



12th
Iranian Horticultural
Science Congress
September 05-08 2021
۱۴ لغایت ۱۷ شهریورماه ۱۴۰۰

همینکست کمره علوم
دوازی



تهیه نشانگرهای اختصاصی در سطح گونه جهت شناسایی زرشک ایرانی با

استفاده از ناحیه ITS

مهدی رضائی^{۱*}، عزیز قهرمانلو^۱، پرویز حیدری^۱ و احمد بالندری^۳

^۱دانشکد کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران، ^۲موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^۳نویسنده مسئول: mhrezaei@shahroodut.ac.ir



چکیده

زرشک بی دانه به عنوان یک محصول اقتصادی سهم عمده ای در اقتصاد کشاورزی منطقه جنوب خراسان دارد. در سالهای اخیر استفاده از توالی نواحی rDNA ITS برای شناسایی گونه های گیاهی و تعیین بارکدینگ آنها افزایش یافته است. تحقیق حاضر با هدف بررسی کارائی توالی نواحی rDNA ITS در بارکدگذاری ۱۹ نمونه جمع آوری شده زرشک از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، شهرستان اسفراین و شاهرود انجام پذیرفت. نمونه ها در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی شاهرود با استفاده از پرایمر اختصاصی ITS2 زرشک تکثیر و برای توالی یابی ارسال گردید. پس از توالی یابی تجزیه و تحلیل فیلوژنی آنها با استفاده از نرم افزار MEGA X و آنالیز آن به روش UPGMA انجام شد. توالی ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی ها با عملیات بلاست با سایر گونه ها مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان مشابهت با سایر گونه ها در پایگاه داده NCBI رسم گردید. نتایج نشان داد فاصله ژنتیکی در میان نمونه های مورد بررسی از ۰/۰۱۲ تا ۰/۱۵۴ متغیر بود. با توجه به شباهت توالی ها تنها امکان تهیه سه جفت پرایمر اختصاصی به نام های R14N2، R9N3 و B.th فراهم گردید. سه جفت پرایمر طراحی، و بر روی ۱۹ نمونه گونه گیاهی بکار گرفته شد. پرایمر R14N2 به طور اختصاصی توانست ژنوتیپ R14N2 را تکثیر نماید ولی پرایمر های R9N3 و B.th باند اختصاصی نداشتند.

مقدمه

همواره تعیین میزان خویشاوندی بین گونه ها و ژنوتیپ ها مورد توجه محققین بوده است. یکی از روش های تعیین خویشاوندی استفاده از نشانگرهای مولکولی می باشد. روبه کاهش بودن تنوع زیستی، وقوع دورگ ها و مضاعف شدن کروموزمی و از طرف دیگر دستیابی به روشی سریع و دقیق و ارزان از دغدغه های متخصصان سیستماتیک گیاهی در شناسایی گونه های گیاهی است (Blaxter, 2003). به همین دلیل بسیاری از محققان بهترین وسیله برای تشخیص در گونه های درختی را استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می دانند (Balasaravanan et al, 2006). در سال های اخیر نشانگرهای مبتنی بر ITS یکی از نشانگرهای مولکولی است که در پژوهش های فیلوژنتیکی و DNA بارکدینگ کاربرد بسیاری پیدا کرده است. یکی از این نواحی پر کاربرد دی ان آ در شناسایی گونه های گیاهی ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) بوده است که این ناحیه در کنار ژن های ریبوزومی قرار دارد (Gultepe et al, 2010). این نشانگرها برای مقایسه گونه ها و جنس های بسیار نزدیک و هم چنین بررسی های تبارزایی (فیلوژنی) مهم هستند (Silva et al., 2018). هدف از انجام این پژوهش، تهیه نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی گونه های زرشک ایرانی و بررسی روابط فیلوژنی بین آن ها است. به علت وقوع هیبرید و دورگ شدن درون گونه ای در زرشک، شناسایی مورفولوژیکی گونه های آن با مشکلاتی همراه می باشد. بنابراین در این پژوهش با هدف شناخت و بهره برداری از پتانسیل های گونه ها و ژنوتیپ های بومی زرشک سعی گردید که با تهیه نشانگر های اختصاصی از ناحیه ITS از آنها برای شناسایی ارقام و گونه های زرشک ایرانی استفاده شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۹ نمونه برگی زرشک که از رویشگاه های قائن، کاخک، شاهرود- آزاد شهر، بیرجند، اسفراین و شاهرود جمع آوری شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برگ های تازه درختچه زرشک نمونه برداری و دی ان آ آنها استخراج شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت دی ان آ، با نشانگر توالی ناحیه ITS باقلا (حیدری و همکاران ۱۳۹۳) نواحی ITS در ترموسایکلر (Bio Rad T100) تکثیر شدند. توالی های حاصل از تکثیر روی ژل اگاروز ران و سپس باند تکثیری از ژل با با استفاده از کیت استخراج ژل جدا سازی و برای توالی یابی به شرکت سیناکلون ارسال گردید. توالی ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی های با عملیات بلاست با سایر گونه ها مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان مشابهت با سایر گونه ها در سایت NCBI رسم گردید. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، ابتدا توالی های مربوطه با نرم افزار MEGA الیگمنت شدند و پس از مشخص شدن حداکثر اختلاف بین توالی های دی ان آ، از نرم افزار طراحی پرایمر Primer-blast برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی های بدست آمده در شرکت سینا کلون ساخته شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده دی ان آ ژنومی ۱۹ ژنوتیپ زرشک با واکنش PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز روی ژل اگاروز یک درصد، کارایی آن ها در تشخیص صحیح هریک از گونه های زرشک بررسی گردید.

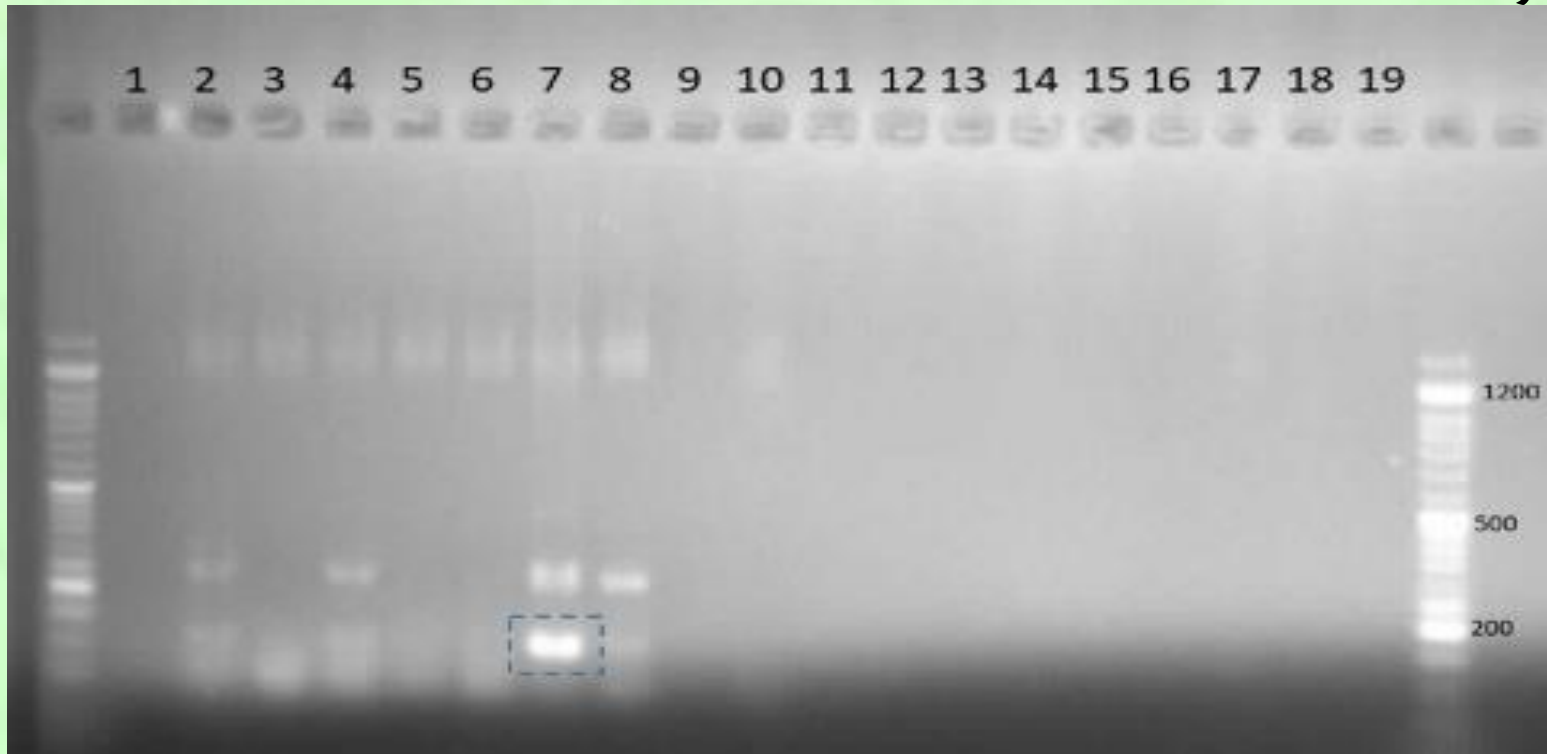
نتایج و بحث

توالی ITS ژنوتیپ ها در سایت NCBI با کدهای از شماره MN758649 تا MN758668 ثبت گردید. توالی ITS با طول تقریبی ۳۵۰ جفت باز ژنوتیپ های زرشک در پایگاه داده NCBI بلاست گردید. این توالی با ۹۳ توالی بالای ۹۰ درصد مطابقت داشتند. تمام این ۹۳ توالی مربوط به گونه های مختلف زرشک بودند. از نظر توالی یابی، رقم زرشک زیتنی (JA) از بقیه ارقام متفاوت بود که بیان کننده تفاوت این رقم با سایر ارقام می باشد چرا که در توالی ها تطابق کامل مشاهده نشد و رقم زرشک زیتنی باندی متفاوت از باند سایر ارقام تکثیر کرد. نواحی حفاظت شده ی بدست آمده از توالی های هم ردیف- سازی شده نیز تعیین گردید و بر اساس تفاوت های مشاهده شده سه جفت پرایمر (B.th, R14N2 و R9N3) طراحی شدند (جدول ۱). سه جفت پرایمر اختصاصی B.th, R14N2 و R9N3 بصورت جداگانه روی DNA ۱۹ نمونه گیاهی زرشک با استفاده از دستگاه PCR مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی توانایی تکثیر پرایمرهای اختصاصی محصول نهایی روی ژل آگارز قرار گرفتند. پرایمر طراحی شده برای ژنوتیپ R14n2 توانست باند اختصاصی این ژنوتیپ را از سایر ژنوتیپ های مجزا کند (شکل ۱). پرایمر طرحی شده برای ژنوتیپ R9N3 در ناحیه مد نظر (۲۶۸bp) باند اختصاصی تشکیل نداد و در ناحیه حدود ۳۵۰ bp پرایمر R9N3 روی ژنوتیپ های R5N1, R11N3, R14N2, Sh4, Es1, Es2 زرشک نواحی را تکثیر کرد. پرایمر B.th نیز باند اختصاصی در ژنوتیپ های مد نظر تولید نکرد.

جدول ۱- اطلاعات پرایمرهای اختصاصی طراحی شدن برای سه ژنوتیپ زرشک

طول قطعه	GC%	Tm	پایان شروع	نقطه طول	توالی (3'→5')	پرایمر	ژنوتیپ
209	42	57	24	4	AGCGGAGACATTGATTGAAC	Forward	JA
	57	59	194	212	CAAGAGCAAGGGGCAGGTA	Reverse	
268	55	57	53	36	GACCCGCGAACTTGTGTA	Forward	R9N3
	42	57	283	303	GTATCGCATTTGCTACGTTT	Reverse	
113	50	55	53	36	GACTCGCGAACTTGTGAA	Forward	R14N2
	30	49	129	148	TTTTATCAGAGCCAAAGATA	Reverse	

نتایج نشان داد که در زرشک به علت اختلاف کم جایگزینی نوکلئوتیدی در طی تکامل، روابط بین آنها به خوبی تفکیک نشده و اکثراً هیبرید هستند. تغییر در جایگاه برش کروموزومی در اثر تغییراتی همچون جابجایی، معکوس شدن و جهش خواهد بود، انتظار تغییرات زیاد نوکلئوتیدی مناطق مختلف، مستلزم داشتن شرایط آب و هوایی متفاوت و حداکثر عوامل تنش زای محیطی خواهد بود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸). در این مطالعه ژنوم گونه های مناطق مشابه آب و هوایی سردسیری اسفراین و شاهرود در تمایز با ژنوم منطقه گرم و خشک قاین و گناباد بوده و تفاوت نوکلئوتیدی در آنها مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان می دهد توالی یابی ناحیه ITS2 از هسته ریبوزومی DNA علی رغم وجود تنوع توانایی تفکیک گونه های زرشک را ندارد و به نظر می رسد که می بایست ناحیه بزرگتری از ITS2 و سایر نواحی بررسی گردد.



شکل ۱- نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر R14N2 روی ژنوتیپ های مورد مطالعه*

*: نمونه ها به ترتیب لاین ۱- R2N1، لاین ۲- R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- سی دانه، لاین ۱۹- زیتنی زایی

منابع

حیدری، ب.، اشرف مهرایی، ع. و نصرالله نژاد قمی، ع. (۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون گروهی گیاه بادرنجبویه. (*Melissa officinalisl.*) با استفاده از هر نشانگر های ITS. نشریه پژوهشگاه اصلاح گیاهان زراعی

Balasaravanan, T., P. Chezhan, R. Kamalakannan, R. Yasodha, M. Varghese, K. Gurumurthi & M. Ghosh. (2006). Identification of species-diagnostic ISSR markers for six Eucalyptus species. *Silvae Genetica*, 55(3): 119-122.

Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature*, 421: 122-124.

Gultepe, M., U. Uzuner, K. Coşkuncelebi, A.O. Belduz & S. Terzioğlu. (2010). Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild *Primula* (Primulaceae) taxa of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 34(3): 147-157.

Silva, S.R., Gibson, R. Adamec, L. Dominguez, Y. & Miranda, V.F. (2018). Molecular phylogeny of bladderworts: A wide approach of Utricularia (Lentibulariaceae) species relatinsheps based on six plastidial and nuclear DNA sequences. *Mol phylogenet Evol*, 118: 244-264