بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام چمانواش بلند با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD

مصطفی خوشحال سرمست، حسن صالحی، محمد امین قنبری جهرمی *

دانشجوی دوره دکتری، دانشیار و دانشجوی دوره کارشناسی ارشد بخش علوم باغبانی، مرکز کشت بافت و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

چمانواش بلند (.Festuca araundicea Schereb) از جمله سبز فرش های مقاوم به شرایط محیطی نامطلوب و مناسب کشت در نواحی انتقالی است. نظر به اینکه در هنگام جابجایی ارقام و ایجاد کلکسیونها، به دلیل ویژگی دگر گشن بودن چمانواش بلند، احتمال اشتباه و اختلاط وجود دارد، در این مطالعه از آغازگر های ISSR و RAPD برای تعیین سطح تفاوت ژنتیکی 11 رقم چمانواش بلند استفاده شد. gDNA از برگ ها استخراج و کیفیت و کمیت آن با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگاروز تعیین و پس از رقیق سازی در واکنش PCR استفاده شد. از بین بیش از 30 آغازگر در واکنش PCR حدود 14 آغازگر دارای تکرار پذیری بالا برای محاسبات انتخاب شدند. این 14 آغازگر در مجموع 400 نوار در کل رقم ها تولید نمودند که متوسط تعداد مکان های ژنی پلی مورف در آغازگرها 4 بود. تجزیه خوشه ای رقم ها بر اساس حضور نوار (1) و عدم حضور نوار (0) با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت. بیشترین و کمترین تشابه ژنتیکی بین رقم ها به ترتیب برابر با 88% و 41% بدست آمد. در تجزیه خوشه ای، رقم ها در درصد تشابه 72% در 5 گروه قرار گرفتند. همچنین ضریب کوفنتیکی بین ماتریکس تشابه و دندروگرام در حدود r=0/92 بدست آمد که بر ارزش مناسب دندروگرا به ماترکس تشابه را نشان می دهد. آنالیز داده های بدست آمده از ISSR و RAPD با استفاده از UPGMA و با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2,02 بیانگر تفاوت آشکار رقم flood و jagvar با دیگر رقم ها می باشد.

مقدمه

سبزفرش ها باریک برگانی هستند که پوششی سبز را روی سطح زمین ایجاد کرده که به طور مداوم کوتاه می شود. باریک برگان به طور گسترده ای برای چمن خانه ها، ساختمان های اداری، زمین های ورزشی، تفرجگاهها و حاشیه جاده ها استفاده می شوند. در سال های اخیر به دلیل دگر گشن بودن چمانواش بلند برخی از کلکسیون های چمن های چمانواش بلند دچار ناخالصی شدهاند. کار حاضر گزارش خلاصه ای از میزان تنوع ژنتیکی 11 رقم چمانواش بلند با نام های- Mini Mustang، Pixie، S3،Jagvar، Houndog، Monarch، hd ، J-r، Elita ، Flood ، Gazelle،) را با استفاده از دو نشانگر ISSR و RAPD در اختیار قرار می دهد.

مواد و روش ها

برای استخراج DNA از روش استنج و همکاران[1] (1998) استفاده شد پس از مشخص شدن غلظت مناسب (بر اساس تعداد نوار های های تشکیل شده)، غلظت DNA نمونه های رشد یافته در درون شیشه و نمونه های گیاه مادری یکسان شد و پس از تنظیم شرایط، PCR اصلی با استفاده از تمام آغازگرها انجام شد. حجم نهای هر واکنش، PCR 20 میکرولیتر بود که حاوی 8 نانوگرم از DNA، 1واحد از بافر x10 ، 1/75 میکرومولار از کلرید منیزیم، 0/25 میلی مولار dNTPs 10 پیکو مولار از آغازگر 10 نوکلئوتیدی تصادفی

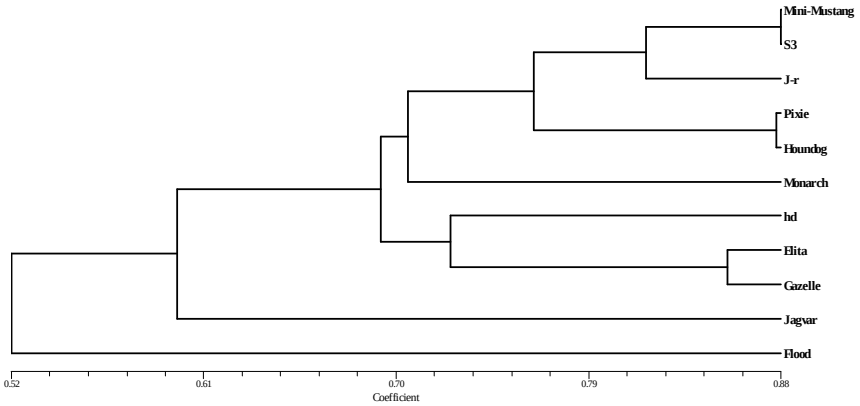
۲. Stange *et al.*

(غلظت محلول آغازگر آگاروز 2% که با اتیدیوم بروماید (1-ml µg 1) رنگ آمیزی شده بود با ولتاژ 60 رانده شد و وضعیت نوار با استفاده از دستگاه (GENE FLASH Gel Doc. China) بررسی شد. برای محاسبه فواصل ژنتیکی، رسم دندروگرام و واکاوی مختصات اصلی، از نرم افزار NTSYS pc 2,02 استفاده شد.

نتایج و بحث

پی از بررسی های اولیه حدود 10 آغازگر جهت آزمون نهایی استفاده شد. آنالیز داده های بدست آمده از ISSR و RAPD با استفاده از UPGMA و با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2,02 بیانگر تفاوت آشکار رقم flood و jagvar با دیگر رقم ها می باشد این در حالی است که رقم های S3 و Mini-mustang و Pixie با دو رقم flood و jagvar بر اساس Pca تفاوت زیادی نشان می دهند.

20 میکرومولار بود) و 2 واحد از Taq DNA polymerase بود. محصول PCR بدست آمده روی ژل



Evaluation of genetic diversity among some genotypes of Festuca arundinacea by ISSR and RAPD molecular markers

M.K. Sarmast* and H. Salehi
Department of Horticultural Science, Plant Tissue Culture and Biotechnology Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
*Khoshhal.sarmast@gmail.com

Abstract
Festuca arundinacea. Schreb. is one on of the most tolerant turfgrass to adverse environmental condition and suitable for transitional zone arena. Regarding that in turf transportation and making plant collection, there is possibility for mixing and error due to being cross pollinate, in present research ISSR and RAPD primers were used for evaluation of genetic diversity among 11 cultivar of Festuca araundicea Schereb. gDNA were extract from leaf and it's quality and quantity determined by Nano Drop and electrophoresis and after DNA dilution get used for PCR reaction. Out of 30 primer, just only around 14 primers chosen for work. Four hundred band were produced from 14 primer that the

mean number of polymorphic band in each primer was 4. Dendrogram analysis were made according presence (1) or absent (0) of band using Jacard similarity coefficient by UPGMA. The highest and lowest genetic similarity among cultivars was 88% and 41% respectively. In dendrogram analysis, cultivars in 72% similarity rate divided to 5 group. Moreover cophenetic correlation between similarity matrix and dendrogram was 0/92. The calculated data data by NTSYS pc 2,02 show the highest différence between Flood and Jagvar cultivars in compare other cultivar.

Keywords: ISSR, RAPD, Festuca arundinacea Schreb, Biodiversity