بررسی تنوع سوماکلونال گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت خرما رقم مجول

آتنا بستاقی[۱]، رضا ضرغامی[۲*]، جعفر احمدی [۳]، مهدی زهراوی[۴]

[۱] گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی

[۲*] گروه کشت بافت.، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

[۳] گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی

[۴] گروه ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

* نویسنده مسئول: rezazarghami2001@yahoo.com

چکیده

افزایش نخل خرما با استفاده از روش پاجوش، بسیار پرزحمت و گران است، زیرا شمار پاجوش‌ها در هر درخت محدود است به همین دلیل امروزه از روش افزایش کشت بافت استفاده می‌شود. روش جنین‌زائی غیرجنسی که یکی از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی می‌باشد و نقش بارزی در افزایش تولید گیاهچه خرما ایفا می‌کند؛ گاهی باعث تنوع ژنتیکی می‌گردد که آن را تنوع سوماکلونال می‌نامند. نشانگرهای مولکولی از جمله عناصر زیستی هستند که به عنوان کاوشگرهای آزمایشگاهی برای یافتن و مشخص کردن یک فرد، بافت، سلول، هسته سلولی، کروموزوم یا ژن بکار می‌روند و به صورت اشکال مختلف آللی معرفی می‌شوند. در این پژوهش بررسی ژنتیکی از گیاه مادری و کشت بافتی ناشی از جنین زائی غیرجنسی در رقم خرمای مجول از ۱۰جفت نشانگر ریزماهواره‌ای استفاده شد. نتایج نشان داد از آغازگرهای مورد استفاده mPdCIR035، PDAAG1023، DP172 قادر به تمایز بین نمونه‌ها و بیان چندشکلی بودند و تفاوتی بین نمونهٔ کشت بافتی و پاجوشی درون هر رقم را نشان ندادند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی،خرما، سوماکلونال، نشانگر

مقدمه

خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera*) گیاهی تک لپه، دو پایه و چندساله و متعلق به خانوادهٔ *Palmaceae* است که شمار کروموزوم‌های آن 2n=2x=36 است (Jameel *et al.*, 2018) و اندازه ژنوم بین ۵۵۰ مگابایت و طول ~ ۶۵۸ مگابایت برآورد شده است (Malek, 2010). گروهی مبدأ این گیاه را آسیا و کرانهٔ خلیج فارس و گروهی شمال آفریقا یا شبه قارهٔ هند می‌دانند (Jain, 2007). میوهٔ خرما از 70 درصد کربوهیدرات، اغلب به صورت قند و ۱۵ تا ۳۰ درصد آب تشکیل شده است و میوهٔ مطلوبی در درمان کم خونی‌ها است. تکثیر درختان خرما با استفاده از سه روش بذری، پاجوش و کشت بافتی است (Jain, 2007). در افزایش جنسی خرما با توجه به دو پایه بودن آن، تشخیص پایهٔ نر و ماده تا چندین سال پس از کشت قابل تشخیص نیست (Jain, 2007) و افزون بر این، کیفیت میوهٔ تولید شده توسط درختان مادهٔ ناشی از کشت نهال‌های بذری پایین است. افزایش خرما با استفاده از روش پاجوش نیز، بسیار پرزحمت و گران است، زیرا شمار پاجوش‌ها در هر درخت محدود است (Jain, 2007)، به همین دلیل امروزه از روش افزایش کشت بافت استفاده می‌شود. این روش چندین برتری از جمله افزایش شمار زیاد نهال، بی‌تأثیر بودن فصل روی روش افزایش، تولید گیاهان یکنواخت از نظر ژنتیکی یعنی همانند به پایهٔ مادری و تولید گیاه بدون بیماری و آفات (Kriaa *et al.*, 2007) دارد. تکنیک کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی می‌تواند نقش بارزی در این زمینه ایفا کند ولی می‌توانند گاهی باعث تنوع ژنتیکی شوند که

IrHC2019

آن را تنوع سوماکلونال می‌نامند. نشانگرهای مولکولی از جمله عناصر زیستی هستند که به عنوان کاوشگرهای آزمایشگاهی برای یافتن و مشخص کردن یک فرد، بافت، سلول، هسته سلولی، کروموزوم یا ژن بکار می‌روند و به صورت اشکال مختلف آللی معرفی می‌شوند. تاکنون نشانگرهای DNAی متفاوتی همچون RFLP, AFLP, SSR, ISSR شناسایی شده‌اند که برای انگشت نگاری و ارزیابی ثبات ژنتیکی در گیاهان حاصل از ریزازدیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از روش‌های متداول در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگرهای مولکولی است. یک نشانگر مولکولی DNA، توالی خاصی از DNA است که براحتی آشکار می‌شود و توارث آن بسادگی قابل رویت است. در پژوهشی پایداری ژنتیکی گیاهان خرمای ریزازدیادی شده در ۲۷ گیاه انتخاب شدهٔ تصادفی با استفاده از ۱۶ آغازگر ریزماهواره بررسی شد ولی هیچ کدام از ریزماهواره‌ها در گیاهان مورد بررسی تنوعی بین خرمای ریزازدیادی شده و پایهٔ مادری آن نشان ندادند، این نتایج نشان داد، جنین‌زایی بدنی برای ریزازدیادی خرما، ثبات ژنتیکی حتی پس از دورهٔ ۱۶۸ هفته‌ای را حفظ می‌کند (Kumar *et al*., 2010).استفاده از نشانگرهای مولکولی، مبتنی بر چند شکل طبیعی در DNA می‌باشد که اساس طراحی روش‌های مختلف برای اهداف کاربردی را تشکیل می‌دهد. بدین معنی که به فرم‌های مختلفی وجود داشته باشد، بطوریکه کروموزوم حامل ژن موتان از کروموزوم حامل ژن معمولی از طریق نشانگری که حمل می‌کند، قابل تشخیص باشد. نشانگرهای مولکولی را می‌توان از هر نوع داده مولکولی که اختلافات قابل گزینشی بین دو موجود زنده را در دسترس قرار می‌دهند، بدست آورد(Kamal-Eldin and Ghnimi 2018).

موادوروش‌ها

ابتدا با روش جنین زائی غیر جنسی به تولید گیاهچه اقدام و سپس گیاهچه‌های تولیدی به شرایط *In vivo* منتقل نموده و سپس جهت استخراج DNA، نمونه‌برداری از برگ ۵۰ گیاهچه کشت بافتی خرمای رقم مجول به همراه نمونه گیاهان مادری صورت گرفت. ابتدا برگ‌های جوان و سالم از هر نمونه گیاه را با ازت مایع کوبیده و سپس بوسیله روش دستی سی تب، DNA ژنومی از برگ‌ها استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA همچنین از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این آزمایش از دستگاه ترموسایکلر (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) استفاده شد.

مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR برای حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر نمونه در جدول ۱ بیان شده است. ابتدا در هر تیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری (تیوپ PCR)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی مورد نظر اضافه شد سپس کلیه‌ی مواد PCR به جز DNA ژنومی با هم مخلوط گردیدند و به صورت Master Mix درآمده و سپس ۱۹ میکرولیتر از محلول فوق در هر تیوپ PCR حاوی DNA ژنومی هر نمونه ریخته شد. سپس تیوپ‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. چرخه حرارتی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل به صورت ۱ دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه مرحله‌ی اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به آغازگر متفاوت بوده)، ۱ دقیقه مرحله‌ی بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. دمای بهینه برای اتصال هر آغازگر در طی واکنش PCR، با تعریف کردن شیب دمایی برای دستگاه ترموسایکلر مشخص می‌گردد که این شیب دمایی براساس دمای TM ارائه شده توسط شرکت تکاپوزیست و برنامه‌ی الیگو نوکلئوتید انتخاب شد.

IrHC2019

جدول «۱» مواد مورد استفاده در واکنش PCR

مواد	حجم (میکرو لیتر)
DNA الگو	۱
Master mix	۱۰
آغازگر Forward (۱۰ میکرو مول)	۱
آغازگر Reverse (۱۰ میکرو مول)	۱
آب مقطر اتوکلاو شده	۷
حجم کلی واکنش	۲۰

جدول «۲» مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی ثبات ژنتیکی

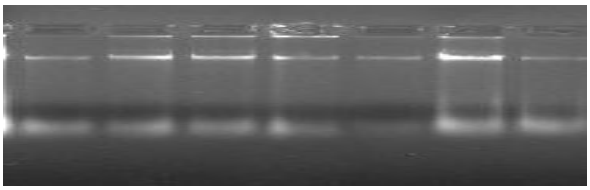
ردیف	نام آغازگر	توالی (5'-3')	
		توالی Forward	توالی Reverse
۱	mPdCIR010	ACCCCGGACGTGAGGTG	CGTCGATCTCCTCCTTTGTCTC
۲	mPdCIR016	AGCGGGAAATGAAAAGGTAT	ATGAAAACGTGCCAAATGTC
۳	mPdCIR025	GCACGAGAAGGCTTATAGT	CCCCTCATTAGGATTCTAC
۴	mPdCIR032	CAAATCTTTGCCGTGAG	GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG
۵	mPdCIR035	ACAAACGGCGATGGGATTAC	CCGCAGCTCACCTCTTCTAT
۶	PDAG1002	GGACATAGTTTTGGCTGGCTAC	ACCAGTTTACCACTTGCTCCA
۷	PDAG1005	GTATGTTCCATGCCGTTCTAC	AGCCACATCACTTGGTTCA
۸	PDAAG1023	AGACGCTCACCTTGGAACTT	ACCCCGCTCATGAATTAGG
۹	PDAAG1025	ATCCCGTCCTCTCTTTCCA	CATGCATACATATACGCAAAGAA
۱۰	DP172	GCATGGACTTAATGCTGGGTA	GGTTTTCCTGCCAACAACAT

در این تحقیق به منظور بررسی یکنواختی ژنتیکی حاصل از گیاهان ریزازدیادی شده خرمای رقم مجول به همراه نمونه‌های گیاهان مادری از منطقه اهواز امکان استفاده از آغازگرSSR با ۱۰ جفت پرایمر مورد آزمون قرار گرفت.

IrHC2019

نتایج وبحث

پس از اینکه نمونه‌های *DNA* استخراج شد. نمونه‌های DNA روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری گردید و باندهای مربوطه زیر نور فرابنفش مشاهده گردید (شکل ۱).

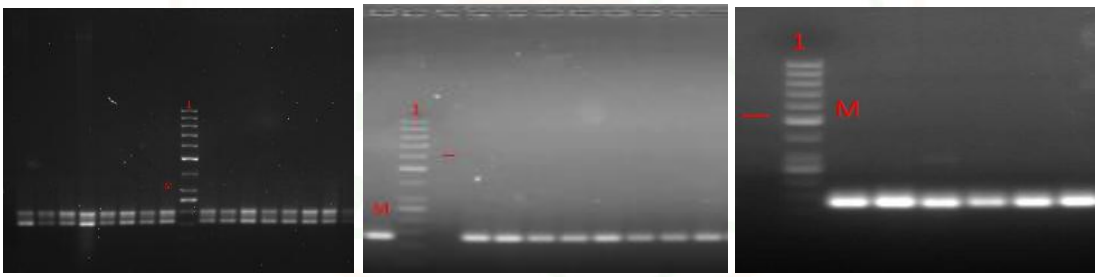


شکل«۱» DNA بارگذاری شده

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR و آشکارسازی ژن هدف

در این پژوهش گیاهان حاصل از کشت بافت با گیاه مادری مورد مقایسه قرار گرفت. در میکروستلایت هایDNA مورد استفاده در این تحقیق در گیاهان تست شده حاصل از کشت بافت با گیاه مادری تنوعی مشاهده نشده است. شکل ۲- مربوط به آغازگر mPdCIR035 می‌باشد که عدم وجود تنوع ژنتیکی را به خوبی نشان می‌دهد. همان طور که در شکل مشخص می‌باشد، نمونه‌ی مادری و گیاهچه‌های کشت بافتی در ۱۴۰ bp باند داده‌اند که نشان از حفظ ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از کشت بافت می‌باشد.

نتایج نشان داد آغازگرهای مورد استفاده mPdCIR035، PDAAG1023 ، DP172 و قادر به تمایز بین نمونه‌ها و بیان چندشکلی بودند. هیچ کدام از آغازگرها تفاوتی بین نمونهٔ کشت بافتی و پاجوشی درون هر رقم نشان ندادند.



(ج) (ب) (الف)

شکل «۲»- پرایمر (الف)mPdCIR035 ، (ب)PDAAG1023 ، (ج) DP172، M نمونه مادری، ۱ لدر 50bp، به همراه گیاهان کشت بافتی

IrHC2019

منابع

Jain, M. 2007. Recent advances in date palm tissue culture and mutagenesis. *Acta Horticulture*, 736: 205-211.

Al-Khayri, J. M., Jain, S. M and Johnson, D. V. (Eds.). 2018. Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits (Vol. 3). Springer.

Kamal-Eldin, A. and Ghnimi, S. 2018. Classification of date fruit (*Phoenix dactylifera*, L.) based on chemometric analysis with multivariate approach. Journal of Food Measurement and Characterization, 12(2): 1020-1027.

Kriaa, W., Masmoudi, F. and Drira, N. 2007. *In vitro culture of date palm using mature female flower explants*. In: Proceedings of *the fourth Symposium on Date Palm*, 5-8 May, Saudi Arabia, King Faisal University, Al-Hassa. p.146.

Kumar, N., Singh, A.S., Modi, A., Patel, A. R., Gajera, B. and Subhash, N. 2010. Genetic stability studies in 21. Micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants using microsatellite marker. Forest Science, 26:31-36.

Malek, J. A. 2010. Next generation DNA sequencing applied to the Date palm tree (*Phoenix dactylifera*). In IV International Date Palm Conference 882 (pp. 249-252).

Verma, S. K., Khanna, V., & Singh, N. (1999). Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmati rice (Oryza sativa L.) germplasm for identification of variability and duplicate accessions, if any. ELECTROPHORESIS: An International Journal, 20(8): 1786-1789.

Study of Soma Clonal Diversity of Seedlings from Palatable Date Culture

Atena Bestaghi [1], Jafar Ahmadi [2], Reza Zarghami [3], Mehdi Zahravi [4]

[1] Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, University of Imam Khomeini

[2] groups of tissue culture., Iranian Agricultural Biotechnology Research Institute

[3] Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, University of Imam Khomeini

[4] Genetics and National Genetic Bank of Iran., Seed and Plant Improvement Institute

[*]*Corresponding author: rezazarghami2001@yahoo.com*

Abstract

The palm cultivar is very busy and expensive, because the number of saucers in each tree is limited, so today, the method of increasing the tissue culture is used. Vegetation and micronutrient culture technique plays a significant role in increasing the production of date seedlings, but sometimes genetic variation occurs, which is called somaclonal diversity. Molecular markers are among the biological elements used as laboratory probes to find and identify an individual, tissue, cell, cell nucleus, chromosome, or gene, and are introduced in various types of alleles. In this research, the genetic evaluation of the dates of pike and chickpea cultivars induced by direct organomyocytes was evaluated using three pairs of microsatellite primers. The results showed that the primers used mPdCIR035, PDAAG1023, DP172 were able to differentiate between the samples and express the polymorphism. None of the primers showed the difference between the tissue culture and the cuvette sample within each digit.

***Keywords*:** Genetic Diversity, Date, Soma Clonal, Indicator

IrHC2019