مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۹، شماره ۳، سال ۱۳۹۲

انگشت‌نگاری DNA ارقام تجاری فندق (*Corylus avellana* L.) بومی ایران برای تهیه شناسه ژنتیکی

DNA Fingerprinting of Commercial Cultivars of Iranian Hazelnut (*Corylus avellana* L.) for Developing Genetic Barcode

مهرزاد احمدی[۱]، جواد مظفری[۲]، سونا حسین‌آوا[۳] و عبداله محمدی[۴]

۱ و۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج
۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶

چکیده

احمدی، م.، مظفری، ج.، حسین‌آوا، س. و محمدی، ع. ۱۳۹۲. انگشت‌نگاری DNA ارقام تجاری فندق (*Corylus avellana* L.) بومی ایران برای تهیه شناسه ژنتیکی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹:** ۵۶۵ - ۵۵۱.

به منظور تهیه شناسه یا بارکد ژنتیکی ارقام تجاری فندق ایران، بیست و هشت اصله درخت از ده رقم کلکسیون فندق با استفاده از ده جفت آغازگرهای ریز ماهواره‌ای (SSR) انگشت‌نگاری DNA شدند. در مجموع ۶۳ آلل با میانگین ۶/۳ آلل در هر مکان ژنی تکثیر شد. تعداد آلل‌ها در هر مکان SSR مورد آزمون بین ۵ تا ۱۰ متغیر بود. بیشترین آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی CAT-B107 با ۱۰ آلل بود. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی ۰/۷۰ محاسبه شد که نشان از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین ارقام فندق کشور بود. در تجزیه خوشه‌ای که بر مبنای الگوی چند شکلی DNA آلل‌های SSR انجام شد، رقم شیروانی به طور جداگانه در یک شاخه مستقل و سایر ارقام در شاخه دیگر شامل پنج گروه قرار گرفتند. بر این اساس کلیه ارقام مورد بررسی به جز دو رقم پشمینه و گرچه از هم متمایز شدند. اگرچه برای تمایز این ارقام تنها چهار جفت آغازگر SSR کافی بود ولی افزایش آن تا ۱۴ جفت آغازگر نیز نتوانست این دو رقم را از هم متمایز کند. با توجه به تکثیر غیر جنسی فندق و محل جمع‌آوری دو رقم پشمینه و گرچه، احتمال این‌که این دو رقم در واقع یک ژنوتیپ باشند زیاد است. براساس بارکد ژنتیکی به دست آمده، اصالت ژنتیکی همه درختان مربوط به ارقام مورد بررسی به جز یک درخت از هر یک از ارقام تابستانه، شصتک، محلی کرج و رسمی تایید شد. توصیه می‌شود نتایج این تحقیق در تولید و گواهی نهال فندق و ثبت ارقام آن مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فندق، نشانگرهای SSR، بار کد ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، شناسائی ژنتیکی.

نویسنده مسئول: jmozafar@yahoo.com تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۱۲۶۰

مقدمه

فندق (*Corylus avellana* L.) با سطح پلوئیدی 2n = 2x = 22 درختچه‌ای خزان‌کننده تک پایه، دو جنسی ناهمرس و خود ناسازگار است. جایگاه اصلی این گیاه کشورهای ترکیه، ایتالیا، ا سپانیا و آمریکا است (Darvishnia, 2000). مناطق عمده فندق‌کاری ایران در استان‌های گیلان، اردبیل، مازندران و قزوین قرار دارد و بیشتر ارقام فندق مورد کشت از منابع ژنتیکی بومی هستند. میانگین عملکرد فندق در ایران پایین بوده و حدود ۱۴۰۰ کیلوگرم در کشت آبی و ۱۲۰۰ کیلوگرم در کشت دیم گزارش شده است (Anonymous, 2008)، در حالی که در کشورهای عمده تولیدکننده عملکرد آن به ۴ تا ۴/۵ تن در هکتار نیز می‌رسد. دستیابی به ارقام با پتانسیل تولید و سازگاری بیشتر اولین گام مهم در افزایش تولید فندق خواهد بود. در این راستا جمع‌آوری و شناسائی ارقام بومی فندق و تعیین خصوصیات کمی و کیفی آن‌ها حائز اهمیت زیادی است. بعضی از ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در کلکسیون فندق کشور در کمال‌شهر کرج مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفته‌اند که طی آن تاریخ ظهور شاتون‌ها و خوشه‌های گل ماده، آغاز و طول مدت گرده‌افشانی، سازگاری گرده‌افشانی و میزان پاجوش‌دهی آن‌ها تعیین شده است (Hossein Ava and Pirkhezri 2010).

روش‌های اصلاح سنتی برای به‌نژادی و تشخیص هویت ارقام درختان میوه، به دلایل متعدد از کارائی کمی برخوردار بوده و زمان بر است. درختان میوه معمولاً دارای تنوع فنوتیپی بالایی بوده و این تنوع براساس شرایط محیطی و عملیات باغی تغییر می‌کند. اغلب صفات مورفولوژیک باغی درختان میوه به دلیل تاثیرپذیری بالای محیط، کارایی بالائی در گزینش‌های به‌نژادی ندارند (Erfatpour, 2008). با بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی می‌توان بر پاره‌ای از دشواری‌های به‌نژادی فندق غلبه کرد. تاکنون مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده که از آن جمله می‌توان به شناسائی و تعیین روابط ژنتیکی ۷۸ رقم فندق از کلکسیون‌های متفاوت با ۱۶ جفت آغازگر SSR اشاره کرد (Boccacci *et al.*, 2006). این بررسی نشان داد که ارقام اسپانیا و ایتالیا در یک خوشه، ارقام ترکیه در خوشه‌ای جداگانه و کولتیوارهای شمال اروپا، آلمان و انگلستان در خارج از این دو خوشه بزرگ واقع می‌شوند. در بررسی دیگری انگشت نگاری ۲۷۰ نمونه از سراسر جهان با ۲۱ جفت آغازگر SSR انجام شد که بیشتر نمونه‌ها در چهارگروه اصلی مشتمل بر اروپای مرکزی، سواحل دریای سیاه، انگلستان و اسپانیا قرار گرفتند (Gokirmak *et al.*, 2008).

اگرچه نشانگرهای DNA ابزاری قوی برای شناسایی دقیق ژنوتیپ‌های گیاهی محسوب می‌شود، اما در ایران تحقیقات کمی در جهت شناسایی ارقام بومی تجاری فندق با استفاده از

این نشانگرهای مولکولی انجام شده است. در مطالعات اولیه شناسائی فندق‌های بومی جنگلی ایران، مراقبی (Moraghebi, 2000) با بررسی‌های ریخت شناسی نمونه‌های فندق جمع‌آوری شده از دو منطقه فندقلو اردبیل و جنگل آق اولر، پایه‌های *C. maxima* را شناسایی و با بررسی ایزوآنزیمی اختلاف زیادی بین پایه‌های *C. avellana* و *C. maxima* مشاهده کرد. در مطالعه دیگری با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره ۲۳ رقم فندق در ۹ مکان ژنی مورد بررسی قرار گرفت و چند شکلی بالایی مشاهده شد. براساس نتایج به دست آمده ژنوتیپ‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند که گروه اول شامل ۹ رقم بود که پنج رقم آن پروفیل ژنتیکی یکسانی داشتند. در گروه دوم چهار رقم ایرانی، در گروه سوم شش رقم خارجی و سه رقم ایرانی قرار گرفتند (Ghanbari *et al.*, 2005).

شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام یکی از ارکان مهم حفاظت منابع ژنتیکی و توسعه تولید ارقام برتر با حمایت از حقوق تولیدکنندگان آن‌ها است. این امر همچنین برای شفافیت در بازار عرضه نهال و اطمینان از سرمایه‌گذاری در راستای افزایش تولید بسیار حائز اهمیت است (Mozafari *et al.*, 2010). با توجه به بالا بودن هزینه اولیه احداث باغ، شناسایی و تعیین اصالت ژنتیکی ارقام درختان میوه از جمله فندق در مقایسه با گیاهان زراعی از اهمیت زیادتری برخودار است. لذا بررسی حاضر به منظور تهیه شناسنامه ژنتیکی و مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام بومی رایج فندق در کشور با استفاده از نشانگرهای SSR انجام شد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان بیست و هشت اصله درخت فندق از ده رقم بومی تجاری ایران از کلکسیون فندق کشور واقع در کمال‌شهر کرج تهیه شده و DNA ژنومی آن‌ها با روش CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) تغییر یافته استخراج شد. بااین تفاوت که در روش استخراج DNA حاضر به جای کلروفرم- اکتانول از کلروفرم- الکل ایزوآمیل و به جای NaCl از استات سدیم ۵ مولار (pH= 5.2) به نسبت ۱/۱۵حجم اولیه استفاده شد.

واکنش PCR اختصاصی با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر SSR که در تحقیقات قبلی معرفی شده بود (Boccacci *et al.*, 2006؛ Mehlenbacher *et al.*, 2006) و دستگاه ترموسایکلر Eppendorf انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ µl و با ترکیب ۲ µl DNA و DNA Tag پلی‌مراز ۰/۲ µl، PCR بافر ۲ µl، $MgCl_2$ ۱ µl، dntp ۰/۵ µl و هر یک از جفت آغازگرها ۱/۵ µl انجام شد. برای تکثیر DNA با هر جفت آغازگر از سیکل حرارتی زیر استفاده شد: مرحله واسرشته‌ساز اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌ساز در ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بهینه اتصال برای هرجفت

آغازگر ۶۵-۵۸ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه بسط نهایی انجام شد. برای الکتروفورز محصول PCR از ژل پلی‌آکریلامید ۶ ٪ استفاده شد.

براساس حضور و یا عدم حضور باندهای DNA مربوط به مکان ژنی فوق‌الذکر، شناسه ژنتیکی هر درخت تهیه شد، به طوری که هر جایگاه تکثیر شده با یک حرف انگلیسی که معرف مکان ژنی است، مشخص شد. شماره آلل‌ها بر اساس اندازه قطعات DNA بر حسب bp از کوچک به بزرگ تنظیم شد. مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC=1-\sum pi^2$ به دست آمد (Smith *et al.*, 1997). داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و بر مبنای روش UPGMA تجزیه کلاستر شد و در نهایت آزمون Bootstrap با ۱۰۰ جایگزینی و با استفاده از نرم‌افزار Winboot انجام و دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستری برای شناسایی ارتباط ژنتیکی ارقام مورد بررسی تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نرم‌افزار POP GENE 32 نیز برای تجزیه و تحلیل پارامترهای هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) استفاده شد.

نتایج و بحث

نام ارقام فندق مورد بررسی در جدول ۱ و نام آغازگرهای SSR استفاده شده و توالی آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- نام ارقام تجاری فندق بومی ایران و کد شناسائی درختان آن‌ها در کلکسیون ایستگاه کمال‌شهر کرج

Table 1. Name of Iranian hazelnut cultivars and identification numbers of their representative trees in the collection of Kamalshahr, Karaj

نام رقم Cultivar name	کد شناسایی در کلکسیون Identification number in the collection	نام رقم Cultivar name	کد شناسایی در کلکسیون Identification number in the collection
محلی کرج Mahali Karaj	114120 114144 114145	شصتک Shastak	114106 114512 114141
رسمی Rasmi	114143 114104 114109	گردویی Gerdoii	110362 110363 114142
پاییزه Paizeh	110365 114536 114102	شیروانی Shirvani	114541 114535 114529
تابستانه Tabestaneh	114550 114108 114509	گرچه Gercheh	114543 114107 110367
پشمینه Pashmineh	110369 110368	گرد اشکورات Gerd Eshkevarat	114547 114105

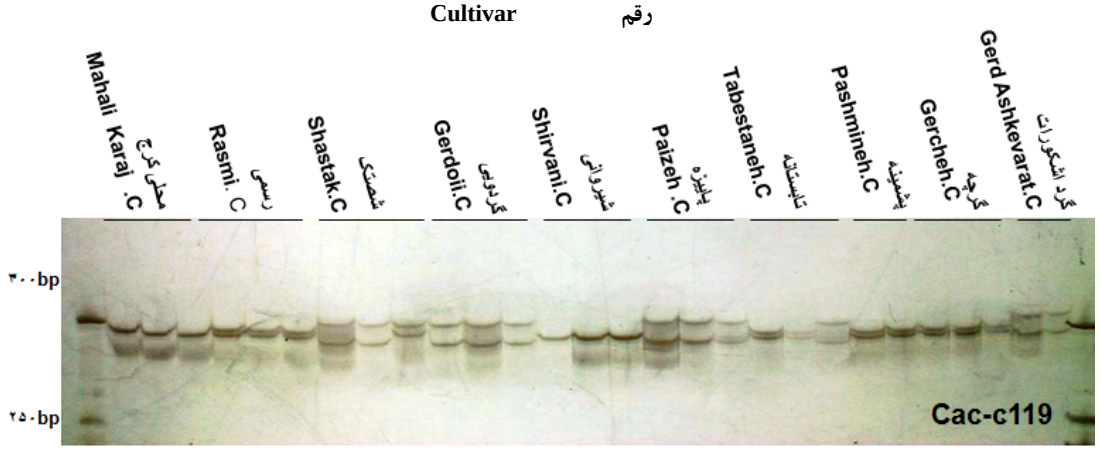
جدول ۲- نام آغازگرهای SSR، توالی و دمای بهینه اتصال استفاده شده برای انگشت‌نگاری DNA رقم‌های فندق

Table 2. Name, sequence and annealing temperature of SSR primer pairs used for DNA fingerprinting of hazelnut cultivars

آغازگرهای SSR SSR markers	توالی آغازگرها Primer sequence	دمای اتصال بهینه Annealing temperature (ºC)
CAC-B020	F: GGGAAAATACTCCAAATCGCT R: TCACCGAGCCGTCATAATC	60.0
CAC-B029b	F: CAATTTACACCTCAGGGAAGAG R: AAGTTCACCCAAGAAATCCAC	60.0
CAC-B109	F: AATCCAAGCCTTTTCACTACC R: ACCCATCAAGTTCACCAATC	59.0
CAC-C001a	F: CCCGTAACTAACCAATCACAAT R: TGGAGAAGAGGAGAGCTTAGTG	61.0
CAC-C119	F: CTCACCTTTACCCCTTCATTTT R: GTTTCCTCATCTTCTGAGAACCATC	62.0
CAT-B106	F: CCAATCGCCAATGAATCATC R: CCCTTTCCAAACTGGGCAT	63.5
CAT-B107	F: GTAGGTGCACTTGATGTGCTTTAC R: AACACCATATTGAGTCTTTCAAAGC	60.5
CAT-B504	F: CGCCATCTCCATTTCCCAAC R: CGGAATGGTTTTCTGCTTCAG	63.5
CAT-B507	F: CTA AGCTCACCAAGAGGAAGTTGAT R: GCTTCTGGGTCTCCTGCTCA	62.5
CAT-B508	F: GGGTCAAGATTTGATAAAGTGGGA R: GCACTCCACTTGTGCGTTTTC	63.5
CAT-C502	F-GCATGCAAGGTGGTCGGT R-TTTGGCACCCAACAACTCTAGA	65.5
CAT-C503	F-CTCAATTCACTCGAACGGATAC R-AGCCGATACCAGCCTCTCGC	62.5
CAT-B509	F-GTCTGGCATGGTTTTGAGAAGA R-CTTTCCCGCCCAAACCAC	64.5
CAC-A24b	F-CACAACATGCAACGTCTATGTA R-AGGTACGTATTGACAGGCTTTT	58.0

تنوع ژنتیکی ارقام فندق

انگشت‌نگاری DNA برای تعیین دقیق‌تر تنوع ژنتیکی به ویژه در مواردی که روش به کار برده شده مانند SSR تکرارپذیری و قدرت تمایز بالایی داشته باشد، حائز اهمیت فراوان است. در مجموع با استفاده از ده جفت آغازگرهای SSR در ده رقم فندق مورد بررسی و در دمای اتصال بهینه، ۶۳ قطعه DNA (آلل SSR) تکثیر شد. به طور میانگین در هر مکان ژنی ۶/۳ آلل تکثیر شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده در مکان‌های ژنی مختلف از ۵ آلل در جایگاه CAC-C119 (شکل ۱) تا ۱۰ آلل در جایگاه CAT-B107 متغیر بود. در قطعات تکثیری به وسیله نشانگرها، CAC-B020 سنگین‌ترین قطعات (۳۰۰ تا ۴۰۰) و نشانگر CAC-B029b سبک‌ترین قطعات (۲۰۰ تا ۲۵۰)



شکل ۱- یک نمونه ژل پلی‌آکریلامید (۶٪) که در آن آلل‌های SSR تکثیر شده توسط جفت آغازگر CAC-C119 در ده رقم تجاری فندق بومی ایران نشان داده می‌شود

Fig. 1. A sample of Poly-acrylamide gel (6%) showing SSR alleles amplified by one primer pair (CAC-C119) in ten Iranian commercial cultivars of hazelnut

را تکثیر کردند. دمای بهینه اتصال جفت آغازگرها در این آزمایش از ۵۸ درجه سانتی‌گراد تا ۶۳/۵ درجه متغیر بود (جدول ۳). میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ارقام زراعی ۰/۷۰۸ به دست آمد که حداکثر آن برای مکان ژنی CAT-B107 با میزان ۰/۸۲۵ تعیین شد (جدول ۳). میانگین هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب به ۰/۹۷ و۰/۰۲۸ بود.

در مورد میانگین آلل‌های SSR ایجاد شده در مطالعات تنوع ژنتیکی فندق اروپایی نتایج مشابه (۷/۱ الل) زمانی به دست آمد که از دو برابر تعداد نمونه ژنتیکی (۲۰ نمونه) و تقریباً دو برابر تعداد آغازگر SSR استفاده شد (Boccacci *et al.*, 2005)، که نشان‌دهنده بالاتر بودن تنوع ژنتیکی در ارقام فندق ایرانی است. بررسی باندهای DNA حاصل از آغازگرها، نشان داد که در کلیه ارقام مورد بررسی حداقل یک مکان SSR تکثیر شده و اکثر ژنوتیپ‌های فندق مورد بررسی دارای دو آلل در هر مکان ژنی SSR بودند. در جدول۴ آلل‌های هر جایگاه ژنی تکثیر شده با یک حرف بزرگ انگلیسی مشخص شده‌اند که معرف مکان ژنی و شماره آلل‌ها براساس اندازه قطعات DNA بر حسب bp از کوچک به بزرگ است. ارقامی که دارای دو قطعه DNA (آلل) در یک مکان ژنی SSR بودند. هتروزیگوت و آن‌هائی که یک قطعه DNA در یک مکان ژنی داشتند هموزیگوت برای آن جایگاه ژنی SSR تلقی شدند. براساس ترکیب آلل‌های تکثیر شده در هر رقم، شناسه آن‌ها تهیه شد (ستون آخر جدول ۴). در بعضی از ارقام در مکان SSR، CAC-C119 تنها یک آلل مشاهده شد، مانند رقم محلی کرج با یک آلل D4 و

جدول ۳- تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، دامنه اندازه باندها (bp) و PIC به دست آمده برای ارقام فندق

Table 3. Number of alleles, heterozygosity rate, range of DNA fragments sizes (bp) and PIC observed for hazelnut cultivars

ردیف No.	آغازگر Primer	تعداد آلل Number of alleles	میزان هتروزیگوسیتی Heterozygosity rate	دمای اتصال Anealing temperature	دامنه اندازه باند ها (bp) Range of fragment sizes (bp)	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC
1	CAT-B508	5	0.96	63.5	200-350	0.636
2	CAC-B020	6	1	60.0	300-400	0.661
3	CAC-B029b	7	1	60.0	150-200	0.679
4	CAC-B109	5	1	59.0	150-200	0.661
5	CAC-C001a	5	1	61.0	300	0.677
6	CAC-C119	5	0.78	62.0	250-300	0.744
7	CAT-B106	9	1	63.5	250-300	0.797
8	CAT-B107	10	1	60.5	250-400	0.825
9	CAT-B504	6	0.96	63.5	250-300	0.749
10	CAT-B507	5	1	62.5	300-350	0.652
11	CAC-A24b	-	-	58.0	150-200	-
12	CAT-B509	-	-	64.5	100-150	-
13	CAT-C502	-	-	65.5	200-250	-
14	CAT-B503	-	-	62.5	100-150	-
	Mean	6.3	0.97	-	-	0.708

PIC: Polymorphic Information Content

رقم شیروانی با یک آلل D2 که نشان دهنده هموزیگوت بودن آن‌ها در آن مکان ژنی است (شکل۱ و جدول ۴).

تمایز ارقام و تعیین اصالت ژنتیکی درختان آن‌ها

انگشت نگاری DNA علاوه بر تعیین تنوع ژنتیکی گام مهمی برای ثبت و گواهی اصالت ژنتیکی ارقام و همچنین تفکیک نمونه‌های با نام مترادف (Synonym) از نمونه‌های بی‌همنام (Homonym) به شمار می‌رود. دو رقم زمانی سینونیم هستند که برغم داشتن نام‌های متفاوت از پروفیل انگشت نگاری DNA یکسانی برخوردار باشند. هنگامی که آن‌ها از یک نام برخوردار باشند اما الگوی انگشت نگاری DNA آن ها متفاوت باشد، همونیم خطاب می‌شوند (Boccacci *et al.*, 2006). در گیاهانی که به صورت رویشی تکثیر می‌یابند مانند درختان میوه ممکن است یک ژنوتیپ با نام‌های مختلف در نقاط مختلف جغرافیائی

جدول ۴- آلل‌های تکثیر شده در هر مکان ژنی (آغازگر) و بارکد ژنتیکی ۲۸ درخت از ده رقم فندق بومی تجاری ایران

Table 4. Amplification of alleles at each locus (primer) and genetic barcode of 28 trees of ten commercial cultivars of Iranian hazelnut

رقم Cultivar	کد درخت Tree cod	نام آغازگر Primer name										بارکد ژنتیکی Genetic Barcode
		CAC-B020	CAC-B109	CAC-B029b	CAC-C119	CAT-B107	CAT-C508	CAT-B504	CAT - B106	CAT-B507	CAC-001a	
Mahali Karaj	H1	A35	B13	C35	D4	E810	F15	H26	I 56	J12	K25	A35B13C35D 4E810F15H26 I56J12K25
	H2	A35	B13	C35	D4	E810	F15	H26	I 56	J12	K25	A35B13C35D 4E810F15H26 I56J12K25
	H3	A35	B12	C23	D4	E810	F15	H24	I 56	J12	K25	A35B12C23D 3E810F15H24 I56J12K25
Rasmi	H4	A46	B15	C35	D34	E29	F23	H45	I 35	J24	K34	A46B15C35D 34E29F23H45 I35J24K34
	H5	A46	B15	C25	D34	E29	F23	H45	I 35	J24	K34	A46B15C25D 34E29F23H45 I35J24K34
	H6	A46	B15	C25	D34	E29	F23	H45	I 35	J24	K34	A46B15C25D 34E29F23H45 I35J24K34
Shastak	H7	A23	B12	C56	D15	E35	F34	H12	I 69	J14	K34	A23B12C56D 15E35F34H12 I69J14K34
	H8	A23	B12	C56	D15	E35	F34	H12	I 69	J14	K34	A23B12C56D 15E35F34H12 I69J14K34
	H9	A23	B12	C56	D45	E13	F3	H12	I 63	J25	K34	A23B12C56D 45E13F3H12 I63J25K34
Gerdoii	H10	A23	B23	C45	D15	E35	F34	H34	I 27	J25	K14	A23B23C45D 15E35F34H34 I27J25K14
	H11	A23	B23	C45	D15	E35	F34	H34	I 27	J25	K14	A23B23C45D 15E35F34H34 I27J25K14
	H12	A23	B23	C45	D15	E35	F34	H34	I 27	J25	K14	A23B23C45D 15E35F34H34 I27 J25 K14
Shirvani	H13	A16	B14	C17	D2	E67	F34	H53	I 24	J23	K34	A16B14C17D 2E67F24H53 I24J23K34
	H14	A16	B14	C17	D2	E67	F34	H53	I 24	J23	K34	A16B14C17D 2E67F24H53 I24J23K34
	H15	A16	B14	C17	D2	E67	F34	H53	I 24	J23	K34	A16B14C17D 2E67F24H53 I24J23K34
Paizeh	H16	A23	B23	C45	D15	E25	F34	H34	I 25	J25	K14	A23B23C45D 15E25F34H34 I25J25K14
	H17	A23	B23	C45	D15	E25	F34	H34	I 25	J25	K14	A23B23C45D 15E25F34H34 I25J25K14
	H18	A23	B23	C45	D15	E25	F34	H34	I 25	J25	K14	A23B23C45D 15E25F34H34 I25J25K14

ادامه جدول ۴

Table 4. Continued

رقم Cultivar	کد درخت Tree cod	نام آغازگر Primer name										بارکد ژنتیکی Genetic Barcode
		CAC-B020	CAC-B109	CAC-B029b	CAC-C119	CAT-B107	CAT-C508	CAT-B504	CAT - B106	CAT-B507	CAC-001a	
	H19	A23	B12	C45	D34	E25	F23	H12	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E25F23H12 I58J12K13
Tabestaneh	H20	A23	B12	C45	D34	E25	F23	H12	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E25F23H12 I58J12K13
	H21	A23	B23	C45	D15	E25	F34	H4	I 51	J25	K14	A23B23C45D 15E25F34H4 I51J25K14
	H22	A23	B12	C45	D34	E34	F23	H14	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E34F23H14 I58J12K13
Pashmineh	H23	A23	B12	C45	D34	E34	F23	H14	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E34F23H14 I58J12K13
	H24	A23	B12	C45	D34	E34	F23	H14	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E34F23H14 I58J12K13
	H25	A23	B12	C45	D34	E34	F23	H14	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E34F23H14 I58J12K13
Gercheh	H26	A23	B12	C45	D34	E34	F23	H14	I 58	J12	K13	A23B12C45D 34E34F23H14 I58J12K13
	H27	A23	B23	C45	D15	E35	F34	H34	I 51	J25	K14	A23B23C45D 15E35F34H34 I51J25K14
Gerd Eshkevarat	H28	A23	B23	C45	D15	E35	F34	H34	I 51	J25	K14	A23B23C45D 15E35F34H34 I51J25K14

شناخته شود. از طرف دیگر در گیاه فندق که به صورت درختچه‌ای رشد کرده و عموماً دارای تنه‌های متعدد نزدیک به هم هستند ممکن است که تنه‌های فرعی بسیار نزدیک به تنه اصلی که از بذر حاصل شده‌اند پاجوش تلقی شوند در حالی که ژنوتیپ متفاوتی دارند. در چنین شرایطی امکان اختلاط ژنتیکی میان درختان منسوب به یک رقم نیز بالاست.

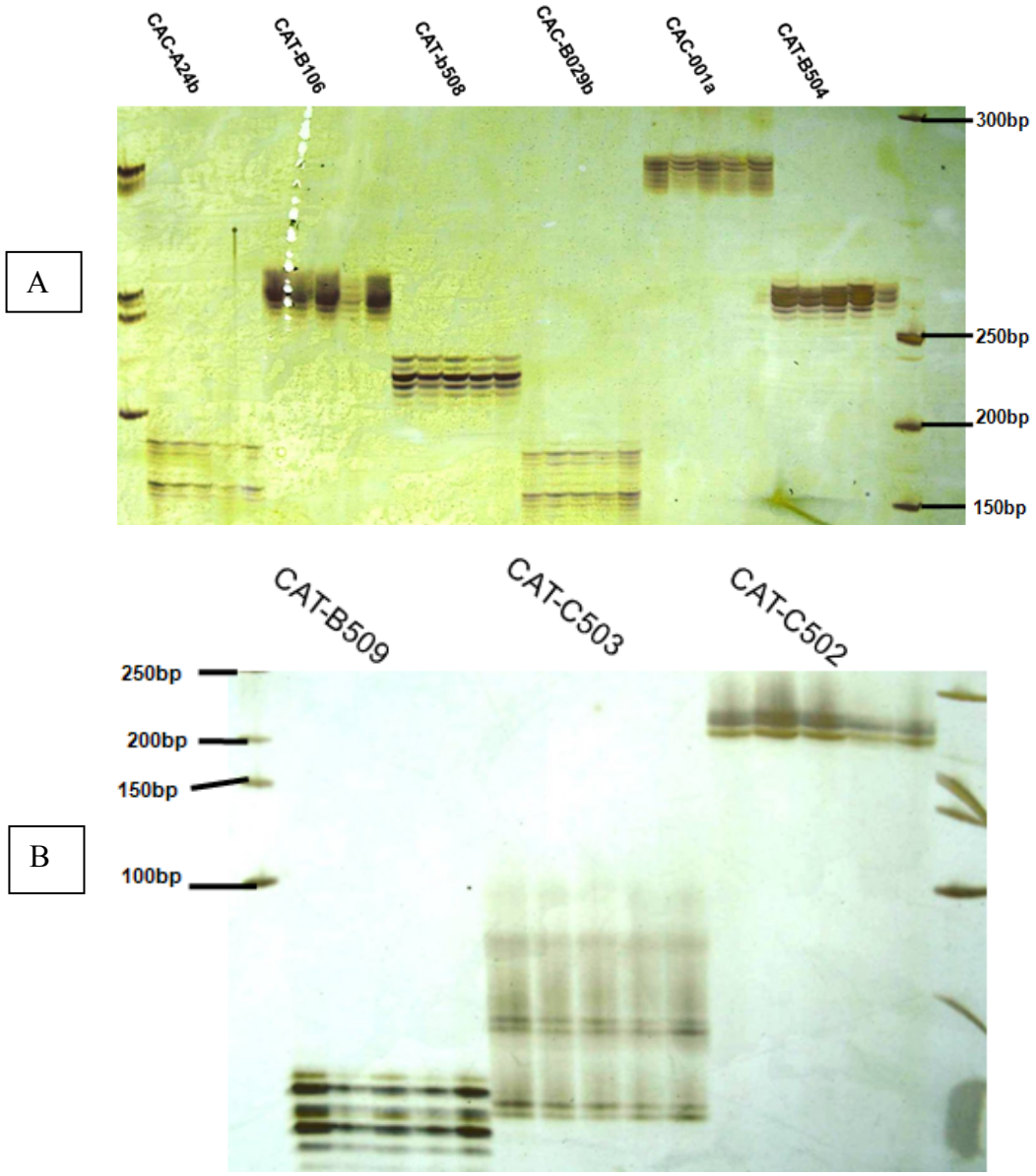
پروفیل انگشت نگاری DNA با نشانگرهای SSR روی ژل پلی‌آکریلامید نشان داد که تنها چهار جفت اغازگر برای تمایز کلیه ارقام از هم‌دیگر به جز دو رقم پشمینه و گرچه کافی بود. در حالی که این دو رقم با استفاده از ۱۴ جفت آغازگرنیز تمایزی نشان ندادند (جدول ۳). بارکد ژنتیکی سه درخت متعلق به هر یک از رقم‌های شیروانی، پاییزه، گردویی و گرد اشکورات کاملاً مشابه بود که بیانگر تائید ژنتیکی اصالت درختان مربوط به این رقم‌هاست. در حالی که میان درختان مربوط به هر یک از ارقام محلی کرج (H3)، رسمی (H4)، شصتک (H9) و تابستانه (H21) با وجود تکرار آزمایش، تفاوت ژنتیکی حداقل در یک مکان ژنی مشاهده شد (جدول ۴). درختان مورد آزمایش در هر یک از رقم‌های شصتک و

تابستانه بیشترین تفاوت درون رقم را نشان دادند، به نحوی که درخت سوم رقم شصتک (با کد شناسایی H9 و بارکد A23B12C56D45E13F3H12I63J25K34) در پنج مکان ژنی با دو درخت دیگر آن رقم متفاوت بود. همچنین یک درخت رقم تابستانه (با کد شناسایی H21 و بارکد A23B23C45D15E25F34H4I51J25K14) در هفت مکان ژنی با دو درخت دیگر آن رقم تفاوت داشت. بنابراین به نظر می‌رسد درختان مذکور نماینده این ارقام نبوده و نباید به عنوان درخت مادری برای تولید نهال از آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

از طرف دیگر دو رقم گرچه و پشمینه در آزمایش‌های مکرر (دو نمونه‌برداری مجزا) و در تمام مکان‌ها ژنی دارای آلل‌های یکسان و کاملاً مشابه بودند (جدول ۴ و شکل ۱). برای اطمینان بیشتر از این تشابه ژنتیکی، واکنش PCR این دو رقم برای هر یک از آغازگرها در کنار هم‌دیگر و بر روی یک ژل پلی‌آکریلامید تفکیک شدند که هیچ تفاوتی میان آن دو مشاهده نشد. علاوه بر این، بررسی مجدد این مشاهده با ۴ جفت آغازگر دیگر نیز انجام شد که باز هم هیچ چند شکلی DNA میان دو رقم پشمینه و گرچه مشاهده نشد (شکل ۲).

در هر حال برای اطمینان بیشتر، با تهیه مجدد نمونه‌های برگی از همان درختان مربوط به رقم پشمینه و رقم گرچه در کلکسیون فندق کمال‌شهر کرج، واکنش PCR نمونه‌ها برای آغازگرهای CAT-B504 و CAC-001a و CAC-B029b و CAT-B508 و CAT-B106 و CAC-A24b تکرار شد. در این بررسی نیز تفاوتی بین این دو رقم مشاهده نشد (شکل۲- A). در یک بررسی جدید دیگر از سه آغاز دیگر با نام‌های CAT-C502 و CAT-C503 و CAT-B509 استفاده شد که این بار نیز رقم‌های پشمینه و گرچه تفاوتی نشان ندادند (شکل۲- B). این در حالی است که قنبری و همکاران (۲۰۰۵) تمایز دو رقم پشمینه و گرچه توسط دو آغازگر CAT-B504 و CAT-B508 را از هم گزارش کرده ولی تصویر ژل پلی‌اکریلامید قطعات تکثیر شده در گزارش فوق ارائه نشده است. در تحقیق حاضر، این دو آغازگر به همراه ۱۲ آغازگر دیگر استفاده شد که تفاوتی در این دو رقم مشاهده نشد. قنبری و همکاران (۲۰۰۵) در ادامه نتایج خود تمایزی در بین ارقام گردویی، پاییزه و تابستانه گزارش نکرد ولی در نتایج حاصل از تحقیقات حاضر دو رقم گردویی و پاییزه در دو مکان ژنی و ارقام پاییزه و تابستانه در هفت مکان ژنی از یک‌دیگر متمایز شدند.

به عقیده بوکاچی و همکاران (۲۰۰۶) وجود اسامی متفاوت برای یک رقم معین موجب بروز اشتباه و بعضاً سر درگمی در معرفی و بررسی آن‌ها می‌شود. این محققان برای مثال اشاره می‌کنند که در جزیره سیسیل ایتالیا ژرم‌پلاسم بومی گسترده و متنوع فندق وجود دارد که در بین آن‌ها یک رقم رواج گسترده دارد که در



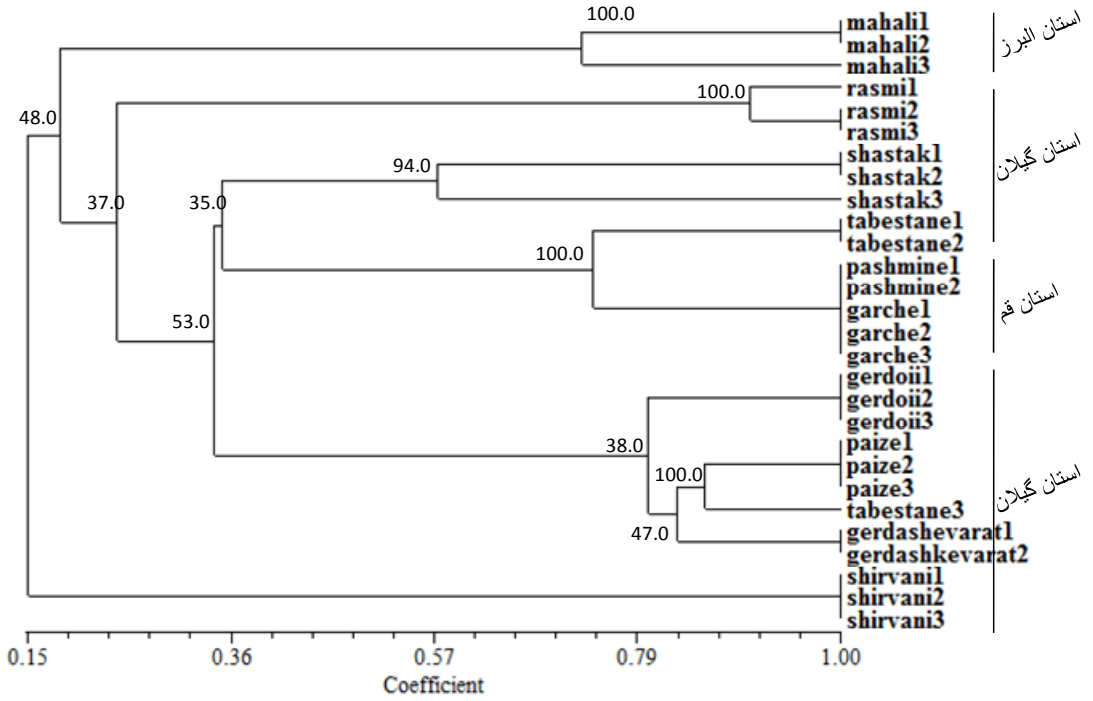
شکل ۲- مقایسه قطعات DNA (آلل‌های SSR) تکثیر شده از درختان مربوط به دو رقم پشمینه و گرچه با استفاده از آغازگرهای مختلف بر روی ژل پلی آکریلامید ۶٪: A تکثیر آلل‌های SSR در نمونه‌برداری دوم با آغازگرهای قبلی و جدید، B. تکثیر آلل‌های SSR در نمونه‌برداری دوم با آغازگرهای جدید. در هر مکان ژنی دو نوار اولی از چپ مربوط به درختان رقم پشمینه و سه نوار بعدی مربوط به درختان رقم گرچه هستند.

Fig. 2. Comparing DNA fragments (SSR alleles) amplified in the two hazelnut cultivars, Pashmineh and Gercheh, on Poly-acrylamide gel (6%): amplification of SSR alleles in the second round of sampling with the same and the new primer pairs (A), and another experiment with new primers (B). In each locus (SSR primer pair), the first two lanes from the left belonged to the trees of cv Pashmineh and the next three lanes to the trees of cv Gercheh.

نواحی مختلف جزیره سیسیل با اسامی Messina، Catania، Mansa، Comune و Nostrale شهرت یافته است. همین مشکل در مورد پاره‌ای از رقم‌های اسپانیایی و ترکیه‌ای نیز مشاهده می‌شود که بعضاً از این کشورها به سایر مناطق عمده کشت و پرورش فندق وارد شده‌اند (Boccacci *et al.*, 2006). در تایید مطالب ارائه شده در گزارش‌های فوق در مورد پراکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام فندق و شناخته شدن آن‌ها به اسامی مختلف در مناطق مختلف ایران می‌توان به گزارش صادقی در سال ۱۳۵۰ اشاره کرد که در آن از نمونه‌های نادری که در منازل روستاییان اطراف مشهد دیده شده سخن رفته است. از آن جمله فندق درشت و خوش رنگی که به نام رقم شکی در قفقاز معروف است و با عنوان صفی‌آباد مشهد در خراسان شهرت پیدا کرده است. این ژنوتیپ حدود ۱۳۰ سال قبل توسط مالکین مهاجر از قفقاز و کوهپایه‌های شهرستان شکی به قریه صفی‌آباد در۱۴ کیلومتری جنوب غربی مشهد منتقل شده و از آن زمان کشت می‌شود (صادقی، گزارش منتشر نشده). در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام فندق ایران باید به این موضوع توجه شود و با بررسی‌های مولکولی دقیق با تعداد آغازگر و نمونه‌های کافی، تفاوت و قرابت ژنتیکی این ارقام که بعضاً در سال‌های گذشته در داخل کشور جابه‌جا شده و یا از خارج وارد ایران شده‌اند، تعیین شود.

تنوع و قرابت ژنتیکی ارقام فندق

پس از کدگذاری داده‌های نشانگرهای مولکولی SSR به صورت صفر (نبود قطعه DNA) و یک (وجود قطعه DNA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و به روش UPGMA و ضریب Jaccard تجزیه کلاستر شد. دندروگرام ایجاد شده که با ضریب اطمینان بالا با آزمون Bootstrap نیز تایید شد، تنوع ژنتیکی و قرابت خویشاوندی ژنوتیپ‌ها را برآورد کرد (شکل ۳). رقم شیروانی جدا از سایر ارقام و به تنهائی در یک شاخه مستقل قرار گرفت. اگر چه این رقم از منطقه تالش استان گیلان جمع‌آوری شده ولی به احتمال زیاد و با توجه به نام آن از منطقه شیروان جمهوری آذربایجان به ایران آورده شده است و به همین خاطر تفاوت ژنتیکی زیادی با دیگر ارقام ایرانی نشان داد. در یک مطالعه قبلی نیز رقم شیروانی به همراه رقم قره باغ که متعلق به منطقه قره‌باغ جمهوری آذربایجان است در یک گروه قرار گرفته بود (Ghanbari *et al.*, 2005). هشت رقم دیگر همگی در یک شاخه جای گرفتند. در این مجموعه رقم محلی کرج با مبدا استان البرز در یک گروه و رقم‌های رسمی و شصتک متعلق به منطقه رحیم‌آباد استان گیلان هر یک در گروه جداگانه قرار گرفتند. در گروه چهارم رقم تابستانه متعلق به منطقه اشکورات استان گیلان در یک زیرگروه و دو رقم پشمینه و گرچه که از منطقه قم جمع‌آوری شده‌اند در زیر گروه



شکل ۳ – دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۸ درخت از ده رقم فندق ایران بر اساس الگوهای تکثیر نشانگرهای ریزماهواره، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS بر مبنای روش UPGMA

Fig. 3. Dendrogram developed by cluster analysis of SSR markers' profile of 28 trees from ten Iranian cultivars of hazelnut based on UPGMA method using NTSYS software

دیگر در داخل این گروه قرار گرفتند. در گروه آخر رقم گردویی در یک زیرگروه، رقم پاییزه، گرد اشکورات و پایه سوم رقم تابستانه از منطقه اشکورات گیلان در زیر گروه دیگر جای گرفتند. بررسی دندروگرام نشان می‌دهد که درختان متعلق به هر رقم در گروه متعلق به همان رقم جای گرفتند به استثنای رقم تابستانه که یکی از درختان منتسب به آن رقم متفاوت از درختان دیگر همان رقم بوده و در یک گروه جداگانه جای گرفت (شکل ۳).

بررسی گروه‌ها به وضوح نشان داد که رقم‌های دارای منشا جغرافیایی یکسان در دندروگرام نزدیک به هم و ارقام و ژنوتیپ‌های دارای منشا جغرافیایی متفاوت، دور از هم قرار گرفتند. برای مثال دو رقم محلی کرج و شیروانی در دو گروه مجزا و دور از هم قرار گرفتند. رقم‌های پشمینه و گرچه (با مبدا قم) نیز همراه با رقم تابستانه (با مبدا گیلان) در یک گروه جای گرفتند. از آن‌جا که قم جزء زیستگاه‌های طبیعی فندق در ایران به شمار نمی‌رود، احتمالا دو رقم پشمینه و گرچه نیز توسط باغداران از استان گیلان به این منطقه

برده شده‌اند. همچنین رقم محلی کرج در یک گروه مجزا قرار گرفتند که می‌تواند نشان دهند وجود تفاوت در جمعیت فندق موجود در دامنه‌های شرقی و غربی البرز باشد.

در یک مطالعه قبلی و بر اساس دندروگرام حاصل از یک بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ نمونه داخلی و خارجی موجود در کلکسیون فندق که با استفاده از ۹ جفت آغازگر SSR انجام شد، رقم‌های گردویی، پاییزه و تابستانه در یک زیرگروه بدون داشتن فاصله ژنتیکی از یک‌دیگر قرار گرفته بودند و از هم متمایز نشدند (Ghanbari *et al*., 2005)، در حالی که در تحقیق حاضر این سه رقم از هم متمایز بوده و در دو گروه متفاوت قرار گرفتند، به نحوی که رقم تابستانه در گروه چهارم و پاییزه و گردویی در گروه پنجم جای گرفتند.

به طور کلی می‌توان بر مبنای تنوع آلل‌های SSR نتیجه‌گیری کرد که تنوع ژنتیکی زیادی در ارقام فندق ایران وجود دارد. این بررسی شناخت دقیق و قابل اعتمادی از ارقام بومی تجاری فندق در ایران و روابط نیائی آن‌ها، در اختیار ما قرار می‌دهد. از طرف دیگر انگشت‌نگاری DNA انجام شده که دارای تکرارپذیری بالائی است و بارکدهای ژنتیکی تهیه شده بر این اساس، آن‌ها را به ابزار مطمئنی برای تمایز، ثبت و گواهی اصالت ژنتیکی وهمچنین حمایت از حقوق مالکیت فکری ارقام فندق کشور مبدل می‌سازد. انتظار می‌رود با استفاده از پروتکل ارائه شده در این تحقیق و بارکد ژنتیکی تهیه شده با این آغازگرها بتوان در هر زمان و مکان به تشخیص ژنتیکی این رقم‌ها اقدام کرده و از حقوق ملی ناشی از منابع ژنتیکی فندق کشور حمایت کرد.

References

Anonymous. 2008. Statistics of Horticultural Crops Production for Year 2008. Ministry of Jahade-e- Agriculture, Tehran, Iran (in Persian).

Boccacci, P., Akkak, A., and Botta, R. 2006. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers. Genome 49: 598-611.

Boccacci, P., Akkak, A., Bassil, N. V., Mehlenbacher, S. A., and Botta, R. 2005. Primer Note: Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other Corylus species. Molecular Ecology Notes 5: 934-937.

Darvishian, M. 2000. Hazelnut Cultivation and Product. Fani Publishing Company, Tehran, Iran (in Persian).

Erfatpour, M. 2008. Identification of genetic diversity among Iranian hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes in north of Iran based on SSR markers. MSc. Thesis, College of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran (in Persian).

Ghanbari, A., Akkak, A., Boccacci, P., Botta, R., Talaie, A., and Vezvaie, A. 2005. Characterization of Iranian hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsalellite markers. Acta Horticulturae 686: 111-116.

Gokirmak, T., **Mehlenbacher, S. A., and Bassil, N. V. 2008.** Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 5 (2): 147-172.

Hossein Ava, S., and Pirkhezri, M. 2010. Evaluation of quantitative and quality characteristics in some hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties in Karaj climatic conditions. Seed and Plant Production Journal 26-2 (3): 329-342 (in Persian).

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., and Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reports 12: 6-13.

Mehlenbacher, S. A., Brown, R. N., Nourha, E. R., Gokirmak, T., Bassil, N. V., and Kubisiak, T.L. 2006. A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. Genome 49: 122-133.

Moraghebi, F. 2000. Study on hazelnuts of Iran and introduction of *Corylus maxima* for Iranian flora by enzymatical and morphologhical survey. Pajouhesh va Sazandegi 53: 2-6 (in Persian).

Mozafari, J., Sadeghian, Y., Mobasser, S., Kheiri, F., Khademi, H., and Mohammadi, A. 2010. Principle of Plant Variety Protection. Published by Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran. 436pp. (in Persian).

Smith, J. S. C., Chin, E. C. L., Shu, H., Smith, O. S., Wall, S. J., Senior, M. L., Mitchel, S. E., Kresorich, S., and Tiegle, J. 1997. Evaluation of the utility of SSR loci as molecular marker in maize (*Zea mays*): Comparison with data from RFIP and pedigree. Theoretical and Applied Genetics 95: 163-173.