پنجمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دانشکده کشاورزی
۲۸-۲۷ بهمن ماه ۱۳۸۹

بررسی تنوع ژنتیکی **ارقام** گلرنگ های بهاره با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

علی رضا احمدزاده*[1] ، اسلام مجیدی[2]، امیر محمد دانشیا ن[1]، بهرام علی زاده[2]

۱- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر. ۲- استاد پژوهش موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج.

* علی رضا احمدزاده، آذربایجانشرقی، شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی. Ar.ahmadzadeh@iaushab.ac.ir

چکیده

لازمه استفاده و به کارگیری بهینه منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی، در گام اول تعیین سطح تنوع ژنتیکی آنها است. در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ گلرنگ با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تنوع ژنتیکی براساس نشانگرهای مولکولی RAPD، از ٦٨ آغازگر استفاده شد، ۱۵ آغازگر الگوی نواربندی چند شکل در مجموع ۱۳۱ نوار چند شکل واضح، تولید کردند. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD از دو روش تجزیه خوشه‌ای دورترین همسایه (ClINK) و متوسط فاصله (UPGMA) براساس ضرایب تشابه ژاکارد، تطابق ساده و دایس استفاده شد. روش خوشه‌بندی UPGMA براساس ضریب تطابق ساده ژنوتیپ ها را در ٤ گروه قرار داد.

واژگان کلیدی: **تنوع ژنتیکی، گلرنگ، مارکر مولکولی، واکنش های زنجیرهای**.

مقدمه

گلرنگ از خانواده استراسه و با نام علمی *Carthamus tinctorius* گیاهی است که از گلهای آن بعنوان ماده رنگی استفاده می کنند ولی امروزه از این گیاه به عنوان یک گیاه روغنی استفاده می‌شود (ویس ، ۲۰۰۰).

با عنایت به اینکه لازمه اتخاذ روش‌های مناسب در جهت اصلاح و معرفی ارقام با عملکرد بالا و کیفیت مناسب محصول، شناخت و درک صحیح از تنوع موجود و ماهیت آن می‌باشد، اولین گام در جهت تولید ارقام مطلوب، سازگار و مقاوم به شرایط نامساعد بررسی تنوع ژنتیکی و شناخت دقیق ژرم پلاسم‌ها است. روشهای مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی وجود دارد که استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی از روشهای متداول در این راستا می‌باشند. با توجه به اینکه روشهای مورفولوژیکی و مولکولی هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود بوده و لذا در خصوص استفاده از آنها برای بررسی تنوع ژنتیکی، بین محققین اختلاف نظر وجود دارد (محمدی ، ۱۳۸۵). در تحقیق حاضر با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی ۳۰ گلرنگ بهاره مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ۳۰ رقم گلرنگ بهاره بود که از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. برای استخراج DNA رقم‌های مورد مطالعه، از هر رقم ۳۰ بذر بین کاغذ صافی در انکوباتور با دمای $۲۰^{\circ C}$ قرار داده شد.

بعد از جوانه زنی جهت استخراج DNA، از هر رقم ۱۵ گیاهچه استفاده شد. استخراج DNA بر اساس روش CTAB (سقای معروف و همکاران، ۱۹۸٤) انجام گرفت.

در تجزیه RAPD برای تکثیر قطعات ژنومی ۳۰ رقم گلرنگ از ٦۱ آغازگر تصادفی استفاده شد که ۲۱ آغازگر قادر به تکثیر DNA بوده اند. برای تفکیک محصولات PCR حاصل از تجزیه RAPD، از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد.
برای امتیاز دهی الگوهای نواربندیDNA ، در صورت وجود نوار به آن نمره یک و در صورت عدم وجود نمره صفر تعلق گرفت.
تجزیه خوشه ای برای داده های مولکولی از دو روش خوشه بندی UPGMA و Complete linkage ، با ضریب تشابه ژاکارد ، دایس و تطابق ساده استفاده شد. این عمل با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC انجام گرفت.

نتایج

در این تحقیق برای تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌های DNAی استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. در این مطالعه از ٦۸ آغازگر تصادفی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی گلرنگ استفاده شد. از این تعداد، ۲۱ آغازگر قادر به تکثیر قطعات DNA در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند و از بین ۲۱ آغازگر، ۱۵ آغازگر (۲۲٪) الگوی نواری چند شکلی تولید کردند. برای امتیاز دهی از نوارهایی با شدت وضوح مناسب استفاده شد. ۱۵ آغازگر تصادفی RAPD، در مجموع ۱۳۱ نوار با میانگین ۸/۷۳ نوار به ازای هر آغازگر در مجموع ژنوتیپ‌ها تولید کردند.
در بررسی یزدی صمدی و همکاران (۲۰۰۱) از ۱۰۰ آغازگر RAPD مورد استفاده برای شناسایی ۲۸ رقم گلرنگ، فقط ۱۱ آغازگر (۱۱٪) سطح چند شکلی قابل قبولی نشان دادند. آنها به ازای هر آغازگر چند شکلی، ۲۵/۷۲ نوار چند شکل گزارش کردند.
ویلاترسانا و همکاران (۲۰۰۵) با ۹ آغازگر RAPD، ۱۵ گونه کارتا میوس را گروه‌بندی کردند. آنها به ازای هر آغازگر ۱۷/۱۱ نوار چند شکلی مشاهده کردند.
برای برآورد شباهت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها از سه ضریب تشابه ژاکارد، دایس و ضریب تطابق ساده (محمدی، ۱۳۸۱) و برای تجزیه خوشه‌ای نیز از دو روش UPGMA و دورترین همسایه استفاده شد.
برای بررسی نیکویی برازش خوشه‌بندی‌های انجام گرفته از ضرایب همبستگی کوفنتیک استفاده شد که نتایج آن در جدول ۱ آمده است. پائین بودن ضریب کوفنتیک در داده‌های مولکولی دلیل بر عدم کارایی دندروگرام حاصل نمی‌تواند باشد، بلکه ممکن است به دلیل شرایط غیرعادی در داده‌های به خصوص وجود داده‌های گم شده زیاد در داده‌های مولکولی باشد (محمدی ، ۱۳۸۱).
در گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده‌از نشانگرهای RAPD، به استثناء دندروگرام حاصل از روش دورترین همسایه با ضریب تطابق ساده در بقیه دندروگرامهای به دست آمده با گروه‌بندی ژنوتیپ ها به ٤ گروه، رقم شماره ١٤ (محلی کردستان ۲) به تنهایی به یک گروه مجزا منتسب شد. در کلیه دندروگرامها با گروه‌بندی ژنوتیپ ها به ٤ گروه، ژنوتیپهای شماره ۷، ۱۰ و ۳ (محلی اصفهان ۱، محلی رزقان و محلی ارومیه) در یک گروه قرار داشت. همواره رقم محلی ارک به همراه دو رقم اراک ۲۸۱۱/۱ و ۲۸۱۱/۲ در یک گروه مشاهده شد. در کلیه دندروگرامها رقم‌های اصلاح شده در یک گروه واقع شدند.

جدول ۱ ضریب همبستگی بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از آن

ضریب همبستگی بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از آن	معیار تشابه	روش تجزیه خوشه‌ای
۰/۸۹۷	Dice	UPGMA
۰/۹۰۴	Jaccard	
۰/۷۰۷	Simple Matching	
۰/۸۵۳	Dice	

Complete Linkage	**Jaccard**	۰/۸۴۹
	Simple Matching	۰/۶۰۳

- محمدی، س. ا. ۱۳۸۱. روش‌های آماری در ژنتیک. مجموعه مقالات ششمین کنفرانس بین‌المللی آمار ایران. دانشگاه تربیت مدرس. ص ۳۷۳-۳۹٤.
- محمدی، س. ا. ۱۳۸۵. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی. مجموعه مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. پردیس ابوریحان ـ دانشگاه تهران. ص ۹٦-۱۱۷.
- Saghai Maroof, M. A. , R. M. Biyashev, G. P. Yang, Q. Zhang, and R. W. Allard. . 1994 .Extraordinarily polymorphic micro satellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proc National Academy of Sci U S A 7; 91(12): 5466–5470
- Vilatersana, R.,Garnatje, T.Susanna,A., Garcia JAcas, N.2005. Taxonomic problems in Carthamus(Asteraceac): RAPD markers and sectional classification Botanical Journal of the linnean society .147:375-383.
- Weiss, E. A. 2000. Oil Seed Crops. Blackwell Science Ltd.. Oxford, London.
- Yazdi Samadi, B.Maali Amiri, R.Ghannadha, M.R. Abd Mishani,C.2001. Detection of DNA Polymorphism in Landrace populations of safflower in Iran using RAPD-PCR technique. The 7th International safflower conference, North Dakota and Sidney, Montana USA – July 23-27.2001.

Analysis of genetic diversity in spring safflower *(Carthamus tinctorius)* cultivars using RAPD markers

Ahmadzadeh A. R.[1*], Danesheyan A.[2], AliZadeh B.[3].

1- Faculty of Agriculture, Islamic Azad University-Shabestar branch. Iran.

2- Faculty of Agriculture, Islamic Azad University-Shabestar branch. Iran.Faculty of Agriculture Tabrez University, Iran.

3- Seed and plant Improvement Institute. KARAJ. Iran.

*** Ahmadzadeh A. R Ar.ahmadzadeh@iaushab.ac.ir**

Abstract

Assessment of genetic diversity in the first step is useful for the utilization of genetic materials through breeding programs . In the present study , genetic diversity of 30 spring genotypes of safflower (*Carthamis tinctorious*) was assessed by RAPD markers. In assessment of genetic diversity by RAPD markers 15 seeds from each genotype were grown in greenhouse and genetic DNA was extracted from leaf samples by CATAB procedure. For the RAPD analyses, 68 primers were screened and 15 most polymorphic ones yield 131 clear polymorphic bands. On the average 8.37 bans per primer were observed. The cluster analyses of RAPD data was done using un weighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and complete linkage methods with jaccard similarity , simple matching and Dic–coefficients. The UPGMA method based on simple matching coefficient based on RAPD data four groups were detected.

Kaywords: *Carthamus tinctorius*, genetic diversity, RAPD markers, spring safflowerm,