مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال سوم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۶

ارزیابی تنوع ژنتیکی کدو حلوایی با استفاده از نشانگر ISSR

طیبه حاتمی[۱*]، سید کمال کاظمی تبار[۲]، غفار کیانی [۳]، رضا اسماعیل زاده کناری[۴]

چکیده

کدو گیاهي از خانواده *Cucurbitaceae* با دانه‌هاي روغني مي‌باشد این جنس داراي ۱۰ گونه گیاهی است، که ۵ گونه دارای اهمیت زراعی هستند . سه گونه *C. Pepo* و *C. Maxima* *C. Moschata* از اهمیت بیشتری برخوردارند. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی در ۳۰ ژنوتیپ از ۳ جمعیت کدو حلوایی براساس نشانگرهای ISSR می‌باشد برای این منظور ۴ آغازگر که دارای توالی‌های ساده تکراری(ریزماهواره) بودند، بکار گرفته شد، در این بررسی ۷۲ مکان ژنی امتیاز بندی شدند که از این تعداد ۷۲ مکان چند شکلی نشان دادند که درصد پلی موفیسم آن ۱۰۰ درصد برآورد گردید. برای ارزیابی شباهت ژنتیکی میان توده‌ها از تحلیل خوشه‌ای با استفاده از تشابه جاکارد با روش UPGMA استفاده گردید. میانگین فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها (توسط ضریب تشابه جاکارد)۰/۷۷ و میانگین محتوای اطلاعات چند شکل 0.47 (PIC) بود. که آغازگر ISSR11 بالاترین مقدار PIC (۰/۵۰) را دارا بود. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای تنوع بالایی را در بین ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه نشان داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها R30، R11 و R14 و کمترین فاصله ژنتیکی بین R24 و R27 بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر ISSR بطور موثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی کدو حلوایی استفاده شوند و از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگر ISSR11 ((GA)8 G) مناسب ترین آغازگر برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: کدو حلوایی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

۱*- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران hatami_t@yahoo.com
۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشیار ، استادیار و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

مقدمه

جنس Cucurbita متعلق به خانواده کدوسانان و طایفه Cucurbiteae است. کدوئیان بدلیل رشد سریعی که در دوره رویشی خود و تولید میوه‌های خوراکی آبدار دارند، مورد توجه اکثریت قرار گرفته است(مردان زاده و همکاران، ۱۳۹۴). گونه‌های جنس کوکوربیتا به علت تنوع ژنتیکی رویشی و زایشی بالا و قدرت سازگاری زیاد، در اکثر مناطق معتدله، گرمسیری، نیمه‌گرمسیری، و بیابان‌های خشک یافت می‌شود(Hermetter,2007 and (Fruhwirth. کدو حلوایی در اکثر نقاط کشور ایران از جمله استان‌های مازندران، گیلان، خراسان، همدان، آذربایجان، فارس و ... کشت می‌شود(شفیعی مشتانی و همکاران، ۱۳۸۸) با تولید بیش از ۸۹۷۰۰۰ تن ایران پنجمین تولید کننده کدو در جهان است (برزگر، ۱۳۹۵). شواهد دیرین حاکی از آن است که انواع اهلی شده کدو حلوایی در اکوادر، سواحل پاناما و جنوب مکزیک از حدود ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح مورد کشت قرار گرفته است، بعد رسیدن اسپانی‌ها به آمریکا بدلیل سازگاری آن به شرایط اکولوژیکی مختلف به سرعت به سایر نقاط جهان ازجمله ژاپن، جاوه، آنگولا، شمال آفریقا، ترکیه، ایران و...گسترش یافت سپس تنوع آن افزایش یافت (برزگر و همکاران،۱۳۹۲). به تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین افراد، ارقام یا لاین‌های موجود بین یک جمعیت یا بین جمعیت‌های گوناگون یک گونه یا جنس تنوع ژنتیکی می‌گویند (صومعه و همکاران،۱۳۹۳). نخستین گام در تنوع ژنتیکی و بهره‌گیری از ویژگی‌های آن در به‌نژادی، شناسایی آن در درون و بین جمعیت و به‌دست آوردن فواصل ژنتیکی در میان آن‌ها می‌باشد. وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها اساس کار هر برنامه به‌نژادی است و تجزیه روابط ژنتیکی در گونه‌های زراعی یکی از مهمترین بخش‌های برنامه‌های اصلاحی است (سیه‌چهره و همکاران، ۱۳۹۳). درک درستی از میزان تنوع ژنتیکی برای موفقیت در برنامه های اصلاحی بسیار مهم است، بنابراین تغییر آشکارا در توالی DNA در خصوصیات فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی نشان دهنده پراکنش ژنتیکی بوده است(حاجی علی و همکاران، ۱۳۹۵). باربزا و همکاران (۲۰۱۱) شناسایی ارقام و داشتن اطلاعات در مورد روابط ژنتیکی در انتخاب والدین برای تولید گونه‌های جدید سودمند است. حذف تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی و تولید ارقام یکنواخت آینده را به خطر می‌اندازد بنابراین شناسایی تنوع و حفظ و نگه‌داری ذخایر توارثی، ضروری و یکی از قدم‌ها در برنامه به‌نژادی موفق است. با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه دامنه‌ی انتخاب وسیع‌تر می‌شود با توجه به این رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی، با افزایش تنوع ژنتیکی دست‌یابی به صفت مورد علاقه آسان‌تر است(صومعه و همکاران،۱۳۹۳). امروزه روش‌های زیادی برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های یک گونه وجود دارد تنوع ژنتیکی در بین ارقام گیاهی را می‌توان به-وسیله مشاهده فنوتیپ گیاهان، اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و اطلاعات بیوشیمیایی که از طریق تجزیه آیزوزایم‌ها بدست می‌آید، برآورد نمود. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بذور کدو با استفاده از نشانگر مولکولی SSR و خصوصیات مورفولوژیکی، برای کدو تنبل ۳۸ رقم چینی با ۲۸ رقم روسیه و برای کدو خورشتی ۱۰ رقم چینی مورد استفاده قرار گرفت، که تجزیه و تحلیل داده‌ها به وضوح متمایز بودن توده‌ها بر اساس گونه‌ها و مناطق جغرافیایی برای هر دو خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی را نشان داد. برزگر و همکاران برای بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از نمونه‌های کدوی ایرانی از نظر خصوصیات مرفولوژیک مولکولی (SSR) و بیوشیمیایی، از ۱۳ استان کشور ایران ۵۰ نمونه کدو که شامل ۲۶ نمونه از گونه C.pepo، ۱۲ نمونه از C. maxima و ۱۲ نمونه از C. moschata را جمع آوری نمودند و مورد ارزیابی قرار دادند که تجزیه خوشه ای رو به روش حداقل واریانس وارد و ۲۶ نمونه را به دو گروه تقسیم بندی نمودند و پی بردند که گروه بندی از صفات بیوشیمایی مستقل از گروه بندی آن‌ها بر مبنای صفات مرفولوژیک بوده است.

مواد و روش

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی از کدو حلوایی محلی با استفاده از نشانگر ISSR، تعداد ۳ جمعیت از کدو حلوایی محلی را در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۳ تکرار در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری واقع در کیلومتر ۹ جاده دریا مورد ارزیابی قرار گرفتند. از هر جمعیت۳۰ بذر در گلخانه کشت گردید قبل از انتقال نشاءها به زمین ابتدا کرت‌هایی به ابعاد ۲×۳ متر و در هر کرت فاصله بوته‌ها از یکدیگر ۵۰ سانتی‌متر و فاصله ردیف‌ها از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شدو زمانی که نشاءها به مرحله ۳ الی ۴ برگی رسید به مزرعه منتقل شد.و سپس تا مرحله تولید میوه کدو مراقبت‌های زراعی انجام شد و سپس از برگ‌های سالم هر نمونهDNA ژنومی به روش CTAB (ونگ و کیم،۲۰۰۰) استخراج گردید، بطور خلاصه، ۰/۵ گرم از برگ های سالم و تازه را که با استفاده از نیتروژن مایع در هاون به خوبی پودر گردیده بود برای استخراج استفاده شد. بعد از استخراج کمیت و کیفیت DNA ژنومی از طریق اسپکتوفتومتری در طول موج‌های۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نیز الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردید. در این پژوهش از ۴ آغازگر ISSR اختصاصی که کیفیت آللی مناسب و میزان پلی مورفیسم بالایی را بین جمعیت کدو حلوایی محلی را نشان داده بودند برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید (جدول ۱). مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سیناکلون تهیه گردید نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر با دمای اتصال مختص هر پرایمر گذاشته و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای مشاهده الگوی باندی ژنوتیپ‌ها از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

آنالیز داده‌های مولکولی

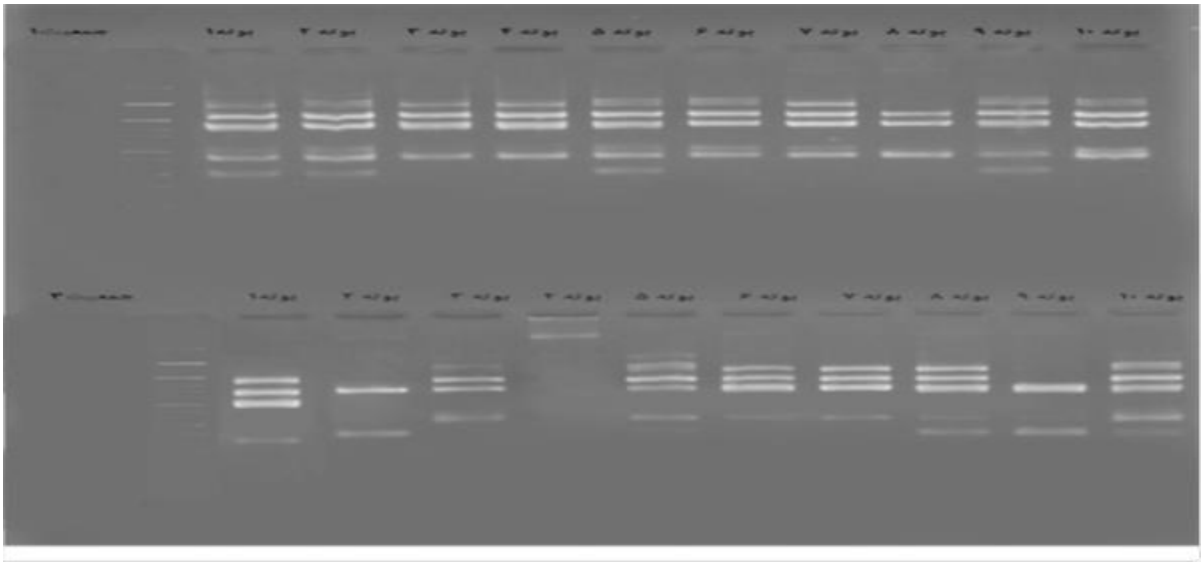
باندهای چند شکل مشخص و تکرارپذیر برای هر پرایمر ISSR به صورت وجود باند و عدم وجود باند به ترتیب با یک و صفر امتیاز دهی شدند سپس محتوای اطلاعات چند شکل(PIC) برای هر نشانگر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

در این رابطه PICi، محتوای اطلاعات چند شکل نشانگر iام، fi فراوانی قطعه نشانگرiام هنگام وجود باند و (1-fi) فراوانی قطعه نشانگرiام در حالت عدم وجود باند می‌باشد (Roldin-Ruiz et al., 2000). که با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد. برای انجام تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی از نرم افزار NTYSIS استفاده گردید.

جدول ۱. نام پرایمرها و توالی آنها و دمای اتصال آغازگرها در واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شده در این مطالعه

پرایمر	توالی	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتی گراد)
ISSR2	$(GA)_9$ C	58
ISSR7	$(GA)_8$ C	53
ISSR11	$(GA)_8$ G	53
ISSR17		53



شکل۱- الگوی باندی پرایمر ۲ ISSR2 درتمام ژنوتیپ های جمعیت ۱و ۳

نتایج و بحث

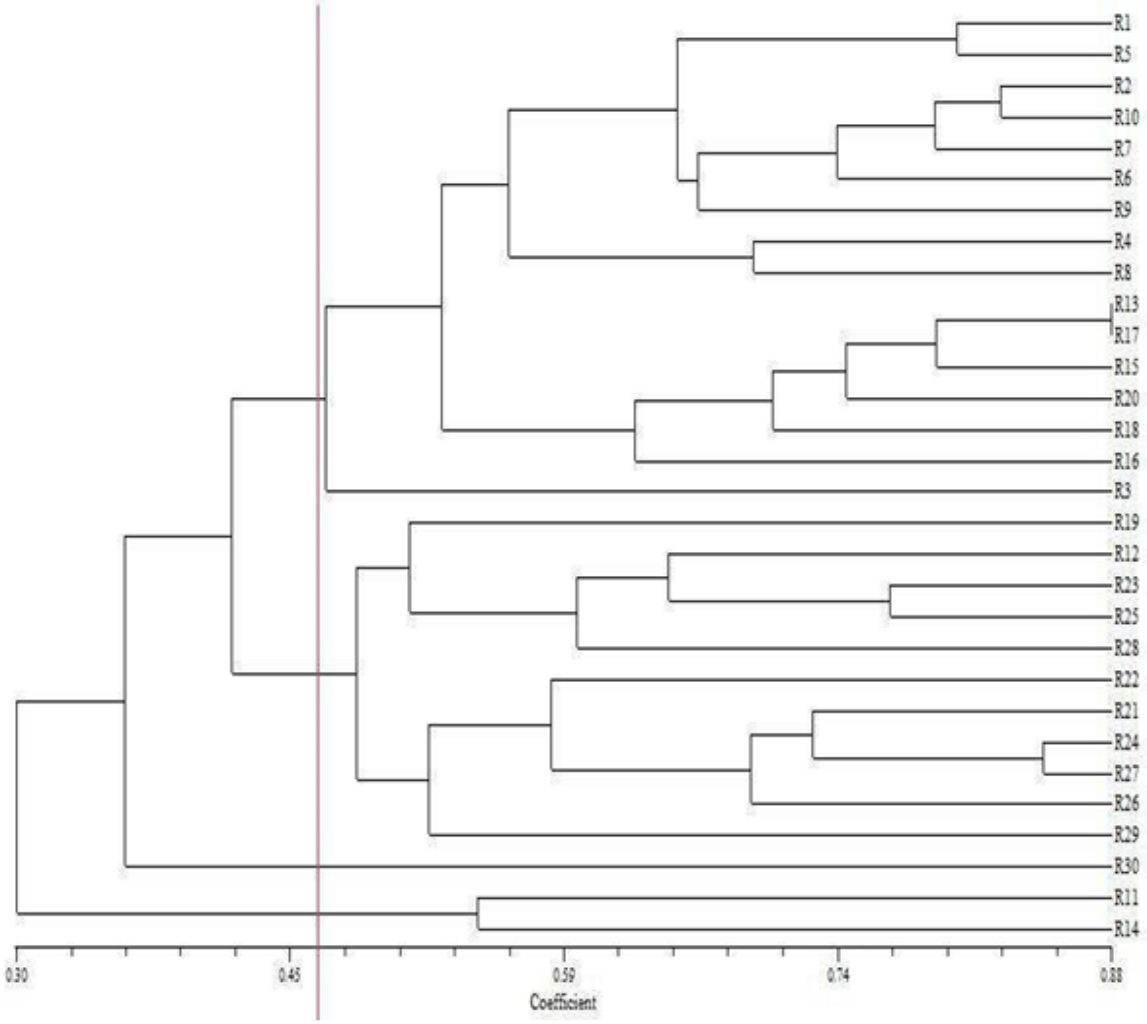
در تحقیق حاضر از تعداد ۴ آغازگر ISSR مورد مطالعه در مجموع ۲۴ قطعه تکثیر شده بدست آمد که از این میزان تمامی آن‌ها چندشکل بودند (جدول۲). میانگین تعداد کل قطعات تولید شده و تعداد باند چند شکل به ازای هر آغازگر ۶ عدد بود. بالاترین تعداد باند توسط آغازگر ۲ (۸ باند) و کمترین تعداد باند برای آغازگرهای ۱۱ و ۱۷ (هر یک ۵ باند) بدست آمد. اندازه باندهای تولید شده مورد سنجش در محدوده‌ی ۳۰۰ تا bp۳۰۰۰ بود. آلل‌ها در جمعیت نشان دهد. محتوای اطلاعات چند شکل در این تحقیق بین ۰/۴۱ تا ۰/۵۰ و میانگین آن ۰/۴۷ بود. بالاترین میزان PIC در آغازگر ISSR11 به میزان ۰/۵۰ و بعد از آن مربوط به آغازگرهای ISSR2 و ISSR7 به میزان ۰/۴۹ تعیین شد که نشان دهنده کارایی بالای این ترکیبات آغازگرها در تمایز ژنوتیپ های مورد استفاده در این تحقیق است. در مطالعه‌ای که روی کدو تنبل با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR انجام گرفت تعداد باندهای چند شکل از ۲تا ۱۳ باند بدست آمد و درصد چند شکلی از ۲۵ تا ۱۰۰ درصد متفاوت بود مقدار شاخص PIC از ۰/۲۷ تا ۰/۳۷ بدست آمده که بیشترین میزان PIC مربوط به نشانگرهای ISSR10 و ISSR14 بود (Kiani and Siahchehreh, 2017).

جدول ۲- لیست پرایمرها و توالی‌های آنها که برای تجزیه و تحلیل تنوع در کدو حلوایی استفاده شده است

پرایمر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای پلی مورفیک	درصد پلی مورفیسم	شاخص PIC
ISSR2	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۹
ISSR7	۶	۶	۱۰۰	۰/۴۹
ISSR11	۵	۵	۱۰۰	۰/۵۰
ISSR17	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۱

تجزیه خوشه‌ای

تجزی خوشه‌ای داده‌های مولکولی برای جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد که این روش دارای بیشترین ضریب کوفنتیک (۰/۷۷) بود که برای انجام تجزیه خوشه‌ای استفاده شد(شکل۲). تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نشانگرها مورد مطالعه توانست تعداد ۳۰ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۳ گروه طبقه‌بندی کند. در گروه اول ۱۶ ژنوتیپ قرار گرفتند که۱۰ ژنوتیپ آن گرفتند ژنوتیپ جمعیت۱بودند که ساختار ژنتیکی نزدیک به هم داشتند در گروه دوم۱۱ژنوتیپ قرار گرفتند که ۹ ژنوتیپ آن مختص جمعیت ۸ و ۲ ژنوتیپ دیگر مختص جمعیت ۳ بودند در اینجا اکثر گروه طبقه‌بندی کند. در گروه اول ۱۶ ژنوتیپ قرار گرفتند مختص جمعیت۱ و ۶ ژنوتیپ دیگری مختص جمعیت ۳ بودند بنابراین اکثر ژنوتیپ‌هایی که در این گروه قرار که ۱۰ ژنوتیپ آن مختص جمعیتاول و ۶ ژنوتیپ دیگر مختص جمعیت سوم بودند بنابراین اکثر ژنوتیپ‌هایی که در این گروه قرار گرفتند ژنوتیپ جمعیت اول بودند که ساختار ژنتیکی نزدیک به هم داشتند در گروه دوم ۱۱ ژنوتیپ قرار گرفتند که ۹ ژنوتیپ آن مختص جمعیت اول و ۲ ژنوتیپ دیگر مختص جمعیت ۳ بودند در اینجا اکثر افرادی که در این گروه قرار دارند. ژنوتیپ جمعیت اول بوده و ساختار ژنتیکی نزدیکی در این جمعیت دیده می‌شود درگروه ۳، ۲ژنوتیپ قرار گرفته که مختص جمعیت ۳ بودند. قرار گیری ژنوتیپ‌ها در یک گروه نشان دهنده تشابه در ساختار ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. مقدار بالای چندشکلی کدو حلوایی نشان داد که نشانگرهای مولکولی ISSR مارکر توانمندی برای بررسی تنوع ژنتیکی می باشد. اسپانسکی و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده ازنشانگر RAPD و ISSR تعداد ۵۴ ژنوتیپ خربزه را بررسی نمودند، نتایج بدست آمده نشان داد که حدود ۹۰ درصد چند شکلی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد به نظر می رسد چند شکلی بالایی که برآورد کردند می‌تواند بدلیل جمع‌آوری ژنوتیپ‌ها از مناطق جغرافیایی وسیع و پراکنده (۲۳ کشور) بوده است.



شکل ۲- فتوگرام ترسیم شده برای ۳۰ ژنوتیپ کدو حلوایی بر پایه باندهای حاصل از نشانگرهای ISSR

منابع

برزگر،ر. ، پ، غ. ا، ع. ر. ب، (۱۳۹۲). بررسی تنوع ژنتیکی نمونه-هایی از گونه¬های کدوی ایران با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی رساله دکتری ۲۰-۱۴

مردان زاده, د. ز, ب. د, ر. (۱۳۹۴). بررسی تنوع ژنتیکی توده¬های بومی کدوی شمال غرب ایران از نظر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی- مجله به¬نژادی گیاهان زراعی و باغی ۳ (۱): ۱۲۳ – ۱۰۷.

برزگر، ر. (۱۳۹۵). ارزیابی برخی از صفات تولید گل و میوه بین توده¬های محلی کدوی خورشتی ایران و مقایسه آنها با رقم تجاری F1- مجله به زراعی کشاورزی ۱۸ (۱):۱۴۰ ۴.

حاجی علی،ا.. ر، د. ز، ب. ک. ج، (۱۳۹۵). ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از توده¬های هندوانه بومی ایران(citrulls vulgaris) در شرایط آب و هوایی ارومیه – تولیدات گیاهی(مجله علمی کشاورزی) ۴۰(۱) -۱۲۹.

N. Barboza, F.J. Albertazzi, J.A. Sibaja-Cordero, F. Mora-Umaña, C. Astorga, P. Ramírez, (2012). Analysis of genetic diversity of Cucurbita moschata (D.) germplasm accessions from Mesoamerica revealed by PCR SSCP and chloroplast sequence data. Scientia Horticulturae: 134 60–71.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 3, No 1, Spring & Summer 2017

Genetic variation of squash pumpkins population using ISSR markers

Hatami, T.[1], Kazemitabar, S.K.[2], Kiani, Gh. [3], Esmaeilzadeh, R.[4]

Abstract

The genus pumpkin from the family *Cucurbitaceae* with oily seeds has 10 species, 5 of which are of agricultural importance. Three species *C. Pepo* and *C. Moschata*, *C. Maxima* are more important. The present study aimed to investigate genetic diversity based on ISSR markers in 30 genotypes of 3 populations of pumpkin. For this purpose, 4 primers with simple repetitive sequences (microsatellite) were used. In this study, 72 genetic locations were ranked, of which there were 72 polymorphic locations with a polygonal percentage of 100%. To assess the genetic similarity between the population, cluster analysis using Jaccard's similarity was used with UPGMA method. The mean genetic distance of genotypes (by Jaccard's coefficient of similarity) was 0.77 and the mean of content (PIC) was 0.47. The ISSR11 primers had the highest PIC (0.50). With the regret to dendrograms obtained from cluster analysis revealed a high variation among genotypes. The highest genetic distance was between genotypes R30, R11 and R14 and the lowest genetic distance between R24 and R27. The results of this study showed that ISSR markers can be effectively used to study the genetic variation of pumpkin. Among the primers used, the marker ISSR11 ((GA) 8 G) was the most suitable primer for subsequent studies.

Key words: squash, genetic variation, ISSR markers

1. Master student, SANRU

2 &4. Associated professor (SANRU)

3.Assisstant Professor (SANRU-Sari Agriculture and Natural Resources University)