SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)

Archive of SID

هفدهمین کنفرانس سراسری و پنجمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران

بررسی تنوع ژنتیکی گردو با استفاده از نشانگر های ریزماهواره

زهرا سفیدکوهی*[۱]، علی سلیمانی[۲]، حسین جعفری[۳]، مهدی طاهری[۴]، ابراهیم دستکار[۵]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه زنجان
۲- عضو هیئت علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۳و۴- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان
۵- کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه زنجان
zsefidkouhi89@yahoo.com

چکیده: برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ گردوی ایرانی در استان زنجان از ۱۳ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. سیستم مارکر در مجموع توانست ۳۷ آلل را با اندازه ای بین ۳۰۸- ۱۶۰ جفت باز شناسایی کند. میانگین تعداد آلل ها برای ۱۳ مکان ژنی، ۲/۸آلل بود. بر اساس مطالعات مورفولوژیکی بین این ژنوتیپ ها تنوع قابل ملاحظه ای مشاهده نشد ولی با کاربرد نشانگر های ریزماهواره بر روی این ژنوتیپ ها تنوع بارزی نمایان شد. لذا پیشنهاد می گردد به منظور افزایش کارایی برنامه های اصلاحی جهت بررسی دقیق تنوع ژنتیکی از نشانگرهای ریزماهواره استفاده گردد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، گردو، نشانگر ریزماهواره

Evaluation of genetic diversity of walnut using microsatellite markers

Abstract: To investigate the genetic diversity among 21 Iranian walnut genotypes in Zanjan province 13 Microsatellile primer pairs were used. The marker system produced 37 alleles in a range size of 160-308 bps. The average number of alleles for 13 loci was about 3 alleles. Based on morphological studies, there was not considerable variation within the genotypes while using of SSR markers showed a significant genetic variation within walnut genotypes. It can be proposed that SSR markers can contribute efficiently in breeding programs of walnut due to high level of polymorphism.

key words: Genetic diversity, Walnut, Microsatellile marker

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گردوی ایرانی با نام علمی Juglans regia L. گیاهی از خانواده juglandaceae می باشد. در میان ۲۱ گونه جنس juglans، گردوی ایرانی از نظر تولید دانه خوراکی بهترین گونه شناخته شده است. کشور ایران بعد از کشورهای چین و آمریکا با سطح زیر کشت ۶۰۶۰۰ هکتار، میزان تولید ۲۷۰۳۰۰ تن و میزان عملکرد ۴۴۶۰۴ کیلوگرم در هکتار مقام سوم را در بین کشورهای تولید کننده گردو داراست [۶]. با توجه به وجود ذخایر ژنتیکی با ارزش این گیاه در کشور، انجام پژوهش روی آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. یکی از راه‌های مهم افزایش عملکرد و کیفیت هر محصول اصلاح ژنتیکی آن است که پایه و اساس این کار، بررسی صفات مهم مورفولوژیکی و شناسایی ژنوتیپ های برتر می باشد[۷]. با به کار گیری نشانگرهای مولکولی این کار با سرعت و سهولت بیشتری انجام شده و موقعیت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به هم مشخص شده و انتخاب والدین برای تلاقی‌های بعدی در برنامه های اصلاحی با اطمینان بیشتری صورت می گیرد [۲]. فناوری ریز ماهواره (SSR) یکی از روش هایی است که به طور گسترده در بررسی های ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد [۴]. وسته و همکاران [۱۰] تعداد ۳۰ نشانگر هسته ای ریزماهواره را در گردوی سیاه شناسایی کردند و از آن ها برای مطالعات ژنومی، ژنتیک توده، و تعیین ژنوتیپ کلونی بر اساس دی ان ا، مطالعات جریان ژنی و اصلاح درختان استفاده کردند. پوله جیونی و همکاران [۸] از ۱۳ آغازگر ISSR و ۱۷ آغازگر RAPD و ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره جهت شناسایی گونه و هیبریدهای درون گونه ای جنس ژوگلانس استفاده کردند. این نشانگر ها به ترتیب ۱۶۲، ۱۸۸، ۱۱۳ باند ایجاد کردند و کل نمونه ها را به ۳ گروه ۸۱ ژنوتیپ J.nigra ۴۹ ژنوتیپ J.rejia و ۸ ژنوتیپ هیبرید بین گونه ای تقسیم کردند. در این تحقیق استفاده از ۱۳ جفت نشانگر ریزماهواره بر۲۱ ژنوتیپ ایرانی گزارش می شود.

مواد و روش ها

این پژوهش در طی سال های۹۱-۹۰ انجام شد. ژنوتیپ های مورد استفاده در این پژوهش از کشت و صنعت خرمدره واقع در استان زنجان جمع آوری گردید. ۲۱ ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۰ ژنوتیپ ناشناخته که حاصل از پروژه های بهنژادی کشت و صنعت خرمدره بودند و یک ژنوتیپ شناخته شده (رقم چندلر) به عنوان شاهد انتخاب شد. DNA ژنومی از برگهای تازه و جوان به روش ورابی و همکاران استخراج شدند [۹]. کیفیت DNA استخراج شده با ژل آگارز ۱ درصد و کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتری تخمین زده شد. در این پژوهش ۱۳جفت آغاز گر ریزماهواره مورد استفاده قرار گرفت. این آغازگرها بر اساس بررسی های قبلی انجام شده توسط وسته و همکاران [۱۰] و دانگل و همکاران [۵] انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر شامل، ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومیک، ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۳۶ میکرولیتر $mgcl_2$، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۲۴ از dNTP و یک واحد Taq پلی مراز با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه ، ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۲۰ ثانیه در دمای مرتبط با توالی آغازگر، ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه، ۶ دقیقه در ۷۲ درجه به عنوان بسط نهایی در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) انجام شد (Cipriani *et al*, 2002). محصولات PCR قبل از بار گذاری با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری واسرشته ساز مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه واسرشته شده و بلافاصله روی توده یخ منتقل شدند. ۱۰ میکرولیتر از این ترکیب را روی ژل پلی اکریل آمید استاندارد ۸ درصد بارگذاری و با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی (PNP-1000d, IRAN) با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴ ساعت ونیم انجام و سپس رنگ آمیزی ژل به کمک نیترات نقره انجام گردید. پس از تفکیک قطعات ریزماهواره

www.SID.ir

Archive of SID

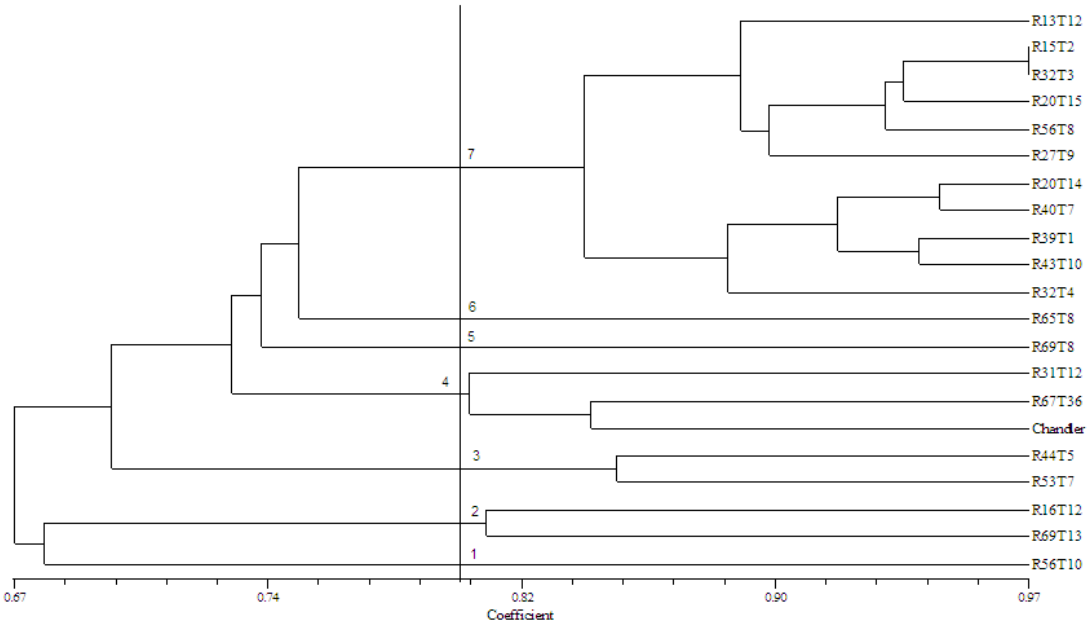
روی ژل پلی اکریل آمید، باندهای حاصله به‌صورت هم بارز و کد دواسمی (۰= عدم حضور و ۱= حضور، برای آنالیزهای تجزیه تابع تشخیص و رسم دندرو گرام) نمره‌دهی شد. تجزیه تابع تشخیص و رسم دندروگرام به کمک نرم افزار آماری Ntsys انجام شد. برای بررسی محتوای اطلاعاتی ریزماهواره ها پارامتر هایی از قبیل Ho هتروزیگوستی مشاهده شده) و He (هتروزیگوستی مورد انتظار) با نرم افزار GenAlex ۶/۴۱ استفاده شد.

نتایج و بحث

۱۳ جفت نشانگر ریزماهواره مذکور در مجموع ۳۷ آلل را در محدوده باندی (۳۰۸-۱۶۰ جفت باز) شناسایی کردند. میانگین تعداد آلل ها برای نشانگرهای ریزماهواره مذکور ۲/۸ بود. در ارتباط با اندازه آلل های تولید شده نیز می توان گفت که تقریباً همه‌ی آغازگرهای مورد استفاده، نوارهای مطابق با اندازه مورد انتظار در گردو تولید نمودند. برای بررسی محتوای اطلاعاتی ریزماهواره ها از پارامترهایی از قبیل هتروزیگوستتی مشاهده شده و هتروزیگوستی مورد انتظار استفاده شد. هتروزیگوستی مورد انتظار از ۰/۰۴ تا ۰/۶۶ تغییرکرده و دارای میانگین ۰/۴ بود. هتروزیگوستی مشاهده شده از ۰/۱ تا ۱ تغییر کرده و دارای میانگین ۰/۴۳ بود. با توجه به تمایل ژنوتیپ های گردو به گرده افشانی آزاد میتوان بزرگتر بودن هتروزیگوستی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوستی مورد انتظار را توجیه کرد. بیشترین میزان اطلاع چند شکلی که معادل هتروزیگوستی مورد انتظار می باشد ۰/۶۶ و مربوط به جایگاه ژنی WGA276 و کمترین مقدار آن ۰/۰۴ مربوط به جایگاه ژنی WGA071 می باشد. دو مکان ژنی WGA276 و WGA202 بیشترین شاخص چند شکلی (محتوای اطلاعات چندشکلی) را به خود اختصاص دادند. بنابراین پیشنهاد می شود از این مکان های ژنی ریزماهواره برای آنالیزهای دیگر ژرم پلاسم گردوی کشور استفاده شود. اطلاعات به دست آمده از مکان ژنی WGA276 با مطالعات احتشام نیا و همکاران [۱] مطابقت دارد. دندرو گرام حاصل از تجزیه خوشه ای اطلاعات ۱۳ نشانگر ریزماهواره، در ژنوتیپ های گردوی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA در شکل نشان داده شده است. در این شکل ژنوتیپ های مورد بررسی به ۷ گروه تفکیک شده است. گروه ۷ بیشترین ژنوتیپ ها را در خود جای داده است. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی نشان داد که سه مولفه ی اول ۵۰/۸۳ درصد تغییرات را توجیه می کند. نتایج تجزیه به مولفه های اصلی مطابقت خوبی با نتایج حاصل از دندروگرام دارد. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه مفید بودن توانایی نشانگرهای ریزماهواره برای تشخیص تنوع میان ژنوتیپ ها را بیان می کند که نشانگر این است که تشخیص ارقام بر مبنای ویژگی های مورفولوژیکی به تنهایی نمی تواند تعیین کننده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- دندروگرام حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ ها با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه دایس

www.SID.ir

Archive of SID

[۱] احتشام نیا، ع. شریفانی، م. وحدتی، ک و عرفانی مقدم، و. ۱۳۸۸، بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده های گردوی بومی استان گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی ریز ماهواره(SSR)، مجله پژوهش های تولید گیاهی، شماره ۴، (۳۹-۵۸).

[2] فتاحی مقدم، م. ر. ابراهیمی، ع و زمانی، ذ. ۱۳۸۶، بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ های گردوی ایرانی(*Juglans rejia* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی رپید RAPD، مجله علوم باغبانی ایران، شماره ۱،(۵۴-۴۵).

[۳] نقوی، م. ر. قره یاضی، ب و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶، نشانگر های مولکولی،انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۴ صفحه.

[۴] Bebli C. 2012. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut *(Juglans regia L.)* cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*,125, 584–592.

[۵] Dangl G.S., Woeste K., Aradhya M.K., Koehmstedt A., Simon C., Potter D., Leslie C., and McGranahan G.H. 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. J. Am. Soc. Hor. Sci. 130, 348-354.

[۶] http://www.fao.org/

[۷] Potter D., Gao FY., Aiello G., Leslie CA. and McGranahan GH. 2002. Intersimple sequence repeats markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. Journal of American Society for Horticultural Sciences, 127, 75-81.

[۸] Pollegioni P.A., Major A., Bartoli S., Dussi F., and Malvolti M.E. 2004. Application of del mp3 microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. Acta. Hort. 705, 191-197.

[۹] VrohBi, I., Hraventg, L., Chadelier, A., Mergiai, G. and Dujardin, P. 1996. Improved RAPD amplification of recal citrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breed. 115, 205-206.**[۱۰] Woeste K., Burns R., Rhodes O. and Michler C. 2002.** Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. J. Hered,93, 5-60.

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)