بررسی تنوع ژنتیکی ارقام وحشی توت‌فرنگی ایران با استفاده از نشانگرهای اپی‌ژنتیکی

سید حمیدرضا هاشمی، یوسف قاسمی، قربانعلی نعمت زاده، همت‌الله پیردشتی
پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

متیلاسیون DNA یکی از مهمترین راه‌های ایجاد تنظیمات اپی‌ژنتیک است که با استفاده از تغییر الگوی بیان ژن در سطح ژنوم سبب انعطاف‌پذیری و پایداری گیاه در شرایط جدید می‌گردد. در این تحقیق جهت شناسایی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی ایران از نشانگرهای حساس به متیلاسیون DNA (MSAP) استفاده گردید. بدین منظور ١٧ ژنوتیپ توت‌فرنگی شامل ٦ واریته تجاری به همراه ١١ ژنوتیپ وحشی مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز MSAP با استفاده از دو آنزیم ایزوشیزومر که به متیلاسیون DNA در جایگاه CCGG حساسند صورت گرفت. ٣ الگوی مختلف متیلاسیون در این بررسی مشاهده گردید. باندهای تیپ I (عدم متیلاسیون) بخش اعظمی از باندهای این تحقیق را به خود اختصاص داد. بیشترین فراوانی متیلاسیون، در باندهای تیپ II یا متیلاسیون CpG مشاهده گردید. میزان تنوع مشاهده شده در باندهای تیپ II بیشتر از تیپ III بوده که به ترتیب بیانگر متیله شدن سیتوزین در جایگاه CpG و CpCpG می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد ژنوتیپ‌های مختلف توت‌فرنگی، از حساسیت متفاوتی به آنزیم‌های‌ای Msp I و Hpa II برخوردار بوده که این الگوهای متیلاسیونی احتمالا با مکانیسم‌های تنظیم ژنی آنها مرتبط می‌باشد.

مقدمه

جنس توت‌فرنگی شامل ٢٠ گونه مختلف، که دارای سطوح پلوئیدی مختلف بوده و تعداد کروموزوم‌های پایه آن ٧ عدد می‌باشد. گونه‌های وحشی توت‌فرنگی ایران که در جنگل‌های شمال ایران می‌رویند گونه وسکا بوده و تعداد کروموزم‌های آن ١٤ عدد می‌باشد. با توجه به اینکه، یکی از خاستگاه‌های مهم رویش و تنوع توت‌فرنگی وسگا در نوار ساحلی و شمالی ایران بوده، متاسفانه اطلاعات اندکی از طبقه‌بندی،خصوصیات مرفولوژی و فیزیکوشیمیایی آنها در دسترس می‌باشد. با توجه به اهمیت حفاظت از ذخایر ژنتیکی و استفاده از پتانسیل ارقام وحشی، شناسایی و طبقه بندی این اکوتیپ‌ها امری ضروری بنظر می‌رسد. تغییرات اپی‌ژنتیک در واقع تغییر در الگوی بیان ژن بدون تغییر در توالی DNA می‌باشد. یکی از تغییرات اپی‌ژنتیکی معمول در گیاهان و جانوران متیله‌شدن DNA است که بواسطه آن مولکول DNA خود را تنظیم می‌کند (١) که بعنوان یکی از مکانیسم‌های مهم در تنظیم بیان ژن در موجودات یوکاریوتی در نظر گرفته می‌شود (٣، ٢). با توجه به نقش کلیدی تغییرات اپی‌ژنتیکی، ارزیابی متیلاسیون DNA در گیاهان با تکامل خاص که از سطوح مخلف پلوئیدی برخوردارند جنبه‌های جدیدی از روابط ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را در سطح ژنوم ترسیم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

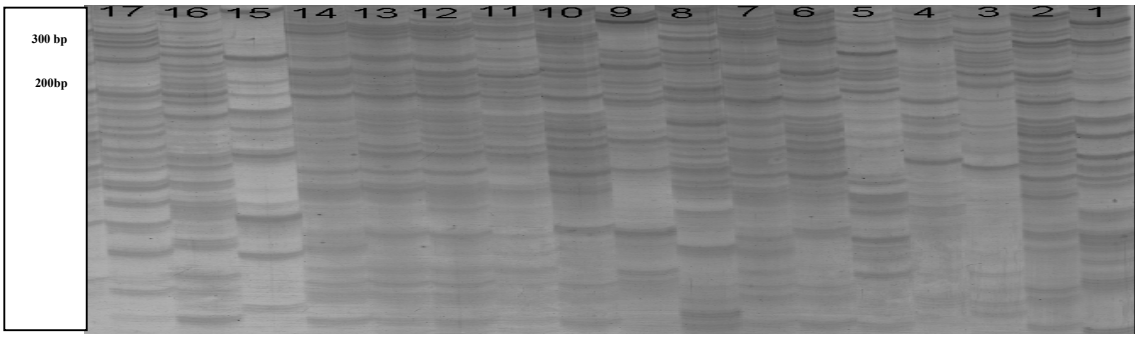
در این تحقیق ١١ نمونه وحشی از مناطق مختلف جنگل‌های استان مازندران ، گلستان، گیلان و آذربایجان شرقی و ٤ واریته محلی دلندی، گیلاسی، اتابکی و کردستان به همراه ٢ رقم تجاری سلوا و کاماروسا جمع‌آوری گردیدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت QIAGEN صورت گرفت. جهت تشخیص و بررسی چندشکلی ناشی از متیله شدن DNA از تکنیک MSAP با مقداری تغییرات استفاده شد. در این مطالعه از تعداد ١٠ ترکیب آغازگری (Alpha DNA, Montreal, Canada) برگرفته از روش سالمون و همکاران صورت پذیرفت. به منظور مشاهده الگوی نواری محصولات تکثیری از دستگاه Sequi-Gen GT Cell و ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ٦٪ استفاده گردید. پس از الکتروفورز رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره اجرا و از الگوی باندی بدست آمده با استفاده از دستگاه دنسیتومتر Imaging densitometer (GS-800, BioRad, USA) تصویربرداری شد.

نتایج و بحث

در مجموع آنالیز MSAP با استفاده از ١٠ ترکیب آغازگری با قطعاتی که در محدوده باندی 150-800 bp قرار داشتند صورت گرفت. با استفاده از مقایسه الگوی باندی ناشی از آنزیم‌های *EcoR* I + *Hpa* II و *EcoR* I + *Msp* I وضعیت متیلاسیون در

جایگاه برشی CCGG بررسی گردید. در این تحقیق الگوهای مختلف متیلاسیون که در آنالیز MSAP مشاهده گردید به سه دسته تقسیم گردید: (۱) تیپ I: وجود باند در هر دو واکنش آنزیمی بعنوان عدم متیلاسیون در جایگاه برشی لحاظ گردید که بخش اعظمی از باندهای این تحقیق را بخود اختصاص داد. (۲) تیپ II: وجود باند در واکنش *EcoR* I + *Msp* I و نبود آن در *EcoR* I + *Hpa* II نشان‌دهنده متیله شدن سیتوزین‌های داخلی در هر دو رشته DNA در نظر گرفته شد. (۳) در حالی که وجود باند در *EcoR* I + *Hpa* II و نبود آن در واکنش *EcoR* I + *Msp* I بعنوان متیلاسیون سیتوزین خارجی در یک رشته کدگذاری گردید. از ۱۰ ترکیب پرایمری مورد استفاده در مجموع ٤٢٠ باند تولید نمودند (شکل ۱) بیشترین فراوانی متیلاسیون، در باندهای تیپ II یا متیلاسیون سیتوزین داخلی قابل مشاهده است. متیله‌شدن بازهای سیتوزین در مکانیسم تنظیمی گیاهان امری رایج است هر چند در واریته‌ها و بافت‌های مختلف گیاهی از میزان متفاوتی برخوردار می‌باشد (٤). در این تحقیق از قابلیت تکنیک MSAP در تعیین اثانگشت ژنوتیپ‌های وحشیف محلی و تجاری توت‌فرنگی استفاده گردید که اثرانگشت منحصربفردی را از وقایع متیلاسیون DNA در جایگاه CG ایجاد نمودند. در تحقیق حاضر اثر انگشت متیلاسیون DNA ژنومی در اکوتیپ‌های مختلف توت‌فرنگی ناشی از پدیده تغییرپذیری ژنومی می‌باشد از طرف دیگر مقادیر متفاوت چندشکلی مشاهده شده در باندهای تیپ I، تیپ II و تیپ III در این بررسی احتمالا حاکی از وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در سطوح مختلف متیلاسیون می‌باشد.

شکل ۱ : نمونه ژل حاصل از ترکیب آغازگری EcoRI (AAG) / HM (TCAC) در واکنش *EcoR* I + *Msp* I در ۱۷ نمونه توت-فرنگی..



منابع:

1) Fang J. and Chao C.T. (2007). Methylation-sensitive amplification polymorphism in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) and their off shoots. Plant Biol. 9: 526–533.

2) Fang J.G., Song C.N., Qian J.L., Zhang X.Y., Shangguan L.F., Yu H.P. and Wang X.C. (2010). Variation of cytosine methylation in 57 sweet orange cultivars. Acta Physiol Plant. 32: 1023–1030.

3) Lu Y., Rong T. and Cao M. (2008). Analysis of DNA methylation in different maize tissues. J Genet Genomics. 35: 41-48.

4) Salmon A., Clotault J., Jenczewski E., Chable V.R. and Manzanares-Dauleux M.J. (2008). *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. Plant Science. 174: 61–70.

Genetic Diversity of Iranian Strawberry Accession Based on Epigenetic Markers

S.H. Hashemi*, Y. Ghasemi, Gh. Nematzadeh, H.A. Pirdashti
Rice and Citrus Research Institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
*Corresponding author: Irahamidreza@yahoo.com

Abstract:
DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications which lead to stability and plasticity of organism. In this study, 17 accessions of Iranian strawberry including 2 commercial varieties, 4 native varieties and 11 wild accessions were characterized by methylatiom sensitive amplification polymorphism (MSAP) markers. MSAP analysis was accomplished based on two isoschizomer enzymes that sensitive to cytosine methylation in CCGG site. In this investigation, three different types of methylation statuses were observed. Although type I (no methylation) fragment has highest frequency, the most frequency of methylation events were observed in Type II (CpG) bands. Type II bands was more diverse than type III bands, that were demonstrated that the methylation status occurs in CpCpG and CpG sites, respectively. Our data showed that strawberry accessions have differential sensitivity to *Msp* I and *Hpa* II enzymes, which these methylation patterns at CG sites probably related to their gene regulatory mechanism.

Key words: Epigenetic, DNA methylation, MSAP, Strawberry, Genetic variation.