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

شناسائی مولکولی ارقام بادام [*Prunus dulcis* (Mill.)] با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره[1]

امیربختیار نازنین[1*]، شیران بهروز[2]، سید طباطبائی بدرالدین ابراهیم[3] و مرادي حسین[4]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات ۲- عضو هیأت علمی دانشگاه شهرکرد ۳- عضو هیأت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان ۴- عضو هیأت علمي مرکز تحقیقات کشاورزي شهرکرد

شهرکرد- دانشگاه شهرکرد- دانشکده کشاورزی- دورنگار و تلفن ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۸، be_shiran@yahoo.com

چکیده

در این بررسی، تنوع و ارتباط ژنتیکی ۳۶ رقم و ژنوتیپ ایرانی و خارجی و سه گونه وحشی بادام با استفاده از ۳۲ جفت آغازگر ریزماهواره (مربوط به هلو) مورد ارزیابی قرار گرفت. از میان ۳۲ جفت آغازگر استفاده شده، ۱۸ آغازگر که الگوهای نواری مناسب داشتند برای تجزیه و تحلیل‌ها استفاده شدند. آغازگرهای مذکور در مجموع ۱۲۶ آلل را آشکار نمودند. میانگین تعداد آلل‌های آشکار شده به ازاء هر لوکوس ۷ برآورد شد. گروه بندی انجام شده بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، پس از جدایی دو گونه وحشی (*Amygdalus scoparia*) و (*Amygdalus orientalis*)، ارقام و ژنوتیپ های باقی مانده را در فاصله ژنتیکی ۰/۷۱ به دو گروه اصلی تفکیک کرد. با توجه به دندروگرام حاصل و ماتریس تشابه به خوبی آشکار گردید که میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ های تحت مطالعه، پایین و تنوع بین آنها نسبتاً زیاد بود. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه، مفید بودن توانایی انتقال بین گونه ای آغازگرهای SSR[1] در جنس *Prunus* و گروه بندی ارقام و ژنوتیپ‌های تحت بررسی را بر اساس منشاء جغرافیایی یا دودمان نشان می‌دهد. لذا نشانگر SSR ابزار مناسبی جهت شناسایی ارقام بادام بوده و توصیه می شود به منظور افزایش کارایی برنامه های اصلاحی جهت بررسی دقیق تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: بادام، نشانگر ریزماهواره، شناسایی مولکولی

مقدمه

درخت بادام با نام علمی(*Prunus dulcis*) متعلق به خانواده Rosaceae می باشد. بادام که گیاهی دیپلوئید و ۱۶ کروموزومی است عموماً غیر خودگشن و از نظر ژنتیکی ناخالص می باشد. ارقام اهلی بادام از توده های وحشی (*Prunus communis*) در آسیای مرکزی منشاء گرفته اند (کستر وهمکاران،۱۹۹۱). امروزه محققان بادام به دنبال ارقامی با کمیت و کیفیت بالای میوه و دیرگلده می باشند تا بتوانند اولاً محصول قابل فروش مناسب به بازار ارائه دهند و ثانیاً با دیرگلدهی درخت از گزند سرمای بهاره در امان باشد. اولین گام برای بدست آوردن ارقامی با صفات مطلوب بررسی تنوع ژنتیکی است زیرا تنوع ژنتیکی اساس کار اصلاح نباتات است. نشانگرهای مولکولی به ویژه در سطح DNA، ابزار مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکي می باشند. ریزماهواره ها یکی از انواع نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR می باشند که به علت دارا بودن مزایایی از قبیل سیستم چند آللی، بروز هم بارز، قابلیت تکرار آسان و توزیع وسیع و تصادفی در طول ژنوم کاربرد وسیعی در انگشت نگاری DNA داشته و به عنوان نشانگرهای انتخابی در بسیاری از برنامه‌های اصلاح گیاهی می‌باشند. تکنیک SSR در بررسی ژرم پلاسم بادام استفاده شده است (زو و همکاران، ۲۰۰۴؛ مارتینز-گومز وهمکاران، ۲۰۰۳a؛ آرانزانا و همکاران، ۲۰۰۳؛ مارتینز-گومز و همکاران، ۲۰۰۳b). در این تحقیق نیز استفاده از ۳۲ نشانگر ریزماهواره (مربوط به هلو) برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۶ رقم و ژنوتیپ ایرانی و خارجی و سه گونه وحشی بادام گزارش می شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۳۶ رقم و ژنوتیپ ایرانی و خارجی و سه گونه وحشی بادام بود که از بادامستان امامیه و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرکرد تهیه شدند. استخراج DNA با استفاده از روش تغییریافته CTAB (موری و تامسون، ۱۹۸۰) انجام شد. ۳۲ جفت آغازگر SSR که توسط دیرلونگر و همکاران (۲۰۰۲)، سپیریانی و همکاران (۱۹۹۹) و تستولین و همکاران (۲۰۰۰) در هلو طراحی شده بودند، برای تکثیر DNA استفاده شدند. تکثیر DNA با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر ایندورف و به صورت Touch Down انجام شد. در نهایت فراورده‌های PCR بر روی ژل ۶% پلی اکریل آمید واسرشته ساز دارای ۷ مولار اوره، بارگذاری و الکتروفورز شدند و رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید با استفاده از روش نیترات نقره انجام گردید (باسام و کاتانوآنولز، ۱۹۹۳). رتبه بندی باندها به صورت ۱ برای وجود باند و ۰ برای عدم وجود باند انجام گرفت و ماتریس داده‌های خام تشکیل داده شد. ماتریس مذکور برای بدست آوردن فواصل ژنتیکی، رسم دندروگرام و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار NTsys 2.02 مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی محتوای اطلاعاتی ریزماهواره ها نیز از پارامترهایی از قبیل Ho[3] (هتروزیگوسیتی مشاهده شده)، He[4] (هتروزیگوسیتی مورد انتظار) و Dp[5] (قدرت تفکیک) استفاده شد.

نتایج و بحث

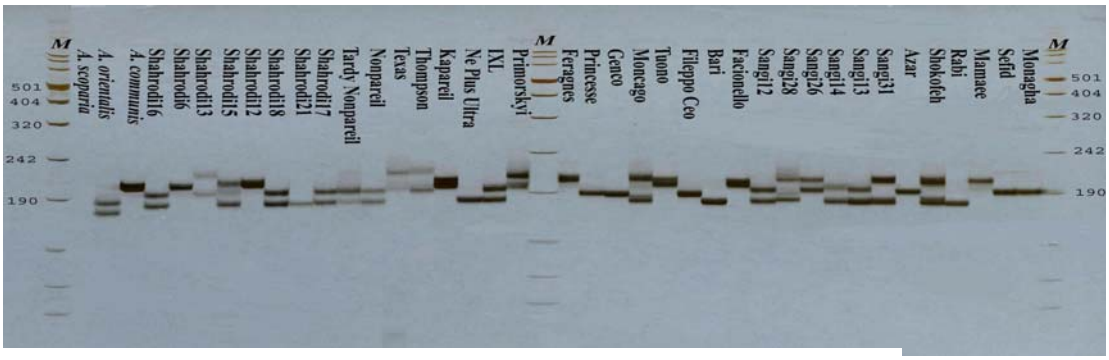
از میان ۳۲ آغازگر هلوی به کار برده شده در بادام، ۶ عدد (۱۸/۷۵%) تکثیر ندادند و ۲۶ آغازگر باقی مانده (۸۱/۲۵%)، محصولات PCR در بادام تولید نمودند (شکل ۱). این امر، نشان دهنده حفاظت شدگی بالای توالی DNA در نواحي مجاور مکان های ریزماهواره در هلو و بادام می باشد. از میان ۲۶ آغازگر تکثیر شده، ۸ آغازگر به علت داشتن الگوهای نواری نسبتاً پیچیده و غیرقابل اسکور کنار گذاشته شدند و ۱۸ آغازگر باقی مانده که همگی چند شکلی نشان دادند، امتیازدهی شده و در تجزیه و تحلیل‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. ۱۸ جفت آغازگر مذکور در مجموع ۱۲۶ آلل را آشکار کردند. تعداد آلل‌های آشکار شده به ازاء هر لوکوس از ۳ تا ۱۸ تغییر کرده و دارای میانگین ۷ بود. فراوانی های آللی نیز از ۰/۰۱ تا ۰/۸۴ تغییر کرده و دارای میانگین ۰/۱۷ بود. در ارتباط با اندازه آلل‌های تولید شده نیز می‌توان گفت که تقریباً همه آغازگرهای امتیازدهی شده، نوارهایی مطابق با اندازه مورد انتظار در هلو تولید نمودند.

---

1 - Microsatellite
2 - Simple Sequence Repeat
3 - Observed Heterozygosity
4 - Expected Heterozygosity
5 - Discrimination Power

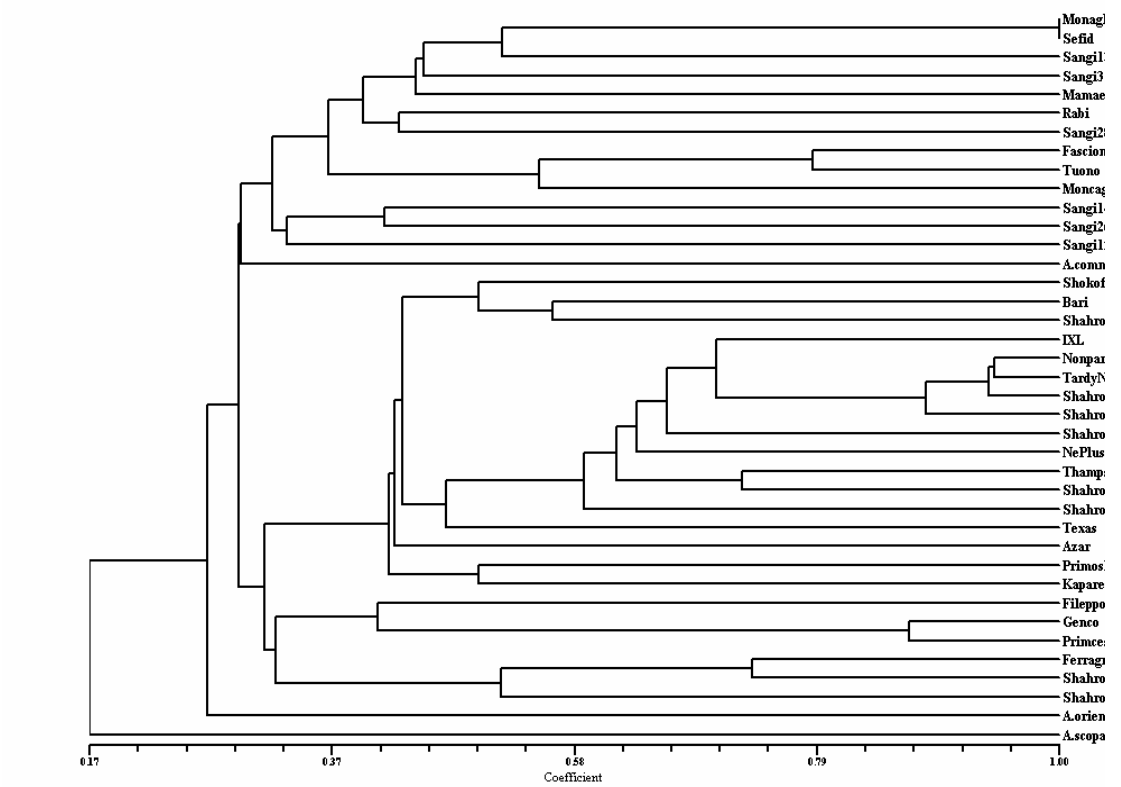
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

برای بررسی محتوای اطلاعاتی ریزماهواره ها از پارامترهایی از قبیل هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و قدرت تفکیک استفاده شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۲۸ تا ۰/۸۵ تغییر کرده و دارای میانگین ۰/۷ بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده که فقط برای آغازگرهای تک لوکوسی محاسبه شد، از ۰/۱ تا ۰/۸۷ تغییر کرده و دارای میانگین ۰/۵ بود. اگر مقایسه‌ای بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار صورت گیرد آشکار می‌شود که در همه مکان‌ها (به جزء برای یک مکان) هتروزیگوسیی مورد انتظار از هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیشتر است که احتمالاً به علت وجود آلل های خنثی می باشد. قدرت تفکیک نیز از ۰/۳۱ تا ۰/۹۵ تغییر کرده و دارای میانگین ۰/۷۹ بود.
تجزیه به مؤلفه های اصلی براساس ماتریس تشابه بدست آمده از ضریب جاکارد انجام شد. نتایج نشان داد که ۱۰ مؤلفه اصلی اولیه تنها ۴۷/۸۱ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند که توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط چند مؤلفه اولیه دلیل بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می باشد.
تجزیه خوشه‌ای نیز بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA انجام شد (شکل ۲). گروه بندی مذکور پس از جدایی دو گونه وحشی *(Amygdalus scoparia)* و (*Amygdalus orientalis*)، ارقام و ژنوتیپ های باقی مانده را در فاصله ژنتیکی ۰/۷۱ به دو گروه اصلی تفکیک کرد. به طوری که گروه اول عمدتاً ارقام و ژنوتیپ های ایرانی و گروه دوم ارقام اروپایی و آمریکایی بادام را شامل شد. در گروه اصلی اول صرفنظر از ارقام و ژنوتیپ های ایرانی سه رقم اروپایی Facionello، Tuono و Moncago و گونه وحشی *(Amygdalus communis)* نیز قرار دارند. در ارتباط با علت حضور سه رقم اروپایی مذکور در این گروه دو احتمال قابل تصور است: احتمال اول این است که این ارقام ممکن است دارای اجدادی از بادام های ایرانی باشند که حضور آنها در این گروه را سبب شده است و احتمال دوم نیز این است که شاید بتوان در صورت استفاده از تعداد بیشتری آغازگر به دلیل پوشش بیشتر و بهتر ژنوم این ارقام را به گروه دوم منتقل نمود. حضور گونه وحشی (*Amygdalus communis*) در گروه مربوط به ارقام ایرانی با در نظر گرفتن این حقیقت که این گونه جد بادام‌های زراعی می باشد و دارای دو نوع توده طبیعی شناخته شده است که یکی از توده های آن در دامنه کوه های کپ داق در آسیای مرکزی و در نواحی بین ایران و ترکمنستان و تاجیکستان قرار دارد (واویلوف، ۱۹۳۰)، قابل توجیه است. در گروه اصلی دوم که ارقام اروپایی و آمریکایی را شامل می‌شود ارقام شاهرودی که در واقع همان ارقام معروف آمریکایی و اروپایی هستند که سال‌ها پیش به ایران آورده شده بودند ولی اسامی واقعی آنها گم شد و تحت شماره نامگذاری شدند و دو رقم ایرانی شکوفه و آذر که والدین اروپایی و آمریکایی دارند، نیز قرار می‌گیرند. با توجه به دندروگرام حاصل و ماتریس تشابه به خوبی آشکار گردید که میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ های تحت مطالعه پایین و تنوع بین آنها نسبتاً زیاد بود. فاصله ژنتیکی بین مجموعه ارقام مورد مطالعه از صفر، بین دو رقم ایرانی سفید و منقاء تا ۰/۹ بین رقم ایتالیایی Bari و گونه وحشی *(Amygdalus scoparia)*، متفاوت و میانگین آن معادل ۰/۶۶ بود
به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه، مفید بودن توانایی انتقال بین گونه ای آغازگرهای SSR در جنس *Prunus* و گروه بندی ارقام و ژنوتیپ‌های تحت بررسی را بر اساس منشاء جغرافیایی یا دودمان نشان می دهد. لذا نشانگرSSR، ابزار مناسبی جهت شناسایی ارقام بادام بوده و توصیه می شود به منظور افزایش کارایی برنامه های اصلاحی جهت بررسی دقیق تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱ - الکوي نواري توليد شده توسط آغازگر UDP96-018

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



شکل ۲ - گروه بندي ارقام مورد مطالعه بر اساس ضريب جاکارد با استفاده از نرم افزار NTsys

References:

1. Aranzana, M., A. Pineda, P. Cosson, E. Dirlewanger, J. Ascasibar, G. Cipriani, C. Ryder, R. Testolin, A. Abbott, G. L. King, A. Lezzoni and P. Arus, 2003. A set of simple sequence repeat (SSR) markers covering most of the *Prunus* genome, Theo. Appl. Genet., 106: 819-825.
2. Bassam, B. J. and G. Caetano-Anolles, 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels, Appl. Biochem. Biotech., 42: 181-188.
3. Cipriani, G., G. Lot, W-G. Haung, M. T. marrazzo, E. Peterlunger and R. Testolin, 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite Repeats in peach [*prunus persica*(L) Batsch]: isolation, characterization And cross-species amplification in *prunus*, Theo. Appl. Genet., 99: 65-72.
4. Dirlewanger, E., P. Cosson, M. Tavaud, M. J. Aranzana, C. Poizat, A, Zanetto, P. Arus and F. Laigret, 2002. Development of microsatellite markers in peach *(Prunus persica* (L.) Batsch*)* and their use in genetic diversity analysis in peach and sweetcherry (*Prunus avium* L.), Theor. Appl. Genet., 105: 127-138.
5. Kester, D. E., T. M. Gradziel and C. Grasselly, 1991. Almond, In: Genetic Resources of temperate fruit and nut Crops (ed. Y. N. moore and J. R. Ballington), Acta Hort., 290: 701-758.
6. Martinez-Gomez, P., S. Arulsekar, D. Potter and T. M. Gradziel, 2003a. An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using Simple Sequence Repeat markers, Euphytica, 131: 313-322.
7. Martinez-Gomez, P., S. Arulsekar, D. Potter and T. M. Gradziel, 2003b. Relationships among peach, almond, and Related Species as Detected by Simple Sequence Repeat Markers, Journal of the American Society for Horticulture Science, 128(5): 667-671.
8. Murry, H. C. and W. F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acid Res., 8: 4321-4325.
9. Testolin, R., T. marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M. T. Dettori, M. pancildi and S. Sansavini, 2000. Microsatellite DNA in peach *(prunus persica* L. Batsch*)* and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars, Genome, 43: 512-520.
10. Vavilov, N. I., 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and the problem of the origin of fruit trees, In: IX International Horticultural Congress report and proceedings, london, 271-286.
11. Xu, Y., R.-C. Ma, H. Xie, J.-T. Liu and M.-Q. Cao, 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region, Genome, 47: 1091-1104.