بررسی تنوع ژنتیکی بنفشه آفریقایی با استفاده از مارکر مولکولی RAPD

حمیده حیدری‌نژاد[1]، مصطفی عبادی[2] * (نویسنده مسئول mtf.ebadi@gmail.com)، حسین عباسپور[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران ۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، رودهن، ایران

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی ارقام مطرح بنفشه‌ی آفریقایی(*Saintpauli ionantha*) در سطح مولکولی از نشانگر RAPD استفاده شد. در این تحقیق ۶ ژنوتیپ با ۸ آغازگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ۸ آغازگر آزمایش شده روی DNA ژنومی ۱۸۰ باند تولید شد که ۱۶۳ باند پلی مورف و ۱۷ باند باقیمانده منومورف بودند. اندازه‌ی قطعات DNA تولید شده بین ۳۰۰bp تا ۴kb بود. آغازگر 10mer C کمترین باند و آغازگر 10mer E بیشترین تعداد باند را تولید کرد. باندهای تولید شده برای آنالیزهای استاتیک مورد استفاده قرار گرفتند. محاسبات آماری براساس ضریب تشابه جاکارد و گروه-بندی به روش دایس با استفاده از نرم‌افزارNtsys ver 2/02 انجام شد. تشابه ژنتیکی بین ۰/۵۷ تا ۰/۷۲ بوده و ضریب جاکارد بین دندروگرام و ماتریس تشابه ۰/۸۵ به دست آمد که نشان دهنده برازش مناسب دندروگرام به ماتریس تشابه بوده است. این آزمایش نشان داد که نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های بنفشه‌آفریقایی یک تکنیک موثر و مفید است.

کلمات کلیدی: بنفشه‌ی آفریقایی، مارکر مولکولی، تنوع ژنتیکی، ماتریس تشابه

Assesment of genetic diversity *Saintpaulia* inonatha using RAPD marker

Hamideh Heidarinejad[1], Mostafa Ebadi[2], Hossein abaspuor[1]

1- Dep. of Biology, Damghan branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Dep of Biology, Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract:

Genetic diversity was studied of *Saintpaulia inonatha* using RAPD marker. The 8 primer used and produced 180 bands. The 163 bands were common in all the variety. Primer 10mer C, producted the least number of polymorphic bands while primers 10 mer A, producted the highest number of band. The sizes of the pieces have been produced between 300bp to 4kb. Ntsys ver 2/02 cluster analysis To draw a phylogenetic tree was used. The genetic similarity between 0.57 to 0.72 and jaccard coefficient between cluster and similarity matrix was 0/85. The results show among 6 variaty there is considerable genetic diversity. This study suggested that molecular markers RAPD useful tool for study genetic diversity among variatys of *saintpaulia*.

Keywords: *Saintpaulia*, genetic diversity, RAPD, Ntsys, similarity matrix

مقدمه

گیاهان زینتی در کشورها دارای اهمیت اقتصادی هستند و تقاضا برای این گیاهان به سرعت در حال افزایش است. و بیشترین تلاش در بخش صنعتی شدن به گل‌دهی گیاهان گلدار در گلدان وابسته است. درآمد سالیانه از فروش گیاهان زینتی در ژاپن و آمریکا سالانه ۸-۹ میلیون دلار است (Eastwood, 1998). کیفیت مهمترین عامل رقابت در بازار جهانی است. خانواده‌ی Gesenariase جزء گیاهان گلدار بوده که بالای ۳۰۰۰ گونه اصلی از آن شناسایی شده که در این بین بنفشه‌ی آفریقایی با نام علمی *Saintpaulia ionantha* بزرگترین گونه‌ی این خانواده محسوب می‌شود (Kolehmainen and Korpelainen , 2008).

این گیاه که در مقیاس وسیع به صورت تجاری و نیز خانگی تولید و پرورش داده می شود. تاکنون ۲۰۰۰ واریته آن توسط تکنیک‌های پیشرفته تولید شده و سالانه چند صد واریته جدید به آن اضافه می‌گردد. رنگ گل در گونه‌های وحشی بنفشه، بنفش، آبی کمرنگ، سفید است (Darbyshire, 2006; Chen, 2005). بنفشه‌ی آفریقایی اندمیک کوه‌های شرقی Arc و سواحل کنیا و تانزانیا است (Baatvik, 1993). تعداد بسیار کمی از ارقام *Saintpaulia* از بذر به دست می‌آید. ولی باید این نکته را یاد آور شد که روش اصلی انتشار بنفشه آفریقایی توسط قلمه برگ و کشت بافت است (Kolehmainen and Korpelainen , 2008).

در این تحقیق تنوع ژنتیکی بنفشه آفریقایی با استفاده از مارکر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. این تکنیک در سال ۱۹۹۰ توسط Williams به دنیا معرفی شد در این روش برخلاف روش‌های استاندارد در PCR، از تک آغازگرهایی به طول ۸ تا ۱۰ نوکلئوتید که ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می‌گردد، استفاده می‌شود، این الیگونوکلوتیدها به صورت تصادفی به جایگاه هدف اتصال می‌یابند و تکثیر پیدا می‌کنند. در این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته‌ی DNA ژنومی می‌یابد و در آن نقاط به رشته‌ی DNA متصل می‌شود که محل اتصال آغازگرها در روی دو رشته‌ی متقابل به هم نزدیک باشند (فاصله‌ای که DNA قابل تکثیر باشد)، ردیف بین آن در نقطه‌ی طی واکنش زنجیره ی پلی‌مراز تکثیر خواهد شد. مارکر مولکولی RAPD در واقع آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی کوتاهی است که در واکنش PCR با دمای آنلینگ پایین که به طور قطع طیفی از قطعات از DNA الگو است تکثیر پیدا می کنند. یک یا چند قطعه از محصولات پلی مورف بوده است که به طور معمول در نتیجه‌ی تغییر در یک باز در جایگاه پیوند پرایمر ایجاد می-شوند، و این پلی مورفیسم می‌تواند نقشه‌ی ژنتیکی باشد (Plotsky et al. 1995; Amani, 2011).

عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیفDNA برای طراحی و ساخت آغازگر، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه از مزایایی این آغازگر است هر چند مشکلاتی چون تکرارپذیری پایین برخی از باندها و حساسیت شدید به شرایط واکنش، استفاده از آن را با مشکلاتی همراه ساخته ولی در حال حاضر به طور گسترده در بررسی جمعیت و تعیین تنوع به کار گرفته می‌شود (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۰).

با این حال مارکر مولکولی RAPD ابزاری سودمند برای بررسی اکولوژی و ساختار ژنتیکی بسیاری از گونه‌ها است. در این پژوهش از مارکر مولکولی RAPD برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی بین ۶ واریته‌ی بنفشه‌ی آفریقایی استفاده شد. استفاده از نشانگر RAPD در این آزمایش به دلیل توانایی این آغازگر در آشکارسازی تنوع ژنتیکی ترجیح داده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

٦ رقم از بنفشه‌ی آفریقایی به نام‌های Tokyo, Ada, Rome , Little Arapahoe Gir , Nevada Colorado از گلخانه‌ی پریسا واقع در محمود آباد ساری خریداری شد. در این آزمایش برگ به عنوان بافت مورد نظر برای استخراج DNA انتخاب گردید. به منظور

جلوگیری از هضم DNA ژنومی توسط نوکلئازها، نمونه‌ها به یخچال ۲۰- درجه منتقل و نگه‌داری شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش (Doyl & Doyl 1390) با ایجاد یک سری تغییرات استفاده شد. در این آزمایش از CTABو PVP (به عنوان حذف کننده‌ی ترکیبات پلی‌فنولی) در گیاه بالغ در کنار یکدیگر هر کدام به میزان ۲٪ و مرکاپتواتانول به میزان ۱٪ استفاده شد. به منظور مشاهده کمی DNAژنومی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شدند. الگوی الکتروفورزی حاصل علاوه بر تعیین کیفیت نمونه‌هایDNA، داده‌های مربوط به غلظت حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر را نیز تایید نمود (Brown, 2006).

واکنش‌های زنجیره‌ی پلی‌مراز

به منظور واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز، ۸ پرایمر ۸ تا ۱۰ نوکلئوتیدی 10mer A, C, I, J و OPA 1, 2, 3 از سایت دانشگاه کلمبیا انتخاب و توسط شرکت سینا کلون سنتز شد. برای واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر به ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymeras ، ۰/۸ میلی‌مولار dNTP، پرایمر ۱۰ میکرومولار ، غلظت ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$و PCR Buffer 10x احتیاج است.

در نهایت پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل Reccobetبا چرخه دمایی یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه که واسرشته سازی اولیه در این مرحله رخ می‌دهد در گام بعد ۳۵ سیکل که واسرشت دومین در ۹۴ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۳۶ درجه ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به عنوان بسط نهایی ۷ دقسیقه انجام گردید (Yu, 1992).

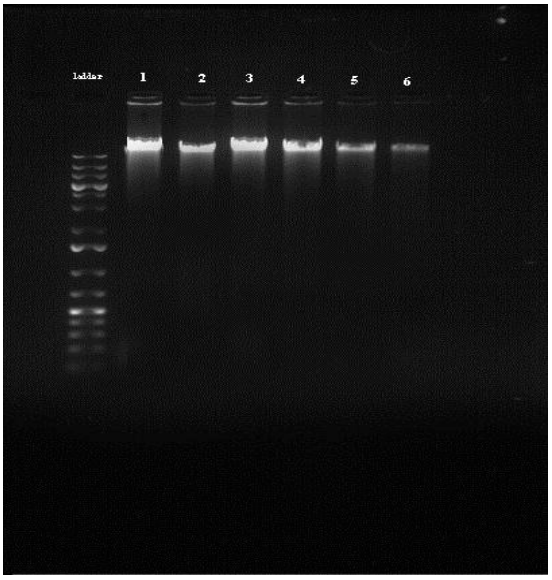
به منظور کنترل تکثیر فرآورده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۱۰ میکرولیتر از فرآورده‌های یک یا دو واکنش اول بر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید و توسط دستگاه ژل داک قطعات تکثیر یافته مشاهده و عکس‌برداری شدند.

به منظور گروه بندی ژنوتیپ‌های این گیاه با استفاده از مارکر مولکولی RAPD از ضریب تشابه جاکارد و روش گروه بندی با استفاده از نرم افزار Ntsys ver.2. انجام شد.

بحث و نتایج

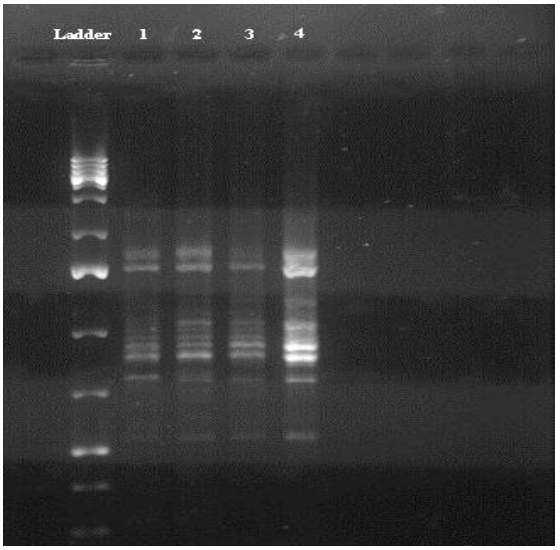
نتایج به دست آمده از استخراج DNA:

استفاده از PVP و CTAB هر کدام به میزان ۲٪ در کنار یکدیگر نقش به سزایی در بهبود OD260/230 داشته است. هنگامی‌که CTAB به تنهایی استفاده شد جذب نشان داده شده پایین‌تر از ۲ بود که نشان دهنده‌ی آلودگی پروتئینی و پلی‌فنولی بود و زمانی که از دو ماده در کنار یکدیگر استفاده شد جذب مورد قبول را نشان دادند که شکل ۱ عدم هر گونه آلودگی پروتئینی و RNA را نشان می‌دهد. PVP ترکیبات پلی فنولی را از طریق شکل‌گیری پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی فنولی حذف می‌کند (Calderon, 2010). در روش استخراج به روش Doyle&Doyle، کلرید سدیم استفاده شده ۰/۸ میلی مولار بوده و از ترکیب فنل، کلرفورم به نسبت ۱:۱ استفاده شد. در حالی‌که در این پژوهش. NaCl استفاده شده ۱/۴ میلی مولار است که کمک به حذف بهتر پلی‌ساکارید کرده و فنل به عنوان ممانعت کننده ی PCR حذف شد.

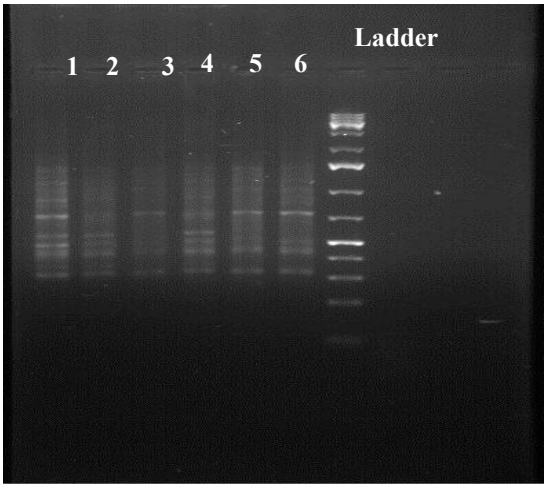


شکل۱. استخراج DNA شش رقم مورد بررسی.
1- Little Arapahoe Gir ,2- Tokyo 3 ,-Ada ,4-Rome ,5- Colorado ,6-Nevada

با توجه به این‌که نتایج براساس حضور و عدم حضور باندها تعریف می‌شود داشتن باندهای قابل اسکور دارای اهمیت است. با توجه به گرادیان تعیین غلظت بهینه‌ی $MgCl_2$مشخص شد که غلظت ۲/۵ میلی مولار بهترین غلظت در واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز برای این گیاه است. که یافته‌های Dubreuil و همکاران تایید کننده‌ی این موضوع است (شکل ۲ و ۳).

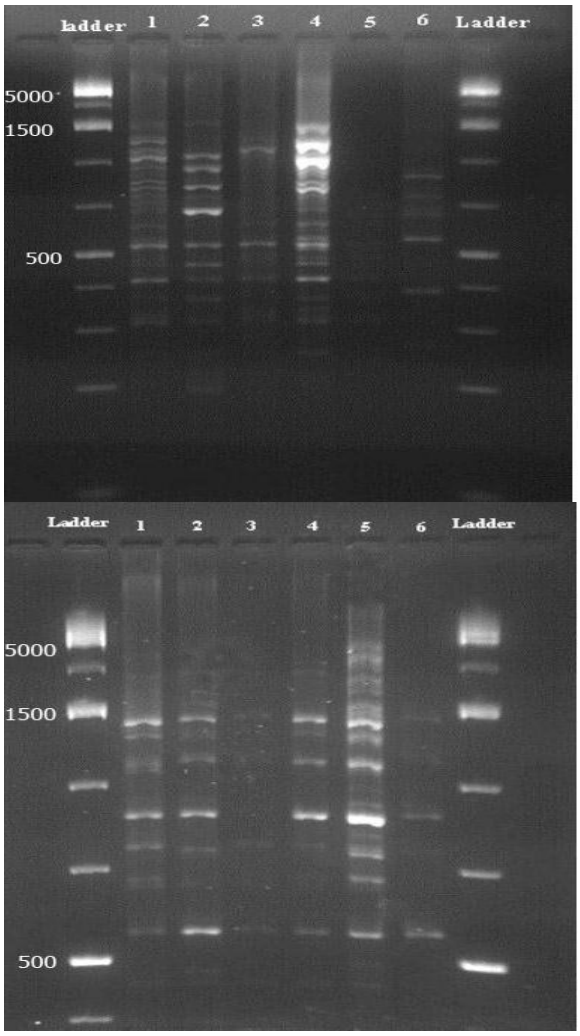


شکل ۲. غلظت‌های متفاوت $MgCl_2$. ۱- غلظت ۲، ۲- غلظت ۲/۵، ۳- غلظت ۳، ٤- غلظت ۳/۵.

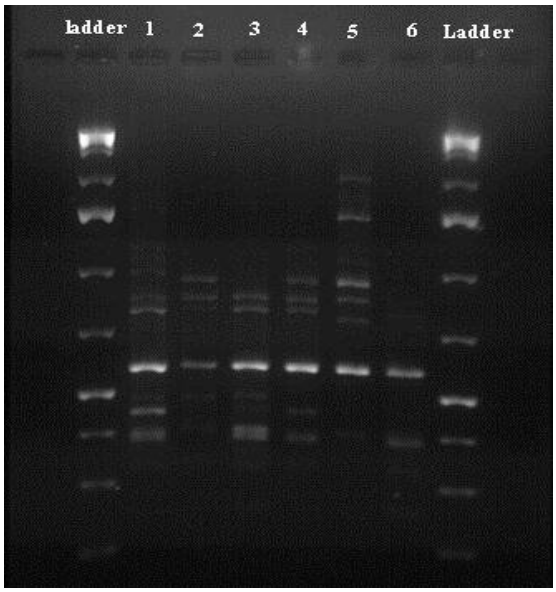


شکل ۳. باند غیر قابل اسکور پرایمر OPA1

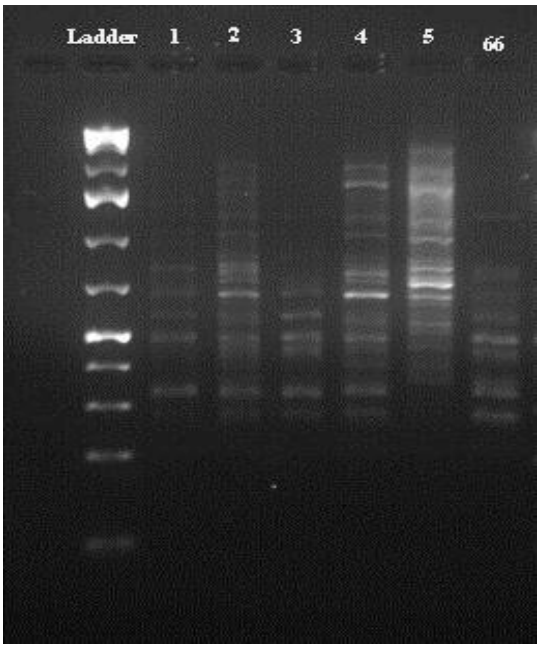
با توجه به یافته‌های Xiong و همکاران مدت زمان انلینگ در این پژوهش با درصد GC تعیین گردید به طوری‌که در صورت داشتن درصد GC بیشتر مدت زمان انلینگ افزایش پیدا کرد که به دلیل پایداری پیوند GC در ارتباط است. این کار باعث شد که باندهای ایجاد شده در طیف وسیعی از اندازه وجود داشته باشد.



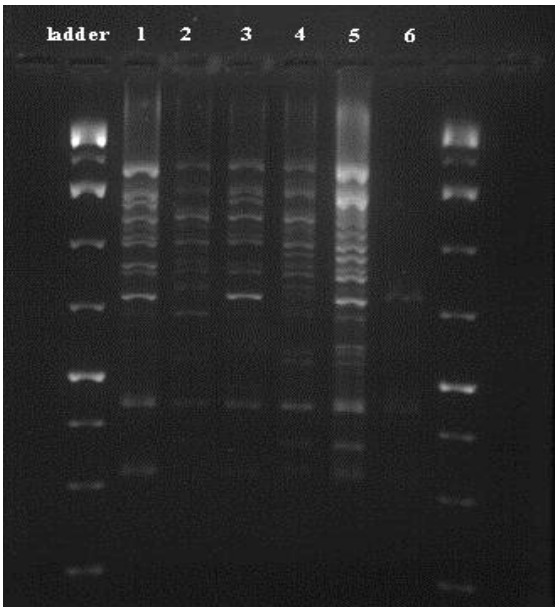
شکل٤. واکنش زنجیره پلی‌مرازا, J 10mer .
-1 Little Arapahoe Gir ,Tokyo 3-2 –,Ada ,Rome–4 ,5-
Colorado–6 ,Nevada



شکل۵. واکنش زنجیره پلی‌مرازC 10mer .
-1 Little Arapahoe Gir ,Tokyo 3-2 –,Ada ,Rome–4 ,5-
Colorado–6 ,Nevada



شکل۶. واکنش زنجیره پلی‌مراز OPA2 .
1- Little Arapahoe Gir ,2-3 Tokyo ,-Ada ,4-Rome ,5- Colorado-6 ,Nevada



شکل۷. واکنش زنجیره پلی‌مراز10mer A .
1- Little Arapahoe Gir ,2-3 Tokyo ,-Ada ,4-Rome ,5- Colorado-6 ,Nevada

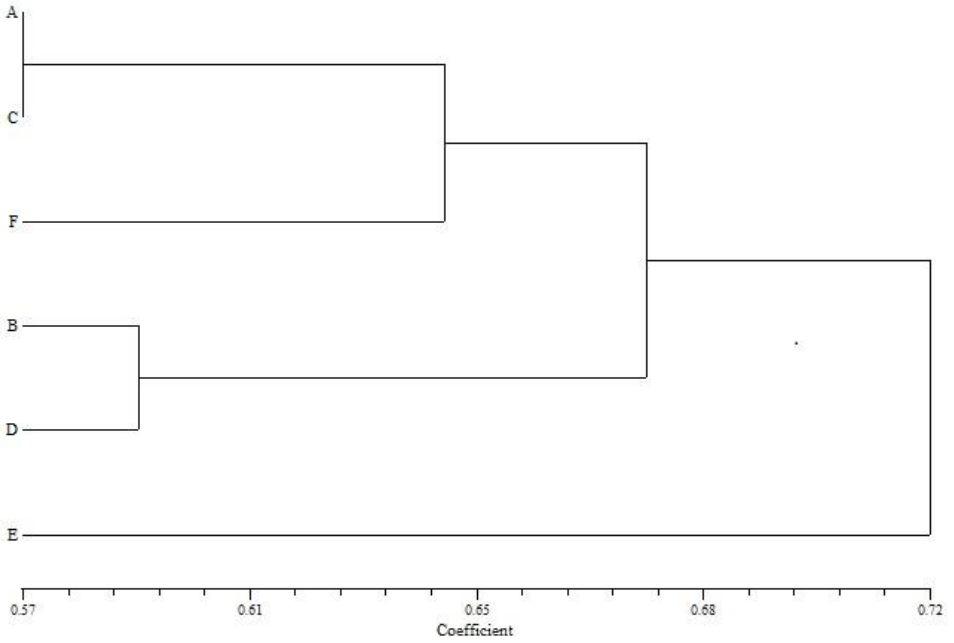
آنالیز داده‌ها

محصول DNA تکثیر شد و باندهای ایجاد شده به صورت حضور باندها (۱) و عدم حضور باندها (۰) به شکل یک ماتریکس امتیازبندی و از نرم افزار Exell برای تشکیل ماتریکس استفاده شد. از ۸ پرایمر استفاده شده در این پژوهش ۵ پرایمر باند قابل شمارش داشتند که در مجموع ۱۸۰ باند تولید کردند که ۱۶۳ نوار چند شکل و ۱۷ نوار تک شکل بودند. به طور متوسط به ازای هر آغازگر ۲۹ باند ایجاد شد. اندازه‌ی باندها در دامنه ۳۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز بود. بیشترین تعداد باند در آغازگر A مشاهده شد(شکل. ۷) و کمترین تعداد نوار ۱۸ بوده که در آغازگر C مشاهده شد (شکل۵). پایین‌ترین قدرت تفکیک مربوط به آغازگر 10mer I با عدد به دست آمده ۷۸/۹ و بالاترین قدرت تفکیک مربوط به پرایمر 10mer j با عدد به دست آمده ۱۰۰ بود (شکل. ۴). میانگین قدرت تفکیک نیز ۰/۷۹ به دست آمد. ضریب تشابه دایس و جاکارد در نرم افزار Ntsys 2.1. بررسی شد که در نتیجه‌ی آن دندروگرام با استفاده از برنامه‌ی SAHAN رسم و ژنوتیپ‌های مورد نظر به ۴ گروه طبقه بندی شدند.

با توجه به نمودار شماره ۱ که نشان دهنده درخت فیلوژنی ارقام بنفشه آفریقایی است ارقام مورد مطالعه، در فاصله‌ی ۰/۷۲ به دو دسته تقسیم شده که در ابن فاصله Nevada از ۵ رقم دیگر به طور کامل جدا شده است، در فاصله‌ی ۰/۶۷ Little Arapahoe Gir، Tokyo و Colorado در یک گروه و دو مورد دیگر در یک گروه جای گرفتند. فاصله‌ی ۰/۶۵ Colorado از Little Arapahoe Gir و Ada جدا شده است. رقم Ada در فاصله‌ی ۰/۵۹ از نمونه‌ی Rome جدا شد.

این درخت فیلوژنی بیانگر این موضوع است که؛ رقم Nevada می‌تواند به عنوان یک زیر گونه جدید مطرح شود. با در نظر گرفتن این نکته که صحت تخمین تنوع ژنتیکی بر مبنای داده‌های مولکولی به عوامل متعددی مانند تعداد نشانگرهای مورد استفاده، توزیع آن‌ها در ژنوم و دقت در امتیاز بندی نوارها بستگی دارد (Schut et al., 1997)، و این که ممکن است بعضی از نوارها در الگوی نواری RAPD مربوط به تکثیر آلل‌ها نبوده و توالی‌های مشابه باشند(Wiliams, 1997; Fraga, 2005)؛ پس در این مورد نیز این امکان وجود دارد که در صورت استفاده از تعداد آغازگرهای بیشتر به دلیل پوشش بیشتر ژنوم این ارقام نیز در گروه دیگر جای گیرند.

ضریب همبستگی کوفنتیکی به‌دست آمده در این حالت ۰/۸ می‌باشد که نشان‌دهنده یک پردازش خوب بین دندروگرام و ماتریس تشابه اصلی می‌باشد. با توجه به دندروگرام حاصل و ماتریس تشابه به خوبی مشخص می‌شود که میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌های بنفشه آفریقایی تحت مطالعه، پایین بوده و تنوع بین آن‌ها به نسبت زیاد می‌باشد.



نمودار ۱. درخت فیلوژنی ٦ ژنوتیپ بنفشه آفریقایی . A– Ada–B Little Arapohe Gir Colorado–F Nevada–E Rome– Tokyo D–C

منابع

۱. **شهریاری، ف.، امام جمعه، ع. (۱۳۸۰).** واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Newton, C. R. and Graham, A) چاپ اول، انتشارات دانشگاه امام رضا، صفحه ۲۲۸

2. **Amani, J., Kazemi, R., Abbasi , A., Salmanian A. H. (2011)** A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis, Iranian journal of Biotechnology, **9**(1):1-3

3. **Baatvik, S.T. (1993)** The genus *Saintpaulia* (Gesneriaceae) 100 years: History, taxonomy, ecology, distribution and conservation. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplementum*, **2**: 97–112

4. **Brown, T.A. (2006)** Gene cloning and DNA analysis, ISBN, **I0**:1-4051-1121-6

5. **Calderon, N., Quesada, M., Camacho, H. (2010)** A Simple and Rapid Method for DNA Isolation from Xylophagous Insects, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 5056-5064

6. **Chen, J., Henny, R.J. (2009)** Cultural Guidelines for Commercial Production of African Violets (*Saintpaulia ionantha*), *University of florida IFAS extention*, pp: 1-4.

7. **Darbishire, G. (2006)**, *Saintpaulia* the genera of Gesnariaseae, *East Africa*, pp. 50-72

8. **Dubreuil, M., Riba, M., Mayol, M. (2008)** Genetic structure and diversity in *Ramonda myconi* (Gesneriaceae): effects of historical climate change on a preglacial relict species, 95:577-587.

9. **Eastwood, A., Bytebier, B., Tye, H., Tye, A. (1998)** The conservation status of *Saintpaulia*, *Curtis's Botanical Magazine*, **15**: 49–62.

10. **Fraga, J., Rodriguez, J., Fuentes, O. (2005)** Optimization of Random Amplified Polymorphic and Techniques for use in genetic studies of Cuban triatominae, Rev. Inst. Med. trop. S. *Paulo*, **47**(5):295-300

11. **Kolehmainen, J., Korpelainen, H. (2008)** Morphotypes, varieties, or subspecies? genetic diversity and differentiation of four *Saintpaulia* (Gesneriaceae)morphotypes from the East Usambara Mountain Tanzania, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **157**: 347–355.

12. **Plotsky, Y., Kaiser, M.G., Lamont, S. J. (1995)** Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers, *Anim. Genet*, **26**:163–170.
13. **Schut, j. W., X. Qi., Stam, P. (1997).** Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley, Theo. Appl. Genet**, 95**:1161-1168.
14**. Yu, K., Pauls, k.p. (1992)** optimization of the program PCR program for RAPD analysis, *Nucleic Acid Research*, **20**:1-4
15. **Williams, J.G.K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafelski, J. A. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. **18**:6531–6535.