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

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های اسفناج بومی ایران (Spinacia oleracea L.) با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره

سحر جهانبازی[1]، خلیل عالمی سعید[2]، علی اکبر مرآتان[2]، سید عبدالله افتخاری[3]

دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه رامین خوزستان[1] عضو هیئت علمی دانشگاه رامین خوزستان[2] عضو هیئت علمی دانشگاه شهید چمران اهواز[3]

Sahar.jahanbazi@gmail.com

چکیده:

تعیین میزان تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی گیاهی اولین قدم در برنامه‌های اصلاح نباتات است. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی، ۲۰ رقم اسفناج ایرانی در ۵ تکرار با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه ۱۰ جفت آغازگر بکار گرفته شد. ۲ جفت از آغازگرهای استفاده شده به علت عدم تکثیر باند از ادامه آزمایشات حذف شدند. سیستم مارکر در مجموع توانست ۴۲ آلل را با اندازه‌ی بین ۲۸۰- ۱۱۰ جفت باز شناسایی کنند. آغازگر X17631، X80044 و U33330 با ۷ آلل و آغازگر X66559 با ایجاد ۴ آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل را داشتند. میانگین تعداد آلل‌های آشکار شده به ازای هر جایگاه ۴/۹۶۳ برآورد شد. بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۴ جایگاه X17031، با فراوانی ۰/۴۶۰ و. کمترین فراوانی آللی مشاهده شده ۰/۰۰۵ مربوط به آلل ۶ جایگاه X17162 می‌باشد. بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی با مقدار ۰/۸۳۹ و ۰/۷۰۳ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای X80044 و Z66559 مشاهده گردید. میانگین PIC به‌دست آمده برای تمام جایگاه‌ها برابر با ۰/۷۷۴ بود که هتروزیگوسیتی بالا را در این توده‌ها نشان داد. گروه‌بندی با استفاده از ضریب تشابه نی و الگوریتم UPGMA، توده‌ها را در چهار گروه قرار داد.

کلمات کلیدی: اسفناج، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، هتروزیگوسیتی

مقدمه:

اسفناج (Spinacia oleracea L.)، گیاهی علفی و دو پایه متعلق به خانواده‌ی Chenopodiacea می‌باشد و یکی از مهم‌ترین سبزیجات برگی از نظر میزان تولید است. در گزارش‌های متعددی اسفناج را بومی آسیای مرکزی و به احتمال زیاد ایران دانسته‌اند. اسفناج یک منبع عالی از مواد معدنی و ویتامین‌ها به شمار می‌رود. این مواد شامل؛ ویتامین K، ویتامین A، منگنز، منیزیم، فولیک اسید، آهن، ویتامین C، ویتامین B2 و پتاسیم می‌باشند. هم‌چنین دارای مقدار زیادی فیبر و امگا-۳ نیز می‌باشد. مید و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در اسفناج را بر روی سلول‌های سرطانی بررسی کردند و گزارش دادند که این آنتی‌اکسیدان‌ها تأثیر معنی‌داری روی رشد سلول‌های سرطانی دارند.

آگاهی از میزان تنوع در میان ژنوتیپ‌های گیاهان، اولین گام در اصلاح برای صفت مهم زراعی است. روش‌های مختلفی جهت تعیین تنوع ژنتیکی ارقام وجود دارد و در این میان استفاده از نشانگرهای مولکولی که چند شکلی بالایی را نشان داده و از اثرات محیطی نیز تأثیرپذیری کمتری دارند از کارایی بیشتری برخوردار هستند در بین نشانگرها، ریزماهواره‌ها به علت چندشکلی بالا، هم‌بارز بودن و عدم تأثیر از شرایط محیطی، به عنوان نشانگری مطمئن مطرح هستند.. ریزماهواره‌ها توالی‌های کوتاهی از DNA هستند که پشت سر هم تکرار شده‌اند و بصورت اختصاصی عمل می‌کنند. اغلب این توالی‌های تکراری از واحدهای دی‌نوکلئوتیدی تشکیل شده اما تکرارهای سه و چهار نوکلئوتیدی نیز در ژنوم گیاهان دیده شده است. گروبن و همکاران (۱۹۹۸) توانستند شصت تکرار توالی ساده

www.agrobreedcongress.ir

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran

۴-۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

(SSR) در ۲۳۷ توالی اسفناج با یک DNA کلی ۳۴۲/۴ کیلو بازی یافت کنند که پس از حذف توالی‌های تکراری ۵۰ ریز ماهواره مختلف باقی ماندند. اختلاف بین DNA هسته و کلروپلاست در تعدادی از ریزماهواره‌ها وجود داشت که این اختلاف بین نوع و طول ریز ماهواره‌ها بود.

مواد و روش‌ها:

این تحقیق در سال ۹۳-۱۳۹۲ در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گردید. مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۲۰ توده اسفناج بومی ایران در ۵ تکرار بوده است که در مرحله ۶-۴ برگی از هر توده ۲ برگ با اندازه متوسط جدا گردید و پس از انجماد سریع در ازت مایع تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰°C- نگه‌داری شد. برای استخراج DNA ژنومی، یک گرم از بافت برگی جمع‌آوری شده از هر بوته در هاون چینی و در حضور ازت مایع پودر شد و استخراج DNA به روش موری و تامسون صورت گرفت. سپس کمیت و کیفیت DNAهای حاصله با روش اسپکتروفتومتری و نیز مقایسه تراکم باندهای DNA هر نمونه در روی ژل آگارز در بافر TBE با تراکم باندهای نشانگر ۱۰۰bp تخمین زده شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از ۸ جفت آغازگر SSR اختصاصی اسفناج استفاده شد. واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X.(Cinnagen Co)، ۰/۷۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز و ۲ میکرولیتر از هر آغازگر و ۲میکرولیتر DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه و به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای مناسب بسته به نوع آغازگر به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود. تکثیر انتهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط شد. سپس در چاهک ژل اکریل‌آمید ۱۲درصد غیر واسرشت‌ساز بارگذاری شد و به مدت ۳ الی ۴ ساعت با ولتاژ ۱۶۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد (). بعد از ظاهر شدن باندها بر روی ژل توسط یک دوربین از این ژل ها عکس گرفته شد. سپس با استفاده از نرم افزار UVIDoc دامنه آللی به دست آمد که این اعداد در واقع اعداد مورد نیاز جهت آنالیزها به شمار می آمدند. از نرم‌افزار SAS برای انجام تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده شد. از نرم افزار Excel جهت محاسبه مقادیر آماره‌های مختلف نظیر PIC و Ho و رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث:

نتایج حاصل از بررسی کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده نشان داد که DNA بدست آمده دارای کیفیت مناسبی جهت انجام واکنش‌های PCR بوده‌اند. در مجموع ۴۲ آلل چند شکل برای ۸ جایگاه ژنی مورد بررسی، توسط آغازگرها تولید شد، که آغازگر X17631و X80044 و U33330 با ۷ آلل و آغازگر X66559 با ایجاد ۴ آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد آلل‌های آشکار شده به ازای هر جایگاه ۴/۹۶۳ آلل برآورد شد. در حالی‌که در نتایج گروبن وهمکاران (۱۹۹۸) بیشترین آلل تولیدی مربوط به آغازگر U03006 با ۳ آلل و کمترین آلل تولیدی مربوط به آغازگر U33330 با یک آلل بود.. در تمام جایگاه‌های مورد مطالعه آلل‌های چندگانه ایجاد شد. بیشترین و کمترین میزان PIC با مقدار ۰/۸۳۹ و ۰/۷۰۳ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای X80044 و Z66559 مشاهده گردید. میانگین PIC به‌دست آمده برای تمام جایگاه‌ها برابر با ۰/۷۷۴ بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان گفت که نشانگر X80044 با بیشترین PIC توانسته است بهتر از بقیه نشانگرهای استفاده شده تنوع موجود بین و درون نمونه‌ها را مشخص کند. بیشترین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت ورامین بذر

www.SID.ir

Archive of SID

گرد (۰/۵۱۵) و کمترین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت ارومیه (۰/۳۶۲) بود. بیشترین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز مربوط به جمعیت ورامین بذر گرد و تبریز (۰/۹۵۰) و کمترین میانگین مشاهده شده نیز جمعیت ارومیه (۰/۶۲۵) بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال وجود خودگشنی در جمعیت ارومیه وجود دارد. در بیشتر جایگاه‌ها میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیش از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود. به‌طوری که در ۱۱۰ ترکیب جایگاه در توده یعنی در ۶۸/۷۵ درصد آنها از نظر حداقل سه جایگاه کاملا هتروزیگوت و در ۲۷/۵ درصد بیش از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود و فقط در ۳/۷۵ درصد موارد میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود. زیاد بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار نشان می‌دهد که هتروزیگوسیتی در این گیاه مطلوب‌تر است. به نظر می‌رسد. نتایج به دست آمده از بررسی تنوع در درون و بین جمعیت‌ها به وسیله تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین جمعیت‌ها ۸۵ درصد و تنوع درون جمعیت ۱۸ درصد می‌باشد. این مطلب حاکی از این است که توده‌های مورد مطالعه در درون خود تنوع کمی دارند و تنوع کافی برای انجام برنامه‌های اصلاحی را دارا نمی‌باشند.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

شماره	نام آغازگر	توالی تکراری	توالی آغازگر در رشته پیشرو و معکوس	دمای اتصال
۱	U03006	(GAA)9	F: ACTAGTGAGGGGGCCAGTTTACA R: CAGCTGAGGCTCTTCTTCTTCTTC	۶۱
۲	U33330	(GCAACA)5	F: GGTACTCCATCCGTCCCAACC R: TCCAAAAGAAGCGGCCATGT	۴۷
۳	X73298	(AG)15	F: GGATCATCACTGGAGAAACACA R: GCAACACTAAAAATACCCTAATCG	جواب نداد
۴	X17031	(TCA)6(TCTTCA)3	F: CTGCTCATTTCTGGTTTGATTGG R: TCGGGTGTGTTATGATAGGTTGG	۵۵
۵	X13134	(TAT)9	F: TGCTTGGGTTCTATTGGTC R: TTTTTTTTACAGAAGTGAATGCAA	جواب نداد
۶	X56691	(AGAGGC)5	F: AGGTAGAGGCAAAGGAAGAGGCA R: ACAGAACCGGAAAAAAAAAAAGGG	۶۱/۴
۷	X80044	(AAG)8	F: TGAAATCAACAACGATTACGC R: AAGAACAAAGCAAGATAAGGTTCC	۵۹
۸	X77162	(TCA)6	F:CCTGAGGTGCAGAACAATAACACG R: GAGGGGATTTCACCTTAACCTTGC	۶۱/۴
۹	X17257	(AT)7GT(AT)7	F: GCGTTTCTAATTGCACCATATCA R: TTTGGCGGTTGGTAGGTTTG	۵۳
۱۰	Z66559	(CAA)7CGA(CAA)3	F: AGGGATAGTTTCGACACGGAGAGA R: TTTAAGGGCAAAGGGAGCATCA	۶۳

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس مولکولی

منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس تخمینی	درصد		F	F < Pr
بین جمعیت‌ها	۱۹	۴۶۳/۱۲۰	۲۴/۳۷۵	۴/۷۱۰	۸۵	B	۰/۸۵۱	۰/۰۱۰
درون جمعیت‌ها	۸۰	۶۶/۰۰۰	۰/۸۲۵	۰/۸۲۵	۱۸	W		
کل	۹۹	۵۲۹/۱۲۰		۵/۵۳۵	۱۰۰	B+W		

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Greesshoff, P. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.

Groben, R., Wricke, G., 1998. Occurrence of microsatellites in spinach sequence from computer databases and development of polymorphic SSR markers. Plant Breeding 117: 271-274.

Maed, N., Yoshida, H., Mizushina, Y., 2010. Spinach and Health: Anticancer effect. Bioactive f oods in promoting health.Fruits and Vegetables Academic Press; 2010; 393-405.

Murray, G. C., Thampson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acid Resources, 8, 4321-4325.

Panaud, O., Chen, X., McCouch, S. R., 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (Oryza sativa). Mol. Gen. 252: 597-607.

Investigation of genetic diversity among native populations of Spinach Iranian (Spinacia oleracea L.) by Microsatellite Markers

Abstract

Determine the extent of genetic variation in the inheritance of plant resources is the first step in breeding programs. In order to determine the genetic diversity of 20 Iranian spinach cultivars using microsatellite markers were studied in five replicates. In this study, 10 primer pairs were used. 2 pairs of primers were used in the experiments were removed from the band due to non-proliferation. Marker systems have a total of 42 alleles with a size between 110-280 bp to detect. Primers X17631, X80044 and U33330 7 allele and X66559 started creating 4 allele had the highest and lowest number of alleles. The mean number of alleles detected per locus 4.963, respectively. The highest allele frequency of allele 4 position X17031, with a frequency of 0.460. The lowest allele frequency was observed in 0.005 to 6 allele status is X17162. Polymorphism information content of the lowest 0.839 and 0.703 the primers X80044 and Z66559, respectively, were observed. Mean PIC obtained for all positions equal to 0.774 in the high heterozygosity of the masses. Grouped using Nei's genetic similarity algorithm and UPGMA, the masses of the four groups.

Keywords: spinach, genetic diversity, microsatellite markers, heterozygosity

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