بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) با نشانگر ISSR

شیرین تقی پور[۱]، عبداله احتشـــامنیا[۲]*، حامد خدایاری[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳-استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

*نویسنده مسئول: ab.ehteshamnia@gmail.com

چکیده

گام اول در برنامه‌های به‌نژادی، تعیین تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم است. بررسی تنوع ژنتیکی گل داوودی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی، امری حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در ارقام داوودی برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در بین ۳۰ رقم مختلف گل داوودی از نشانگر ISSR استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش تامسون و موری و کیفیت و کمیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۸ ٪ بررسی شد. سپس DNA استخراج شده توسط ۱۴ پرایمر ISSR با استفاده از ترموسایکلر تکثیر شد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام نشان داد که بر اساس صفات مورد مطالعه، ارقام در هفت کلاستر قرار گرفتند. ماتریس تشابه ارقام به روش ضریب جاکارد نشان داد که فاصله ژنتیکی از ۰/۹۱-۰/۳۸ متغیر بود، کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۳۸) بین ارقام 'فریبرز'و 'فرحناز' با میزان تشابه ۰/۳۸ و بیش ترین فاصله ژنتیکی بین ارقام 'اوران' و 'تابان'۳ با میزان تشابه ۰/۹۱ مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: **تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، گل داوودی**

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) در میان گل‌های زینتی به‌عنوان ملکه پاییز شناخته شده و دومین گل بریدنی بعد رز می‌باشد (Kumar *et al.*, 2006). بهبود محصول از طریق استفاده از تنوع ژنتیکی، کلید موفقیت برنامه‌های اصلاحی است (Renganayaki *et al.*, 2001). اختلافات بین ارقام با توجه به ویژگی‌های زراعی، مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی به‌طور مستقیم و غیر مستقیم نشان‌دهنده اختلافات در سطح DNA است.نشانگر های مولکولی، چندشکلی را در سطح DNA آشکار می‌کنند و در نتیجه تحت شرایط محیطی یا مراحل رشدی گیاه قرار نمی‌گیرند (Collard *et al.*, 2005). استفاده از نشانگرهای مولکولی و تهیه نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی، از فعالیت های اصلی در زمینه‌ی اصلاح مولکولی است. در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR، نشانگرهای ISSR (نواحی بین توالی های تکراری ساده) به‌طور وسیعی توسط محققان برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و کارآمد گزارش شده‌اند. نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و جزء انواع تغییر یافته‌ی نشانگرهای ریز ماهواره می‌باشد.در پژوهشی با استفاده از بیست آغازگر ISSR، ارقام جدید گل داوودی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان پلی‌مورفیسم تفاوت معنی‌داری در ارقام مختلف دارد و نشانگر ISSR می‌تواند یک تکنیک مفید و سریع و آسان برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان گونه‌های مختلف باشد (Palai & Rout., 2011). در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت از گل داوودی در چین، از صفات مورفولوژیک و از دو نشانگر مولکولی SRAP و ISSR استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه نشانگرهای مولکولی نمونه‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی تقسیم کرد و

در دو گروه جداگانه شمال و جنوب چین قرار داد (Shao *et al.*, 2010). انجام بررسی‌های مولکولی به‌منظور شناخت ژنتیکی و بررسی فنوتیپی برای گروه‌بندی ارقام گل داوودی موجود در ایران از مهم‌ترین اهداف پژوهش حاضر در استان لرستان بود. همچنین با توجه به این‌که استفاده از نشانگرهای ISSR تاکنون برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام داوودی انجام نشده بود و همچنین درصد چند شکلی بالایی که با استفاده از این نشانگر حاصل می‌شود، این پژوهش بدین منظور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

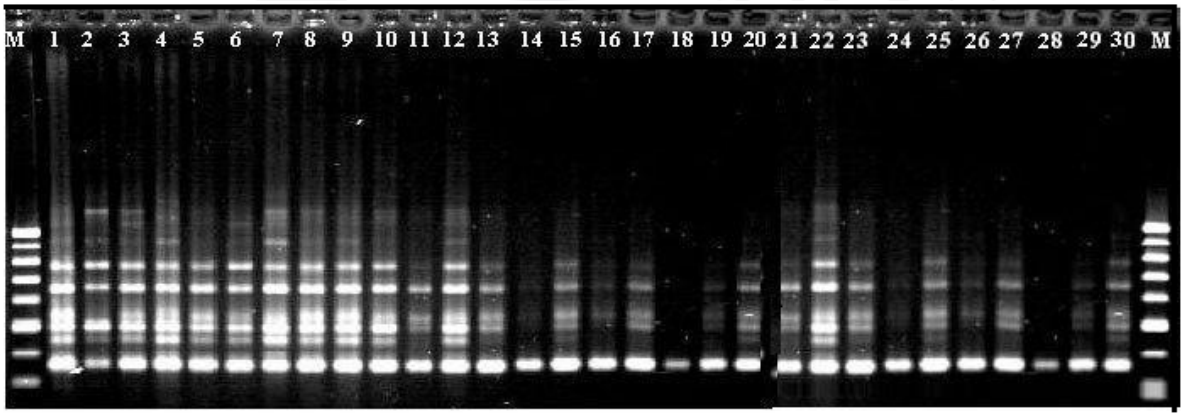
در این مطالعه ۳۰ رقم اصلاح‌شده گل داوودی به‌صورت قلمه ریشه‌دار شده از پژوهشکده گل و گیاهان زینتی محلات تهیه و اردیبهشت ۹۵ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت گردید. برای استخراج DNA، نمونه‌های برگی از بوته‌های انتخابی در مرحله شش تا هشت برگی با استفاده از روش CTAB (Doyle & Doyle, 1990)با اندکی تغییر استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد استفاده شد. در نهایت بعد از اطمینان از کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده، برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با غلظتی برابر ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. در این پژوهش برای تکثیر قطعات DNA ژنومی از ۱۴ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول۱).

جدول ۱- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی ارقام گل داوودی

شماره	توالی آغازگر	دما
1	5′ GGCGGCGGCGGCGGCAT 3′	56
2	AAGAAGAAGAAGAAGGC 3′5′	52
3	AAGAAGAAGAAGAAGTG 3′5′	50
4	AAGAAGAAGAAGAAGCC 3′5′	46
5	AGCAGCAGCAGCAGCCA 3′5′	46
6	AGCAGCAGCAGCAGCCG 3′5′	48
7	GGCGGCGGCGGCGGCTA 3′5′	56
8	AGCAGCAGCAGCAGCGA 3′5′	50
9	5′ AAGAAGAAGAAGAAGCG 3′	50
10	CCAGTGGTGGTGGTG 3′5′	50
11	GACAGACAGACAGACA 3′5′	48
12	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT 3′5′	54
13	TGAGAGAGAGAGAGAGAGA 3′5′	54
14	5′AGGAGGAGGAGGAGGAGG 3′	56

تحلیل آماری داده‌های مولکولی

برای به‌دست آوردن فواصل ژنتیکی و رسم دندروگرام مورد انتظار از نرم‌افزار NTSYSpc ver 2.02 استفاده گردید.

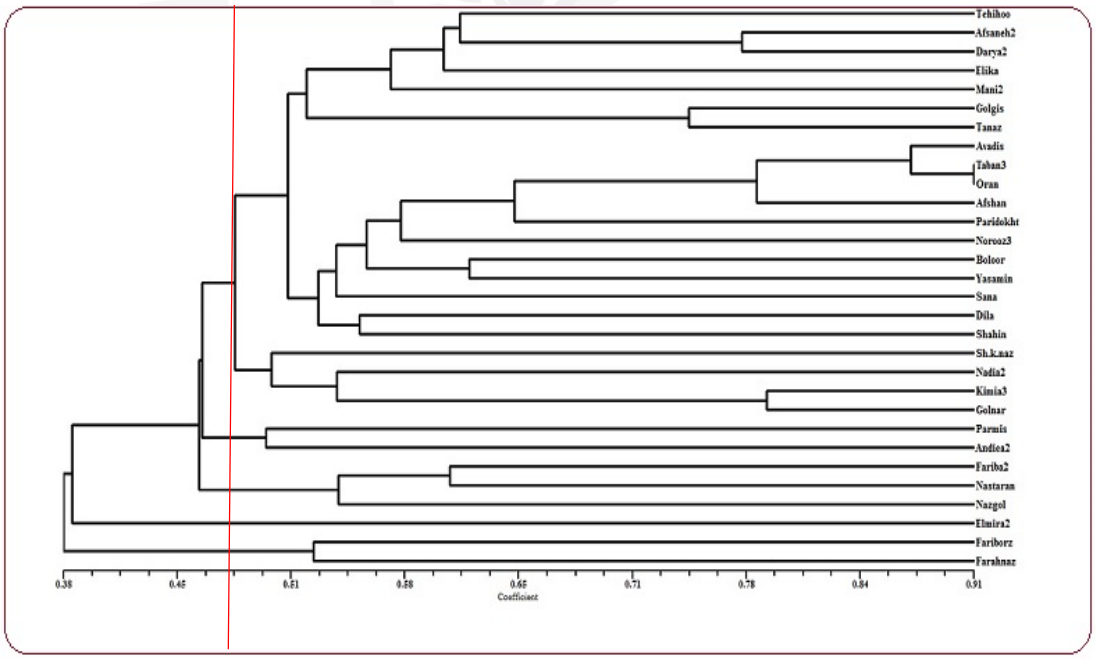


شکل ۱: الگوی باندی ISSR با استفاده نشانگر (AAG)5TG: نشانگر به‌اندازه ۱۰۰bp می‌باشد.
Figure1: ISSR banding pattern using marker (AAG) 5TG: the marker is the size of bp 300

تجزیه خوشه‌ای ارقام داوودی با نشانگر ISSR

. برای برآورد تنوع ژنتیکی بین ارقام داوودی مورد مطالعه ماتریس داده‌ها با ۸۲۵ باند ایجاد گردید. در این حالت نیز از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA برای گروه‌بندی استفاده گردید. دندروگرام حاصله در ضریب تشابه ۰/۵۰ قطع شد (شکل ۲) که در این حالت ارقام گل داوودی تشکیل هفت خوشه را دادند.

مطابق با نتایج حاصل از ماتریس فاصله مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد، کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۳۸) بین ارقام 'فریبرز' و 'فرحناز' بود. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین ارقام 'اوران' و 'تابان۳' (۰/۹۱) مشاهده شد. دامنه فاصله ژنتیکی در بین ارقام با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب جاکارد، از ۰/۳۸ تا ۰/۹۱ متغیر بود (شکل ۲). نتایج مشابهی را (Chen *et al.*, 2013) نیز برای داوودی گزارش نمودند، به‌طوری‌که دامنه ضریب تشابه جاکارد در پژوهش آن‌ها بین ۰/۶۴ تا ۰/۸۹ بود. در پژوهشی دیگر دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۲۰رقم گل داوودی، در فاصله ۰/۶۱ ضریب تشابه، آن‌ها را در هفت خوشه اصلی قرار داد(Darabi, 2016). کم‌ترین میزان شباهت نشانه این است که این ارقام دارای اختلاف ژنتیکی زیادی می‌باشند، لذا می‌توان از آن‌ها در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری و اصلاح داوودی از طریق تولید هیبرید و به‌دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده کرد (Roein *et al.*, 2014).نتایج به‌دست آمده از دندروگرام تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، ارقام مورد مطالعه داوودی را به هفت گروه تقسیم کرد (شکل ۲). بر این اساس، گروه اول (I) متشکل از ۷ رقم به نام‌های 'تیهو'، 'افسانه ۲'، 'دریا ۲'، 'الیکا'،'مانی ۲'، 'گل‌گیس' و 'تناز' بود. گروه (II) بیش‌ترین تعداد رقم (۱۱ رقم) را به خود اختصاص داد. ارقام 'آوادیس'، 'تابان ۳'، 'اوران'، 'افشان'، 'پریدخت'، 'نوروز ۳'، 'بلور'، 'یاسمین'، 'ثنا'، 'دیلا' و 'شهین' بودند. گروه (III) شامل ۴ رقم 'شکرناز'، 'نادیا ۲'، 'کیمیا ۳' و 'گلنار' بود. دو رقم 'پارمیس' و 'تناز' به گروه چهارم (IV) تعلق داشتند. درحالی که سهم گروه پنجم (V) شامل سه رقم 'فریبا ۲'، 'نسترن' و 'نازگل' بود. رقم 'المیرا ۲' متمایز از سایر ارقام در کلاستر ششم (VI) به‌صورت جداگانه قرار گرفت. در نهایت گروه هفتم فقط ارقام 'فریبرز' و 'فرحناز'را در خود جای داد.



شکل ۲- دندروگرام ۳۰ رقم گل داوودی با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

منابع

Kumar, S., Prasad, K.V., Choudhary, M.L. 2006. Detection of genetic variability among Chrysanthemum radiomutants using RAPD markers. Curr. Sci. 90, 1108–1113.

Chen, X., M. Sun, J. Liang, H. Xue and Q. Zhang. 2013. Genetic diversity of species of chrysanthemum and related genera and groundcover cultivars assessed by amplified fragment length polymorphic markers. Hort. Sci. 48:539-546

Palai, S. and Rout, G.R. 2011. Characterization of new variety of Chrysanthemum by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira*,**29**: 613-617.

Roein, Z., Asil, M.H., Sabouri, A. and Dadras, A.R. 2014. Genetic structure of Chrysanthemum genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant systematics and evolution*,**300**: 493-503.

Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M. and Guo, H.P. 2010. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal Chrysanthemum morifolium based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*,**38**: 1160-1169.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 11-15.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. & Bandpang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. Euphytica, 142, 169-196.

Darabi, F.2016. Evaluation of Genetic Diversity among some of chrysanthemum cultivars using Morphological and SSR molecular markers.Lorestan University. Khorramabad.Iran.

Evaluation Of Genetic Diversity Of 30 Chrysanthemum (*Chrysanthemum Morifolium* Ramat.) Cultivars By ISSR Markers

Shirin Taghipour[1], AbdollahEhteshamnia[*2], Hamed Khodayari[3]
[*]Corresponding Author: ab.ehteshamnia@gmail.com

Abstract
The first step in breeding programs is the genetic diversity determination of modified materials. Investigating the genetic diversity of chrysanthemums for breeding programs and preservation of genetic resources is a vital issue, and knowing of the genetic variation level is of utmost importance at varieties of chrysanthemums for the parents in breeding programs. In this study, ISSR markers were used to investigate genetic diversity among 30 cultivars of chrysanthemums. Genomic DNA extraction was evaluated using the method of Murray & Thompson, and its quality and quantity were evaluated using 8% agarose gel electrophoresis. Then, the extracted DNA was amplified by 14 ISSR primers using the thermocycler. The results of the analysis showed that cluster analysis divided the cultivars in seven clusters, based on the traits they had. Jaccard's similarity coefficient matrix cultivars showed that the genetic distance of 0.91- 0.38 was variable.The less genetic distance 0.38 was observed among the cultivars of "Fariborz" and "Farahnaz" by a similarity of 0.38, and the highest genetic distance was observed among the cultivars of "Oran"' and "Taban3"' by a similarity of 0.91.
***Keywords*: ISSR marker, Genetic diversity,Chrysanthemum**