مقایسه نشانگرهای مولکولی اختصاصی بکار رفته در تعیین مقاومت به بیماری سفیدک پودری درختان سیب استان اصفهان از نظر میزان محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص‌های تنوع ژنتیکی

مرضیه ربانی[۱]، محمد مجتبی کامل منش[۲]
[۱*] دانشجوی سابق گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد شیراز، شیراز، ایران
۲. استادیار گروه مهندسی گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول: Marziehrabbani421@yahoo.com

چکیده

هدف بیشتر پژوهش‌های جدید در بیماری شناسی گیاهی یافتن شیوه‌هایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی است که به محیط زیست آسیب کمتری برسانند. تکنیک‌های مولکولی باعث کشف فاکتورهای ژنتیکی مقاوم در یک نهال می شوند. سفیدک پودری سیب در تمام مناطق سیب کاری جهان وجود دارد و در غالب کشورها یکی از مشکلات اساسی و مهم تولید این محصول است. استفاده از نشانگرهای مولکولی امکان تشخیص ژن‌های مهم مقاومت را می‌دهد. در پژوهش پیش‌رو، ژن‌های مقاوم به بیماری سفیدک پودری در برخی از ژنوتیپ‌های سیب موجود در استان اصفهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی بررسی و نشانگرها از لحاظ شاخص‌های تنوع ژنتیکی با هم مقایسه گردیدند. نمونه‌های برگی تازه و جوان از ارقام سیب کشت شده در استان اصفهان جمع آوری شده، DNA آن‌ها به روش CTAB استخراج و واکنش زنجیره پلی‌مرازی بر روی آن‌ها انجام گرفته و طول قطعه DNA تکثیر شده تشخیص داده شد. در بررسی الگوی باندی، باند نادری بین جمعیت‌ها مشاهده نگردید. همچنین درصد چند شکلی برای تمامی آغازگرها برابر ۱۰۰ بود و لذا تمامی آن‌ها توانستند تمایز بین جمعیت‌ها و نمونه‌ها را نشان دهند. آغازگر EMMO1 دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی، شاخص شانون، تعداد آلل موثر و تعداد آلل متفاوت بود و نسبت به آغازگرهای دیگر بهتر توانسته فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان کند. آغازگر OPAT20 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی بود که نشان می‌دهد به خوبی توانسته نمونه‌های جمعیتی سیب را از هم تفکیک کند و تنوع بین نمونه‌ها را از لحاظ ژن مورد بررسی نشان دهد. آغازگر EMMO2 نیز دارای بیشترین میزان فراوانی آللی بود.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، ژن مقاوم، مارکرهای مولکولی، PCR

مقدمه

از ابتدای پیدایش کشاورزی بیماری‌های گیاهی به دلیل آسیب به گیاهان، محدود کننده تولید بوده‌اند. خسارت این گروه تنش ها سالانه از لحاظ صرف هزینه و نیروی انسانی قابل توجه است. از این رو اصلاح ارقام مقاوم به بیماری ها از طریق افزایش میزان محصول و کیفیت آن می تواند تأثیر بسزایی بر اقتصاد کشاورزی جهان داشته باشد (بهداد، ۱۳۸۵). مهندسی ژنتیک و روش‌های به‌نژادی مولکولی امکان ایجاد واریته‌ها و گیاهانی با صفاتی ویژه را فراهم می‌کند که دسترسی به آن‌ها از روش‌های معمول غیرممکن است. از جمله‌ی این صفات، صفت مقاومت به تنش‌ها است که به دلیل اهمیت فراوان تنش‌های زنده و غیرزنده تهدیدکننده گیاهان، توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده است (آگریوس، ۱۳۸۹). پیشرفت در علم ژنتیک و مزایای مشخص کاشت یک واریته‌ی مقاوم به جای واریته‌ی حساس، اصلاح ارقام مقاوم را مطلوب و امکان‌پذیر ساخت. در سال‌های اخیر، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA نویدبخش تسریع روند اصلاح گیاهان بوده‌اند. نشانگرهای ملکولی یک ابزار مفید برای انتخاب واریته‌هایی با ژن‌های مشخص در جمعیت

IrHC2019

های در حال تفرق هستند. با کمک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت می‌توان ژن هدف را تکثیر کرده و حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ مورد بررسی را تعیین نمود. نشانگرهای مولکولی، توالی‌های خاصی از DNA هستند که به راحتی آشکار شده و توارث آن‌ها به سادگی قابل تشخیص است. انتخاب به کمک نشانگر این امکان را ایجاد می‌کند تا ژن مقاومت بدون نیاز به صرف زمان جهت فرارسیدن زمان بیان فنوتیپی ژن آن در گیاه، توسط محقق انتخاب شود (Kumar and Gupta, 2008).

سودمندی نشانگرهای مولکولی برای ژن‌های مقاومت توسط سه عامل پیوستگی نشانگر با ژن مقاومت، شناسایی آسان نشانگر و عامل میزان چندشکلی نشانگر بین ژنوتیپ های حاوی ژن مقاومت و ارقام وحشی معین می‌شود (Mukhtar *et al*, 2002). سفیدک پودری سیب در تمام مناطق سیب کاری جهان وجود دارد و در غالب کشورها یکی از مشکلات اساسی و مهم تولید این محصول است. لذا تشخیص ژن‌های مقاومت در این بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

روش‌های مولکولی و نقشه های لینکاژ ژنتیکی قادر به کشف و آنالیز ژن‌های مهم مقاومت و توسعه ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری PL1، Pl2، Pld و Plw شده اند. اولین نشانگر SCAR برای PL-1 ایجاد شده است و پس از آن N18-SCAR برای ژن اصلی تاثیرگذار در مقاومت به PL-2 معرفی شده است. چندین مورد از نشانگرهای PL-M نیز مشخص شده‌اند و همچنین نشانگرهای SSR و SCAR نیز برای PL-W و PL-D مشخص گردیده‌اند (James Jame *et al., 2004* and Evans, 2004). Stankovich و همکاران (۲۰۰۲) نیز با بررسی ژن‌های مقاوم به بیماری سفیدک پودری با استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان دادند که ژن PL2 مقاوم به بیماری سفیدک پودری در برخی ژنوتیپ‌های سیب موجود می‌باشد که نشان دهنده رابطه مستقیم بین فراوانی این ژن با مقاومت به بیماری در نمونه‌های سیب می‌باشد. لذا توالی یابی و جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در ایجاد گیاهان دست ورزی شده و دارای ژن‌های مقاوم، بسیار مهم و موثر خواهد بود و دستیابی به این مورد مدیون به کارگیری روش‌های مولکولی و استفاده از مارکرهای مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برگ های جوان و تازه ۷۰ نمونه از ۱۲رقم کشت شده در باغات ۵ منطقه استان اصفهان شامل سمیرم (شامل بخش‌های مرکزی سمیرم، حاجی آباد، حنا، مهرگرد، بیده و پادنا)، دهاقان، شهرضا، خمینی شهر و اصفهان در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت ماه به منظور شناسایی ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری سیب جمع آوری و به وسیله یخ به آزمایشگاه منتقل و در فریزر با دمای ۸۰- نگهداری شد... پس از آن استخراج DNA از نمونه‌های برگی به روش CTAB (موری و تامپسون[1]، ۱۹۸۰) انجام شد و با توجه به میزان پیوستگی و فاصله نشانگرهای گزارش شده برای بیماری مورد نظر، نشانگرها از گروه SCAR انتخاب شدند (جدول ۱). پس از آن تکثیر قطعات ژنومی با اسفاده از آغازگرهای در دستگاه ترمال سایکلر انجام و سپس شاخص‌های تنوع ژنتیکی محاسبه گردید. محاسبات در این پژوهش بوسیله نرم‌افزار GenAlex انجام شد.

[1]. Murray and Thompson

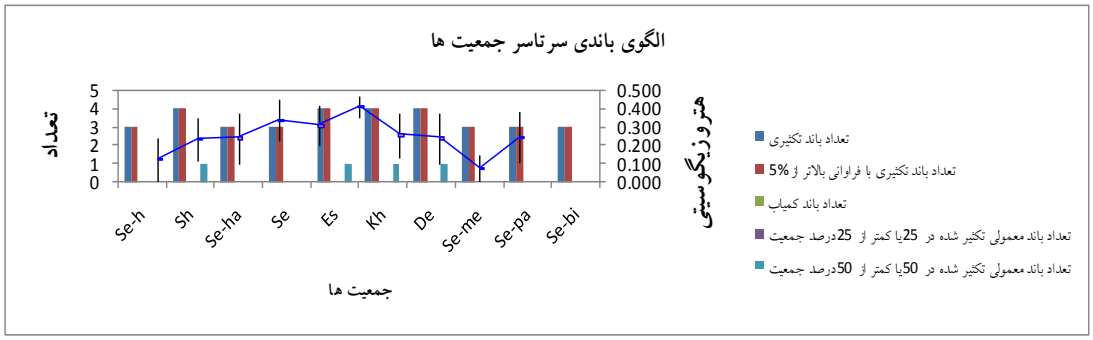
IrHC2019

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده

توالی آغازگر	نوع نشانگر	اندازه قطعات واحد (bp)	ژن	پرایمر
F: ATCAGCCCCACATGAATCTCATACC	SCAR	450	PL-1	OPAT20
R: ACATCAGCCCTCAAAGATGAGAAGT				
F: AGGATAATAATCTATCTTGTAAAGG	SCAR	90	PL-D	EMDM01
R: CCATTCAGCCCAACGAGT				
F: AGATCAAGAAACATGGGATA	SCAR	2000	PL-2	DR033888
R: TAGCAGCAGAAATACTGGCAGA				
F: CTGCAGACTGTTTGTAAGTTGG	SCAR	250	PL-W	EM MO2
R: AACTCCTTGATTTCTCCTATTGTT				
F: GAATTCACTTGTGCTAAG	SCAR	88	PL-W	EM MO1
R: GGAAAGAAAGACCAAAATAAACG				

نتایج

چهار آغازگر به کار رفته به خوبی تمایز بین جمعیت‌ها و نمونه‌ها را نشان دادند. تعداد کل نوارهای تکثیر شده توسط ۴ آغازگر برابر ۱۷۵ قطعه و در محدوده ۸۸ تا ۴۵۰ جفت باز بود که بیشترین تعداد نوار تکثیر شده (۶۴ قطعه) مربوط به آغازگر EMMO1 و کمترین تعداد (۷ قطعه) متعلق به آغازگر OPAT20 بود. متوسط تعداد قطعه تولیدی با اندازه مختلف توسط هر آغازگر ۴۶/۳۳ قطعه بود. بلندترین باند تکثیری ثبت شده در بین آغازگرهای مورد مطالعه توسط آغازگر OPAT20 با ۴۵۰ جفت باز و کوتاه‌ترین قطعه تکثیری توسط آغازگر EMMO1 با ۸۸ جفت باز بود. نتایج تکثیر ۴ آغازگر نشان داد که در کل جمعیت‌ها هیچ کدام از آغازگرهای متصل به ژن بیماری سفیدک، باند نادر و باند معمولی تکثیر شده در ۲۵ یا کمتر از ۲۵ درصد جمعیت تکثیر نکردند. همچنین فقط ۴ جمعیت باند معمولی تکثیر شده در ۵۰ یا کمتر از ۵۰ درصد جمعیت تکثیر کردند. تعداد مکان ژنی تکثیر شده و تعداد باندهای تکثیری با فراوانی بالاتر از ۵٪ در تمام جمعیت‌ها در محدوده ۳ تا ۴ عدد بود (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی باندی حاصل از ۴ آغازگر متصل به ژن بیماری سفیدک سطحی سیب در کل جمعیت‌ها

IrHC2019

تمامی ۴ آغازگر توانستند پلی‌مورفیسم را بین نمونه‌ها نشان دهند و تمامی آن‌ها باندهای واضحی را تولید کردند. آغازگر EMMO1 دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی (۰/۴۷)، شاخص شانون (۰/۶۷)، تعداد آلل موثر (۱/۹۱) و تعداد آلل متفاوت (۲) بود. همچنین OPAT20 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی (۰/۹۹) و EMMO2 دارای بیشترین میزان فراوانی آللی (۰/۹۴) بود. از بین آغازگرها، 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 به آغازگر EMMO2 (۰/۱۱) تعلق داشت (جدول ۲).

جدول ۲- چند شکلی نشانگرهای مورد استفاده با استفاده از شاخص‌های نی، شانون، تعداد آلل موثر ومتفاوت

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

بحث

در بررسی الگوی باندی، باند نادری بین جمعیت‌ها مشاهده نگردید که این نتیجه تاییدی بر اختصاصی بودن آغازگرهای متصل به ژن و عدم تکثیر غیر اختصاصی بود. همچنین نتایج نشان داد که آغازگر EMMO1 دارای بیشترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل موثر) بود. در نتیجه این آغازگر نسبت به آغازگرهای دیگر بهتر توانسته است فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان کند که پیشنهاد می‌شود در کارهای آتی از آن‌ها بهره جست. در عوض آغازگر OPAT20 دارای کمترین میزان این سه شاخص بود که نشان دهنده ضعیف بودن این آغازگر در متمایز کردن جمعیت‌ها از هم می‌باشد.

آغازگرOPAT2 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی و EMMO2 دارای بیشترین میزان فراوانی آللی بود و برعکس آغازگر OPAT20 دارای کمترین میزان فراوانی آللی بود و کمترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی متعلق به آغازگر EMMO2 بود. از این موضوع می‌توان دریافت که محتوی اطلاعات چندشکلی با مقدار فراوانی آللی رابطه معکوس دارد. زیرا در فرمول محاسبه محتوی اطلاعات چند شکلی میزان فراوانی آللی از میزان ۰/۵ کم می‌گردد در نتیجه هر چه میزان فراوانی آللی کمتر شود میزان محتوی اطلاعات چند شکلی بیشتر می‌گردد که این نتیجه تایید گردیده است. پس آغازگر OPAT20 که ژن‌های مربوطه را تکثیر کرده است، به خوبی توانسته نمونه‌های جمعیتی سیب را از هم تفکیک کند و تنوع بین نمونه‌ها را از لحاظ ژن مورد بررسی نشان دهد و از این تنوع می‌توان در جهت تلاقی نمونه‌ها با همدیگر و تولید نوترکیبی جدید بین ژن‌های مورد نظر استفاده کرد تا این امید باشد که ژن‌های دستخوش تغییرات مفید جهت مقاومت به بیماری مورد نظر استفاده شوند. همچنین بعد از شناسایی چنین ژن‌هایی می‌توان با روش‌های مولکولی همانند جداسازی ژن، ژن مفید تغییر یافته جداسازی شده را به نمونه‌های فاقد چنین ژنی منتقل کرد تا بتوان مقاومت را در این نمونه‌ها تقویت کرد.

IrHC2019

منابع

آگریوس، ج ا. ۱۳۸۹. بیماری شناسی گیاهی. ترجمه ایزدپناه ک. اشکان م. بنی هاشمی ض. رحیمیان ح. میناسیان و. ویرایش پنجم. چاپ اول. تهران. انتشارات آییژ.

بهداد، ا. ۱۳۸۵. فیتوپاتولوژی و بیماری های مهم گیاهی. قم. انتشارات عطر عترت

Mukhtar, MS., Rahman, M. and Zafar, Y. 2002. Assessment of genetic diversity among wheat (*Triticum aestivum L.)* cultivars from a range of localities across Pakistan using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Euphytica, 128: 417-425.

Kumar, J. and Gupta, PK. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotech Rep

James, CM. and Evans, KM. 2004. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance genes *Pl-d* and *Pl-w* in apple. Acta Hortic, 663: 123–127.

James, CM. Clarke, JB. and Evans, KM. 2004. Identification of molecular markers linked to the *mildew* resistance gene *Pl-d* in apple. Theor Appl Genet, 110: 175–181.

Murray, HG. And Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acid Res, 8: 4321–4325

Stankovich, L. Koller, B. Seglias, N. Kellerhals, M. and Gessler, C. 2002. Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. Theor. Appl. Genet, 93: 199–204.

Comparison of specific molecular markers used in determining the resistance of Isfahan apple trees to *Powdery mildew* disease by polymorphic and genetic diversity indexes

Marzieh Rabbani[1]*, Mohammad Mojtaba Kamelmanesh[2]

[1*] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Shiraz, Shiraz, Iran

[2] Assistant professor, Dep. of plant pathology, Islamic Azad university of Shiraz, Shiraz, Iran

**Corresponding Author: Marziehrabbani421@yahoo.com*

Abstract

The goal of most new studies in plant pathology is to find ways to control plant diseases that are less harmful to the environment. Molecular techniques are cause of resistant genes detection in plant.Powdery mildew is excited in all apple areas and in most countries it is one of the main important problems of apple production. The use of molecular markers allows important resistant genes detection. This study was conducted to track and determine genes which are resistant to Powdery mildew in some apple genotypes present in Isfahan.Young and fresh leaf samples of apple trees grown in Isfahan were collected. DNA was extracted by CTAB, polymerase chain reaction was performed and the DNA fragment was detected and DNA length were measured. In study of bond pattern no infrequent bond was realized. The results indicated that polymorphic percentage was 100 for all primer so all of them could show diversity in populations and genotypes. Primer EMMO1 showed the highest genetic diversity indexes (Nei diversity index, Shannon, effective number of alleles) therefore it was more efficient in determining the distance between the population better than others and OPAT20 primer showed the highest data content polymorphism which indicates that it could differ apple populations and samples diversity better than other primers and EMMO2 primer had the highest allele frequency., EMMO1 primer was more efficient in determining the distances between the populations.

Keywords: DNA extraction, molecule markers, PCR, resistant gene

IrHC2019