بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بر اساس نشانگر مولکولی ISSR

حسین رستمی احمدوندی (۱)، کیانوش چقامیرزا (۲)، دانیال کهریزی (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه رازی ۲- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

در این تحقیق تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگر ISSR روی ٤٠ توده‌ی زیره سبز بومی ایران بعلاوه‌ی دو توده از کشورهای سوریه و افغانستان مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۰ آغازگر مورد استفاده، همه‌ی این آغازگرها باند های چند شکل تولید کردند به‌طوری‌که از مجموع ۸۸ باند تولید شده در حدود ۵۱ باند (۵۷/۹۵٪) چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل ایجاد شده مربوط به آغازگر UBC827 با درصد چندشکلی برابر ۰/۹۰ و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر B با درصد چندشکلی برابر با ۱۲/۵٪ بود. بر اساس تجزیه کلاستر و تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد ژنوتیپ‌ها را به سه گروه متمایز تقسیم شدند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین توده‌های ۳۱ و ۳۷، و کمترین شباهت ژنتیکی بین توده‌های ۲۲ و ۳ مشاهده شد.

کلمات کلیدی : نشانگرISSR ، زیره سبز ، تنوع ژنتیکی، تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی

مقدمه:

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* گیاهی است بومی مدیترانه، که جزء تیره چتریان می‌باشد. در زمان باستان این گیاه دارویی ارزشمند توسط مردم کشورهای مصر و هند کشت گردیده است(۲). از آنجایی که اصلاح گیاهان بر پایه ایجاد تنوع با گزینش انواع مطلوب تا رسیدن به هدف نهایی استوار است داشتن تنوع ودامنه وسیعی از ذخایر توارثی در اصلاح نباتات ضروری است(۱). تنوع مبنای همه‌ی گزینش‌ها در اصلاح نباتات است انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع می باشد و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب وسیع تر می شود(۳). امروزه به منظور مطالعه بهتر تنوع ژنتیکی در گیاهان از انواع نشانگرها استفاده می‌کنند. یک نشانگر مناسب، نشانگری است که بین دو فرد متفاوت باشد و در ضمن قابلیت توارث نیز داشته باشد(٤). هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های زیره سبز بر اساس نشانگرهای ISSR می‌باشد.

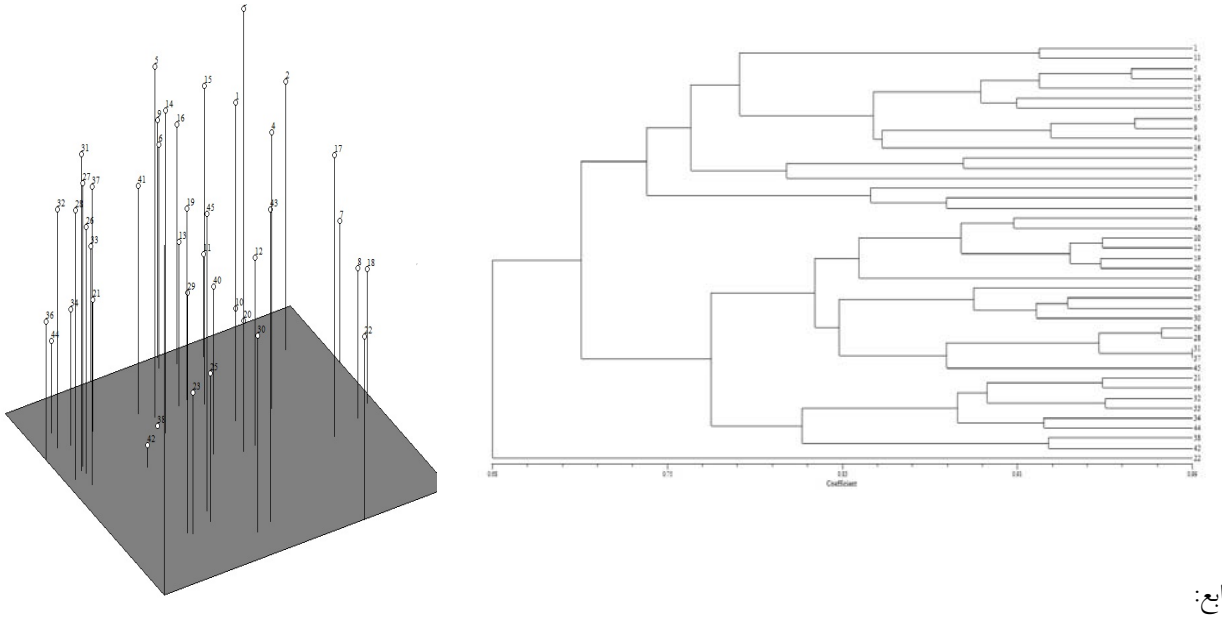
مواد و روش ها:

مواد گیاهی شامل ٤٠ توده‌ی زیره سبز بومی ایران بعلاوه دو توده از کشورهای سوریه و افغانستان بود. DNA از برگ های جوان ۵ گیاه از هر توده با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA از طریق الکتروفورز بروی ژل آگارز بررسی گردید. غلظت نهایی DNA هر نمونه به ۱۰ ng/µl رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران با تغییر جزیی انجام شد. نهایتاً تکثیر DNA در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل mM Tris-HCl (pH 8.4), ۱۰ mM MgCl2 ،۵۰mM KCl ،۱۰ µM آغازگر، ۰.۱ mM dNTP و ۱ U آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۰ng از DNA الگو انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Analyticajena مدل 96G با شرایط تکثیر زیر صورت گرفت: واسرشت سازی اولیه ۹٤°C به مدت ٤ دقیقه، و ٤٠ سیکل واسرشت سازی در ۹۲ °C به مدت ۳۰s، اتصال در ٦٠°C-۵۰ به مدت ۱۵ s و بسط در۷۲ °C به مدت ۹۰s. قطعات حاصل برروی ژل آگارز ۱/۲٪ تفکیک گردیدند. رنگ آمیزی ژل‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر انجام شد. سپس باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیاز دهی شدند .آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم افزار NTSYSpc version 2.02e صورت گرفت. تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ضریب تشابه جاکارد (۵) انجام گرفت و دندروگرام و پلات سه‌بعدی در نهایت ترسیم شد.

نتایج و بحث:

در این پژوهش حضور و عدم حضور قطعات تکثیر شده توسط هر آغازگر ISSR به ترتیب به عنوان یک و صفر در نظر گرفته شدند. از مجموع ۱۰ آغازگر استفاده شده تمامی این آغازگرها قادر به ایجاد باندهای قابل امتیاز دهی بودند. تعداد باند-های ایجاد شده توسط آغازگرهای مورد استفاده بین ۵ تا ١٤باند متغیر بود. از مجموع ۸۸ باند تولید شده در حدود ۵۱ باند (۵۷/۹۵٪) چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل ایجاد شده مربوط به آغازگر UBC827 با درصد چند شکلی برابر ۰/۹۰ و کمترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگر B با درصد چند شکلی برابر با ۰/۱۲/۵ بود. بیشترین تشابه ژنتیکی بین توده‌های ۳۱ و ۳۷، و کمترین شباهت ژنتیکی بین توده های ۲۲ و ۳ مشاهده شد. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش COMPLETE و پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی توده های مورد مطالعه بر اساس نتایج نشانگرهایISSR در شکل ۱ ارائه شده است. بر اساس این نتایج توده‌ها به ۳ گروه تقسیم شدند بصورتی که توده شماره ۲۲به تنهایی در یک گروه ، توده‌های ١٦،٢،٣،١٧،٧،٨،٤١،٩،٦،١٥،١٣،٢٧،١٤،٥،١١،١و ۱۸ در گروه دیگر و سایر توده ها در سومین گروه طبقه بندی شدند. ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شده برابر ۰/۸۱ بود که نشان می دهد که داده ها برازش نسبتا مناسبی با دندروگرام حاصل دارند. در نتیجه نشانگر ISSR می‌تواند به عنوان یک روش ارزیابی مناسب برای آنالیز تنوع ژنتیکی در توده های مختلف زیره سبز در نظر گرفته شود.

شکل ۱: نتایج حاصل از تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی ٤٢ توده مختلف زیره ی سبز بر اساس ضریب تشابه جاکارد



منابع:

۱- اهدایی،ب. ۱۳۷۳. اصلاح نباتات. نشر دانشگاهی مشهد ٤٥٦ص.

۲- پاپ زن، ع. و ص. بهرامی نژاد. ۱۳۸۱. بررسی مراحل فنولوژیک زیره سبز،عملکرد و اجزاء آن در شرایط کرمانشاه. مجموعه مقالات اولین همایش ملی زیره سبز، صفحه ۵۹-۵۵ .

۳- عبد میشانی،س.و ع. شاه نجات بوشهری. ۱۳۷۷.اصلاح نباتات تکمیلی نشر دانشگاه تهران.

٤ - نقوی، م.، ب.قره یاضی و ق..حسینی سالکده. ١٣٨٦. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران .

5- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bul. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223–27