انگشت نگاری DNA ارقام تجاری فندق(*Corylus avellana* L.) بومی ایران برای تهیه شناسنامه ژنتیکی

مهرزاد احمدی، جواد مظفری، سونا حسین آوا، عبداله محمدی
کرج- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر- بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران

به منظور تهیه شناسه یا بارکد ژنتیکی ارقام تجاری فندق ایران، ۲۸ درخت از ۱۰ رقم کلکسیون فندق کشوربا استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره ای(SSR) انگشت نگاریDNA شدند. تعداد آلل ها در هر مکان SSR مورد آزمون بین پنج تا ۱۰ آلل متغییر بود. براساس چندشکلی DNA این آلل ها همه ارقام مورد بررسی از هم متمایز گردیدند. تجزیه خوشه ای برمبنای الگوی DNA آلل های SSR ارقام مورد بررسی را در پنج گروه قرارداد. کلاستر اول شامل ارقام گرداشکورات به همراه تابستانه شماره ۲۱، پاییزه و گردویی بود. در کلاستر دوم رقم شیروانی، در کلاستر سوم رقم فندق رسمی و در کلاستر چهارم رقم محلی کرج جای گرفت. کلاستر پنجم به دو زیرگروه تقسیم شد که در زیر گروه اول رقم تابستانه (شماره ۱۹ و ۲۰)، رقم پشمینه و رقم گرچه قرار گرفتند. زیر گروه دوم این کلاستر فقط شامل یک رقم شصتک بود. به این ترتیب به جز درخت شماره ۲۱ رقم تابستانه اصالت ژنتیکی ارقام مورد بررسی تایید و بارکد یا شناسه ژنتیکی آنها ایجاد شد.

کلمات کلیدی: فندق -SSR - انگشت نگاری DNA

مقدمه

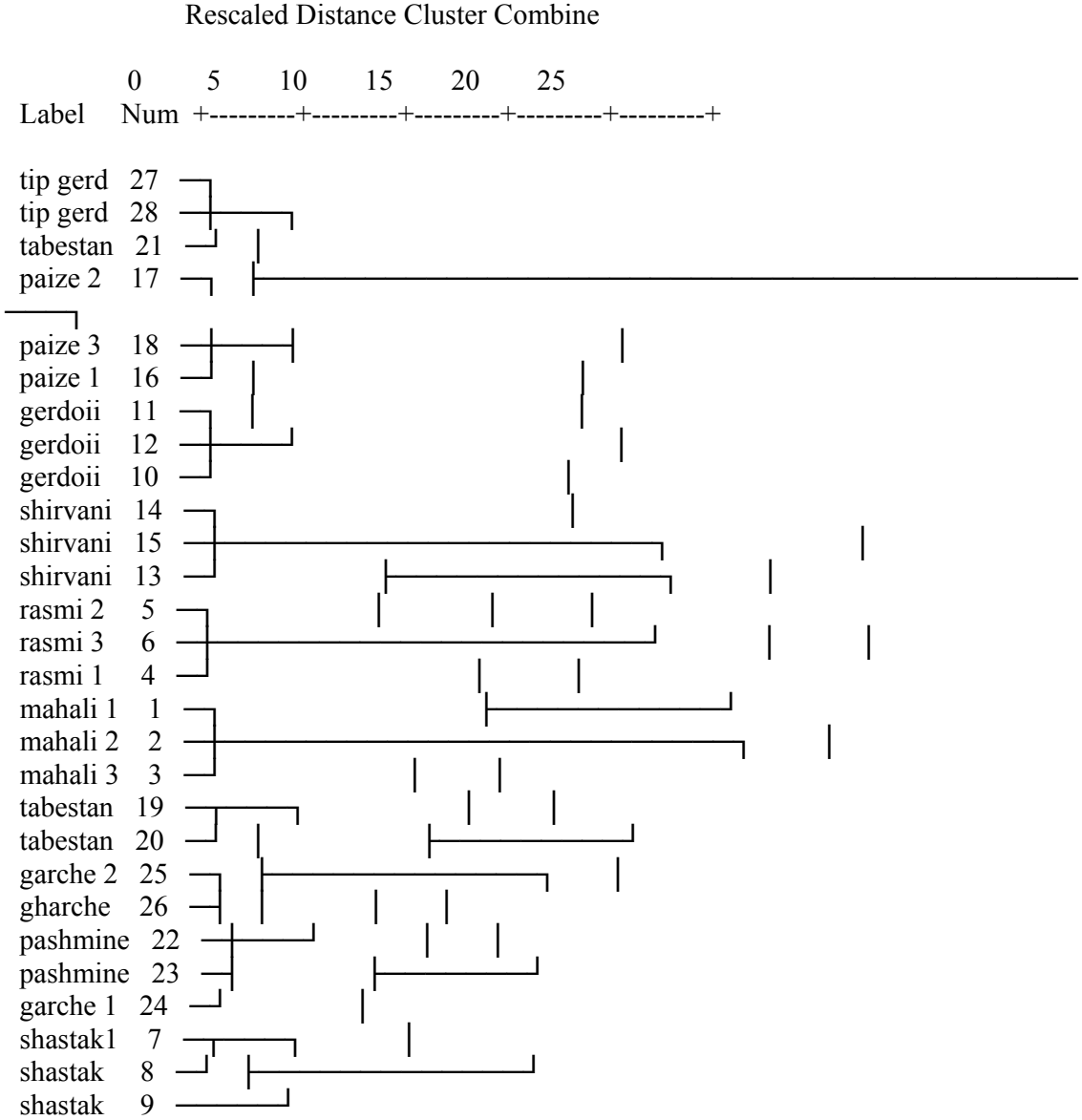
فندق *Corylus avellana* L. با سطح پلوئیدی 2n=2x=22 درختچه ای خزان کننده تک پایه و دو جنسی ناهمرس و خود ناسازگار است. مناطق عمده کشت آن عبارتند از ترکیه که تحت تاثیر دریای سیاه، کشورهای ایتالیا و اسپانیا تحت تاثیر دریای مدیترانه و آمریکا تحت تاثیر اقیانوس آرام می باشد (۱). عمده مناطق فندق کاری در ایران عبارتند ازاستان های گیلان، اردبیل، مازندران، قزوین. بیشترین ارقام فندق مورد کشت وکار از تیپ های بومی می باشد. عملکرد فندق در ایران بسیار پایین بوده و حداکثر به یک تن در هکتار می رسد. در حالی که در سایر کشورهای تولید کننده به ٤ تا ٤/٥ تن هم می رسد (۳). در اصلاح فندق می توان با بهره گیری از نشانگرهای مولکولی بر پاره ای از دشواری های اصلاح فندق غلبه نمود. روش های اصلاح سنتی برای شناسایی و تشخیص هویت ارقام و به ویژه درختان میوه به دلایل متعدد، سخت و زمان بر است. درختان میوه معمولا دارای تنوع فنوتیپی بالایی بوده و این تنوع بر اساس شرایط محیطی و عملیات باغی تغییر می کند. صفات مورفولوژیک به دلیل تاثیر پذیری بالای محیط کارایی لازم را ندارند(۲). در بررسی حاضربه منظور تهیه شناسنامه ژنتیکی برای تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ فندق موجود درکلکسیون فندق کشور با استفاده از نشانگر های SSR انجام گرفت .

مواد و روش ها

در این بررسی برگ های جوان ۲۸ درخت فندق از ۱۰ رقم بومی تجاری ایران از کلکسیون فندق کشور تهیه شده و از آنها DNA ژنومی استخراج گردید. استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته (Lodhi *et al* 1994) انجام شد. با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر SSR (Mehlenbacher *et al* 2006 ; Boccacci *et al* 2006))برای تشخیص چند شکلی هایDNA در این مکان های ژنی واکنش PCR اختصاصی صورت گرفت. واکنش PCR در حجم۲۵µl وباترکیب DNA ۲µl و Tag دی ان ای پلی مراز۰.۲µl، PCR بافر ۲ µl، $Mgcl_2$ ۱ µl، dntp ۰.۵ µl وهر یک از جفت پرایمرها ۱.۵ µ l انجام شد. برای تکثیر DNA با هر جفت پرایمر از سیکل حرارتی زیر استفاده شد: مرحله واسرشته ساز اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤ دقیقه و۳۵ چرخه شامل : واسرشته ساز در ۹٤ درجه به مدت ٤۰ ثانیه، دمای بهینه اتصال برای هرجفت پرایمر ٦٥-٦۰ سانتی گراد به مدت ٤۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه بسط نهایی انجام شد. برای الکتروفورز محصول PCR از دو سیستم ژل آگارز۳٪ و پلی آکریل آمید ٦ ٪ استفاده شد. بر اساس حضور و یا عدم حضور باندها شناسه ژنتیکی هر درخت تهیه شد و ماتریس داده های حاصل با استفاده از نرم افزار NTSYS و بر مبنای روش Ward تجزیه کلاستر گردید.

بحث و نتیجه گیری

DNA های استخراج شده با موفقیت به وسیله ۱۰ جفت پرایمر تکثیر شدند. تعداد آلل ها در هر مکان بین پنج آلل در پرایمر " CAC-B109" تا ۱۰آلل در پرایمر" CAC-B107" بوده است. شناسه ژنتیکی درخت های مربوط به یک رقم به استثنای رقم تابستانه کاملا یکسان بود. یکی از درختان منتسب به رقم تابستانه متفاوت از دو درخت دیگر بود. دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه ای، ژنوتیپ ها را به پنج گروه تقسیم کرد(شکل -۱). درکلاستر اول ، رقم گرداشکورات به همراه تابستانه شماره ۲۱، رقم پاییزه و رقم گردویی قرار گرفتند. در کلاستر دوم رقم شیروانی، در کلاستر سوم، رقم فندق رسمی ودر کلاستر چهارم رقم محلی کرج جای گرفتند. کلاستر پنجم به دو زیرگروه تقسیم شد که در زیر گروه اول رقم تابستانه(شماره ۲۰و۱۹)، رقم پشمینه و رقم گرچه قرار گرفتند. کلاستر پنجم رقم شصتک جای گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که مارکر SSR ابزاری قوی برای شناسایی ژنوتیپ ها است. نتایج حاصل مبین تنوع ژنتیکی بسیار زیاد در جمعیت فندق ایران است و شناخت دقیق و قابل اعتمادی از ارقام بومی فندق و نیز روابط نیائی بین آنها در اختیار ما قرار می دهد.



شکل -۱: دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ارقام فندق بر مبنای تنوع آلل های SSR براساس روش Ward

منابع

۱. برگونیو. اف.، س. ک. ژرمن .ای، ژ. پ. درویشیان، م. فندق. کشت و تولید. شرکت انتشارات فنی ایران. تهران. چاپ .۷۹
۲. عرفت پور. م.، ۱۳۸۰. بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ های فندق در شمال ایران با استفاده از ردیف های تکراری ساده (SSR). پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه باغبانی. دانشگاه گیلان.
۳. جوادی مجدد. د.، ۱۳۸۸. مطالعه مقدماتی سازگاری ارقام فندق وارداتی از روسیه. گزارش نهایی. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان.
4. Boccacci, A. A., R. Botta. 2006. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers. Genome 49: 598-611.
5. Mehlenbacher, S., R. N. Brown, E. Gokirmak, T. Bassil and V. Kubisiak. 2006. A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. Genome 49:122-133.
6. Lodhi, M. A., G. N. Ye, N. F. Weeden and B. I. Reisch, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Biol. Rep., 12: 6-13.

DNA fingerprinting of commercial cultivars of Iranian hazelnut for developing genetic barcode

Mehrzad Ahmadi, Javad Mozafari, Sona Hossinava, Abdolah Mohammadi
Department of Genetics and National Plant Gene-Bank, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj Iran
e-mail: Jmozafar@yahoo.com

Abstrect

The simple sequence repeat (SSR) markers were used for developing genetic identification barcode for of 28 trees of 10 Iranian commercial cultivars of hazelnut. Allele number of each SSR locus studied ranged from 5 to 10 alleles. The polymorphic alleles differenciated all cultivars from each other. The cluster analysis classified the cultivars into five main clusters. The first cluster included four cultivars Gerd Eshgevarat, Tabestane 21, Paize and Gerdoei. Cultivars Shirvani was placed in cluster 2, Rasmi cluster 3 and Mahali-Karaj in cluster 4. The fifth cluster was divided into two sub-clusters. One of them including cultivar Tabestane (numbers 19 and 20), Pashmine and Garche. The other one was comprised of cultivar Shastak. Based on these results genetic identity of clones belonging to all cultivars, except for Tabestsne-21, were confirmed and their genetic identification barcode was developed.