گروه‌بندی و تعیین میزان تنوع بین جمعیت‌های سیب بر اساس ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب در باغات استان کهگیلویه و بویراحمد به کمک نشانگرهای اختصاصی SCAR و SSR

هاجر یزدانی[1*]، محمدمجتبی کامل منش[2]

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز.

*نویسنده مسئول: yazdanihajar@rocketmail.com

چکیده

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۳در دانشگاه آزاد شیراز بر روی ۶ جمعیت سیب جمع آوری شده در نقاط مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد انجام شد. پس از نمونه‌برداری، استخراج DNA انجام گرفت و ۱۳ آغازگر SCAR و SSR متصل به ژن‌های مقاوم به بیماری لکه سیاه سیب بر روی جمعیت‌های مورد بررسی تکثیر انجام گرفت. بعد از نمره‌دهی باندها، نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۰۰ درصد تنوع مشاهده شده متعلق به درون جمعیت‌ها بود. همچنین نتایج فاصله ژنتیکی نشان داد که بیشترین فاصله بین دو جمعیت ka-mn و ka-h و کمترین فاصله بین دو جمعیت ka و si می‌باشد. همچنین نتایج تجزیه کلاستر نشان داد که خط برش با کمک تجزیه واریانس مولکولی، ۶ جمعیت را به ۲ گروه تقسیم می‌کند. از این نتایج بدست آمده امید است که با تلاقی جمعیت‌ها دور از هم، همچنین تلاقی بین نمونه‌ها موجود در هر جمعیت بتوان نتاجی با قدرت هتروزیس و مقاومت بالاتر به بیماری لکه سیب بدست آورد.

کلمات کلیدی: لکه سیاه سیب، تجزیه کلاستر، تجزیه واریانس مولکولی، فاصله ژنتیکی، SCAR و SSR

مقدمه

سیب به همراه اکثر میوه‌های معتدله نظیر گلابی، آلو، هلو، زردآلو، هلو، گیلاس، توت فرنگی، تمشک و توت سیاه به خانواده گل‌سرخیان(Rosaceae) تعلق دارد. سیب، گلابی، به، زبان گنجشک کوهی و برخی جنس‌های غیر مشهور در زیر خانواده (pomoideae) تحت عنوان میوه‌های دانه دار طبقه بندی می شوند. بر اساس یافته‌های محققین، جنس(Malus) تاکنون بیش از ۳۰ گونه مختلف سیب شناسایی شده است که اغلب آنها قابلیت تلاقی با یکدیگر را دارند. سیب کشت شده احتمالا در نتیجه بومی شدن اولیه و در پی آن تلاقی‌های بین گونه‌ای حاصل شده است.. سیب‌ها عموما خود ناسازگار بوده و برخی از طریق تامیزیدن تولید می‌شوند. سیب بعنوان محصولات مهم باغی به شمار می‌آید .که زیر کشت فعلی کشور تقریبا حدود ۱۴۸۶۶۵ هکتار و صادارات کشور ما تقریبا ۶۶۸۱۹۲ تن می‌باشد. کشور ما از نظر سطح زیر کشت در مقام هفتم و از نظر صادرات در رده ۲۹ جهان قرار دارد.درختان سیب در طولانی مدت با محرک‌های محیطی و موتاسیون پاتوژن‌ها مواجه شده‌اند. برای از بین بردن پاتوژن‌ها و تولید سیب با کیفیت بالا تلاش‌های زیادی انجام گرفته است. اکثر پاتوژن‌ها با عوامل حفاظتی گیاه مبارزه می‌کنند. اصلاح مقاومت باعث از بین رفتن پاتوژن‌های گیاه توسط خود گیاه می‌شود. غالب‌ترین و مضرترین پاتوژن در سیب مانند لکه سیاه سیب (Venttoria inaequalis)، آتشک (Erwinia amylovoro) ، لکه برگی آلتر ناریایی (Alternaria galligeria) و غیره به اثبات رسیده است.

در تمام کشورهایی که سیب کشت می شود بیماری (Apple scab) وجود دارد، که از لحاظ اقتصادی مهمترین بیماری سیب به شمار می رود. این بیماری در مناطقی که بهار و تابستان خنک و مرطوب دارند شدیدا خسارت بار است و گاهی تا ۷۰ در صد محصول را از بین می برد (بی‌نام، ۱۳۷۹). بیشترین بیماری دنیا در شمال شرقی آمریکا، اروپا، استرالیا مشاهده گردیده است و در ایران در اکثر نقاط و از نظر کثرت به ترتیب در شمال ایران، آذربایجان، خراسان، فارس، همدان، اصفهان و اطراف تهران می‌باشد. بیماری لکه سیاه سیب به برگ، دمبرگ، شکوفه، کاسبرگ، میوه، دم میوه و گاهی به شاخه وفلس و جوانه نیز حمله می کند (اگریوس،جرج.ان . ۱۳۷۶). عامل بیماری لکه سیاه به فرم جنسی (Venturia-inaeqalis) و به فرم غیر جنسی (Fusicladium-dendriticum) می باشد.

یکی از راه‌های کنترل این بیماری کشت ارقام نسبتا مقاوم مثل واریته زرد و قرمز لبنانی می‌باشد (Soriano et al., 2009). تا نیمه دوم قرن بیستم اکثر ارقام سیب دنیا، فقط ارقام بذری بودند که گزینش آنها به صورت تصادفی توسط باغ‌داران انجام گرفته بود. در حالی که هم اکنون از ۱۰۰۰۰رقم به صورت رسمی ثبت شده است اما فقط تعدادکمی از انها حدود ۴۰رقم, تجاری در سراسر دنیا کشت می شود. (Vay et al., 1990)

از سال ۱۹۸۳بهترین ارقام شناخته شده سیب در دنیا در نهال‌های تصادفی یافت شده که منشا ان آمریکای شمالی بود که در قرن ۱۸و۱۹معرفی شده بود. از جمله این ارقام می‌توان گلدن دلیشز(۶/۳ میلیون تن)، رد دلیشز (۳میلیون تن) و کوکوس اورنج پی پن (۷/۱میلیون تن) اشاره کرد. به نژادی کنترل شده سیب توسط (Thomas A. Kinght) شروع شد. او اولین بار ارقامی تولید کرد که دارای والدین مشخص بودند. پس از آن تکنیک دورگه گیری کنترل شد، ادامه یافت به‌طوری که این روش هم اکنون اساس برنامه‌های اصلاح سیب را تشکیل می دهد و توجه به کارهای اصلاحی انجام شده در گذشته موید ان است که عدم موفقیت در این امر بیشتر به دلیل ضعف در انتخاب والدین بوده است. در طول شصت سال اخیر با معرفی ژن‌های اصلی مقاوم که از سیب‌های وحشیMalus Floribunda 821 ایجاد می‌شود. وجود ژن‌های مقاوم ترکیبی در گیاه توسط مجموعه نشانگرهای پیوسته (MAS) تشخیص داده می‌شود. یکی از منابع مقاومت به Scab بهتر است از نقشه QTLاستفاده شود (Fletcher, H.R. 1969). هدف از این تحقیق گروه بندی جمعیت‌های مورد بررسی و تعیین بهترین تلاقی بین جمعیت‌ها با کمک روش تجزیه کلاستر و فاصله ژنتیکی نی و نعیین میزان تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها با کمک تجزیه واریانس مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ابتدا از برگهای جوان و تازه درختان سیب موجود در ۶ نقطه استان کهگیلویه و بویراحمد نمونه گیری شد. این برگ‌ها از باغات موجود در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد جمع آوری شد (جدول ۱) که با توجه به سطح زیر کشت هر منطقه و ارقام موجود در باغات آن منطقه، تعداد باغات مورد بازدید و همچنین تعداد نمونه ها متفاوت بود. بعد از جدا شدن برگ‌ها از درخت برای جلوگیری از تخریب DNA آنها، برگ‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شد و در یخ قرار داده شد و آنها را به فریزری با دمای حدود ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد.

DNA با روش تغییر یافته CTAB، استخراج شد. سپس کمیت DNA توسط اشعه ماوراء بنفش در طول موج ۲۶۰ نانو متر توسط دستگاه اسپکترو فتومتر ارزیابی و برای مشخص نمودن کیفیت DNA مورد نظر از ژل آگارز و دستگاه الکترو فورز استفاده شد. و با ۱۳ نشانگرSCAR و SSR به وسیله PCR تکثیر انجام گردید. نمونه های تکثیری بر روی ژل برده شد و بر اساس حضور یا عدم حضور باند مربوطه نمره انجام گردید.

تجزیه کلاستر با استفاده از نرم‌افزار Mega4، فاصله ژنتیکی و تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام گردید.

جدول ۱- جمعیت‌های مورد بررسی در این تحقیق

کاکان
کاکان- حمزه خانی
کاکان- منصورخانی
کاکان – منصورآباد
تنگ سرخ
سی سخت

نتایج

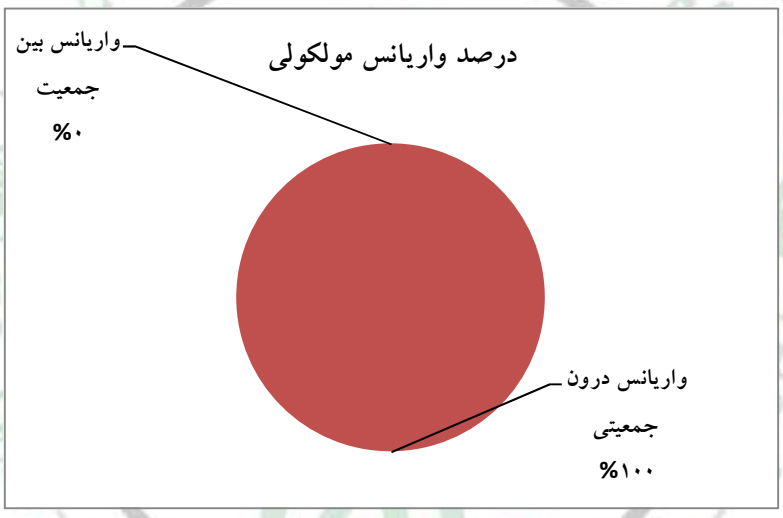
تجزیه واریانس مولکولی

جهت تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان گروهی جمعیت‌ها توسط آزمون تجزیه واریانس مولکولی و برنامه جین‌آلکس نسخه ۶,۳ صورت گرفت. نتیجه تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که سطح نسبتا بالایی از تمایز ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۱۰۰٪) شاهد هستیم. همچنین جدول تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول 2-تجزیه واریانس مولکولی بین جمعیت‌های سیب مورد بررسی

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	واریانس تخمینی	درصد واریانس
بین جمعیت	۵	۱.۷٤۸$^{n.s}$	۰.۰۰۰	۰٪
درون جمعیت	٤۸	۱.۸۲٤	۱.۸۲٤	۱۰۰٪
کل	۵۳		۱.۸۲٤	۱۰۰٪

$^{n.s}$ عدم اختلاف معنی‌دار آماری



شکل ۱-میزان واریانس بین و درون جمعیت‌های سیب مورد مطالعه

فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب

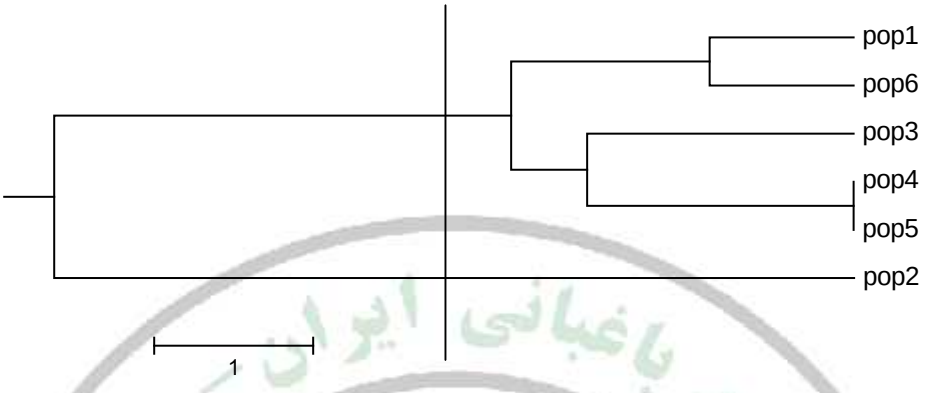
نتایج فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب مورد بررسی بر اساس فاصله نی و با استفاده از نرم‌افزار جین‌آلکس نشان داد که دو جمعیت Ka-mn و Ka-h بیشترین فاصله (۰/۱۷۲) و دو جمعیت Ka و Si دارای کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲۷) بودند (جدول ۳).

جدول ۳ - ماتریس فاصله ژنتیکی نی ما بین جمعیت‌های سیب مورد بررسی بر اساس آغازگرهای تکثیری متصل به ژن بیماری لکه سیاه سیب

جمعیت	Tn	Si	Ka-mn	Ka-m	Ka-h	Ka
Ka						0.000
Ka-h					0.000	0.162
Ka-m				0.000	0.082	0.078
Ka-mn			0.000	0.083	0.172	0.066
Si		0.000	0.030	0.048	0.137	0.027
Tn	0.000	0.053	0.112	0.052	0.098	0.029

تجزیه خوشه‌ای حاصل از جمعیت‌های مورد بررسی

تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها بر اساس ضریب فاصله نی و روش خوشه‌بندی UPGMA صورت گرفت. پس از انجام خط برش بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی نتایج نشان داد که این گروه‌بندی جمعیت‌ها را به ۲ گروه تفسیم کرد. که نتایج آن در شکل۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲-تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی

بحث

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۰۰ درصد تنوع موجود متعلق به تنوع درون جمعیت‌ها است.این نتیجه نشان داد جهت انتخاب و گزینش و تجمع ژن‌های مقاوم به بیماری به درون جمعیت وارد شویم. نتایج فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نشان داد که بیشترین فاصله بین دو جمعیت ka-mn و ka-h و کمترین فاصله بین دو جمعیت ka و si بود. همچنین نتایج فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های سیب نشان داد که بیش از یک مورد بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی وجود دارد. که حاکی از تنوع بالای درون نمونه‌ها می‌باشد. هر چه دو جمعیت از هم دورتر باشند احتمال کراسینگ اور و تولید نتاج برتر از والدین بیشتر است در نتیجه در برنامه‌های اصلاحی آتی توصیه می‌شود با تلاقی دو جمعیت ka-mn و ka-h و دورترین نمونه‌ها بدست آمده شاهد هتروزیس و قدرت مقاومت به بیماری بیشتر و همچنین صفات مناسبتر و مفیدتر خواهیم بود. همچنین تنوع هتروزیس و قدرت مقاومت به بیماری بیشتر در بین تلاقی نمونه‌ها به دلیل موارد بیشتر از دورترین فاصله بین نمونه‌ها بیشتر مشاهده می‌گردد. که یک جمعیت وسیع و مناسب جهت برنامه‌های آتی اصلاحی بوجود می‌آورد. نتایج تجزیه کلاستر بین جمعیت‌ها و نمونه‌ها نشان داد که خط برش جمعیت‌ها را به 2 گروه تقسیم کرد.

منابع

۱. اگریوس،جرج.ان . ۱۳۷۶ . آسیب شناسی گیاهی، بیماریهای قارچی گیاهان جلد(۲) (ترجمه) . انتشارات دانشگاه ارومیه.

۲. آمار نامه کشاورزی سال زراعی ۸۰-۱۳۷۹ دفتر آمار و فناوری اطلاعات شهریور ۱۳۸۱.

3. A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggini, F. Gennari, S. Sansavini, and C. Gessler , (2005). Identification by genome scanning approach (GSA)of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm.
4. De Vay, J. E. Stapleton, J. J., C. L. Elmore, 1990. Soil So- Soil So- larization. Food and Agricultural Organization, United Nations. FAO Report #109. Rome, Italy
5. Fletcher, H.R. 1969, The Story of the Royal Horticultural Society 1804 -1968, Oxford and London, Oxford University Press for the Royal Horticultural Society, (Portrait facing page 52
6. Gygax, M, Gianfranceschi, L, Liebha, R Kellerhals, M Gessler, C and Patocchi, A . (2004). Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from Malus baccata jack,

7. Mingliang Xu, Ernesto Huaracha, and Schuyler S. Korban (2000). Development of sequence-characterized amplifiedregions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple.
8. Porras-Soriano, A; Soriano-Martin, ML; Porras-Piedra, A; Azcon, R. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY. 166(13):1350-1359.
9. V.G.M. Bus1, E.H.A. Rikkerink, W.E. van de Weg, R.L. Rusholme,S.E. Gardiner, H.C.M. Bassett, L.P. Kodde, L. Parisi, F.N.D. Laurens, E.J. Meulenbroek3 and K.M. Plummer (2005). The Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple.

Grouping and determination of genetic diversity apple populations based on apple scab resistance genes in Kohgiluyeh and Boyrahmad Province orchard Using SCAR and SSR markers

Hajar Yazdani[1*], Mohammad Mojtaba Kamelmanesh[2]

1 and 2 Ms.c Student and Assistant Professor Department of Phytopathology, Islamic Azad University, Shiraz

*Corresponding author: yazdanihajar@rocketmail.com

Abstract

The study during the years 2013-2014 at the University of Shiraz on 6 apples population was performed collected in different parts of the province. After sampling, DNA extraction was performed and 13 primer SCAR and SSR linked to genes for resistance to scab apple disease of apple proliferation was performed on the population studied. After scoring bands, Analysis of molecular variance indicated that 100% of the variation observed within population. The results indicated that the maximum genetic distance between two populations ka-h and ka-mn and minimum distance between si and ka population. The results of cluster analysis showed that the cutting of point with the analysis of molecular variance of 6 population divided into 4 groups. From these results, it is hoped that the cross of the population are far apart, the cross between the samples in each population can be obtained Heterosis with higher resistance to scab apple disease

Key words: Scab apple, Cluster Analysis, Analysis of molecular variance, Distance Genetic, SSR and SCAR