف می‌شوند. تعیین ساختار ژنتیکی کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم ناهمگن به‌منظور اطمینان‌یافتن از حفظ طیف ژنتیکی و اکولوژیکی آن، جزء اصلی در نمونه‌برداری کلکسیون‌های پایه به‌شمار می‌رود. تعیین ساختارهای ژنتیکی موجود در کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم، یکی از مهمترین جنبه‌های مطالعات ارتباطی است که با استفاده از نشانگرهای مختلف از جمله ریزماهواره‌ها انجام می‌گردد (Behzadi. 1998). اکثر محققان بر این عقیده‌اند که تلفیق ساختار جمعیت در مدل‌های آماری مورد استفاده در تعیین نقشه‌های ارتباطی، به‌منظور ممانعت از نتایج مثبت کاذب ضروری است. بنابراین، گرچه آگاهی از ساختار ژنتیکی برای نمونه‌برداری کلکسیون‌های پایه و مطالعات ارتباطی مورد نیاز است، انتخاب روش مناسب در تعیین ساختار ژنتیکی کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم، مهمترین چالش در این زمینه به‌شمار می‌رود. در گذشته نه چندان دور تعیین ساختار ژنتیکی کلکسیون‌ها، عمدتاً با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره متداول مانند تجزیه کلاستر، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و Multidimensional scaling انجام می‌گرفت. در ژنتیک حفاظتی، کاربرد تئوری Coalescence، روش‌های حداکثر درست‌نمایی، تکنیک‌های MCMC و آماره‌های Bayesian را شبیه‌سازی می‌کند (Kazemialamuti *et al*., 2012). در سال‌های اخیر، روش‌های جدید متعددی به خصوص در زمینه مطالعه ساختار جوامع طبیعی، بررسی انساب و روابط خویشاوندی و آنالیزهای فضایی الگوهای آللی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارایه شده است. می‌توان از این روش‌ها در مطالعه ساختار ژنتیکی کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم نیز استفاده نمود. لازم به ذکر است که روش‌های کلاستربندی سلسله مراتبی متداول نیز کماکان در مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های زراعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بر اساس تحقیق انجام‌شده، روش‌های کلاستربندی متداول مانند UPGMA و Ward کماکان می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسبی در مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی روی مواد گیاهی کلکسیون ژرم‌پلاسم مورد استفاده قرار گیرند. دلیل این امر را می‌توان در سهولت دسترسی به آن‌ها در برنامه‌های آماری متداول، درک آسان‌تر نتایج حاصل از این روش‌ها و کوتاه‌بودن زمان مورد نیاز برای انجام آنالیز جستجو کرد. علاوه براین، نیازی به فرضیات ژنتیکی نظیر تعادل هاردی واینبرگ[1] یا لینکاژی نیست. کلاستربندی سلسله مراتبی، نیازمند تعیین معیارهای فاصله، الگوریتم کلاستربندی و ارزیابی دندروگرام‌های حاصل از روش‌های مختلف است. لازم به ذکر است که روش‌های متعددی برای ارزیابی نتایج این تکنیک‌ها وجود دارد که در تأیید نتایج و دندروگرام‌های حاصل و نیز تعیین تعداد دقیق کلاسترها می‌توانند مفید باشند. از جمله این معیارها می‌توان

1. Hardy-Weinberg equilibrium

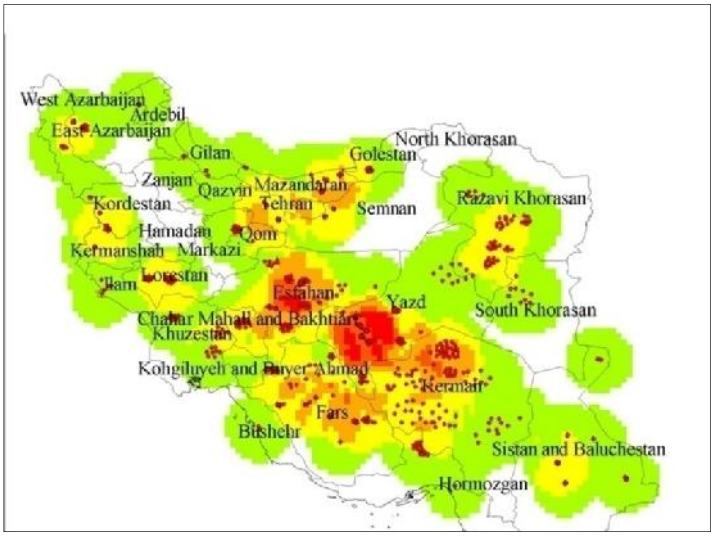
نویسنده مسئول: مهرشاد زین‌العابدینی
E-mail: mzeinolabedini@mail.abrii.ac.ir

به ضریب همبستگی کوفنتیک و ضریب تراکم اشاره کرد. همچنین معیارهای زیادی برای تعیین تعداد دقیق دندروگرام‌های حاصل از این روش‌ها وجود دارد. البته در این زمینه مطالعات اندکی پیرامون ارتباط بین ساختار ژنتیکی کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم و کارایی تکنیک‌های کلاستربندی متداول وجود دارد. علاوه بر این، روش‌های فیلوژنتیک شبکه‌ای نیز که دارای فرضیه‌های دیگری در الگوریتم خود هستند، مفید می‌باشند. از جمله ابزارهای دیگر مورد استفاده در تجزیه خوشه‌ای، مدل‌های گرافیکی موجود در این زمینه است که خصوصاً در ارتباط با کلکسیون‌های پایه (تعداد زیاد اکسسیون) مفید هستند (شکل ۴). در مجموع توصیه می‌شود که در صورت استفاده از روش های متداول کلاستربندی از روش Ward و NJ استفاده گردد. علاوه بر این روش‌های فیلوژنتیک شبکه‌ای نیز که دارای فرضیه‌های دیگری در الگوریتم خود هستند، مفید می‌باشند. از جمله ابزارهای دیگر مورد استفاده در تجزیه خوشه‌ای، مدل‌های گرافیکی موجود در این زمینه است که خصوصاً در ارتباط با کلکسیون‌های پایه (تعداد زیاد اکسسیون) مفید هستند (شکل۱). در این روش‌ها نیز به‌منظور تعیین تعداد کلاستر، پارامترهای مختلفی بررسی می‌شوند.

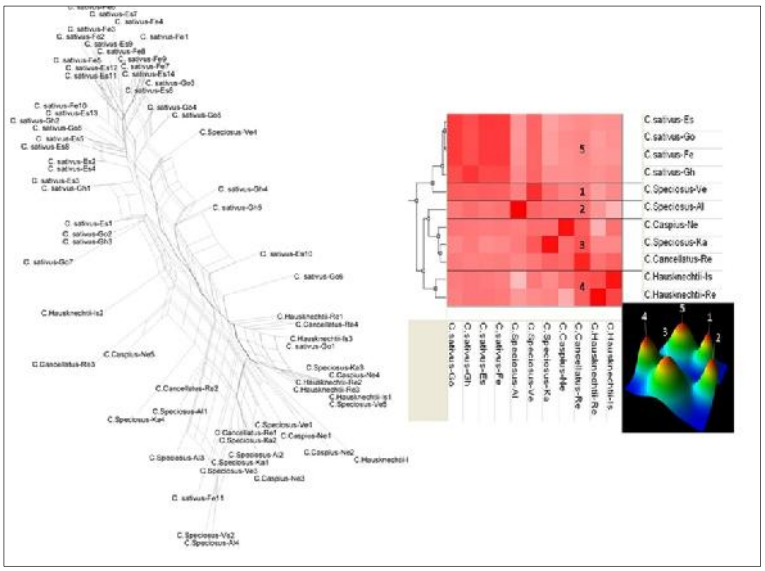
در این روش‌ها نیز به‌منظور تعیین تعداد کلاستر، پارامترهای مختلفی بررسی می‌شوند (Ouborg. 2010). علاوه بر روش‌های فوق، آنالیزهای IBC[1] (تجزیه کلاستر مبتنی بر افراد) نیز می‌تواند در تعیین ساختار ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. در حال حاضر دو گروه از روش‌های IBC وجود دارد که به‌طور گسترده در ارزیابی ساختار جمعیت‌ها به‌کار می‌رود. این روش‌ها شامل مدل‌های فاقد اطلاعات جغرافیایی Spatially non-explicit (مانند آنچه که در نرم‌افزار STRUCTURE به‌کار می‌رود و مدل‌های حاوی اطلاعات Spatially explicit) که پیش‌فرض‌های معین فضایی مستقیماً به مدل Baysian اضافه می‌شود، مانند نرم‌افزارهای GENELAND، BAPS و TESS (شکل۵) (Kelly. 2005).

امروزه آنالیز توزیع فضایی تنوع یکی از بخش‌های متداول در شناسایی واحدهای تکاملی و ارزیابی اثرات تغییرات محیطی بر توزیع و جریان ژنی به‌شمار می‌رود. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه پیش‌بینی توزیع فضایی برخی از گونه‌های *Prunus* در ایران براساس نیچه‌های اکولوژیک و تأثیر عوامل محیطی مختلف در پراکنش آن اشاره نمود (شکل ۳). در این تحقیق به‌منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت، آنالیز واریانس مولکولی و جریان‌ژنی از نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژنوم استفاده شد که با بررسی نتایج حاصل کارایی استفاده از این نشانگر در این زمینه مشهود است (Frankham *et al.*, 2002).

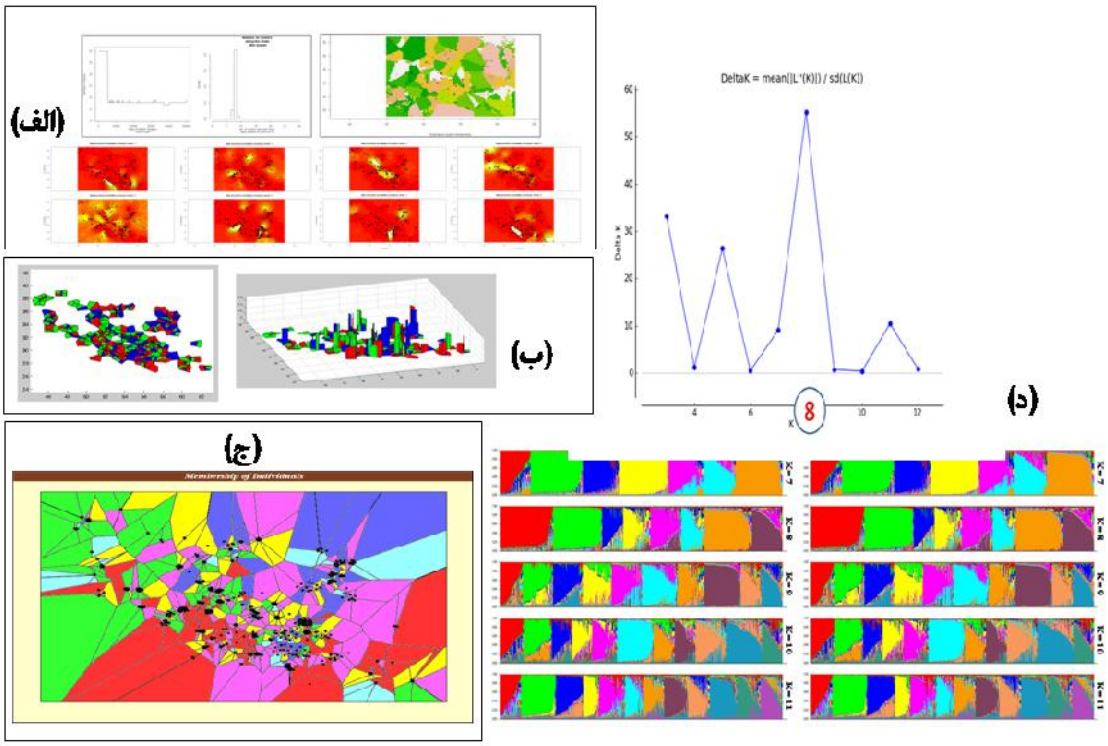
[1] . Individual based clustering



شکل ۳- پیش‌بینی نواحی پراکنش *Prunus* و تأثیر پارامترهای اقلیمی با استفاده از داده‌های جغرافیایی و روش حداکثر آنتروپی



شکل ۴- تجزیه کلاستر نمونه‌های زعفران زراعی و برخی از گونه‌های خویشاوند آن با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و روش شبکه‌ای و مدل گرافیکی



شکل ۵- مقایسه روش‌های آماری مختلف به‌منظور تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از مدل‌های آماری مختلف در انار. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت و نحوه پراکنش نمونه های با استفاده از مدل های حاوی اطلاعات جغرافیایی (الف) GENELAND (ب) BAPS، (ج) TESS و مدل فاقد اطلاعات جغرافیایی (د) STRUCTURE

بخش چهارم: روش‌های ژنتیک حفاظتی اطلاعاتی را در زمینه فرآیندهای مرتبط با مدل ژنتیک حفاظت فراهم ساخته‌اند، گرچه این اطلاعات برای سایر زمینه‌های بیولوژی تکاملی نیز مهم هستند. به‌عنوان مثال مطالعه رکود پسروی خویش‌آمیزی به‌عنوان یکی از مهمترین پدیده‌های ژنتیک حفاظتی همواره مدنظر قرار دارد، زیرا این پارامتر از دست‌رفتن تنوع ژنتیکی ناشی از رانش و تأثیر احتمالی آن را در فرآیند انقراض مرتبط می‌سازد. در عین حال این مطالعه می‌تواند نقش مهمی را در مدل‌های تکاملی سیستم‌های آمیزش گیاهان و جانوران ایفا کند (Kelly. 2005). رکود پسروی خویش‌آمیزی یک پارامتر وابسته به محیط و اختصاصی برای ژنوتیپ و جمعیت است و می‌تواند تکامل صفات را به روش‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهد. البته میزان تأثیرپذیری پایداری جوامع و گونه‌ها هنوز مورد سؤال است. به‌عنوان مثال در پروانه *Melitaea cinxia*، بین سطوح پسروی خویش‌آمیزی و انقراض همبستگی وجود دارد. همچنین در جمعیت‌های آزمایشگاهی مگس‌سرکه *Drosophila melanogaster*، سرعت انقراض در لاین‌های خالص نسبت به لاین‌های دیگر بیشتر بود. این امر به‌خصوص در شرایط تنش مشهودتر بود (Saccheri *et al.*, 1998; Bijlsma *et al.*, 2000). علی‌رغم تمامی پیشرفت‌هایی که تا کنون در زمینه ژنتیک حفاظتی به‌دست آمده، کماکان سوالات متعددی بی‌پاسخ مانده است. در این قسمت به چهار مورد از این سؤالات اشاره می‌گردد.

چگونه تنوع ژنتیکی عملکردی مرتبط با سازگاری، تحت تأثیر فرآیندهای مشابه مؤثر بر تنوع ژنتیکی خنثی قرار می‌گیرند. به‌عبارتی آیا بین اندازه جمعیت و سطح تنوع ژنتیکی غیرخنثی نیز همبستگی وجود دارد؟ در الگوی ژنتیک حفاظتی، همبستگی مثبت بین اندازه جمعیت و سطح تنوع ژنتیکی پیش‌بینی می‌شود. این همبستگی در تجزیه و تحلیل متا [1] در مطالعات گیاهی و جانوری مشاهده شده است. علاوه بر این، بین اندازه جمعیت و متوسط سازگاری افراد نیز همبستگی وجود دارد. وجود این همبستگی‌ها می‌تواند به‌دلیل وقوع برخی از فرآیندهای ژنتیکی باشد، اما ممکن است تحت‌تأثیر سایر فرآیندهای غیرژنتیکی مرتبط با اندازه جمعیت مانند اثرات

1. Meta analysis

Allee (همبستگی مثبت بین اندازه جمعیت و میزان سازگاری)، قطع برهم‌کنش‌های بین گونه‌ای یا زوال کیفی رویشگاه‌های محلی نیز قرار گیرد (Kramer and Sarnelle, 2008; Mhemmed *et al.*, 2008). اثر رانش ژنتیکی متناسب با اندازه مؤثر جمعیت (*Ne*) است. اگر اندازه مؤثر جمعیت کوچک باشد، انتظار بر این است که حتی نشانگرهای به‌شدت انتخابی نیز، رفتاری مشابه تنوع خنثی نشان دهند و واریانس ژنتیکی نشانگرهای خنثی و غیرخنثی نزدیک به‌هم خواهد شد. در مقابل اگر *Ne* بزرگ باشد، همبستگی بین تنوع نشانگرهای خنثی و نشانگرهای به‌شدت انتخابی بسیار کم خواهد بود. بنابراین همبستگی بین *Ne* و تنوع ژنتیکی برای نشانگرهای خنثی بسیار بالاتر از نشانگرهای انتخابی است (Frankham. 1996). اما اکثر تحقیقاتی که تاکنون در ژنتیک حفاظتی صورت گرفته است، از نشانگرهای تقریباً خنثی استفاده شده و آزمون‌های تجربی محدودی در زمینه بررسی اثر جوامع کوچک در تنوع ژنتیکی عملکردی در دسترس می‌باشد. علاوه بر این چگونگی تعمیم نتایج حاصل از تعداد محدود نشانگر ریزماهواره برای کل تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم نیز نامشخص است. این امر بدان مفهوم است که تعمیم نتایج الگوی نشانگرهای مولکولی برای کل تنوع ژنتیکی در سطوح مختلف موجودات متفاوت است. بنابراین، ضرورت استفاده از روش‌هایی که تنوع ژنتیکی موجود در کل ژنوم را ارزیابی می‌کند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

گرچه ژنتیک حفاظتی پیشرفت‌های زیادی در زمینه پیش‌بینی و تشریح پویایی تنوع ژنتیکی خنثی داشته است، مکانیسم‌هایی که این پویایی را با سازگاری مرتبط می‌سازد، هنوز ناشناخته باقی‌مانده است. به‌عنوان مثال رکود پسروی خویش‌آمیزی به‌عنوان یکی از مهمترین پدیده‌ها در ژنتیک حفاظتی، حتی اگر نوع جهش‌های دخیل در آن نیز مشخص باشد، دلایل ژنومیک ناشناخته‌ای دارد. البته، به‌منظور پیش‌بینی نتایج حاصل از اندازه کوچک جمعیت در سازگاری، آگاهی دقیق‌تر از دلایل ژنومیک ضروری است. بدیهی است که واردکردن رکود پسروی خویش‌آمیزی در آنالیزهای دموگرافی به‌عنوان یک مقدار برای یک جمعیت خاص کافی نیست، زیرا این پدیده پیچیده و به‌شدت پویا بوده و بین جمعیت‌ها، ژنوتیپ ها، مراحل مختلف چرخه زندگی و شرایط محیطی متغیر است. بنابراین دانستن تعداد ژن‌ها و یا مسیرهای ژنومیک دخیل در رکود پسروی خویش‌آمیزی، میزان مشارکت هر کدام در این پدیده و چگونگی فعالیت این ژن‌ها در واکنش به تنوع محیطی و ontogenetic ضروری است (Charlesworth and Willis. 2009; Kristensen *et al.*, 2010).

۱. مرکز ژنتیک حفاظتی عمدتاً بر موضوعاتی مانند اثرات رانش و فقدان جریان ژنی مرتبط با بخش‌بندی رویشگاه‌ها می‌باشد. البته انقراض جوامع به‌وسیله فرآیندهای مهم‌تری مانند بدی شرایط محیطی، تغییرات اقلیمی و قطع برهمکنش بین‌گونه‌ای تحت تأثیر قرار می‌گیرد. میزان برهمکنش بین فرآیندهای ژنتیکی و غیرژنتیکی، تحت عنوان برهمکنش ژنتیک در محیط خلاصه می‌شود که هنوز به‌خوبی ارزیابی نشده است. البته، نحوه سازگاری جوامع با تغییرات محیطی و میزان تأثیرات رانش و پسروی خویش‌آمیزی عمدتاً ناشناخته است. آگاهی دقیق از نقش سازگاری محلی در شبکه‌ای از جوامع در ژنتیک حفاظتی بسیار مهم است. سوال دیگری که مطرح می‌شود آن است که چه میزان انعطاف‌پذیری فنوتیپی با اثرات رانش و پسروی خویش‌آمیزی برهمکنش دارد. در برخی از موارد، در جوامعی که از تنوع ژنتیکی آن‌ها کاسته شده است، انعطاف‌پذیری فنوتیپی، منجر به سازگاری کوتاه‌مدت در برابر تغییرات محیطی می‌شود، اما ممکن است واریانس فنوتیپی را افزایش داده و از این‌رو پاسخ تکاملی به فشارهای انتخابی را کاهش دهد. در مجموع باید از میزان و چگونگی تأثیر رانش و پسروی خویش‌آمیزی در پتانسیل انعطاف‌پذیری فنوتیپی اطلاع داشت (Barrett and Schluter, 2008; Pigliucci, 2005).

۲. ژنتیک حفاظتی عمدتاً تنوع توالی مدنظر قرار می‌گیرد و توجه اندکی به تنوع در بیان‌ژن‌ها مبذول می‌شود. روشی که در آن بیان‌ژن تحت تأثیر رانش و پسروی خویش‌آمیزی قرار گرفته و به‌وسیله مکانیسم‌های تنظیمی سیس و ترانس تغییر می‌کند، هنوز تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده است. البته بدیهی است که بیان‌ژن نسبت به تنوع توالی، به تنوع صفات فنوتیپی نزدیک‌تر است. تنش‌های محیطی مانند خشکی، افزایش دما یا فقدان موادغذایی می‌تواند مسیرهای ژنومیکی را در گیاهان و جانوران تغییر دهد. تنظیم بیان‌ژن اغلب دارای اجزا اپی‌ژنتیک است، جائی‌که متیلاسیون DNA و تغییرات هیستون می‌توانند حتی در غیاب تنوع توالی، تنوع فنوتیپی حاصل کنند. البته نحوه واکنش مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک به رانش ژنتیکی و خصوصاً پسروی خویش‌آمیزی ناشناخته است

(Khaitovich *et al.*, 2006; Roelofs *et al.*, 2008).

در چند سال اخیر، توجه ویژه‌ای به پیشرفت روش‌ها و داده‌های ژنومیک عملکردی و به‌کارگیری آن‌ها در جوامع و محیط‌های طبیعی شده است. این امر با این منطق که عملکرد ژن‌ها تنها می‌تواند در محیط‌هایی که در آنجا ارزیابی شده‌اند، تعریف شود، شبیه‌سازی شده است. بنابراین در اکثر حالات، همواره این سوال مطرح می‌شود که آیا امکان تعمیم نتایج ژنومیک عملکردی حاصل از موجودات مدل (*Arabidopsis thaliana*، *Caenorhabditis elegans*، *Mus musculus* و *D. melanogaster*)، با تعداد محدودی ژنوتیپ و در شرایط محیطی کنترل‌شده، به شرایط طبیعی وجود دارد؟ برای مثال، گزینش مصنوعی لاین‌های مگس سرکه برای مقاومت به گرما، منجر به واکنش سازگاری غیرقابل پیش‌بینی این لاین‌ها در شرایط طبیعی گردید. ضرورت اشاعه نتایج ژنومیک از آزمایشگاه به شرایط طبیعی و از موجودات مدل به موجودات غیرمدل، مورد توجه قرار گرفته است.

به‌منظور توسعه روش‌های اکولوژیک و تکاملی به روش‌های ژنومیک، معضلات متعددی وجود دارد. این موارد شامل تغییر از گونه‌های مدل ژنومیک با منابع ژنومیک فراوان و ابزار موجود، به گونه‌های مدل اکولوژیک با منابع و ابزارهای محدود می‌باشد. همچنین، از جمله این معضلات می‌توان به حرکت از شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با حداقل تغییرات محیطی، به شرایط طبیعی که تغییرات ژنتیکی و محیطی جزیی از حیات بوده و تفکیک اثرات ژنتیکی از محیطی دشوار است، می‌باشد. در نهایت، با تعمیم این روش‌ها می‌توان شاخه جدیدی از ژنومیک عملکردی تحت عنوان Ecogenomics را در مطالعه افراد و اشاعه آن به جمعیت‌ها، به‌کار برد. شروع برنامه‌های مطالعاتی Ecogenomics در زمینه حفاظت به‌سرعت افزایش یافته است. از جمله ابزارهایی که در این زمینه به‌کار برده می‌شوند، می‌توان به فناوری‌های نسل جدید توالی‌یابی مانند Pyrosequencing ۴۵۴ (Roche)، Solexa sequencing-by-synthesis (Illumina) و SOLiD (sequencing by oligo ligation and detection; Applied Bio-systems) اشاره کرد (Feder and Mitchell-Olds. 2003; Van Straalen and Roelofs. 2011).

در زمینه ژنتیک حفاظتی، منابع توالی برای اکثر گونه‌های مورد توجه در دسترس نمی‌باشد. به تازگی، ساده‌ترین روش برای به‌دست‌آوردن این توالی‌ها، توالی‌یابی نمونه‌های mRNA با استفاده از روش‌هایی مانند تکنولوژی ۴۵۴ است. در مرتب‌کردن مجدد[1] ۵۰۰۰۰۰ قرائت توالی، به‌طور معمول ۳۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ کانتیگ[2] به‌دست می‌آید. کانتیگ‌های به‌دست‌آمده را می‌توان از نظر فیلوژنتیک در مقابل نزدیک‌ترین موجودات ژنومیک مدل یا گونه‌ای با توالی‌های کافی منتسب شده، بلاست [3] نمود، تا برای آن‌ها تفاسیر بیولوژیک شناسایی گردد. با توجه به اینکه نمونه توالی‌یابی شده شامل چندین فرد می‌باشد، قرائت‌های همپوشان در الگوی اولیه [4]، اطلاعاتی را در زمینه وجود SNPs فراهم خواهد کرد. در هر پیمایش ۴۵۴، معمولاً هزاران SNP شناسایی می‌گردد. علاوه براین، صدها ریزماهواره مبتنی بر EST[5] نیز به‌دست می‌آید (Simon *et al.*, 2009; Wheat. 2010). برای مثال، در یک مطالعه در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران از کلاله گل زعفران برای بررسی ترانسکریپتوم استفاده شد. RNA کلاله استخراج و سپس توالی‌یابی توسط سیستم توالی‌یابی سریع ایلومینا انجام شد. از پشت سر هم قراردادن این قرائت‌ها با نرم‌افزار، با توجه توالی‌های مشترک انتهایی آن‌ها کانتیگ‌ها[6] و اسکفولدها[7] در نهایت یونی‌ژن‌ها [8] (توالی‌های با طول بلندتر) ایجاد شد. یونی‌ژن‌های به‌دست‌آمده برای شناسایی در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلفی از جمله NCBI و Uniprot/SwissProt بررسی شدند. در نهایت در این بررسی تعداد ۲۳۴۳۳۸۰۷۶۰ نوکلئوتید توالی‌یابی شد. پس از مونتاژ توالی‌ها تعداد ۱۱۸۰۶۸ یونی‌ژن شناسایی گردید که از این تعداد ۶۶۱۷۰ در پایگاه‌های اطلاعاتی پیش از این ثبت شده بودند. از این میان تعداد ۱۴۵۶ یونی‌ژن شناسایی شدند که در ۱۴۱ مسیر بیوسنتزی در زعفران فعال هستند. در بررسی مسیرهای فعال بیوسنتزی در کلاله زعفران مشخص شد که مسیر متابولیسم چربی‌ها در کلاله بسیار فعال است [داده‌ها منتشر نشده].

در نهایت، بسته به امکانات و تسهیلات، می‌توان در

1. De novo assembly
2. Contigs
3. Blast
4. Scaffold
5. Expressed Sequence Tag
6. Contig
7. Scaffold
8. Unigene

مدت زمان کوتاهی اطلاعات لازم از گونه‌های اکولوژیک مدل را برای به‌کارگیری در برنامه‌های ژنومیک حفاظتی به‌دست آورد. اطلاعات به‌دست‌آمده مرتبط با توالی‌ها را می‌توان به دو روش در زمینه مطالعات حفاظتی، به‌کار برد. نخست، از نشانگرهای SNP و EST-SSR می‌توان در مطالعات گزینش استفاده کرد. به‌عنوان مثال، تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره براساس وجود چندشکلی بین مکان‌های ریزماهواره در ترانسکریپتوم نارنگی (به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم به بیماری جاروی جادوگر لیموترش) و لیموترش (میزبان اصلی این بیماری)، خصوصاً بخش‌هایی با تفاوت بیان یا عملکرد مرتبط با پاسخ‌های مقاومتی، انتخاب شدند. گروه‌بندی انجام‌شده ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به این بیماری بر اساس این نشانگرها، در مقایسه با درخت فیلوژنی به‌دست‌آمده از نشانگرهای ریزماهواره تصادفی از دقت بالاتری برخوردار بود (Biswas *et al.*, 2012; Jannati *et al.*, 2009). نتایج نشان می‌دهد که این آلل‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای آگاهی بخش کاندید، برای شناسایی ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم در برنامه‌های اصلاحی بعدی استفاده شوند. اگرچه بهتر است این نشانگرها روی طیف وسیع‌تری از ژنوتیپ‌های مرکبات آزمایش شوند تا کارایی آن‌ها کاملاً اثبات شود.

نشانگرهای SNP در قیاس با نشانگرهای ریزماهواره و AFLP بخش بیشتری از ژنوم را پوشش می‌دهد. از این نشانگرها، در ابتدا برای بررسی وضعیت تنوع ژنتیکی در سطح افراد، جمعیت‌ها و جمعیت‌های متا استفاده می‌شود. این اطلاعات نتایج دقیق‌تری در ارتباط با دموگرافی، جریان‌ژنی، پسروی خویش‌آمیزی و تاریخ جمعیت در اختیار محقق قرار می‌دهد. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در مطالعه گزینش نیز مفید باشند. از این نشانگرها می‌توان در روش‌های ژنومیک جمعیت استفاده نمود، جایی‌که انحراف الگوی پراکنش برای نشانگرها می‌تواند شاخصی برای وقوع گزینش در مکان‌های ژنی پیوسته با نشانگرها باشد. اگرچه شناسایی اثرات گزینشی در جمعیت‌های طبیعی دشوار است، اما انجام اسکن کامل ژنوم و مطالعات ارتباطی و نیز به‌کارگیری روش‌های آماری جدید در جمعیت‌های طبیعی، یک گزینه مناسب و عملی به‌شمار می‌رود (Hermisson. 2009; Slate *et al.*, 2009; Stephens and Balding. 2009). با این وجود، شناسایی ژن‌های دقیق تحت گزینش هنوز از جمله معضلات مهم محسوب می‌شود. اولویت اول ژنومیک حفاظتی، شناسایی نواحی و نشانگرهایی در ژنوم است که تحت گزینش قرار دارند. مقایسه الگوهای فضایی و موقت[1] نشانگرهای خنثی و نیز نشانگرهایی که با اسکن ژنوم، ارزش گزینشی آن‌ها شناسایی شده است، امکان بررسی رانش‌ژنتیکی و اثرات گزینش را میسر خواهد ساخت. این امر عرصه جدیدی در مطالعه تأثیرات کیفیت رویشگاه‌ها (متأثر از فاکتورهای مضر محلی و فاکتورهای جهانی مانند تغییرات اقلیمی) و تأثیرات ژنتیکی تحمیل‌شده به‌وسیله بخش‌بندی رویشگاه‌ها، را آشکار می‌سازد. چنین مطالعاتی می‌تواند تأثیرات اساسی تغییرات محیطی در نواحی مختلف ژنومی را نمایان کند (Ouborg *et al.*, 2010). دومین کاربرد توالی‌های ترانسکریپتوم به‌دست‌آمده از روش‌های توالی‌یابی با کارایی بالا، استفاده از آن‌ها به‌عنوان مرجعی برای نقشه‌یابی رونوشت‌ها[2] است. تاکنون، عمده تمرکز مطالعات ژنتیک حفاظتی، بر تنوع توالی بوده است. روش ترانسکریپتئومیک[3] جمعیت، امکان مطالعه تنوع فعالیت ژن‌ها، ناشی از عملکرد حاصل از بخش‌بندی رویشگاه، تنوع میزان مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و تغییرات محیطی، را میسر می‌کند. از آنجایی‌که تغییرات تکاملی عملاً مبتنی بر بروز تغییرات در تنظیم بیان ژن‌ها است تا تغییر خود ژن، مطالعات ترانسکریپتئومی جمعیت، ممکن است اطلاعات کاملاً جدیدی را پیرامون تأثیرات مرتبط با جمعیت‌های کوچک و ایزوله در اختیار محقق قرار دهد (Khaitovich *et al.*, 2006). روش‌های ترانسکریپتئومیک جمعیت در ژنومیک حفاظتی مبتنی بر استفاده از ریزآرایه‌های هترولوگ است، اما امروزه روش‌های جدیدی همانند توالی‌یابی RNA با راندمان بالا (RNA-Seq) در سطح وسیعی استفاده می‌شود (Stephens and Balding. 2009). از نظر مفهومی، نتایج حاصل از این روش نسبت به نتایج به‌دست‌آمده در ژنتیک حفاظتی متفاوت بوده و ضرورتاً ناشی از عملکرد فاکتورهای ژنتیکی و محیطی خواهند بود. بنابراین، اگرچه استفاده از SNP و EST-SSR و به‌کارگیری آن‌ها در اسکن ژنوم، توسعه مفهوم ژنتیک حفاظتی محسوب می‌شود، اما ترانسکریپتئومیک جمعیت، در راستای توسعه این مفهوم کارآمدتر است. روش ترانسکریپتوم، امکان مطالعه مکانیسم‌های مرتبط با ناسازگاری[4] ناشی از تأثیرات بخش‌بندی رویشگاه‌ها و درک عمیق‌تر پدیده‌های

1. Spatial and temporal
2. Mapping transcripts
3. Transcriptomics
4. Maladaptation

پیچیده‌ای نظیر رکود پسروی خویش‌آمیزی (از طریق شناسایی ژن‌های دخیل در این پدیده در مراحل مختلف حیات)، پویایی جمعیت‌های متا (با شناسایی ژن‌های مرتبط با پراکنش یا عادت پراکنش و نظارت بر فعالیت آن‌ها به‌عنوان عملکرد تغییرات محیطی محلی و منطقه‌ای) و نیز انعطاف‌پذیری فنوتیپی و برهمکنش بین ژنوتیپ و محیط (G×E) (با نظارت بر بیان‌ژن‌ها به‌عنوان عملکرد فاکتورهای اپی‌ژنتیک و محیطی) را فراهم می‌سازد (Ouborg *et al.*, 2010).

مطالعات ترانسکریپتئومی جمعیت، تنها مقدمه‌ای بر روش‌های ژنومیک حفاظتی است. انتظار بر این است که تأثیرات بخش‌بندی رویشگاه‌ها و اندازه کوچک جمعیت در سطح پروتئوم و متابولوم، نیز قابل شناسایی باشد، از این‌رو اخیراً پروتئومیک جمعیت و حتی متابولومیک جمعیت به‌عنوان بخشی از خانواده OMICS در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، زمینه‌هایی که به درک مکانیسم‌های مرتبط با تنظیم رونوشت‌ها کمک می‌کنند نیز به‌سرعت در حال پیشرفت هستند. مهمترین این زمینه‌ها اپی‌ژنومیک است که چگونگی تأثیر شرایط محیطی در نحوه تنظیم بیان‌ژن از طریق فرآیندهای اپی‌ژنتیک خاص مانند متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی را مطالعه می‌کند. انجام مطالعات دقیق‌تر در این زمینه‌ها، چهارچوبی را برای برنامه‌های تحقیقاتی ژنومیک حفاظتی فراهم می‌سازد تا در سایه انجام این تحقیقات، به درک بهتری از نحوه برهم‌کنش تغییرات محیطی و فرسایش ژنتیکی دست یابیم (Kristensen *et al.*, 2010).

همانند سایر زمینه‌های جدید علمی، ژنومیک حفاظتی نیز با معضلات و محدودیت‌هایی روبرو است. در این میان، تلاش برای درک رابطه میان ژن‌ها و سازگاری (یکی از اهداف همواره مطرح در ژنتیک جمعیت)، بیولوژی تکاملی و ژنومیک عملکردی، از جمله اقدامات مهم و دشوار محسوب می‌شود. به منظور پاسخگویی به سوالاتی از این دست، نخست انجام مطالعات گسترده و همه جانبه در زمینه‌های مختلف از جمله ژنتیک جمعیت، اکولوژی، دموگرافی، بیولوژی محیطی و بیوانفورماتیک ضروری است. ژنومیک حفاظتی تنها زمانی در پاسخ گوئی به سوالات مختلف موفق است که به‌وسیله یک برنامه چندرشته‌ای حمایت گردد. اگرچه اسکن ژنوم و مطالعات ارتباطی می‌توانند در گونه‌های مدل اکولوژیکی انجام شوند، با افزایش تعداد نمونه‌ای که مورد آنالیز قرار می‌گیرد بر قابل اعتمادبودن این نتایج افزوده می‌شود. تنوع محیطی در جمعیت‌های طبیعی، نسبت به شرایط آزمایشگاهی یا گلخانه‌ای بیشتر است، در نتیجه به‌منظوریافتن ارتباطات معنی‌دار بین نشانگرها و خصوصیات فنوتیپی، بررسی تعداد نمونه بیشتر ضروری خواهد بود. علاوه بر این، انتظار بر این است که در جمعیت‌های کوچک، اثرات رانش‌ژنتیکی می‌تواند برجسته‌تر باشد، از این‌رو، شناسایی ردپای گزینش در این جمعیت‌ها بسیار دشوار و پیچیده است. احتمالاً اسکن ژنوم در جمعیت‌های بزرگتر گونه مرجع و به‌کارگیری نشانگرهایی با سیگنال انتخابی به‌عنوان کاندید در جمعیت‌های کوچک‌تر، مناسب‌ترین استراتژی که می‌توان در این زمینه به‌کار برد.

حتی در مواردی که بین نشانگر و صفت، ارتباطی مشاهده شود، تعیین ژن مسئول به سهولت امکان‌پذیر نیست. مثال‌های اندکی وجود دارد که در آن ژن‌های دقیق مسئول QTLهای مشاهده شده، با این روش کشف شده باشد. یافتن ژن‌های مسئول QTLها در جمعیت‌های طبیعی دشوار است، مگر اینکه ژن‌های کاندید متقاعد کننده‌ای در دسترس باشد. البته، در ژنومیک حفاظتی شناسایی ژن، اولویت نخست نیست. در عوض، هدف اصلی، یافتن نشانگرهای مرتبط با صفات فنوتیپی خاص و مقایسه الگوی توزیع آن‌ها درون و بین جمعیت‌ها در مقابل الگو نشانگرهای ظاهراً خنثی، می‌باشد (Primmer, 2009; Slate, 2005).

در ترانسکریپتوم جمعیت نیز با معضلاتی روبرو هستیم. برای مثال، امکان تمایز دقیق بین ژن‌های علت و معلول در پروفایل ترانسکریپتوم لاین‌های اینبرد خالص و ناخالص[1]، به آسانی وجود ندارد. اگرچه بیان بسیاری از ژن‌ها به‌واسطه پسروی خویش‌آمیزی تغییر می‌کند، جستجو برای یافتن QTLهای یک صفت خاص نشان می‌دهد، در رکود پسروی خویش‌آمیزی، ژن‌های متعددی دخیل نیستند. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تفکیک اثرات اولیه و ثانویه‌ای که در آن تغییرات بیان در برخی از ژن‌ها بتواند به‌طور خودکار سطوح بیان در بسیاری از ژن‌های دیگر را تغییر دهد، امری دشوار است (حتی اگر این ژن‌ها هدف مستقیم گزینش نباشند). شاید مهمترین معضلی که پیرامون تفسیر فرآیندهای موجود در جمعیت مطرح است، نحوه برخورد با تنوع رونوشت‌ها است، زیرا این تنوع به‌شدت وابسته به بافت و مقیاس موقت آزمایش خواهد بود. بخشی از پاسخ برای زیست‌شناسان جمعیت آشنا است: تکرار بیولوژیک. البته در شرایط کنونی تکرار در پروژه‌های زیست‌شناسی مولکولی مرتبط با ژنومیک حفاظتی مانند انجام آنالیزهای ترانسکریپتوم،

1. Outbred

با توجه به هزینه بالای تحقیق، منطقی نیست. می‌توان انتظار داشت که در آینده و با کاهش هزینه‌های این آنالیزها بتوان نتایجی با دقت و صحت بالاتر به‌دست آورد. لازم به ذکر است، پویایی بالا و ماهیت وابسته به نوع بافت در داده‌های ترانسکریپتوم در سطح جمعیت، یک معضل جدی بوده و نیازمند طراحی و استانداردسازی دقیق آزمایشات است (Ouborg *et al.*, 2010).

نتیجه گیری و نگاهی به چشم انداز آینده

تا این قسمت، پتانسیل استفاده از روش‌های ژنومیک در ژنتیک حفاظتی مورد بحث و بررسی قرار گرفت. با نگاهی به تاریخ طولانی ژنتیک حفاظتی، ضرورت استفاده از روش‌های نوین ژنومیک در این بحث کاملاً مشهود است: آیا الگوی مشاهده شده با نشانگرهای خنثی، نشان‌دهنده الگوی تنوع انطباقی یا مضر است؟ به عبارتی، آیا مطالعه نشانگرهای خنثی که اطلاعات بیشتری پیرامون رانش‌ژنتیکی، پسروی خویش‌آمیزی، جریان‌ژنی و دموگرافی ارایه می‌دهند، برای ارزیابی پتانسیل سازگاری جمعیت‌ها مناسب است؟ Khon *et al.*, (2006)، چنین استدلال کردند که اطلاعات وسیع از توالی ژنوم می‌تواند برای پاسخ‌گویی به این شبهه مفید باشند.

در اینجا، ما بر اساس پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌ها و تکنیک‌های ژنومیک، بحث را تا حدی گسترده‌تر کرده‌ایم. روش‌های نوین ژنومیک نه تنها امکان ارزیابی کل ژنوم را برای تنوع خنثی و انتخابی فراهم خواهد کرد، بلکه امکان مطالعه دقیق مکانیسم‌های ژنومیک مرتبط با تأثیر اندازه کوچک جمعیت در سازگاری را نیز میسر می‌کند. ژنومیک حفاظتی چشم‌انداز ما را از اثرات بر تنوع توالی، به اثرات بر بیان‌ژن سوق داده و از این‌رو در راستای شناخت تأثیرات نسبی تهدیدات ژنتیکی و محیطی، به کمک روش‌های تلفیقی، دریچه جدیدی از علم را در برابر دیدگان محققین خواهد گشود. گرچه ژنومیک حفاظتی هنوز در مراحل ابتدایی پیشرفت قرار دارد، اما مثال‌های قابل‌توجهی را می‌توان در این زمینه یافت.

مثال‌های ژنومیک ذکرشده در ارتباط با گونه‌هایی است که از نظر فیلوژنتیک خویشاوند گونه‌های مدل هستند، اما امروزه با عنایت به پیشرفت‌های تکنیکی موجود از جمله نسل جدید توالی‌یابی، امکان انجام این مطالعات در گونه‌های غیرمدل نیز فراهم شده است. می‌توان پیش‌بینی کرد که در آینده‌ای نزدیک، بتوان از مزایای تکنیک‌هایی با کارایی بالا و روش‌های ژنومیک در بخش‌های مختلف استفاده نمود. نخست، استفاده از نشانگرهای کل ژنوم، منجر به بهبود ارزیابی پارامترهای ژنتیکی و دموگرافی از جمله هتروزیگوتی افراد، فواصل ژنتیکی، نرخ گذشته رشد جمعیت، سطوح جریان ژنی و ساختار (متا) جمعیت خواهد شد. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از ده‌ها نشانگر ریزماهواره و هزاران SNP کل ژنوم در نمونه‌های مشابه، تفاوت‌های احتمالی ممکن در ارزیابی تنوع ژنتیکی (به‌طور عام) و ارتباط با اندازه جمعیت (به‌طور خاص)، را نشان می‌دهد. دوم، کاربرد ژنومیک جمعیت، با استفاده از هزاران نشانگر SNP، امکان بررسی اثرات اندازه جمعیت و پویایی جمعیت متا بر تنوع ژنتیکی خنثی[1]، مضر[2] و انطباقی[3] را فراهم می‌کند. البته این اطلاعات برای مطرح‌نمودن فرضیه‌ها مفید است، اما هنوز تأثیرات دقیق اندازه جمعیت بر پتانسیل سازگاری تکاملی مغفول مانده است. سوم، علاوه بر ترانسکریپتوم، روش‌های پروتئومیکس و متابولومیکس در زمینه حفاظت، نیز می‌توانند به‌عنوان ابزارهایی مفید و مؤثر، در راستای شناسایی مکانیسم‌های سازگاری و ناسازگاری[4] مورد استفاده قرار گیرند. این روش‌ها می‌توانند در پاسخگویی به سوالات متعدد مطرح کمک کنند: بیان چه تعداد ژن و چگونه در واکنش به پسروی خویش‌آمیزی دگر آمیزی تغییر می‌کند؟ آیا این ژن‌ها همواره در جمعیت‌ها یکسانند؟ چه ژن‌هایی در تغییر عادت پراکنش دخیل هستند؟ ارزش سازگاری این ژن‌ها در شرایط پراکنش کم یا زیاد چقدر است؟ تغییر شرایط محیطی و یا اقلیمی، چگونه با اثرات ژنتیکی ناشی از بخش‌بندی رویشگاه‌ها برهم‌کنش نشان می‌دهد؟ با پاسخ مناسب به این سوالات می‌توان از ژنتیک حفاظتی به سوی ژنومیک حفاظتی گام برداشت و پویایی آینده و پتانسیل سازگاری هر جمعیت را پیش‌بینی نمود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پژوهشی است که با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است. نویسندگان ضمن قدردانی از دانشگاه از همکاری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران نیز سپاسگزاری می‌نمایند.

1. Neutral
2. Detrimental
3. Adaptive
4 Maladaptation

REFERENCES

Barrett RD, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. Trends in Ecology & Evolution. 23: 38-44.

Behzadi Shahrebabaki, H (1998) Distributation and Diversity of Pomegranate Cultivars in Iran. Agriculture Education Publication, Tehran, p. 226.

Bijlsma R, Bundgaard J, Boerema A (2000) Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from Drosophila. Journal of Evolutionary Biology. 13: 502-514.

Biswas M, Chai L, Mayer C, Xu Q, Guo W, Deng X (2012) Exploiting BAC-end sequences for the mining, characterization and utility of new short sequences repeat (SSR) markers in Citrus. Molecular Biology Reports. 39(5): 5373-5386.

Callow JA, Ford-Lloyd B, Newbury H (1997) Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. CAB International.

Charlesworth D, Willis JH (2009) The genetics of inbreeding depression. Nature Reviews Genetics. 10: 783-796.

Excoffier L, Heckel G (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. Nature Reviews Genetics. 7: 745-758.

Feder ME, Mitchell-Olds T (2003) Evolutionary and ecological functional genomics. Nature Reviews Genetics. 4: 649-655.

Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology. 10: 1500-1508.

Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.

Hermisson J (2009) Who believes in whole-genome scans for selection & quest. Heredity. 103: 283-284.

Hunter RL. Markert CL (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science. 125: 1294–1295.

Jannati M, Fotouhi R, Abad AP, Salehi Z (2009) Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. Journal of Horticulture and Forestry. 1(7): 120-125.

Kazemi alamuti M, Zeinalabedini M, Roodbar Shojaie T, Poor Irandoost H, Zahravi M, Vazifehshenas M, Ebrahimi MA, Khayam Nekouei SM, Hossini Salekdeh SG, Mardi M (2012) Extensive Genetic Diversity in Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm revealed by Microsatellite markers. Scientia Horticulturae. 146: 104-114.

Kelly JK (2005). Family level inbreeding depression and the evolution of plant mating systems. New Phytologist. 165: 55-62.

Khaitovich P, Enard W, Lachmann M, Pääbo S (2006) Evolution of primate gene expression. Nature Reviews Genetics. 7: 693-702.

Kohn MH, Murphy WJ, Ostrander EA, Wayne RK (2006) Genomics and conservation genetics. Trends in Ecology & Evolution. 21: 629-637.

Kramer A, Sarnelle O (2008) Limits to genetic bottlenecks and founder events imposed by the Allee effect. Oecologia. 157: 561-569.

Kristensen TN, Pedersen KS, Vermeulen CJ, Loeschcke V (2010) Research on inbreeding in the 'omic'era. Trends in Ecology & Evolution. 25: 44-52.

Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, Fischer M (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? Journal of Ecology. 94: 942-952.

Leveque C, Mounolou JC (2004) Biodiversity, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 284.

Mhemmed G, Kamel H, Chedly A (2008). Does habitat fragmentation reduce genetic diversity and subpopulation connectivity? Ecography. 31: 751-756.

Mortazavi A, Williams BA., McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods. 5: 621-628.

Nemati Z, Zeinalabedini M, Mardi M, Pirseyediand SM, Marashi SH, Khayam Nekoui SM (2012). Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (iridaceae). American Journal of Botany. 99: 340-343.

Ouborg N, Pertoldi C, Loeschcke V, Bijlsma RK, Hedrick PW (2010) Conservation

genetics in transition to conservation genomics. Trends in Genetics. 26: 177-187.

Ouborg NJ (2010) Integrating population genetics and conservation biology in the era of genomics. Biology letters. 6: 3-6.

Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? Trends in Ecology & Evolution. 20: 481-486.

Pirseyedi SM, Valizadehghan S, Mardi M, Ghaffari MR, Mahmoodi P, Zahravi M, Zeinalabedini M, Nekoui SMK (2010) Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). International Journal of Molecular Sciences. 11: 2010-2016.

Primmer CR (2009) From conservation genetics to conservation genomics. Annals of the New York Academy of Sciences. 1162: 357-368.

Roelofs D, Aarts M, Schat H, Van Straalen N(2008) Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. Functional Ecology. 22: 8-18.

Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature. 392: 491-494.

Shabani M, Bertheau C, Zeinalabedini M, Sarafrazi A, Mardi M, Naraghi SM, Rahimian H, Shojaee M (2012) Population genetic structure and ecological niche modeling of the leafhopper Hishimonus phycitis. J. Pest Sci., DOI 10.1007/s10340-012-0463-9 (1-11).

Shafiee M, Mardi M, Fattahi Moghadaam M, Zamani Z, Karimi Farsad L, Hossini Salekdeh SG (2011) Microsatellite marker development in *Citrus aurantifolia* L. using Transcriptome sequencing. 3rd Iranian Agricultuarl Biotechnology Congress. Mashhad, Iran.

Simon SA, Zhai J, Nandety RS, McCormick KP, Zeng J, Mejia D, Meyers BC (2009) Short-read sequencing technologies for transcriptional analyses. Annual Review of Plant Biology. 60: 305-333.

Slate J (2005) Invited Review: Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. Molecular Ecology. 14: 363-379.

Slate J, Gratten J, Beraldi D, Stapley J, Hale M, Pemberton JM (2009) Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. Genetica, 136: 97-107.

Stephens M, Balding DJ (2009) Bayesian statistical methods for genetic association studies. Nature Reviews Genetics, 10: 681-690.

Thomson RC, Wang IJ, Johnson JR (2010) Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution, and conservation. Molecular Ecology. 19: 2184-2195.

Van Straalen, NM, Roelofs D (2011) An introduction to ecological genomics. OUP Oxford.

Wheat CW (2010) Rapidly developing functional genomics in ecological model systems via 454 transcriptome sequencing. Genetica. 138: 433-451.

Zeinalabedini M (2008) Evaluation of genetic diversity in cultivated almonds and related *Prunus* using simple sequence repeat markers. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 10.

Zeinalabedini M, Grigorian V, Torchi M, Khayam-Nekoui M, Majourhat K, Dicenta F, Martinez-Gomez P (2008a) Genetic introgression in natural and directed interspecific crosses within native Iranian wild almond species. 18th EUCARPIA. Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. Valencia. Spain.

Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam Nekoui SM., Grigorian V, Torchi M, Dicenta F, Martínez-Gómez P (2008b) Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. Scientia Horticulturae. 116: 80-88.

Zeinalabedini M, Nakhoda B, Majidian P, Khosh Kholgh Sima NA, Mortazavi E (2011a) Biodiversity, Genetic Engineering and Sustainable Development. Journal of Biosafety. 4(1): 53-72.

Zeinalabedini M, Kazemi alamuti M, Mardi M, Zahravi M, Vazifehshenas M, Khayam Nekoui SM., Nakhoda B (2011b) New methods to determine the genetic structure of germplasm collections and natural populations using molecular markers. 12th Iranian Genetics Congress. Tehran, Iran.