مطالعه تنوع ژنوتیپی در مقاومت به خشکی در جنس فراگاریا *Fragaria* (خانواده رزاسه) و نقش عملکردی و ساختاری ژنوم گیاه در این مقاومت

فرزانه رضوی[1*]

۱- دکتری تخصصی ژنتیک ملکولی در کشاورزی، عضو هیات علمی و استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، موسسه باغبانی،(Institute of Horticulture)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)

نویسنده مسئول: farzanehrazavi2003@yahoo.com

چکیده

بروز خشکسالیهای اخیر همراه با محدودیت منابع آبی در بخش کشاورزی، خسارات اقتصادی قابل توجهی را بر عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی وارد نموده است. مهمترین استراتژی در جهت رفع این چالش، استفاده از ژنوتیپ ها و ارقام مقاوم به خشکی بوده و لازمه گزینش و یا اصلاح ژنوتیپ های مقاوم به خشکی، شناسایی مکانیسم‌های کنترل کننده عکس‌العمل گیاه به خشکی و مسیرهای متابولیکی و ملکولی آن در سطح سلول و گیاه، می‌باشد. تا کنون جنبه‌های مختلف کاربردی و بنیادی مقاومت گیاه به تنش خشکی در گیاهان مختلف بررسی شده و این موضوع همواره مورد توجه محققین بوده است (Razavi et al 2012). هدف از مطالعه حاضر، شناسایی عوامل ژنتیکی کنترل کننده مقاومت به خشکی در خانواده رزاسه(Rosaceae) بعنوان یکی از خانواده‌های گیاهی پراهمیت از لحاظ اقتصادی در تولید محصولات باغی خصوصاً میوه‌جات معتدله بوده و تحقیق حاضر خصوصا در جنس فراگاریا (*Fragaria sp.*)، یکی از جنس‌های علفی و گیاه مدل در این خانواده انجام گرفته است. در این تحقیق، همبستگی بین ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های مقاوم یا حساس به خشکی در جنس فراگاریا با فنوتیپ مقاومت یا حساسیت به خشکی از طریق استفاده از مارکرهای ملکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و ESTs (Expressed sequence Tag) شناسایی شده و مارکرهای وابسته به صفت مقاومت به خشکی معرفی می گردد. مارکرهای EST وابسته به ژن‌های عملکردی متاثر از استرس خشکی، به عنوان مارکرهای ملکولی فانکشنال در سلکسیون ژنوتیپ‌های مقاوم درختان میوه در خانواده رزاسه معرفی گردیدند(سلکسیون فنوتیپ مقاومت به خشکی با استفاده از مارکرهای ژنتیکی وابسته به صفت یا Marker)) . assisted selection (MAS.

کلمات کلیدی: توت فرنگی، *Fragaria sp.*، رزاسه، تنش خشکی، مارکر AFLP ، مارکر EST

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل تغییرات اقلیمی و مواجهه زمین با کم آبی و کمی بارندگی، خسارات ناشی از تنش خشکی و تأثیرات آن بر تولید غذا و محصول دهی گیاهان در بخش کشاورزی و باغی در کل دنیا چشمگیر بوده، توجه محققین علوم گیاهی را به خود جلب نموده است. شناسایی ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم به خشکی و نیر شناسایی دقیق مکانیسم‌های عملکرد گیاه تحت خشکی به محققین کمک می‌کند که با استفاده از روش‌های به زراعی و به نژادی، کارایی گیاه و محصولات زراعی باغی را تحت تنش خشکی حفظ و حتی بالا ببرند و مشکلات تولید غذا تحت تنش خشکی را مرتفع نمایند. گیاه جنس فراگاریا (*Fragaria* sp.)، که یکی از گونه های آن بعنوان توت فرنگی شناخته میشود (*F. ananassa*)، یک گیاه علفی چند ساله متعلق به خانواده رزاسه با ژنومی کوچک و ساده بوده و زادگاه اصلی آن در اقلیم‌های پرآب می‌باشد و مسلماً به دلیل سیستم ریشه کم عمق و سطح برگ گسترده حساسیت بالایی به کم آبی دارد (Razavi et al 2012) . تأثیرات فیزیولوژیکی خشکی بر روی این گیاه قبلاً توسط برخی از محققین در مطالعات مختلف به صورت محدود اعلام شده، همچنین تنوع در مقاومت به خشکی در جنس فراگایا (*Fragaria* sp.) و حتی تنوع درون گونه‌ای در میزان مقاومت به خشکی قبلا در گونه *F.*

chiloensis اعلام شده است (VanDerZanden and Cameron 1996)، (Zhang and Archbold 1993)، (Klamkowski and Treder 2006).

همچنین نحوه تعادل اسمزی گیاه و تعادل متابولیکی آن تحت تنش خشکی قبلاً توسط رضوی و همکاران اعلام گردیده است (Razavi et al 2008). لیکن کنترل ژنتیکی عکس‌العمل به خشکی در جنس *Fragaria* و بقیه جنس‌های خانواده رزاسه کاملا شناخته شده نمی باشد. با شناسایی عوامل ملکولی کنترل کننده مقاومت به خشکی در این خانواده مهم گیاهی و ایجاد ارقام میوه مقاوم به خشکی، میتوان میزان عملکرد کمی و کیفی بالایی را علیرغم مشکل خشکی در باغات میوه حفظ نمود. در مطالعه حاضر بهترین روش فیزیولوژیکی ارزیابی مقاومت به خشکی در ژنوتیپ‌های فراگاریا تعیین شده، دو دسته از مارکرهای AFLP (مارکرهای غیر فانگشنال) و مارکرهای EST (مارکرهای فانگشنال) مطالعه و همبستگی آنها به فنوتیپ مقاومت به خشکی و بالانس آبی گیاه فراگاریا بررسی شد. نهایتا مارکرهای DNA با همبستگی بالا با صفت مقاومت به خشکی با استفاده از روش Association Mapping در یک جمعیت 'گیاهی بدون تلاقی در جنس فراگاریا معرفی گریدند.

مواد و روش‌ها

کلکسیونی از ژنوتیپ‌های مختلف فراگاریا، با تنوع فنوتیپی بالا در میزان مقاومت به خشکی، شامل ۲۰ رقم زراعی توت فرنگی (*F.× ananassa*, 2n=8x)، ۲ اکوتیپ از گونه دیپلوئید (*F. vesca*) و نیز یک گونه اکتاپوئید (*F. chiloensis*) انتخاب و به مدت سه ماه تحت آبیاری کامل، درجه حرارت ۲۲ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و فتوپریود ۱۸ ساعت با شدت نور ۱۰۰ ماکرو مول بر مترمربع بر ثانیه در گلخانه نگهداری شدند. تیمار خشکی و اندازه‌گیری های فاکتورهای اکوفیزیولوژیک بر اساس روش رضوی و همکاران انجام گرفت . جداسازی DNA و شناسایی مارکرهای AFLP بر اساس پروتکل‌های استاندارد ملکولی توصیف شده توسط رضوی و همکاران انجام گرفت (Razavi et al 2008). مارکرهای فانگشنال EST براساس روش رضوی و همکاران بر روی سکوانسهای کلون شده از ژن‌های کاندید متأثر از تنش خشکی در توت فرنگی که ژن‌های کلیدی و فانگشنال مربوط به چرخه های مختلف متابولیکی، پروتئین‌های محافظ و نیز ژن‌های رگولاتور و فاکتورهای رونویسی ژنها بودند (Transcription Factors) انتخاب شدند (Razavi et al 2008, 2011, 2012). آنالیزهای آماری: در آنالیز مارکرها، تعداد آلل‌های پلی مورفیک و تعداد متوسط آلل‌ها بر لوکوس بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید. نتایج صفات فیزیولوژیکی با استفاده از تجزیه‌های آماری ANOVA و آزمون توکی بررسی گردید. تشابهات ژنتیکی، آنالیزهای کانونیکال (Canocical Discriminant Analysis)، PCO (Principal Coordinate Analysis)،آنالیزهای پارامتریک و غیر پارامتریک، تجزیه کلاسترها و کای اسکوار (χ^2 chi-square) همگی در برنامه SPSS V. 11.01 تحت ویندوز انجام گرفت. آنالیز بوت استرپ با استفاده از نرم افزار Treecon pakage جهت ارزیابی تکرار پذیری و پایداری کلاسترها و نیز تست مانتل جهت انطباق ماتریس‌ها انجام گرفت (Razavi et al 2012).

نتایج و بحث

با استفاده از روش استفاده شده در تحقیق حاضر، ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به خشکی در جنس فراگاریا شناسایی و گروه بندی شدند (شکل‌های ۱، ۲ (فایل پیوست ۱). نتایج این تحقیق امکان استفاده از آنالیز همبستگی بین مارکر و صفت مقاومت و سلکسیون ژنوتیپ‌ها در یک جمعیت بدون تلاقی را تایید می‌کند (Association mapping and marker Assisted Selection) در جدول شماره۱ (فایل پیوست ۱)، همبستگی گروهی از مارکرهای DNA (AFLP , EST) با صفت مقاومت به خشکی مشخص و مارکرهای مفید در این زمینه تعیین شدند. اعتبار و صحت همبستگی این مارکرها به صفات مقاومت به خشکی از طریق آنالیزهای مختلف آماری بررسی و تأیید گردید. همچنین آنالیزهای تجزیه کلاستر نشان دادند که گروه های ژنوتیپی ایجاد شده با

استفاده از مارکرهای DNA وابسته به خشکی، دقیقاً با گروه‌بندی فیزیولوژیکی در شکلهای ۱-۲ مطابقت داشته و این صحت نتایج را در رابطه با همبستگی مارکرهای ژنتیکی را به صفت مقاومت به خشکی نشان می‌دهد (نتایج کلاسترینگ ارائه نشده اند). مارکرهای وابسته به مقاومت به خشکی تعیین شده در این مطالعه نهایتاً قابل استفاده در سلکسیون‌های ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در جمعیت‌های بزرگ در خانواده رزاسه و باغات کلکسیون ارقام میوه می‌باشد. به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در جمعیت بدون تلاقی نظیر جمعیت مورد مطالعه، انجام متدهای آنالیز همبستگی بین ساختمان ژنتیکی و صفات فیزیولوژیکی و تشخیص اولیه آللها و لوسای‌های ژنی کنترل صفات کمی (QTL) مانند مقاومت به خشکی، حتی بدون تلاقی بین دو والد حساس و مقاوم نیز امکان‌پذیر است. نتایج این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که ژن‌های کاندید مقاومت به خشکی شامل ژنهای فانگشنال در چرخه‌های متابولیکی گیاه، فاکتورهای رونویسی ژنها (Transcription factors) ، پروتئین های محافظ سلولی و غیره که در تهیه مارکرهای EST بکار برده شده‌اند، ژن‌هایی بسیار مؤثر در سازگاری گیاه با خشکی بوده، عملکرد دقیق این ژن‌ها نقش مهمی در ایجاد مقاومت به خشکی و کنترل ژنتیکی این صفت را در خانواده رزاسه و جنس فراگاریا دارا می‌باشند.

منابع

1. Klamkowski K., Treder W. (2006). Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. Agric Conspec Sci, 71: 159-165.
2. Razavi F., Pollet B., Steppe K., Van Labeke M.C. (2008). Study of chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. Photosynthetica, 46: 631-633.
3. Razavi F., Van Labeke M.C. (2009). Functional diversity for response to water deficit among different strawberry genotypes compared to their genetic structure as assessed by AFLP Markers. Acta Hort, 839: 491-497.
4. Razavi F., De Keyser E., De Riek J., Van Labeke M.C. (2011). A method for testing drought tolerance in *Fragaria* based on fast screening for water deficit response and use of associated AFLP and EST candidate gene markers. Euphytica, 180: 385-409.
5. Razavi F. (2012). (eds. Molecular and physiological responses to drought stress in *Fragaria* sp, Razavi F.), Ghent University, Belgium
6. VanDerZanden A.M., Cameron S.J. (1996). Effect of water deficit stress on 11 native *Fragaria chiloensis* clones selected as ornamental groundcovers. Sci Hort, 66: 241-253.
7. Zhang B., Archbold D.D. (1993). Solute accumulation in leaves of a *Fragaria chiloensis* and a *F. virginiana* selection responds to water deficit stress. J Amer Soc Hort Sci, 118: 280-285.

The study of genotype variation in drought tolerance and associated structural & functional genomics in *Fragaria* genus (Rosaceae)

F. Razavi[1*]

1- Assistant Professor Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Iran.
*Corresponding author: farzanehrazavi2003@yahoo.com

Abstract

Water deficit as an abiotic stress and important environmental challenge limits plant growth and development, reducing yield. The objective of the present research was to correlate the genetic structure and functional genome of different *Fragaria* genotypes, as assessed by analysis of DNA molecular markers included Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers, Expressed Sequence Tag (EST) and associated putative functional DNA sequences with plant responses to drought stress. In this experiment AFLP and ESTs were compared in terms of their information content and efficiency in the study of physiological parameters related to plant response to drought stress. Eco-physiological factors were compared for 20 cultivars, two ecotypes of the diploid species *F. vesca* and one octaploid species *F. chiloensis*. To evaluate the genetic and genomic basis for the observed variation in the measured physiological parameters and drought tolerance, the correlation of specific AFLP/EST loci with drought-tolerant traits for the different *Fragaria* genotypes was

quantified by different statistical analyses. A better discriminating capacity for associated markers was noted, enabling a functional marker selection approach to screen the strawberry gene pool for drought tolerance.

Key words: *Fragaria sp.*, *Rosaceae* , Drought stress, Water deficit, DNA markers, AFLP, EST, candidate genes, Trait- Marker Assisted Selection (MAS), structural & functional genomics of drought stress