بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نر و ماده خرما در منطقه هرمزگان با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ملکولی

حامد حسن‌زاده خانکهدانی[*1] و عبدالنبی باقری[2]

[*1]محقق بخش تحقیقات زراعی و باغی و [2]عضو هیأت علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

[*]نویسنده مسئول: Hamed51h@gmail.com

چکیده

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* گیاهی تک‌لپه‌ای، دوپایه، گرمسیری و دارای عمر طولانی است که از اهمیت اقتصادی بالایی در کشور ایران برخوردار است. این تحقیق در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه ملکولی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نر و ماده خرمای منطقه هرمزگان به‌منظور شناسایی ارتباط خویشاوندی این ارقام با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ISSR انجام شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام و از ۱۲ آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری و با استفاده از رنگ فلورودای قابل رویت شد. الگوی باندی براساس حضور یا عدم حضور باند با اعداد یک و صفر نمره‌دهی شد و محتوای اطلاعات چندشکلی محاسبه شد که از ۰/۳۶۹۵ تا ۰/۴۹۹۸ با میانگین ۰/۴۴۹۷ متغیر بود. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به مکان ژنی $(CT)_{10}G$ معادل ۰/۴۹۹۸ بود. در مجموع ۱۱۲ آلل شناسایی شد. بر اساس صفات ریخت‌شناسی و همچنین نشانگرهای ملکولی، ارقام خرمای مورد بررسی به هشت گروه اصلی و زیرگروه‌های مختلف تقسیم شدند اما همبستگی معنی‌داری بین گروه‌بندی ریخت‌شناسی و ملکولی مشاهده نشد. نشانگرهای ISSR تا حد بسیار زیادی ارقام نر را از ارقام ماده تفکیک نمود اما در بررسی صفات ریخت‌شناسی تفکیک مشخصی بین ارقام نر و ماده مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: محتوای اطلاعات چندشکلی، نخل خرما، نشانگر، DNA، ISSR.

مقدمه

خرما یکی از محصولات عمده کشاورزی ایران و یکی از منابع مهم تحصیل ارز برای کشور است. تأثیر محصول خرما در وضعیت اقتصادی کشور مسئله‌ای قابل تعمق و پراهمیت است. یکی از معضلات باغداران در احداث نهالستان، نامشخص‌بودن اصالت ژنتیکی ارقام تحت کشت می‌باشد. اطلاع از تنوع ژرم‌پلاسم‌ها و روابط ژنتیکی میان ارقام در اصلاح خرما امری ضروری است. با توجه به دگرگشن‌بودن خرما و این‌که نوع گرده بر خصوصیات کمی و کیفی میوه و هسته اثر می‌گذارد، لذا انتخاب نوع گرده مناسب می‌تواند در تولید کمی و کیفی محصول خرما موثر باشد (رضازاده و همکاران، ۲۰۱۳). به‌نظر می‌رسد قرابت ژنتیکی بین نخل نر و ماده می‌تواند در بهبود این روند مفید باشد. به همین دلیل بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نر و ماده خرما در یک منطقه و پی‌بردن به قرابت ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در انتخاب نوع گرده برای هر رقم ماده، موثر باشد. در منطقه میناب ارقام نر و ماده زیادی وجود دارد که تنوع ریخت‌شناسی زیادی نشان می‌دهند. از طرفی چندین رقم نخل نر با کیفیت، طی چند سال گذشته از خارج از کشور وارد و در ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب کشت شده است که از مرغوبیت بالایی برخوردار بوده و در صورتی که بتوان قرابت ژنتیکی هر یک از این ارقام نر را با ارقام ماده تحت کشت در منطقه مشخص نمود، می‌توان با نتایج به دست آمده از این پژوهش، نوع گرده مناسب را برای هر رقم ماده تعیین نمود. تکنیک ISSR، یک روش مبتنی بر PCRاست که شامل تکثیر یک قطعه DNA حاضر در فاصله تکثیر میان دو ناحیه تکراری ریزماهواره منحصربه‌فرد با جهات مخالف می‌باشد. کریم و همکاران (۲۰۱۰) هفت آغازگر ISSR را برای بررسی ۱۰ رقم خرما در تونس به کار بردند. آن‌ها توصیه کردند از تعداد آغازگر بیشتری برای دستیابی بیشتر به تنوع بین این ارقام استفاده شود. بین نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی و صفات ریخت‌شناسی در نخل خرما اختلافات زیادی وجود دارد. عقیده بر آن است که نشانگرهای ISSR ساده، سریع و کم‌هزینه بوده و به دلیل طول آغازگر و دمای اتصال‌شان بسیار تکرارپذیر هستند (Gürcan *et al*., 2009). Marsafari

IrHC2019

و Ashraf-Mehrabi (۲۰۱۳) در بررسی تنوع ژنتیکی بین ۱۵ رقم خرما در جنوب و جنوب غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD دریافتند که این دو نشانگر قادر به بررسی رابطه بین ارقام خرما می‌باشند. پژوهش حاضر، با هدف تعیین ارتباط ژنتیکی بین ارقام نر و ماده خرمای تجاری موجود در استان هرمزگان انجام شد.

مواد و روش‌ها

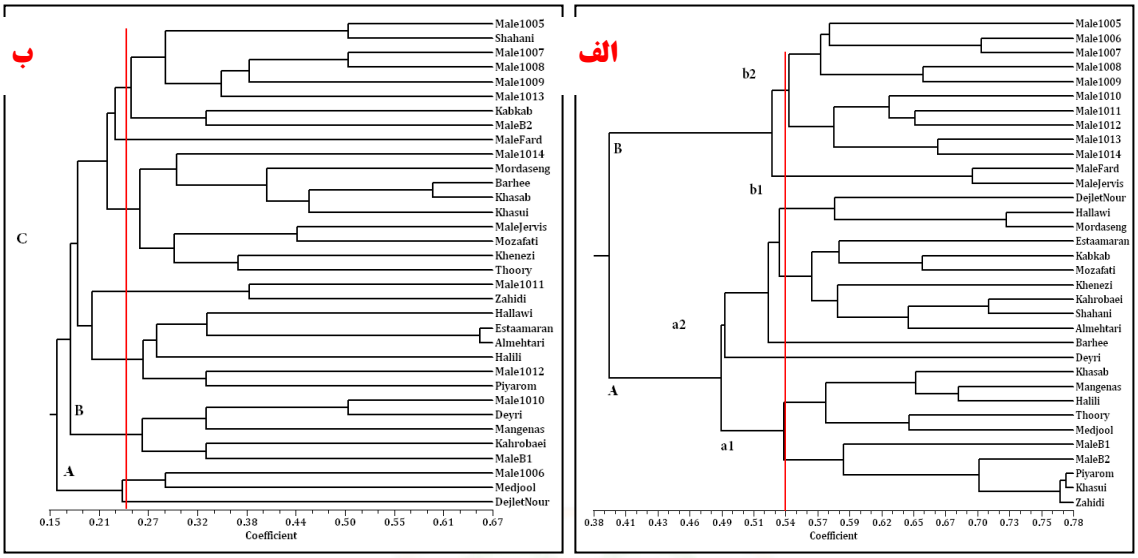
این پژوهش در آزمایشگاه مولکولی بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان در تابستان ۱۳۹۵ انجام شد. نمونه‌های گیاهی از ایستگاه‌های تحقیقات کشاورزی میناب و حاجی‌آباد تهیه شد. نمونه‌ها از برگ‌های ابتدایی هنوز بازنشده که تقریباً فاقد کلروفیل بودند، انتخاب شدند. یادداشت‌برداری از صفات ریخت‌شناسی بر اساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در خرما (مرعشی، ۱۳۸۵) و از تعداد پنج اصله نخل هم سن انجام شد. استخراج DNA به روش Murray و Thompson (۱۹۸۰) با مقداری تغییرات انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر ISSR از ۱۲ آغازگر با شرایط تکثیر شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای هر آغازگر به‌مدت ۴۵ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۷ دقیقه توسعه نهایی انجام شد. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز افقی استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل، باندها در زیر نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داک مشاهده و عکس‌برداری شد. برای امتیازدهی باندها، باندهای چندشکل حاصل، با روش صفر و یک امتیازدهی شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده، از نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 استفاده شد. محتوای اطلاعات چندشکلی، از رابطه $PIC = 1- p_i^2-q_i^2$ استفاده شد. در این رابطه p_i برابر نسبت فراوانی وجود باند به تعداد کل باندها در هر آغازگر و q_i برابر نسبت فراوانی عدم وجود باند به تعداد کل باندها در هر آغازگر است. برای استفاده از داده‌های ریخت‌شناسی برای خوشه‌بندی ارقام، این اعداد به صفر و یک تبدیل و با نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 خوشه‌بندی ارقام انجام شد. برای بررسی همبستگی بین صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی، ضرایب تشابه حاصل در هر دو نشانگر، در نرم‌افزار SPSS 16.0 وارد و همبستگی بین آن‌ها محاسبه شد.

نتایج و بحث

گروه‌بندی ارقام نر و ماده خرما براساس صفات ریخت‌شناسی

داده‌های حاصل از ثبت صفات ریخت‌شناسی براساس توصیف‌نامه خرما، گروه‌بندی و به صورت صفر و یک امتیازبندی شد. براساس ضریب همبستگی ضرایب کوفنتیک و ضرایب تشابه با سه روش دایس، جاکارد و تطابق ساده، بیشترین همبستگی در استفاده از روش جاکارد (۰/۶۴۷) مشاهده شد. بنابراین کلاستر مربوطه با استفاده از ضریب جاکارد رسم شد. از مهم‌ترین صفات ریخت‌شناسی مورد بررسی می توان به رشد طولی سالیانه نخل؛ محیط تنه؛ طول و عرض پهنک برگ و نسبت آن‌ها به هم؛ طول طول قسمت خاردار برگ و طول برگ و نسبت آن‌ها به هم؛ طول، عرض و نسبت طول به عرض برگچه میانی؛ متوسط طول خار؛ تعداد خار و برگچه و نسبت تعداد آن‌ها به هم؛ محیط انتهای محور برگ، طول اسپات نر و ماده و رنگ گل‌آذین؛ و صفات مربوط به میوه شامل طول، قطر و وزن میوه و هسته اشاره نمود. گروه‌بندی ارقام نر و ماده خرما براساس صفات ریخت‌شناسی به‌صورت دندروگرام (شکل 1A) نمایش داده شده است. به‌طور کلی ارقام نر و ماده در سه گروه A شامل دجله‌نور، مجول و نر ۱۰۰۶؛ B شامل نر بی‌نام ۱، کهربایی، منگناس، دیری و نر ۱۰۱۰ و C شامل بقیه ارقام نر و ماده قرار گرفتند. بر اساس رفرنس لاین، ارقام نر و ماده به هشت گروه اصلی و زیرگروه‌های مختلف تقسیم شدند. در بررسی ضرایب تشابه بین ارقام نر و ماده بر اساس صفات ریخت‌شناسی، بیشترین ضریب تشابه بین دو رقم آل‌مهتری و استعمران (۰/۶۶) مشاهده شد. در رتبه بعد رقم خصب و برحی (۰/۶۰) قرار داشتند. ارقام شاهانی و نر ۱۰۰۵، نر ۱۰۰۷ و نر ۱۰۰۸ و رقم دیری و نر ۱۰۱۰ با ضریب تشابه دو به دوی ۰/۵۰ در رتبه سوم قرار داشتند. کمترین ضریب تشابه بین رقم نر ۱۰۰۶، دجلتنور و مجول با بقیه ارقام نر و ماده (۰/۱۶) مشاهده شد (شکل 1A).

IrHC2019



شکل ۱- گروه‌بندی ارقام نر و ماده خرما براساس صفات ریخت‌شناسی (الف) و نشانگرهای ISSR (ب)

نتایج تجزیه ISSR

داده‌های حاصل از باندهای تفکیک‌شده در الکتروفورز به صورت صفر و یک امتیازبندی شد. از مجموع ۱۲ آغازگر ISSR مورد استفاده، هفت آغازگر باندهای چندشکل تولید کردند. از این تعداد آغازگر مجموعاً ۱۱۲ باند تولید شد که میانگین باند تولیدی در هر آغازگر ۱۶ باند بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در بین هفت آغازگر، برابر ۰/۴۴۹۷ بود (جدول ۱). براساس ضریب همبستگی ضرایب کوفنتیک و ضرایب تشابه با سه روش دایس (۰/۸۳)، جاکارد (۰/۸۴) و تطابق ساده (۰/۸۵)، بیشترین همبستگی در استفاده از روش تطابق ساده مشاهده شد. اما با توجه به این که دامنه ضرایب تشابه به دست آمده از طریق ضریب جاکارد گسترده‌تر از دو ضریب دیگر بود و تنوع بیشتری نشان داد و همچنین اختلاف کمی بین ضرایب کوفنتیک وجود داشت، بنابراین کلاستر مربوطه با استفاده از ضریب جاکارد رسم شد. به‌طور کلی، براساس دندروگرام حاصل از تجزیه داده‌های ISSR، ارقام نر ۱۰۰۵ تا ۱۰۱۴ و فرد نر و جرویس در یک گروه (B) و همه ارقام ماده و دو رقم نر بی‌نام ۱ و ۲ در یک گروه (A) قرار گرفتند. براساس رفرنس لاین ارقام نر و ماده خرما به هشت گروه اصلی و زیرگروه‌های مختلف تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱B). در بررسی ضرایب تشابه بین ارقام نر و ماده بر اساس داده‌های ISSR، بیشترین ضریب تشابه بین سه رقم پیارم، خاصویی و زاهدی (۰/۷۷) مشاهده شد. در رتبه بعد رقم مرداسنگ و حلاوی (۰/۷۲) قرار داشتند. ارقام شاهانی و کهربایی با ضریب تشابه ۰/۷۱ در رتبه سوم قرار داشتند. ارقام نر ۱۰۰۶ و ۱۰۰۷، ارقام نر جرویس و فرد نر و نیز نر بی‌نام ۲ با سه رقم پیارم، خاصویی و زاهدی با ضریب تشابه ۰/۷۰ رده‌های بعد قرار داشتند. کمترین ضریب تشابه بین ارقام نر ۱۰۰۶ تا ۱۰۱۴ با همه ارقام ماده و نیز دو رقم نر بی‌نام ۱ و ۲ (۰/۳۹) مشاهده شد (شکل ۱B).

IrHC2019

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه ISSR ژنوتیپ‌های نر و ماده خرما

کد آغازگر	توالی (5′--->3′)	دمای اتصال (°C)	تعداد کل باند	تعداد باند چندشکل	طول باندهای تکثیرشده (bp)	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
DP1	$(AGG)_6$	55	–	–	–	–	–	–
DP2	$(AG)_{10}G$	60	–	–	–	–	–	–
DP3	$(AG)_{10}C$	60	۱۸	۱۸	۴۵۰-۳۲۰۰	۱۰۰	۰/۴۲۲۴	۷/۶۰۳
DP4	$(AG)_{10}T$	57	۱۳	۱۲	۵۰۰-۳۲۰۰	۹۲	۰/۳۹۳۵	۴/۷۲۲
DP5	$(CT)_{10}A$	57	–	–	–	–	–	–
DP6	$(CT)_{10}G$	60	۱۶	۱۵	۲۰۰-۳۰۰۰	۹۴	۰/۴۹۹۸	۷/۴۹۷
DP7	$(CT)_{10}T$	57	–	–	–	–	–	–
DP8	$(ACTG)_4$	45	۱۷	۱۴	۳۵۰-۳۱۰۰	۸۲	۰/۴۸۷۹	۶/۸۳۱
DP9	$(GACAC)_4$	55	۱۹	۱۹	۱۰۰-۲۶۰۰	۱۰۰	۰/۳۶۹۵	۷/۰۲۰
DP10	$(TGGA)_5$	55	۱۴	۱۴	۳۰۰-۲۵۰۰	۱۰۰	۰/۴۹۹۷	۶/۹۹۶
DP11	$(GACA)_4$	45	۱۵	۱۵	۴۰۰-۲۷۰۰	۱۰۰	۰/۴۷۵۰	۷/۱۲۵
DP12	$(AG)_{10}$	55	–	–	–	–	–	–
جمع		۱۱۲		۱۰۷	–	–	–	–
میانگین		۱۶		۱۵/۳	–	۹۵/۴	۰/۴۴۹۷	۶/۸۲۸

بحث

براساس منابع، تعداد زیادی آغازگر ISSR برای ژنوتیپ‌های نخل خرما (Zehdi *et al*., 2002; Mitra *et al*., 2011) مورد استفاده قرار گرفته است. در یک تحقیق از هفت آغازگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام خرما، مجموعاً ۳۴ باند تکثیر شد که متوسط تعداد باند در هر آغازگر ۶/۱۴ بود (Hamza *et al*., 2012). این تعداد باند در مقایسه با تحقیقات دیگران (Zehdi *et al*., 2002; Mitra *et al*., 2011) و نیز با نتایج تحقیق حاضر بسیار کمتر است. در تحقیق حاضر مجموعاً ۱۱۲ باند از هفت آغازگر با میانگین ۱۶ باند در هر آغازگر تولید شد. در پژوهش حاضر همبستگی بین نتایج تجزیه ریخت‌شناسی و ISSR غیرمعنی‌دار بود (r=۰/۰۲۵). مطالعات مولکولی کارایی نشانگرهای مولکولی را در بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های نخل خرما به اثبات رسانده است. با این حال، مطالعات محدودی، همبستگی بین نشانگرهای مولکولی و فنوتیپی را نشان داده‌اند (Hamza *et al*., 2012). Arabnezhad و همکاران (۲۰۱۲) ارقام مختلف نر و ماده خرما با سه منشأ ایران، عراق و آفریقا را با استفاده از نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار داده و دریافتند ارقام براساس منطقه جغرافیایی گروه‌بندی شدند. آن‌ها شباهت زیادی بین سه رقم مجول، دجلت‌نور و توری که از آفریقا بودند مشاهده کردند. مشابهاً در تحقیق حاضر ارتباط نزدیکی بین مجول و توری مشاهده شد. براساس نتایج پژوهش حاضر، مشخص شد که رقمی از خرما که در سالهای قبل با عنوان استعمران در کلکسیون ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب کشت شده است، ژنوتیپی شبیه به آل‌مهتری با تفاوتهای بسیار جزئی بوده است. بر اساس صفات ریخت‌شناسی و همچنین نشانگرهای ملکولی، ارقام خرمای مورد بررسی به هشت گروه اصلی و زیرگروه‌های مختلف تقسیم شدند اما همبستگی معنی‌داری بین گروه‌بندی ریخت‌شناسی و ملکولی مشاهده نشد. نشانگرهای ISSR تا حد بسیار زیادی ارقام نر را از ارقام ماده تفکیک نمود اما در بررسی صفات ریخت‌شناسی تفکیک مشخصی بین ارقام نر و ماده مشاهده نشد.

IrHC2019

منابع

مرعشی، س.س. ۱۳۸۵. دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در خرما. موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال. ۴۱ صفحه.

Arabnezhad, H., Bahar, M., Mohammadia, H.R. and Latifianb, M. 2012. Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae, 134: 150-156.

Gürcan, K., Mehlenbacher, S.A. and Cristofori, V. 2009. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in hazelnut. Acta Horticulture (ISHS), 845: 159-162.

Hamza, H., Benabderrahim, M.A., Elbekkay, M., Ferdaous, G., Triki, T. and Ferchichi, A. 2012. Investigation of genetic variation in Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR marker systems and their relation with fruit characteristics. Turkish Journal of Biology, 36: 449-458.

Karim, K., Chokri, B., Amel, S., Wafa, H., Richid, H. and Nouredine, D. 2010. Genetic diversity of Tunisian date palm germplasm using ISSR Markers. International Journal of Botany, 6(2): 182-186.

Marsafari, M. and Ashraf-Mehrabi, A. 2013. Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR and RAPD markers. Australian Journal of crop Science, 7(8): 1160-1166.

Mitram C., Kharb, P. and Uppal, S. 2011. Genetic diversity analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.): a comparative assessment using ISSR and RAPD marker assays. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 86: 398-402.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.

Rezazadeh, R., Hassanzadeh, H., Hosseini, Y., Karami, Y. and Williams, R.R. 2013. Influence of pollen source on fruit production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Barhi in humid coastal regions of southern Iran. Scientia Horticulturae, 160: 182-188.

Zehdi, S., Trifi, M. and Ould Mohamed Salem, A. 2002. Survey of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.). Journal of Genetic and Breeding 56: 77-83.

Genetic diversity of male and female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Hormozgan province using morphological and molecular markers

Hamed Hassanzadeh Khankahdani[1]* and Abdoolnabi Bagheri[2]
[1]Horticulture Crop and [2]Plant Protection Research Departments, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran
[*]*Corresponding Author: Hamed51h@gmail.com*

Abstract

Date palm (*Phoenix dactylifera*) is a monocot, dioecious and tropical plant and it has longevity, which it has high economic importance in Iran. This study was conducted in order to recognize relationship among date palm cultivars using ISSR and morphological markers to evaluate genetic diversity of male and female cultivars of date palm in Hormozgan province, in laboratory of Agricultural and Natural Research and Education Center of Hormozgan in 2016. DNA was extracted using CTAB method and it was used 12 ISSR primers. PCR product was separated using Agarose gel 1.5% and it became visible by staining using floru Dye. Banding pattern was scored based on presence or non-presence of band with 0 and 1 and PIC was estimated in which it varied from 0.3695 to 0.4998 with average 0.4497. The highest PIC value was relative to $(CT)_{10}G$ primer (0.4498). Totally, 112 alleles were recognized. According to dendrogram, the 34 studied cultivars placed in eight main groups and different sub-groups. ISSR markers almost separated male cultivars from female cultivars, but it was not observed distinct separation between male and female cultivars using morphological attributes.

***Keywords*:** Date palm, DNA, ISSR, Marker, PIC.

IrHC2019