بررسی ژن های مقاومت vh1 و vh2 و vh3 و vh4 به بیماری لکه سیاه سیب در باغات استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگرهای مولکولی

هاجر یزدانی*[1]، محمد مجتبی کامل منش[2]

۱و۲ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشدعلوم باغبانی، دانشگاه ازاد اسلامی ،شیرازو استادیار دانشگاه آزاد شیراز، گروه گیاه پزشکی

*نویسنده مسئول: yazdanihajar@rocketmail.com

چکیده

از نظر اهمیت اقتصادی می‌توان گفت که لکه سیاه سیب پر خسارت‌ترین بیماری سیب در تمام نقاط جهان است و بطور کلی خسارت آن در طی دوره رویش بیش از خسارت مربوط به سایر بیماریهای سیب می‌باشد. مناسب ترین روش مبارزه با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می باشد .به منظور تولید ارقام مقاوم، ابتدا باید ژنهای مقاومت در منابع ژنتیکی شناسایی شود. این پژوهش به منظور شناسایی حضور ژن های مقاومت به لکه سیاه Vh2,Vh3,Vh4 , vh1,و در 55 ژنوتیپ مختلف سیب در استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR , SCAR انجام شد. نمونه های برگی ژنوتیپ های مورد استفاده اواخر اردیبهشت ماه جمع آوری گردید وپس از استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر روی آنها انجام گردید. نتایج نشان داد که از تعداد ۴ آغازگر مورد استفاده در مجموع۱۰۰ قطعه قابل امتیازدهی ثبت گردید. طول قطعات حاصل از آغازگرهای CH02b10وs22و CH03d01 و OPL19به ترتیب ۱۲۱،۱۳۰۰،۱۲۴،۴۳۳ می باشد.بیشترین قطعه تولیدی متعلق به آغازگرOPL19(۴۴قطعه) مربوط به ژنvh2و کمترین تعداد مربوط به آغازگرهای S22 (۴قطعه) مربوط به ژن vh4 بودند. درصد چندشکلی برای تمامی آغازگرها برابر ۱۰۰ بود.در مجموع هرچه والدین از هم دور باشند، امکان تولید هتروزیس بیشتر شده و احتمال موفقیت در ایجاد ژنوتیپ های برتر افزایش خواهد یافت.

کلمات کلیدی: لکه سیاه سیب، ژن مقاومت، نشانگر مولکولی، استخراج DNA، PCR

مقدمه

از نظر اهمیت اقتصادی می‌توان گفت که لکه سیاه سیب پر خسارت‌ترین بیماری سیب در تمام نقاط جهان است و بطور کلی خسارت آن در طی دوره رویش بیش از خسارت مربوط به سایر بیماریهای سیب می‌باشد. این خسارت شامل نقصان مقدار محصول ، کاهش کیفیت و کمیت آن و افزایش هزینه بهره‌برداری می‌باشد. (دولتی بانه و مجدی، ۱۳۸۸) خسارت بیماری گاهی به ۷۰٪ مقدار محصول می‌رسد نمونه ی قارچ عامل بیماری لکه سیاه سیب ابتدا در سال ۱۸۱۹ در سوئد توسط فریز جمع آوری و تشخیص داده شده است(Anderson, 1956) در ایران نیز بیماری مزبور اولین بار در سال ۱۳۲۵ به وسیله اسفندیاری گزارش گردید. (دولتی بانه و مجدی، ۱۳۸۸).عامل بیماری لکه سیاه قارچی است به نام *Venturia inaequalis* از رده آسکومیست که اسپورهای جنسی در یک ساختار کیسه مانند به نام آسک تولید میکند.(Vaillancourt and Hartman, 2000).

مهندسی ژنتیک و روش های به نژادی مولکولی امکان ایجاد واریته ها و گیاهانی با صفاتی ویژه را فراهم میکند که دسترسی به آنها از روشهای معمول غیرممکن است .از جمله ی این صفات، صفت مقاومت به تنش هاست که به دلیل اهمیت فراوان تنش های زنده و غیرزنده تهدیدکننده گیاهان، توجه محققین را بسیار به خود جلب کرده است .تکنیکهای مهندسی ژنتیک امکان ردیابی،

جداسازی، اصلاح، انتقال و بیان تک ژن یا گروههایی از ژنهای مرتبط به هم از یک موجود به موجود دیگر را فراهم کرده است .(آگریوس، ۱۳۸۹)در بهنژادی مقاومت به لکه سیاه در تکثیر سیب ها، ژن مقاومت Vf به 821 *Malus floribunda* برمی گردد که در این راه مورد استفاده قرار گرفت. (Boone 1971; MacHardy 1996)منابع گوناگونی از مقاومت به لکه سیاه کشف شده است (Williams, Kuc, 1969). چند ژن اصلی مقاومت به لکه سیاه از میوه های کوچک گونه سیب های آسیایی سرچشمه گرفته اند. ژن Vbj از *Malus baccata jackii* ، ژن Vb از *M. baccata* ، ژن Vm از804 *M. Xmicromalus and M. Xatrosanguinea* ، Vr از R12740-7A (*Russian Seedling*) *M. pumila* ، Vf از 812 *M. Xfloribunda* به لاین ها و انتخاب های اصلاحی وارد شده اند که آنها را برای اهداف اصلاحی قابل استفاده می سازد (Liebhard *et al.*, 2003)تا کنون اساساً مقاومت Vf در ارقام تجاری ثبت شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۵ نمونه کشت شده در باغات استان کهگیلویه و بویراحمد برای انجام آزمایش انتخاب شدند. در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه برگ های تازه و جوان این ارقام به منظور شناسایی ژن های مقاومت به لکه سیاه سیب جمع آوری شدند.استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد.

جدول ۱- مواد لازم برای استخراج DNA

مواد مورد نیاز	غلظت
بافر CTAB	۱%به نسبت
Chloroform:iso-amyl alcohol	۱:۴۱
Iso Propanol	
Ethanol	به مقدار لازم ۷۰٪

آغازگرهای مورد استفاده مطابق جدول زیر می باشد.

جدول۲- آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

F: 5´-CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG-3´ R: 5´-CAAGTGGCTTCGGATAGTTG-3´	CH02b10	SSR	Vh1
F: 5´-CGCACCACAAATCCAACTC-3´ R: 5´-AGAGTCAGAAGCACAGCCTC-3´	CH03d01	SSR	Vh8
F: 5´-ACCTGCACTACAATCTTCACTAATC-3´ R: 5´-GACTCGTTTCCACTGAGGATATTTG-3´	OPL19	SCAR	Vh2
F: 5´-GTCGTGGAAGAGGACCGA-3´ R: 5´-GTCGTGGAAATCCTCGTGAG-3´	S22	SCAR	Vh4

واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از 2 میکرولیتر DNA ژنومی ، مواد PCR شامل dNTP mix ، TagDNA polymerase ، Mgcl2 و PCR buffer که از شرکت سیناژن می باشد، آغازگر و آب دوبار تقطیراستریل انجام شد.

جدول۳- سیکل های استفاده شده در واکنش های زنجیره ای پلیمراز

ژن	واسرشت سازی اولیه	واسرشت سازی	اتصال	بسط	بسط نهایی	تعداد چرخه
Vh_1	۹۴ درجه (۲:۳۰ ثانیه)	۹۴ درجه (۳۰ ثانیه)	۵۵ درجه (۳۰ ثانیه)	۷۲ درجه (۱ دقیقه)	۷۲ درجه (۵ دقیقه)	۳۳ سیکل
Vh_2	۹۴ درجه (۲:۳۰ ثانیه)	۹۴ درجه (۳۰ ثانیه)	۵۵ درجه (۳۰ ثانیه)	۷۲ درجه (۱ دقیقه)	۷۲ درجه (۵ دقیقه)	۳۳ سیکل
Vh_3	۹۴ درجه (۲:۴۵ ثانیه)	۹۴ درجه (۵۵ ثانیه)	۵۵ درجه (۵۵ ثانیه)	۷۲ درجه (۱:۳۹ ثانیه)	۷۲ درجه (۱۰ دقیقه)	۴۰ سیکل
Vh_4	۹۴ درجه (۲:۴۵ ثانیه)	۹۴ درجه (۵۵ ثانیه)	۵۵ – ۶۵ درجه (۵۵ ثانیه)	۷۲ درجه (۱:۳۹ ثانیه)	۷۲ درجه (۱۰ دقیقه)	۲۰ سیکل

جهت بررسی واکنش زنجیرهای پلیمراز و اطمینان از تکثیر قطعه DNA مدنظر، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۲٪بارگذاری شدند.

نتایج و بحث

تمامی آغازگرهای مورد استفاده در نمونه‌های گیاهی، محصولات تکثیر قابل ثبت را تولید نمودند.

از بین شاخص تنوع ژنتیکی محتوی اطلاعات چند شکلی، شاخص مارکری و قدرت تفکیک روش محتوی اطلاعات چندشکلی انتخاب گردید. محتوی اطلاعات چندشکلی معتیر تر از دو مورد دیگر عمل کرده است (Askary et al., 2013). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، می توان گفت که آغازگر Vh4 با بیشترین PIC توانسته است بهتر از بقیه نشانگرهایِ استفاده شده، فاصله ژنتیکیِ نمونه ها را مشخص کند. همانطور که نتایج نشان می‌دهد میزان فراوای آللی به دلیل نسبت عکس با محتوی اطلاعات چند شکلی کمترین میزان را دارا بود.بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین میزان تنوع ژنی از نظر آلل تکثیری در جمعیت Si مشاهده شد. زیرا بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی، شاخص شانون، تعداد آلل موثر و تعداد آلل متفاوت که همگی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی هستند در این جمعیت برآورد گردید. در نتیجه زمینه ژنتیکی متنوعی دارند که باعث شده تا فاکتورهای تنوع ژنتیکی در این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها بالاتر باشد. در نتیجه از این زمینه ژنتیکی متنوع جهت انتخاب نمونه و کارهای اصلاحی آتی استفاده می گردد.

جدول ۴- نتایج حاصل از تکثیر آغازگرهای متصل به ژن بیماری لکه سیاه سیب

جمعیت	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	جمعیت	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4
Ka1	0	1	0	1	Si1	0	1	1	0
Ka2	0	1	0	0	Si2	0	1	1	0
Ka3	0	1	1	0	Si3	1	1	0	0
Ka4	0	1	0	0	Si4	0	1	1	0
Ka5	0	1	1	1	Si5	1	1	1	0
Ka6	0	1	0	0	Si6	0	1	1	1
Ka7	0	1	1	0	Si7	0	1	1	1
Ka8	0	1	1	0	Si8	0	1	1	0
Ka9	0	0	1	0	Si9	0	1	1	0
Ka10	1	1	0	0	Si10	0	1	1	0
Ka11	1	0	0	0	Si11	1	1	0	0
Ka12	0	1	0	0	Si12	1	1	0	0
Ka13	0	0	1	0	Si13	0	0	1	0
Ka14	0	1	0	0	Si14	0	0	1	0
Ka15	1	1	1	0	Si15	1	1	0	0
Ka16	1	1	0	0	Si16	1	1	0	0
Ka-h1	1	1	1	0	Tn1	1	1	1	0
Ka-h2	1	1	0	0	Tn2	1	0	0	0
Ka-h3	1	1	1	0	Tn3	1	0	1	0
Ka-h4	1	0	0	0	Tn4	0	0	0	0
Ka-m1	0	0	1	0	Tn5	1	1	0	0
Ka-m2	0	1	1	0	Tn6	0	1	1	0
Ka-m3	1	1	0	0	Tn7	0	1	0	0
Ka-m4	1	1	0	0	Tn8	0	1	1	0
Ka-mn1	0	1	1	0	Tn9	1	1	0	0
Ka-mn2	0	1	1	0	Tn10	1	1	0	0
Ka-mn3	1	1	0	0	Ka-mn4	1	1	0	0

جدول ۵- بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی بر اساس آغازگرهای متصل به ژن بیماری لکه سیاه سیب

آغازگر	تنوع ژنتیکی نی	شاخص شانون	تعداد آلل موثر	تعداد آلل متفاوت	محتوی اطلاعات چند شکلی	فراوانی آللی
Vh1	0.31	0.46	1.51	1.83	0.80	0.44
Vh2	0.41	0.57	1.80	1.83	0.34	0.81
Vh3	0.41	0.60	1.71	2.00	0.73	0.52
Vh4	0.04	0.08	1.05	0.67	0.99	0.07

جدول ۶-بررسی وضعیت فراوانی تکثیر آغازگرهای متصل به ژن بیماری لکه سیاه سیب

آغازگر متصل به ژن	Tn	Si	Ka-mn	Ka-m	Ka-h	Ka
Vh1	0.37	0.21	0.29	0.29	1.00	0.13
Vh2	0.45	0.65	1.00	0.50	0.50	0.57
Vh3	0.23	0.44	0.29	0.29	0.29	0.25
Vh4	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.06

منابع

۱. آگریوس ج ا. 1389. بیماری شناسی گیاهی. ترجمه ایزدپناه ک. اشکان م. بنی هاشمی ض. رحیمیان ح. میناسیان و. ویرایش پنجم. چاپ اول. انتشارات آییژ.۳۵۶ صفحه.

۲. دولتی بانه،ومجدی،وحیده(۱۳۸۸).ژنتیک مقاومت در مقابل بیماری های مهم سیب،مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی.

3. Bus, Vincent G.M., Bassett, Heather C.M., Bowatte, D., Chagné, D., Ranatunga, Chandra A., Ulluwishewa, D., Wiedow, C., Gardiner, Susan E. 2010. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated Mildew Immune Selection. Tree Genetics & Genomes, 6:477–487

4. Liebhard, R., Koller, B., Gianfranceschi, L.and Gessler, C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (Malus domestica Borkh.) genome. Theor. Appl. Genet. 106, 1497—1508.

5. MacHardy¸ W.E.¸ 1996 Apple Scab Biology¸ Epidemiology¸ and Management. APS Press St. Paul 545 pp.

Study of resistant genotypes to apple scab in gardens of Kohgiluyeh and Boyrahmad

H. Yazdani[1*], M.M. Kamelmanesh[2]

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

*Corresponding author: yazdanihajar@rocketmail.com

Abstract

From the view of economic importance we can say apple scab is the most damageous apple disease in all over the world and on the whole its damage in growth time is more than the other apple diseases. The most suitable technique to fight this disease is using resistant numbers. To produce resistant numbers at first we should know resistant gens in genetic resources. This investigation was done to know the presence of resistance gens to apple scabs Vh1,Vh2,Vh3,Vh4 in 55 different apple genotype in Kohgiluyeh and Boyrahmad provinc, by using molecular markers SSR SCAR STS. Leaf samples of used genotype was gathered at the last of May and after DNA exploitation, PCR was done. The results show from 4 initiator which was used, on the whole 100 scoreable parts was registered. The length of parts from cH02b10 , S22,CH03d01 , OPL19 ,initiators were 121,1300, 124 , 433.The most production part is related to OPL19 initiator and the least number is related to SS22 initiator. The percentage of multimorphism for all of the initiators were 100. On the whole, even if parents were far from each other, the possibility of hetrozis production was increased and the possibility of success in creation of the best genotypes will increase.

Key words: apple scab, resistant gen, molecular marker, DNA exploitation, PCR