بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشانگر مولکولی اختصاصی SCAR در تشخیص ژن های مقاوم مربوط به بیماری سفیدک در درختان سیب استان اصفهان

مرضیه ربانی [۱*]، محمد مجتبی کامل منش [۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح درختان میوه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، شیراز، ایران. ۲. استادیار گروه مهندسی گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول: marziehrabbani@yahoo.com

چکیده

با وجود اینکه بهره‌مندی از ژنتیک و اصلاح نباتات بیشترین نقش را در افزایش محصول و تولید فرآورده‌های غذایی به عهده داشته است، به دلیل رشد روزافزون جمعیت تلاش بیشتری برای چیرگی بر شرایط نامساعد محیطی، اعم از عوامل زیستی و غیرزیستی و افزایش کیفیت محصول لازم است. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های تحسین برانگیزی که در زمینه ی زیست شناسی مولکولی صورت گرفته، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش گیاهان عالی فراهم آورده است. یکی از اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای DNA است. توسعه این نشانگرها عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده، به طوری که به کمک آن‌ها شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی میسرگردیده است. به منظور شناسایی ژن های مقاوم مرتبط با بیماری سفیدک، پس از نمونه‌گیری برگ از ۱۰ منطقه مختلف استان اصفهان، نمونه‌ها جهت استخراج DNA و تکثیر با استفاده از ۴ آغازگر SCAR مربوط به مقاومت به بیماری سفیدک به آزمایشگاه انتقال یافتند. بعد از تکثیر، فرآورده PCR بر روی ژل منتقل و نمره‌دهی صورت گرفت. بررسی چند شکلی جمعیت‌ها بر اساس آغازگرهای متصل به بیماری سفیدک نشان داد جمعیت خمینی شهر بالاترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل موثر) را دارا بود. همچنین جمعیت سمیرم- پادنا با کمترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان دهنده کمترین میزان زمینه تنوع در خود بود. نتایج نشان داد EMMO1 و OPAT20 در بیماری سفیدک، به ترتیب دارای بیشترین و کمترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی بودند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی نی، سفیدک، سیب، شاخص شانون، نشانگر مولکولی

مقدمه

تنوع زیستی عبارت است از تنوع موجود در اشکال حیات از لحاظ ساختار و وظیفه، در سطوح ژنتیک، جمعیت، گونه، اجتماع و اکوسیستم. اقدامات گسترده‌ای به منظور تعیین تنوع زیستی از لحاظ سه جنبه زیست‌شناختی پایه که دارای روابط سلسله مراتبی می‌باشند یعنی ژن، گونه و اکوسیستم صورت گرفته است (کدخدایی، ۱۳۸۱). تنوع در سطح DNA به واسطه فرایندهای رانده-شدگی ژنتیکی[۱]، گزینش[۲]، جهش[۳] و جریان ژنی به وجود می آید. پیشرفت‌های اخیر در رابطه با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۴] (PCR)، تکنیک‌های مولکولی قدرتمندی را در اختیار زیست شناسان قرار داده است، به طوری که امروزه این تکنیک‌های متنوع را می‌توان برای بررسی تنوع موجود در توالی DNA بکار گرفت. به طور کلی زیست شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته تا بتوان شواهدی را مبنی بر تاکید تکامل بر اساس تنوع و واحد بودن حیات به دست آورد (کدخدایی، ۱۳۸۱).

1. Drift
2. Selection
3. Mutation
4. Polymerase Chain Reaction

مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان درخت سیب از مناطق مختلف استان اصفهان شامل سمیرم (بخش‌های مرکزی سمیرم، حاجی آباد، حنا، پادنا، مهرگرد، بیده)، خمینی شهر، شهرضا، اصفهان و دهاقان جهت استخراج DNA برداشت شده و پس از قرار گرفتن در فویل‌های آلومینیومی جداگانه و برچسب گذاری تا زمان استخراج، در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این تحقیق استخراج DNA طبق روش تغییر یافته CTAB انجام شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA ، الکتروفورز ژل آگارز با ولتاژ ۹۵ ولت، به مدت ۳۰ دقیقه و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد و ژل در زیر نور ماورای بنفش مشاهده و غلظت DNA از طریق مقایسه با مارکر تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران و با اندکی تغییر بر روی ۴ نشانگر SCAR مربوط به بیماری سفیدک انجام شده و پس از مشاهده باندهای تکثیری، نمره‌دهی باندها در محیط excel انجام گرفت. سپس شاخص‌های تنوع ژنتیکی محاسبه گردید. محاسبات در این پژوهش بوسیله نرم‌افزار GenAlex انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی بر روی جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت خمینی شهر دارای بیشترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی با میزان ۰/۴۱۲، شاخص شانون با میزان ۰/۵۹۷، تعداد آلل موثر با میزان ۱/۷۴۷ و میزان آلل متفاوت با میزان ۲ بود. همچنین جمعیت سمیرم- پادنا دارای کمترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی ، شاخص شانون، تعداد آلل موثر و میزان آلل متفاوت بود (جدول ۱).

جدول ۱. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از شاخص‌های نی، شانون، تعداد آلل موثر و متفاوت

جمعیت	تنوع ژنتیکی نی	شاخص شانون	تعداد آلل موثر	تعداد آلل متفاوت
سمیرم- حنا	۰/۱۲۲	۰/۱۷۰	۱/۲۳۸	۱/۰۰۰
شهرضا	۰/۲۳٦	۰/۳۵۳	۱/٤۱۱	۱/۷۵۰
سمیرم- حاجی‌اباد	۰/۲٤۰	۰/۳۳٦	۱/٤٦۲	۱/۲۵۰
سمیرم	۰/۳۳۷	۰/٤۸۱	۱/٦۱۳	۱/۵۰۰
اصفهان	۰/۳۰۸	۰/٤٤۹	۱/۵٤۵	۱/۷۵۰
خمینی‌شهر	۰/٤۱۲	۰/۵۹۷	۱/۷٤۷	۲/۰۰۰
دهاقان	۰/۲۵٦	۰/۳۷۸	۱/٤٦۲	۱/۷۵۰
سمیرم- مهرگرد	۰/۲٤۰	۰/۳۳٦	۱/٤٦۲	۱/۲۵۰
سمیرم- پادنا	۰/۰۷۵	۰/۱۱۹	۱/۱۰۷	۱/۰۰۰
سمیرم- بیده	۰/۲٤٤	۰/۳٤۱	۱/٤۷۷	۱/۲۵۰

از ۴ آغازگر متصل به ژن بیماری، تمامی ۴ آغازگر توانستند پلی‌مورفیسم را بین نمونه‌ها نشان دهند و هر ۴ آغازگر باندهای واضحی را تولید کردند. آغازگر EMMO1 دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی (۰/۴۷)، شاخص شانون (۰/۶۷)، تعداد آلل موثر (۱/۹۱)، تعداد آلل متفاوت (۲) بود. همچنین آغازگر OPAT20 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی (۰/۹۹) و

EMMO2 دارای بیشترین میزان فراوانی آللی (۰/۹۴) بود. همچنین آغازگر OPAT20 دارای کمترین میزان تنوع ژنتیکی نی (۰/۰۱۸)، شاخص شانون (۰/۰۳۹)، تعداد آلل موثر (۱/۰۱۹)، تعداد آلل متفاوت (۰/۵) و فراوانی آللی (۰/۱) بود و کمترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی متعلق به آغازگر EMMO2 (۰/۱۱) بود (جدول ۲).

جدول ۲. چند شکلی نشانگرهای مورد استفاده با استفاده از شاخص‌های نی، شانون، تعداد آلل موثر و متفاوت

آغازگر	تنوع ژنتیکی نی	شاخص شانون	تعداد آلل موثر	تعداد آلل متفاوت	محتوی اطلاعات چند شکلی	فراوانی آللی
EMMO1	0/477	0/670	1/913	2/000	0/52	0/69
EMMO2	0/114	0/162	1/210	1/250	0/11	0/94
OPAT20	0/018	0/039	1/019	0/500	0/99	0/10
EMDMO1	0/325	0/468	1/582	1/750	0/30	0/84

وجود تنوع ژنتیکی برای تداوم و پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی گیاهان و افزایش کارایی انتخاب ضروری است. در این بررسی جمعیت خمینی شهر، بالاترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل موثر) را دارا بود که این نتیجه نشان دهنده تنوع ژنتیکی این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها است. همچنین جمعیت سمیرم- پادنا با کمترین میزان شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان دهنده کمترین میزان زمینه تنوع در خود بود. می‌توان از تلاقی بین این دو جمعیت جهت هرمی‌کردن ژن‌های مقاوم (با استفاده از اصلاح گیاهان میوه دگرگشن و انتخاب در هر نسل با توجه به بیمار کردن نتاج بدست آمده از تلاقی و انتخاب بهترین‌ها) و تولید نوترکیبی جدیدی بین ژن‌های مقاوم به بیماری بهره برد. با توجه به عدم وجود سابقه تحقیق در گذشته در خصوص جمعیت های مورد آزمایش، می توان برای تحقیقات آتی به منظور اصلاح و رسیدن به مقاومت پایدار به بیماری سفیدک این جمعیت ها را پیشنهاد داد.

همچنین نتایج نشان داد که آغازگر EMMO1 دارای بیشترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل موثر) است. در نتیجه این آغازگر نسبت به آغازگرهای دیگر بهتر توانسته فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان کند و برای استفاده در تحقیقات بعدی بهتر می تواند مفید فایده واقع شود. در عوض آغازگر OPAT20 دارای کمترین میزان این سه شاخص بود که این نشان دهنده ضعیف بودن این آغازگر در متمایز کردن جمعیت‌ها از هم است.

منابع

۱. آگریوس، ج. ا. ۱۳۸۹. بیماری شناسی گیاهی. ویرایش پنجم. چاپ اول. انتشارات آییژ.۳۵۶ صفحه

۲.کدخدایی، س. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های بادام وحشی استان اصفهان با استفاده از نشانگرRAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته باغبانی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۳. نقوی، م.، قره یاضی؛ ب.، و حسینی، س. ق. ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران.

4. Williams, J. G., kubelik, A. R., livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., 1990, DNA polymorphism amplified by arbitary primers are usefol as genetic markers nucl. Acids. Res., Vol. 18, pp. 6531-6535

Investigation of genetic diversity indexes of SCAR specific molecular marker to determine resistant genes of Powdery mildew disease in apple trees of Isfahan

M. Rabbani [1*], M. kamelmanesh [2]

1. M.Sc. student of physiology and breeding of fruit trees, Islamic Azad university of Shiraz. Shiraz, Iran. 2. Assistant professor, Dep. of plant pathology, Islamic Azad university of Shiraz, Shiraz, Iran.

*Coressponding author: marziehrabbani@yahoo.com

Abstract

Although the utilization of genetic and breeding plays the most important role in increasing productivity and food production, considering population raise, greater efforts must be done to overcome adverse environmental condition such as biotic and abiotic factors and also to increase crops quality. In recent years, impressive advances has been made in the field of molecular biology, which has provided a powerful tool for the study of higher plants. One of this determinative tool is DNA markers. Development of these markers has opened a new era in genetic science, to help identify the controller genes of quantitative and qualitative traits. In order to evaluate resistant genes of powdery mildew disease, leaf samples were gathered from 10 different zones of Esfahan. Samples carried to lab for DNA extraction and amplification using four SCAR primers resistant to powdery mildew disease. After amplification, PCR products transferred on gels and scored. Study the population polymorphism based on primers attached to powdery mildew, showed that population of Khomeini Shahr had the highest indices of genetic diversity (Nei diversity index, Shannon, Number of effective alleles). Padena-Samirom population showed the least genetic diversity. According to the results, EMMO1 and OPAT20 in powdery mildew disease, showed the highest and lowest genetic diversity respectively.

Key words: Apple, Powdery mildew, Molecular marker, Nei genetic diversity, Shannon index