بررسی تنوع ژنتیکی بنفشه های معطرایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

نرجس اسدی [1]، علیرضا بابایی [2*]، معصومه حسنی [1]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. 2- استادیارگروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

نویسنده مسئول: دکترعلیرضا بابائیarbabaei@modares.ac.ir

چکیده

در این مطالعه از نشانگرهایISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی و قرابت 41 نمونه بنفشه معطر ایرانی استفاده شد. تعداد 10 آغازگر 0تصادفی روی نمونه هایDNA استخراج شده از برگ مورد آزمون قرار گرفتند که تعداد 6 آغازگر بین ژنوتیپ ها چند شکلی مطلوب نشان دادند. در مجموع 105 باند در کل ژنوتیپ ها تکثیرشد که از بین آنها 65 باند چند شکل بودند. تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت. در ضریب تشابه0,12 ژنوتیپ ها در دو گروه مجزا و در تجزیه خوشه ای در ضریب تشابه0,34 ژنوتیپ ها درهشت گروه قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: بنفشه های معطر ایرانی ، تنوع ژنتیکی، نشانگرISSR ، تجزیه خوشه ای

مقدمه

تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب در صفت مورد بررسی می‌باشد. مطالعات تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی از جنبه‌های مختلف قابل بررسی می‌باشد.از میان این مطالعات شناسایی ذخایر ژنتیکی گیاهی به منظور ثبت و صیانت از ذخایر توارثی ملی، حفظ ذخایر ژنتیکی در برابر عوامل تهدید کننده و همچنین استفاده از مزیت‌های تنوع گیاهی در قالب فر آیندهای اصلاحی دارای اهمیت بالایی می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی دربین گونه‌های گیاهی اطلاعات ارزشمندی را در زمینه مسیر تکاملی گیاهان حاصل نموده و از نظر اتخاذ استراتژی‌های مناسب در راستای اهداف اشاره شده از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد، چراکه بسیاری از مفاهیم در زمینه شناسایی، حفظ و کاربرد ذخایر ژنتیکی تنها با مطالعات ژنتیک جمعیت امکان‌پذیر است. بنفشه معطر (Ever Green sweet violet) بانام علمیViola oderata از خانواده Violaceae است. در خانواده ویولاسه جنس ویولا بزرگترین جنس بوده که نزدیک به 525 تا 600 گونه را شامل می‌شود که در تمام بخش‌های جهان شیوع دارد.

تحقیقات جدید نشان داده که این گیاهان بومی نیمکره شمالی هستند (Ballard et al. 1999; Yockteng et al. 2003)توماس مارکوسسن و لیو بورگن(Marcussen and Borgen, 2011) گونه‌های موجود بنفشه‌های منطقه قفقاز و آذربایجان و اطراف دریاچه کاسپین (خزر) را با توجه به آزمایشات آلوزایمیک و مورفولوژیکی و سطح پلوییدی مورد بررسی قرار دادند و براساس اطلاعات آلوزایمیک ، سطح پلوییدی و ویژگیهای مورفولوژیکی پیشنهاد کردندکه Viola sieheanaدر منطقه قفقاز متعلق به گونه جداگانه V. caspia هستند. در این تحقیق ویژگی‌های موفولوژیکی این دوگونه مورد بحث قرار گرفته و مشخص شده که مهمترین مناطق شیوع گونه V. Sieheanal شرق بالکان، ترکیه، قبرس و لبنان است وبرای V. caspia مناطق غربی دریاچه کاسپین و شمال شرقی ترکیه است. هیرونوری تویاما و تتساکازا یاهارا (Toyama andYahara ,2009) تنوع ژنتیکی بین دوگونه Viola eizanensis و Viola chaerophylloides var sieboldiana بومی ژاپن را با نشانگر AFLP مورد بررسی قرار دادند.

مواد و روشها

در این تحقیق از42 ژنوتیپ گیاهی بنفشه های معطر در ایران که ازاستانهای شمالی کشور؛گیلان،مازندران وگلستان جمع آوری شده بودند، استفاده شد.DNA ژنومی نمونه برگهای تثبیت شده در ازت مایع به روش(CTAB) با اندکی تغییرات استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورزDNA در ژل آگارز 1% درصد تعیین گردید.

دراین تحقیق از 10 آغازگر ISSR استفاده شد که ازاین تعداد 6آغازگرتکثیر مناسب قطعات داشتند وبرای آزمایشات مفید واقع شدند. تکثیرقطعات DNA باواکنش PCR درحجم 25 میکرولیتر(شامل5 میکرولیترازDNA با غلظت 10 نانوگرم در میکرولیتر ، 2,5میکرولیتر بافرPCR ، 1,5میکرولیتر کلرید منیزیم ، 15میکرولیتر مخلوط نوکلئوتید (dNTPs) ، 2میکرولیترازآغازگر و 0,2 میکرولیترآنزیم Taq DNA polymerase که با آب دو بار تقطیر استریل به حجم 25 رسانده شده بود) انجام شد. واکنش PCR دردستگاه ترموسایکلر اپندورف با برنامه حرارتی شامل، واسرشته سازی اولیه به مدت 5دقیقه دردمای 94درجه سانتی گراد، درادامه 37چرخه بصورت واسرشته سازی به مدت 1دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد،اتصال آغازگربه مدت 1دقیقه دردمای مناسب اتصال برای هر آغازگرومرحله توسعه رشته جدید به مدت 2دقیقه در دمای 72درجه سانتی گرادودرنهایت توسعه نهایی به مدت 5دقیقه در دمای 72درجه سانتی گراد صورت گرفت.

محصول تکثیر حاصل PCRبرروی ژل آگارز2% ران شده ، ژل بدست آمده در دستگاه ژل داک عکسبرداری شده وامتیازدهی به صورت صفر ویک برای هر آغازگر انجام شد. نتایج بدست آمده وارد نرم افزارExcle شدوبرای انجام آنالیز به نرم افزارNTsys منتقل شد.ماتریس تشابه ژنوتیپ ها توسط این نرم افزار و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد و تجزیه خوشه ای با استفاده از روش UPGMAانجام شد.

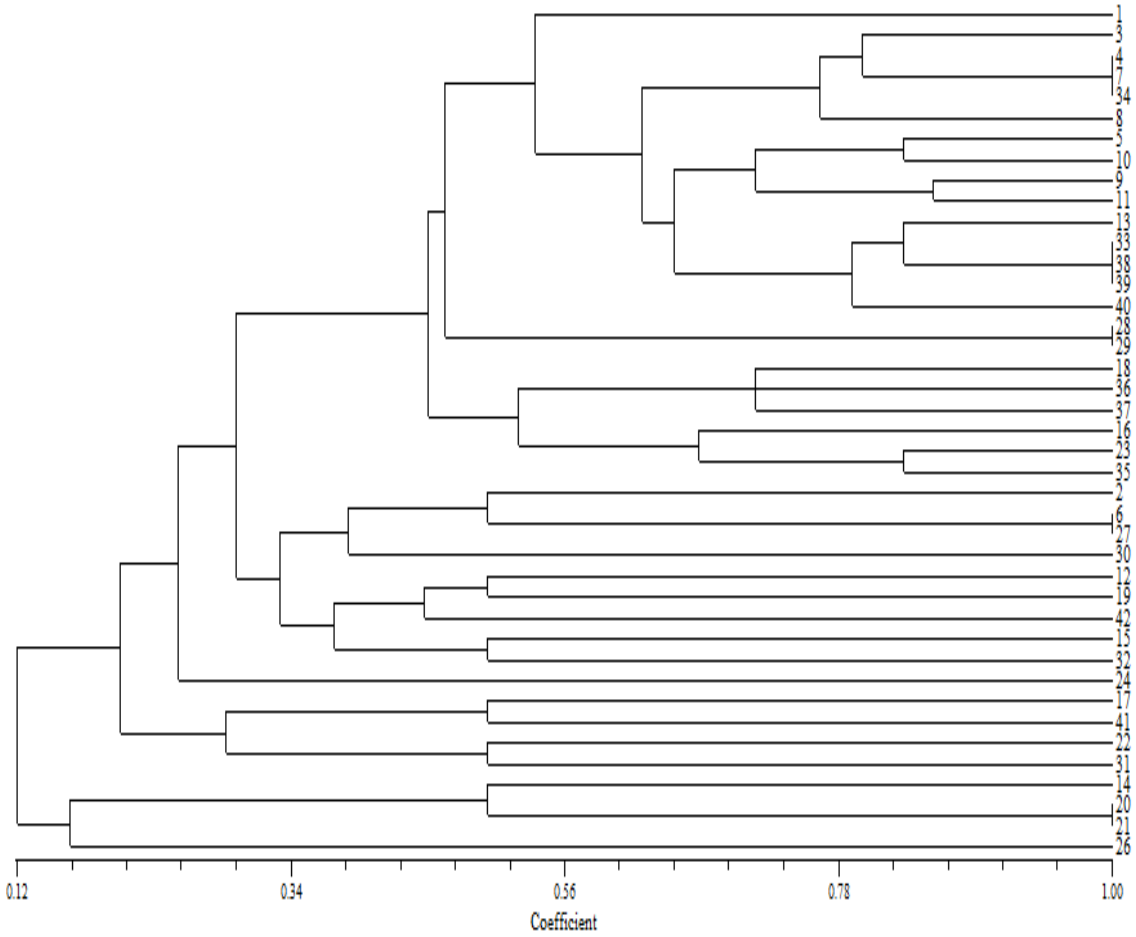
نتایج

از بین 10 آغازگر مورد استفاده در این آزمایش6آغازگر آن دارای باند های چند شکل بوده است. در مجموع 105 باند در کل ژنوتیپ ها تکثیرشد که از بین آنها 65 باند چند شکل بودند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای در شکل 1مشاهده می شود.

در ضریب تشابه 0,12 بنفشه ها در قرار گرفتند که 38 ژنوتیپ از 41 ژنوتیپ در گروه اول قرار گرفتند.در ضریب تشابه0,34 بنفشه ها در 8گروه قرار گرفتندکه باز هم بیشتر توده ها(23 ژنوتیپ از 41 ژنوتیپ) در گروه اول قرار گرفتند.

بعضی از جمعیت ها ژنوتیپ کاملا مشابه داشتند که شامل جمعیت های بنفشه جمع آوری شده از مناطق: (رشت38، فومن33 ولنگرود39) ؛ (گرگان4، کردکوی5وبهشهر34) ؛ (رامسر28وچالوس29) ؛ (گلوگاه6وتنکابن27) ؛ (سوادکوه20و بابلکنار21) می باشد.

شکل 1: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روشUPGMA



به نظر می رسد بین فاصله مکانی رویش توده ها رابطه نزدیکی وجود دارد ،بدین معنی که گیاهانی که در فاصله مکانی نزدیک به هم رشد کرده اند دارای تنوع ژنتیکی یکسانی هستند.

منابع

Marcussen ,T., Borgen ,L.(2011). Species delimitation in the Ponto-Caucasian Viola sieheana complex, based on evidence from allozymes, morphology, ploidy levels, and crossing experiments. Plant Syst Evol 291,183–196.

Ballard HE, J.r., Sytsma, K.J., Kowal ,R.R. (1999) .Shrinking the violets: phylogenetic relationships ofinfrageneric groups in Viola (Violaceae) based on internal transcribed spacer DNA sequences. Syst Bot23:439–458

Toyama.H, Yahara.T.(2009). Comparative phylogeography of two closely related Viola species occurring in contrasting habitats in the Japanese archipelago. J Plant Res 122,389–401.

genetic diversity in iranian viola(Viola oderata) by using ISSR markers

N. asadi1 , A. Babai1and M. hasani1
1-Departmentof Horticultural Sciences, University of Tarbiat Modares

Abstract
ISSR markers were used to determine the genetic diversity level and phylogenetic relationships among 41 genotypes of Viola odorata included wild cultivar iris. In this study 10 random primers were used for PCR reaction on the template DNAs extracted from leaves, which 6 showed good amplification and polymorphism. Totally, 105 bands were produced, and 65 bands were polymorphic. Cluster analysis of the genotypes was performed using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method. In similarity measure of 0.12 on the denrogram, the 41genotypes of Viola odorata were divided into two groups and Eight groups in similarity measure of 0.34.

Keywords: Viola odorata, ISSR markers , cluster analysis, genetic diversity.