شناسایی هاپلوتایپی برخی ژنوتیپ‌های لایم منطقه میناب با استفاده از ژنوم کلروپلاست

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[1*]، یوسف حمیداوغلی[2]، بهروز گلعین[3]، عاطفه صبوری[4]

[1] پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران،

[2] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان،

[3] پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران،

[4] گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گیلان.

[*] نویسنده مسئول: shjahangirzadeh@gmail.com

چکیده

ژنوم کلروپلاستی ۲۰ نمونه لایم و لمون برای مشخص کردن هاپلوتایپ‌های آن‌ها با کاربرد روش cpSSR بررسی شد. از مزایای اصلی این روش تحلیل راحت، صرفه‌جویی در زمان و هزینه، تکرارپذیر بودن آن می‌باشد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی برخی لیموهای بومی ایران با این روش از ۱۱ جفت آغازگر اختصاصی کلروپلاست در جنس Citrus استفاده شد و از ژل پلی‌اکریل آمید برای تفکیک باندها استفاده شد. یازده جفت آغازگر این مطالعه توانست در مجموع ۲۱ نوار را تکثیر کنند که سه جفت آغازگر SPCC8، SPCC12 و SPCC14 حالت یک شکلی نشان دادند. هشت جفت آغازگر باقی‌مانده تولید ۱۸ نوار چند شکل نمودند. تمام جهش‌های شناسایی‌شده حذف- اضافه بودند. ترکیب تمام جهش‌ها شش هاپلوتایپ (H1، H2، H3، H4، H5 و H6) را در نمونه‌های مورد بررسی معرفی نمود. معلوم گردید که بیشترین فراوانی هاپلوتایپ مربوط به H6 با حدود ۶۰٪ فراوانی (۱۲ نمونه) می‌باشد که رقم مکزیکن لایم در این گروه در کنار اکثر نمونه‌های منطقه میناب قرار دارد که نشان از رابطه بالای آن‌ها با این رقم است. اطلاعات تنوع DNA کلروپلاستی می‌تواند برای مطالعات فیلوژنتیکی در این گیاه به کار رود و چندشکلی‌های مشخص‌شده در ژنوم سیتوپلاسمی می‌تواند به درک وراثت مادری در مرکبات خصوصاً لیموها کمک کند.

***کلمات کلیدی*: لیمو، میناب، هاپلوتایپ، cpSSR**

مقدمه

مطالعه ژنوم کلروپلاست در دهه ۱۹۵۰ و زمانی که زیست‌شناسان گیاهی برای اولین بار دریافتند که کلروپلاست دارای DNA مختص به خود می‌باشد، شروع شد (Sugiura, 2003). در مطالعات اولیه از میکروسکوپ الکترونی، کلون‌سازی، نقشه‌یابی مکان‌های برشی و نقشه‌یابی ژن برای شناسایی ساختار و دسته‌های ژنی ژنوم کلروپلاست استفاده شد (Palmer 1991). این قبیل مطالعات فیلوژنتیکی بر اساس چندشکلی‌های مکان‌های برشی و تغییرات دسته‌های ژن بود (Olmstead and Plamer 1994). انتشار توالی کامل پلاسمید تنباکو و Marchantia اولین فرصت را برای مقایسات ژنوم در سطح نوکلئوتید فراهم آورد (Morton 1994). در حال حاضر تعداد گیاهانی که توالی‌یابی ژنوم کلروپلاست آن‌ها کامل شده است تا ۴۵ مورد افزایش یافته است و شامل تنوع وسیعی از گروه‌های رده‌بندی می‌باشد. توالی‌یابی ژنوم کلروپلاست طی سالیان گذشته سریع بوده و ۱۹ مورد از این توالی‌یابی‌ها در دو تا سه سال گذشته انجام شده است. علیرغم دستیابی به توالی‌های تعداد زیادی از ژنوم‌ها، آگاهی بشر از تکامل ژنوم کلروپلاست هنوز محدود

می‌باشد زیرا اطلاعات موجود به‌عنوان یک نمونه کوچک از گونه‌های دارای پلاستید بوده و همچنین مطالعات گذشته توالی‌یابی برای نشان دادن تکامل مولکولی و فیلوژنی گونه‌ها نبوده است.

نواحی حفاظت شده ژن، دستیابی وسیع به آغازگرها و فقدان نوترکیبی و هتروپلاسمی[1] ژنوم کلروپلاست را به‌عنوان یک ابزار جذاب برای مطالعات فیلوژنتیکی گیاهان مطرح نموده است (Olmstead and Palmer, 1994). بعلاوه، وراثت والدینی یکنواخت آن (معمولاً در نهاندانگان از طرف والد مادری و در بازدانگان از طرف والد پدری)، سهم نسبی بذر و دانه گرده را در ساختار ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی روشن می‌نماید که این با مقایسه نشانگرهای هسته و کلروپلاست امکان‌پذیر می‌باشد. با شناسایی این پتانسیل، محققان زیادی روش‌های تعیین ژنتیک جمعیت را بر اساس نشانگرهای اندامکی در اوایل تا اواسط دهه ۱۹۹۰ بررسی و توسعه دادند (Petit et al. 1993، McCauley 1995، Golein et al., 2012، Jahangirzadeh et al., 2013). این مطالعات، اطلاعات تئوریکی در مورد تاریخچه و دینامیک جمعیت را افزایش داده است. در مطالعه حاضر تنوع سیتوپلاسمی و ارتباط هاپلوتایپی برخی ژنوتیپ‌های لایم منطقه میناب استان هرمزگان بررسی شده است تا ضمن روشن‌تر شدن روابط ژنتیکی مادری در بین آن‌ها کمکی برای حفاظت و مدیریت ژرم‌پلاسم بسیار غنی مرکبات موجود در کشور ایران باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به‌طورکلی ۱۹ ژنوتیپ و رقم شامل ۱۵ ژنوتیپ لایم منطقه میناب و پنج رقم تجاری لیمو (پرشین لایم، مکزیکن لایم لیمو لیسبون، راف لمون و لیمو شیرین) تهیه گردید (جدول ۱).

جدول۱- اسامی ارقام و ژنوتیپ‌های لیمو مورد بررسی در این پژوهش، محل جمع‌آوری آن‌ها.

نام نمونه	محل جمع‌آوری	کد نمونه‌ها	نام نمونه	محل جمع‌آوری	کد نمونه‌ها
M1-1	میناب (رودان)	M1-1	M2-10	رودان	M2-10
M1-3	میناب (باغ ازدیادی ایستگاه)	M1-3	M4-2	سندرک	M4-2
M1-4	میناب (باغ ازدیادی ایستگاه)	M1-4	M4-5	سندرک	M4-5
M1-5	میناب (روستای حکمی)	M1-5	M5-1	جغین	M5-1
M1-7	میناب (روستای تیرور)	M1-7	M5-2	جغین	M5-2
M1-10	میناب (باغ ازدیادی ایستگاه)	M1-10	پرشین لایم	رامسر	S51
M1-13	میناب (باغ ازدیادی ایستگاه)	M1-13	مکزیکن لایم	رامسر	S37
M1-14	میناب (ایستگاه تحقیقات کشاورزی)	M1-14	لیمو لیسبون	رامسر	S46
M2-2	رودان (بندملا)	M2-2	راف لمون	رامسر	S49
M2-8	رودان (بندملا)	M2-8	لیمو شیرین	رامسر	S55

استخراج DNA و آنالیز cpSSR

استخراج DNA از نمونه‌های برگی بر اساس دستورالعمل تهیه شده برای نشانگر آرایه تنوع یا دارت توصیه‌شده توسط شرکت (Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DArT P/L)) (http://www.diversityarrays.com) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio Rad انجام شد. ترکیبات هر واکنش PCR برای آنالیز cpSSR شامل ۵۰ng از DNA ژنومی، بافر PCR حاوی یون Mg^{2+} (۱۰X) به غلظت ۱X، مخلوط نوکلئوتیدی ۰/۲mM، نشانگر رفت و برگشت هرکدام ۰/۵µM، آنزیم Taq به میزان ۱U بود. حجم نهایی واکنش برای ۲۰µl تنظیم گشت. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر جفت آغازگر به‌صورت واسرشته سازی اولیه در

[1] Heteroplasmy

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه،۳۲ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال برای هر جفت آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه بر اساس گزارش Cheng et al., 2005 تنظیم شد و توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و درنهایت ۴ دقیقه توسعه نهایی در۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از پایان تکثیر محصول PCR برای بررسی روی ژل پلی اکریل آمید برده شد.

آنالیز و مشخص نمودن هاپلوتایپ‌ها

جهت تعیین هاپلوتایپ‌ها به حالات متفاوت مشاهده شده یک حرف انگلیسی خاص اختصاص داده شد بعد از اختصاص حروف به تمام نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرهای cpSSR متفاوت، هر نمونه دارای کدهایی بر اساس باندهای مشاهده شده در خود گردید. بر اساس همین کدها نمونه‌های دارای کدهای مشابه در یک گروه هاپلوتایپی مشابه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

جهت بررسی تنوع ژنتیکی برخی لیموهای بومی ایران با روش cpSSR از ۱۱ جفت آغازگر اختصاصی کلروپلاست در جنس Citrus استفاده شد. در این مطالعه تقریباً در همه مکان‌های ژنی، کلیه جفت آغازگرها سبب تکثیر قطعات DNA در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شدند. به‌طورکلی هر جفت آغازگر بیان‌کننده یک مکان ژنی و هر قطعه DNA تکثیرشده توسط هر جفت آغازگر، یک نوار محسوب می‌شود. یازده جفت آغازگر این مطالعه توانست در مجموع ۲۱ نوار را تکثیر کنند که سه جفت آغازگر SPCC8، SPCC12 و SPCC14 حالت یک شکلی نشان دادند که با نتایج چنگ و همکاران (2005) مشابه بود. هشت جفت آغازگر باقی‌مانده تولید ۱۹ نوار چند شکل نمودند. تعداد نوارهای بدست آمده در مطالعه پیش رو در مقایسه با تعداد نوارهای بدست آمده با مطالعه چنگ و همکاران (Cheng et al., 2005) مشابه بود. لازم می‌باشد ذکر شود بسیاری از نوارهای معرفی شده توسط چنگ و همکاران (Cheng et al., 2005) برای جنس‌های دیگر مرکبات (Poncirus و Fortunlla) و دورگ‌های آن‌ها بود.

به‌منظور تشخیص روابط کلروپلاستی هاپلوتایپ‌های ممکن برای نمونه‌های مورد بررسی مشخص گردید و نمونه‌ها در ۶ هاپلوتایپ از ۵۷۶ هاپلوتایپ ممکن قرار گرفتند. پایین بودن تعداد هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در برابر تعداد هاپلوتایپ ممکن، نشان از حفاظت‌شدگی بالای ژنوم کلروپلاست می‌باشد. در مطالعات اسدی آبکنار و همکاران (۱۳۹۲) با کاربرد روش PCR-RDLP برای از ۱۲ هاپلوتایپ ممکن سه هاپلوتایپ معرفی نمودند که اکثر نمونه‌های جنوب منطقه میناب با مکزیکن لایم در یک هاپلوتایپ قرار گرفته بودند که با نتایج مطالعه پیش رو مشابهت داشت. برای مشخص شدن هاپلوتایپ‌ها به هر الگوی نواری کد تعلق گرفت که کد رابطه بین نوارهای مشاهده شده و کد داده شده به آن جهت مشخص نمودن هاپلوتایپ‌ها در جدول ۳ آمده است. تمام تغییرات مشاهده شده در بررسی ژنوم کلروپلاست بسیار محدود و در حد جهش حذف و اضافه قطعات بسیار کوچک بود.

تمام ارقام در هاپلوتایپ‌های مجزایی قرار گرفتند که در بررسی لی و ژی (Li and Xie, 2010) و گولسن و روز (Gulsen and Roose, 2001) نیز نتایج مشابهی دیده می‌شود اما در بررسی گلعین و همکاران (Golein et al., 2012) و اسدی آبکنار و همکاران (۱۳۹۲) چنین نتیجه‌ای دیده نمی‌شود که این موضوع می‌تواند به بررسی حجم کمی از ژنوم کلروپلاست توسط آن‌ها یا کاربرد روشی ضعیف‌تر از cpSSR بازگردد. توزیع نمونه‌ها در میان 6 هاپلوتایپ شناسایی‌شده در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- رابطه بین نوارهای مشاهده شده در بررسی cpSSR و کد داده شده به آن برای تعیین هاپلوتایپ‌های ممکن در بررسی ۴۶ نمونه لیموی اسیدی ایران

نام آغازگر	اندازه قطعه تکثیری	کد جهت هاپلوتایپ
SPCC1	۲۴۰	A
	۲۳۵	B
	۲۳۰	C
SPCC2	۸۲۰	A
	۸۰۰	B
SPCC3	۸۱۰	A
	۷۶۰	B
SPCC5	۱۲۰	A
	۱۱۰	B
SPCC6	۱۰۰	A
	۸۵	B
SPCC9	۲۱۰	A
	۲۰۰	B
SPCC10	۲۵۰	A
	۲۲۰	B
SPCC11	۲۲۰	A
	۲۱۰	B
	۲۰۰	C

جدول ۴- توزیع ۴۶ نمونه لیموی اسیدی ایران در میان ۱۲ هاپلوتایپ شناسایی‌شده توسط نشانگر cpSSR

ردیف	کد هاپلوتایپ*	کد نمونه‌ها بر اساس جدول ۲-۱
H1	BBAABABB	S49، راف لمون
H2	ABAABABB	S46، لیمو لیسبون
H3	CABBAAAC	S55، لیمو شیرین
H4	AABAABAA	M1-1, M1-5, M5-1
H5	AABABBBA	S51,
H6	AABAABBA	S37, M1-3, M1-4, M1-7, M1-10, M1-13, M1-14, M2-2, M2-8, M2-10, M4-2, M4-5, M5-2

* حروف از چپ به راست به آغازگرهای P1، P2، P3، P5، P6، P9، P10 و P11 تعلق دارد.

مطالعه تنوع DNA کلروپلاستی می‌تواند جامعه‌های بزرگ را به جمعیت‌های کوچک‌تر تقسیم نماید و شرایط را برای بررسی نمونه‌های کمتر توسط نشانگرهای دقیق‌تر در حجم کاری کمتر مهیا نماید. به‌طوری‌که فقط کافی است که نمونه‌های داخل یک گروه هاپلوتایپی با یکدیگر مقایسه و بررسی شوند. البته برای افزایش دقت در تعیین هاپلوتایپ‌ها کاربرد یا تکثیر قطعات متفاوت ژنوم کلروپلاستی و بررسی آن‌ها توسط روش‌های متعدد نیز تأثیر زیادی دارند که باید مدنظر قرار گیرد.

منابع

Asadi Abkenar, A., Sharafi A.A., Mardi, M., Hasanzadeh Khankehdani, H., Bahrami, H.R. and Zakeri Fard, A. 2013. Investigation on chloroplast DNA polymorphism in local acid lime genotypes of Iran using PCR-RFLP method. 8th national biotechnology congress or I.R.Iran and 4th national biosafety congress of Iran. 6-8 July, Tehran University, Tehran. Iran. (in Persian).

Cheng, Y., Carmen De Vicente, M., Meng, H., Guo, W. Tao, N. and Deng, X. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera, Tree Physiology, 25: 661–672

Diversityarrays, 2007. http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf bfw.ac.at/200/1859.html

Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadi, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (Citrus sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Scientia Horticulturae, 148:147–153.

Gulsen, O. and Roose, M.L. 2001. Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. American Society for Horticultural Science. 126 (3): 309-317

Jahangirzadeh khiavi Sh, Z. Zamani, M. Mardi and M. Fatahi Moghdam. 2013. Evaluation of Chloroplast relationship between some apple genotype from Azerbaijan of Iran and their comparison with other local genotypes, cultivars and rootstocks. African Journal of Agricultural Research. 8(1): 106-112.

Li, X. and Xie, R. 2010. The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. American Society for Horticultural Science. 135 (4): 341–350.

McCauley, D.E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. Trends in Ecology and Evolution. 10: 198-204.

Morton, B.R. 1994. Codon use and the rate of divergence of land plant chloroplast genes. Molecular Biology and Evolution. 11: 231–238.

Olmstead, R.G. and Palmer, J.D. 1994. Chloroplast DNA systematics- A review of methods and data analysis. American Journal of Botany. 81: 1205–1224.

Palmer, J.D. 1991. Plastid chromosomes: Structure and evolution. In The Molecular Biology of Plastids. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (R. G. Hermann, ed.), 7A. Springer–Verlag, Vienna. 5–53.

Petit, R.J., Kremer, A and Wagner, D.B. 1993. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. Heredity. 71: 630–641.

Sugiura, M. 2003. History of chloroplast genomics. Photosynthesis Research. 76: 371-377.

Haplotype Identification of Some Lime Genotypes from Minab Region by Usage of Chloroplast Genome

Shahin Jahangirzadeh Khiavi[1*], Yousef Hamidoghli[2], Behroz Golein[3], Atefeh Sabouri[4]
[1] Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran;
[2] Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran;
[3] Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran;
[4] Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan, Rasht, Iran
**Corresponding author: Shjahangirzadeh@gmail.com*

Abstract

Chloroplast genome of 20 lime and lemon genotypes was studied using cpSSR method for identification of haplotypes. The main advantages of this technique is high resolution, time and cost effective and reproduciblity. For genetic diversity, investigating of some limes by this method, 11 specific primer pairs of chloroplast in Citrus genus was used and PAGE gels were used to separate fragments. All the primers pair amplified 21 bands. Three primer pairs (SPCC8, SPCC12 and SPCC14) showed monomorphic pattern. Remaining primers produced 18 polymorphic band. All the mutations detected were insertion-deletions. The combination of all the mutations resulted to six haplotypes (H1, H2, H3, H4, H5 and H6). It was defined that the highest haplotype frequency between the samples was for H6 (60% approximately) that Mexican lime cultivar placed in this group with most of samples from Minab. This showed that high level of genetic similarity between them. It was approved that cpDNA diversity data can be considered for phylogenetic studies in this plant and the polymorphism determined in cytoplasmic genome can help to understand the maternal inheritance in citrus especially in Limes and Lemons.

Keyword: **Lime, Minab, Haplotype, cpSSR**