کاربرد مارکر های مولکولی RAPD در تشخیص تنوع ژنتیکی گیاهان ریز ازدیادشده زیتون

مهناز منصف (۱ و ۲) ، مریم پیوندی (۲)، سید مهدی حسینی مزینانی (۱)

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ، تهران، ۲- گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

از مارکر های RAPD برای ارزیابی میزان تاثیر تعداد واکشت ها بر تنوع ژنتیکی گیاهان ریزازدیاد شده زیتون استفاده شد . جداکشتهای تک گره ای از یک گیاه بالغ در محیط های کشت پایه DKW دارای هورمون ۲- ایزوپنتنیل آدنین (2-ip) (٤mgl-1) کشت شدند . به منظور بررسی تاثیر تعداد واکشتها در ایجاد تنوع ژنتیکی در گیاهچه های نوپدید ، از نوساقه های سترون ، برای ریز ازدیادی در مراحل بعد استفاده شد. واکشتها با فواصل ٤٥روز انجام شد . DNA برگ های تازه گیاه مادری وگیاه ریزازدیاد شده استخراج شدند. بررسی تنوع در سطح DNA ، در گیاهان مادری و ریزقلمه های ریز ازدیاد شده با استفاده از ۱۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD (گروه C) انجام شد. محاسبات بر اساس باندهای متشابه ، گیاهان ریزازدیاد شده در واکشتهای اول و سوم بیش از ۹۰٪ تشابه را نشان دادند.

مقدمه

زیتون درختی با ارزش اقتصادی فراوان است که در نقاط مختلف جهان به ویژه در کشور های حوزه مدیترانه کشت می شود. در تکثیر گیاهان ، مهمترین مسئله حفظ و نگهداری خصوصیات فیزیولوژیکی و ژنتیکی گیاه مادری است از آنجائیکه تکنیک کشت درون شیشه می تواند القاء کننده تنوع ژنتیکی باشد ، با استفاده ازمارکر های مولکولی DNA مانند RAPD احتمال وقوع تنوع ژنتیکی حاصل از کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت .

مواد و روش‌ها

کشت و واکشت نمونه ها درون شیشه :

شاخه های جوان از گیاه بالغ زیتون رقم دزفول واقع در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری پس از جداشدن و شستشو با آب جاری و حذف برگها ، با وایتکس تجارتی۲۰٪ (۱۵ دقیقه) و آب مقطر سترون (۵ بار) ، سترون گردید وجوانه های جانبی(تک گره ای)در محیط کشت DKW دارای هورمون 2ip($4\ mgl^{-1}$) کشت گردیدند.در مرحله واکشت ،بخشهای دو گره ای از ساقه های سترون مرحله اول ،واکشت شدند(٤٥ روز یکبار).

استخراج DNA وتکثیر PCR :

DNA از برگ های تازه گیاه مادری وگیاه ریزازدیاد شده زیتون استخراج شد . واکنش PCR در حجم کلی20µM با ۱۰ پرایمرRAPD (گروه C) انجام شد.برای بررسی محصولات PCR الکتروفورز برروی ژل آگارز ۲٪ و ژل پلی اکریلامید ٦ ٪ انجام شد . آنالیز داده ها براساس تفاوت بین داده ها انجام شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی بین گیاه مادری و گیاهان ریز ازدیاد شده در واکشتهای اول و سوم بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی باندهای متشابه و نامتشابه بر اساس ماتریس تفاوت مربع فاصله اقلیدسی (روش UPGMA) نشان داد که گیاهان باززایی شده بیش از ۹۰٪ تشابه را نسبت به گیاه مادری دارند.

منابع

1) Bednarek P.T, R.Orłowska,R.M.D. Koebner and J. Zimny,2007. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.),BMC Plant Biology , 7:10

2) Bordallo P.N., D. H. Silva, J. Maria, C. D.Cruz and E. P. Fontes, 2004. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. Horticultura Brasileria. 22 (2): 300-304

3) De la Rosa R., C. M. James and K. R. Tobutt, 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae.* Primer note. Molecular Ecology Notes.2:265-267.

4) Driver D.and A. Kuniyuki, 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. Hort. Science.19:507-509.

5) Rout ,G.R. Das ,P., Raina,S.N., 1998. Determination of stability of micro propagated plants of ginger using Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Bot.Bull.Acad.Sin. 39: 23-27

Application of RAPD molecular markers in detecting genetic variation of micropropagated plants of Olea europaea L.

Abstract:

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to evaluate the influence of the number of subcultures on diversity of micropropagated plants of olive. Uninodal explants from a matured olive plant were cultured in DKW medium supplemented with 2ip (4 mgl^{-1}). To study the effect of number of subcultures on genetic diversity of micropropagated olive plants, sterile i*n vitro* shoots were used for plant tissue culture. The explants were subcultured with 45 days interval. DNA was extracted from fresh leaves of micropropagated and mother plants. Ten arbitrary 10-base primers RAPD kit C were used for PCR reaction .Mother plant and plantlets(micropropagated plants) were subjected to RAPD analysis. 10 arbitrary decamer primers produced polymorphic amplification products. The estimation of genetic similarity coefficient based on RAPD band sharing data indicated that regenerated plants from the first and third subculturs were more than 90% similar to mother plants.

Keywords: Micropropagation, genetic variation, Olea europaea L., RAPD