مطالعه مورفولوژیکی و مولکولی تنوع ژنتیکی جمعیت جنگلی فندق در اردبیل

مهرزاد احمدی [۱و۲]، جواد مظفری [۱*]، سونا حسین آوا [۱]، عبداله محمدی [۲]
۱- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران. ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
E-mail: Jmozafar@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی جمعیت جنگلی فندق واقع در غرب دریای مازندران در استان اردبیل با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ریزماهواره (SSR) مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ۲۰ ژنوتیپ با استفاده از ۹ صفت مورفولوژیک نشان داد که تنوع قابل توجهی از حیث صفاتی نظیر شکل، طول و عرض پهنک برگ، کرکدار بودن سطح زیرین برگ، طول دمبرگ، کرکدار بودن دمبرگ، حاشیه برگ، رنگ برگ تفاوت های محسوسی در این جمعیت وجود دارد. تجزیه خوشه ای داده های صفات مورفولوژیک، ژنوتیپ های مورد بررسی را به سه گروه مختلف تقسیم نمود. برای ارزیابی مولکولی تنوع جمعیت جنگلی فندق اردبیل، ۱۰ ژنوتیپ از این جمعیت با استفاده از ۱۳ جفت نشانگرهای ریزماهواره انگشت نگاری DNA شدند. چندشکلی DNA بالائی مشاهده شد به طوری که در مجموع ۶۸ آلل با میانگین پنج آلل در هر مکان ژنی تکثیر گردید. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی ژنوتیپ های جنگلی اردبیل ۰/۶۶ بدست آمد که حداکثر آن برای مکان ژنی CAT-B507 ۰/۷۸ برآورد گردید. تجزیه خوشه ای داده های مولکولی براساس روش UPGMA ژنوتیپ های مورد بررسی را در پنج گروه اصلی متمایز طبقه بندی نمود.

کلمات کلیدی : فندق، نشانگر های مولکولی، تنوع ژنتیکی.

مقدمه

فندق .*Corylus avellana* L با سطح پلوئیدی (2n=2x=22) درختچه ای خزان کننده تک پایه و دو جنسی ناهمرس و خودناسازگار است. مطالعاتی که انجام شده نشان می دهد که مرکز پیدایش و تنوع فندق در غرب دریای مازندران، سواحل اقیانوس اطلس و شمال اروپا می باشد. این گیاه باغی در ایران نیز دارای تنوع فنوتیپی بالایی است. بررسی ها در ایران بر روی ارقام بومی و تجاری متمرکز بوده و در زمینه پراکنش و تنوع جمعیت های فندق در کشور اطلاعات کافی در دست نیست. در اصلاح فندق و تولید ارقام جدید با عملکرد کمی و کیفی بالاتر، شناسائی دقیق تنوع ژنتیکی فندق با بهره گیری از نشانگرهای مولکولی گام مهمی به شمار می رود. بوکاچی و همکاران روابط ژنتیکی ۷۸ کولتیوار فندق از مناطق مختلف را با ۱۶ جفت آغازگر SSR بررسی کردند. آنها نشان دادند که کولتیوارهای اسپانیا و ایتالیا در یک خوشه، کولتیوارهای ترکیه در خوشه جداگانه وکولتیوارهای شمال اروپا، آلمان و انگلستان در خارج از این دو خوشه بزرگ قرار می گیرند(Boccacci *et al.* 2006). برای شناسایی دقیق جمعیت های فندق در ایران کار مولکولی کمی انجام شده است. مطالعه تنوع ژنوتیپ های جنگلی فندق از نظر حفاظت منابع ژنتیکی اهمیت زیادی برخوردار است. لذا در بررسی حاضر تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ های جمع آوری شده از جنگل های فندقلو واقع دراستان اردبیل با استفاده از نشانگر های SSR انجام گرفت.

مواد و روش ها

بیست ژنوتیپ از جمعیت جنگلی فندق در منطقه فندقلو اردبیل با مختصات جغرافیائی طول ۴۰/ ۴۸ و عرض ۳۸/۲۵ و در ارتفاع ۱۶۵۰ متر از سطح دریا به صورت تصادفی انتخاب شدند. بر روی این ژنوتیپ ها ۹ صفت کمی و کیفی مورفولوژیک برگی با استفاده از "دستور العمل ملی آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری فندق" (بی نام. ۱۳۸۶) اندازه گیری گردید. داده های حاصل به

روش Ward و با استفاده از نرم افزار SPSS.16 تجزیه خوشه ای شدند و ۱۰ ژنوتیپ به نمایندگی از کلاسترهای حاصل برای ارزیابی مولکولی تنوع انتخاب شدند. DNA از نمونه های برگی جوان این ژنوتیپ ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Fermentas (K0512) تهیه شد. واکنش PCR با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر SSR (جدول۱) در حجم ۲۵ µl انجام شد (احمدی و همکاران. ۱۳۹۱). برای الکتروفورز محصول PCR از پلی آکریل آمید ۶٪ استفاده شد. براساس حضور و یا عدم حضور باندها، ماتریس داده های صفر و یک بدست آمد. تجزیه و تحلیل آماری ماتریس داده ها با انجام تجزیه کلاستر، بر مبنای روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC ver. 2.02 و نیز محاسبه پارامتر های تنوع ژنتیکی مانند هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) با استفاده از نرم افزار POP GENE 32 صورت گرفت. مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC[1]) با استفاده از فرمول $PIC=1-\sum pi^2$ بدست آمد که در آن pi فراوانی آلل ها می باشد.

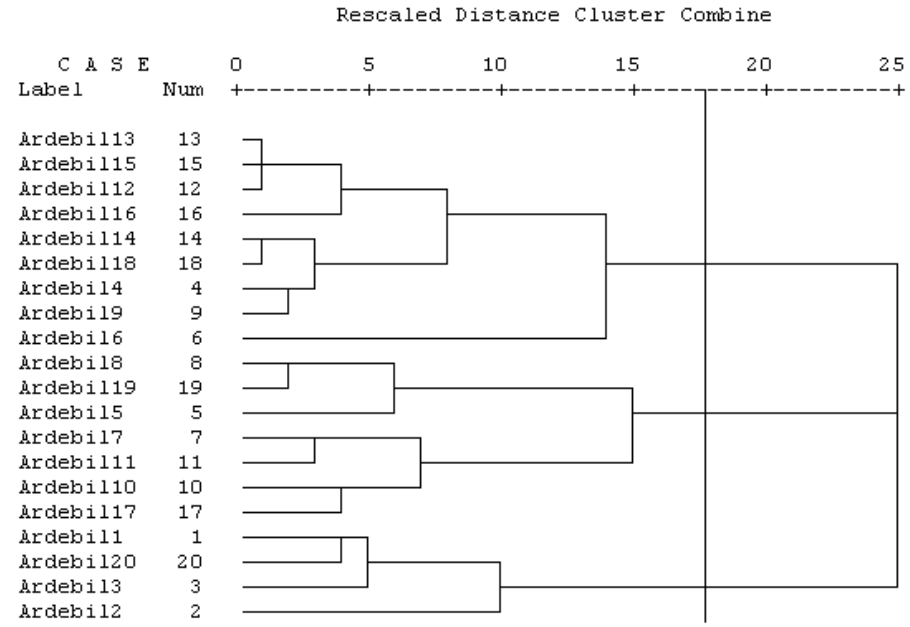
نتیجه و بحث

دندروگرام حاصل از نتایج تجزیه خوشه ای داده های ۹ صفت مورفولوژیک بر روی ۲۰ ژنوتیپ به روش ward (شکل۱) نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالائی در جمعیت جنگلی فندق در اردبیل بود، به طور کلی ۲۰ ژنوتیپ منتخب مورد بررسی در سه گروه متمایز جای گرفتند. در ژنوتیپ ها جای گرفته در کلاستر اول برگ ها بیضی شکل با کرک زیاد در سطح دمبرگ، رنگ سبز تیره و عمق کم محل اتصال دمبرگ بودند. در گروه دوم بر خلاف گروه اول، کرک دمبرگ کم، رنگ برگ سبز روشن بودند. در حالیکه در گروه سوم شکل پهنک برگ متفاوت از دو گروه دیگر به شکل گرد می باشد. همچنین ژنوتیپ ها این گروه دارای بیشترین طول دمبرگ و عمق محل اتصال دمبرگ بودند.

با توجه به نتایج فوق ژنوتیپ های شماره ۲، ۴، ۵، ۶،۷،۱۰، ۱۵، ۱۶،۱۹و ۲۰ برای ارزیابی مولکولی تنوع انتخاب شدند. با استفاده از ۱۳ جفت آغازگرSSR بر روی ۱۰ ژنوتیپ منتخب ۶۸ آلل را با میانگین ۵/۲۳ در هر مکان ژنی بدست آمد. تعداد آلل های مشاهده شده در لوکوس های مختلف از ۷ آلل در جایگاه آغازگر CAT-b507, CAC-b109 , CAC-b020 و CAC-B029b تا 4 آلل در جایگاه آغازگر CAT-B509، CAT-C502, CAT-b504 و CAT-b107 متغیر بوده است. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (H_O) ۰/۶۹ با حداکثر ۰/۸۱ برای مکان آغازگری CAT-b507 تعیین شد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی ژنوتیپ های بومی اردبیل ۰/۶۶ با حداکثر آن ۰/۷۸ برای مکان ژنی CAT-B507 تعیین گردید (جدول ۱). این در حالی است که در مطالعات قبلی با ۵۰ ژنوتیپ پلی مورفیسم و تعداد آلل های کمتری با میانگین ۳/۱۳ در هر مکان ژنی SSR شناسائی شد (کریمی و همکاران، ۱۳۹۰). نشان دادن پلی مورفیسم DNA بیشتر در این مطالعه می تواند به این علت باشد که در ابتدا نمونه های دارای تنوع مورفولوژیک براساس تجزیه ای خوشه ای انتخاب شده بودند. این موضوع اهمیت انتخاب استراتژی مناسب نمونه گیری در مطالعات ارزیابی تنوع مولکولی را نشان می دهند.

تجزیه خوشه ای داده های مولکولی، ژنوتیپ های جمعیت جنگلی فندق اردبیل (شکل ۲) را به پنج گروه تقسیم نمود. در گروه اول ژنوتیپ های ۲ و۱۰، در گروه دوم ژنوتیپ های۴، ۷و ۵ ، در گروه سوم ژنوتیپ های ۶ و ۱۶ در گروه چهارم ژنوتیپ های ۱۵ و ۲۰ جای گرفتند و ژنوتیپ ۱۹ به تنهایی در گروه پنجم قرار گرفته است. با توجه به نتایج به دست آمده تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای در بین ژنوتیپ های جنگلی فندق اردبیل چه از لحاظ ژنتیکی و چه از لحاظ مورفولوژیکی وجود دارد که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا و پویایی این جمعیت است.

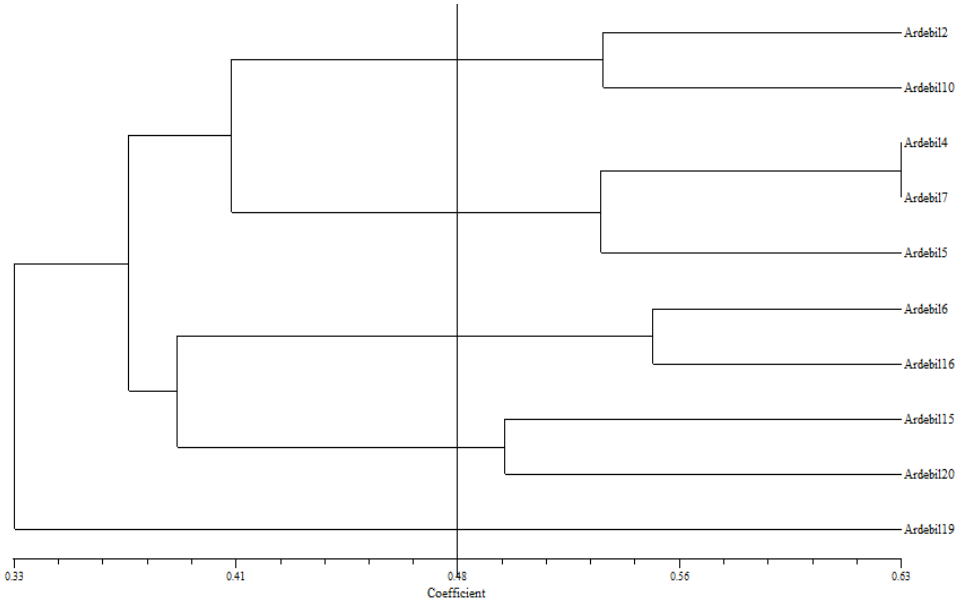
[1] .PIC= polymorphic information content



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ های جنگلی فندق اردبیل با استفاده از ۱۰ صفت مورفولوژیک کمی و کیفی به روش ward

جدول ۱ - آغازگرهای مورد استفاده، PIC، هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده در ژنوتیپ های جنگلی اردبیل

جفت آغازگرها	توالی آغازگر 3′ ⟵ 5′	دمای اتصال(C0)	تعداد آلل ها	PIC	هتروزیگوسیتی مشاهده شده
CAC-B020	F-GGGAAAATACTCCAAATCGCT R-TCACCGAGCCGTCATAATC	60	7	0.74	0.77
CAC-B109	F-CAATTTACACCTCAGGGAAGAG R-AAGTTCACCCAAGAAATCCAC	60	7	0.74	0.77
CAC-B029b	F-AATCCAAGCCTTTTCACTACC R-ACCCATCAAGTTCACCAATC	59	7	0.77	0.70
CAC-C119	F-CTCACCTTTACCCCTTCATTTT R-GTTTCCTCATCTTCTGAGAACCATC	62	5	0.57	0.62
CAT-B107	F-CCAATCGCCAATGAATCATC R-CCCTTTCCAAACTGGGCAT	63.5	4	0.48	0.52
CAT-C508	F-GTAGGTGCACTTGATGTGCTTTAC R-AACACCATATTGAGTCTTTCAAAGC	60.5	3	0.51	0.58
CAT-B504	F-GAAATTCAATCACACCAATAAAGCA R-CCTCCCTTGTCCTCATCACTG	63.5	4	0.67	0.72
CAT-B106	F-CGCCATCTCCATTTCCCAAC R-CGGAATGGTTTTCTGCTTCAG	63.5	6	0.70	0.73
CAT-B507	F-CTA AGCTCACCAAGAGGAAGTTGAT R-GCTTCTGGGTCTCCTGCTCA	62.5	7	0.78	0.81
CAT-C501	F-GTCTGGCATGGTTTTGAGAAGA R-CTTTCCCGCCCAAACCAC	64.5	5	0.76	0.79
CAT-C502	F-GCATGCAAGGTGGTCGGT R-TTTGGCACCCAACAACTCTAGA	65.5	4	0.60	0.66
CAT-C503	F-CTCAATTCACTCGAACGGATAC R-AGCCGATACCAGCCTCTCGC	62.5	5	0.65	0.70
CAT-B509	F-GGGTCAAGATTTGATAAAGTGGGA R-GCACTCCACTTGTGCGTTTTC	63.5	4	0.59	0.63
میانگین			5.2	0.66	0.69



شکل۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ های جنگلی فندق اردبیل بر مبنای تنوع آلل های SSR براساس روش UPGMA

منابع

- احمدی، م.، مظفری، ج.، حسین آوا، ح.، محمدی، ع.۱۳۹۲. انگشت نگاری DNA ارقام تجاری فندق (*Corylus avellana* L .) بومی ایران برای تهیه شناسه ژنتیکی. مجله نهال و بذر (در حال چاپ).
- درویشیان، م. چاپ دوم ۷۹. فندق، کشت و تولید. شرکت انتشارات فنی ایران. تهران .۱۷۵صفحه .
- کریمی، ب.، بابائی، ع. حمید اوغلی، ی. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های بومی استان اردبیل با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۲۱-۲۳ شهریور ۱۳۹۰. تهران.
- بی نام. ۱۳۸۶ . دستورالعمل ملی آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری در فندق. موسسه ثبت و گواهی بذر و نهال .
- **Anonimous. 2008.** Statistics of Horticulture crop production for year 2008. Ministry of Jahade- agriculture, Tehran, Iran.
- **Boccacci, A., Akkak, A . Botta. R.2006**. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers. Genome 49: 598-611.

Morphological and molecular evaluation of genetic diversity in a wild population of hazelnut in Ardebil

Ahmadi M[1,2]., Mozafari j[1]*., Hossain ova S [1] and Mohamadi A.[2]

1. Department of Genetic and National Plant Genebank of Iran Seed and Plant Improvement Institute. Shahid Fahmideh St. Karaj, Iran.

2. Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

E-mail: Jmozafar@yahoo.com

Abstract

In this study the genetic diversity of wild population of hazelnut in Ardabil Province, located in Western Caspian Sea using morphological traits and molecular microsatellite markers (SSR) was studied. Morphological diversity of 20 hazelnut genotypes, on 9 traits was analyzed. Considerable variation was observed for traits such as width, length, shape, color and margin of leaf, petiole length and hairiness, ad hairiness of leaf lower surface. The cluster analysis of morphological traits divided the genotypes examined in this study into three main groups.

For molecular diversity analysis of wild hazelnut population in Ardabil 10 genotypes representing the distinct clusters were DNA fingerprinted using 13 pairs of microsatellite primers. DNA polymorphism was very high, amplifying a total of 68 alleles with an average of 5 alleles per locus. Average DNA polymorphism information content (PIC) in Ardabil hazelnut population was 0.66. Maximum PIC 0.78 was detected in locus CAT-B507. The dendrogram obtained by cluster analysis of Molecular data based on UPGMA method divided the genotypes studied into five distinct groups.

Keywords: hazelnut, genetic diversity, molecular markers.