استفاده از نشانگر ISSR در تعیین واریته های گل جالیز مصری کشور

نوشین نظام آبادی*[۱]، سیروان بابائی[۲] و محمدرضا نقوی[۲]
۱. موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور ۲. دانشجوی دکتری علوم علف‌های هرز و استاد گروه زراعت دانشگاه تهران
*nezamabadi_n@yahoo.com

چکیده
گل جالیز مصری *Orobanche aegyptiaca* Pers. با نام مترادف *Phelipanche aegyptiaca* Walp. مهمترین گیاه انگلی کشور است. این گونه دارای صفات بسیار متغیر بوده و بر این اساس دو واریته در ایران برای آن ذکر شده است. اما شناسایی واریته ها از روی خصوصیات ریخت شناسی کار مشکلی است و نیازمند دقت و اندازه گیری های مشکل می باشد. در این پژوهش ۶۰ نمونه از دوازده جمعیت گل جالیز مصری مناطق مختلف کشور در تابستان ۱۳۸۸ انتخاب و با استفاده از نشانگر ISSR مورد تجزیه مولکولی قرار گرفت. نتایج نشان داد نمونه های یک جمعیت در کنار هم گروه بندی نشدند. از طرف دیگر نشانگر ISSR توانست از ۶۰ نمونه ۱۲ جمعیت گل جالیز مصری آنهایی را که از واریته *aemula* بودند از نمونه های واریته *aegyptiaca* تفکیک کند. لذا می توان از نشانگرهای مولکولی در تعیین و تایید واریته های جمعیت های گل جالیز کشور استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: واریته *aemula* ، واریته *aegyptiaca* ، جمعیت گل جالیز مصری، خصوصیات ریخت شناسی.

Determination of broomrape (*Phelipanche aegyptiaca*) varieties with ISSR markers

Noushin Nezamabadi[1], Sirwan Babaei[2] and Mohamad Reza Naghavi[3]
1. Iranian Research Institute of Plant Protection, 2 and 3. PhD student of weed science and professor of University of Tehran

Abstract
Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca* Pers. syn. *Phelipanche aegyptiaca* Walp.) is the most important parasitic plant in Iran. This plant has very different forms so that it has two varieties in Iran. Determinations of these varieties using morphological characteristics are very hard. In this experiment, 60 samples of 12 broomrape populations were collected from different regions of Iran during the summer of 2009. The results showed that samples of one population were not in one group. The ISSR primers separated two varieties *aemula* from *aegyptiaca*. The overall results of the experiment indicated that molecular markers can determine and confirmed the varieties of broomrape populations in Iran.

Keywords: *Phelipanche aegyptiaca* var. *aemula*. *Phelipanche aegyptiaca* var. aegyptiaca. Egyptian broomrape population, morphological characteristic.

مقدمه
گل جالیز مصری *Orobanche aegyptiaca* Pers. با نام مترادف *Phelipanche aegyptiaca* Walp. گیاهی یکساله، به بلندی ۵۰-۱۵ سانتی متر، با پرزهای غده ای کوتاه و یا گاهی تقریباً صاف و بی پرز است. ساقه معمولاً منشعب و زرد رنگ است. براکتئول ها خطی- درفشی و کوتاه تر از کاسه گل هستند. کاسه گل بطول ۱۴-۸ میلی متر و به رنگ روشن مایل به سفید است. براکتئول ها خطی- درفشی و کوتاه تر از کاسه گل هستند. کاسه گل بطول ۱۴-۸ میلی متر و به رنگ روشن مایل به سفید است. پهنک گلبرگ ها به رنگ آبی مایل به بنفش و قاعده لوله جام گل روشن تر و مایل به سفید است. سطح خارجی جام گل دارای پرزهای غده ای می باشد. حاشیه گلبرگ ها مژه دار است. قاعده میله پرچم پرز دارد. بساک نیز دارای پرزهای زیاد است. طول کپسول۱۲-۷ میلی متر است. پوسته دانه ها مشبک می باشد (ایرانشهر، ۱۳۸۷). این گونه دگر گرده افشان است و نکتار و رنگ

گل ها سبب جلب حشرات می شود (بک – ماناگتا، ۱۹۶۶). این گونه دارای صفات بسیار متغیر است و بر این اساس دو واریته در ایران برای آن ذکر شده است (بک ماناگتا، ۱۹۳۰). در ادامه به شرح این دو واریته (گیلی، ۱۹۷۹) پرداخته می شود:

۱- *P. aegyptiaca var. aegyptiaca* G. Beck : گل ها بزرگ، از ۲۷ تا ۳۷ میلی متر طول دارند. شکاف جام گل پهن و جام گل با کرک های مومی فراوان است. دندانه کاسه گل تا حدودی سرنیزه ای و یا تا حدودی نخی شکل، لوله کاسه گل اغلب طویل تر از دندانه ها است. گل های روی سنبله جدا و تنک هستند. شاخه پرچین (گیلی، ۱۹۷۹). ۲- *P. aegyptiaca var. aemula* G. Beck: گل ها کوچک، از ۲۰ تا ۲۶ میلی متر طول دارند. (بندرت کوچکتر از ۱۸ میلی متر)، شکاف جام گل کوچک است. دندانه کاسه گل تا حدی سرنیزه ای و برابر با طول کاسه گل. سنبله با گل های متراکم (به ندرت گل ها جدا و تنک) (گیلی، ۱۹۷۹). شناسایی واریته ها از روی خصوصیات ریخت شناسی کار مشکلی است و نیازمند دقت و اندازه گیری های مشکل می باشد (ایرانشهر، ۱۳۸۷) درحالی که با استفاده از نشانگرهای مولکولی می توان بر این مشکل فایق شد. استفاده از نشانگر ISSR برای تشخیص واریته ها و ارقام گیاهانی مثل نخود، خردل، انبه، مرکبات و بارهنگ گزارش شده است (بات، ۲۰۱۲). لذا در این پژوهش با استفاده از ۵ نشانگر ISSR دوازده جمعیت گل جالیز مصری مورد تجزیه تحلیل ژنتیکی قرار گرفتند و واریته های موجود در کشور با استفاده از این نشانگر تفیک شدند.

مواد و روش‌ها

طی سال های ۸۸-۱۳۸۷ بذر دوازده جمعیت گل جالیز از مناطق مختلف کشور (جدول ۱) جمع آوری گردید که مشخصات طول و عرض جغرافیایی محل و گیاه میزبان در این جدول ذکر شده است. در این بررسی به دلیل دگرگشن بودن گل جالیز مصری، از هر دوازده جمعیت گل جالیز مصری، ۵ نمونه درون هر جمعیت انتخاب شد (ایرانشهر، ۱۳۸۷). به منظور بررسی استخراج ماده وراثتی هسته جمعیت های گل جالیز مصری، ۰/۱۵ تا ۰/۱۶ گرم از گل های انتهایی نمونه های رویش یافته، انتخاب و DNA هسته سلول مطابق با دستورالعمل رومن و همکاران (۲۰۰۲) استخراج شد. فرایند PCR جهت تکثیر آغازگرهای ISSR (رومن و همکاران، ۲۰۰۲) (جدول ۲) انجام شد. محصولات PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪و با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. سپس نمره‌دهی بر اساس وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۰) صورت گرفت. این داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.02 تجزیه مولکولی شدند و تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس و با استفاده از روش UPGMA ترسیم شد.

جدول ۱- مشخصات بذر جمعیت های گل جالیز جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران

شناسه	جمعیت	میزبان	استان	طول جغرافیایی (درجه دقیقه ثانیه)	عرض جغرافیایی (درجه دقیقه ثانیه)	شماره نمونه ها در هر جمعیت
A	اراک	سیب زمینی	مرکزی	۵۲ ۴۱ ۴۹	۰۹ ۰۵ ۳۴	۱-۵
B	بهشهر	توتون	مازندران	۳۰ ۳۲ ۵۳	۰۳ ۴۲ ۳۶	۶-۱۰
E	ایوانکی	خربزه	سمنان	۰۰ ۰۰ ۵۲	۰۰ ۱۸ ۳۵	۱۰-۱۵
G	گرمسار	گوجه فرنگی	سمنان	۲۴ ۰۳ ۵۲	۴۰ ۲۰ ۳۵	۱۶-۲۰
M1	مشهد	گوجه فرنگی	خراسان	۰۰ ۲۵ ۵۹	۰۰ ۲۶ ۳۶	۲۱-۲۵
M2	مشهد	گوجه فرنگی	خراسان	۰۰ ۳۶ ۵۹	۰۰ ۱۷ ۳۶	۲۶-۳۰
H	همدان	سیب زمینی	همدان	۴۹ ۴۱ ۴۸	۰۷ ۱۳ ۳۵	۳۱-۳۵
O	ارومیه	آفتاب گردان	آذربایجان غربی	۰۶ ۰۴ ۴۵	۰۸ ۴۰ ۳۷	۳۶-۴۰
P	پیشوا	گوجه فرنگی	تهران	۰۰ ۴۲ ۵۱	۰۰ ۱۸ ۳۵	۴۱-۴۵
S	ساوه	سیب زمینی	مرکزی	۰۰ ۲۱ ۵۰	۰۰ ۰۱ ۳۵	۴۶-۵۰
K	کرج(هشتگرد)	گوجه فرنگی	تهران	۰۰ ۳۶ ۵۰	۰۰ ۵۳ ۳۵	۵۱-۵۵
V	ورامین	گوجه فرنگی	تهران	۲۰ ۳۹ ۵۱	۲۴ ۱۹ ۳۵	۵۶-۶۰

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در فرایند PCR (رومن و همکاران، ۲۰۰۲)

آغازگر	توالی('5-'3)
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG

نتایج و بحث

از دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای (شکل ۱) با استفاده از الگوریتم UPGM در فاصله ضریب تشابه ۷۶ درصد، نمونه های گل جالیز در ۶ گروه عمده تقسیم بندی شد. به طوری که در گروه اول ۱۲ نمونه شامل جمعیت های گل جالیز اراک، ورامین، همدان، کرج (هشتگرد)، مشهد، همدان، و بهشهر، در گروه دوم ۵ نمونه شامل جمعیت های گل جالیز ایوانکی، گرمسار و ساوه، در گروه سوم ۱۵ نمونه شامل جمعیت های دیگری از اراک، مشهد ۱، همدان، هشتگرد، مشهد ۲، ورامین، بهشهر، ایوانکی و گرمسار، در گروه چهارم ۱۱ نمونه شامل جمعیت هایی از اراک، ارومیه، مشهد، هشتگرد، ساوه، ایوانکی، گرمسار و پیشوا، گروه پنجم شامل نمونه های دیگری از جمعیت های گل جالیز پیشوا، اراک، بهشهر و همدان، و در گروه ششم، ۵ نمونه از جمعیت های گل جالیز ساوه، ایوانکی، گرمسار، پیشوا و ارومیه قرار گرفتند (شکل ۱). در کل جمعیت هایی از گل جالیز مصری با فاصله جغرافیایی متفاوت در یک گروه، جا گرفتند. قرارگیری جمعیت هایی با منشأ جغرافیایی متفاوت در دندروگرام کنار یکدیگر نشان می‌دهد، که آلل‌های مشترکی بین آنها وجود دارد. به این ترتیب، نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع ملکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد (رنجبر و همکاران، ۱۳۸۶).

از سوی دیگر با بررسی نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای مشاهده می شود که نمونه هایی که از واریته *aemula* بودند مثل ۴۳، ۴۱، ۴۰، ۱۹، ۱۴، ۲۵، ۲۲، ۹، و۲ در دندوگرام تجزیه خوشه ای حاصل از داده های مولکولی در گروه ۵ و ۶ در کنار هم قرار گرفتند. و بقیه نمونه ها که از واریته *aegyptiaca* بودند در گروه های دیگر قرار گرفتند. پس می توان گفت نشانگر ISSR توانست از ۶۰ نمونه ۱۲ جمعیت گل جالیز مصری آنهایی را که از واریته *aemula* بودند از نمونه های واریته *aegyptiaca* تفکیک کند. در کل با استفاده از نشانگرها و نتایج داده های مولکولی می توان واریته های این گیاه انگل را شناسایی کرد. البته لازم به ذکر است که این نتایج بایستی برای سایر جمعیت های گل جالیز کشور مجدد تکرار شود تا نتایج قابل استناد باشد.

منابع

ایرانشهر، م. ۱۳۸۷. گیاهان گلدار و نیم انگلی ایران (جلد دوم). رستنی ها. ۷۹ صفحه.

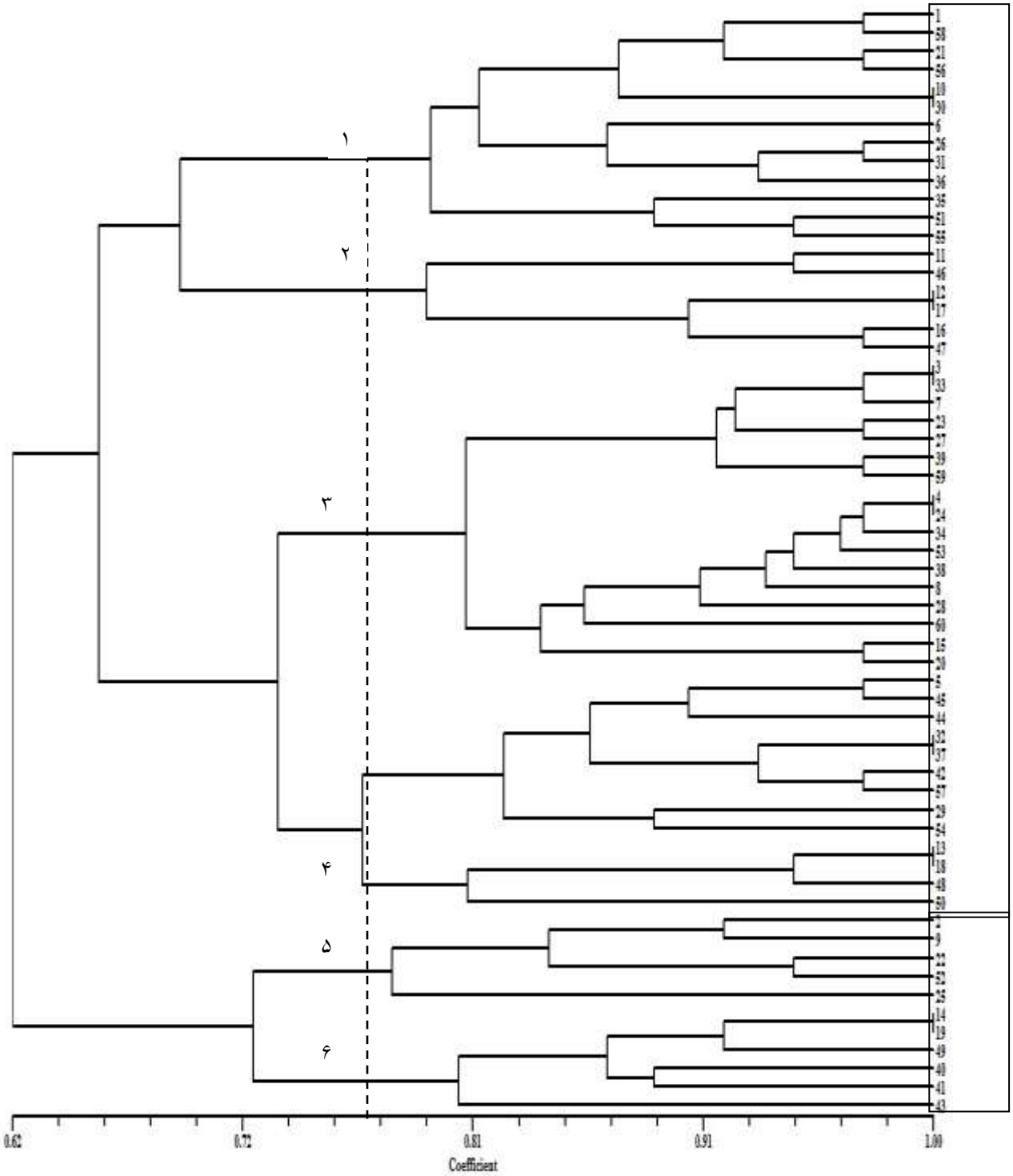
رنجبر، م.، م. ر. نقوی و ع. زالی. ۱۳۸۶. بررسی تنوع مورفولوژیکی و مولکولی بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران. ۹۴ صفحه.

Beck von Mannagetta, G. 1966. *Orobanchaceae*. In : A. Engler, Das Pflanzenreich IV. 261:1-348.

Bhat, R. V. 2012. DNA fingerprinting and cultivar identification. http://www.iasri.res.in/ebook/EBADAT/6_Other_%20_Useful_%20_Techniques_/9DNA_%20_Finger_printing_-IASRI_KVB._pdf.

Gilli, A. 1979. Die orobanchaceen der flora iranica. Candollea 34. 2: 279-305.

Roman, B., Z. Satovic, D. Rubiales, A. M. Torres, J. Ignacio Cubero, N. Katzir, and D. M. Joel. 2002. Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche crenata* from spain and israel revealed by inter simple sequence repeat markers. 92. 1262-1266.



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ۶۰ نمونه از ۱۲ جمعیت گل جالیز مصری بر اساس ماتریس تشابه حاصل از داده‌های ISSR