مقایسه نشانگرهای مولکولی اختصاصی بکار رفته در تعیین مقاومت به بیماری آتشک درختان سیب استان اصفهان از نظر شاخص‌های تنوع ژنتیکی

مرضیه ربانی[۱]، مهران کنعانی[*۲]

[۱] دانشجوی سابق گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد شیراز، شیراز، ایران

[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[*] نویسنده مسئول: kanani.mehran@gmail.com

چکیده

هدف پژوهش‌های جدید در بیماری‌شناسی گیاهی، یافتن شیوه‌هایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی بوده که آسیب کمتری به محیط زیست برسانند. امیدبخش‌ترین این شیوه‌ها، تولید گیاهان مقاوم به بیماری می‌باشد. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی صورت گرفته که ابزار قدرتمندی برای پژوهش گیاهان عالی می‌باشد. یکی از اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA بوده که موجب شناسایی دقیق‌تر ارقام و پایه‌ها شده و توسعه این نشانگرها، عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده، بطوری‌که به کمک آن‌ها، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی میسر گردیده است. بیماری آتشک از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار بوده که سالانه خسارات فراوانی به محصول وارد می‌کند. با کمک نشانگرهای مولکولی اختصاصی، می‌توان ارقام مقاوم به این بیماری را کنترل نمود. در پژوهش پیش‌رو، ژن‌های مقاوم به بیماری آتشک در برخی از ژنوتیپ‌های سیب موجود در استان اصفهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی بررسی و نشانگرها از لحاظ تنوع ژنتیکی با هم مقایسه گردیدند. پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگی تازه و جوان از ارقام سیب کشت 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. نتایج نشان داد که تمامی آغازگرها توانستند پلی مورفیسم بین نمونه‌ها را نشان دهند و درصد چندشکلی برای تمامی آن‌ها برابر ۱۰۰ بود. آغازگر متصل به ژن CH-SD1 دارای بیشترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل مؤثر و تعداد آلل متفاوت) بوده و آغازگر GE8019 دارای بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی و بیشترین میزان فراوانی آللی بود. بنابراین، آغازگر CH-SD1 نسبت به سایر آغازگرها بهتر توانست فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان سازد.

کلمات کلیدی: **آتشک سیب، ژن مقاوم، نشانگرهای مولکولی، استخراج DNA، PCR**

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش گیاهان فراهم آورده است. یکی از اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA می‌باشد که عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده، به‌طوری‌که به کمک آن ایجاد نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده و نیز شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی میسر گردیده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴). یکی از پرکاربردترین این نشانگرها، نشانگرهای مولکولی می‌باشد. نشانگرهای مولکولی سبب شناسایی آسان و قابل‌اطمینان ژن‌ها، ردیابی، انتقال، و تخمین تنوع ژنتیکی و ارتباط ژرم‌پلاسم‌ها شده و به‌طور گسترده‌ای در بررسی‌های تنوع ژنتیکی و سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم و مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی، بررسی‌های فنولوژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیهٔ QTL، همسانه‌سازی ژن‌های خاص بر اساس نقشه‌های ژنی، گزینش به کمک نشانگر، هرم‌بندی ژن‌ها، طبقه‌بندی گیاهان زراعی الیت، انتقال ژن‌ها از گونه‌های دور، انتقال ژن‌های خارجی از گیاهان تراریخته به واریته‌های مطلوب و همچنین در قرنطینه نباتی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نشانگرهای مولکولی در زمینه شناسایی ارقام مقاوم به بیماری سودمند بوده که این سودمندی نشانگرهای مولکولی برای ژن‌های مقاومت، توسط سه عامل پیوستگی نشانگر با ژن مقاومت، شناسایی آسان نشانگر و عامل میزان چندشکلی نشانگر بین ژنوتیپ‌های حاوی ژن مقاومت و ارقام وحشی مشخص می‌شود. انتخاب به کمک نشانگر این امکان را ایجاد می‌کند تا ژن مقاومت بدون نیاز به‌صرف زمان جهت فرارسیدن زمان بیان فنوتیپی ژن آن در گیاه، توسط محقق انتخاب شود (Naik *et al*., 1998). بااین‌حال اصلی‌ترین هدف کاربرد نشانگرهای مولکولی، گزینش و اصلاح به کمک نشانگر می‌باشد.

بیماری آتشک در اثر آلودگی به باکتری *Ervinia amylovora* Burrill به وجود می‌آید و یکی از شدیدترین و مخرب‌ترین بیماری‌های میوه دانه‌دار به‌خصوص در سیب (*Malus domestica*) و گلابی (*Communis pyrus*) محسوب می‌شود. تحقیقات صورت گرفته، سبب شناسایی موقعیت ویژگی کمی (QTL) مرتبط با مقاومت به آتشک در هلو و سیب شد. تشخیص QTL متصل به مقاومت آتشک به‌صورت مستقل در F7 در دومین مجموعه گیاهچه‌های حاصل از تلاقی فیستا و دیسکاوری کشف (Khan *et al*., 2006) و با موارد کشت شده در سوئیس و تلقیح شده با سویه سوئیس *E. amylovora* بررسی گردید. محدوده تفاوت‌های فنوتیپی توضیح داده شده توسط QTL F7 برابر با ۳۷/۵ تا ۳۸/۶٪ می‌باشد (Khan et al., 2007). بنابراین مشخص شد یک QTL اصلی متصل به مقاومت به سوختگی آتشی، بین ۳۴/۳ تا ۴۶/۶٪ تفاوت‌های فنوتیپی را سبب می‌گردد. این QTL روی گروه‌های ۷ متصل رقم سیب فیستا در موقعیت ژنتیکی مشابه در دو پیش‌زمینه ژنتیکی متفاوت مشخص شده است که شامل Fiesta × Discovery و Prima × Fiesta می‌باشد. یک نشانگر SCAR و یک نشانگر SSR ویژه برای این منطقه ایجاد شده است. آنالیز شجره‌ای Fiesta با این نشانگر امکان ردیابی (مشتق) آلل QTL F7 را به رقم Cox Orange Pippin فراهم می‌سازد. پایداری اثر آلل QTL در زمینه‌های مختلف آنالیز شده با القاء نتاج در تلاقی بین Milwa (یک رقم حساس) و رقم ۱۲۱۷ (یک رقم نیمه مقاوم) تداوم می‌یابد. QTL بر روی LG7 فیستا را می‌توان به‌عنوان یک QTL پایدار در نظر گرفت زیرا در پیش‌زمینه‌های ژنتیکی متفاوت مشخص گردیده و پس از تلقیح با ۲۰ سویه متفاوت باکتری *Ervinia amylovora* مشاهده می‌گردد (Khan *et al*., 2007)، QTL F7 امروزه به‌عنوان مهم‌ترین QTL مقاوم به بیماری آتشک برای استفاده در MAS خوانده می‌شود، درحالی‌که هیچ QTL دیگری در مناطق جوامع دیگر مشاهده نشده است. چهار مورد از QTL جزئی نیز مشخص شده که یک مورد روی لینکاژ گروه ۳ از فیستا و یک مورد روی لینکاژ گروه ۳ از پریما با استفاده از تلاقی F × D و P × F (به ترتیب) مشخص گردیده است. همچنین یک مورد برای هرکدام از لینکاژ گروه ۱۲ و لینکاژ گروه ۱۳ دیسکاوری در یک تلاقی F × D حاصل شده است. مقاومت مونوژنیک به آتشک در سیب مشخص نشده و اغلب آنالیزهای مولکولی با استفاده از رویکرد QTL بر روی نتاج حاصل از ارقام تجاری صورت گرفته است (Folta and Gardiner, 2009).

مواد و روش‌ها

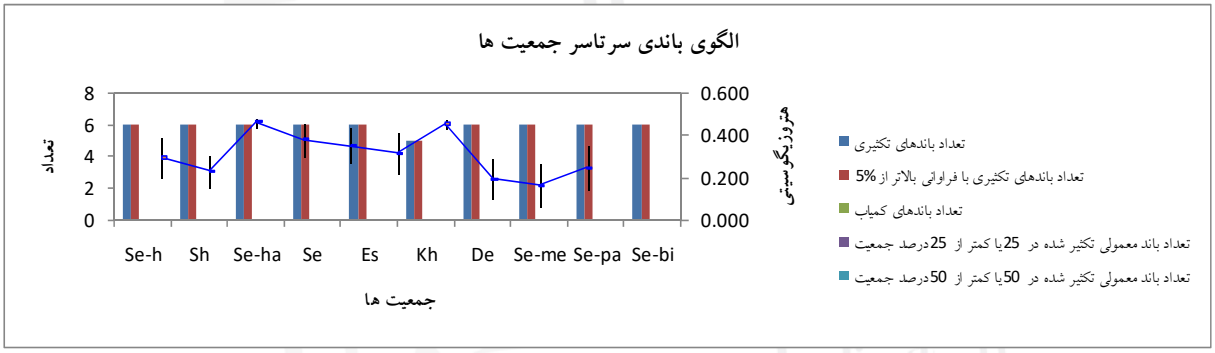
برگ‌های جوان و تازه ۷۰ نمونه از ۱۲رقم کشت شده در باغات ۵ منطقه استان اصفهان در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت‌ماه به‌منظور شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری آتشک سیب جمع‌آوری شد. سپس برگ‌های جوان جمع‌آوری‌شده در فویل‌های آلومینیومی پیچیده و به‌وسیله یخ به آزمایشگاه منتقل و در فریزر با دمای ۸۰- نگهداری شد.. مناطق نمونه برداری شده، شامل پنج منطقه به ترتیب سطح زیر کشت: سمیرم (شامل بخش‌های مرکزی سمیرم، حاجی‌آباد، حنا، مهرگرد، بیده و پادنا)، دهاقان، شهرضا، خمینی شهر و اصفهان بود. پس از آن DNA نمونه‌ها به روش CTAB استخراج و با توجه به میزان پیوستگی و فاصله نشانگرهای گزارش شده برای مورد نظر، نشانگرها از دو گروه SCAR و SSR برگزیده شدند (جدول ۱) پس از آن تکثیر قطعات ژنومی با استفاده از آغازگرهای انتخابی و در دستگاه ترمال سایکلر انجام و توالی بدست آمده تجزیه و تحلیل و مقایسه گردید.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده

بیماری	ردیف	پرایمر	ژن	اندازه قطعات واحد (bp)	نوع نشانگر	توالی آغازگر
آتشک	۱	AE10	QTL	375	SCAR	F: CTGAAGCGCACGTTCTCC R: CTGAAGCGCATCATTTCTGATAG
	۲	GE-8019	QTL	397	SCAR	F: TTGAGACCGATTTTCGTGTG R: TCTCTCCCAGAGCTTCATTGT
	۳	CH-F7-Fb1	QTL	174-210	SSR	F: AGCCAGATCACATGTTTTCATC R: ACAACGGCCACCAGTTTATC
	۴	CH-Sd1	QTL	242	SSR	F: TGCGTATCCAACTCATTCTCC R: GCCATAAAGGAGGTCGAATTTAC
	۵	CH03e03	QTL	186	SSR	F: AAAACCCACAAATAGCGCC R: GCACATTCTGCCTTATCTTGG
	۶	CH03g12z	QTL	220	SSR	F: CAAGGATGCGCATGTATTTG R: GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT R: GGAAAGAAAGACCAAAATAAACG

نتایج

شش آغازگر استفاده شده توانستد به‌خوبی تمایز بین جمعیت‌ها و نمونه‌ها را نشان دهند. تعداد کل نوارهای تکثیر شده توسط ۶ آغازگر برابر ۲۷۸ قطعه و در محدوده ۱۷۴ تا ۳۹۷ جفت باز بود که بیشترین تعداد نوار تکثیر شده (۶۴ قطعه) مربوط به آغازگر F7FB1 و کمترین تعداد (۳۵ قطعه) متعلق به آغازگر GE8019 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 GE8019 با ۳۹۷ جفت باز و کوتاه‌ترین قطعه تکثیری توسط آغازگر F7FB1 با ۱۷۴ جفت باز بود. نتایج تکثیر ۶ آغازگر نشان داد که در کل جمعیت‌ها هیچ‌کدام از آغازگرهای متصل به ژن بیماری آتشک، باند نادر، باند معمولی تکثیر شده در ۲۵ یا کمتر از ۲۵ درصد جمعیت و باند معمولی تکثیر شده در ۵۰ یا کمتر از ۵۰ درصد جمعیت تکثیر نکردند. همچنین تعداد مکان ژنی تکثیر شده و تعداد باندهای تکثیری با فراوانی بالاتر از ۵٪ در تمام جمعیت‌ها به‌جز جمعیت خمینی شهر (۵ مکان تکثیری)، ۶ مکان ژنی تکثیر شده بود (شکل ۱).



شکل ۱. الگوی باندی حاصل از ۶ آغازگر مربوط به بیماری سوختگی آتشی سیب در کل جمعیت‌ها

از ۶ آغازگر متصل به مکان ژنی بیماری، تمامی ۶ آغازگر توانستند پلی‌مورفیسم را بین نمونه‌ها نشان دهند. همچنین کل آغازگرها توانستند باندهای واضحی را تولید کنند. آغازگر CH-SD1 دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی (۰/۴۴)، شاخص شانون (۰/۶۳)، تعداد آلل مؤثر (۱/۸۱)، تعداد آلل متفاوت (۲) بود. همچنین GE8019 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چندشکلی (۰/۷۴) و F7FB1 (۰/۹۳) دارای بیشترین میزان فراوانی آللی بود. آغازگر F7FB1 دارای کمترین میزان تنوع ژنتیکی نی (۰/۱۶)، شاخص شانون (۰/۲۲)، تعداد آلل مؤثر (۱/۳۰)، تعداد آلل متفاوت (۱/۳۳) و محتوی اطلاعات چندشکلی (۰/۱۴) بود و کمترین میزان فراوانی آللی به آغازگر GE8019 (۰/۵۱) تعلق گرفت (جدول ۲).

جدول ۲. چندشکلی نشانگرهای مورد استفاده با استفاده از شاخص‌های نی، شانون، تعداد آلل مؤثر و متفاوت

آغازگر	تنوع ژنتیکی نی	شاخص شانون	تعداد آلل مؤثر	تعداد آلل متفاوت	محتوی اطلاعات چندشکلی	فراوانی آللی
GE8019	0/42	0/61	1/75	2/00	0/74	0/51
F7FB1	0/16	0/22	1/30	1/33	0/14	0/93
CH-SD1	0/44	0/63	1/81	2/00	0/64	0/60
AE10	0/25	0/37	1/43	1/50	0/70	0/54
CHO3G12z	0/32	0/45	1/62	1/67	0/22	0/88
CHO3E03	0/43	0/62	1/79	2/00	0/64	0/60

بحث

بررسی الگوی باندی در بیماری آتشک نشان داد که باند نادری بین جمعیت‌ها مشاهده نگردید که این نتیجه تأییدی بر اختصاصی بودن آغازگرهای متصل به ژن و عدم تکثیر غیراختصاصی بود. نتایج نشان داد که آغازگر CH-SD1 دارای بیشترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل مؤثر) بود. درنتیجه این آغازگر نسبت به آغازگرهای دیگر بهتر توانسته فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان کند و به‌خوبی توانسته نمونه‌های جمعیتی سیب را از هم تفکیک کرده و تنوع بین نمونه‌ها را از لحاظ ژن مورد بررسی قرار دهد و از این تنوع می‌توان در جهت تلاقی نمونه‌ها با همدیگر و تولید نوترکیبی جدید بین ژن 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.

آغازگر F7FB1 دارای کمترین میزان این سه شاخص بود که این نشان دهنده ضعیف بودن این آغازگر در متمایز کردن جمعیت‌ها از هم می‌باشد. ازآنجاکه تعداد مکان ژنی تکثیر شده و تعداد باندهای تکثیری با فراوانی بالاتر از ۵٪ در تمام جمعیت ها به‌جز جمعیت خمینی شهر (۵ مکان تکثیری)، ۶ مکان ژنی بود لذا ارتباطی بین مقاومت و پروفیل باندی وجود ندارد و QTL ها مقاومت را نشان دادند. در این بیماری آغازگر GE8019 دارای بیشترین میزان محتوی اطلاعات چندشکلی و کمترین میزان فراوانی آللی و F7FB1 دارای بیشترین میزان فراوانی آللی و کمترین محتوی اطلاعات چندشکلی بود.

نتایج تحقیقات نشان داد آغازگرهای مورد استفاده به‌خوبی تنوع بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهند و می‌توان برای تحقیقات آتی از این آغازگرها استفاده کرد. همچنین در تشخیص بیماری آتشک سایر درختان هم می‌توان از این آغازگرها بهره برد.

منابع

نقوی م. قره‌یاضی ب. حسینی سالکده ق. ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. چاپ اول. تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

Folta KM. Gardiner SE. 2009. Genetics and Genomics of Rosaceae. Springer, 633 p. http://www.springer.com/series/7397

Khan MA. Durel CE. Duffy B. Drouet D. Kellerhals M. Gessler C. Patocchi A. 2007. Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker assisted selection. Genome, 50: 568–577.

Khan MA. Duffy B. Gessler C. Patocchi A. 2006. QTL mapping of fire blight resistant in apple. Mol. Breed, 17: 299-306.

Naik S. Gill KS. Prakasa Rao VS. Gupta VS. Tamhanker SA. Pujar S. Gill BS. Ranjekkar PK. 1998. Identification of a STS marker linked to the Aegilops spelioides derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Theorical and Applied Genetics, 97: 535-540.

Comparison of Specific Molecular Markers Used in Determining the Resistance of Isfahan Apple Trees to Fire Blight Disease by Genetic Diversity Indexes

Marzieh Rabbani[1], Mehran Kanani[2]*
[1] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Shiraz, Shiraz, Iran
[*2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
*Corresponding Author: Kanani.mehran@gmail.com

Abstract

New researches in plant pathology have targeted finding the ways to control plant diseases to have less harmful effects on environment. The most promising practices are producing disease-resistant plants. In recent years, much progress has been made in the field of molecular biology, which is a powerful tool for the study of higher plants. One of the most useful tools are DNA markers which have facilitated the precise identification of cultivars and rootstocks and development of these markers has opened a new era in genetics and facilitated the identification of quantity and quality traits. Fire blight is one of the most destructive diseases in pome fruits which cause a huge damage annually. The control of this disease is feasible through specific molecular markers. This study was conducted to track and determine genes which are resistant to fire blight in some apple genotypes present in Isfahan via specific molecular markers. Young and fresh leaf samples of apple trees grown in Isfahan were collected, DNA was extracted by CTAB, polymerase chain reaction (PCR) was performed and the DNA length were measured. The results indicated that all primers could recognize the polymorphism between the samples and polymorphism percentage was 100 for all. The primer CH-SD1 gene linked to the fire blight disease showed the highest genetic diversity indexes (Nei diversity index, Shannon, number of effective alleles, and number of different alleles) and GE8019 primer showed the highest data content polymorphism and the highest allelic frequency. Therefore, the CH-SD1 primer was more efficient in identification of distances between the populations.

***Keywords*: DNA extraction, fire blight, molecule markers, PCR, resistant gene**