جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ارزیابی تنوع ژنتیکی ناخنک (*Astragalus hamosus* L.) در مناطقی از ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

نادره نادری نائینی*[1]، مهدی هادی‌پور[2]، سمیه شهرزادی[3]، آمنه احمدی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان
۲- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی منابع گیاهی، اولین و مهم‌ترین گام در جهت برآورد اهداف اصلاحی می‌باشد. کشور ایران به عنوان یکی از مراکز مهم تنوع گونه‌های گون می‌باشد که در بین آن‌ها، ناخنک (*Astragalus hamosus* L.) از خانواده بقولات به دلیل دارا بودن خواص دارویی فراوان از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به مشکلات موجود در اصلاح این گیاه، استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA ابزار قدرتمندی در ارزیابی ژرم‌پلاسم و بهره‌برداری‌های بهنژادی به شمار می‌آید. در این تحقیق، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ ناخنک، پس از استخراج DNA، از ۱۰ آغازگر ISSR برای تکثیر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید. پس از امتیازدهی باندهای DNA بر اساس صفر (وجود باند) و یک (عدم وجود باند)، تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار NTSYS انجام شد. این آغازگرها ۸۷ باند چندشکل تولید کردند که ۸۹ درصد از کل ۹۸ باند تکثیر شده را شامل گردید. متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ۸/۷ برآورد گردید. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب ۰/۶۴۴ و ۶/۱۵۳ محاسبه شد. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش میانگین فواصل (UPGMA) و ماتریس تشابه تطابق ساده، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد که بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو نمونه ناخنک از ورزنه مشاهده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای با گروه‌بندی تجزیه مولفه‌های اصلی همخوانی داشت. در مجموع نتایج نشان داد که نشانگر ISSR نشانگری قابل اطمینان در آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ناخنک در مطالعات اصلاحی آینده مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: ناخنک *Astragalus hamosus* L.، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

از آنجا که ایران خاستگاه اصلی و یکی از مراکز مهم تنوع گون‌های گون می‌باشد، بررسی تنوع ژنتیکی گون امر مهمی است [2]. جنس گون (Astragalus) یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های گیاهی ایران است که در بین گونه‌های مختلف گون، گیاه ناخنک (*Astragalus hamosus* L.) یکی از گیاهان متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) می‌باشد [8].

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در مراحل مختلف انجام یک پروژه اصلاحی و جهت بهره‌برداری از منابع ژرم‌پلاسمی امری ضروری است. بررسی تنوع ژنتیکی با روش‌های متفاوتی امکان‌پذیر است که از میان این روش‌ها، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره-ای پلیمراز (PCR) روشی قدرتمند برای شناسایی چندشکلی DNA و بررسی تنوع ژنتیکی است. مستقل بودن این نشانگرها از اثرات محیطی باعث می‌شود که برای دسته‌بندی و منشأیابی ژنوتیپ‌ها مفید باشند [3].

یک نوع از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، نشانگر ISSR می‌باشد که اولین بار توسط ماریا و همکاران در سال ۱۹۹۳ معرفی شد و مبنای عملکرد آن تکثیر ترادف‌های DNA بین دو ترادف SSR معکوس می‌باشد. این نشانگر اصولاً از ریزماهواره‌هایی به طول ۱۶ تا ۲۵ جفت باز به عنوان آغازگر استفاده می‌کند [9]. مزایای این نشانگر قابلیت تکثیر زیاد، چندشکلی بالا، عدم نیاز به شناسایی ترادف ژنومی خاص و از معایب آن غیراختصاصی و غالب بودن آن می‌باشد [10]. در این تحقیق با توجه به توانمندی‌های این نشانگر، به مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ ناخنک با آغازگرهای ISSR پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۸ ژنوتیپ ناخنک از موسسه جنگل‌ها و مراتع ایران (کرج) جمع‌آوری گردید. در ابتدا DNA ژنومی از ۲۰۰ میلی‌گرم برگ جوان ناخنک به چندین روش مختلف استخراج شد و از بین انواع مختلف روش‌های استخراج، بهترین روش از نظر کمیت و کیفیت DNA انتخاب گردید [12]. سپس DNA ژنومی محلول بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، کمیت و کیفیت DNA با دستگاه بیوفتومتر ارزیابی شد و نمونه‌هایی که نسبت جذب ($OD_{۲۶۰/۲۸۰}$) آن‌ها بین ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب شدند. سرانجام از DNAهای انتخابی یک محلول پایه (استوک) با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد و برای واکنش PCR استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر برای تمامی ژنوتیپ‌ها بهینه شد. برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت [5] و سرانجام محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شدند.

برای امتیازدهی باندها، حضور و عدم حضور باند به ترتیب به صورت کد یک و صفر در برنامه Excel وارد شد. برای ترسیم دندروگرام به روش تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYS و انواع مختلف ضرایب تشابه استفاده شد و بهترین روش انتخاب گردید. تجزیه مولفه‌های اصلی برای تعیین نحوه پراکنش نشانگر در سطح ژنوم و تعیین سهم هر مؤلفه در توجیه تنوع انجام شد [11]. محتوای اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content) و شاخص نشانگر (Marker Index) به کمک فرمول (۱) محاسبه شد که pi فراوانی باند iام را نشان می‌دهد [13].

$$PIC=\sum [2pi\ (1-pi)] \qquad (1)$$

شاخص نشانگر از حاصلضرب محتوای اطلاعات چندشکلی در تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ISSR بدست می‌آید.

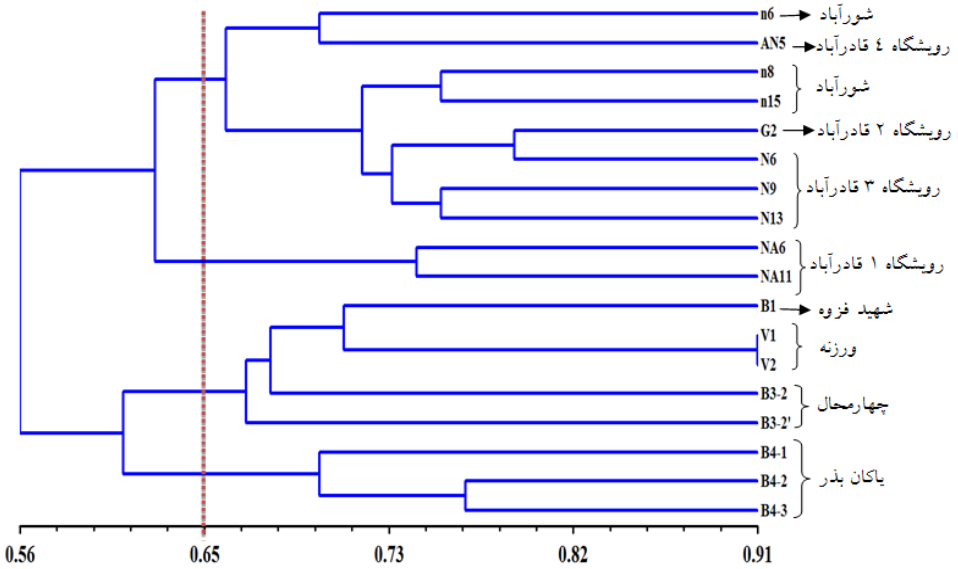
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پس از بررسی ۱۵ آغازگر ISSR از نظر کمیت و کیفیت باندهی، ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت. کل آغازگرها، ۹۸ باند تولید کردند که ۸۷ باند آن‌ها چندشکل بود. نتایج حاصل از باندهای تکثیر یافته آغازگرهای ISSR نشان داد که آغازگرهای شماره ۱۱ و ۱۵ بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) را تولید کردند. متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر و هر ژنوتیپ به ترتیب ۸/۷ و ۴/۸۳ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب ۰/۶۴۴ و ۶/۱۵۳ محاسبه شد. آغازگرهای شماره ۱۳ و ۲۲ بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر را داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو آغازگر نسبت به سایر آغازگرهای ISSR پتانسیل بالایی در تولید باند بیشتر داشته‌اند.

در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ توده متعلق به گونه A. adsurgens از شمال کشور چین با نشانگرهای ISSR و RAPD گزارش شد که ۱۲ آغازگر ISSR، ۱۱۶ باند و ۸۷ باند چندشکل تولید کرد [6].

در این تحقیق دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه تطابق ساده مناسب‌ترین دندروگرام با ضریب کوفنتیک ۸۰ درصد بود که ژنوتیپ‌های ناخنک را در ضریب تشابه ۶۵ درصد به چهار گروه تقسیم کرد (شکل ۱).



شکل (۱) دندروگرام تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تشابه تطابق ساده به روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS

گروه اول دندروگرام شامل ژنوتیپ‌های شورآباد و ژنوتیپ‌های رویشگاه دوم، سوم و چهارم قادرآباد از چهارمحال و بختیاری بود. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌هایی از رویشگاه اول قادرآباد، گروه سوم شامل دو ژنوتیپ ناخنک از ورزنه، یک ژنوتیپ از پژوهشکده فزوه و دو ژنوتیپ از چهارمحال و بختیاری و گروه چهارم شامل سه ژنوتیپ از شرکت پاکان بذر اصفهان بود. در کل دندروگرام بیشترین شباهت با ۹۱ درصد تشابه بین دو ژنوتیپ ناخنک از ورزنه مشاهده شد. در مجموع نتایج نشان داد که نشانگر ISSR به خوبی توانسته است ژنوتیپ‌های ناخنک را از نظر منشاء جغرافیایی از هم تفکیک کند.

در مطالعه‌ای با نشانگرهای RAPD، ISSR و DAMD در بررسی تنوع بین و درون گونه‌ای ۵۰ توده از چهار گونه آستراگالوس گزارش شد که این نشانگرهای مولکولی به خوبی توانستند تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها را آشکار سازند اما تنوع ژنتیکی با نشانگر ISSR تمایز بهتری را نسبت به دو نشانگر دیگر از خود نشان داد [4].

تجزیه مولفه‌های اصلی یک روش گروه‌بندی است که برای کامل کردن اطلاعات تجزیه خوشه‌ای استفاده می‌شود. در این تحقیق جهت بررسی توزیع فضایی ژنوتیپ‌ها با مقایسه فواصل فضایی و فواصل ژنتیکی بین آن‌ها، از تجزیه مولفه‌های اصلی استفاده شد. نتایج حاصل از آن نشان داد که سه مؤلفه اول ۴۱/۹۶ درصد از کل تغییرات را بین ۱۸ ژنوتیپ ناخنک توجیه نمودند. سهم مؤلفه اول، مؤلفه دوم و سوم به ترتیب ۲۱/۰۷، ۱۱/۸۱ و ۹/۰۸ درصد بود. نتایج بیانگر توزیع مناسب آغازگرهای ISSR در تمام سطح ژنوم گیاه ناخنک بود. نحوه گروه‌بندی تجزیه مؤلفه‌های اصلی نیز با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت.

در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ نمونه جمعیت گون زرد و سفید با نشانگرهای ISSR گزارش شد که نتایج تجزیه مولفه‌های اصلی توانست نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید کند [1]. در مطالعه تجزیه مولفه‌های اصلی سه واریته آستراگالوس *A. lentiginosus* گزارش شد که سه مؤلفه اول ۴۹/۶۰ درصد از کل تنوع را توجیه کرد که بیانگر مناسب بودن نشانگر AFLP جهت تعیین ارتباطات ژنتیکی درون واریته‌های آستراگالوس بود [7].

در مجموع نتایج بدست آمده نشان داد که آغازگرهای ISSR به کار رفته، لوکوس‌های سازگاری اقلیمی را به خوبی پوشش داده‌اند. بنابراین تنوع ژنتیکی حاصل از داده‌های مولکولی با منشأ جغرافیایی آن‌ها مطابقت داشت. بنابراین می‌توان گفت که نشانگر ISSR ابزار مناسب و موثری در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ناخنک می‌باشد.

منابع

رحیم‌ملک، مهدی، غریبی، فضیلتی، محمد، شیما و وهابی، محمد، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گون‌های زرد و سفید در مناطق حفاظت شده استان اصفهان با استفاده از نشانگر ISSR، مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، شماره اول، سال اول، ۱۳۹۰، صفحات ۳۴-۲۵

معظم، فهیمه، بررسی خصوصیات کروموزومی دو گونه مرتعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۱۳۸۸

نقوی، محمدرضا، قره‌یاضی، بهزاد و حسینی سالکده، قاسم، نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۸۶

٤.Anand, K.K. Srivastava, R.K. Chaudhary and L.B. Analysis of Genetic Diversity in Astragalus rhizanthus Benth. ssp. rhizanthus var. rhizanthus (Fabaceae) Using Molecular Markers from India. Journal of Botany, 2010, pp. 1-9.

٥.Butler, J.M. Ruitberg, C.M. and Vallone, P.M. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. Fresenius J Anal Chem., 2001, 369: 200-205.

٦.Huang, L.K. Chen, Zh. Zhang, Xi. Wang, Zh. and Liu, Ch. A Comparative Analysis of Molecular Diversity of Erect Milkvetch (Astragalus adsurgens) germplasm from North China Using RAPD and ISSR Markers, Biochem Genet., 2009, 47: 92-99.

٧.Knaus, B.J. Cronn, R.C. and Liston, A. Genetic characterization of three varieties of Astragalus lentiginosus (Fabaceae). Brittonia, 2005, 57(4): 334-344.
٨.Luo, M.C. Hwu, K.K. and Huang, T.C. Taxonomic study of Taiwan Astragalus based on genetic variation. Taxon, 2000, 49: 35-46.
٩.Pradeep Reedy, M. Salar, N. and Siddiq, E.A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
١٠.Reddy, M.P. Sarla, N. and Siddiq, E.A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
١١.Rohlf, M. (1998) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Varsion 2.02. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
١٢.Saunders, G.C. and Parkers, H.C. Annalytical molecular biology: Quality and validation, Trowbridge, Wiltshire, UK. 1999.
١٣.Thimmappaiah, W. Santhosh, G. Shobha, D. and Melwyn, G.S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae, 2008, 118: 1-7.
١٤. Vicente, M.J. Segura, F. Aguado, M. Migliaro, D. Franco, J.O. and Martinez-Sanchez, J.J. Genetic diversity of Astragalus nitidiflorus, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. Biochemical Systematics and Ecology, 2001, 39: 175-182.