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

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

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

بررسي تنوع ژنتيكي ارقام انگور سيستان با استفاده از ماركر مولكولي RAPD

محمود سلوكي[1]، نفيسه ريگي نژاد[1]، حسين كمال الديني[2*]، براتعلي سياه سر[1] ، ريتا ويگناني[3]**

[1]- ايران، دانشگاه زابل، دانشكده كشاورزي، گروه زراعت و اصلاح نباتات
[2]- ايران، دانشگاه زابل، دانشكده علوم پايه، گروه زيست شناسي
[3]- ايتاليا، دانشگاه سيانا، دانشكده علوم پايه، گروه زيست شناسي
[**]ارائه دهنده و نويسنده مسئول مكاتبات nafisehrigi@yahoo.com

چكيده:

به منظور بررسي تنوع ژنتيكي و ارزيابي ارقام انگوردر سطح مولكولي از نشانگر رپيد استفاده شد. در اين تحقيق ۶ ژنوتيپ انگور متعلق به مناطق مختلف سيستان با ۳۱ آغازگر مورد ارزيابي قرار گرفتند. از ۳۱ پرايمر تست شده روي DNA ژنوميكي ، ۲۱ پرايمر براي آناليز ژنتيكي انتخاب شدند. پرايمرهاي انتخاب شده ۴۹۷ باند واضح و آشكار توليد كردند. تكثير حاصله باعث ايجاد باندهاي در محدوده اندازه هاي بين ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز شد. اين باندها به صورت ماتريس (۱ و ۰) كه به ترتيب حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) امتياز بندي شدند. ماتريس حاصله به روش UPGMA تجزيه گرديد. براي رسم دندوگرام فواصل ژنتيكي ارقام بوسيله تجزيه كلا ستر بكار گرفته شد و در نهايت ارقام مطالعه شده در ۴ گروه اصلي طبقه بندي شدند كه ارقام ياقوتي قرمز و سفيد داراي بيشترين تشابه (۰/۶۷۲) و ارقام قرمز و لعل داراي كمترين تشابه(۰/۴۱۱) بودند. در اين تحقيق با توجه به باندهاي چند شكل كارآيي نشانگر رپيد جهت گروه بندي ارقام تاييد شد.

واژه هاي كليدي: پلي مورفيسم، تشابه ژنتيكي، پرايمر تصادفي، UPGMA، ماتريس تشابه، RAPD

Study of Genetic variation in some grape cultivars genotypes from sistan by RAPD technique

RAPD Marker was used in order to study the genetic variations and assessment of the characters of the grape fruit on the molecular level .For this research 6 genotypes related to the different areas of season were assessed by 31 primers. Out of these 31 primers which were tested on the genetic DNA, 21 primers were selected for the genetic analysis. Selected primers produced 497 evident bands. Resulted proliferations lead to the formation of bands ranging in size from 300-3500 base pairs. These bands were grades in the form of (0 & 1) matrix that were in the order of presence of band 1 and the absence of band 0. Product matrix was analyzed by the method of UPGMA . To draw the dendogram of the genetic distances of the characters with the help of analysis of clusters were classified in 4 principle groups in which ruby red and white ruby had the maximum similarity and ruby red and lal had the minimum . Considerations multishape bands , efficiency of RAPD marker for the classification of characters has been confirmed in this research .

مقدمه:

تكثير انگور بوسيله قلمه صورت ميگيرد كه در نتيجه آن جمعيت هاي از كلونهاي مشابه (به جز موتاسيونهاي سوماتيكي) كه كاملا مشابه هم و مشابه پايه مادري هستند ايجاد مي شود.(Vignani *et al.*, 2001). متدهاي سنتي شناسايي رقم هاي انگور برپايه صفات مر فولوژيكي بودند كه اين صفات خود تحت تاثير فاكتورهاي رشدي و محيطي هستند و باعث كاهش كارايي اين شاخص ها مي شود.نشانگر هاي بيو شيميايي مانند ايزوزايم ها هم چنين براي شناسايي رقم هاي انگور (Ohmi *et al.*, 1993) مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعه تنوع ژنوتيپي بر پايه تنوع روي ايزوزايم ها به علت كم بودن تعداد ايزوزايم ها فابل ثبت و مشاهده و پايين بودن چند شكلي و تفاوت قابل ثبت در انها، محدود مي باشد. در همين راستا نهايتا ماركرهاي مولكولي مبتني بر DNA بوجود آمد كه پلي مورفيسم وسيعي را در سطح DNA نشان داد و يک روش مطلوب براي تشخيص گونه هاي خويشاوند نزديک بهم است. با پيدايش تكنيک واكنش زنجيره اي پلي مراز (PCR) تكنيک هاي مولكولي مطلوب و جديدي مبتني بر آن گسترش يافت كه عبارت است از تكثير قطعات تصادفي DNA يا RAPD بواسطه مزاياي تكنيكي، ماركرهاي RAPD بطور وسيعي در ژنتيک جمعيت ها ، تجزيه تنوع زيستي و مطالعات و بررسي خويشاوندي در ميان گونه ها در سطوح مختلف بكار رفته است (، Williams *et al.*, 1990) گرفتند. در تحقيق حاضر هدفي دنبال شد كه عبارتست از بررسي تنوع ژنتيكي و يا پلي مورفيسم ژنتيكي در ميان كولتيوارهاي انگور و نهايتا تجزيه و تحليل آماري داده ها جهت گروه بندي ارقام بوده است

مواد گياهي:

ژنوتيپ هاي مورد بررسي در اين تحقيق شش رقم انگور (فخري ، لعل ، سنگک ،ياقوتي قرمز ، ياقوتي سفيد ، چشم گاوي) بومي منطقه سيستان كه از سطح مناطق مختلف شهرستان زابل استان سيستان و بلوچستان در نيتروژن مايع يا روي يخ جمع آوري شد وتا زمان استفاده در دماي °c ۷۰- نگهداري شده و در نهايت توسط روش RAPD آناليز شدند

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

استخراج DNA:

۰/۵ گرم از برگهاي جوان جمع آوري شده توسط هاون در حضور نيتروژن مايع آسياب شدند و DNA ژنوميكي آنها از طريق پروتكل (Lodhi et al ., 1994) استخراج شد . در اين روش از بافر استخراج (20mMEDTA CTAB 2%،1.4 M Nacl ،100mMTris PH=8) استفاده شده و هم چنين از PVP براي برداشتن پلي فنل ها و از Nacl براي حذف پلي ساكاريدهاي استفاده مي كنيم. سپس پليت DNA بدست آمده را در بافر TE حل نموده، كيفيت و كميت DNAي ژنومي از طريق بيوفتومتري (جذب نور) انجام شد. به اين ترتيب محلو ل هاي پايه اي كه اين نسبت در آنها بين ۱/۸-۲ بود انتخاب شدند پس از آن محلول كاري يا DNA ي به غلظت ۱۰ نانو گرم در ميكرو ليتر تهيه و از اين غلظت DNA در آزمايشها استفاده گرديد.

شرايط RAPD و تكثير:

DNA ژنوميكي با استفاده از ۳۱ پرايمر تكثير شد. پرايمرها توسط شركت سيناژن آماده شدند. شرايط آزمايش به شرح زير بود (40 mM Kcl . 10mMTris PH=8 . 2mMMgcl2 . 200microMdNTPs . 2unit Taq DNA . 0.4 microM primer . Triton x-100 %0/110 ng DNA) و در پايان حجم واكنش ۲۵ ميكرو ليتر خواهد بود.

تكثير در يک دستگاه ترمو سايكلر مدل mastercycler gradient با شرايط °C ۹۵ براي ۳۰ ثانيه ، °C ۳۵ براي يک دقيقه °C ۷۲ براي يک دقيقه و ۴۵ ثانيه با تعداد ۳۸ سيكل صورت گرفت، و در پايان سيكل ها نمونه ها را به مدت ۸ دقيقه در دماي °C ۷۲ نگه داشتيم و آنگاه تا دماي °C ۴ سرد كرديم و تا زمان استفاده در يخچال نگه داري نموديم . محصولات PCR بوسيله ژل آگاروز ۱/۴ % و بافر TAE 0.5 X تفكيک داده شدند و توسط اتيديوم بروماید رنگ آميزي شدند.

آناليز RAPD:

DNA ژنوميكي هر رقم حداقل دو بار توسط هر يک از پرايمر ها تكثير شدند. اكثريت نشانگرها بطور واضح قابل تكرار و اندازه گيري هستند. باندهاي پلي مورفيک براي تشكيل ماتريس جفتي (۰ و ۱) بر مبناي حضور و عدم حضور رتبه بندي شدند. و بر اساس آن ماتريس تشابه برمبناي ضريب تشابه دايس (۱۹۴۵ ، DICE) تشكيل شد . براي گروه بندي ارقام از روش UPGMA استفاده شد. و نتايج حاصل به صورت يک دندوگرام توسط نرم افزار SPSS رسم شد.

نتايج وبحث :

به طور كلي از ۳۱ پرايمر بكار گرفته شد . ۲۱ پرايمر پروفيل هاي الكتروفورتيكي مشخص را نتيجه دادند كه براحتي قابل دسته بندي بودند كه در شكل ۱ نشان داده شده است در ضمن تمامي پرايمرهاي بكار رفته حاوي ۸۰-۶۰ درصد (C+G) بودند و هيچ كدام از توالي پرايمرهاي ، داراي انتهاي خود مكملي نبودند و علاوه بر اين مساله پرايمرهاي اختياري و تصادفي بوده است.مجموع ۴۹۷ باند با ۲۱ پرايمر امتياز بندي شدند . باندهاي هر پرايمر از طول ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز متغير بودند . بيشتر از دو سوم باندها بزرگتر از ۲۰۲۷ جفت باز و كمتر از ۹۸۳ جفت باز بودند و اكثرا متوسط بودند. ۸۸/۹۷% باندها پلي مورفيک بودند(شكل ۱). از ۳۱ پرايمر استفاده شده در اين مطالعه تنها چهار تا از پرايمرها در تكثير موفق نبودندو باند هاي توليد شده توسط دو تا از پرايمر ها مناسب براي امتياز بندي نبودند و چهار تا از پرايمرها نسبت به ساير آغازگرها اين توانايي را داشته اند كه باندهايي يک شكل براي تمامي ژنوتيپها توليد نمايند. بطور مثال آغازگر B341 در لوكوس ۲۰۲۷ جفت بازي و ۱۵۸۴ جفت بازي براي تمام ژنوتيپ‌ها باندهايي واضح را تكثير نمود. بعضی از آغازگرهااين توانايي را داشته اند كه با اكثر ارقام باندهاي واضح با اندازه ۳۵۳۰-۲۰۰جفت بازي توليد نمايند. همچنين اين آغازگرها نسبت به ساير آغازگرها باندهايي با اندازه بيشتر توليد نموده است. با توجه به دي ان اي تكثير شده و باندهاي حاصل و تجزيه و تحليل داده ها ميزان تشابه بين ارقام محاسبه گرديد. بيشترين تشابه بين ارقام ياقوتي قرمز و ياقوتي سفيد مي باشد كه معادل ۰/۶۷۲ است و كمترين ميزان تشابه را ارقام ياقوتي قرمز و لعل دارا بودند كه برابر ۰/۴۱۱مي باشد. برش دندوگرام حاصل ژنوتيپ ها را به چهار گروه تقسيم نمود . گروه اول شامل ژنوتيپ هاي ياقوتي قرمز و ياقوتي سفيد . گروه دوم شامل ژنوتيپ هاي فخري و سنگک . گروه سوم شامل ژنوتيپ لعل . گروه چهارم شامل ژنوتيپ چشم گاوي. با رجوع به شكل (۲) مي توان ديد كه در گروه اول ابتدا ژنوتيپ هاي ياقوتي قرمز و ياقوتي سفيد تشكيل يک زيرگروه را دادند و همچنين ژنوتيپ هاي فخري و سنگک با هم تشكيل يک زير گروه مجزاي ديگر را دادند كه در فاصله ژنتيكي بالاتر، اين دو زير گروه به هم پيوستند. سپس ژنوتيپ چشم گاوي و در نهايت ژنوتيپ لعل وارد مدل شد. نتايج نشان مي دهد كه ژنوتيپ لعل حداكثر فاصله ژنتيكي را با ژنوتيپ هاي يافوتي قرمز و سفيد و ژنوتيپ ها ي فخري و سنگک داشت. در مرحله بعدي ژنوتيپ چشم گاوي بيشترين فاصله را با ژنوتيپ هاي ياقوتي قرمز و سفيد و ژتوتيپ هاي فخري و سنگک داشت.

در اين تحقيق ژنوتيپ‌هاي ۴ و ۵ با ژنوتيپ ۶ وژنوتيپ ۲ نسبت به ساير ژنوتيپ‌ها فاصله ژنتيكي بيشتري دارند لذا مي‌توان با مطالعات تكميلي و شناسايي بيشتر اين ژنوتيپ‌ها، از آنها به عنوان والدين در تلاقي‌ها جهت توليد واريته‌هاي

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

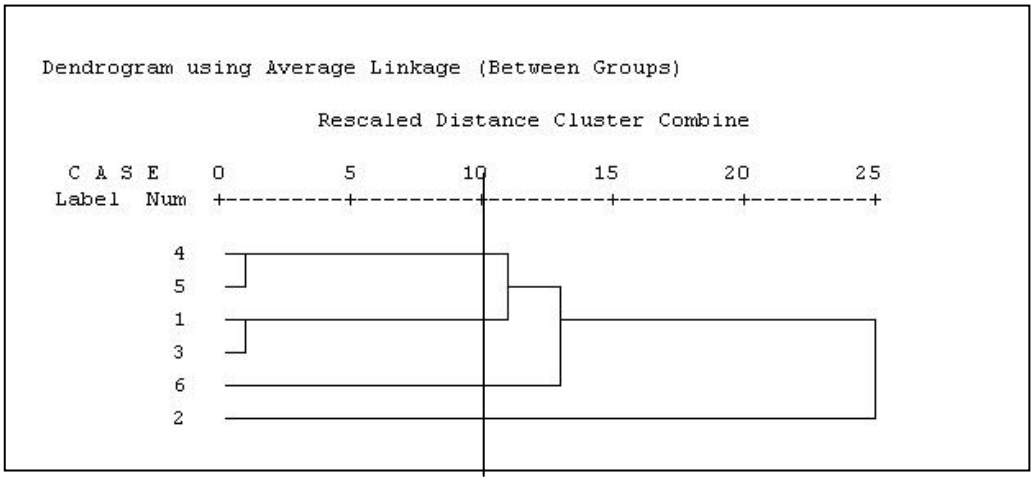
منابع

Lodhi, Muhammad A., Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch. (1994).A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars , Vitis species and Ampelopsis . Plant Molecular Biology Reporter **12(1)**: 6-13.

Ohmi C, Wakana A, Shiraishi S (1993).Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isozymes. Euphytica **65**: 195-202

Vignani R, Scali M , Masi E, Cresti M(2001) . Genomic variability in vitis vinifera l. '" sangiovest" assessed by microsatellite and non- radioactive AFLP test.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. **18**:6531-6535.



شکل(۲) دندروگرام تعیین میزان خویشاوندي بین ژنوتیپ‌هاي‌ها براساس ضریب تشابه دایس بوسیله نرم افزار SPSS که به چهار گروه تقسیم مي‌شود