ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیلاس ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

افسانه سادات فرساد[۱]، محمود اثنی‌عشری[۲] و احمد ارشادی[۳]

چکیده

تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم مهم گیلاس ایرانی مورد نظر در برنامه‌های به‌نژادی به همراه سه رقم آلبالوگیلاس، یک رقم آلبالو و پنج رقم گیلاس خارجی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از برگ‌های جوان گیلاس با روش دویل و دویل (۱۹۸۷) با اندکی تغییرات انجام شد و DNA حاصل با استفاده از ۱۶ جفت آغازگر ریزماهواره تکثیر گردید. محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ دارای اوره ۷ مولار و تحت شرایط واسرشتگی تفکیک شدند و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره قابل رویت گردیدند. الگوی باندها بر اساس حضور یا عدم حضور باند با اعداد یک و صفر نمره‌دهی شد و محتوای اطلاعات چندشکلی برای هر جفت نشانگر محاسبه گردید و میانگین چندشکلی معادل ۰/۶۵ برآورد شد. تعداد آلل‌ها در جایگاه از ۹-۶ متغیر بود و در مجموع ۱۲۳ آلل شناسایی شدند. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها بر اساس ضریب تشابه ژاکارد و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS محاسبه و روش تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی استفاده شد. بر اساس دندروگرام حاصله، ۲۹ رقم مورد مطالعه در ۵ گروه قرار گرفتند که نشان دهنده وجود تنوع زیاد در بین ارقام مورد آزمایش بود، به طوری‌که ارقام گیلاس ایرانی در گروه‌هایی متفاوت از ارقام خارجی قرار گرفتند که تایید کننده تفاوت زیاد گیلاس‌های ایران با گیلاس‌های خارجی و منحصر به فرد بودن آن‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیلاس، نشانگر ملکولی، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره

Archive of SID

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲ و ۳. به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

www.SID.ir

مقدمه

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گیلاس در کشور ایران به دلیل قرار گرفتن در حوزه جغرافیایی خاص این محصول، از اهمیت زیادی برخوردار است (۳). اکثر ارقام گیلاس خودناسازگارند، از این رو در مقایسه با ارقام خودسازگار تنوع ژنتیکی بیش‌تری نشان می‌دهند (۲). از نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام گیلاس استفاده شده است. نشانگرهای مولکولی آیزوزایمی به دلیل نشان دادن چندشکلی پایین، تنوع زیادی در بین ارقام گیلاس نشان نمی‌دهند (۱۴). در ایران بوذری (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی ارقام بومی گیلاس را به منظور انتخاب والدین مناسب جهت برنامه‌های به‌نژادی با استفاده از تکنیک ایزوآنزیم بررسی کرد و کارایی آن را در این زمینه به اثبات رساند (۱).

واربرتون و بلیس (۱۹۹۶) نشان دادند که نشانگر مولکولی RAPD[1] به دلیل تکرارپذیری کم، کاربرد محدودی در شناسایی ارقام گیلاس داشته‌است (۱۷). سیپریانی و همکاران (۱۹۹۹) روشن ساختند که یکی از قابل اطمینان‌ترین مارکرهای مولکولی، ریزماهواره‌ها هستند که به دلیل سطوح بالای چندشکلی، صحت و دقت بالا و تکرار پذیری زیاد، به‌طور وسیعی برای شناسایی ارقام و تهیه نقشه‌های ژنتیکی درختان میوه استفاده می‌شوند (۷). ریزماهواره‌ها یا توالی‌های کوتاه تکراری (SSR)[2] از جمله نشانگرهای مولکولی هم‌بارز و چندآللی هستند که در ژنوم موجودات به‌طور فراوان یافت می‌شوند (۱۱، ۱۶). داونی و لزونی (۲۰۰۰) و سانتینی و همکاران (۲۰۰۱) با توجه به کارایی ریزماهواره‌ها آن‌ها را به‌عنوان نشانگرهای مناسب در گیلاس معرفی کردند (۶، ۹). دیرلوانگر و همکاران (۲۰۰۲) نشانگرهای ریزماهواره را برای ارقام هلو طراحی و کاربرد آن‌ها را در تعیین تنوع ژنتیکی ارقام هلو و گیلاس بررسی کردند (۸). شولر و همکاران (۲۰۰۳) کارایی نشانگرهای SSR طراحی شده برای هلو را جهت شناسایی ارقام وحشی و اهلی گیلاس به اثبات رساندند (۱۲). استراس و همکاران (۲۰۰۳) تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گیلاس را با کاربرد نشانگرهای SSR و AFLP[3] مورد مطالعه قرار دادند (۱۳).

ووقان و راسل (۲۰۰۴) نشانگرهای SSR جدیدی را برای شناسایی ارقام گیلاس وحشی و مطالعه جمعیت آن‌ها به‌کار بردند (۱۵). در این پژوهش از نشانگرهای SSR به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۹ رقم مختلف گیلاس (که ۲۰ رقم آن‌ها ایرانی بودند)، تعیین چندشکلی موجود در بین ارقام و هم‌چنین تعیین فاصله ژنتیکی و خویشاوندی آن‌ها استفاده و کارایی این نشانگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام استفاده گردید. نتایج این گونه پژوهش‌ها می‌تواند در برنامه‌ریزی پروژه‌های به‌نژادی گیلاس و تولید ارقام تجاری مناسب و گسترش سطح باغات این محصول مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری برگ‌های جوان ۲۹ رقم گیلاس مختلف (اسامی ارقام در جدول ۱ آورده شده است) از باغ کلکسیون کمال آباد وابسته به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام گردید. پس از ثبت مشخصات، نیم گرم از هر نمونه گیاهی به‌طور جداگانه به وسیله ازت مایع منجمد شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰°C- نگه‌داری شد.

از روش دویل و دویل (۱۰) جهت استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی استفاده گردید. بر اساس روش فوق نمونه‌ها در حضور ازت مایع پودر شدند و سپس به میزان ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج که محتوی ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCLpH 8.0، ۲۰ میلی-مولار EDTA pH8.0، ۱/۴ مولار NaCL، نیم درصد (V/V) β- Mercaptaethanol، ۲ درصد (W/V) PVP40 و ۱/۲ درصد (W/V) CTAB بود به آن‌ها اضافه گردید و به مدت سه دقیقه به صورت وارونه در حمام آبگرم ۶۵°C تکان داده شد تا کاملاً مخلوط گردد. جهت استخراج DNA از مخلوط کلروفورم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ استفاده گردید. برای این منظور نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ

1. Random Amplified Polymorphic DNA
2. Simple Sequence Repeates
3. Amplified Fragment Length Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

شدند. DNA به دست آمده با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگه‌داری گردید تا خشک شود، سپس در بافر TE با حجم مناسب حل گردید. اندازه‌گیری کمی غلظت DNA هر نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر تحت تابش اشعه فرابنفش با طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد و سپس با آب مقطر استریل در حدود ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم گردید.

تکثیر ریزماهواره‌ها

هشت جفت از آغازگرها که شامل آغازگرهای گروه BPPCT هستند از کتابخانه غنی شده ژنومی ارقام هلو انتخاب گردیدند (۸). هفت جفت از آغازگرها یعنی آغازگرهای گروه UCD-CH از کتابخانه فاژی DNA ژنومی ارقام گیلاس انتخاب (۱۳) و شش جفت آغازگر گروه (EMPA) از کتابخانه DNA ژنومی Prunus avium، انتخاب شدند (۱۵). ساخت آغازگرها که دارای چندشکلی نسبتاً بالایی بودند توسط شرکت آلمانی (MWG) صورت پذیرفت. برای حل کردن آغازگرها و ساخت محلول ذخیره ۱۰۰میلی‌مولار، مقدار لازم بافر TE مطابق توصیه شرکت سازنده به آن‌ها اضافه شد و سپس توسط آب دوبار تقطیر تا ۵ میلی‌مولار رقیق شدند. جدول ۲ مشخصات جفت آغازگرهای استفاده شده را نشان می‌دهد.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR به دلیل انتخاب سه گروه آغازگر، با استفاده از سه پروتوکل مختلف انجام گردید. واکنش PCR مربوط به آغازگرهای گروه BPPCT، در حجم ۱۵ میکرولیتر مطابق پروتوکل دیرلوانگر و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت (۸). مقدار ۲۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ میکرو مولار از هر یک از آغازگرها با ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۷ واحد DNA پلیمراز و بافر تجاری 10x مخلوط گردید و پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی استریل به هر نمونه به دستگاه ترموسایکلر اپندورف ساخت کشور آلمان منتقل گردید. دستگاه مذکور به این ترتیب برنامه‌ریزی شده بود که واسرشت سازی اولیه (Denaturing) در آن در یک چرخه یک دقیقه‌ای در ۹۴ºC انجام شود. متعاقب آن، واسرشت سازی ثانویه شامل ۳۵ چرخه به مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴ºC، اتصال آغازگرها به رشته DNA (Annealing) به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۷ºC، بسط قطعات DNA سنتز شده (Extention) به مدت دو دقیقه در ۷۲ºC و نهایتاً یک چرخه بسط به مدت چهار دقیقه در ۷۲ºC به‌وسیله دستگاه انجام گردید.

واکنش PCR مربوط به آغازگرهای گروه UCD-CH، در حجم ۱۲ میکرولیتر مطابق پروتوکل استراس و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت (۱۳). PCR مربوط به آغازگرهای گروه EMPA، در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر مطابق پروتوکل ووقان و همکاران (۲۰۰۴) انجام گرفت (۱۵). در مورد این گروه از آغازگرها از Touchdown PCR استفاده گردید (۱۵). شیب دمای اتصال مناسب برای آغازگرها در جدول ۲ ذکر شده است. پنج میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با پنج میکرولیتر بافر بارگذاری محتوی Formamide (۹۵ درصد)، Bromophenolblue (۰/۵ درصد) و Xylenecyanol (۰/۵ درصد) به‌علاوه ده میلی‌مولار EDTA مخلوط شد. سپس پنج میکرولیتر از هر نمونه در چاهک ژل بارگذاری شد. ژل مورد استفاده پلی اکریل آمید ۶ درصد واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بود که به همراه نمونه‌ها به مدت دو ساعت با ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت الکتروفورز گردید. نهایتاً از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (۴) جهت رویت قطعات DNA در ژل استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری (نمره‌گذاری آلل‌ها و ارزیابی چندشکلی)

حضور و یا عدم حضور هر باند با امتیاز دهی یک و صفر به‌عنوان الگو در نظر گرفته شد و تجزیه خوشه‌ای توسط نرم افزار NTSYS-pc2.02 انجام گردید. سپس دندروگرام حاصل بر اساس روش UPGMA ترسیم شد. شاخص تنوع (PIC)[1] هر یک از جایگاه‌ها با استفاده از فرمول بوستین و همکاران ($PIC = 1 - \sum Pi^2$) محاسبه شد (۵). در فرمول مذکور pi فراوانی iامین آلل

1.Polymorphic Information Content

Archive of SID

www.SID.ir

برای نشانگر i است که برای n آلل تعمیم داده می‌شود. چندشکلی قطعات ریزماهواره در مکان ژنی BPPCT002 در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

نتایج و بحث

از ۲۱ جفت آغازگر به کار رفته در این پژوهش تنها ۱۶ جفت آغازگر قادر به تولید محصول مورد نظر بودند و پنج جفت آغازگر باقیمانده به دلایل مختلف احتمالی مانند متفاوت بودن توالی‌های احاطه‌کننده جایگاه‌ها (Flanking region) در یک یا دو جایگاه اتصال آغازگر نتوانستند مکان ژنی مورد نظر را تکثیر کنند. در ۲۹ رقم مورد مطالعه در این پژوهش ۱۲۳ باند تکثیر شد. تعداد آلل‌ها بین ۶- ۹ متغیر بود (جدول ۱). بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده‌شده مربوط به مکان‌های ژنی BPPCT002، BPPCT039، BPPCT040، UCD-CH39 و UCD-CH12 بود. بیش‌ترین میزان PIC مربوط به مکان ژنی UCD- CH39 و معادل ۰/۸۶۲۸ بود. ارقام مجتهدی، حاج یوسفی، زرد دانشکده، صورتی همدان و آلبالوگیلاس ۱۹ نیز بیش‌ترین هتروزیگوسیتی را به خود اختصاص دادند. شاخص شانون (I) در بین ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای بین ۰/۱۶۶۷ تا ۰/۵۰۰۰ و میانگین ۰/۴۵۸۳ داشت. گروه‌بندی ارقام با استفاده از نرم افزار NTSYS و به کمک روش‌های تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم دورترین همسایه و ضریب تشابه ژاکارد انجام شد.

ضریب همبستگی کوفنتیک بالای به‌دست آمده به کمک روش تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه ژاکارد (۰/۸۵) نشان دهنده کارایی نسبی این روش برای گروه‌بندی ارقام بود. برای بررسی این نمودار (شکل۲) خط قطع از حدود ۷۳٪ تشابه رسم شد که نتیجه آن ایجاد ۵ گروه بود. مشاهده فقط دو آلل در ارتباط با ارقام گیلاس ایرانی ثابت نمود که کلیه ارقام دیپلویید هستند. آلبالوها و آلبالوگیلاس‌ها تتراپلویید بوده و در گروهی مجزا از ارقام دیپلویید مورد بررسی قرار گرفتند. آلبالوگیلاس‌ها به استثنا آلبالوگیلاس ۱۹ (یا به دلیل اشتباه نام‌گذاری آن در کلکسیون میوه کمال‌آباد و یا عدم توانایی مکان‌های ژنی بررسی شده در شناسایی رقم فوق‌الذکر) همه در یک گروه یکسان قرار گرفتند. ارقام گیلاس خارجی هدیلفینجن، لامبرت و اس کا ۱ در یک گروه قرار گرفتند. ارقام بینگ و اس کا ۵ نیز یک گروه مجزا را تشکیل دادند. رقم آلبالوگیلاس ۱۹ به دلیل داشتن ژنوتیپ دیپلویید در کلیه مکان‌های ژنی بررسی شده در کنار ارقام گیلاس خارجی قرار گرفت. احتمالاً این رقم گیلاس بوده و اشتباها آلبالوگیلاس نام‌گذاری شده‌است. لازم به ذکر است که رقم صورتی لواسان با هیچ‌یک از آغازگرهای بررسی شده به دلیل تخریب DNA آن طی مراحل استخراج تکثیر نشان نداد و از نمودار تنوع ژنتیکی (شکل۲) حذف گردید.

تعداد آلل‌های مشخص شده در مکان‌های ژنی ریزماهواره از ۹-۶ آلل متغیر بود که این امر به احتمال زیاد به دلیل درصد بالای خودناسازگاری گیلاس و دگرگرده‌افشانی در آن‌ها می‌باشد که منجر به ایجاد یک تنوع بالای ژنتیکی در گیلاس‌های اولیه شده‌است. ارقام و سلکسیون‌های مورد بررسی بر خلاف ارقام اروپایی و آمریکایی حاصل تلاقی‌های کنترل شده بین چند رقم محدود گیلاس تجارتی نبوده و عمدتاً از گرده‌افشانی آزاد به‌دست آمده‌اند که این امر می‌تواند دلیلی بر تنوع ژنتیکی بیش‌تر در این ارقام باشد و می‌توان از آن‌ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به‌منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. این بررسی به‌خوبی نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره ابزار ایده‌آلی برای ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی جمعیت‌ها می‌باشند. هر چند که ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی با استفاده از تعداد زیاد نشانگرها همراه با صفات مورفولوژیک تحقق می‌یابد، با وجود این نتایج نشان دادند که مجموعه نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش برای اهدافی نظیر ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی جمعیت‌های گیلاس سودمند بوده و هم‌چنین می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری و هم‌نام کارآمد باشند. در نهایت با تعیین ژنوتیپ و اثر انگشت گیاهان با نشانگرهای ریزماهواره علاوه بر حفظ حقوق اصلاح‌گران نباتات، می‌توان از تبادلات برون مرزی این ذخایر ارزشمند و استفاده‌های غیرقانونی از منابع ژنتیک ملی کشور جلوگیری نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: ارقام گیلاس استفاده شده در پژوهش

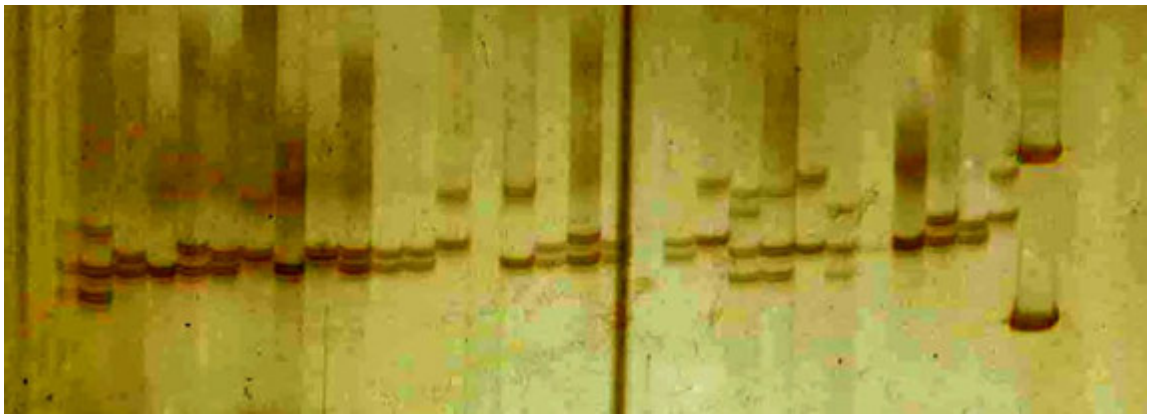
ردیف	رقم	ردیف	رقم	ردیف	رقم
۱	مجتهدی	۱۱	سیاه دانشکده	۲۱	اس کا ۱ (سانبرست)
۲	حاج یوسفی	۱۲	سیاه قزوین	۲۲	اس کا ۵ (سابیما)
۳	شعاع السلطنه	۱۳	صورتی لوسان	۲۳	لامبرت
۴	اراک	۱۴	همدان	۲۴	بینگ
۵	سیاه مشهد	۱۵	سفید رضاییه	۲۵	هدیلفینجن
۶	ابرده	۱۶	صورتی همدان	۲۶	آلبالوگیلاس شماره ۱۹
۷	سیاه زودرس	۱۷	گیلاس ۴۶	۲۷	آلبالوگیلاس دانشکده
۸	شبستر	۱۸	گیلاس ۲۸	۲۸	آلبالوگیلاس بلغاری
۹	شاملو	۱۹	قرمز بلغاری	۲۹	آلبالو (رقم مونت مورینسی)
۱۰	زرد دانشکده	۲۰	رافت		

جدول۲: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در پژوهش

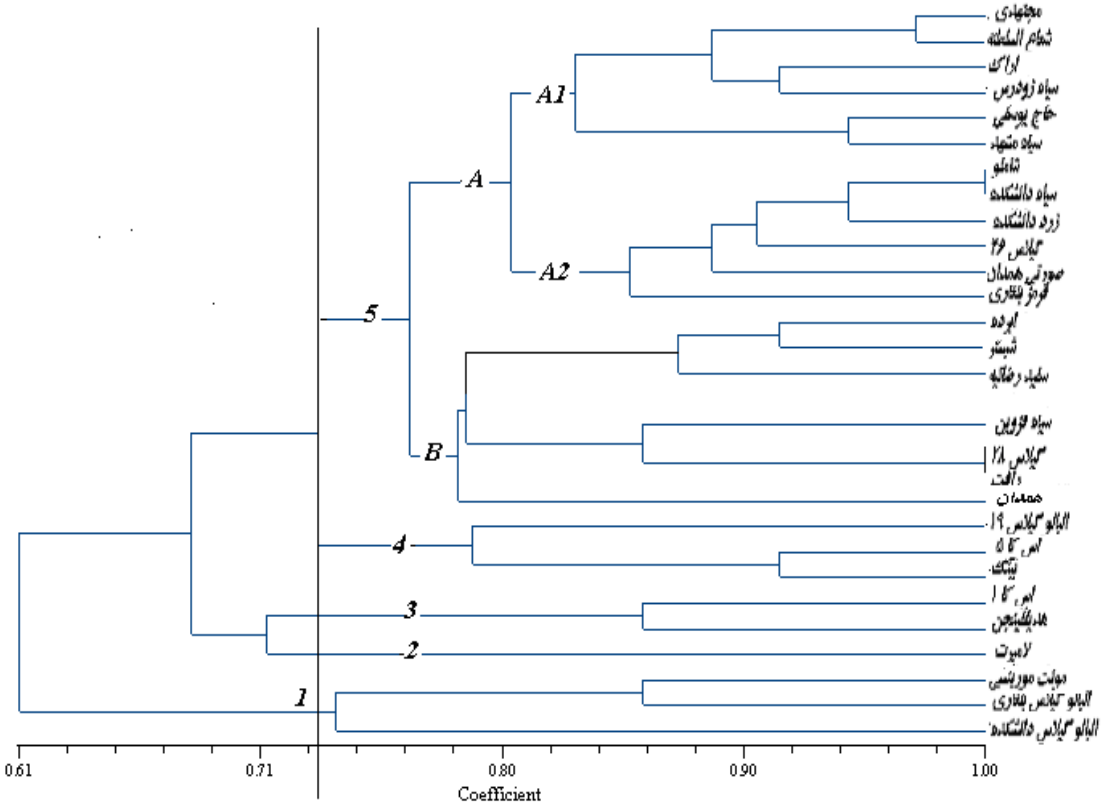
آغازگر	تعداد آلل	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)	دمای اتصال مناسب برای آغازگرها (سانتی گراد)
BPPCT002	۹	۰/۸۲۶۴	۶۳
BPPCT005	۸	۰/۴۹۴۸	۵۷
BPPCT026	-	-	-
BPPCT034	۷	۰/۶۷۵۹	۵۷
BPPCT037	-	-	-
BPPCT038	-	-	-
BPPCT039	۹	۰/۶۷۸۰	۵۴
BPPCT040	۹	۰/۶۱۰۶	۴۹
EMPA004	۷	۰/۶۵۴۱	۶۱
EMPA005	۶	۰/۵۶۴۱	۶۱
EMPA015	۷	۰/۴۰۲۴	۶۲
EMPA018	۷	۰/۷۹۷۱	۶۲
EMPaS01	۷	۰/۵۷۳۵	۶۲
EMPaS02	۶	۰/۵۰۷۷	۶۲
UCD-CH11	۸	۰/۸۰۰۰	۵۶/۷
UCD-CH12	۹	۰/۸۲۸۱	۶۰/۵
UCD-CH18	-	-	-
UCD-CH21	-	-	-
UCD-CH31	۸	۰/۷۵۶۳	۶۰/۵
UCD-CH36	۷	۰/۷۵۶۳	۶۰/۵
UCD-CH39	۹	۰/۸۶۲۸	۶۰/۵

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: چند شکلی قطعات ریزماهواره در مکان ژنی BPPCT002



شکل ۲: نمودار تنوع ژنتیکی بر حسب ضریب ژاکارد و روش UPGMA

www.SID.ir

منابع

بوذری، ن. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بومی گیلاس به‌منظور انتخاب والدین مناسب جهت برنامه‌های به‌نژادی. پایان‌نامه دکترای، باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات.

بی‌نام، آمارنامه کشاورزی ایران. ۱۳۸۳. انتشارات وزارت کشاورزی.

رسول‌زاده‌گان، ی. ۱۳۷۰. میوه‌کاری در مناطق معتدله. (ترجمه). چاپ اول، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان. ۷۵۹ صفحه.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P. T. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196: 80-83.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.

Cantini, C., Iezzoni, A. F., Lamboy, W. F., Boritzki, M. and Struss, D. 2001. DNA Fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:205-209

Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E. and Testolin, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeates in peach (*Prunus persica*) : Isolation, characterization and cross-species amplification in Prunus. *Theor .Appl. Genet*. 99:65-72.

Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P. and Laigret, F. 2002. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theor. Appl. Genet.* 105:127-138.

Downey, S. L. and Iezzoni, A. F. 2000. Polymorfic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:76-80

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. Rapid DNA isolation procedur for small quantities of fresh leaf tissue. *Phtichemecal Bulletin* 19 : 11-15.

Morgante, M. and Olivieri, A. M. 1993. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J*. 3: 175-179.

Schueler, S., Tusch, A., Schuster, M. and Ziegenhagen, B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) markers for indivigual identification and reproductive processes. *Genome.* 46(1) : 95-102.

Struss, D., Ahmad, R. and Southwick, S. 2003. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *J. Amer.Soc. Hort. Sci*.128(6) : 904-909.

Tobutt, K. R. and Boskovic, R. 1996. A cherry gene database. *Acta. Hort* . 410: 147-153.

Vaughan, S. P. and Russell, K. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *(Prunus avium). Molecular Ecology Notes*. 141:429-431.

Wang, Z., Weber, J. L., Zhang G. and Tanksley, S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet*. 88: 1-6.

Warburton, M. L. and Bliss, F. A. 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding co-efficient. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 121:1012-1019.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessment of Genetic Diversity of Iranian Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Genotypes Using Micro-Satellite Markers

FARSAD[1], A., ESNA-ASHARI[2], M. and ERSHADI[3], A.

Abstract

Genetic diversity of 20 important Iranian sweet cherry cultivars considerable for breeding programs, together with 3 sour-sweet cherry, 1 sour cherry and 5 foreign sweet cherry cultivars were studied using micro-satellite markers. Extracted genomic DNA from sweet cherry young leaves was used for PCR and amplification. Amplified products were separated using 6% polyacrylamide gel containing 7M urea under denaturing conditions and visualized by staining with silver nitrate. Gels were then scored based on either the presence or absence of the bands, and polymorphism information content (PIC) for each SSR marker was determined. The number of alleles per locus ranged from 6 to 9 and totally 123 alleles were identified. Genetic diversity of cherry cultivars was estimated using NTSYS software program based on the Jaccard Similarity coefficient which was considered for cluster analysis. Cluster analysis placed the 29 cultivars in five groups, showing a high diversity between the cultivars, so that the Iranian sweet cherries were alighted quite different from the foreign cherries. Foreign cherries were grouped in different branches so other sour cherry and sour-sweet cherries.

Keywords: Sweet Cherry, Molecular markers, Genetic diversity, Micro-satellite

Archive of SID

1. Postgraduate student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan
2 & 3. Associate and Assistant Professors respectively, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan

www.SID.ir