ارزیابی تنوع ژنتیکی زنبق های بومی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

روح الله حیدری هایی (۱) ، رضا امیری (۲)، علیرضا بابایی (۴)، شیرین دیانتی (۳)، وحید رحیمی (۱)، حمید رضا بیات (۱)

۱- دانشجویان کارشناسی ارشد رشته اصلاح گیاهان باغی، دانشگاه تهران ،پردیس ابوریحان، ۲- عضو هیات علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران ،پردیس ابوریحان، ۳- عضو هیات علمی گروه تولیدات گیاهی(باغبانی)، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، ۴- عضو هیات علمی گروه باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس

در این مطالعه از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و قرابت ۱۶ نمونه زنبق متشکل ازنمونه های وحشی استفاده شد. در این آزمایش تعداد ۱۴ آغازگر تصادفی روی نمونه های DNA استخراج شده از برگ مورد آزمون قرار گرفتند که تعداد ۱۲ آغازگر بین ژنوتیپ ها چند شکلی مطلوب نشان دادند. در مجموع ۷۲۲ باند در کل ژنوتیپ ها تکثیر شد که از بین آنها ۶۸۰ باند چند شکل بودند. تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت. در تجزیه خوشه ای در ضریب تشابه ۰/۲۳ ژنوتیپ ها در دو گروه مجزا و در ضریب تشابه ۰/۳۵ ژنوتیپ ها در هفت گروه قرار گرفتند. نشانگرهای RAPD به راحتی به منظور گروه بندی ژنوتیپ های مختلف زنبق می تواند بکار رود و یک تکنیک مناسب در راستای این هدف باشد.

مقدمه

امروزه دو عامل فرسایش ژنتیکی و آسیب پذیری ژنتیکی به شدت محصولات زراعی و باغی را تحت تأثیر قرار داده است، لذا از مهمترین وظایف یک اصلاحگر توجه به ذخایر ژنتیکی و استفاده بهینه از این ذخایر و تنوع موجود در جهت بهبود کمی و کیفی محصولات است. در نتیجه ذخیره ژرم‌پلاسم گیاهی یکی از گرانبهاترین سرمایه‌های طبیعی هر کشور محسوب می‌شود و کشور ایران از این لحاظ کشوری غنی و دارای موقعیت منحصر به فرد از نظر تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله زنبق می‌باشد. گل زنبق به لحاظ تنوع در رنگ و شکل گل و برگها، زمان به گل رفتن، سهولت ازدیاد ازطریق اندامهای زیرزمینی، چند ساله و دائمی بودن تنوع کارائی به صورت گل شاخه بریده، گلدانی، باغچه ای دارد. این گل در منازل، فضای سبز، پارکها و نیز تولید عطرو اسانس از دیر باز مورد توجه بوده و به عنوان سمبلی برای زیبائی به کار رفته است. کشور ایران به دلیل برخورداری از تنوع آب و هوائی دارای فلور گیاهی غنی می باشد. بنابراین شناسائی و بررسی تنوع زنبق های بومی ایران در عرصه های مختلف از جمله پرورش، تولید و تکثیر می تواند نقش به سزائی در پرورش و صادرات این محصول ایفا نماید بدین منظور نمونه های مختلف زنبق های وحشی از نقاط مرکزی، شمالی و غربی کشور جمع آوری گردید و پس ازکشت در کلکسیون تحقیقاتی گروه تولیدات گیاهی پردیس ابوریحان(دانشگاه تهران) مورد بررسی قرار گرفتند. نشانگرهای DNA (ولش و مک کللند، ۱۹۹۰) به عنوان یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی های ژنتیکی موجودات کارایی خود را ثابت نموده اند، زیرا اینها از نشانگرهای مرفولوژیک دقیق تر بوده و تحت تاثیر محیط قرار نمی گیرند. با کشف واکنش زنجیره ای پلیمراز جهشی عظیم در استفاده از این نشانگرها برای ارزیابی ژنتیکی موجودات مختلف به وجود آمد. نشانگر RAPD، یکی از تکنیکهای مبتنی بر PCR بوده که در مطالعات مختلف از جمله تنوع ژنتیکی و نقشه یابی ژنومی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (احمد و همکاران۲۰۰۶). این روش ساده بوده و نیاز به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم ندارد. عدم نیاز به استفاده از مواد خطرناک مانند مواد رادیواکتیو، عدم نیاز به طراحی آغازگر و همچنین میزان کم DNA ژنومی مورد نیاز در این روش از دیگر

محاسن آن است. به همین دلیل استفاده از این تکنیک در سالهای اخیر در مطالعات مختلف ژنتیکی رشد زیادی داشته است.

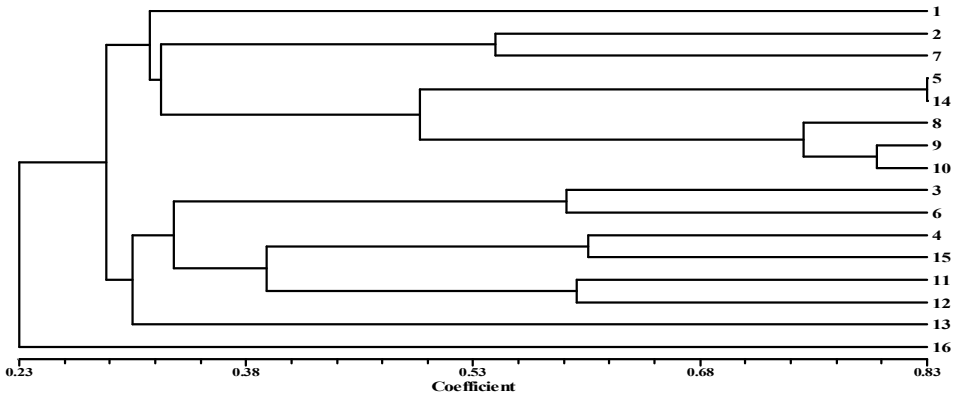
مواد و روش ها:

در این تحقیق از ۱۶ ژنوتیپ گیاهی مختلف زنبق های وحشی استفاده شد که از نقاط مرکزی، شمالی و غربی کشور جمع آوری گردیده اند(دیانتی، ۱۳۸۷). پس از کشت ژنوتیپ های مذکور در کلکسیون تحقیقاتی گروه تولیدات گیاهی پردیس ابوریحان(دانشگاه تهران) از برگ آنها برای استخراج DNA نمونه گرفته شد. استخراج DNA به روش دویل و دویل(۱۹۸۷) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۰/۸درصد تعیین گردید و به کمک آنها غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر از DNA آماده شد. در ضمن برای رقیق سازی نمونه های DNA از آب مقطر دو بار تقطیر استریل استفاده شد. برای انجام آزمایش RAPD از ۱۲ آغازگر سری اوپرون استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، از کیت مخصوص PCR (Amplicon, Denmark) که حاوی مواد مورد نیاز برای این واکنش می باشد استفاده شد. برای انجام هر واکنش PCR ۷/۵ میکرولیتر از این محلول برداشته شده و درون تیوب های مخصوص PCR (تیوب های ۰/۵ میلی لیتری) ریخته شده و همراه با آغازگر و DNA ژنومی (که قبلاً به غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شده بود) مخلوط شده و سپس توسط آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۱۵ میکرولیتر رسانده شد.

بعد از انجام واکنش PCR محصولات بوسیله دستگاه ژل داک عکس برداری شد، پس از مشاهده و ثبت قطعات حاصل از تکثیر، فقط قطعات تولیدی شفاف و واضح که از تکرار پذیری بالایی برخوردار بودند برای امتیاز دهی به کار رفتند. نتایج بدست آمده وارد Excle شد و برای انجام آنالیز به نرم افزار NTsys (ver 2.02) 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 UPGMA انجام شد.

نتایج و بحث:

از بین ۱۴ آغازگر مورد استفاده در این آزمایش ۱۲ آغازگر آن دارای باند های چند شکل بوده و به منظور تجزیه و تحلیل باند ها که در محدوده بیش از ۲۰۰ جفت باز بودند، وارد تجزیه شدند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای در شکل ۱ مشاهده می شود.



شکل ۱: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA.

ژنوتیپ ها عبارتند از:

1:(*i.reticulata*),2:(*i.songarica*),3:(*i.meda*),4:(*i.persica*), 5:(*i.germanica*), 6:(*i.persica*), 7:(*i.songarica*), 8&9,10:(*i.imbricata*),11:(*i.barnomea.spdamavandica*),12:(*I.caspica*), 13:(*I.spuriaSubspmusulmanica*), 14:(*i.germanica*), 15:(*I.persica*), 16:(*i.pesoudocorus*)

در ضریب تشابه ۰/۲۳ زنبق ها در ۲ گروه جدا گانه قرار گرفتند که زنبق مردابی به تنهایی در یک گروه قرار گرفت اما در ضریب تشابه ۰/۳۵ ژنوتیپ ها در ۷ گروه متفاوت قرار گرفتند که زنبق های بومی ایران در یک گروه قرار گرفتند. زنبق *i.barnomea.sp damavandica* که تنها در ایران یافت می شود بیشترین تشابه را با *I.caspica* نشان داد. کمترین ضریب تشابه بین *I.caspica* و *i.pesoudocorus* به میزان ۰/۰۹و بیشترین تشابه بین ژنوتیپ های زنبق های آلمانی ۰/۸۳است که از نقاط متفاوتی جمع آوری شده اند و دارای رنگ های مختلفی می باشند، بدست آمد. تکثیر RAPD ازDNA زنبق درجه بالایی از تنوع ژنتیکی را بین گونه های زنبق آشکار میکند بررسی نتایج RAPD مدارک بیشتری مبنی بر اینکه این تکنیک روش ساده و قابل اعتماد برای شناسایی روابط نزدیک گونه ها است، ارائه میکند(احمد و همکاران ۲۰۰۶).

منابع:

دیانتی، ش. ۱۳۸۷. بررسی، جمع آوری و اهلی نمودن زنبق های بومی ایران. گزارش نهایی طرح پژوهشی، دانشگاه تهران(پردیس ابوریحان).

Doyel, J.J., and J.L. Doyel. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bul. 191:11-15.

Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18, 7213-7218.

Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvment. Biotechnol. Adv. 17:143-183.

Ahmad, H. and S. Dhia. 2006. Determination of genetic Diversity among Iris species using random amplified polymorphic DNA analysis. Biotechnology 5(2):173-179.

Assessment of genetic diversity among Iranian native *Iris* spp genotypes Using Random Amplified Polymorphic DNA markers

Rohollah Heidarhaee[1], Reza Amiri[2], Alireza Babai[3],Shirin Dianati[1], Vahid Rahimi[1], Hamid reza Bayat[1]

1- Department of Horticultural Sciences, College of Abooraihan, University of Tehran 2- Department of Agriculture Sciences, College of Abooraihan, University of Tehran 3- Department of Horticultural Sciences, University of Tarbiat Modares

Abstract

RAPD markers were used to determine the genetic diversity level and phylogenetic relationships among 16 genotypes of *Iris spp* included wild cultivar iris. In this study 14 random primers were used for PCR reaction on the template DNAs extracted from leaves, which 12 showed good amplification and polymorphism. Totally, 722 bands were produced, and 680 bands were polymorphic. Cluster analysis of the genotypes was performed using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method. In similarity measure of 0.23 on the denrogram, the 16 genotypes of cyclamen were divided into two groups and seven groups in similarity measure of 0.30. RPAD markers showed to be a useful technique for studying the genetic diversity of this important ornamental plant.