دومین همایش ملی
پژوهش‌های کشاورزی و زیست محیطی ایران
2nd National Conference on
Agricultural Research and Environment of Iran

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زیره سبز با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR

زهرا وحدتی پور چوبدار ، علیرضا سیفی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به نژاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک و به نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Email: z.vahdatipoor@gmail.com

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی زیره سبز با استفاده از نشانگرهای SSR انجام شد. بدین منظور ۱۵ توده زیره سبز، که از مناطق مختلف ایران، هند، و ترکیه جمع‌آوری شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. دوازده مارکر SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شد. محصولات PCR روی ژل اکریلامید الکتروفورز شد و باندهای حاصل پس از اسکوردهی برای آنالیزهای ژنتیکی استفاده شد. میانگین تعداد آلل‌ها در مارکرها ۱/۶۸ و میانگین پلیمورفیسم در میان جمعیتها ۵۸/۲۹ درصد می باشد. مارکر SSR۵۸۹ بیشترین هتروزیگوسیتی (۰/۳۳) و مارکر SSR۱۲ بیشترین شاخص شانون (۰/۶۱) را به خود اختصاص داده است. در بررسی انجام شده و تجزیه و تحلیل داده‌ها توده‌های K2، مرکزی، سمنان، گناباد و Lydeh بیشترین پلیمورفیسم را در میان جمعیت‌ها داشتند. همچنین توده‌های K2، گناباد و Lydeh بیشترین هتروزیگوسیتی را در میان جمعیت‌های مورد مطالعه داشته است. نتایج AMOVA نشان داد که تنوع درون جمعیت‌های مورد مطالعه بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها ست.

کلمات کلیدی: پلیمورفیسم، تنوع ژنتیکی، زیره سبز، SSR.

مقدمه :

براساس شواهد مستند منشأ زیره شمال مصر است که آب و هوای جنوب مدیترانه یا خاورمیانه را دارا است. زیره با نام علمی *Cuminum cyminum*، گیاهی یک‌ساله، دیپلوئید (2n=2X=14) و از خانواده اپیاسه[1] است و در همه جا به صورت یک‌ساله کشت می گردد (Chaudhry, Khera, Hanif, Ayub, & Sumrra, 2020). زیره سبز گیاهی دگرگشن است (Kafi, 2006). فصل رشد نسبتاً کوتاه زیره سبز (۱۰۰ تا ۱۲۰ روز) این امکان را فراهم می آورد تا پس از برداشت زیره کشت محصولاتی نظیر ذرت علوفه‌ای[2]، سویا[3] و ... صورت گیرد (Hanif & Ayub, 2019). این گیاه نیاز آبی کمی دارد، در نتیجه برای کشت در مناطق کم آب

[1] Apiaceae
[2] *Grass Sorghum*
[3] *Glycine max*

مناسب می باشد. در خراسان رضوی سطح زیر کشت زیره سبز در سال زراعی ۹۷-۹۸ به صورت آبی ۱۰۹۷۶ هکتار که از این میزان تولید ۸۱۵۷ تن محصول می باشد، عملکرد سطح ۷۴۳ هکتار بر کیلوگرم بوده است (آماری, ۱۳۹۸).

با استفاده از نشانگرهای مولکولی با سرعت و دقت بالاتری می توان تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم‌های گیاهی را ارزیابی کرد (Govindaraj, Vetriventhan, & Srinivasan, 2015).مطالعه تنوع ژنتیکی در زیره سبز در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP انجام شده است (Baghizadeh, Salar Karimi, & Pourseyedi, 2013)

در مطالعه‌ای که توسط عبدالحلیم[1] و هوکایل[2] در سال ۲۰۱۶ برای مشاهده تنوع ژنتیکی در زیره سبز با استفاده از نشانگر RAPD وآنالیز چند شکلی‌های DNA در میان ۱۱ توده از مناطق مختلف عربستان سعودی مورد بررسی قرار گرفت، نشانگر RAPD توانست چند شکلی را تشخیص و تمایز ژنوتیپ‌های زیره را امکان پذیر نماید. (Abdelhaliem & Al-Huqail, 2016). برای مثال عسگرزاده و همکاران در سال ۱۳۸۴ در پژوهشی به ارزیابی عملکرد، اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیکی توده‌های زیره پارسی پرداختند. (Kouhestani, Baghizadeh, Ranjbar, & Jelodar, 2009)

علیرغم اهمیت بالای زیره سبز پیشرفت های چشمگیری در به نژادی این گیاه در ایران انجام نشده است. برآورد میزان تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم زیره سبز ایرانی برای تدوین پروژه های به نژادی برای این گونه گیاهی نیاز است. هدف این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی در توده های زیره سبز با استفاده از مارکرهای SSR است.

مواد و روش‌ها

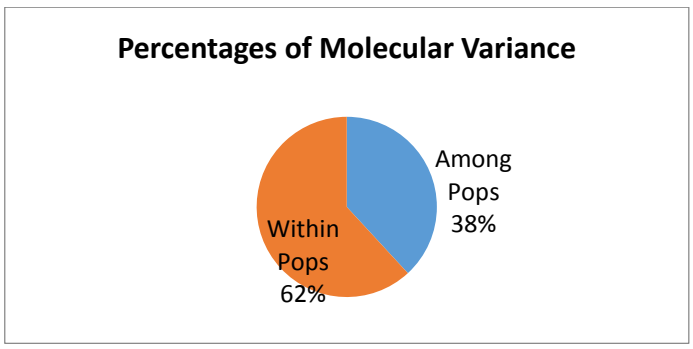
این تحقیق در مرکز زیست فناوری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. در این آزمایش از ۳۱ توده‌ی گیاه زیره سبز (یزد، سمنان، دامغان، اراک، بیابانک، خوشاب، فردوس، هند بی نام، shiva pujari، K2، تایباد، صالح آباد، ترکیه K2، کوهبنان، نهبندان، طالخونچه، R1، مرکزی، بشرویه، مرکزی BR1، تبریز، سربیشه، بیابانک، کرمان، بشرویهR2، حاجی آباد، گناباد، درگز، Lydeh، بشرویه، تربت جام، L1)که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شده بود استفاده شد. بعد از مدت تقریباً یک هفته جوانه‌های زیره شروع به رشد نمود و پس از ده روز گیاه آماده استخراج DNA ژنومی بود. استخراج DNA به روش CTAB[3] انجام شد(Doyle, 1991). ارزیابی کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری صورت گرفت. توالی‌های میکروستلایت در زیره‌سبز توسط یک گروه تحقیقاتی هندی گزارش شده است (Bharti, Kumar, & Parekh, 2018). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra به روش Touch Down انجام شد. چرخه حرارتی در این مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴۰ ثانیه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۵ دور بود. بسط آن ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه اتصال ۵ درجه

[1] Abdelhaliem
[2] Huqail
[3] Cetyltrimethylammonium bromide

سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که این چرخه ۳۰ دور انجام شد. برای تفکیک مناسب قطعات تکثیر شده محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریلامید ۸٪ واسرشت کننده الکتروفورز انجام شد. اسکوردهی با توجه به تصاویر الکتروفورز محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از تصاویر ژل‌های رنگ آمیزی شده، باندهای ایجاد شده بر روی ژل را بصورت ۰ و۱ امتیازدهی نمودیم. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات DNA بر روی ژل‌آکریلامید براساس منظور نمودن یک حضور باند و صفر برای غیاب باند و باندهای از دست رفته با ۹ مشخص گردید. داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار Excel ذخیره گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Genealex و NTSYS 02.ver 2 جهت محاسبه چند شکلی ژنتیکی و شباهت ژنتیکی استفاده شد. با استفاده از مدل کلاستری NJoin آنالیز و نهایتاً دندوگرام ترسیم شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر از ۳۱ توده استخراج DNA انجام شد. DNA ژنومی با روش CTAB از گیاهچه‌های ۸ روزه استخراج شد. از هر توده ۸ گیاهچه استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. از این نهجفت آغازگر، برای سه جفت محصول PCR حاصل نشد و لذا اینسه مارکر SSR۲۵، SSR۱۶۹، SSR۱۸۶ باندی تکثیر نشد و از ادامه آزمایش حذف شدند. . مارکرهای مونومورف SSR ۱۵۱، SSR۲۸۱، SSR۲۵۶ بود. مارکرهای SSR۵۸۹، SSR۵۳، SSR۱۲،SSR۱۲۹، SSR۴۸ مارکرهایی بودند که در آنها پلیمورفیسم نشان داده شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها میانگین شاخص‌های درون جمعیتی شامل آلل موثر (Ne) و آلل مشاهده شده (Na) تنوع ژنی و شاخص شانون(I) جمعیت‌ها محاسبه شد. بیشترین آلل در جمعیت‌های دامغان، تایباد و هند (Shiva pujari) مشاهده شد.. میانگین تعداد آللها مشاهده شده ۱/۶۸ و میانگین تعداد آلل موثر ۱/۵۸ می باشد. میانگین شاخص شانون(I) برابر با ۰/۴۱ بود. بیشترین شاخص شانون مربوط به جمعیت k2 است و کمترین شاخص مربوط به جمعیت R1 و جمعیت درگز به خود اختصاص داده‌اند. با استفاده از نرم‌افزار GeneAlex6/51b2 تجزیه واریانس مولکولی داده‌های جمعیتی و آزمون AMOVA محاسبه گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نشانگر SSR نشان می دهد ۳۸٪ از تغییرات مربوط به بین جمعیت و ۶۲٪ مربوط به درون جمعیت می باشد. در نتیجه تنوع بین جمعیت‌ها از تنوع درون جمعیت‌ها کمتر است که این امر می تواند به علت وسعت جغرافیایی و یا به دلیل همجوار بودن با استان‌های دیگر بذرها به آن نقاط منتقل شده باشند.



شکل ۸-۱ فراوانی تجزیه واریانس مولکولی

جدول ۳-۱ تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	۳۰	۱۱۰۳/۰۹۷	۳۶/۷۷۰	۷/۹۵۶	%۳۸
Within Pops	۶۲	۸۰۰/۰۰۰	۱۲/۹۰۳	۱۲/۹۰۳	%۶۲
Total	۹۲	۱۹۰۳/۰۹۷		۲۰/۸۵۹	%۱۰۰

نتیجه‌گیری

از آنجا که برآورد تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های زیره می‌تواند نقش مهمی در پیشرفت برنامه‌های اصلاحی داشته باشد. در این مطالعه با استفاده از نه آغازگر SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۹۳ ژنوتیپ زیره سبز استفاده شد. مارکر SSR۵۸۹ بیشترین هتروزیگوسیتی را داشت. جمعیت اراک، یزد، بیابانک، k2 درکلاستر بندی در نزدیک هم قرار داشتند. نتایج نشان می دهد که تنوع درون جمعیت مورد مطالعه بیشتر از تنوع بین جمعیت‌هاست. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد اکوتیپهای مختلف زیره تنوع ژنتیکی را نشان نمی دهد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی انجام شده است. از جناب آقای دکتر فراوانی و سر کار خانم دکتر عزیزی برای در اختیار قرار دادن بذور توده های زیره قدردانی می‌شود.

مراجع

Abdelhaliem, E., & Al-Huqail, A. (2016). Genetic linkage between protein and DNA polymorphisms and antioxidant capacity of *Cuminum cyminum* L. accessions. *Genet. Mol. Res, 15*(4).

Baghizadeh, A., Salar Karimi, M., & Pourseyedi, S. (2013). Genetic diversity assessment of Iranian green Cumin genotypes by RAPD molecular markers. *Intl J Agron Plant Prod, 4*, 472-479.

Chaudhry, Z., Khera, R. A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., & Sumrra, S. H. (2020). Cumin *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 165-178): Elsevier.

Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293): Springer.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international, 2015*.

Hanif, M. A., & Ayub, M. A. (2019). Zarghouna Chaudhry1, Rasheed Ahmad Khera1, Muhammad Asif Hanif1, Muhammad Adnan Ayub2, Sajjad Hussain Sumrra3. *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*, 165.

Kafi, M. (2006). *Cumin (Cuminum Cyminum): production and processing*: CRC Press.

Kouhestani, S. D., Baghizadeh, A., Ranjbar, G., & Jelodar, N. B. (2009). Investigation of genetic diversity in Persian Cumin [Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch.] germplasm from Kerman province using RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24*(4), 414-427.

آماری, س. ه. (۱۳۹۸). سالنامه آماری بخش کشاورزی خراسان رضوی سال ۱۳۹۸ .