استفاده از ریز ماهواره ISSR در مطالعه جمعیت‌های علف هرز فالاریس

سارا خوش‌آیند[۱]، اسکندر زند[۲]، فهیمه نظری[۲] و محمد تائب[۱]

[۱] دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات و [۲] بخش تحقیقات علف‌های هرز، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۵۸ نمونه علف هرز فالاریس جمع آوری شده از استان های فارس، خوزستان و گلستان با استفاده از ۳ نشانگر ریزماهواره بررسی شد. در مجموع ۳۴ الل چندشکل با میانگین ۱۱/۳ الل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ژنوتیپ ها تکثیر شد. آغازگرهای UBC 809 با ۱۰ الل کمترین تعداد و آغازگر UBC 810 با ۱۳ الل بیشترین تعداد الل را دارا بودند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرهای مورد بررسی از ۰/۲۴ برای آغازگر UBC 812 تا ۰/۴۰ برای آغازگر UBC 809 متفاوت بود. همچنین شاخص نشانگر از ۲/۶۴ برای آغازگر UBC 812 تا ۴/۹۴ برای آغازگر UBC 810 تغییر می کرد. گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از نسخه 2/02e نرم‌افزار NTSYS-pc با استفاده از روش UPGMA و ضریب Jaccard، میانگین شباهت ژنتیکی بین نمونه ها را ۰.۵۹ تعیین کرد.بیشترین تشابه ژنتیکی مشاهده شده بین دو ژنوتیپ از استان های فارس و گلستان ، برابر ۰/۹۴ بود. یک ژنوتیپ از استان خوزستان کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۶۰) را با سایر ژنوتیپ های مورد بررسی نشان می داد. نتایج این تحقیق بیانگر مناسب بودن نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های علف هرز فالاریس است.

واژه های کلیدی: گندم، فالاریس، تنوع ژنتیکی، ISSR.

Evaluation of genetic diversity of phalaris sp. Accessions using issr markers

S. Khoshayand[1] , E. Zand[2], F. Nazari[2] , M. Taeb[1]

[*] Department of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University,[**] Department of Weed Research, Plant Pests and Diseases Research Institute

Abstract

In this study, the genetic diversity of 58 accessions of *Phalaris* sp. from Fars, Khuzestan and Golestan provinces was assessed using 3 micro satellite markers. In overall, 34 polymorphic alleles with an average of 11.3 alleles per locus were amplified. UBC 809 marker with 10 alleles and UBC 810 marker with 13 alleles showed the minimum and maximum number of alleles among the studied loci, respectively. The polymorphic information content (PIC) values of the loci ranged from 0.24 (UBC 812) to 0.40 (UBC 809). Moreover marker index (MI) values ranged from 2.64 to 4.94 for UBC 812 and UBC 810 loci, respectively. Grouping of genotypes using NTSYS software version 2.02e, with the methods of UPGMA and Jaccard correlation coefficient, showed an average of 0.59 genetic similarity between the genotypes. The most genetic similarity was 0.94, which occurs between two genotypes from Fars and Khuzestan. A genotype from Khuzestan showed minimum genetic diversity (0.60) with respect to the other genotypes. The measured relative genetic distances among accessions was not correlated to the geographical distances of places of their origins, indicating that the populations are genetically different. The results demonstrated that micro satellites are suitable for assessing genetic diversity of *Phalaris* accessions.

Keywords: Wheat, *Phalaris* sp., Genetic diversity, ISSR

مقدمه

از جمله نشانگرهای DNA، نشانگرهای ریزماهواره می باشند که به علت دارا بودن خاصیت چند اللی، وراثت هم بارز، فراوانی نسبی و پوشش وسیع ژنومی و همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص، کاربرد فراوانی دارند (۱). مک رابرتس و همکاران(۴) ، تنوع بین و درون گونه ای جمعیت های فالاریس را با استفاده از نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار دادند. این بررسی بر روی ۴ جمعیت فالاریس جمع آوری شده از ۴ منطقه ی مختلف در کشورهند صورت گرفت که هر کدام از این مناطق ۱۵۰ کیلومتر با یکدیگر فاصله داشتند.. نتایج این بررسی نشان داد که میزان پلی مورفیزم درون و بین جمعیت ها در مقایسه با مقادیرگزارش شده از گونه های دیگر علف های هرز کمتر

Archive of SID
www.SID.ir

است مشخص نمودن طبیعت تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت های مختلف فالاریس و مقایسه ی تنوع موجود می تواند چشم انداز جدیدی در سیستم های مدیریتی مبارزه با این علف هرز ایجاد نماید (۲).

مواد و روش ها

در این تحقیق، که در سال ۸۶ و ۸۷ در موسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، بخش تحقیقات علف های هرز انجام شد، تعداد کل نمونه ها ۵۸ نمونه بذر شامل ۳۲ نمونه از استان خوزستان، ۱۴ نمونه از استان فارس و ۱۲ نمونه از استان گلستان بود.

تجزیه ملکولی

تعداد ۳ جفت نشانگر ریزماهواره (به شرح جدول ۲) در این بررسی استفاده شد (مک رابرتس و همکاران 2005). استخراج DNA از نمونه های بذر و با استفاده از روش Van Kang و همکاران انجام گرفت (Van Kang et al.1998). واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل DNA ژنومی (غلظت ۱۰ نانوگرم)، بافر 10XPCR، 100mM dNTPs، آغازگر با غلظت ۱۰۰ پیکومول، آنزیم Taq پلیمراز(۵ U)، کلرید منیزیم ۲۵ میلی مولار، و در نهایت با ۱۳/۰۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. چرخه حرارتی شامل ۳۵ سیکل بود. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد. نمره دهی بر اساس وجود باند (۱) و یا عدم وجود باند (۰) صورت گرفت.

میزان اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^{\,2}$ محاسبه گردید، به طوری که p_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل‌ها می‌باشد. همچنین میزان شاخص نشانگر[1] (MI) با استفاده از فرمول $\beta\,\mathrm{MI} = PIC \times N$ محاسبه گردید، بطوریکه N تعداد کل باند و β نسبت تعداد باند چند شکل به تعداد کل باند می‌باشد (رنجبر و همکاران ۱۳۸۷). آنالیز آماری به کمک نرم افزار NTSYS 2.02e ، روش جاکارد و سپس دندروگرام با الگوریتم UPGMA ترسیم گردید.

نتایج و بحث

از مجموع ۳ آغازگر ریز ماهواره ی مورد استفاده، ۳۴ الل چند شکل حاصل شد، به طوری که تعداد الل های چندشکل در دامنه ۱۰ تا ۱۳ الل و با میانگین ۱۱/۳ برای هر آغازگر قرار داشت. میزان چند شکلی در این مطالعه نسبت به تحقیق قبلی که توسط مک رابرتس و همکاران (۴)، با آغازگرهای مشابه انجام گرفته بود، بهبود چشمگیری یافته بود. میزان چندشکلی در تحقیق مک رابرتس و همکاران برابر ۲۰ بود. تفاوت در تعداد الل شناسایی شده در مطالعات مختلف می تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره همچون تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد (۳). بیشترین تعداد الل مربوط به آغازگر UBC 810 با ۱۳ الل چندشکل و کمترین آن ها مربوط به آغازگرهای UBC 809 با ۱۰ الل چندشکل بود. از آن جایی که میانگین تعداد الل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می دهد، بنابراین آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده شدند. با استفاده از فراوانی اللی آماره ی PIC و MI که برای هر نشانگر به طور جداگانه محاسبه گردید، محتوای اطلاعات چندشکلی(PIC) از ۰/۲۴ برای آغازگر UBC 812 تا ۰/۴۰ برای آغازگر UBC 809 متفاوت بود. همچنین شاخص نشانگر (MI) از ۲/۶۴ برای آغازگر UBC 812 تا ۴/۹۴ برای آغازگر UBC 810 تغییر می کرد (جدول ۱).

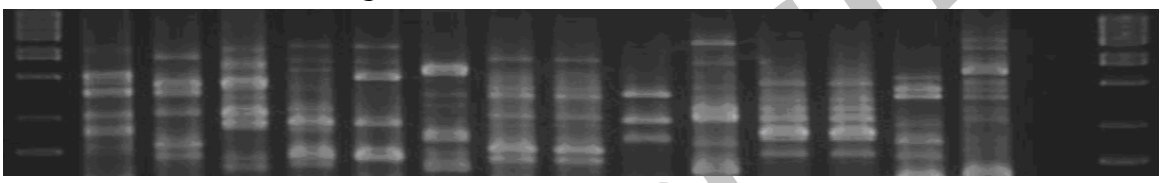
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه میزان اطلاعات چندشکلی(PIC) و شاخص نشانگر آن ها (MI)

نشانگر	توالی نشانگر	تنوع ژنی	PIC	تعداد الل	MI
UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGg	۰/۳۷	۰/۴۰	۱۰	۴/۰۰
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۰/۴۰	۰/۳۸	۱۳	۴/۹۴
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	۰/۲۵	۰/۲۴	۱۱	۲/۶۴

1 Marker index

www.SID.ir
Archive of SID

نشانگر UBC 809 با بیشترین مقدار PIC توانسته است بهتر از بقیه ی نشانگرهای استفاده شده، فاصله ی ژنتیکی نمونه ها را مشخص کند. میانگین شباهت ژنتیکی بین نمونه ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره ۰/۵۹ تعیین شد. بیشترین تشابه ژنتیکی مشاهده شده بین دو ژنوتیپ از استان های فارس و گلستان و برابر ۰/۹۴ بود. یک ژنوتیپ از استان خوزستان کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۶۰) را با سایر ژنوتیپ های مورد بررسی نشان می داد. با استفاده از تشابه به دست آمده بین نمونه ها گروه بندی آن ها با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام گرفت. دندروگرام نهایی که بر اساس داده های حاصل از هر سه آغازگر رسم شد، نمونه ها را در ۵ گروه عمده تقسیم بندی نمود (شکل۲). به طوری که در گروه اول ۴۴ نمونه، در گروه دوم ۶ نمونه، در گروه سوم ۳ نمونه، در گروه چهارم ۴ نمونه و در گروه پنجم ۱ نمونه قرار داشتند. نتایج حاصل از گروه بندی تجزیه ی خوشه ای تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع ملکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می دهد، به طوری که نمونه های جمع آوری شده در یک استان یا شهر در بسیاری از موارد در گروه ها یا زیرگروه های جداگانه قرار می گرفتند که بیانگر تفاوت ژنتیکی بالای این نمونه ها می باشد. از طرف دیگر بسیاری از نمونه هایی که در یک گروه قرار گرفته بودند از مناطق جغرافیایی متفاوت بودند که این مورد می تواند به دلیل تشابه شرایط اقلیمی و یا تبادل فیزیکی مواد بین این مناطق یا به دلیل رخ دادن پدیده ی جریان ژنی باشد. کم بودن فاصله جغرافیایی بین جمعیت های مختلف نیز منجر به ایجاد تشابه ژنتیکی بیشتر بین این جمعیت ها نمی شد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که نشانگر SSR می‌تواند وسیله مناسبی برای آشکارسازی تنوع ژنتیکی نمونه های علف هرز فالاریس باشد.



شکل ۱- الگوی باندی تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی توسط آغازگر UBC 812، حرف M بیانگر سایز مارکر می باشد.

شکل۲- گروه بندی نمونه های مختلف *Phalaris* Sp. با استفاده از روش جاکارد و الگوریتم UPGMA.

www.SID.ir

منابع

1. RANJBAR, M, NAGHAVI, M, ZALI, A, AGHAYI, J, PIRSEYEDI, M, and MARDI, M. 2008. Evaluation of genetic diversity of Aegilops crassa accessions from Iran using SSR markers Modern genetics journal, 3: 29-38.
2. ZAND, E, and M. A. BAGHESTANI. 2002. Weed Resistance to Herbicide. Jahad-e-Daneshgahi Press.
3. BECKIE, H. J., I. M. HEAP, R. J. SMEDA and L. M. HALL. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. Weed Technology, 14: 428- 445.
4. MCROBERTS, N., W. SINCLAIR, A. MCPHERSON, AC. FRANKE, RP. SAHARAN, RK. MALIK, S. SINGH and G. MARSHAL. 2005. An assessment of genetic diversity within and between populations of phalaris minor using ISSR markers. Weed Research, 45: 431-439.
5. WAN KANG, HEE., YONG GU CHO, UNG HAN YOON and MOO YOUN EUN. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1- 9.

Archive of SID

www.SID.ir