دستورالعمل فنی

معرفی نشانگرهای ریزماهواره ژنومی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

نگارندگان:

یوسف محمدی

عباس قمری زارع

فرزاد بنائی اصل

زهرا آبروش

۱۴۰۱

عنوان طرح منتج به نشریه	
بررسی تنوع ژنتیکی نه ژنوتیپ منتخب گل محمدی با استفاده از نشانگرهای مولکولی	۲-۰۹-۰۹-۰۳۲-۹۸۰۶۷۲

عنوان نشریه: معرفی نشانگرهای ریزماهواره ژنومی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

نویسندگان:

یوسف محمدی – استادیار پژوهشی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

عباس قمری زارع – دانشیار پژوهشی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

فرزاد بنائی اصل – استادیار پژوهشی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

زهرا آبروش – کارشناس ارشد، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور/ اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستاران علمی: سیدرضا طبایی عقدایی و علی اشرف مهرابی اولادی

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۱

این نشریه به شماره ۶۱۷۴۲ در تاریخ ۱۴۰۱/۰۳/۲۹ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

9789644734960

مخاطبان نشریه:

کارشناسان، پژوهشگران و اعضای هیئت‌علمی بخش‌های زیست‌فناوری، ژنتیک و به‌نژادی گیاهی مؤسسات تحقیقاتی و دانشگاه‌ها

اهداف آموزشی:

شما خوانندگان گرامی در این نشریه با:

نحوه استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آشکارسازی فراورده‌های آن و معرفی نشانگرهای مورد استفاده در تجزیه‌وتحلیل مولکولی و بهترین نشانگرهای SSR مورد استفاده در مطالعات تجزیه تنوع ژنتیکی گل محمدی

آشنا خواهید شد.

فهرست مطالب

چکیده ۱
مقدمه ۲
مراحل انجام کار ۴
استخراج DNA ۴
تعیین کمیت و کیفیت DNA و واکنش زنجیرهای پلیمراز ۷
الکتروفورز محصولات PCR ۷
معرفی بهترین نشانگرهای مورد استفاده برای گل محمدی ۹
منابع مورد استفاده ۹

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه، برای مطالعات اصلاحی لازم و ضروری است تا محققان بتوانند از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به بهترین هیبرید و حداکثر عملکرد، بهره ببرند. بنابراین باید تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه بر اساس صفات مختلف بررسی شود. استفاده از صفات مورفولوژیکی برای بررسی تنوع ژنتیکی، به دلیل معایب نشانگرهای مورفولوژیکی کمرنگ شده است و به‌همین دلیل امروزه محققان از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه گیاهی استفاده می‌کنند. گل محمدی یکی از مهمترین گیاهان تجاری است که در صنایع غذایی، دارویی، عطرسازی و آرایشی استفاده می‌شود و تولید ارقام سازگار به اقلیم‌های مختلف، اهمیت به‌سزایی در تولید این گیاه ارزشمند دارد. در این نشریه با نحوه استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الکتروفورز افقی، عمودی و بهترین نشانگرهای چند شکل برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات ژنومیکس گل محمدی آشنا خواهید شد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گل محمدی، نشانگرهای مولکولی، SSR

مقدمه

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill) به‌عنوان گل رز دمشقی شناخته می‌شود و یکی از مهمترین گیاهان معطر است که به‌طور گسترده در چین، هند، لیبی، مراکش، جنوب فرانسه، جنوب ایتالیا، جنوب روسیه، اوکراین و به‌طور ویژه در بلغارستان، ترکیه و ایران کشت می‌شود (Sharma and Kumar, 2016). این گیاه جزء گونه‌های معطر و اسانس‌دار است و از نظر غذایی و دارویی نیز دارای اهمیت می‌باشد (Nunes, and Migue, 2017).

در مورد منشأ گل محمدی در بین گیاه‌شناسان اختلاف نظر وجود دارد. اگرچه نام علمی گونه (*damascena*) و نام انگلیسی آن رز دمشقی[1] (Damask Rose) اشاره به شهر دمشق در کشور سوریه دارد، اما بیشتر گیاه‌شناسان منشأ آن را سوریه نمی‌دانند (Ellen, 2004; Lioyd, 1997). برخی از گیاه‌شناسان منشأ گل محمدی را جنوب اروپا و ایتالیا می‌دانند و عده‌ای از آنان در این مورد به‌طور مستقیم به ایران اشاره کرده‌اند (Lioyd, 1997). در سال ۱۳۹۶ چهار استان فارس، کرمان، اصفهان و آذربایجان‌شرقی به‌ترتیب با ۸۰۱۳، ۳۷۰۰، ۲۴۱۸ و ۱۱۳۲ هکتار از نظر سطح زیر کشت مقام‌های اول تا چهارم را داشته‌اند. اما از نظر تولید گل در واحد سطح استان آذربایجان‌غربی با تولید حدود ۳۲۳۳ کیلوگرم در هکتار بالاترین تولید را در واحد سطح داشته است.

در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ سطح زیر کشت آن در ایران ۲۰۶۸۴ هکتار بود که از این مقدار ۲۰۶۷۸ هکتار مربوط به کشت آبی و ۶ هکتار مربوط به کشت دیم بود. این مقادیر نشان می‌دهد که بیش از ۹۹ درصد مربوط به کشت آبی است. در همین سال میزان کل تولید گل محمدی در کشور ۳۲۲۰۸ تن بود که ۳۲۱۹۴ تن از گل محمدی آبی و ۱۴ تن از گل محمدی دیم بدست آمد. به‌عبارت‌دیگر بیش از ۹۹ درصد به کشت آبی تعلق داشت (بی‌نام، ۱۳۹۶).

1 - Damask rose

◈ معرفی نشانگرهای ریزماهواره ژنومی گل محمدی / ۳

تاکنون مطالعات انگشت‌شماری بر روی مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف گل محمدی انجام شده است که نتایج این مطالعات نیز گاهی ضد و نقیض می‌باشد. فاروق و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ گل محمدی جمع‌آوری شده از پاکستان و ایران و همچنین ۱۲ رقم تجاری را با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر SSR انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های ایران و پاکستان مشاهده نشد. در تحقیقی دیگر، بابایی و همکاران (۲۰۰۷) از ۹ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ ایرانی در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور استفاده کردند. در این مطالعه ۴۰ ژنوتیپ مورد نظر در ۹ خوشه قرار گرفتند و تنوع ژنتیکی بالایی در بین خوشه‌ها دیده شد. طبائی عقدایی و همکاران (۲۰۰۶) از ۲۲ نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ گل محمدی موجود در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور استفاده کردند و ژنوتیپ‌ها تنوع ژنتیکی مناسبی نشان دادند. در مطالعات دیگر نتایج ضد و نقیضی با مطالعات قبلی مشاهده شده است. آقااوغلو و همکاران (۲۰۰۰) از ۱۴ نشانگر RAPD و همچنین بایدار و همکاران (۲۰۰۴) از ۲۳ نشانگر AFLP و ۹ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گل محمدی ترکیه استفاده کردند و هیچ تنوع ژنتیکی را بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نکردند.

در اوایل دهه ۱۳۸۰، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور اجرای یک طرح جامع تحقیقاتی کاربردی را با نزدیک به ۴۰ پروژه تحقیقاتی ستادی، منطقه‌ای و استانی برای گل محمدی آغاز کرده است. این طرح جامع تقریباً تمام جنبه‌های تحقیقات مولکولی و سیتوژنتیکی، خصوصیات مورفولوژیکی، فنولوژیکی، فیتوشیمیایی، خصوصیات کمی و کیفی اسانس کلن‌ها، جنبه‌های زراعی و باغی و غیره مرتبط را دربرگرفته و در نهایت ۹ ژنوتیپ به‌عنوان ژنوتیپ‌های منتخب معرفی شده است (شکل ۱). با

توجه به موارد مطرح شده، باید یک دستورالعمل فنی یکپارچه برای مطالعات مولکولی گل محمدی نوشته شود.

شکل ۱- کلکسیون گل محمدی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

مراحل انجام کار

استخراج DNA

در این دستورالعمل از نه ژنوتیپ گل محمدی که طی تحقیقات وسیع و با استفاده از صفات مورفولوژیکی و عملکردی به وسیله مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به‌عنوان ژنوتیپ‌های منتخب معرفی شده‌اند، استفاده شد. برای بقیه ژنوتیپ‌های گل محمدی از این روش برای استخراج DNA استفاده شود.

۱. نمونه‌های برگی جوان از گیاهان مادری انتخاب و پس از انجماد در ازت مایع، به فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل گردد.

۲. استخراج DNA به روش CTAB (سقای معروف و همکاران، ۱۹۸۴) (جدول ۱) به شرح زیر انجام شود.

۳. حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونهٔ برگی در حضور ازت مایع پودر و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری استریل حاوی ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج استریل گرم (حدود ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و ۴۰ میکرولیتر PVP منتقل و پس از چند بار سروته‌کردن در زیر هود، ۳ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول به هر تیوب اضافه شود.

۴. تیوب‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شوند. هر ۱۰ دقیقه یکبار نمونه‌ها به آرامی سروته شوند تا بافر استخراج به‌طور کامل با پودر برگی مخلوط شود.

۵. نمونه‌ها را پس از خارج شدن از بن‌ماری، به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در هوای اتاق قرار دهند تا خنک شوند.

۶. هم‌حجم نمونه‌ها، محلول کلروفورم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) به آنها اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی سروته شوند.

۷. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شود و فاز مایع بالایی لوله‌ها به تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری استریل جدید منتقل گردد و ۳۰۰ میکرولیتر NaCl سرد (نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) برای حل کردن پروتئین‌ها و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول خالص (۱۰۰٪) به هر تیوب اضافه شود.

۸. پس از ظهور کلاف DNA، تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شوند.

۹. پس از تشکیل رسوب، محلول رویی تیوب تخلیه و از محلول‌های شستشوی ۱ و ۲ (جدول ۲ و ۳) هریک به مدت ۱۰ دقیقه برای شستشوی رسوب استفاده شود.

۱۰. تیوب‌های حاوی پلیت DNA در دمای اتاق برای خشک شدن قرار داده شده و پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر TE، [Tris(10Mm), EDTA(1mM)] اضافه شد و تیوب‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق قرار داده شدند تا رسوب DNA کاملاً حل شود.

۱۱. برای حذف RNA، دو میکرولیتر RNase ٪۱۰ (۱۰ mg/ml) به هر تیوب اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در بن‌ماری در دمای ۳۷°C قرار داده شود.

جدول ۱- اجزاء بافر استخراج CTAB

حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر	غلظت نهایی	استوک
۲۰ ml	۱۰۰ mM	Tris ۱ M pH = ۷/۵
۲۸ ml	۷۰۰ mM	NaCl ۵ M
۲۰ ml	۵۰ mM	EDTA ۰/۵ M pH =۸
۲gr	٪۱	CTAB
۱۳۰ ml		H_2O

جدول ۲- اجزاء محلول شستشوی ۱

حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر	استوک
۷۶ ml	Absolute EtOH
۸ ml	NaOAc ۲/۵ M
۱۶ ml	dH_2O

جدول ۳- اجزاء محلول شستشوی ۲

حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر	استوک
۷۶ ml	Absolute EtOH
۱ ml	NH_4OAc
۲۳ ml	dH_2O

تعیین کمیت و کیفیت DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

با توجه به اهمیت کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده در انجام واکنش PCR، بررسی کمیت و کیفیت با روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شود. پس از تعیین کمیت نمونه‌ها، آنها به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رقیق شوند. آنگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزای مندرج در جدول ۴ انجام شود.

جدول ۴- اجزای مورد استفاده برای PCR در تجزیهٔ ریزماهواره‌ها

اجزای مخلوط	مقدار برای ۲۰ میکرولیتر
مسترمیکس قرمز	۱۰ میکرولیتر
DNA	۴ میکرولیتر
آغازگر مستقیم (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
آغازگر معکوس (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۴ میکرولیتر

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخهٔ واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر (جدول ۵) در دمای ۶۰-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد (با توجه به آغازگر) به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه باشد.

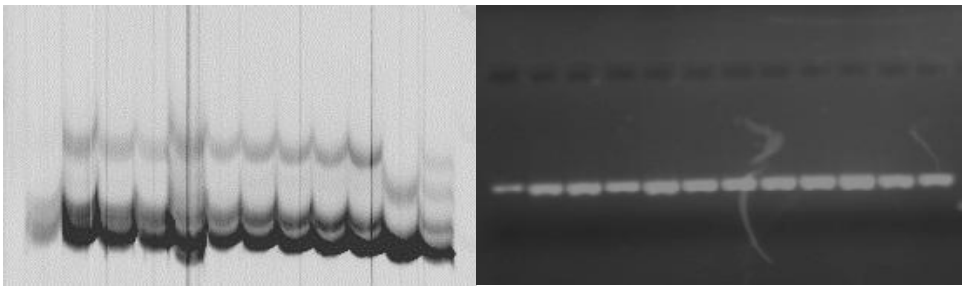
الکتروفورز محصولات PCR

بر اساس مطالعات انجام شده، چون اختلاف طول قطعات برای نشانگرهای مورد استفاده در ژنوتیپ‌های مختلف ناچیز بود، الکتروفورز ژل آگارز قادر به تمایز افراد مختلف نیست. در نتیجه حتماً از

الکتروفورز عمودی با ژل آکریلامید ۶ تا ۸ درصد استفاده شود. تفاوت الکتروفورز افقی (ژل آگارز ۳ درصد) با الکتروفورز عمودی (ژل آکریلامید ۸ درصد) در شکل ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۵- اسامی، توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس و دمای اتصال آغازگرها

نشانگر	توالی آغازگر مستقیم	توالی آغازگر معکوس	دمای اتصال
RD1	5CAGATTCGCCGTAGCCCTTAC3	5ATCCGAACCCCGACCTGAC3	54
RD2	ATCATGTGCAGTCTCCTGGT	AATTGTGGGCTGGAAATATG	55
RD3	AGAGAATTGAAAAGGGCAAG	GAGCAAGCAAGACACTGTAA	53
RD4	CAGGTAATTTGCGGATGAAG	GATCCGCCGTTTCCAGT	58
RD5	GTGGATTTTCAGAGATACGC	TCACAGACAGGACCACCTAT	50
RD6	GCCATCACTAACGCCACTAAA	GCGTCGTTCGCTTTGTTT	56
RD7	ACAGGCCTCTGTTCACCATC	CACACATGCACAACTCAGAGAA	55
RD8	CGGTGGAGAGGATGATGTG	GCAACAAGAACCAGCACAGA	55
RD9	ACTCCTCCAAAGCTTCACCA	CCTCATCGACAGAGTCGTCA	59
RD10	CGCCCTAGTCTGCTCTCTCTC	CTCAAGCTGAAGCTCGGAGT	59
RD11	GCACTCTTGACGTTGTCCAT	GTCAATGTAGTCCGGTTCGG	58
RD12	GGCCTAGCAAAGCAACAAAC	AGTGGAGGGCAGTCTCTGAA	59
RD13	CAGCGAAAAGAACAAGGACC	CAGAAGCTAATAAATTAACAAT CACCA	59
RD14	TCTTTCGGTTCAGAAAGTTCG	CTCGCTGATCTTGTCCATCA	59
RD15	ACAACCAACCCAAGAACTCG	TGCCAGCTTCAGTCTCACCT	60
RD16	CAACTGGGTTGGGTCAGTCT	TCAAATGTACCTTGCGCTTG	60
RD17	AGAGGTTTAGGGCAGCCATT	GCGAATGATGGTGGAGAGTT	60
RD18	CTACTCCAATGTCCGCTTCC	GTTGGAGAAGAAGCCGTGAG	59
RD19	CGAGGAAAAACCCAAAATCC	TGGAAGCAAGAAAAGGCAGT	60
RD20	GGCGTCTCTCACATCTCAAA	AAGATCTTCTCTCCGGCCTT	59
RD21	GCCGTAATTCGTGGAAAGAA	ATGCCACCAGAACCTTGAAC	60
RD22	CCTAAAGCTTAAGCCCCCAA	GCAATAGACTTGGCAGCCTC	60
RD23	TCTGAGCACGACTCAACAGG	AGGCATGTAATGCTGTGGGT	60
RD24	TTCTTGAGCTAAAAGTGCATCG	CAGATCCAAACCGAACCCTA	59
RD25	AGAAAAGCGAAAGCACAAGC	CTTAAATGCGCCACCAATTT	59
RD26	GCCACCATAGCCAGAGACAT	GGGCAGAGAAGAAGTTGACG	55
RD27	GACATCACCACCACCACAAG	AACCAAGGTTTCCAGTTCCA	55
RD28	TGGTTTGGGGTTTTGTGTCT	GCACAGTCTCCACCTGACAA	55
RD29	TTAATCCAAGGTCAAAGCTG	TCTCTTTCCCTCCTCACTCT	53
RD30	AGAGAATTGAAAAGGGCAAG	GAGCAAGCAAGACACTGTAA	52



شکل ۲- تفکیک قطعات. سمت راست (الکتروفورز افقی)، سمت چپ (الکتروفورز عمودی)

معرفی بهترین نشانگرهای مورد استفاده برای گل محمدی

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که نشانگرهای RD18 و RD5 با تولید ۱۶ قطعه چند شکل بهترین نشانگر بوده، بنابراین برای مطالعات مولکولی گل محمدی استفاده شود. همچنین نشانگرهای RD10، RD11، RD12 و RD14 مونومورف بوده و قابل استفاده در سنجش مولکولی تنوع در گیاه گل محمدی نیست.

منابع مورد استفاده

Agaoglu Y., Ergul A., Baydar N. (2000) Molecular Analysis of Genetic Diversity Oil Rose (*Rosa Damascena* Mill.) Grown Isparta (Turkey) Region. Biotechnol. & Biotechnol.Eq., 14, 16-18.

Babaei A., Tabaei-Aghdaei S.R., Khosh-Khui M., Omidbaigi R., Naghavi M.R., Esselink G.D., Smulders M.J. (2007) Microsatellite analysis of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) accessions from various regions in Iran reveals multiple genotypes. BMC Plant.Biol., 7, 12-19.

Baydar N.G., Baydar H., Debener T. (2004) Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. J.Biotechnol., 111, 263-267.

Ellen , W., 2004. *Rosa damascena* Mill. . http://www. Helpmefind .com/rose /index. Php.

Farooq A, Kiani M, Khan MA, Riaz A, Khan AA, Anderson N, Byrne DH (2013) Microsatellite analysis of *Rosa damascena* from Pakistan and Iran. Hortic Environ Biotechnol 54: 141-147.

Lioyd, C., 1997. Damask roses on the rose garden .Wendy @ netlist . co. nz. :14

Maroof, M. S., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q., & Allard, R. W. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(12), 5466-5470.

Nunes, H., & Miguel, M. G. (2017). *Rosa damascena* essential oils: a brief review about chemical composition and biological properties. Trends in Phytochemical Research, 1(3), 111-128.

Tabaei-Aghdaei, S.R., Monfared, H.H., Fahimi, H., Ebrahimzadeh, H., Jebbely, M., Naghavi, M.R., Babaei, A.(2006).Genetic variation analysis of different populations of *Rosa damascena* in NW Iran using RAPD markers. Iran J Bot, 12: 121-127.

Sharma, S., & Kumar, R. (2016). Effect of temperature and storage duration of flowers on essential oil content and composition of damask rose (*Rosa*× *damascena* Mill.) under western Himalayas. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3(1), 10-17.