بررسی تنوع ژنتیکی ارقام محلی لیموترش جنوب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

اسد اسدی آبکنار[1*]، عطاالله شرفی[1]، روح اله رجبی[2] ، محمد مسائلی[3] و حامد حسن زاده خانکهدانی[3]

۱- مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور-رشت. ۲-بخش گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد خوزستان، واحد دزفول. ۳- دانشجوی سابق اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان، رشت. ۴- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان-ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب.

*نویسنده مسئول: asadiabkenarasad@gmail.com

چکیده

به منظور بررسی ژنتیکی ارقام محلی لیموترش ایران ۲۸ ژنوتیپ از ارقام محلی لیموترش استان هرمزگان، جمع آوری شده در ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب به همراه ۱۹ ژنوتیپ از مرکبات موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات شمال کشور در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. هفت آغازگر ISSR جهت واکنش PCR به کار برده شد هر هفت آغازگر انتخاب شده الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی برای ۴۷ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید نمودند که میزان چندشکلی این قطعات از ۶۶,۶ درصد تا ۱۰۰ درصد می باشد. در مجموع تعداد ۱۱۴ الل در گونه های تحت بررسی مشاهده گردید. تجزیه خوشه ای بر اساس داده های مولکولی به روش UPGMA و با ضریب تشابه دایس انجام شد. دندروگرام به دست آمده ۳ کلاستر اصلی را نشان داد. ژنوتیپ های M3، M4، M7، M14، R2، H2، S2 و S5 از مکزیکن لایم سوا نشدند که می تواند به علت نوسلار بودن این ژنوتیپ ها باشد. با توجه به این که در جنوب کشور بیماری جاروی جادوگر لیموترش بیماری کشنده لیموترش می‌باشد یافتن منابع مقاوم و یا متحمل به این بیماری به احتمال زیاد باید از ژنونیپ هایی از لایم صورت گیرد که منشا نوسلار نداشته باشند. بنابراین انتظار می‌رود که ژنونیپ‌های مورد مطالعه به جز ۸ مورد که با لیموترش شباهت کامل نشان دادند عکس العمل متفاوتی نسبت به این بیماری نشان بدهند چون پایه ژنتیکی متفاوتی با لیمو ترش دارند.

کلمات کلیدی: لیموترش، نشانگرهای ISSR، جاروک لیموترش

مقدمه

یکی از مهم‌ترین درختان میوه که در جنوب ایران پرورش می یابد لیموترش (*Citrus aurantifolia*) است که از گونه‌های مرکبات گرمسیری محسوب می‌شود و با شرایط گرم و خشک در جنوب کشور به خوبی سازگار شده و از اهمیت اقتصادی بالایی در منطقه برخوردار است. مهم‌ترین و معروف‌ترین لایم کشت شده در جنوب کشور مکزیکن لایم می‌باشد. متاسفانه در سال‌های اخیر شیوع بیماری کشنده جاروک لیموترش در استان هرمزگان باعث از بین رفتن درختان لیموترش در این استان گردیده است. بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان قرابت ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌ها به عنوان گام اولیه و اصلی در شناسایی و ارزیابی ارقام در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است. از مزایای نشانگرهای مولکولی می‌توان به فراوانی بالای آن‌ها در سطح ژنوم، عدم تاثیرپذیری آن‌ها از شرایط محیط، امکان به‌کارگیری آن‌ها در مراحل اولیه رشد گیاه، سهولت امتیازدهی، دقت و قابلیت بالای تفسیر نتایج اشاره نمود. ۲۰ تا ۲۵ درصد بذور لیموترش تک جنین‌اند (جنسی‌اند) یعنی از آن‌ها نهال‌هایی به دست می‌آید که شبیه والد مادر نیستند. از آنجایی که در مناطق جنوبی کشور در طول زمان لیموترش از طریق بذر ازدیاد یافته، به احتمال زیاد منشا تنوعی که با آنالیز مولکولی به دست می‌آید نهال‌های جنسی‌اند. فقط نمونه‌هایی که با لیموترش شباهت ۱۰۰٪ نشان می‌دهند احتمالا باید نوسلار باشند. با توجه به این که بیماری جاروک لیموترش، بیماری کشنده لیموترش می‌باشد یافتن منابع مقاوم و یا متحمل به این بیماری به احتمال زیاد باید از ژنوتیپ‌هایی از لایم صورت گیرد که منشا نوسلار نداشته باشند زیرا پایه ژنتیکی متفاوتی با لیموترش دارند و انتظار می‌رود عکس العمل متفاوتی نسبت به این بیماری نشان دهند.

مواد و روش‌ها

۲۸ ژنوتیپ از ارقام محلی لیموترش استان هرمزگان، جمع آوری شده در ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب، به همراه ۱۹ ژنوتیپ از مرکبات موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات شمال کشور برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. ۲ تا ۳ برگ سالم و جوان از هر گیاه جمع آوری و برای استخراج DNA در هاون چینی توسط ازت مایع پودر شدند. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت (Murry & Tompson, 1980). برای تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر با نسبت جذب ۲۶۰-۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. نمونه های با نسبت ۱/۸ و یا بیشتر به دلیل ناخالصی کم تر جهت انجام آزمایش ها انتخاب شدند و رقیق سازی DNA استخراجی برای دست یابی به غلظت ۲۰ تا ۲۵ نانو گرم بر میکرولیتر صورت گرفت. در مجموع هفت آغازگر ISSR جهت واکنش PCR به کار برده شد (Awasthi et al., 2008) (جدول ۱). واکنش های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer ، ۰/۸ میکرولیتر کلرید منزیم ۵۰ میلی مولار ، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase ، ۰/۲ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۵۰ میلی مولار ، مخلوط نوکلئوتیدی ($dNTP_S$) ۱/۵ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۲۵ نانوگرم بر میکرو لیتر، انجام پذیرفت. چرخه حرارتی واکنش PCR به شرح زیر می باشد: یک چرخه ی ۲ دقیقه ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول واکنش PCR بر روی ژل آگازر تاپ ویژن ۱,۵ درصد در توان ثابت ۷۵ وات و به مدت ۳ ساعت انجام شد . الگو های نواری حاصل به صورت وجود و یا عدم وجود باند در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیاز دهی شدند . تجزیه ای خوشه ای به روش UPGMA و با ضریب تشابه دایس انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS Pc ver 2. 02 انجام گرفت (Rohlf, 1990).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده ، تعداد الل های رد یابی شده، درصد چندشکلی و میزان PIC

آغازگر	تعداد الل		درصد چندشکلی	PIC
	کل الل ها	الل های چند شکل		
$(AG)_8G$	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰/۳۹
$(GA)_8C$	۱۷	۱۵	۸۸/۲	۰/۳۸
$(GA)_8A$	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰/۳۳
$(CT)_8T$	۱۲	۸	۶۶/۶	۰/۳۲
$(AC)_8YT$	۱۷	۱۶	۹۴/۱	۰/۳۲
$(GT)_8AGTCY$	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۴
$(GACA)_4$	۲۰	۱۵	۷۵	۰/۳۵
Total	۱۱۴	۱۰۲	۸۹/۱	۰/۳۵

Y: C/T

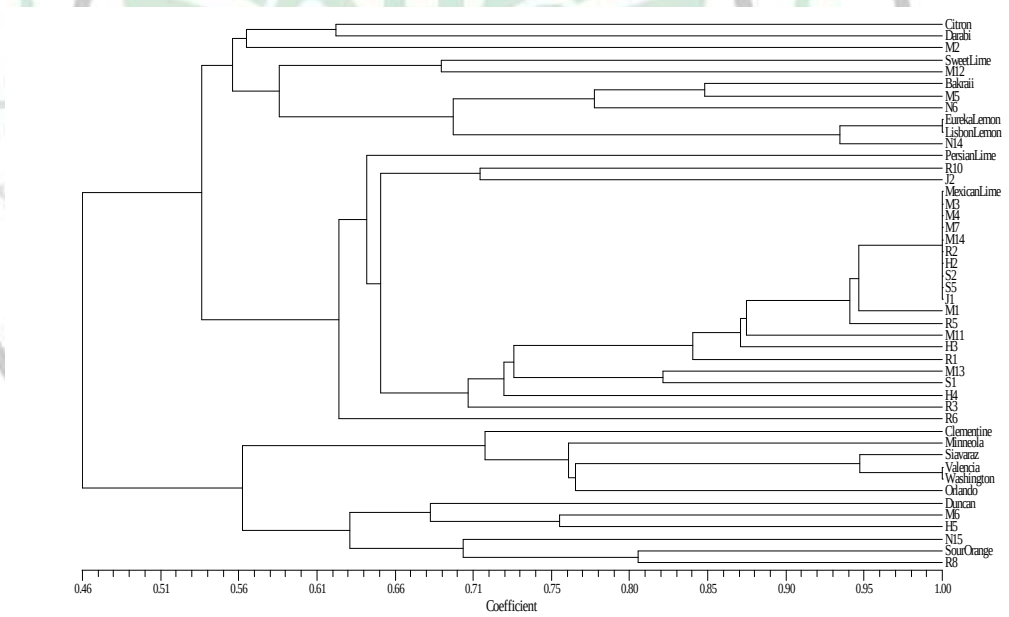
نتایج و بحث

همه هفت آغازگر قطعاتی قابل امتیازدهی تولید کردند که میزان چندشکلی این قطعات در جدول (۱) نشان داده شده است که از ۶۶/۶ درصد تا ۱۰۰ درصد می باشد. PIC اشاره به ارزش یک نشانگر برای تشخیص پلی مورفیسم در درون یک جمعیت دارد. PIC بستگی به تعداد آلل شناسایی شده و توزیع فراوانی آنها دارد و معادل تنوع ژن است. میزان PIC برای نشانگرهای غالب نظیر

ISSR حداکثر ۰/۵ است و میزان PIC برای این نشانگرهای به کار رفته نیز کمتر از ۰/۵ بود. ضریب کوفنتیک به دست آمده بالا بود (r = 0.932) که نشان می دهد ۹۳ درصد از ماتریس تشابه به دندروگرام منتقل شده است.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که هر هفت آغازگر انتخاب شده الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی برای ۴۷ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید نمودند. در مجموع تعداد ۱۱۴ الل در گونه های تحت بررسی مشاهده گردید تجزیه ای خوشه ای بر اساس داده های مولکولی به روش UPGMA و با ضریب تشابه دایس انجام شد (شکل ۱). میزان شباهت گونه های مورد بررسی بر اساس ضریب تشابه دایس از حداقل ۰/۵۵ تا حداکثر ۱,۰۰ متغییر بوده که نشان دهنده میزان تنوع میان ژنوتیپ های مورد بررسی می باشد. دندروگرام به دست آمده ۳ کلاستر اصلی را نشان داد. ژنوتیپ های M3، M4، M7، M14، R2، H2، S2 و S5 از مکزیکن لایم سوا نشدند که می تواند به علت نوسلار بودن این ژنوتیپ ها باشد.

بر اساس گزارش بهرامی و همکاران (۱۳۹۰) ژنوتیپ های R10، R8، R3، R6، M11، H4 و H5 متحمل نسبت به بیماری جاروک لیموترش معرفی شدند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. زیرا بر اساس نتایج این تحقیق ژنوتیپ های یاد شده فاصله ژنتیکی قابل توجهی را با مکزیکن لایم که رقم حساس به بیماری جاروک لیموترش است نشان می دهند. با توجه به این که در جنوب کشور بیماری جاروی جادوگر لیموترش بیماری کشنده لیموترش می‌باشد یافتن منابع مقاوم ویا متحمل به این بیماری به احتمال زیاد باید از ژنونیپ هایی از لایم صورت گیرد که منشا نوسلار نداشته باشند. بنابراین انتظار می‌رود که ژنونیپ‌های مورد مطالعه به جز ۸ مورد که با لیموترش شباهت کامل نشان دادند عکس العمل متفاوتی نسبت به این بیماری نشان بدهند چون پایه ژنتیکی متفاوتی با لیمو ترش داند. در پایان استفاده از نشانگر های مولکولی دیگر مانند SSR وAFLP و بررسی DNA ارگانل های کلروپلاست و میتوکندری این گونه ها پیشنهاد می شود.



شکل ۱ : دندروگرام بر اساس داده های مولکولی ISSR به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس

منابع

۱. بهرامی، ح ر، فقیهی م م، اکبری ح، حسن زاده ح. ۱۳۹۰. واکنش ارقام ترش استان هرمزگان و پایه های تجاری مرکبات نسبت به فیتوپلاسمای بیماری جاروک لیمو ترش. مجموعه مقالات هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان.

2. Awasthi, A.K., Kar, P.K., Srivastava, P.P., Rawat, N., Vijayan, K., Pradeep, A.R. and Raje Urs, S. 2008. Molecular evaluation of bivoltine, polyvoltine and mutant silkworm (*Bombyx mori* L.) with RAPD, ISSR and RFLP-STS markers. Indian Journal of Biotechnology, 7: 188-194.

3. Murry, M.G.and Tompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8, 4321-4325.
4. Rohlf, F.J. 1990. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariat Analysis System , version 2.02. Exeter Software , New York.

Genetic Diversity Evaluation of local lime cultivars of South of Iran using ISSR marker

A. Asadi-Abkenar[1]*, A. A. sharafi[1], Rouhollah Radjabi[2], M. Masaeli[3] and H. Hasanzadeh Khanakhadani[4]

1- Agricultural biotechnology research institute of Iran-Branch of North region-Rasht. 2- Plant Protection Department, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Khouzestan. 3- Previous MSc Student of Plant Breeding, Gilan University, Rasht. 4- Research Center of Agriculture and Natural Resources, Minab Station, Hormozgan, Minab.

*Corresponding author: asadiabkenarasad@gmail.com

Abstract

Because of a long history of cultivation as well as propagation by seed, many variants of Mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] have emerged in south citrus growing regions of Iran. In this study, genetic variation in 28 lime-like accessions from five regions of south of Iran, and their relatedness with other 19 citrus cultivars were analyzed using ISSR markers. Seven ISSR primers were used for allele scoring. In total, 114 ISSR polymorphic alleles were detected. Both UPGMA cluster analyses and principal components analyses of ISSR data showed that most of the lime-like accessions (19) had hybrid origin rather than being nucellar of Mexican lime (9). The variants may be used to select resistant or tolerant genotypes against biotic constricts like Witches' Broom Disease of Lime which destroyed too many trees in the regions.

Key words: Cluster analysis, Mexican lime (*Citrus aurantifolia*), ISSR markers