نهمین کنفرانس ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی فیزیولوژی گیاهی
9th National and 1st International Conference of Plant Physiology
۲۷-۲۹ بهمن ۱۴۰۴، دانشگاه گیلان

شناسایی جهش‌ها در ژن *fbp6* در ژنوتیپ‌های کم پر و پُرپَر گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*)

مهدیه ملک پوری[۱]، لیلا خدائی[۲*]، اصغر میرزائی اصل[۱] و محمدرضا عبداللهی[۱]
۱ گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲ گروه کشاورزی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران- رایانامه: lkhodaei@pnu.ac.ir

چکیده

گل اطلسی (*Petunia hybrida*) یکی از گیاهان باغچه‌ای مهم جهان است و یکی از اهداف مهم به‌نژادی این گیاه، تولید ارقام پُرپَر می باشد. در این پژوهش به منظور شناسایی جهش‌ها در ژنوتیپ‌های کم‌پَر و پُرپَر در ژن‌های کاندید پُرپَری ، توالی ژن *FBP6* مربوط به گیاه اطلسی در پنج ژنوتیپ پُرپَر و پنج ژنوتیپ کم‌پَر مورد مقایسه قرار گرفت. طراحی آغازگرهای مورد نظر برای هر ژن با استفاده از توالی‌های DNA موجود در پایگاه داده NCBI صورت گرفت. ازگیاهان کشت شده در گلدان نمونه‌های برگی تهیه و DNA استخراج شد و به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید. در ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای ژن *fbp6* یک جهش حذف/ اضافه به طول ۶۴ جفت باز در ناحیه اینترونی مشاهده شد. همچنین چندین جهش‌های نقطه‌ای در این ژن مشاهد شد. جهش‌های شناسایی شده ممکن است در بیان ژن *fbp6* مورد بررسی موثر باشند و یا موجب تغییر در ساختار پروتئین گردند. بررسی این جهش‌ها در ژنوتیپ‌های دیگر می‌تواند منجر به شناسایی نشانگر پیوسته به صفت پُرپَری شود.

مقدمه

صفت پرپری با افزایش تعداد گلبرگ و اندازه کلی گل در ارتباط است .ارقام اطلسی پرپر ارزش افزوده زینتی بالاتر و در نتیجه ارزش تجاری بالاتری دارند. شناخت مکانیسم مولکولی پُرپَری در اطلسی، هزینه تولید ارقام پُرپَر را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، شناسایی جهش‌ها در ژنوتیپ‌های کَم‌پر و پُرپَر در ژن‌های کاندید پُرپَری امکان دستیابی به نشانگرهای ژنتیکی پیوسته با صفت پُرپَری را فراهم می‌سازد که می‌تواند در به‌نژادی گیاه اطلسی کارآمد باشد. یافته های پژوهشگران نشان می‌دهد که بیشتر فنوتیپ‌های پُرپَری از کمبود ژن‌های عملکردی C ناشی می‌شوند (Coen and Meyerowitz, 1991). جهش در ژنهای کلاس C (AGAMOUS) موجب تبدیل پرچمها به گلبرگها می شود. یکی از این ژن-ها(FLORAL BINDING PROTEIN6) *fbp6* است. هدف از این مطالعه بررسی الگوهای باندی و توالی چند ژنوتیپ پرپر و کم پرگیاه اطلسی حاصل از آغازگرهای توالی ژن *fbp6* به منظور شناسایی جهش‌های ژنی مرتبط با صفت پُرپَری برای بکارگیری در به‌نژادی گیاه اطلسی و کاهش هزینه و زمان تولید ارقام پُرپَر است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از ۱۰ ژنوتیپ مختلف گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) استفاده گردید. ژنوتیپ‌های کم‌پَر ۱۳۸، ۱۳۹، ۱۴۲، ۱۶۰ و ژنوتیپ‌های پُرپَر ۱۶۲ و H1، P40، B، C و M. بذرهای اطلسی تهیه و در گلخانه کشت شدند. استخراج DNA از برگ‌ها وبافت‌های سبز گیاهان انجام و سپس کیفیت و کمیت DNA مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش۶ جفت آغازگر طراحی ساخته شد. PCR طبق برنامه مشخص انجام گرفت. سپس، محصولات PCRبر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. محصولات PCR مربوط به هر ژن، بعد از تایید مناسب بودن، برای توالی‌یابی به روش مستقیم به شرکت بایونیر کره فرستاده شدند. جهت شناسایی جهش‌در توالی‌های مورد نظر از نرم‌افزار asergene (SeqMan)استفاده گردید.

نتایج و بحث

با استفاده از آغازگرهای طراحی شده *pep6*، *5fb6*، *4fb6*، *3fb6*، *2fb6*و *pe2p6* قطعات مختلف از توالی ژن *fbp6* در ژنوتیپ‌های اطلسی تکثیر شد. محصول PCR با آغازگر پیشرو و پسرو جهت مقایسه توالی‌ها، توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی در پایگاه NCBI مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی بدست آمده در بانک داده-های توالی با سایر گیاهان با استفاده از نرم‌افزار BLASTn در پایگاه BLAST مورد جستجو قرار گرفت. نتایج نشان داد تعداد ۵۶۲ جفت باز از توالی قطعه تکثیر شده بزرگتر مربوط به پیشبر و ۵۱۰ جفت باز آن مربوط به ناحیه اگزونی و اینترون ژن *fbp6* بود. تعداد ۱۲ جهش از نوع جایگزینی و ۵ جهش از نوع حذف/اضافه مشاهده شد که ۴ جهش آن از نوع حذف/اضافه تک نوکلئوتیدی بود. یک جهش حذف/اضافه به طول ۶۴ نوکلئوتید شناسایی شد که در ناحیه اینترون ژن *fbp6*قرار داشت. این جهش‌ها ممکن است در بیان ژن *fbp6*موثر باشند و یا موجب تغییر در ساختار پروتئین گردند. با توجه به اینکه نتایج BLASTn آغازگرهای *3fb6*قطعه توالی‌یابی شده نشان داد که توالی X6867.1 مربوط به mRNA ژن *fbp6*می-باشد که مربوط به قسمتی از ناحیه اینترون۵، اگزون ۶، اینترون ۶، اگزون قسمتی از اینترون۷ ژن *fbp6*گیاه اطلسی است. در آغازگرهای *2fb6*از تعداد ۴۴ جهش جایگزینی، تعداد ۲۴ جهش از نوع غیر هم‌جنس و تعداد ۲۰ جهش از نوع هم‌جنس می‌باشد. همچنین تعداد ۴ جهش از نوع حذف/اضافه تک نوکلئوتیدی بود. نتایج BLASTn نشان دادکه توالی JQ073292.1 مربوط به اینترون ، توالی X6867.1 مربوط به mRNA، توالی JN654512 مربوط به پروموتور و ′5 UTR ژن *fbp6*نشان داد مربوط به قسمتی از اینترون ۷ و اگزون ۸ ژن f*bp6* می‌باشد. آغازگرهای *pe2p6*ناحیه اگزون ۸ ژن *fbp6* را تکثیر نمودند. طبق گزارش انگنت و همکاران ، تخمک‌ها به عنوان یک حلقه گل جداگانه متمایز از برچه حلقه چهارم تعریف شدند و *fbp7*و *fbp11*به عنوان ژن‌های شناسایی تخمک شناخته شدند(Angenent *et al.*, 1995).. ناکاتسوکا و کویشی ، در گیاه شب‌بو گزارش کردندکه MiAG را از ارقام *Matthiola incana* جدا کردند که توالی و ساختار ژنومی آن شباهت زیادی به ژن AGAMOUS در آرابیدوپسیس دارد. علاوه بر این ، آن‌ها نشانگرهای مولکولی غالب برای توصیف ژنوتیپ‌های سه آلل *MiAG* ایجاد کردند که با استفاده از این نشانگرهای DNA انتخاب افراد کم‌پَر یا پُرپَر در بین جوانه‌هایی که تفاوت فنوتیپی نشان نمی‌دهند، امکان پذیر شده است(Nakatsuka and Koishi, 2018). در پژوهش حاضر، ۹۸۸۶ جفت باز از توالی *fbp6*به همراه نواحی تنظیمی مشخص شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، جهش حذف/اضافه‌ای به طول ۶۴ جفت باز در ژنوتیپ کم‌پَر(۱۳۹) مشاهده شده است که این جهش حذف در ژنوتیپ کم‌پَر (۱۳۹) در ناحیه اینترون ژن *fbp6*قرار دارد. این جهش‌ها ممکن است در بیان ژن *fbp6*موثر باشند.

منابع

Angenent, G. C., Franken, J., Busscher, M., van Dijken, A., van Went, J. L., Dons, H. J., and van Tunen, A. J. (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. The Plant Cell, 7(10): 1569-1582

Coen, E. S., and Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature, 353(6339): 31-37. doi: https://doi.org/10.1038/353031a0

Nakatsuka, T., and Koishi, K. (2018). Molecular characterization of a double-flower mutation in *Matthiola incana*, Plant Science, 268: 39-46.