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

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسي تنوع ژنتيكي درون و بين گونه هاي علفهاي چمني چندساله با استفاده از نشانگر مولكولي AFLP

مجيد طالبي بداف*[1]، بدرالدين ابراهيم سيد طباطبائي[2]، خورشيد رزمجو[3]، بهروز شيران[4]**

1- دانشجوي دكتراي اصلاح نباتات گرايش بيوتكنولوژي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه صنعتي اصفهان 2- گروه بيوتكنولوژي كشاورزي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه صنعتي اصفهان 3- گروه زراعت و اصلاح نباتات ، دانشكده كشاورزي، دانشگاه صنعتي اصفهان 4- گروه علوم زراعي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه شهركرد

چكيده

هدف از اين تحقيق بررسي تنوع ژنتيكي بين و درون گونه هاي مختلف چمن و برآورد روابط ژنتيكي آنها با استفاده از نشانگر AFLP بوده است. تعداد پنج گونه چمن به همراه پنج رقم از هر گونه انتخاب و با استفاده از نشانگر ملكولي AFLP و با استفاده از آنزيم هاي برشي *Pst*I و *Mse*I مورد مطالعه قرار گرفتند. نتايج حاصل در تجزيه خوشه اي به روش جاكارد مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت. با استفاده از 10 تركيب آغازگري، تعداد 1170 نوار حاصل شد كه تمام آنها در بين ارقام چندشكلي نشان دادند. از بين آغازگرهاي مورد استفاده، تركيب آغازگري P-AAG و M-CAG با 166 نوار، بيشترين تعداد نوار و تركيب آغازگري P-ACT و M-CGC با 81 نوار، كمترين تعداد نوار را توليد نمودند. در گروهبندي به دست آمده در اين تحقيق، 5 گونه مورد مطالعه در فاصله ژنتيكي 40 درصد به طور كامل از يكديگر جدا شده و در 5 گروه مختلف قرار گرفتند. ضمن اينكه رقم هاي متعلق به هر گونه نيز از يكديگر تفكيك گرديدند. برخي از اين نشانگرها گونه اختصاصي بودند كه از آنها مي توان در شناسايي گونه مورد نظر استفاده نمود. توليد تعداد باند زياد و ميزان چندشكلي بالا در گونه ها و رقم هاي مختلف چمن بيانگر آن است كه اين روش مي تواند بطور كارا و موثري در تعيين روابط ژنتيكي رقم هاي مختلف بين و درون گونه اي موفق عمل نموده است.

كلمات كليدي: علف هاي چمني چندساله، نشانگر AFLP، تنوع ژنتيكي، فاصله ژنتيكي

Inter- and intra-species genetic diversity in perennial grasses using AFLP marker

M. Talebi Bedaf[1], B.E. Sayed-Tabatabaei[2], K. Razmjoo[3] and B. Shiran[4]

Abstract

Identification of grass species is hindered due to the morphological similarities. This is in spite of the importance of selecting desirable parental genotypes of the crosses based on the genetic distances which is considered as the most critical step in a breeding program. Molecular techniques can be used to assess cultivars correctly. The aims of this study was to characterized grass species using AFLP techniques. Five species with five cultivars from each species were selected and AFLP reaction performed by *PstI* and *MseI* restriction enzymes and data analyzed using NT SYS-pc Ver. 2.02 software and Jaccard's method. Ten primer combination amplified 1170 bands that all of them were polymorphic between cultivars and species. The maximum and the minimum number of bands were produced by P-AAG & M-CAG and P-ACT & M-CGC with 166 and 81 bands respectively. In classification of this research, five species separated from each other in 40% genetic distance. Some of the markers were conserved in special species that can be used in identification of that species. The result showed that this technique is a robust and efficient tools for identification of genetic relationships of different genotypes within species. High level of bands and polymorphism makes AFLP one of the most powerful markers in determination and classification of species and different cultivars of grass.

Key words: perennial grass, AFLP marker, genetic diversity, genetic distance

1- PhD student of Plant Breeding-Biotechnology, Collage of Agriculture, Isfahan Univ. Technol. Isfahan, Iran.
2- Dept. of Agobiotechnology, Collage of Agriculture, Isfahan Univ. Technol. Isfahan, Iran.
3- Dept. of Agronomy and plant breeding, Collage of Agriculture, Isfahan Univ. Technol. Isfahan, Iran.
4- Dept. of Crop sciences, Collage of Agriculture, Shahrekord Univ., Shahrekord, Iran

مقدمه

نظر به اهميت فوق العاده چمن در طراحي و ايجاد فضاي سبز، اصلاح ارقام با كيفيت مناسب از اهميت ويژه اي برخوردار است. واريته هاي جديد چمن به طور اختصاصي براي خصوصيات مهمي از قبيل ظرافت برگ، رنگ، رشد كم و متراكم، مقاومت نسبت به عوامل نامساعد محيطي و امراض گياهي و ديگر ويژگيهاي مطلوب اصلاح مي گردند(زمان خانپور، 1372). از آنجائيكه صفات ظاهري چمن تحت تاثير عوامل محيطي بوده و تشخيص ارقام مختلف به وسيله اين صفات مشكل مي باشد، لذا استفاده از نشانگرهاي مولكولي براي شناسائي گونه و ارقام چمن ضروري به نظر مي رسد. نشانگرهاي ملكولي مبتني بر PCR روش قدرتمندي براي شناسايي چندشكلي هاي DNA و بررسي تنوع ژنتيكي است(Kubic و همكاران، 1999).AFLP يكي از روشهاي آنگشت نگاري DNA مبتني بر واكنش زنجيره اي پليمراز مي باشدكه توسطVos وهمكاران (1995) معرفي شد وداراي مزايايي نسبت به ساير روشهاي موجود مي باشد.
از نشانگرهاي AFLP به طور موفقيت آميزي براي تعيين تنوع ژنتيكي در تعدادي از گونه هاي گياهان شامل گياهان علوفه اي و علفهاي چمني استفاده شده است (Roldan-Ruiz و همكاران، 2000). Charmet و همكاران (1999) نيز براي توسعه نقشه هاي پيوستگي با تراكم بالا درچمنهاي دائمي ازAFLP استفاده نمودند. درسال 1999 Dupal و همكاران با استفاده از تكنيك AFLP به مطالعه تنوع ژنتيكي درون و بين گونه هاي چمن پرداختند و نتيجه گرفتند كه اين روش مي تواند براي مطالعه ژنوم و تجزيه فيلوژني آن بكار رود. Gilliland و همكاران (2000) براي مطالعه تنوع ژنتيكي در 12گروه چمن دائمي ازAFLP استفاده نمودند واظهار داشتند كه اين نشانگر تنوع بيشتري را با توجه به دقت بالاي مورد نياز تامين مي نمايد. Roldan-Ruiz و همكاران (2000) و نيز Guthridge و همكاران (2000) كاربرد نشانگرAFLP را براي آشكارسازي پلي مورفيسم در بين گياهان چمن داراي درجات متفاوتي از خويشاوندي مورد ارزيابي قراردادند ومشخص نمودند كه اين نشانگر قدرت تمايز بالا و همچنين توانايي تشخيص ارتباط ژنتيكي ميان گياهان چمن را داراست. Sweeney و همكاران (2000) از نشانگر AFLP در بررسي تنوع ژنتيكي چمن هاي ديپلوئيد استفاده نمودند. عليرغم استفاده از نشانگر AFLP در بررسي تنوع ژنتيكي ارقام علف هاي چمني خارجي، استفاده از اين تكنيك در بررسي ارقام داخلي ايران احساس مي گردد.

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

مواد و روش ها

در اين تحقيق تعداد پنج جنس و گونه از علفهاي چمني چند ساله شامل گونه هاي *Festuca rubra* var. Gaud. commutata، *Festuca arundinacea* Scherb، *Lolium prenne* L.، *Poa pratensis* L. و *Cynodon dactylon* از مركز تحقيقات محمودآباد اصفهان انتخاب گرديد و از هر كدام تعداد پنج رقم نمونه برداري شد.
استخراج DNA ژنومي به روش دلاپورتا (1983) انجام شد. مقدار و كيفيت DNA به دست آمده با استفاده از الكتروفورز ژل آگارز كنترل شد. انجام واكنش AFLP بر اساس روش Vos و همكاران (1995) صورت گرفت.
به منظور برش DNA از دو آنزيم برشي *Pst*I و *Mse*I استفاده گرديد.
تكثير قطعات متصل شده به آداپتورها طي دو مرحله انجام گرفت. ابتدا نمونه هاي مرحله قبل به نسبت 5:1 رقيق شدند و مقدار سه ميكروليتر از آنها در تكثير پيش انتخابي مورد استفاده قرار گرفتند. در اين مرحله از آغازگرهاي بدون نوكلئوتيد انتخابي در انتهاي '3 (P000 و M000) استفاده شد. در مرحله دوم تكثير، محصولات حاصل از مرحله تكثير پيش انتخابي به نسبت 5:1 رقيق شده و در واكنش تكثير انتخابي استفاده گرديد.
به منظور مشاهده الگوي باندي از ژل پلي اكريل آميد شش درصد واسرشت با هفت مولار اوره استفاده گرديد. پس از الكتروفورز، رنگ آميزي ژل به روش نيترات نقره انجام گرفت و از الگوي باندي به دست آمده عكس برداري شد. الكتروفورز با دستگاه توالي ياب Biometra (Sequencing gel) مدل S2 انجام گرفت.
پس از اتمام مراحل PCR، وجود و عدم وجود نوار با اعداد يک و صفر براي رقم هاي مورد مطالعه كدگذاري شد. سپس ماتريس تشابه تشكيل شده و تجزيه و تحليل داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 و به روش جاكارد انجام گرفت.

نتايج و بحث

در اين تحقيق با استفاده از 10 تركيب آغازگري در مجموع تعداد 1170 نوار (محدوده 50 تا 1000 جفت باز) حاصل شد كه تمام آنها در بين اين گونه ها چندشكلي نشان دادند. از بين آغازگرهاي مورد استفاده، تركيب آغازگري P-AAG و M-CAG با 166 نوار، بيشترين تعداد نوار و تركيب آغازگري P-ACT و M-CGC با 81 نوار، كمترين تعداد نوار را توليد نمودند.
آزمون Mantel روي داده ها و با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2.02 انجام شد و پس ازتشكيل ماتريس كوفنتيک با استفاده از سه روش(SM) Simple Maching، Jaccard's و Dice، مشخص گرديد كه روش جاكارد با ضريب همبستگي 0/99213 بهترين روش گروه بندي از بين روشهاي فوق است. بنابراين ماتريس تشابه بر اساس ضريب تشابه جاكارد و تجزيه خوشه اي با استفاده از روش UPGMA انجام گرفت.
براي مقايسه تشابه كلي بين نمونه ها، با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2.02 داده هاي صفر و يک به ارزشهاي فراواني نشانگر AFLP تبديل شدند. يک بردار از ارزشهاي فراواني نشانگر AFLPبدست آمد. تجزيه به مولفه هاي اصلي روي داده هاي AFLP نشان داد كه مقادير ويژه در روش جاكارد براي سه مولفه اول تنها 35 درصد از كل واريانس را توجيه كرد. از طرفي كاهش اطلاعات به دو يا سه مولفه اصلي توانست اكثر رقم ها را مطابق با روش تجزيه خوشه اي از هم جدا كند و نشان دهنده اين است كه اكثر نشانگرها، اطلاعات نزديكي را در رابطه با ساختار ژنتيكي گونه هاي مختلف چمن در اين مطالعه ارائه مي دهند.
در گروهبندي به دست آمده در اين تحقيق، 5 گونه مورد مطالعه در فاصله ژنتيكي 40 درصد به طور كامل از يكديگر جدا شده و در 5 گروه مختلف قرار گرفته اند. با توجه به تفاوت هاي ژنتيكي بين گونه هاي مختلف چمن چنين نتيجه اي دور از انتظار نيست. چمن هاي دائمي گونه هاي ديپلوئيد (2n=14) با قابليت خوداسازگاري گامتوفيتيک مي باشند و به دليل آلوگام بودن، جمعيت چمن هاي طبيعي و ساختگي از نظر ژنتيكي هتروژن مي باشند. خوداسازگاري گونه هاي مختلف چمن سبب انجام دگرگرده افشاني و هتروژن بودن رقم ها در درون گونه ها مي شود، لذا بررسي تنوع درون گونه هاي چمن نيز با استفاده از نشانگرهاي ملكولي امكان پذير است. در تحقيق حاضر با استفاده از نشانگرهاي AFLP علاوه بر جداسازي گونه هاي مختلف، در درون هر گونه نيز پنج رقم مورد مطالعه از يكديگر جدا شده اند و اين موضوع بيانگر تنوع درون اين گونه ها مي باشد اما در اين ميان پنج رقم موجود در گونه *Cynodon dactylon* L. از تنوع كمتري برخوردارند و از آنجايي كه اين چمن عمدتا به وسيله ريزوم و استولون تكثير مي شود كاملا منطقي به نظر مي رسد. گونه هاي *Festuca arundinacea* Scherb. و *Lolium prenne* L. بسيار به هم نزديک هستند و هومولوژي كافي بين كروموزومهاي آنها براي جفت شدن و نوتركيبي وجود دارد. در اين مطالعه نيز دو گونه فوق در يک گروه قرار گرفته اند كه صحت تشابه بين اين دو گونه را نسبت به گونه هاي ديگر نشان مي دهد. گونه *Cynodon dactylon* L. چمن گرمسيري و با ريزوم، استولون و بذر تكثير مي شود و چهار گونه ديگر چمن هاي سردسيري هستند كه عمدتا از طريق بذر تكثيرمي يابند و به همين دليل تنوع درون اين گونه ها نسبت به گونه *Cynodon dactylon* L. بيشتر است . در بين گونه هاي مورد استفاده در اين تحقيق تنوع زيادي از نظر بسياري از صفات ازقبيل احتياجات غذايي، نحوه استقرار، نوع استفاده و مقاومت به تنش هاي زنده و غير زنده وجود دارد، لذا ارتباط دادن گروه بندي به دست آمده با استفاده از نشانگرAFLP و صفات مورفولوژيک موجود در گونه ها مشكل به نظر مي رسد. در نشانگرAFLP، به دليل كاربرد تعداد محدودي آغازگر، احتمال ارزيابي بخشي از ژنوم گياه وجود دارد در حاليكه محصولات كل ژنوم به همراه تاثير محيط، صفات مورفولوژيكي را بوجود آورده‌اند. همچنين امكان دارد بخشي از ژنوم كه توسط آغازگرهاي AFLP تكثير مي گردد، حاوي ژن‌هاي كد كننده صفات مورفولوژيك نباشد. به همين دليل، اين دو نشانگر نتايج يكساني را ندارند.

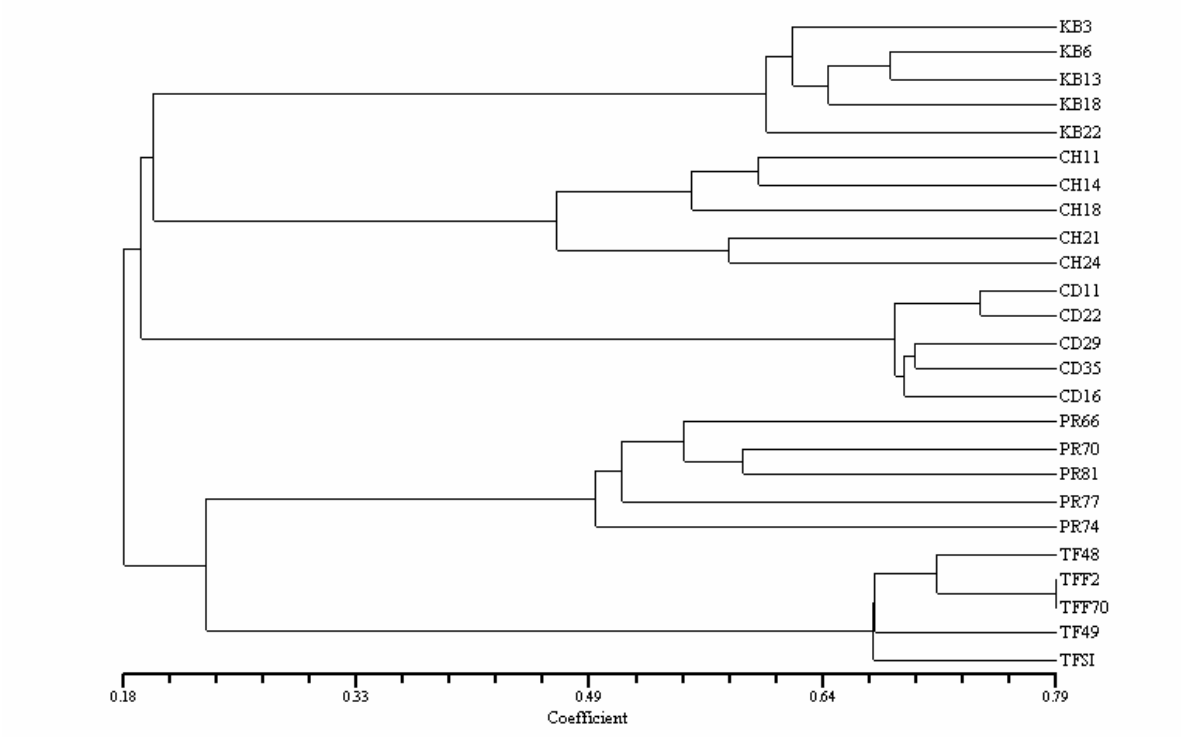
منابع مورد استفاده:

1- زمان خانپور، ف.، 1372. چمن. سازمان پارکها و فضاي سبز شهر تهران. ص 40.
2-Charmet, P.F and M. D. Sourdille. 1999. High-density molecular map for ryegrass(*Lolium perenne*) using AFLP.Theor Appl Genet 99 :445-452.
3-Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparation: Version II. Plant. Mol. Biol. Report 4: 19-21.
4-Dupal, M. Gurthridge, K. Jones, E.S. and J. Forster. 1999. AFLP-based DNA profiling in prennial ryegrass. PAG-VII. january 17-21.

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

5-Gilliland, T.J. Coll, R. Calsyn, E. De Loose, M. Van Eijk MJT. Roldan-Ruiz, I. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 1.Morphology and biochemical characterization. Mol Breed. 6:569-580.
6- Guthridge, K.M., M.P. Dupal, E.S. Jones, R. Kolliker, K.F. Smith and J.W. Forster. 2001. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) p. 141. In Plant and Animal Genome. The Int. Conf. On the status of Plant and Animal Genome Res., 9th. San Diego. CA. 13-17 Jan. 2001. Scherago Int., New York.
7- Kubic, C., W.A. Mcyer and B.S. Gaut. 1999. Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. Crop Sci. 39:1136-1141.
9- Roldan-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depieker and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Mol. Breed. 6:125-134.

10-Rouf Main, M.A., Hopkins, A.A. and Zwonitzer, J.C. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. Crop Sci. 42:944-950.
11- Thomas, H., M. Humphreys, F. Volaire, M. Humphreys and A. James. 2001. Exploiting interspecific and ecotype diversity to improve drought resistance in temperate forage grasses, with emphasis on *Festuca* and *Lolium*. Second meeting of SAGES partners at Cambridge. 21 June 2001.
12- Turgeon, A.J. 1991. Turfgrass Management, 3rd edition. Prentice-Hall. New Jersey.
13-Sweeney,P. and K. Danneberger. 2000. Inhetitance of restriction amplified fragment length polymorphisms in perennial ryegrass. Crop Sci. 40:1126-1129.
14-Vos, P. R. Hogres, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frilters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA finger printing. Nucleic Acid Res. 23:4407-4414.



شکل1- گروهبندي 25 رقم مختلف چمن متعلق به پنج گونه مختلف با استفاده از ضريب تشابه جاکارد و بر اساس نشانگر AFLP

CH11, CH14, CH18, CH21, CH24= *Festuca rubra* var. Commutata
TF48, TF49, TFF2, TFF70, TFSI= *Festuca arundinacea* Scherb.
PR66, PR70, PR74, PR77, PR81= *Lolium prenne* L.
KB3, KB6, KB13, KB18, KB22= *Poa pratensis* L.
CD11, CD16, CD22, CD29, CD35= *Cynodon dactylon* L.