SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

اصول تنظیم قراردادها

مقاله نویسی علوم انسانی

Archive of SID

اولین کنگره بین المللی
و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات
و سومین همایش علوم وتکنولوژی بذر
1st International and
13th Iranian Crop Science Congress
3rd Iranian Seed science and Technology Conference

استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی استبرق

فخرپور سعید [۱]، یامچی احد[۲]، نواب پور سعید[۲]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

پست الکترونیکی: saeed_fakhrpour@yahoo.com

چکیده

شناسایی و طبقه بندی بوته های استبرق در ارتفاعات مختلف با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی گردید. به این منظور پس از استخراج DNA، بهینه سازی شرایط و غلظت‌های مختلف مواد مورد استفاده در PCR، ۹ آغازگر به صورت انفرادی و ترکیبی به کار گرفته شدند. در مجموع ۲۵۹ قطعه تکثیر شد که ۱۰۶ قطعه ازآنها چند شکل بودند. محاسبات آماری با استفاده از روش جاکارد و نرم‌افزار NTSYS Ver.2.02 انجام گرفت. میزان PIC برای آغازگرهای مختلف از ۰/۳۷ برای آغازگر ISSR2 تا ۰/۴۶ برای آغازگرهای ISSR5 و ISSR9 متغیر بود.۱۴ نمونه در سه گروه جای گرفتند که ۲ گروه هرکدام ۶ نمونه ، و یک گروه ۳ نمونه را جای دادند. در مجموع تکنیک ISSR برای طبقه بندی گیاهان استبرق مفید است و شاید استفاده از آغازگرهای زیادتر کمک بیشتری برای تفکیک و گروه‌بندی ارقام نماید. تنوع ژنتیکی قابل توجهی درون استبرق های بومی استان کرمان وجود دارد و نمونه های استبرق از نظر سطح تنوع ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند. عوامل محیطی و تکثیر جنسی احتمالا دلیل اصلی ایجاد فاصله ژنتیکی بین نمونه ها می باشند.

واژه‌های کلیدی: استبرق، تنوع ژنتیکی، ISSR

مقدمه

استبرق با نام علمی *Calotropis procera Aiton* از خانواده *Asclepiadaceae* درختچه ای است از گیاهان کائوچویی که به طور گسترده در مناطق بیابانی ، حاره‌ای و نیمه حاره‌ای آفریقا ، شبه جزایرعربی ، جنوب ایران ، شرق افغانستان ، پاکستان وتمام مناطق بیابانی غرب هند انتشار دارد. این گیاه در ایران در نقاط گرمسیر و سواحل جنوبی دریای عمان از خوزستان تا مکران بلوچستان با ارتقاع ۱۱۰۰ متری از سطح دریا دیده می شود. با توجه به مواردی چون شرایط اقلیمی گرم و خشک، استقرار این گیاه در اراضی شنی و ماسه بادی ، نیازهای اکولوژیکی پایین گیاه ، کاربرد آن در جلوگیری از فرسایش خاک و تثبیت شن های روان ، استفاده از الیاف این گیاه در نساجی و کاربرد های آن در صنایع لاستیک سازی و دارویی اهمیت این گیاه را صد چندان، و اهمیت آن را به عنوان یک گیاه استراتژیک تایید می کند.

به طور کلی علم و تجربه نشان داده است که برای افزایش میزان تولید گیاهان زراعی دو راه اساسی افزایش سطح کشت و راندمان تولید وجود دارد. راه اول به دلیل محدودیت های زیاد سودمندی محدودی دارد. روش دوم مبتنی بر کاربرد الگوی های به زراعی و به نژادی است. اصولاً کارآیی روش های به زراعی نهایتاً در حد پتانسیل ژنتیکی ارقام و گونه هاست. بنابراین اتکاء به ظرفیت ژنتیکی گونه ها و تلاش در جهت اصلاح ژنی مهمترین و پایدارترین الگوی افزایش تولید می باشد. در این راستا شناسایی ژنوم گیاه اهمیت بسزایی دارد. اما هیچ گونه اطلاعاتی درمورد ژنوم این گیاه استبرق در جهان گزارش نشده است و لذا پیشرفت در بخش های اشاره شده در آینده نزدیک موجب افزایش درکیفیت خصوصیات این گیاه در جهت استفاده بهتر در صنایع مزبور خواهد شد ، افزایش کیفیت صفات مهم مستلزم مشخص شدن ژنهای کد کننده این خصوصیات است ، از طرف دیگر اطلاعاتی نظیر نحوه تکامل این گیاه و قرابت آن با گیاهان وجود ندارد. مجموع این اطلاعات برای اصلاح این گیاه برای صفات اقتصادی و مهم آن ضروری به نظر می رسد. برای شروع شناسایی اطلاعات ژنومی اولین قدم بررسی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی بین گیاهان استبرق رشد

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran
۲۴-۲۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر، کرج، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

یافته در نوار مرزی ایران حتی نمونه های خارجی آن که در کشور های همسایه است.

نشانگر ISSR نیمه تصادفی بوده و در حضور یک آغازگر مکمل نسبت به میکروساتلیت هدف، تکثیر می یابد که این عمل در حضور آغازگرهای بدون جایگاه انتخابی ولی دارای نوکلئوتید های تکراری، مانند AG,AC,GT و غیره انجام می شود. این تکنیک نیازمند اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم نیست و الگوهای چندشکل زیاد و چند لوکوسی ایجاد می نمایند. هر باند تولید شده مربوط به قسمتی از توالی DNA است که به وسیله دو میکروساتلیت معکوس احاطه شده است. کابرد نشانگرهای ISSR همانند RAPD ساده بوده و به صرف وقت زیادی نیازمند نیست، اما به نظر می رسد که تکرارپذیری آنها در حد نشانگرهای SSR، به دلیل طویل تر بودن اندازه آغازگرشان، می باشد. نشانگرهای ISSR همانند RAPD اغلب جزء نشانگرهای غالب طبقه بندی می شوند.

به دلیل فراوانی تکرارهای دو نوکلئوتیدی AG, GA, CT, TC, AC, CA در ژنوم گیاهان، استفاده از آغازگرهای ISSR مربوط به این تکرارها در ژنوم گیاهان میزان چند شکلی مناسبی ایجاد می کند. از این نشانگر در انگشت نگاری ژنومی، تنوع ژنتیکی و آنالیز فیلوژنتیکی، نقشه یابی ژنوم، ژن یابی، مشخص ساختن فراوانی توالی های میکروساتلیت و مطالعه روی جمعیت های طبیعی و تمایز گونه ها استفاده می شود.

ژانگ وهمکاران (۳) ازتکنیک ISSR برای تعیین تنوع و روابط ژنتیکی۲۷ جمعیت چمن مرغ استفاده کردند و توانستند نمونه های مشابه ازنظر ریخت شناسی را با کمک این نشانگرها، از هم مجزا کنند. محمدی فارسانی و همکاران (۱)تنوع ژنتیکی۷۵ نژادگان مختلف چمن مرغ (جمع آوری شده از برخی نقاط ایران) را با کمک نشانگرهای مولکولی ISSR و برخی صفات ریخت شناسی ارزیابی کردند.از بررسی داده های مولکولی، نژادگان مورد مطالعه را در ۷ گروه بر اساس محل انتشار، سطوح چندگانی و برخی ویژگی های ریخت شناسی قرار دادند. نتایج به دست آمده از بررسی صفات ریخت شناسی نشان دادندکه از بین نژادگان مذکور، ۲۳نژاد دراصفهان ازنظرکیفیت ظاهری پتانسیل مناسبی برای ایجاد چمن داشتند.

مواد و روش ها

برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه استبرق از گیاهان موجود در مناطق و ارتفاعات مختلف جیرفت نمونه برداری شد.

استخراج DNA از نمونه‌های استبرق، با استفاده از روش (۲) Doyl & Doyl و اعمال تغییراتی در آن انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز اندازه گیری شد.

برای انجام آزمایشات ISSR از آغازگرهای مکمل با توالی های ریزماهواره ای همراه با یک، دو و سه نوکلئوتید انتخابی در انتهای 3' و 5' استفاده گردید. واکنش تکثیر شامل ۱ ماکرولیتر DNA الگو، بافر PCR[1] (۱۰x) ۲ماکرولیتر، آنزیم *Taq* DNA polymerase[2] ۰/۵ ماکرولیتر، کلرید منیزیم[3] (۵۰ میلی مولار) ۱ ماکرولیتر، ، آغازگرها ۲ ماکرولیتر، آب مقطر ۱۳/۱، دزوکسی نوکلئوتیدها[4] (۱۰ میلی مولار) ۰/۴ ماکرولیتر بود، که در مجموع حجم محلول واکنش PCR به ۱۷ ماکرولیتر می رسید. مخلوط حاصله سریعا تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه PCR قرار گرفت.

مقدار ۸ میکرولیتر از مخلوط حاصل در چاهک‌های ژل پلی اکریل آمید ۴۰٪ واسرشت ریخته شد. نمونه‌ها به مدت حدود سه ساعت با وات ثابت ۲۵۰ الکتروفورز شدند. پس از این مرحله، ژل به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. باند های چند شکل از روی ژل با اعداد صفر و یک کدگذاری شدند.

---

1. PCR buffer
2. Taq polymerase
3. $MgCl_2$
4. dNTPs

www.SID.ir

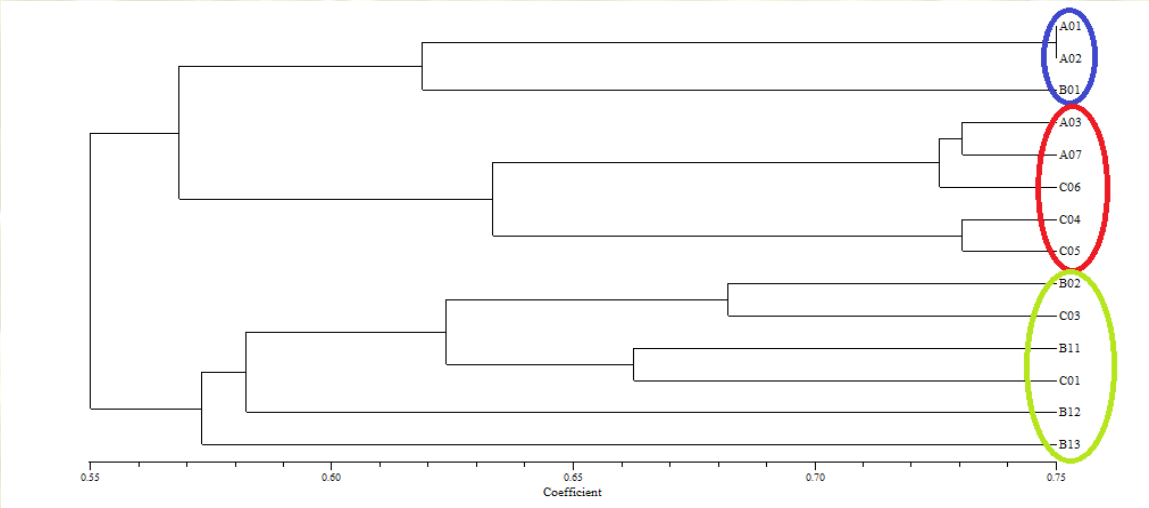
Archive of SID

به منظور گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های ISSR، از ضرایب تشابه جاکارد و روش UPGMA استفاده شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار NTSYS Ver. 2.02 انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این آزمایش ۹ آغازگر به صورت انفرادی استفاده گردید. آغازگرهای مورد استفاده دارای توالی های تکراری CT, AG, GA, GT, AGوGA (۸ مرتبه) بودند. تمام آغازگرهای مورد آزمایش در بین دو یا چند رقم چندشکلی نشان دادند. از این تعداد آغازگر ۲۹۵ نوار تولید شد که ۱۰۶ نوار آن چندشکل و بقیه یک شکل بودند. نوارهای چندشکل بر اساس وجود و یا عدم وجود باند کدگذاری شدند و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Ver.2.02 و با روش جاکارد ماتریس تشابه تهیه و دندروگرام مربوط به ۱۴ رقم ترسیم شد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۴۰/۵٪) مربوط به نمونه های A03 و C03 است و بیشترین شباهت (۷۲/۶٪) بین نمونه های A03 و A07، A07 و C06 می‌باشد. در دندروگرام حاصله دو گروه با ۶ زیر مجموعه و یک گروه با سه زیر مجموعه ایجاد شد. گروه‌بندی به دست آمده در موارد کمی از مواقع با صفات مورفولوژیک موجود مطابقت نداشت. عدم تطابق صفات مورفولوژیک با گروه‌بندی بر اساس نشانگر ISSR می‌تواند مربوط به تاثیر شرایط اقلیمی متفاوت باشد.

دندروگرام گروه‌بندی ۸ توده کارتاموس لاناتوس بر اساس فاصله‌ی ژنتیکی نئی، با روش UPGMA



در مجموع تکنیک ISSR برای طبقه بندی گیاهان استبرق مفید است و شاید استفاده از آغازگرهای زیادتر کمک بیشتری برای تفکیک و گروه‌بندی ارقام نماید. تنوع ژنتیکی قابل توجهی درون استبرق های بومی استان کرمان وجود دارد و نمونه های استبرق از نظر سطح تنوع ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند.

عوامل محیطی و تکثیر جنسی احتمالادلیل اصلی ایجاد فاصله ژنتیکی بین نمونه ها می باشند.

برخی از منابع

۱- **محمدی فارسانی، ط.، اعتمادی، ن.، طباطبائی، ب، الف. ۱۳۸۷.** ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه های گیاه چمنی مرغ با استفاده از نشانگر های ملکولی ISSR. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۹(۲): ۹۶-۸۳.

2- **Doyle**, J. J., and **Doyle**, J. L. **1988**. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13-15.

3- **Zhang, L. H., P. Ozias-Akins, G. Kochert, S. Kersovich, R. Dean, and W. Hanna. 1999.** Differentation of bermudagrass (cynodon spp.) genotypes by AFLP analyses. Theor. Appl. Genet. 98:895-902.

www.SID.ir

Archive of SID

Using ISSR Markers in Genetic Diversity Milkweed

Abstract

Identification and classification of milkweed plants in different heights using ISSR markers were studied. For this purpose, next to DNA extraction, optimization of Conditions and Different concentrations of materials used in the PCR, 9 primers were used individually and in combination. in total, 259 Pieces were amplified that, 106 of them were polymorphic fragments. Statistical analysis was performed using jakard method and NTSYS Ver.2.02 software. PIC levels for different markers , were variable from 0.37 for ISSR2 marker to 0/46 for ISSR5 and ISSR9 markers. 14 samples were classified into three groups that 2 groups have 6 samples and 1 group has 3 samles. In total, ISSR technique is useful for classifying milkweed plants and perhaps more helpful for identification and grouping of samples, using more markers. Considerable genetic variation exists within kerman native milkweeds and Milkweed examples are different in levels of genetic diversity. Likely The main reason for the creation of genetic distance Between samples are Environmental factors and sexual reproduction.

Keywords: Milkweed, genetic diversity, ISSR

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

اصول تنظیم قراردادها

مقاله نویسی علوم انسانی