



تعیین تنوع ژنتیکی ارقام گلابی با استفاده از نشانگرهای ISSR

مریم صفرپور شورباخلو^۱، روح اله حسینی منفرد^۲، سولماز پایدار^۱، مستانه شریفی^{۱*}

^۱ کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

^۲ دانشجوی کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶

چکیده

ایران با نزدیکی به مراکز تنوع گلابی و نیز دارا بودن بیش از ده گونه از جنس *Pyrus* به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ژنتیکی گلابی در دنیا شناخته شده است. از طرف دیگر، کشور ایران با ۱۷۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت، یکی از مراکز تولید گلابی محسوب می‌شود. با وجود موقعیت ممتاز جغرافیایی، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط بین ژنوتیپ‌های مختلف گلابی در ایران وجود ندارد و مشخص نیست چه نسبت ژنتیکی بین ارقام بومی ایرانی با ارقام تجارتي وارداتی وجود دارد. در این تحقیق به منظور گروه‌بندی ۱۰ ژنوتیپ گلابی ایرانی و تعیین موقعیت ژنتیکی آن‌ها در بین ۱۳ رقم وارداتی، از تکنیک مبتنی بر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) استفاده شد. پانزده آغازگر ISSR به کار رفته، در مجموع ۲۵۷ باند تکثیر نمود که ۲۱۳ باند دارای چندشکلی (سطح چندشکلی ۸۱/۶ درصد) بود. دندروگرام ژنوتیپ‌های گلابی مورد استفاده در این تحقیق با الگوهای باندي ISSR با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA با نرم افزار NTSYS V. Pc-2.02e، رسم شد. گلابی‌های مورد بررسی در سه دسته مجزا قرار گرفتند. در گروه اول کنفرنس، محمدعلی، سردرودی، بارتلت، ردمبارتلت، هراسویت، پاس کراسان، دوین دوکومیس، آنجو، فلسطینی، لوئیس بن، دوشس و دره‌گزی، در گروه دوم کولی خوج، خوج لب ترش، خوج کته سر، دم کج، سبری، خوج مرداب انزلی و شاه‌میوه و در گروه سوم SK10 و SK13 قرار گرفتند. ارقام براساس خاستگاه جغرافیایی طبقه بندی گردید و ارقام متعلق به *P. communis* و *P. pyrifolia* کاملاً از هم جدا شدند. ارقام ایرانی تجارتي دم کج، شاه میوه و سبری همراه با خوج‌ها در یک دسته قرار گرفتند که به نظر می‌رسد از خوج‌ها منشأ گرفته باشند در حالی که سه رقم محمدعلی، دره گزی و سردرودی نزدیکی بیشتری به ارقام اروپایی نشان دادند و احتمالاً منشأ متفاوتی از خوج‌ها داشته و با ارقام اروپایی اجداد مشترکی دارند. نتایج این بررسی کارآمد بودن نشانگر ISSR برای انگشت‌نگاری ارقام گلابی را اثبات می‌نماید.

کلمات کلیدی: گلابی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

مقدمه

سیب روی شاخه می رسند. گونه مهم اقتصادی این دسته *P. pyrifolia* می باشد (Bell, 1990). تیپ دوم گلابی های اروپایی هستند. ترکیب بافت کره مانند با مزه و عطر خوشایند از خصوصیات این دسته می باشد. گونه مهم اقتصادی این گروه *P. communis* می باشد که تقریباً ۹۰٪ واریته های گلابی کشت شده در دنیا را شامل می شود (Atar, 2001)

کمبود جمعیت های وحشی اجدادی به خصوص در گونه های بسیار کشت شده امروزی، محدود بودن تنوع مورفولوژیکی بین ارقام و گونه ها، نبود خصوصیات متمایز کننده بین گونه ها و نیز تلاقی وسیع بین گونه ای^۳ که سبب بوجود آمدن ارقام و حتی گونه های وحشی با خصوصیات بینابینی شده است، عواملی هستند که دسته بندی گلابی ها را مشکل ساخته اند (Iketani et al., 1998). گرچه خصوصیات مورفولوژیکی و تجزیه تحلیل های آیزوزیمی دو روش مهم برای بررسی تنوع ژنتیکی داخل جنس *Pyrus* بوده است، ولی به دلیل محدودیت نشانگرهای مورفولوژیکی و آیزوزیمی، اعتبار دسته بندی ارقام گلابی با چنین روش هایی مورد تردید می باشد. به همین جهت در سال های اخیر استفاده از روش های ملکولی برای تعیین مشخصات ژنتیکی گونه و ارقام گلابی توجه بیشتری را جلب کرده است (Yamamoto et al., 2001 a,b; Wunsch & Hormaza, 2007) در ارزیابی تنوع ژنتیکی گلابی

در دهه های اخیر تنوع زیستی، به عنوان ماده خام و دستمایه اصلی اصلاح گران برای تولید فرآورده های زیستی، توجه پژوهشگران زیادی را به خود جلب کرده است. بنابراین، به موازات گسترش فنون روش های زیست فن آوری به عنوان سرمایه و ثروتی که روز به روز ارزش بیشتری می یابد، باید در رأس اولویت های تحقیقات قرار گیرد (Vejdani, 1997).

درخت گلابی که از دوران قبل از تاریخ به سبب حضور طبیعی در فلات ایران مورد توجه مردم این سرزمین قرار گرفته است، از جنس *Pyrus*، عضوی از زیرخانواده *Pomoideae* و خانواده *Rosaceae* است. در این جنس ۲۲ گونه اولیه بومی اروپا، آسیا و مناطق کوهستانی شمال آفریقا، شش هیبرید بین گونه ای طبیعی و حداقل سه هیبرید مصنوعی قرار دارند (Bell, 1990). تقریباً همه گونه های *Pyrus* دیپلوئیدهایی با ۱۷ جفت کروموزوم ($2n=34$) هستند و به دلیل آن که به طور گامتوفیتی خودناسازگار^۱ می باشند، تنوع بالایی در این جنس وجود دارد (Bell & Hought, 1986).

ارقام گلابی را به دو تیپ شرقی^۲ (شرق دور) و اروپایی تقسیم می کنند. ارقام شرقی که با نام گلابی آسیایی یا با اسم ژاپنی *nashi* شناخته شده اند، در چین و ژاپن کشت می گردند و در بیرون از آسیا به ندرت دیده می شوند. مشخصه عمده آنها بافت ترد و مزه شیرین است و مانند

¹ Self-Incompatible² Oriental pear³ Introgression

گزارش شده است (Reddy et al., 2002). در بررسی تنوع ژرم پلاسما *Poncirus trifoliata* مزیت ISSR نسبت به RFLP و RAPD مشخص شد و همچنین در جنس *Eleusine* کیفیت و کمیت داده های بدست آمده از ISSR به RFLP و RAPD ارجحیت داشت (Reddy et al., 2002).

شناسایی ارقام *Eucalyptus grandis* توسط ISSR نشان داد که این نشانگر یک روش ارزان و سریع برای دسته بندی مناسب ارقام است (Mezzena et al., 2001). کارایی نشانگر ISSR در ژنوتیب های مهم سپیدار (Jianming et al., 2006)، سیب (Goulão & Oliveira, 2001) و Bitter gourd (*Momordica charantia*) (Singh et al., 2007) نیز نشان داده شده است. در پژوهشی که با ۳۰ واریته توت فرنگی از مناطق جغرافیایی مختلف انجام شد، نشان داده شد که این تکنیک نیاز به DNA با کیفیت بالا ندارد و در مقایسه با نتایج حاصل از AFLP، ارزان تر، سریع تر و قابل اعتمادتر می باشد (Arnaud et al., 2000).

استفاده از نشانگر ISSR در گونه های *Pyrus* هم گزارش شده است. در یک تحقیق که از نتایج RAPD، AFLP و ISSR در شناسایی ارقام *P. communis* استفاده شده بود، شاخص مرغوبیت^۲ در ISSR (۸/۸۱) خیلی بالاتر از RAPD (۲/۰۶) بود و بیست و چهار رقم مورد آزمون را به خوبی دسته بندی کرد (Monte-Corro et al., 2002).

به طور وسیعی نشانگرهای RAPD (JianXin et al., 2004; Sharifani & Jackson, 2000; Ye et al., 1996; Wang & Dolatowski et al 2004. AFLP (Monta-Corvo et al., 2000)، SSR (Inoue et al., 2007; Ghosh et al., 2006; Fernández-Fernandez et al., 2006; Bassil, Monte-Corro et al., 2005 & 2004) و ISSR (et al., 2001 & 2002) مورد استفاده قرار گرفته-اند. در میان این نشانگرها، استفاده از نشانگر ISSR به چندین دلیل توصیه می شود. تکنیک ISSR برخلاف SSR، به اطلاعات قبلی از توالی DNA نیاز ندارد و آغازگرهای طراحی شده دارای حقوق انحصاری نیستند. به همین دلیل هزینه اولیه برای تعیین توالی آغازگرهای ISSR پایین است (Chenneau-Kourda et al., 2007). کار با ISSR آسان و سریع می باشد و چندشکلی بالایی نشان می دهد (Wünsch & Hormaza, 2002). محصولات تکثیر شده معمولاً ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز طول دارند و با دو روش الکتروفورز آگاروز و اکریل آمید قابل بررسی هستند و نیاز به استفاده از مواد رادیواکتیو ندارد (Branchard & Bornat, 2001). به سبب استفاده از آغازگرهای بلند (۱۶ تا ۲۵ مری) در مقایسه با آغازگرهای RAPD (۱۰ مری)، تکرارپذیری ISSR بسیار بالا است (Wünsch & Hormaza, 2007).

برتری ISSR نسبت به برخی تکنیک های مولکولی دیگر در دامنه وسیعی از گونه های گیاهی مانند برنج، گندم و سیب زمینی شیرین^۱

² Index Value¹ Sweet Potato

شناخته شده است (Maniee, 1995). گونه‌های متعدد گلابی در دامنه‌های البرز و زاگرس، جلگه‌های پست ساحلی کنار دریای خزر، در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، کردستان، لرستان، کوه‌های بختیاری، منطقه طوالیش گیلان، مازندران، گرگان و همچنین در کوهستان‌های استان فارس پراکنده هستند (Sabeti, 2002). علی‌رغم این موقعیت ممتاز جغرافیایی برای گلابی در ایران، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گلابی در ایران وجود ندارد و مشخص نیست ارقام بومی ایرانی چه نسبت شجره‌ای با ارقام تجارتي وارداتی دارند. کسب اطلاعات کافی در این زمینه می‌تواند به مدیریت صحیح این منابع ارزشمند ژنتیکی برای جلوگیری از انقراض ژرم‌پلاسماها و بهره‌برداری مناسب از ژنوتیپ‌های محلی برای اهداف اصلاحی گلابی کمک نماید.

کسب اطلاعات کافی در این زمینه می‌تواند به بهره‌برداری مناسب از ژنوتیپ‌های محلی برای اهداف اصلاحی گلابی منجر شود. به علاوه، این اطلاعات به یافتن منشأ جغرافیایی برخی ارقام تجاری کشور که نیای ژنتیکی آنها مشخص نیست، کمک می‌کند. در هر حال برای برنامه ریزی در اصلاح ژنوتیپ‌های گلابی، داشتن اطلاعات کافی از زمینه ژنتیکی هر رقم و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی ارقام نسبت به یکدیگر اهمیت اساسی دارد. ضمناً گاهی ارقامی مشابه با نام‌های محلی متفاوت خوانده می‌شوند. مقایسه ارقام ایرانی با ارقام خارجی امکان شناسایی چنین اشتباهاتی را فراهم می‌کند.

هشت آغازگر ISSR برای شناسایی ارقام گلابی اروپایی به کار رفته است. از ۳۳۷ باند تولید شده ۷۹/۵٪ چندشکلی داشت (Monte-Corro *et al.*, 2001). در تحقیقی برای شناسایی ارقام گلابی آسیایی از ۱۶ آغازگر ISSR استفاده شد. چهل و چهار قطعه حاصل شد که ارقام مورد نظر را به خوبی از هم جدا می‌کرد. نتایج این تحقیق نشان داد، نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگر RAPD چندشکلی بالاتری ایجاد می‌کند (Wang & Shih 2004).

مطالعه ژرم‌پلاسما گلابی با آگاهی از این که این میوه از نظر اقتصادی سومین میوه مهم منطقه معتدله پس از سیب و انگور است، ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های گذشته میراث ژنتیکی این جنس به سبب نابودی ارقام محلی، رو به فرسایش گذاشته است (Olivera *et al.*, 1999). تولید گلابی دنیای امروز به تعداد محدودی از ارقام مانند ویلیامز، آنجو، بوره بوسک، کنفرنس و پاس کراسان وابسته است، که همگی در قرن ۱۸ و ۱۹ انتخاب شده‌اند. به همین دلیل نیاز مبرمی به مدیریت ژرم‌پلاسما و شناسایی وارثه‌های حفاظت شده گلابی برای بدست آوردن سطح کافی سرمایه ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی وجود دارد (Wünsch & Hormaza 2007).

کشور ما با سطح کشتی معادل ۱۷۰۰۰ هکتار و با عملکرد ۱۱۴۷۰۶ کیلوگرم در هکتار یکی از مراکز تولید گلابی محسوب می‌شود. ضمناً این کشور به سبب نزدیکی به مراکز تنوع گلابی و دارا بودن بیش از ده گونه از جنس *Pyrus*، به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ژنتیکی گلابی دنیا

(حاوی ۱۰ میلی مولار تریس، ۰/۵ میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید و ۵ میلی مولار استات سدیم) و مقایسه تراکم باند آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III (λ DNA) برش یافته با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *Hind III* استفاده شد.

آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت Metabion International (Germany) سنتز شد. در جدول ۲ توالی این آغازگرها به همراه دمای اتصال مناسب برای هر آغازگر آورده شده است. آغازگرها طبق دستور شرکت تولیدکننده تا غلظت $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ رقیق گردید. با استفاده از PCR گرادینانت تکثیر آغازگرها در سه دمای اتصال مختلف بررسی گردید و دمای مناسب انتخاب شد که در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر $10\times$ (حاوی کلریدمنیزیم ۱/۵ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA Polymerase (۱ واحد)، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$)، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (۰/۲ میلی مولار) و ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد.

ضمن این که مشخص می‌کند ارقام ایرانی چه نسبت ژنتیکی با ارقام تجارتي وارداتی دارند و آیا آنقدر زمینه ژنتیکی متفاوتی دارند که ارزش بررسی برای ژن های جدید (ژن های مقاومت به بیماری‌ها و یا تنش‌ها) در برنامه های اصلاحی را داشته باشند.

چون در مطالعات ژنتیکی انجام شده روی گلابی و سایر گیاهان توسط پژوهش‌گران دیگر، کارایی نشانگرهای ISSR به اثبات رسیده بود، لذا این نشانگرها برای تأمین اهداف این پژوهش، تعیین روابط فیلوژنتیکی ارقام گلابی ایران و مقایسه آنها با ارقام خارجی، انتخاب گردیدند.

مواد و روش‌ها

نمونه های برگ گلابی شامل ۱۳ رقم خارجی و ۱۰ رقم ایرانی (جدول ۱)، از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج جمع آوری شدند. نمونه‌های انتخابی از میان ژنوتیپ هایی بود که کشت آنها مرسوم است. به علاوه چند ژنوتیپ وحشی جهت بررسی منشا ارقام تجاری استفاده گردید. نمونه های برگي بعد از انجماد سریع با نیتروژن مایع، تا زمان انجام استخراج DNA ژنومی در فریزر -80°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از برگ های جوان گلابی با روش (Murray and Thompson, 1980) انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش الکتروفورز پنچ میکرولیتر از DNA به دست آمده در ژل آگاروز ۰/۷٪ در بافر TAE¹

¹ Triss-Acetate-EDTA

جدول ۱- ارقام گلابی مورد استفاده در تحقیق (ارقام خوج کته سر، خوج مرداب انزلی، کولی خوج و خوج لب ترش جزو ارقام وحشی می باشند. سایر ارقام تجاری هستند).

Table 1- Pear varieties used in study (Khuj katesar, KoliKhuj, Khuj mordab anzali and Khuj labtorsh accessions are Wild genotypes and other cultivars are commercial).

ردیف	نام فارسی	نام انگلیسی	کد نمونه ها	مبدأ	گونه
Row	Farsi name	English name	cod	source	species
1	آنجو	Anjou	Anj	فرانسه	<i>Pyrus communis</i>
2	ویلیامز	Williams	Wil	انگلستان	<i>P. communis</i>
3	دوین دوکومیس	Doyenneducomice	Doy	فرانسه	<i>P. communis</i>
4	هراسوئیت	Harrow Sweet	Har	کانادا	<i>P. communis</i>
5	کنفرنس	Conference	Con	انگلستان	<i>P. communis</i>
6	دوشس	Duchesse	Duc	فرانسه	<i>P. communis</i>
7	لیس بن	Lies Bonne	Lie	فرانسه	<i>P. communis</i>
8	آبت فتل	Abate Fetel	Aba	فرانسه	<i>P. communis</i>
9	فلسطینی	Palestine	Pal	فرانسه	<i>P. communis</i>
10	ردبارتلت	Red Bartlett	Red	انگلستان	<i>P. communis</i>
11	پاس کراسان	Pass Crassane	Pas	فرانسه	<i>P. communis</i>
12	-	SK10	S10	ژاپن	<i>P. pyrifolia</i>
13	-	SK13	S13	ژاپن	<i>P. pyrifolia</i>
14	خوج کته سر	Khuj katesar	Kkat	ایران	<i>P. communis</i>
15	خوج مرداب انزلی	Khuj mordab anzali	Kmor	ایران	<i>P. communis</i>
16	کولی خوج	KoliKhuj	KolK	ایران	<i>P. communis</i>
17	سبری	Sebri	Seb	ایران	-
18	شاه میوه	Shah miveh	Shah	ایران	<i>P. communis</i>
19	خوج لب ترش	Khuj labtorsh	Klab	ایران	<i>P. communis</i>
۲۰	دم کج	Dom Kaj	Dom	ایران	<i>P. communis</i>
۲۱	دره گزی	Daregazi	Dar	ایران	<i>P. communis</i>
۲۲	محمد علی	Mohammad Ali	Moh	ایران	<i>P. communis</i>
۲۳	سردودی	Sardroudi	Sar	ایران	<i>P. communis</i>

جدول ۲- آغازگرهای ISSR استفاده شده در تحقیق.

Table 2- ISSR primers used in study.

ردیف	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
Row	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp.
1	(AC)8YG	50
2	(GA)8YC	50
3	BDB(CAC)5	55
4	HVH(TGT)5	51
5	VBV(AC)7	49
6	(AGTG)4	50
7	(CA)8GT	54
8	(AC)8YT	53
9	(AC)8YA	54
10	(GT)8YC	54
11	(GT)8C	52
12	(GATA)5	49
13	(TCT)6	49
14	HBH(CT)7	54
15	(TC)8RG	54

Y = T یا C

D = A یا G یا T

H = A یا C یا T

R = A یا G

B = G یا C یا T

V = A یا C یا G

گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه و نیز یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، برنامه ریزی شد.

مقدار ۶ میکرولیتر از محصول PCR با مقدار ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری^۴ مخلوط شد. مقدار پنج میکرولیتر از آن در یک چاهک ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE (حاوی ۹۰ میلی مولار تریس، ۹۰ میلی مولار اسید بوریک و دو میلی مولار اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید) بار گذاری شد. سه میکرولیتر نشانگر اندازه ۵۰ (از شرکت Fermentas) نیز به عنوان نشانگر جهت تخمین اندازه قطعات DNA تکثیر شده تزریق شد و به

پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی استریل به هر نمونه، لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Maste cycler-gradient Eppendorf) قرار گرفتند که در آن انجام واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی^۱ اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه، ۳۳ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها^۲ به رشته DNA در دمای بهینه شده برای هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر قطعات^۳ DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی

¹ Denaturing² Annealing³ Extension⁴ Loading buffer

نتایج و بحث

پانزده آغازگر ISSR به کار رفته توانستند در همه ۲۳ رقم گلابی مطالعه شده، به جز موتانت‌ها، تکثیر قابل تشخیصی داشته باشند. در کل ۲۵۷ باند مشاهده شد که ۸۱/۶ درصد آن‌ها، یعنی ۲۱۳ باند، چند شکلی نشان دادند. درجه چند شکلی به دست آمده بالاتر از درصد چند شکلی حاصل از RAPD (۷۴٪) و AFLP (۷۵٪) در مطالعه ۲۵ رقم گلابی بود (Monta-Corvo *et al.*, 2000). چنین به نظر می‌رسد نشانگر ISSR چندشکلی بالاتری از این دو نشانگر ایجاد می‌کند. به علاوه، چندشکلی حاصل طبیعت خود ناسازگار گلابی را نیز اثبات می‌نماید.

نتایج به دست آمده از هر آغازگر در جدول ۳ خلاصه شده است. تعداد باندهای چند شکلی از ۵ باند در نشانگر 5(GATA) تا ۲۱ باند چندشکل در نشانگرهای 8YA(AC) و 7HBH(CT) متغیر بود. به این ترتیب متوسط آلل‌های تولیدشده برای هر آغازگر ۱۴/۲ باند چندشکل بود. محدوده قطعات تکثیر شده از ۲۰۰ تا ۱۴۰۰ جفت باز بود. الگوی تکثیر دو آغازگر 8YC(GA) و 8GT(CA) به عنوان مثال در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مدت ۸ ساعت با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ آمیزی به روش اتیدیوم بروماید^۱ (۰/۵ mg/L) استفاده شد.

وجود یا عدم وجود باندها با اعداد یک و صفر برای هر رقم مشخص شد. داده‌های گم شده با عدد ۹ رتبه‌دهی گردید. به دلیل ماهیت غالب نشانگرهای ISSR از نرم افزار V.Pc-2.02e NTSYS برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها شامل تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه خوشه انجام شد. همچنین با استفاده از این نرم افزار پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی^۲ (PIC) محاسبه شد. مقادیر PIC بر پایه رابطه $PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$ محاسبه گردید (Roldan-Ruize *et al.*, 2000)، که در آن p_{ij} فراوانی الگوی j برای نشانگر i است که برای n الگو جمع زده می‌شود. همچنین ضریب همبستگی کوفتیک محاسبه و آزمون مانتل (Mantel, 1967) برای ارزیابی همبستگی بین ماتریسهای تشابه و دندروگرام نهایی، بر پایه ضریب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده انجام شد. در نهایت دندروگرام به دست آمده از گروه-بندی نمونه‌ها، بر اساس روش دایس و روش اتصال میانگین^۳ (UPGMA) تهیه شد.

¹ Ethidium bromide

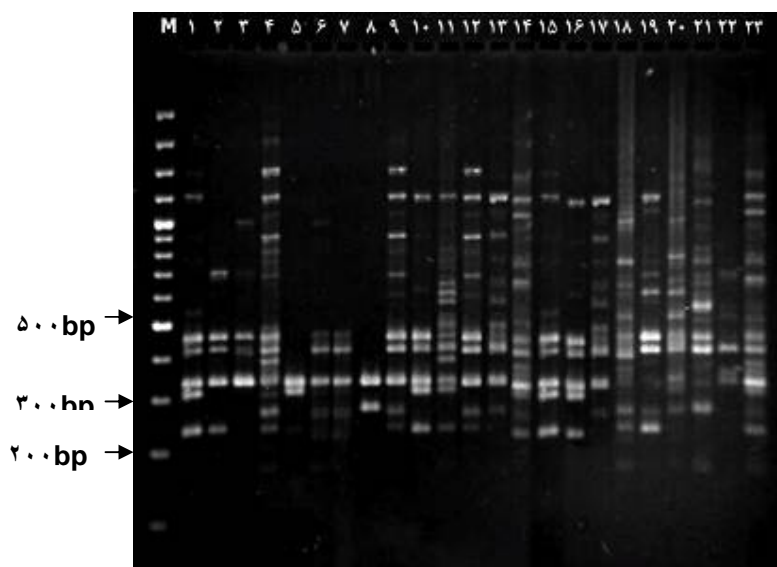
² Polymorphic Information Content (PIC)

³ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

جدول ۳- لیست آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق.

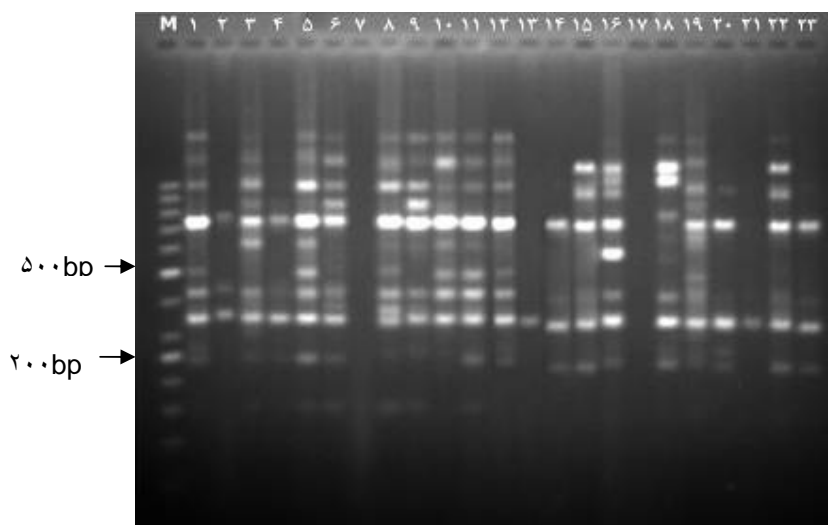
Table 3- The name of ISSR primers used in study.

ردیف	آغازگر	تعداد باندهای مشاهده شده	تعداد باندهای چندشکل	درصد باندهای پلی مورف	محتوای اطلاعات
Row	primer	Number of bands	Number of polymorphism band	Percent of polymorphism band	چند شکلی PIC
1	(AGTG)4	9	8	88.88	0.22
2	(GATA)5	7	5	71.45	0.18
3	(TCT)6	10	8	80	0.37
4	(AC)8YG	20	15	75	0.39
5	(GA)8YC	12	11	91.66	0.30
6	(CA)8GT	16	15	93.78	0.30
7	(AC)8YT	21	18	85.71	0.26
8	(AC)8YA	25	21	84	0.45
9	(GT)8YC	15	13	86.66	0.28
10	(GT)8C	18	14	77.77	0.29
11	(TC)8RG	15	10	66.66	0.28
12	BDB(CAC)5	21	18	85.71	0.39
13	HVH(TGT)5	18	17	94.44	0.38
14	VBV(AC)7	22	19	67.82	0.39
15	HBH(CT)7	28	21	75	0.43
	mean	17.13	14.2	81.6	
	total	257	213		



شکل ۱- الگوی بانندی ISSR حاصل از تکثیر آغازگر (CA)8GT روی ارقام مختلف گلابی (ژل آگاروز دو درصد، رنگ آمیزی اتیدیوم برماید).

Figure 1- ISSR band- pattern of pear genotypes analyzed with the (CA)8GT marker (Ethidium bromide-stained 2% agarose gel).



شکل ۲- الگوی بانندی ISSR حاصل از تکثیر آغازگر (GA)8YC روی ارقام مختلف گلابی (ژل آگارز ۲ درصد، رنگ آمیزی اتیدیوم برماید).

M: نشانگر اندازه جفت بازی ۱۰۰، ۱-کنفرنس، ۲-دوشس، ۳-لوئیس بن، ۴-SK10، ۵-آبت فتال، ۶-بارتلت، ۷-ردبارتلت، ۸-پاس کراسان، ۹-دوین دوکومیس، ۱۰-آنجو، ۱۱-SK13، ۱۲-هراسویت، ۱۳-فلسطینی، ۱۴-سردردی، ۱۵-محمدعلی، ۱۶-دره گزی، ۱۷-سبری، ۱۸-دم کج، ۱۹-خوج مرداب انزلی، ۲۰-خوج لب ترش، ۲۱-شاه میوه، ۲۲-خوج کته سر، ۲۳-کولی خوج.

Figure 1- ISSR band- pattern of pear genotypes analyzed with the (GA)8YC marker (Ethidium bromide-stained 2% agarose gel).

M: 100 bp DNA Ladder. 1—Conference, 2- Duchesse, 3- Lies Bonne, 4- SK10-4, 5- Abate Fetel, 6- Bartlett, 7- Red Bartlett, 8- Pass Crassane, 9- Doyenneducomice, 10- Anjou, 11- SK13, 12- Harrow Sweet, 13- Palestine, 14- Sardrood, 15- Mohammad Ali, 16- Daregazi, 17- Sebri, 18- Dom Kaj, 19- Khuj mordab anzali, 20- Khuj labtorsh, 21- Shah miveh, 22- Khuj katesar, 23- KoliKhuj.

را تولید نمودند. زیرا این تکرارها در طول ژنوم به نسبت تکرارهای دی نوکلئوتیدی کمتر دیده می شوند و استفاده از آنها در نشانگرهای ISSR کم اهمیت تر از دی نوکلئوتیدها است (Katti et al., 2001). در مطالعه دیگری که روی رقم گلابی با استفاده از نشانگر ISSR انجام شده بود، ثابت شد که آغازگرهای حاوی تکرارهای دی نوکلئوتیدی از آغازگرهای حاوی تکرارهای تری، تترا و پنتانوکلئوتیدی بازده بیشتری دارند و استفاده از آنها بیشتر توصیه شده است (Monte-corvo et al., 2001). مطالعه ای هم که روی برنج (*Oryza sativa*) انجام گرفت همین

مطالعات نشان می دهد آغازگرهای ISSR دارای تکرارهای CA، AC، TC، CT، GA، AG چند شکلی بالاتری از سایر تکرارهای دی، تری و تترانوکلئوتیدی نشان می دهند (Reddy et al., 2002). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز با این فرضیه مطابقت داشت. به طوری که آغازگرهای (AC)8YA و HBH(CT)7 با تولید ۲۱ باند چندشکل بیشترین چندشکلی را نشان دادند. همان طور که انتظار می رفت، آغازگرهای فاقد باز اضافی تری و تترا نوکلئوتیدی 6(TCT)، 5(GATA) و 4(AGTG) کمترین میزان باندهای چند شکل (متوسط هفت)

(Reddy et al., 2002). از آنجایی که نواحی تکثیر شده توسط آغازگرهای لنگر شده در جهت ۵' شامل مناطق بین ریزماهواره ها و توالی‌های ریزماهواره‌ای هستند، ایجاد محصولات با طول بزرگ تر از محصولات سایر آغازگرها که شامل مناطق بین ریزماهواره‌ای هستند، منطقی به نظر می‌رسد (Reddy et al., 2002).

ضریب تشابه از صفر تا یک متغیر است. زمانی که نشانگرها برای دو رقم کاملاً یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت باشند. دامنه ضریب تشابه به دست آمده از نشانگرهای ISSR در این تحقیق از ۰/۰۵ بین ارقام دره گزی و SK13 تا یک بین دو رقم ردبارتلت و بارتلت متغیر بود.

برای انتخاب مناسب ترین الگوریتم جهت دسته‌بندی ارقام از ضریب همبستگی کوفنتیک ($r=0/824$) استفاده شد. بهترین روش انتخاب شده روش UPGMA بود و دندروگرام بر اساس این روش ترسیم گردید (شکل ۳). براساس دندروگرام حاصله در شباهت ژنتیکی ۰/۳۶ نمونه‌های مورد بررسی، به سه دسته و یک ژنوتیپ مستقل تقسیم شد. در گروه اول کنفرنس، محمدعلی، سردرودی، بارتلت، ردبارتلت، هراسویت، پاس کراسان، دوین دوکومیس، آنجو، فلسطینی، لوئیس بن، دوشس و دره گزی، در گروه دوم کولی خوج، خوج لب ترش، خوج کته سر، دم کج، سبری، خوج مرداب انزلی و شاه میوه و در گروه سوم SK10 و SK13 قرار گرفتند. ژنوتیپ

نتایج را اثبات نمود (Monte-corvo et al., 2001). در نتایج حاصل از تحقیق حاضر معمولاً بیشترین تعداد باندهای مشاهده شده به آغازگرهایی که حاوی تکرار دی نوکلئوتیدی AC هستند مربوط می‌شود. بر این اساس، به نظر می‌رسد که تکرار دی نوکلئوتیدی AC در ژنوم گلابی بیشتر وجود دارد. از این نتایج می‌توان در طراحی آغازگرهای ریزماهواره برای گلابی استفاده نمود. در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی گندم نانویی و سیب زمینی هم نشان داده شد آغازگرهای حاوی تکرار AC در مقایسه با سایر آغازگرهای ISSR، بازده بیشتری دارند (Reddy et al., 2002). بررسی ژنوم گندم ماکارونی با نشانگر ISSR هم حضور بالای تکرارهای AC را تأیید می‌کند (Reddy et al., 2002).

در میان آغازگرهای دارای باز اضافی در جهت ۵'، آغازگرهای BDB(CAC)5 و HVH(TGT)5 باندهایی با وزن مولکولی بالا (بالاتر از ۱۰۰۰ جفت باز) تکثیر کردند که امتیازدهی آنها مشکل بود. قبلاً هم در مطالعه ژنوم جو، فشردگی باندها در قسمت بالای ژل آغازگرهای دارای باز اضافی در جهت ۵' گزارش داده شده بود (Monte-corvo et al., 2002). در تحقیقی که برای تعیین تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گلابی با استفاده از آغازگرهای ISSR صورت گرفت، حضور باندهایی با طول بالای ۸۰۰ جفت باز در مورد آغازگرهای HVH(TG)7، DBD(AC)7، HVH(CA)7 و DBD(AC)7 مشاهده شد

communis هستند جدا شده اند. اگر رقم سبری متعلق به گلابی های ژاپنی بود، انتظار می رفت در این دسته قرار گیرد در حالی که چنین اتفاقی نیفتاد.

در دندروگرام حاصل، رقم آبت فتال از سایر ارقام فرانسوی جدا شد و به صورت یک شاخه تنها قرار گرفت. قرارگیری دور از انتظار آبت فتال شاید به ماهیت نشانگرهای ISSR مربوط باشد لذا این نتیجه دور از انتظار باید مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

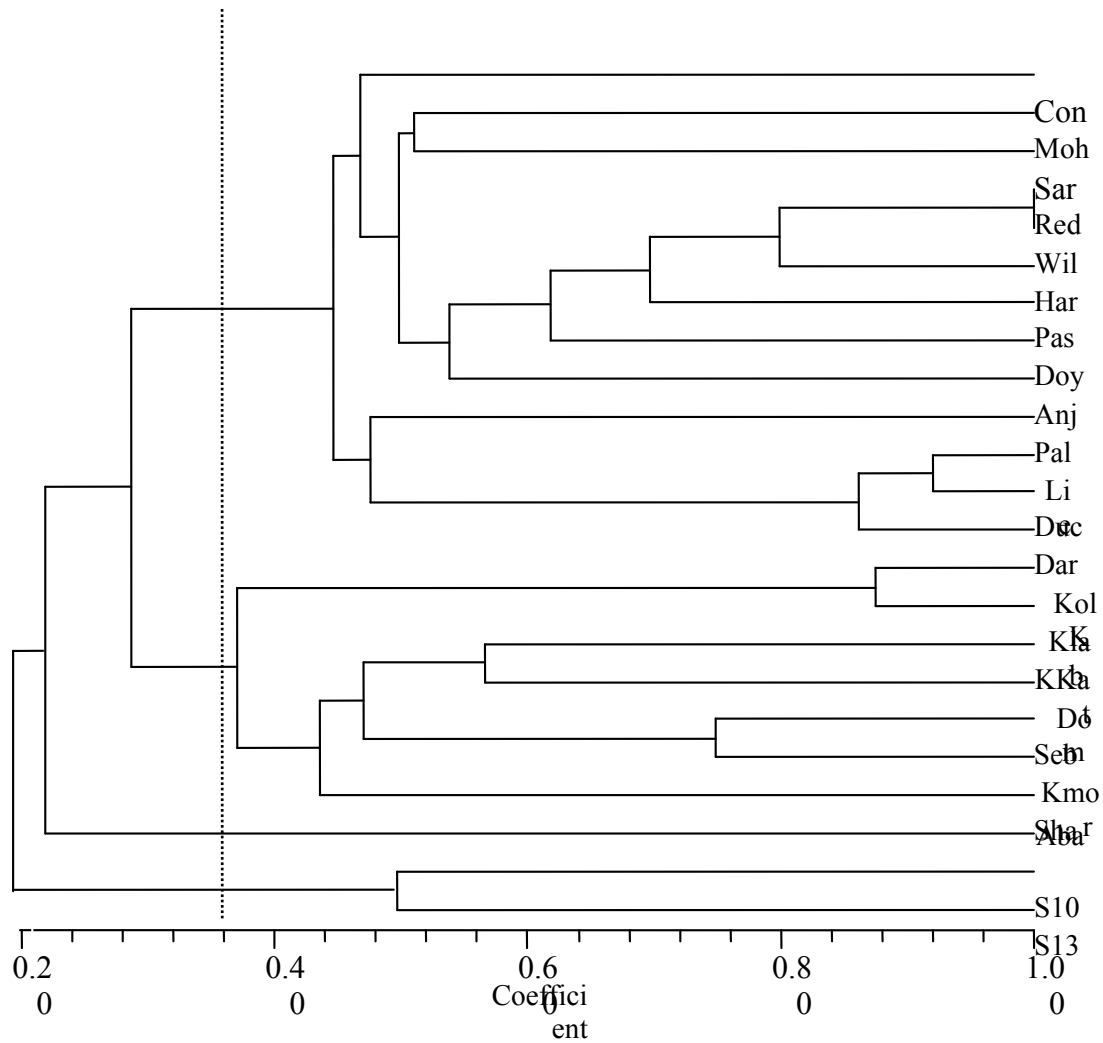
ارقام شاهمیوه، دم کج و سبری با ارقام وحشی خوج (خوج لب ترش، کولی خوج، خوج مرداب انزلی و خوج کته سر) در یک دسته قرار گرفتند که نشان داد احتمالاً این سه رقم تجارتي از ژنوتیپ های خوج ها، که در مناطق شمالی کشور پراکنده اند، مشتق شده اند و بعداً به قسمت مرکزی ایران وارد شده اند. سه رقم محمدعلی، سردرودی و دره گزی نزدیکی زیادی با ارقام اروپایی نشان دادند و در گروهی متفاوت از ارقام ایرانی قرار گرفتند. این یافته به تأیید این فرضیه کمک می کند که ارقام مزبور به احتمال زیاد با ارقام اروپایی اجداد مشترکی دارند. به علاوه ارقام محمدعلی و سردرودی نزدیکی قابل توجهی نشان دادند. با توجه به این که منشأ رقم سردرودی آذربایجان است، می توان احتمال داد رقم محمدعلی و سردرودی هر دو جزو ارقامی باشند که از ناحیه قفقاز وارد ایران شده اند.

آبت فتال به صورت مستقل از بقیه گلابی ها قرار گرفت.

همه ارقام غرب اروپا در دسته اول قرار گرفتند. حضور سه رقم ایرانی محمدعلی، سردرودی و دره گزی در این دسته نشان می دهد که این سه رقم نزدیکی زیادی با ارقام اروپایی دارند و به احتمال زیاد از اجداد مشترکی اشتقاق پیدا کرده اند. در این دسته بارتلت و ردبارتلت با شباهت کامل (ضریب تشابه یک) از هم تفکیک نشدند. رقم گلابی هراسویت نیز با اجداد خود بارتلت و ردبارتلت در یک زیردسته قرار گرفت. ژنوتیپ گلابی ایرانی دره گزی همراه با لوئیس بن و دوشس که ارقامی از فرانسه هستند به یک زیر دسته دیگر تعلق یافتند. ارقام محمدعلی و سردرودی نیز در مقایسه با دره گزی شباهت بیشتری به هم نشان دادند که به تأیید این فرضیه کمک می کند که آنها جد مشترکی دارند.

در دسته دوم ژنوتیپ های کولی خوج و خوج لب ترش از سایر ارقام ایرانی جدا شدند که شاید دلیلی بر زمینه ژنتیکی متنوع تر این دو رقم باشد. سایر خوج ها و ارقام تجارتي سبری، شاهمیوه و دم کج فاصله ژنتیکی کمتری از هم داشتند. سبری که به نظر عده ای جزو ارقام گلابی های آسیایی است (Sabeti, 2002; Maniee, 1995)، در دسته خوج ها قرار گرفته بود و به احتمال قوی متعلق به گونه *P. communis* است.

دسته سوم شامل دو رقم ژاپنی SK10 و SK13 از گونه *P. pyrifolia* بود. این دو رقم کاملاً از سایر ارقام که همگی متعلق به گونه *P.*



شکل ۳- دندروگرام ژنوتیپ های گلابی مورد بررسی بر اساس الگوهای بانندی ISSR، با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA. کد نمونه‌ها بر اساس جدول ۱-۲ انتخاب شده است

Figure 3- Phenogram for the 23 genotypes of pear evaluated in this study, using the UPGMA method and Dice Similarity Matrix between varieties. samples Code selected according to Table 1-2.

منابع

- Arnaud G, Lallemand J, Bourgoin M (2000). ISSR versus AFLP for variety identification. Plant and Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA. PP. 552.
- Atar A (2001). Specification of Europe and U.S. commercial cultivars of apple and pear. Publication of Agricultural Education 70P
- Bassil NV, Neou C and Postman J (2005). EST-SSR utility in managing the pear collection at the national germplasm repository. Plant and Animal genome XIII conference, San Diego, CA. pp. 134.
- Bassil NV, Postman JD, Neou C (2004). *Pyrus* microsatellite markers from gene bank sequences. Acta Horticulturae 671: 42.
- Bell RL (1990). Pears (*pyrus*) Genetic resources of temperate fruit and nut crops In: J. N. Moore and J. R. Ballington (Eds), I. International society for horticultural science, wageningen, the Netherland 665-697.
- Bell RL, Hough LF (1986). Interspecific hybridization of *pyrus.*, Horticultural science 21: 62-64.
- Bornat B, Branchard M (2001). Nonanchored inters simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.
- Chenneau-Kourda H, Marghali S, Marrakchi M, Trif-Farah N (2007). Genetic diversity of *sulla* genus (*Hedysarea*) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Biochemical Systematic and Ecology 35:682-688.
- Dolatowski J, Nowosielski J, Podyma W, Szymanska M, Zych M (2004). Molecular studies on the variability of polish semi-wild pears (*Pyrus*) using AFLP. Fruit Ornamental Plant Research 12: 22-26.
- Fernández-Fernandez F, Harvey NG, James CM (2006). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis*). Molecular Ecology Notes 6(4): 1036-1041.
- Ghosh AK, Lukens LN, Lukens DM, Hunter DM, Strommer JN (2006). European and Asian pears: simple sequence repeat-polyacrilamide gel electrophoresis-based analysis of commercially important North American cultivars. Horticultural Science 41: 304-309.
- Goulão L, Oliveira CM (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Iketani H, Manabe T, Matsuta N, Akihama T, Hayashi T (1998). Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). Genetic Resources and Crop Evolution 45:533-539
- Inoue E, Matsuki Y, Anzai H, Evans K (2007). Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Molecular Ecology Notes 7:445-447.
- Jianming G, Shougong Z, Liwang Q, Yong Z, Chunguo W (2006). ISSR and AFLP identification and genetic relationships accessions from the genus *Populus*. Annals of Forest Science 63: 499-506.
- JianXin N, Gany MB, Lizhong P, Jian Rong F, Yan LX (2004). Study on the genetic relationships among 18 pears cultivars by RAPD. Journal of Fruit Science 21: 521-525.

- Katti MV, Ranjeker RK, Gupta VS (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in Eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1161-1167.
- Kimura T, Ban Y, Yamamoto T, Shi YZ, Kotobuki K, Matsuta N, Hayash T (1999). The Japanese pear genome program I. Development of SSR markers and identification of pears. *Acta Horticulturae* 587: 237-242.
- Kimura T, Yamamoto T, Mochida K, Lmai T, Matsuta N, Ban Y, Hayashi T(2002). Development and mapping of SSR markers in peach and pear. *Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference, San Diego, CA.* 191-206.
- Maniee A (1995). Pear and Foster and their training. Technical publication of Iran 50p
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220
- Mezzena L, Paris A, Gimene M As, Bonine C, Valle CF(2001). Identification of ISSR (inter simple sequence repeat) codominant markers in *Eucalyptus grandis*. *Plant and Animal Genome IX Conference San Diego, CA.* P24.
- Monta-Corvo L, Caberita L, Leitao J (2000). Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47 : 257-265.
- Monte-Corro L, Goulão L, Oliveira C (2002). Discrimination of pear cultivars with RAPD, AFLP and ISSR. *Acta Horticulturae* 596: 187-191.
- Monte-corvo L, Goulão L , Oliveira C (2001). ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(5): 517-522.
- Murray GC and Thompson WF(1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Research.* 8: 4321-4325.
- Olivera CM, Mota M, Monte-Corvo L, goulão L, Silva DM (1999). Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae Amsterdam* 79: 163-174.
- Pan Z, Kawabata S, Sugiyama N, Sakiyama R, Cao Y (2002). Genetic diversity of cultivated resources of pear in north china. *Acta Horticulturae* 587: 187-194.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Roldan-Ruize I, Calsyn E, Gilliland TJ, Coll R, Vaneijk MJT, De Loose M (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding* 6:593-602
- Sabeti H (2002). Forests, trees, and shrubs of Iran. Pulpication of Tehran Research Center and Natural Resources.
- Sharifani, MM, Jackson JF (2000). Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers. *Acta Horticultrae* 538: 499-504.
- Singh, AK, Behera TK, Chandel D, Sharma P, Singh NK (2007). Assessing genetic relationships among bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of Horticultural and Science and Biotechnology* 82: 217-222.
- Vejdani M (1997). Importance of safeguarding procedures in the natural growth and its rolls in Preservation and Operation of Reserve plant inheritance. *Proceeding of the 4th Iranian Congress of Crop Science, Esfahan* pp 554-573.
- Wang JY, Shih JC (2004) Molecular for fingerprinting cultivar of oriental pear (*Pyrus pyrifolia* *Scientia Horticulturae Amsterdam* 107: 441-421.

- Wünsch A, Hormaza JI (2007). Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae Amsterdam* 113: 37-43.
- Wünsch A, Hormaza JI (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59-67.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Ban Y, Aayashi T, Matsuta N (2001). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 865-870.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Mastuta N (2002). Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica*, 124: 129-137.
- Ye G N, Hemmat M, Lodhi MA, Weeden NF and Reisch BI (1996). Long primers for RAPD mapping and fingerprinting of grape and pear. *Bio Techniques* 20: 368-371.

Determination of genetic diversity in pear genotypes using ISSR markers**Safarpour Shorbakhlo M.¹, Hosseini Monfared R.², Paydar S.¹, Sharifi M.*¹**¹Fars Agricultural and Natural Resources Research Center²Graduated students Islamic Azad University, Arsenjan Branch**Abstract**

Iran is known as one of the most important pear genetic resources because of being near to the pear diversity centers and having more than 10 species of genus *Pyrus*. On the other hand, Iran with acreage of 17,000 hectares, is one of the pear production centers. Despite its unique geographical location, there is no sufficient genetic information among pear germplasm in Iran and it is not clear what genetic relationship is between Iranian local genotypes and imported genotypes. In this study, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers was used for clustering of 10 Iranian Pear genotypes and positioning of their genetic variation among 13 imported genotypes. Fifteen ISSR primers were screened that yielded a total of 257 amplified products, of which 213 bands (81.6%) were polymorphic. Dendrogram of pear cultivars with ISSR banding patterns was drawn with NTSYS V. Pc-2.02e software using Dice coefficient and UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average), method. The 23 genotypes of pear were clustered in to three groups. The first group includes Conference, Mohammad Ali, Sardroudi, Bartlett, Red Bartlett, Harrow Sweet, Pass Crassane, Doyenneducomice, Anjou, Palestine, Lies Bonne, Duchesse and Daregazi. Kolikhaj, Sebri, Khuj labtorsh, Dom kaj, Khuj Katesar, Khuj Mordab Anzali and Shah Miveh belong to the second group. The third group includes SK10 and SK13. Cultivars were classified according to the geographical origin and the figures belonging to *P. communis* and *P. pyrifolia*, were completely separated. Iranian commercial cultivars including: Dom kaj, Shah miveh, Sebri with different Khuj accessions were placed in a group, that seems that they have originated from different Khuj. While the three cultivars: Mohammad Ali, Sard roudi and Daregazi revealed closer to the European figures and possibility they have different origin than different Khuj And have a common ancestor with European figures. The results of this study indicate that ISSR markers have higher level of discrimination in evaluating genetic diversity and fingerprinting of pear genotypes.

Keywords: Genetic diversity, ISSR markers, Pear.

* Corresponding Author: Sharifi M.

Tel: 07124222425

Email: sharifi_m2002@yahoo.com