نشانگرهای اختصاصی در سطح گونه جهت شناسایژنوتیپ‌هایموردمطالعه ITS

مهدی رضائی*[۱]، عزیز قهرمانلو[۱]، پرویز حیدری[۲] و احمد بالندری[۳]

[۱] گروه علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

[۲] مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

*نویسنده مسئول: mhrezaei@shahroodut.ac.ir

چکیده

زرشک بی‌دانه به‌عنوان یک محصول اقتصادی سهم عمده‌ای در اقتصاد کشاورزی منطقه جنوب خراسان دارد. در سال‌های اخیر استفاده از توالی نواحی rDNA ITS برای شناسایی گونه‌های گیاهی و تعیین بار کدینگ آنها افزایش‌یافته است. تحقیق حاضر باهدف بررسی کارائی توالی نواحی rDNA ITS در بارکد گذاری ۱۹ نمونه جمع‌آوری‌شده زرشک از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، شهرستان اسفراین و شاهرود انجام پذیرفت. نمونه‌ها در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی شاهرود با استفاده از پرایمر اختصاصیITS2 زرشک تکثیر و برای توالی‌یابی ارسال گردید. پس از توالی‌یابی تجزیه‌وتحلیل فیلوژنی آنها با استفاده از نرم‌افزار MEGA X و آنالیز آن به روش UPGMA انجام شد. توالی‌ها در پایگاه‌داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی‌ها با عملیات بلاست با سایر گونه‌ها مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان مشابهت با سایر گونه‌ها در پایگاه‌داده NCBI رسم گردید. نتایج نشان داد فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی از ۰/۰۱۲ تا ۰/۱۵۴ متغیر بود. باتوجه‌به شباهت توالی‌ها تنها امکان تهیه سه جفت پرایمر اختصاصی به نام‌های R14N2، R9N3 و B.th فراهم گردید. سه جفت پرایمر طراحی، و بر روی ۱۹ نمونه گونه گیاهی بکار گرفته شد. پرایمر R14N2 به طور اختصاصی توانست ژنوتیب R14N2 را تکثیر نماید ولی پرایمرهای R9N3 و B.th باند اختصاصی نداشتند.

واژه‌های کلیدی :زرشک، توالی‌یابی ناحیه ITS، بارکد گذاری DNA، پایگاه‌داده NCBI

مقدمه

همواره تعیین میزان خویشاوندی بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها موردتوجه محققین بوده است. یکی از روش‌های تعیین خویشاوندی استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد. روبه کاهش بودن تنوع زیستی، وقوع دورگه‌ها و مضاعف شدن کروموزومی و از طرف دیگر دستیابی به روشی سریع و دقیق و ارزان از دغدغه‌های متخصصان سیستماتیک گیاهی در شناسایی گونه‌های گیاهی است (Blaxter, 2003). به همین دلیل بسیاری از محققان بهترین وسیله برای تشخیص در گونه‌های درختی را استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌دانند (Balasaravanan *et al*, 2006). در سال‌های اخیر نشانگرهای مبتنی بر ITS یکی از نشانگرهای مولکولی است که در پژوهش‌های فیلوژنتیکی و DNA بار کدینگ کاربرد بسیاری پیدا کرده است. یکی از این نواحی پرکاربرد دی‌ان‌آ در شناسایی گونه‌های گیاهی ناحیه فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) بوده است که این ناحیه در کنار ژن‌های ریبوزومی قرار دارد (Gultepe *et al*, 2010). این نشانگرها برای مقایسه گونه‌ها و جنس‌های بسیار نزدیک و همچنین بررسی‌های تبارزایی (فیلوژنی) مهم هستند (Silva *et al*., 2018). هدف از انجام این پژوهش، تهیه نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی گونه‌های زرشک ایرانی و بررسی روابط فیلوژنی بین آن‌ها است. به علت وقوع هیبرید و دورگه شدن درون‌گونه‌ای در زرشک، شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های آن با مشکلاتی همراه می‌باشد؛ بنابراین در این پژوهش باهدف شناخت و بهره‌برداری از پتانسیل‌های گونه‌ها و ژنوتیپ‌های بومی زرشک سعی گردید که با تهیه نشانگرهای اختصاصی از ناحیه ITS از آنها برای شناسایی ارقام و گونه‌های زرشک ایرانی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۹ نمونه برگی زرشک که از رویشگاه‌های قائن، کاخک، شاهرود – آزادشهر، بیرجند، اسفراین و شاهرود جمع‌آوری شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برگ‌های تازه درختچه زرشک نمونه‌برداری و دی‌ان‌آ آنها استخراج شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت دی‌ان‌آ، با نشانگر توالی ناحیه ITS باقلا (حیدری و همکاران ۱۳۹۳) نواحی ITS در ترموسایکلر (Bio Rad T100) تکثیر شدند. توالی‌های حاصل از تکثیر روی ژل اگاروز ران و سپس باند تکثیری از ژل با استفاده از کیت استخراج ژل جداسازی و برای توالی‌یابی به شرکت سیناکلون ارسال گردید. توالی‌ها در پایگاه‌داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی‌های با عملیات بلاست با سایر گونه‌ها مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان مشابهت با سایر گونه‌ها در سایت NCBI رسم گردید. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، ابتدا توالی‌های مربوطه با نرم‌افزار MEGA الیگمنت شدند و پس از مشخص‌شدن حداکثر اختلاف بین توالی‌های دی‌ان‌آ، از نرم‌افزار طراحی پرایمر Primer-blast برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی‌های به‌دست‌آمده در شرکت سینا کلون ساخته شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده دی‌ان‌آ ژنومی ۱۹ ژنوتیپ زرشک با واکنش PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز روی ژل اگاروز یک درصد، کارایی آن‌ها در تشخیص صحیح هریک از گونه‌های زرشک بررسی گردید.

نتایج و بحث

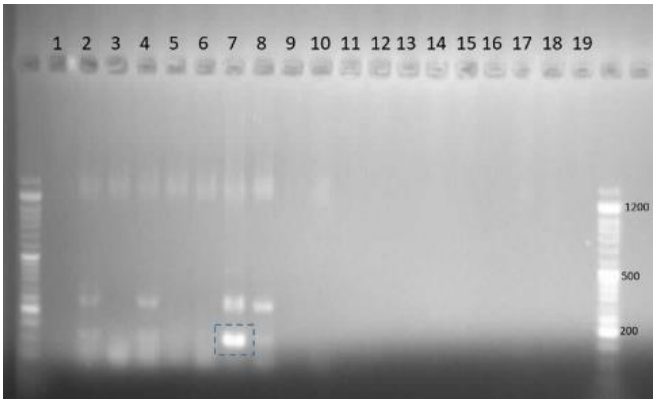
توالی ITS ژنوتیپ‌ها در سایت NCBI با کدهای از شماره MN758649 تا MN758668 ثبت گردید. توالی ITS با طول تقریبی ۳۵۰ جفت باز ژنوتیپ‌های زرشک در پایگاه‌داده NCBI بلاست گردید. این توالی با ۹۳ توالی بالای ۹۰ درصد مطابقت[31] داشتند. تمام این ۹۳ توالی مربوط به گونه‌های مختلف زرشک بودند. از نظر توالی‌یابی، رقم زرشک زینتی (JA) از بقیه ارقام متفاوت بود که بیان‌کننده تفاوت این رقم با سایر ارقام می‌باشد چرا که در توالی‌ها تطابق کامل مشاهده نشد و رقم زرشک زینتی باندی متفاوت از باند سایر ارقام تکثیر کرد. نواحی حفاظت‌شده‌ی به‌دست‌آمده از توالی‌های هم‌ردیف سازی شده نیز تعیین گردید و بر اساس تفاوت‌های مشاهده شده سه جفت پرایمر (B.th, R14N2 و R9N3) طراحی شدند (جدول ۱). سه جفت پرایمر اختصاصی B.th, R14N2 و R9N3 به صورت جداگانه روی DNA ۱۹ نمونه گیاهی زرشک با استفاده از دستگاه PCR مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی توانایی تکثیر پرایمرهای اختصاصی محصول نهایی روی ژل آگارز قرار گرفتند. پرایمر طراحی شده برای ژنوتیپ R14n2 توانست باند اختصاصی این ژنوتیپ را از سایر ژنوتیپ‌های مجزا کند (شکل ۱). پرایمر طرحی شده برای ژنوتیپ R9N3 در ناحیه مدنظر (۲۶۸bp) باند اختصاصی تشکیل نداد و در ناحیه حدود ۳۵۰ bp پرایمر R9N3 روی ژنوتیپ‌های R5N1, R11N3, R14N2, Sh4, Es1, Es2 زرشک نواحی را تکثیر کرد (شکل ۲) .پرایمر .B.th نیز باند اختصاصی در ژنوتیپ‌های مدنظر تولید نکرد.

نتایج نشان داد که در زرشک به علت اختلاف کم جایگزینی نوکلئوتیدی در طی تکامل، روابط بین آنها به‌خوبی تفکیک نشده و اکثراً هیبرید هستند. تغییر در جایگاه برش کروموزومی در اثر تغییراتی همچون جابه‌جایی، معکوس شدن و جهش خواهد بود، انتظار تغییرات زیاد نوکلئوتیدی مناطق مختلف، مستلزم داشتن شرایط آب‌وهوایی متفاوت و حداکثر عوامل تنش‌زای محیطی خواهد بود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸). در این مطالعه ژنوم گونه‌های مناطق مشابه آب‌وهوایی سردسیری اسفراین و شاهرود در تمایز با ژنوم منطقه گرم و خشک قاین و گناباد بوده و تفاوت نوکلئوتیدی در آنها مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد توالی‌یابی ناحیهITS2 از هسته ریبوزومی DNA علی‌رغم وجود تنوع توانایی تفکیک گونه‌های زرشک را ندارد و به نظر می‌رسد که می‌بایست ناحیه بزرگ‌تری از ITS2 و سایر نواحی بررسی گردد.

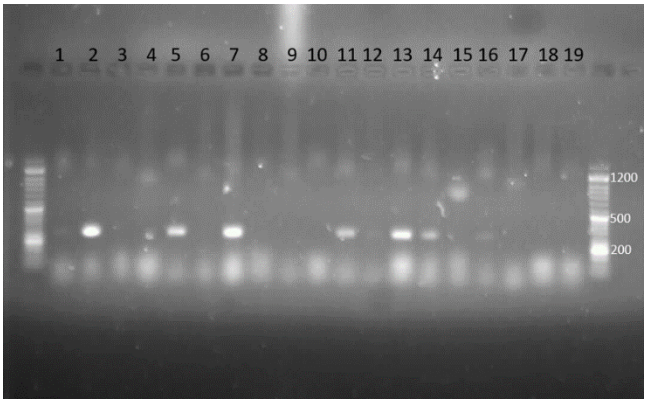
[31] Identity

جدول ۱- اطلاعات پرایمرهای اختصاصی طراحی شدن برای سه ژنوتیپ زرشک

ژنوتیپ	پرایمر	توالی (5'-> 3')	رشته الگو	طول	نقطه شروع	پایان	Tm	GC%	خود مکمل[۳۲]	خود مکمل 3'	طول قطعه
B. thunbergii JA	Forward primer	AGCGGAGACATTGATTGAACT	Plus	21	4	24	57	42	3	1	209
	Reverse primer	CAAGAGCAAGGGGCAGGTA	Minus	19	212	194	59	57	2	2	
R9N3	Forward primer	GACCCGCGAACTTGTTGA	Plus	18	36	53	57	55	4	1	268
	Reverse primer	GTATCGCATTTCGCTACGTTT	Minus	21	303	283	57	42	7	0.	
R14N2	Forward primer	GACTCGCGAACTTGTGAA	Plus	18	36	53	55	50	6	1	113
	Reverse primer	TTTTATCAGAGCCAAAGATA	Minus	20	148	129	49	30	4	3	



شکل۱- نتایج الگوی تکثیر برای پرایمرR14N2 روی ژنوتیپ های مورد مطالعه*



شکل۲- تشکیل باند غیر اختصاصی پرایمر R9N3 روی ژنوتیپ های R5N1, R11N3, R14N2, Sh4, Es1, Es2 گیاهی زرشک*

[32] Self complementarity

*: نمونه‌ها به ترتیب لاین ۱- R2N1، لاین ۲ – R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- بی‌دانه، لاین ۱۹- زینتی ژاپنی

منابع

حیدری، پ.، اشرف مهرابی، ع. و نصراله نژاد قمی، ع .(۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون گروهی گیاه بادرنجبویه. *(Melissa officinalisl.)* با استفاده از هر نشانگرهای ITS. نشریه پژوهشگاه اصلاح گیاهان زراعی

Balasaravanan, T., P. Chezhian, R. Kamalakannan, R. Yasodha, M. Varghese, K. Gurumurthi & M. Ghosh. (2006). Identification of species-diagnostic ISSR markers for six Eucalyptus species. Silvae Genetica, 55(3): 119-122.

Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA. Nature, 421: 122-124.

Gultepe, M., U. Uzuner, K. Coşkuncelebi, A.O. Belduz & S. Terzioğlu. (2010). Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild *Primula* (Primulaceae) taxa of Turkey. Turkish Journal of Botany, 34(3): 147-157.

Silva, S.R., Gibson, R. Adamec, L. Dominguez, Y. & Miranda, V.F. (2018). Molecular phylogeny of bladderworts: A wide approach of Utricularia (Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA sequences. Mol phylogenetic Evol, 118: 244-264

Development of species-specific markers for identification of Iranian barberry by using ITS regions

Mehdi Rezaei[1]*, Aziz Ghahramanlu1, Parviz Heidari[2] and Ahmad Balandary [3]

[1*] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

[3] Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

[*]*Corresponding Author: mhrezaei@shahroodut.ac.ir*

Abstract

As an economic crop, Seedless barberry has a significant role in the agricultural economy of the southern region of Khorasan. In recent years, ITS sequences of rDNA have been increased to identify plant species as DNA barcoding. The present study's main objective is to evaluate the ITS sequence's efficiency for DNA barcoding of 19 collected barberry genotypes from a barberry collection in Mashhad Food Science and Technology Research Institute and some genotypes collected from Esfarayen and Shahroud, Iran. ITS2 primers amplified DNA samples, and then DNA fragments were extracted from agarose gel and sent to SinaClon Co for sequencing. The phylogenetic analysis of barberry genotypes was performed using MEGA X software by UPGMA method on ITS-DNA sequencing. ITS sequences were registered in the NCBI database, and the sequence's identity was determined with other related species by blasting analysis. Dendrogram of cluster analysis was done based on sequence similarity with other species in the NCBI database. The results showed that the genetic pair–wise distance between the studied samples varied from 0.122 to 0.154. Due to the high similarity of the DNA sequences, only three pairs of primers were designated for R14N2, R9N3, and B.th genotypes. Three specific primers amplified the DNA of 19 barberry genotypes. The R14N2 primer was explicitly able to reproduce the R14N2 genotype, but the R9N3 and B.th primers did not have a specific band.

Keywords: barberry, ITS sequencing, DNA barcode, NCBI database