بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انجیر (.Ficus carica L) استان فارس به کمک خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی RAPD

غزال بازیار1،علیرضا شهسوار2*،مسلم جعفری3

1-دانشجوی پیشین کارشناس ارشد باغبانی دانشگاه شیراز.2-استادیار بخش باغبانی دانشگاه شیراز.3-کارشناس ارشد باغبانی ایستگاه تحقیقات انجیر استهبان.

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی 21 رقم انجیر از استان فارس مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی و تعیین روابط فیلوژنتیکی نمونه ها از تکنیک DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) استفاده شد. به این منظور DNA نمونه ها در واکنش PCR با استفاده از 16 آغازگر RAPD افزایش یافت. در کل 229 نوار به دست آمد که تعداد 170 نوار آن چند شکل بود (74%). بعد از محاسبه ضریب تشابه جاکارد، دندروگرام به روش UPGMA رسم شد. بر اساس این روش، 21 نمونه مورد آزمایش در 5 گروه اصلی دسته بندی شدند: (E1 و E2)، (E16)، (K1، J1، J2، E3، E4، E6، E9، E10، E11، E12، E13 ،E14 و E15)، (K2 و K3) و (E5 و E8). تعدادی از نمونه ها تشابه ژنتیکی بالایی نشان دادند (84% بین شاه انجیر مروارید و شاه انجیر) و تعدادی دیگر کمتر به دیگر نمونه ها شباهت داشتند (رقم اتابکی با ضریب تشابه 62%). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در ژرم پلاسم ارقام خوراکی انجیر استان فارس می باشد که با حفاظت از این منبع ژرم پلاسم غنی می توان از آن در اجرای برنامه های بهنژادی بهره برد.

کلمات کلیدی:انجیر خوراکی، مارکر DNA، RAPD، فارس.

مقدمه

انجیر یکی از مهمترین میوه ها در پاره ای از کشورهای جهان به ویژه کشورهای حوزه دریای مدیترانه، دریای سرخ و خلیج فارس بشمار می رود، انجیر از تنوع زیادی برخوردار است بخصوص در استان فارس با سطح کشتی حدود 40000 هکتار این تنوع بیشتر محسوس است .تا به حال از روش های گوناگونی برای شناسایی، بررسی گوناگونی ژنتیکی وتعیین روابط تکاملی ارقام انجیر استفاده شده است که اغلب آنها بر پایه استفاده از نشانگرها[1] می‌باشند. نشانگرهایی مانند RFLP (خداری و همکاران، 2005)، RAPD (سادر و آتیه، 2006)، SSRها (سدود و همکاران، 2011) و AFLP (باراکت و همکاران، 2011) و نشانگرهای مورفولوژیکی (جعفری و همکاران، 1391). RAPD یک نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR است. در این تکنیک از تک آغازگرهایی به طول هشت تا ده نوکلئوتید که ردیف بازی آنها به طور قراردادی تعیین می‌گردد، استفاده می شود تا مجموعه ای از قطعات DNA توزیع شده در سراسر ژنوم را به طور تصادفی تکثیر نماید.

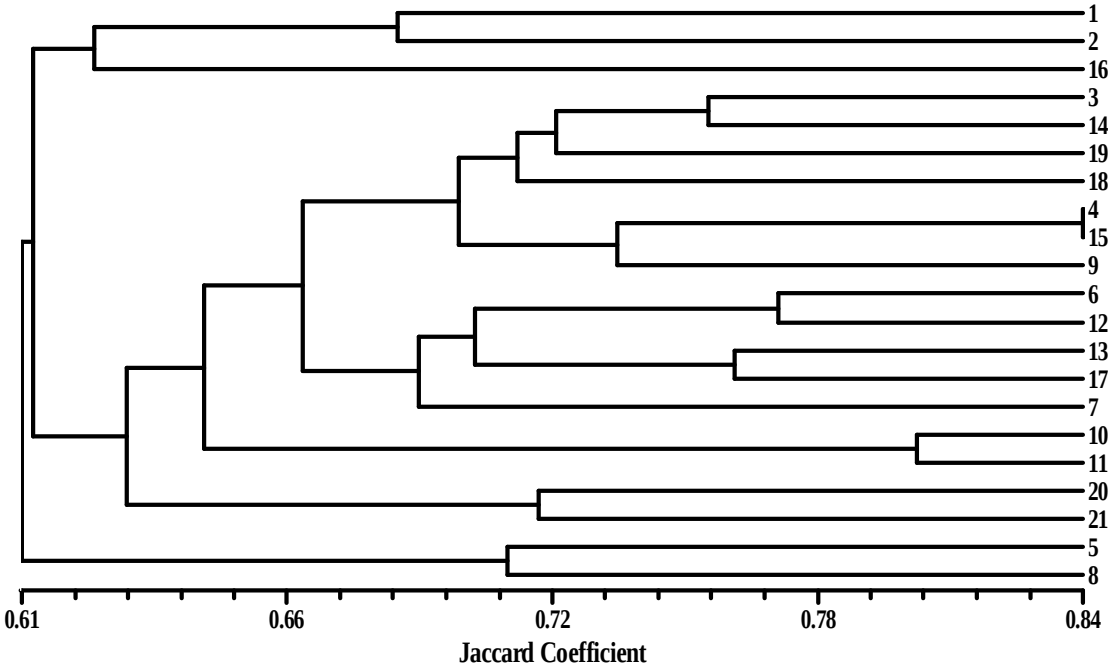
مواد و روش ها

در این پژوهش 21 ژنوتیپ انجیر مورد آزمایش قرار گرفتند. این نمونه ها همگی از نوع انجیرهای خوراکی هستند و از لحاظ مورفولوژیکی شباهت هایی با یکدیگر نشان می دهند. برگهای جوان هریک از نمونه ها جمع آوری گردید و ÷س از شستشو و خشک شدن با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شده و در فریز 80- نگهداری گردیدند . جهت استخراج DNA از کیت استخراج شرکت QIAGENاستفاده گردید. پس از بررسی های نهایی از 24 آغازگر اولیه، شانزده آغازگر RAPD (جدول1) برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفتند. برای افزایش DNA از دستگاه ترموسایکلر با برنامه زیر استفاده

[1] Markers

گردید. برای جداسازی محصول PCR از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز 2 درصد استفاده گردید. جهت تشخیص نوارها روش رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن ماتریس تشابه بر اساس ضریب جاکارد تشکیل و دندروگرام بر اساس این ضریب به روش UPGMA و به کمک نرم افزار NTSYS (ویرایش 2/02) رسم شد.

نتایج و بحث:از 16 آغازگر به کار رفته با 21 نمونه DNA، در مجموع 229 قطعه به دست آمد. 74/23% از قطعه های به دست آمده چند شکل بودند. تعداد کل قطعه ها از 22 قطعه مربوط به آغازگر OPH19 تا 9 قطعه مربوط به آغازگر OPY15 متغیر بود. بیشترین میزان چند شکلی با آغازگر OPH19 و کمترین آن با آغازگر OPY15 ایجاد شد. در مقایسه با دیگر پژوهش‌های انجام شده به وسیله نشانگرهای RAPD بر روی ارقام انجیر کشورهای مختلف، که میزان چند شکلی در آنها بین 81-39% متغیر است، نتایج به دست آمده از این پژوهش یکی از بیشترین مقادیر چندشکلی را در میان ارقام انجیر نشان می‌دهد. این نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در ژرم‌پلاسم ارقام خوراکی انجیر استان فارس می‌باشد. بر اساس دندروگرام(شکل 1)، 21 نمونه مورد آزمایش به پنج گروه اصلی طبقه بندی شدند. در گروه اول 2 ژنوتیپ روغنی و کله گربه ای از منطقه آبسرد جهرم قرار گرفته‌اند. گروه دوم تنها شامل رقم اتابکی از منطقه مروارید داراب است. گروه سوم، گروهی بزرگ متشکل از دو زیر گروه است. زیر گروه اول شامل تعدادی از ژنوتیپ های استهبان، مروارید داراب، کازرون و آبسرد جهرم می‌باشد. در این زیر گروه، ارقام پیوس سیاه، سیاه، پیوس، کنیزک، شاه انجیر مروارید، شاه انجیر، متی، سبز مروارید، رونو، سبز و سفید قرار دارند. رقم شاه انجیر مروارید و شاه انجیر با ضریب تشابه 84% بیشترین تشابه را در میان ارقام این گروه نشان می دهند. زیر گروه دوم متشکل از دو ژنوتیپ کشکی و چرمی می‌باشد که هر دو متعلق به استهبان هستند. گروه چهارم گروه کوچکی متشکل از دو ژنوتیپ غنی و ممبیلی متعلق به کازرون است.



شکل1- گروه بندی 21 ژنوتیپ انجیر خوراکی با استفاده از نشانگرهای RAPD به روش UPGMA.

گروه پنجم شامل دو رقم سی‌گوتو از نورآباد و برگ چناری از استهبان می‌باشد. این دو ژنوتیپ با ضریب تشابه 71% از لحاظ ژنتیکی به یکدیگر شباهت دارند ولی با ضریب تشابه 61% بطور کامل از سایر گروه‌ها جدا می‌شوند. بطور کلی نتایج بدست آمده از این پژوهش، نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا میان ارقام انجیر استان فارس می‌باشد.

جدول 1- آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

نام آغازگر	توالی	نام آغازگر	توالی
OPA02	TGCCGAGCTG	OPO3	CTGTTGCTAC
OPA05	AGGGGTCTTG	OPO13	GACAGGAGGT
OPA16	AGCCAGCGAA	OPX11	GGAGCCTCAG
OPC17	TTCCCCCCAG	OPY04	GGTCGCAATG
OPH14	ACCAGGTTGG	OPY07	AGAGCCGTCA
OPH18	GAATCGGCCA	OPY11	AGACGATGGG
OPH19	CTGACCAGCC	OPY13	CACCACCACC
OPK17	CCCAGCTGTG	OPY 15	AGTCGCCCTT

منابع

نقوی، م. ب. قره یاضی و ق. حسینی سالکده. 1388. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. 340 ص.

جعفری، م. ی.دهقان شورکی و ض. طباطبایی. 1391.شناسایی وثبت تعدادی از ارقام انجیر با استفاده خصوصیات مورفولوزیک. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.69 ص.

Baraket, G.H., K.H.Chatti, O. Saddoud. 2011. Comparativeassessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of fig, Ficus carica L., genetic resources in Tunisia. Plant Molecular Biology Reporter 29: 171-184

Chawla, H.S. 2004. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. Enfield, NH, USA. 368 p.

Khadari, B., C. Grout, S. Santoni, F. Kjellberg. 2005. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean population of Ficus carica L.: A study using mtDNA RFLP. Genetic Resources and Crop Evaluation. 52: 97-109

Sadder, M.T., A.F. Ateyyeh. 2006. Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (Ficus carica L.). Scientia Horticulturae 107: 347-351

Saddoud. O., G.H. Baraket, K.H. Chatti. 2011. Using morphological characters and Simple Sequence Repeat (SSR) markers to characterize Tunisian fig (Ficus Carica L.) cultivars. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 53: 7-14.

Evaluation of genetic variability of fig (Ficus carica) in the Fars Province by morphological traits and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers

Gh. Bazyar1, A.R. Shahsavar1*, M. Jafari2

1- Dept. of Horticultural Sciences, Shiraz University of Shiraz- Iran. 2- Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Estahban Fig Research Station

Abstract

This research was conducted to assess polymorphism among genotypes of edible fig available in Fars province. Leaf samples were collected in spring for DNA isolation from 21 different genotypes. The genotypes were assessed using the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Sixteen of the 24 screened primers showed reproducible polymorphic profiles. Out of 229 amplified bands, 170 were polymorphic (74%). After

determining Jaccard similarity index, some genotypes showed high genetic similarity (84% between E4 and E15), while other were less similar (62% between E16 and all other genotypes). Furthermore, bootstraps were incorporated to construct trees using UPGMA technique. The genotypes were clustered into five major clades: (E1, E2), (K1, J1, J2, E3, E4, E6, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15), (K2, K3), (E5, E8) and (E16). The analyzed data illustrates a good variability in the genetic pool of the edible fig in Fars Province making it a valuable source for incorporation into potential breeding programs for the region.
Keywords: Edible fig; DNA markers; RAPD; Fars