مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۲ شماره ۱ صفحه های ۳۹ تا ۵۲ (۱۳۹۰)

بررسی تنوع ژنتیکی نژادگان های آلو با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD [۱]

GENETIC DIVERSITY AMONG PLUM GENOTYPES USING RAPD MOLECULAR MARKERS

مهدی آران، محمدرضا فتاحی مقدم و ذبیح اله زمانی[۲]

چکیده

در ایران آلو و گوجه از مهمترین پایه های بذری مورد استفاده برای درختان میوه هسته دار محسوب می‌شوند که به نظر می رسد دارای تنوع بالایی بوده و درختان پیوند شده روی این پایه ها یکنواختی لازم برای مدیریت مناسب را نداشته باشند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی۷۲ نژادگان آلو توسط نشانگرهای ملکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. ۲۲ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۲۲٤ باند تولید کردند که از بین آن ها ۲۰۵ باند در بین نژادگان ها چند شکل بودند و ۱۹ باند دیگر در بین نژادگان‌ها یک شکل[۳] بودند. بیشترین تعداد باندهای تولیدی ۱۷ عدد و به وسیله آغازگر BD04 و بیشترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگرهای BB03، BB05، BB08، BD04، BD05، BD11، BD13، BD15، BD17 و BD18 با میزان ۱۰۰٪ بود. میانگین درصد چند شکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۸۹/۰۳۷٪ بود. مجموع قدرت تفکیک (Rp) آغازگرها ۹۲/۱٦ بود و هر آغازگر به طور میانگین قدرت تفکیک ٤/۱۹ نشان دادند. بر اساس نتایج به دست آمده از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی بین دو نژادگان تنسگل (دورگه احتمالی آلو در زردآلو) و S4-13 (۰/۲۳) و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین نژادگان های S11-25 و S11-26 (۰/۷۸) مشاهده شد. میانگین تشابه بین کل نژادگان های مورد بررسی ۰/۵۵ بود. در تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA در حد تشابه ۰/۵۸ نژادگان های مورد بررسی به ۱۳ گروه تقسیم شدند. در فاصله تشابه ۰/۲۹ نژادگان تنسگل از بقیه نژادگان ها جدا شد و در یک شاخه مستقل قرار گرفت. نتایج تنوع به نسبت بالای مولکولی بین نمونه‌های آلوی مورد بررسی را نشان داد.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، آلو، نشانگرهای ملکولی RAPD، ماتریس تشابه، تجزیه کلاستر.

مقدمه

آلو متعلق به تیره Rosaceae، زیر تیره *Pronoidea*e و جنس *Prunus* می باشد. جنس پرونوس شامل بیش از ٤۰۰ گونه است (٤) که به لحاظ اقتصادی برای تولید میوه تازه، خشکبار، روغن، چوب و همچنین به عنوان گیاه زینتی برای استفاده در فضای سبز اهمیت دارد (۲). گونه هایی از این جنس که برای تولید میوه و خشکبار مورد استفاده قرار می گیرند شامل هلو، زردآلو، گیلاس، آلبالو، بادام و آلو می باشند. از گونه های دیگر این

۱- تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۳

۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه تهران و مربی فعلی دانشگاه زابل و دانشیاران(Fattahi@ut.ac.ir) گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه تهران، تهران، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Monomorph

www.SID.ir

جنس آلوی 'میروبالان' (*Prunus cerasifera* Ehrh.) و 'محلب' (*Prunus mahaleb* L.) می باشند که بیشتر به عنوان پایه برای جنس *Prunus* استفاده می شوند (۵)

بنا بر نظر پژوهشگران مختلف ۴۰-۲۰ گونه آلو وجود دارد که بیشتر آن ها گونه های وحشی هستند (۱۵). آلوی ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.)، آلوی 'میروبالان' (*Prunus cerasifera* Ehrh) و آلوهای آمریکایی به صورت دوگان (۲n=۲x=۱۶) و در مقابل *Prunus spinosa* L. چهارگان (۲n=۴x=۳۲) و گونه های اروپایی عموما ششگان (۲n=۶x=۴۸) هستند (۱۹).

آلو به طور گسترده در مناطق معتدله جهان کشت می شود. در ایران آلو و گوجه از مهمترین پایه های بذری مورد استفاده برای درختان میوه هسته دار محسوب می‌شوند که به نظر می رسد دارای تنوع بالایی بوده و درختان پیوند شده روی این پایه ها یکنواختی لازم برای مدیریت مناسب باغ را نداشته باشند. اغلب رقم های آلوهای ژاپنی و اروپایی همانند آلو و گوجه های بومی ایران حتی در نواحی نیمه گرم و مرطوب شمالی (گرگان و مغان) با تابستان های گرم و زمستان های معتدل نیز سازش خوبی دارند. کشت آلو و گوجه از ارتفاع صفر تا ۱۶۰۰ متری از سطح دریا در مناطق نیمه گرمسیری، معتدله شمالی و جنوبی رشد مطلوبی نشان داده است.

سطح زیر کشت آلو و گوجه در ایران در سال ۲۰۰۷ (۱۳۸۶) حدود ۱۴۵۰۰ هکتار بود که از آن ها حدود ۱۴۷۰۰۰ تن میوه برداشت شده است. مقدار تولید آلو و گوجه در دنیا در سال ۲۰۰۷ حدود ۹۷۱۹۴۵۱ تن بود که ایران در بین کشورهای تولید کننده دارای مقام ۱۱ بوده است (۶).

آلوها به دامنه بسیار وسیعی از شرایط خاک و به عنوان پایه سازگار هستند (۳). آلوی ژاپنی و آلوهای هگزاپلوئید (*Prunus domestica*) به طور عمده برای تولید میوه به کار می روند اما بسیاری از آن ها به عنوان پایه برای به تقریب همه گونه های *Prunus* به جز گیلاس و آلبالو قابل استفاده می باشند. در بین آلوها، 'میروبالان' در سال های اخیر بیشتر به عنوان پایه استفاده شده است. بیشتر آلوهایی که روی دانهال‌های 'میروبالان' پیوند شده اند دارای سازگاری خوب بوده و شروع باردهی آنها ۶-۲ سال بعد از پیوند می باشد (۱۱). عملکرد پایین در ارقام پیوند شده روی دانهال‌های 'میروبالان' از معایب اصلی این پایه می باشد (۸، ۱۸). دانهال‌های 'میروبالان' پایه مناسبی برای کشت باغ های متراکم آلو نیستند. پایه های جدید باید اندازه درخت را کاهش داده، باردهی زودهنگام را تحریک و باعث تولید مقدار میوه مناسب و با کیفیت مطلوب شوند (۱۱).

نتایج پژوهش ها فواید بعضی از پایه های همگروهی را نشان می دهد. در اوکراین عملکرد آلوهای پیوند شده روی پایه های برومپتون، GF677 و GF655/2 حدود دو برابر بیشتراز دانهال‌های میروبالان بوده است. در لهستان آلوهای پیوند شده روی دانهال‌های آلوی Wangenheim یا پایه های کلونی سنت جولین[1] A، Eruni، GF655/2 و پیکسی قدرت رشد کمتر و کارایی عملکرد بالاتری نشان داده اند (۸). مطالعات مولکولی انجام شده روی آلو در مناطق مختلف دنیا سطوح مختلفی از تنوع ژنتیکی را نشان می دهد.

هند و همکاران (۱۰) تنوع ژنتیکی بین ۲۷ رقم آلو از ۴ منطقه تونس شامل ۲۵ رقم محلی و ۲ رقم تجاری را با استفاده از نشانگرهای ملکولی RAPD مورد ارزیابی قرار دادند که بر اساس تجزیه کلاستر گونه های *P. saliciana* و دورگه هایی از *P. cerasifera*، *P. americana* و *P. simonii* متمایز شدند و پراکنش رقم های مستقل از منشاء جغرافیایی آن ها بود. لیو و همکاران (۱۳) تنوع ژنتیکی ۱۰۸ توده شامل *Prunus salicina*، *P. simonii*، *P. ussuriensis*، *P. domestica*، *P. cerasifera*، *P. nigra*، *P. spinosa*،

۱- St. Julien

www.SID.ir

P. armeniaca و *P. tomentosa* را به وسیله نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار دادند. در آنالیز کلاستر به روش UPGMA چهار گروه اصلی شامل آلو × زردآلو، آلوهای ژاپنی، آلوهای اروپایی و گونه های دیگر مشخص شدند. آلوی کانادایی (*P. nigra*) و Wanhei (یک آلوی اروپایی که نام اصلی آن مشخص نیست) از نمونه های دیگر آلو جدا شدند.

کیا و همکاران (۱۷) تنوع ژنتیکی ٥٦ نژادگان آلو (٥٤ نژادگان ژاپنی و ۲ نژادگان اروپایی) را با استفاده از ٢٤ آغازگر RAPD، ۱۰ آغازگر ISSR و ۲۱ جفت آغازگر SSR استخراج شده از گونه های دیگر *Prunus* مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش ۲۰۱ باند RAPD، ۸۳ باند ISSR و ۱۰۲ آلل SSR به دست آمد. بر اساس داده های نشانگرهای فوق، دندروگرام نژادگان ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ترسیم که به طور کامل آلوهای اروپایی و ژاپنی را تفکیک نمود. ترکیبی از سه نشانگر روش مناسبی برای تعیین تنوع ژنتیکی در آلو بود. لیسک و همکاران (۱۲) تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم آلوی اروپایی انتخاب شده را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی از ۷۷ آغازگر RAPD، ۳۷ آغازگر و از ۳۱ آغازگر ISSR ۲۷ آغازگر چندشکلی نشان دادند. نتایج به دست آمده مناسب بودن هر دو تکنیک را برای شناسایی رقم های آلو تایید کرد.

با توجه به این که ایران دارای نمونه های وحشی و بومی آلو می باشد بنابراین در این پژوهش سعی شده است برخی از نمونه های آلو جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور مورد بررسی مولکولی و مرفولوژیکی قرار گیرد.

مواد و روش ها

از بین ٥٦٠ دانهال موجود در مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران که از نهالستان های مختلف جمع آوری شده بودند، ۳۵ دانهال که دارای ویژگی های مرفولوژیک برتر از نظر استفاده پایه بودند جهت انجام آزمایش RAPD انتخاب شدند. در این دانهال‌ها ویژگی های مورفولوژیکی از سال دوم تا چهارم رشد اندازه گیری شد که همبستگی بین داده های مورفولوژی و RAPD نیز در این ۳۵ دانهال مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعداد ۳۵ نمونه دیگر بذری آلو که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است به همراه رقم های شاهد قطره طلا و تنسگل برای این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱).

استخراج DNA از نمونه های برگی و با استفاده از روش موری و تامسون (١٤) با تغییرهای اندک (اضافه شدن ۲٪ PVP) صورت گرفت. سپس غلظت یکسان از نمونه ها (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) تهیه شد. در این پژوهش از بین ۱۲۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی سری TibMolBiol که روی دو نژادگان با ویژگی های ظاهری متفاوت مورد آزمایش قرار گرفتند، تعداد ۱۸ آغازگر که توانستند باندهای چندشکل و پایدار تولید کنند، برای کلیه نژادگان ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

هر مخلوط واکنش PCR شامل ۲۰ نانوگرم DNA، ۱/٥ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۱۰μM و ۷/٥ میکرولیتر کیت PCR (ساخت شرکت سیناژن (ایران)، شامل dNTPs، PCR buffer، *Taq* DNA Polymerase و $MgCl_2$) با غلظت ۲X بود که در نهایت با اضافه کردن ٤ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون، حجم مخلوط واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسانیده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای انجام واکنش PCR سیکل های حرارتی به شرح زیر انجام شد. چرخه ۱ (واسرشت سازی اولیه) شامل $94^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه، چرخه ۲ با ۵ تکرار شامل $92^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه (واسرشت سازی)، $39/5^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه (اتصال آغازگر به DNA)، $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه (بسط) و چرخه ۳ با ۳۷ تکرار شامل $92^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت سازی) $37/5^{\circ}C$ به مدت ٤٥ ثانیه (اتصال آغازگر به DNA)، $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه (بسط) و چرخه ٤ (بسط نهایی) شامل $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه بود.

پس از انجام واکنش PCR به محتویات هر تیوب مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و مخلوط حاصل در چاهک های ژل آگاروز ۱/۲٪ در بافر 1X TBE[1] ریخته شد و به مدت ۱۳۰ دقیقه با جریان ۷۰ ولت در دستگاه الکتروفورز قرار داده شد. رنگ آمیزی ژل حاوی باندهای DNA با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

محاسبه های آماری

پس از انجام آزمایش RAPD برای بررسی چندشکلی بین نژادگان ها، عدم وجود یا وجود یک باند چند شکل با اعداد صفر و یک مشخص گردید. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم افزار Excel، داده ها به نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 منتقل شد. ماتریس تشابه نژادگان ها با استفاده ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA[2] انجام شد. تجزیه پلات نژادگان ها نیز به صورت سه بعدی انجام گرفت.

برای هر آغازگر در این آزمایش قدرت تفکیک[3] (Rp) محاسبه شد. این شاخص براساس فرمول زیر محاسبه می شود (۷):

$$Rp = \sum Ib \qquad Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

Ib: میزان آگاهی بخش بودن هر باند یک پرایمر می باشد. این مقدار طبق فرمول بالا برای هر کدام از باندهای تولید شده می تواند بین صفر تا یک متغیر باشد و p: نسبتی از نژادگان ها است که دارای باند مورد نظر می باشند.

نتایج و بحث

۲۲ آغازگر تصادفی سری TibMolBiol مورد استفاده در ۷۲ نژادگان مورد بررسی در مجموع ۲۲٤ باند تولید کردند که از بین آن ها ۱۹ باند در بین تمام نژادگان ها یک شکل بودند و ۲۰۵ باند در بین نژادگان ها چند شکلی نشان دادند. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه SM1553 Fermentas (دارای قطعات DNA ۵۰۰۰، ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰ جفت باز) استفاده شد. اندازه باندهای تولید شده در تمام آغازگرها در محدوده ۳۰۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد (شکل۱). بیشترین تعداد باند چند شکل به تعداد ۱۷ عدد و به وسیله آغازگر BD04 و بیشترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگرهای BB03، BB05، BB08، BD04، BD05، BD11، BD13، BD15، BD17 و BD18 با میزان ۱۰۰٪ بود. میانگین درصد چند شکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۸۹/۰۳۷٪ بود. مجموع قدرت تفکیک (Rp) آغازگرها ۸۸/۲۸ بود و هر آغازگر به طور میانگین با ۹/۳ باند چند شکل قدرت تفکیک ٤/۰۱ نشان دادند. در بین آغازگرهای مورد استفاده بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به آغازگر BD18 (با ۱۳ باند چند شکل) و به میزان ۷/۳۹ بود. این ضریب بیانگر میزان کارآیی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه های مورد مطالعه می باشد (۱٦).

۱- Tris Boric Acid EDTA ۲- Unweighted Paired Group Method Using Aritmatic Average ۳- Resolving power

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- نام های قراردادی نژادگان های مورد بررسی در آزمایش RAPD.

Table 1. Codes for genotypes studied by RAPD markers.

نام قراردادی نمونه	Code	شماره نمونه Number of sample	نام قراردادی نمونه Genotype code	شماره نمونه Number of sample
نیشابور برجی ۱	Neyshaboor borji 1	37	S1-1	1
ولیان ۱ (کرج)	Velyan 1 (karaj)	38	S1-10	2
بی نام ۱	Anonymous 1	39	S1-20	3
بی نام ۲	Anonymous 2	40	S1-22	4
آلو بخارا (نیشابور)	Alo Bokhara (Neyshaboor)	41	S2-11	5
اسجیل (چناران)	Esjil (Chenaran)	42	S2-29	6
جواهر ده ۱	Javaherdeh 1	43	S3-1	7
کلات نادر ٤	Kelat Nader 4	44	S3-15	8
نیشابور برجی ۲	Neyshaboor borji 2	45	S3-39	9
ولیان ۲	Velyan 2	46	S4-13	10
ولیان ۳	Velyan 3	47	S4-17	11
بیرجند ۲	Birjand 2	48	S5-22	12
جواهر ده ۲	Javaherdeh 2	49	S5-41	13
ولیان ٤	Velyan 4	50	S6-17	14
بی نام ۳	Anonymous 3	51	S6-30	15
آلوی وحشی میروبالان زرد	Mirobalan zard	52	S6-40	16
آلوی شیرین هسته جدا (چناران)	Shirin haste joda (Chenaran)	53	S7-18	17
کلات نادر ۲	Kelat Nader 2	54	S7-36	18
ولیان ٥	Velyan 5	55	S8-8	19
جواهر ده ۳	Javaherdeh 3	56	S8-34	20
جواهر ده ٤	Javaherdeh 4	57	S9-3	21
n-4	n-4	58	S9-21	22
n-7	n-7	59	S10-4	23
4M-1	4M-1	60	S10-7	24
4M-12	4M-12	61	S10-19	25
4M-25	4M-25	62	S10-23	26
4M-47	4M-47	63	S10-40	27
4M-44	4M-44	64	S11-4	28
4M-63	4M-63	65	S11-23	29
4M-69	4M-69	66	S11-25	30
4M-91	4M-91	67	S11-26	31
کلات نادر ٥	Kelat Nader 5	68	S12-19	32
بی نام ٤	Anonymous 4	69	S12-21	33
قطره طلا	Golden drop	70	S12-22	34
ولیان ٦	Velyan 5	71	S13-4	35
تنسگل	Tansgol	72	4-MM	36

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج به دست آمده از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی بین دو نژادگان تنسگل و S4-13 (۰/۲۳) و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین نژادگان های S11-25 و S11-26 (۰/۷۸) مشاهده شد. میانگین تشابه بین کل نژادگان های مورد بررسی ۰/۵۵ بود. به دلیل استفاده از نژادگان هایی که از رویشگاه های طبیعی جمع آوری شده بودند تنوع ژنتیکی به نسبت زیادی بین این نژادگان ها مشاهده شد. این نتایج با نتایج هند و همکاران (۱۰) روی ۲۷ رقم آلوی بومی از ٤ منطقه تونس با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD که تعداد ۱٤۳ باند با ۹۷/۲۸٪ چند شکلی، قدرت تفکیک (Rp) ۸۲ و میزان تشابه ژنتیکی ۰/۸۸-۰/۲ و با میانگین ۰/۵۲ داشتند مطابقت دارد. شیمادا و همکاران (۱۹) با استفاده از ٤۲ رقم آلوی تجاری و کاربرد ۲۰ آغازگر RAPD، ۲۸۳ باند تولید کردند که ۲٤٪ آن ها چند شکل بودند و تشابه ژنتیکی بین ۱-۰/٦۲ به دست آوردند که نسبت به نتایج این آزمایش دارای تنوع کمتری بوده است. تنوع کمتر به احتمال به علت استفاده از رقم های تجاری بوده است که ممکن است دارای والدین مشترک باشند و به طور کلی رقم های تجاری به نسبت به نژادگان‌های بومی تنوع کمتری نشان می‌دهند.

تجزیه کلاستر

براساس دندروگرام به دست آمده از ماتریس تشابه و در حد تشابه ۰/۵۸ نژادگان های مورد بررسی به ۱۳ گروه تقسیم شدند (شکل ۲). در حد تشابه ۰/۲۹ نژادگان تنسگل از بقیه نژادگان ها جدا شد و در یک شاخه مستقل قرار گرفت. ویژگی های مرفولوژیکی این رقم حد واسط آلو و زردآلوست که شاخص‌ترین ویژگی آن دیر گلی است که می‌توان از آن در تلاقی ها به عنوان والد جهت به دست آوردن نژادگان های دیر گل استفاده کرد. از ویژگی های دیگر آن رنگ بنفش پوست درخت، درختان با ارتفاع کم و میوه های آن که شبیه به آلو است. در مطالعه جنتی زاده (۱) روی تنوع ژنتیکی ۳۹ رقم و نژادگان زردآلو، رقم تنسگل تشابه ژنتیکی بسیار پایینی با رقم های دیگر زردآلو داشت و در تجزیه کلاستر داده های RAPD نیز این نمونه در حد تشابه ۰/۳٦ از بقیه رقم ها جدا شد.

گروه دوم شامل نژادگان های جواهرده ۳ (۵۷)، آلوی شیرین هسته جدای چناران (۵۳) و آلوی بخارای نیشابور (٤۱)، گروه سوم شامل نژادگان بیرجند ۲ (٤۸) و گروه چهارم شامل نژادگان های S4-13 (۱۰) و نژادگان S4-17 (۱۱) که دارای تیپ رشد مستقیم، قوی رشد، قطر تنه زیاد، بدون خار، تعداد پاجوش کم، زود بارده و دارای میوه های دیررس بودند. گروه پنجم شامل نژادگان S8-8 (۱۹) که دارای تیپ رشد مستقیم، تعداد شاخه جانبی زیاد، بدون خار و زود بارده بود و گروه ششم شامل نژادگان S1-20 (۳) که با توجه به دارا بودن تیپ رشد به طور کامل مستقیم، ارتفاع زیاد، بدون پاجوش و زود بارده بودن می تواند در برنامه های اصلاحی و هم به عنوان پایه قوی رشد مورد استفاده قرار گیرد.

گروه هفتم شامل نژادگان 4M-1 (٦۰) (دارای تیپ رشد میانه، خاردار و بدون پاجوش)، گروه هشتم شامل نژادگان ولیان ٥ (٥٥) (با تیپ رشد مستقیم، خاردار و پاجوش کم)، گروه نهم شامل نژادگان ولیان ٦ (۷۱) (دارای میوه هایی به رنگ پوست سیاه، هسته چسبیده به گوشت و TSS بالا)، گروه دهم شامل نژادگان S10-4 (۲۳) (مسقیم رشد، قوی رشد و بدون خار)، گروه یازدهم شامل نژادگان 4MM15 (۳٦) و گروه ۱۲ شامل نژادگان های n-7 (۵۹)، نیشابور روستای برجی ۲ (٤٥) و S13-4 (۳٥) بود.

www.SID.ir

جدول ۲- ویژگی ها و نتایج نوارهای DNA تولید شده توسط آغازگرهای RAPD مورد استفاده.

Table 2. Characteristics and results of DNA bands produced by RAPD markers.

ردیف	آغازگر	توالی	تعداد کل قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی	قدرت تفکیک
Number	Primer	Sequence	Number of total amplified fragments	Number of polymorphic fragments	Percentage of Polymorphism	Resolving power
1	BA08	5'-CCACAGCCGA-3'	13	12	92.23	4.69
2	BA16	5'-CCACGCATCA-3'	10	9	88.88	3.25
3	BA20	5'-GAGCGCTACC-3'	12	11	91.66	5.19
4	BB01	5'-ACACTGGCTG-3'	14	13	92.85	6.42
5	BB03	5'-TCACGTGGCT-3'	11	11	100	6.03
6	BB04	5'-ACCAGGTCAC-3'	6	4	66.66	1.31
7	BB05	5'-GGGCCGAACA-3'	9	9	100	2.94
8	BB07	5'-GAAGGCTGGG-3'	7	6	85.71	1.22
9	BB08	5'-TCGTCGAAGG-3'	13	13	100	5.61
10	BB09	5'-AGGCCGGTCA-3'	7	5	71.43	1.97
11	BB11	5'-TGCGGGTTCC-3'	6	4	66.66	2.81
12	BB14	5'-GTGGGACCTG-3'	9	6	66.66	2.47
13	BD01	5'-TCACTCGCTC-3'	10	9	90	2.42
14	BD04	5'-TCGGGTGTTG-3'	17	17	100	7.39
15	BD05	5'-GTGCGGAGAG-3'	11	11	100	5.56
16	BD11	5'-CAACCGAGTC-3'	10	10	100	5.31
17	BD13	5'-CCTGGAACGG-3'	12	12	100	4.89
18	BD15	5'-TGTCGTGGTC-3'	8	8	100	2.14
19	BD17	5'-GTTCGCTCCC-3'	10	10	100	3.67
20	BD18	5'-ACGCACACTC-3'	13	13	100	6.11
21	BE05	5'-GGAACGCTAC-3'	9	8	88.88	4.75
22	BE06	5'-AAGCGGCCCT-3'	7	4	57.14	2.14
کل (Total)	-	-	224	205	_	88.28
میانگین (Mean)	-	-	10.22	9.32	89.03	4.01

گروه ۱۳ شامل دو زیر گروه بود که در زیر گروه اول نژادگان های S6-30 (۱۵) و S6-40 (۱۶) قرار گرفت و زیر گروه دوم شامل نژادگان های زیادی بودند که با ۰/۵۹ تا ۰/۷۸ تشابه ژنتیکی خویشاوندی بالای آن ها به هم را نشان می دهد. تعدادی از نژادگان های جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور در گروه های ۱۲-۱ قرار گرفتند ولی سایر آن ها در بین دانهال‌های بذری انتخاب شده از نهالستان های مختلف قرار داشتند که می تواند دلیلی بر تشابه این دانهال‌ها با نژادگان‌های مناطق مختلف باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

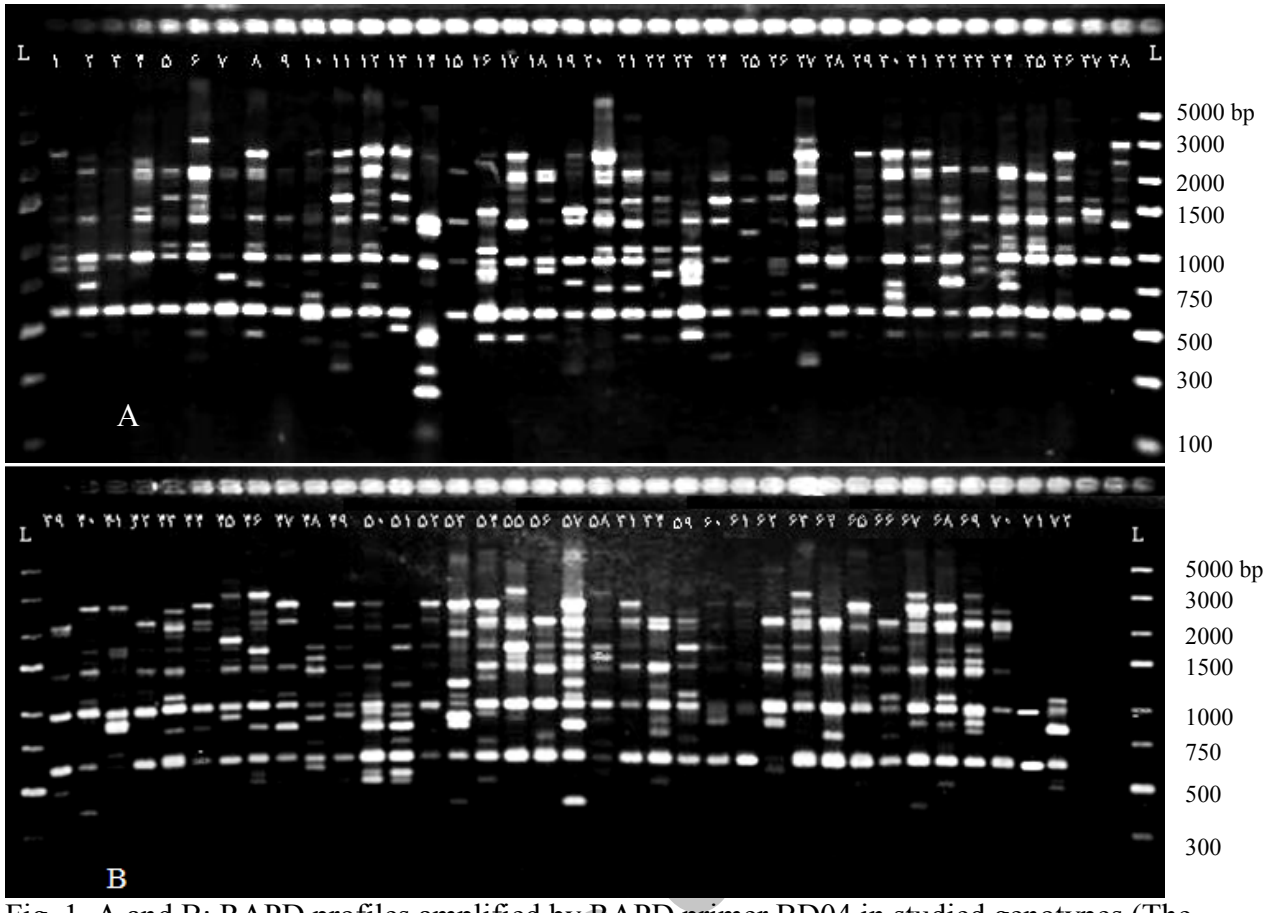

Fig. 1. A and B: RAPD profiles amplified by RAPD primer BD04 in studied genotypes (The number of each lane corresponds to genotype number in Table 1).

شکل ۱- A و B الگوی باندی حاصل از آغازگر BD04 در نژادگان های مورد بررسی (شماره هر ردیف بر اساس جدول ۱ نژادگان مورد نظر را نشان می دهد).

نژادگان های S11-25 (۳۰) و S11-26 (۳۱) که نژادگان هایی با ارتفاع بسیارکم، تیپ رشد مستقیم، بدون خار و تعداد کم پاجوش بودند در گروه ۱۳ با شباهت زیادی (۰/۷۸) در کنار هم قرار گرفتند که می توان از این دو نژادگان به عنوان پایه های پاکوتاه کننده و هم به عنوان والدین پاکوتاه کننده در تلاقی ها استفاده نمود. نژادگان های S3-39 (۹) و S12-19 (۳۲) که دارای تیپ رشد مستقیم، بسیار قوی رشد، بدون خار، پاجوش کم و دارای رنگ برگ و سرشاخه های کبود بودند در گروه ۱۳ با تشابه ۰/۷٦ در کنار هم قرار گرفتند. نژادگان های S10-7 (۲٤) و S10-19 (۲۵) که دارای تیپ رشد میانه، قدرت رشد متوسط، پاجوش زیاد، و زود بارده بودند نیز در گروه ۱۳ با تشابه ۰/۷۷ در کنار هم قرار گرفتند. نژادگان های 4M-44 (٦٤) و 4M47 (٦۳) که دارای تیپ رشد میانه، قوی رشد، بدون پاجوش و خاردار بودند در گروه ۱۳ با تشابه ۰/٦۹ در کنار هم قرار گرفتند. همچنین آلوی شیرین هسته جدای چناران (۵۳) و جواهرده ۳ (۵۷) که دارای تیپ رشد مستقیم و خاردار بودند در گروه ۱۳ با تشابه ۰/۷۲ در کنار هم قرار گرفتند.

تفاوت ژنتیکی در بین نژادگان ها توسط نشانگرهای RAPD نشان داده است که در بعضی موارد نژادگان‌هایی که از یک منطقه جمع آوری شدند در تجزیه کلاستر در کنار هم قرار گرفتند ولی در بیشتر موارد

www.SID.ir

گروه بندی مستقل از منشاء جغرافیایی نژادگان ها بود که با نتایج هند و همکاران (۱۰) روی نژادگان های آلوی بومی تونس که از چهار منطقه این کشور جمع آوری شده بودند و گروه بندی آن ها مستقل از منشاء جغرافیایی آن ها بود، مطابقت دارد.

گروه بندی به دست آمده در برخی از موارد با ویژگی های مرفولوژیکی مطابقت نداشت، به طوری که ارقام با ویژگی های مشترک در گروه های متفاوت قرار گرفتند. همبستگی بین داده های مرفولوژیکی و داده های حاصل از نشانگرهای RAPD پایین بود (r=۰/۱٤). به طور کلی ویژگی های مرفولوژیکی زیر تاثیر عوامل متعددی قرار می گیرند که مجموعه این عوامل سبب می شود که ارقامی که بر اساس داده های موجود در سطح DNA نزدیک به هم هستند از نظر ویژگی های مرفولوژیکی متفاوت باشند. باید توجه داشت که قطعه های افزایش یافته با استفاده از نشانگرهای RAPD الزاما از نظر توالی نوکلئوتیدی یکسان نیستند و قطعه‌هایی با اندازه یکسان ممکن است متعلق به قسمت های مختلف ژنوم و دارای توالی متفاوت باشند (۹). بنابراین این خود دلیلی است که ممکن است داده های حاصل از نشانگرهای RAPD همبستگی مورد انتظار با ویژگی های مرفولوژیکی را نداشته باشند. این امر با توجه به تاثیر پذیری ویژگی های مرفولوژیکی از محیط دور از انتظار نیست، بنابراین در برنامه های به نژادی اگر انتخاب فقط بر اساس ویژگی های مرفولوژیکی باشد ممکن است نتیجه مطلوبی نداشته باشد و انتخاب باید با توجه به نتایج ویژگی های مرفولوژیکی و ملکولی صورت گیرد.

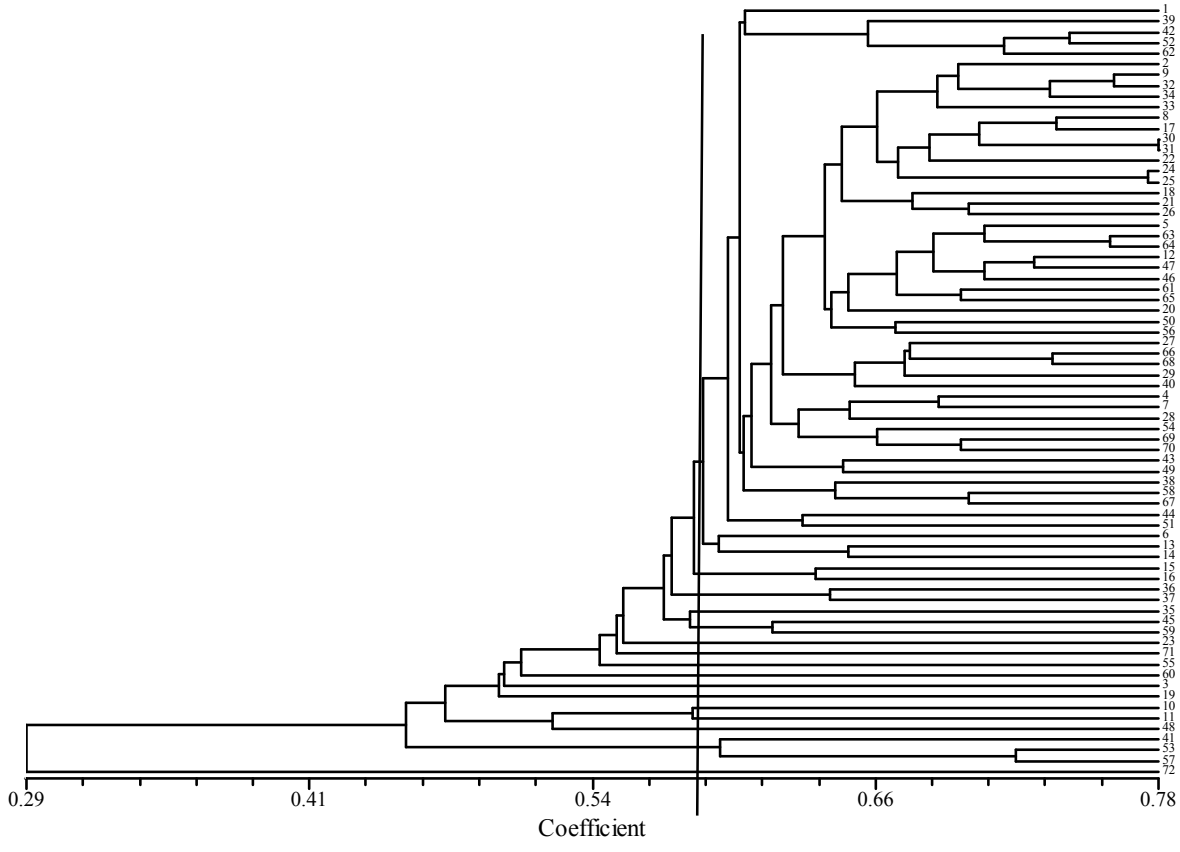

Fig. 2. Dendrogram of 72 plum genotypes (Table-1) constructed by Jaccard's similarity coefficients and UPGMA method based on RAPD data.

شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه بندی ۷۲ نژادگان آلو (جدول ۱) با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد و روش UPGMA حاصل از داده‌های RAPD.

www.SID.ir

تجزیه پلات

در تجزیه مختصات اصلی نشانگرهای مورد استفاده ۸ عامل اصلی که با تعداد کروموزوم پایه آلو (2n=2x=16) برابر است و در مجموع ۵۳/۸۱٪ کل تغییرها را توجیه کردند. در بین این عوامل، عامل اول درصد بالایی از واریانس با میزان ٤۱/۸٪ را توجیه نمود. دو عامل دوم و سوم به ترتیب با ۳/۱۷ و ۲/۱۳٪ در رتبه های بعدی قرار گرفتند. با وجود این که ٤۱/۸٪ از نشانگرها (عامل اول) یک ناحیه از ژنوم را پوشش داده اند بقیه نشانگرها تقریبا تمام سطح ژنوم را پوشش داده اند و پراکنش مناسبی داشتند. این نتایج با یافته های پژوهشی آیانوقلو و همکاران (۳) بر روی ۲۰ توده آلوی 'میروبالان' با استفاده از نشانگرهای AFLP که ٦۳٪ از واریانس کل توسط سه عامل اول توجیه شدند قابل مقایسه است.

در تجزیه مختصات اصلی نژادگان ها ۱۳ عامل اصلی در مجموع ۷۳/۳۲٪ کل تغییرها را توجیه کردند. عامل اول، دوم و سوم به ترتیب ۵۷/۲۷، ۲/۰٤ و ۱/۸۵٪ از واریانس کل را توجیه کردند. تجزیه پلات که در دو نوع دو و سه بعدی انجام می شود قادر است فواصل بین نژادگان ها را با استفاده از دو و یا سه عامل اصلی که بیشترین نقش را در توجیه تغییرها ایفا می کنند، نشان دهد. در این پژوهش آزمون تری پلات نژادگان‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 انجام گرفت (شکل ۳). در این آزمون نیز همانند تجزیه کلاستر به خوبی می توان جدا شدن نژادگان هایی که فاصله ژنتیکی بیشتری با سایر نژادگان ها دارند را مشاهده نمود و نتایج این آزمون نتایج حاصل از تجزیه کلاستر را تایید می کند و نژادگان هایی که در تجزیه کلاستر در یک گروه قرار گرفتند در تجزیه پلات نیز در کنار یکدیگر قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود همانند تجزیه کلاستر نژادگان تنسگل (۷۲) کاملا از سایر نژادگان ها جدا شد. پس از آن نژادگان های جواهرده ۳ (۵۷)، آلوی شیرین هسته جدای چناران (۵۳) و آلو بخارا نیشابور (٤۱) از سایر نژادگان ها جدا شده‌اند.

شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش[۱]

به منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش، هر یک از ویژگی ها در ترکیب با داده های RAPD مورد بررسی رگرسیونی چندگانه گام به گام قرار گرفتند (جدول ۳). با تعدادی از ویژگی ها تعداد چندین نشانگر وارد مدل رگرسیونی شدند که نشانگر دارای بالاترین R^2 به عنوان موثرترین نشانگر همبسته برای آن ویژگی در نظر گرفته شد. R^2 در واقع میزان همراهی هر نشانگر وارد شده در مدل با ویژگی مورد نظر را نشان می دهد. از بین ویژگی های ارزیابی شده به این منظور، بیشترین R^2 مربوط به تعداد ۱۵، ۵ و ۱۰ نشانگر مرتبط با ویژگی های رنگ برگ و سرشاخه ها، تیپ رشد و عرض برگ بود. در بین آن ها نشانگرهای $BB01_{750}$، $BD05_{300}$ و $BB08_{300}$ بیشترین مقدار R^2 را نشان دادند.

۱- Informative markers

www.SID.ir

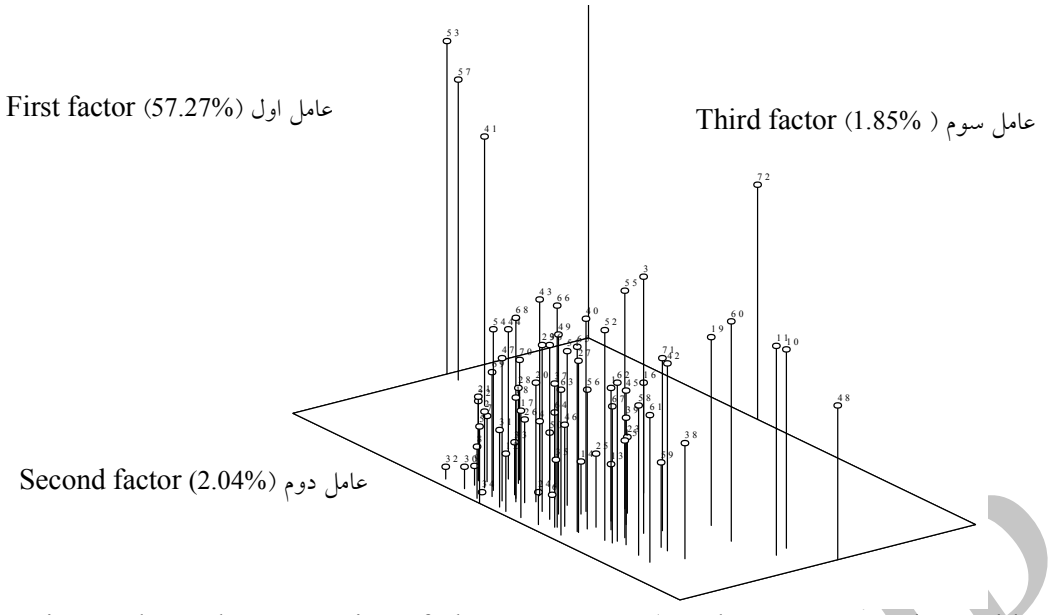

Fig. 3. Three plots scattering of plum genotypes (numbers correspond to Table 1) using 3 main factors.

شکل۳- الگوی سه بعدی پراکنش نژادگان های آلو (شماره ها بر اساس جدول ۱) مورد بررسی با استفاده از سه عامل اصلی.

جدول ۳- نتایج نشانگرهای آگاهی بخش حاصل از تجزیه رگرسیونی گام به گام باندهای چندشکل نشانگرهای RAPD برای برخی ویژگی های مهم پایه در آلو.

Table 3. Informative markers resulted by stepwise regression analysis between polymorphic RAPD bands with some important rootstock characters in plum.

نشانگر RAPD (RAPD Marker)					
ویژگی Character	تعداد نشانگر در مدل Number of markers	درصد R^2 کل Total R^2 %	درصد R^2 ماکزیمم Adjusted R^2 %	باند سرگروه† Main marker	طول باند† سر گروه Band length
تیپ رشد Growth habit	5	100	66.6	$BD05_{300}$	300bp
ارتفاع سال سوم رشد Height in Y3	7	84.2	28.7	$BE05_{300}$	300bp
رنگ برگ Leaf color	15	100	35.9	$BB01_{750}$	750bp
ارتفاع سال چهارم رشد Height in Y4	20	99.5	21.4	$BE05_{300}$	300bp
عرض برگ Leaf width	10	93.9	37.2	$BB08_{2300}$	2300bp
افزایش ارتفاع Increase height	8	90.4	25.6	$BD15_{750}$	750bp
زمان ریزش برگ Leaf abscission time	2	43.5	24	$BD11_{1250}$	1250bp

† Related to marker with the highest R^2.

† مربوط به نشانگر با بیشترین R^2 .

Archive of SID

www.SID.ir

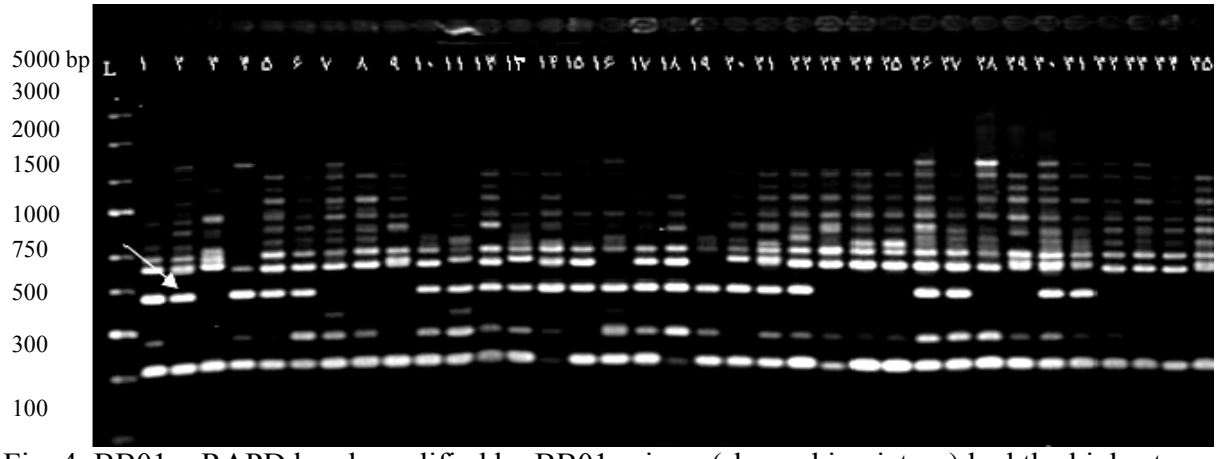

Fig. 4. $BB01_{750}$RAPD band amplified by BB01 primer (showed in picture) had the highest correlation with green color of shoot tip and leaf.

شکل ٤- آغازگر BB01 که نشانگر $BB01_{750}$ آن بیشترین R^2 را برای ویژگی رنگ برگ و سرشاخه ها سبز داشته است. این نشانگر با علامت فلش مشخص شده است.

نشانگر $BB01_{750}$ دارای بیشترین R^2 برای ویژگی رنگ برگ و سرشاخه ها بود و در نژادگان هایی که این باند تولید شده دارای رنگ برگ و سر شاخه های سبز رنگ بودند و نژادگان هایی که این باند را نداشتند بیشتر دارای برگ و سرشاخه های کبودرنگ بودند (شکل ٤). نشانگر $BD05_{300}$ دارای بیشترین R^2 برای ویژگی تیپ رشد می باشد و در نژادگان هایی که این باند تولید شده، دارای تیپ رشد مستقیم بودند و نژادگان هایی که این باند تیپ رشد مستقیم را نداشتند همچنین نشانگر $BE05_{300}$ دارای بیشترین R^2 برای ویژگی ارتفاع بودند و نژادگان هایی که دارای این باند بودند دارای ارتفاع کمتری نسبت به سایر نژادگان ها بودند. این باندها دارای ارتباط نسبی با ویژگی مورد نظر هستند و می توانند به عنوان باندهای DNA کاندید برای مطالعه ویژگی مورد نظر باشند البته ماهیت آن ها باید در جمعیت هایی که والدین برای آن ویژگی در حال تفرق هستند و از طریق آزمون BSA اثبات گردد تا فاصله دقیق آن به سانتی مورگان[1] که نشان دهنده درصد کراسینگ آور[2] است به دست آید و در صورت همبسته بودن بالا و در حد کمتر از یک سانتی مورگان می توان از آن در انتخاب غیرمستقیم اولیه نتاج در برنامه های بهنژادی کمک گرفت. همچنین ممکن است در صورت همگروه سازی و توالی یابی آن ها بتوان اطلاعات کامل تری از نظر تطابق ژنتیکی آن ها با نشانگر های گزارش شده در این مورد به دست آورد و از طریق تبدیل آن به مارکر SCAR میزان کارایی آن را افزایش داد.

REFERENCES منابع

۱. جنتی زاده، ع. ۱۳۸۷. ارزیابی ملکولی و مرفولوژیکی برخی از نژادگان ها و ارقام زردآلو. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۸۸ ص.

2. Aradhya, M.K., C. Weeks, and C.J. Simon, 2004. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. Sci. Hort. 103:131–144.

۱- Centimorgan
۲- Crossing-Over

Archive of SID
www.SID.ir

3. Ayanoglu, H., S. Bayazit, G. Inan, M. Bakir, A.E. Akpinar, K. Kazan and A. Ergul, 2007. AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. Sci. Hort. 114:263–267.
4. Bouhadida, M., J.P. Martin, G. Eremin, J. Pinochet, M.A. Moreno and Y. Gogorcena, 2007. Chloroplast DNA diversity in *Prunus* and its implication on genetic relationships. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132:670–679.
5. Dirlewanger, E., P. Cosson, W. Howad, G. Capdeville, N. Bosselut, M. Claverie, R. Voisin, C. Poizat, B. Lafargue, O. Baron, F. Laigret, M. Kleinhentz, P. Arus, and D. Esmenjaud, 2004. Microsatellite genetic linkage maps of Myrobalan plum and an almond-peach hybrid-location of root-knot nematode resistance genes, Theor. Appl. Genet. 109:827–838.
6. FAO. 2007. FAO statistical database. Retrieved from http://apps.fao.org.
7. Gilbert, J.E., R.V. Lewis, M.J. Wilkinson, and P.D.S. Galigari, 1999. Developing and appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. Theo. Appl. Genet. 98:1125–1131.
8. Grzyb, Z.S., M. Sitarek, and B. Kozinski, 1998. Effect of different rootstock on growth, yield and fruit quality of four plum cultivars (in central of Poland). Acta Hort. 478:239-242.
9. Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa, 1993. Plant Breeding, Principle and Prospects, Champan and Hell, Londan, U.K.
10. Hend, B.T, B. Ghada, B. Mustapha Sana, M. Mohamed, T. Mokhtar and A. Salhi-Hannachi, A. 2009. Genetic relatedness among Tunisian plum cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis and evaluation of phenotypic characters. Sci. Hort. 124:440-446.
11. Lanauskas, J. 2006. Effect of rootstock on growth and yield of plum tree CVS. Stanly and Kauno Vengrine. Scientific work of the Lithuanian Institute of Horticultural and Lithuanian University of Agriculture. 25:243-249.
12. Lisek, A., M. Korbin, E. Rozpara, and E. Żurawicz, 2007. Plum cultivar DNA polymorphism generated with RAPD and ISSR markers. Acta Hor. 734:281-285.
13. Liu, W., S. Li, A. Zhang, and D. Liu, 2007. Genetic diversity revealed by RAPD markers in plum collection of China. Acta Hort. 734:287-294.
14. Murray, H.G. and W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
15. Okie, W.R. and J.F. Hancock, 2008. Plums, In: Hancock, J.F. Temperate Fruit Crop Breeding Germplasm to Genomics. Michigan State University. 455 p, 337-357.
16. Prevost, A. and M.J. Wilkinson, 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98:107-112.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Qiao, Y.S., J.G. Fang, Y. Cong, J. Zhou, and Z. Zhang, 2006. Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. Acta Hort. 763:177-184.
18. Rozpara, E. and Z.S. Grzib, 1998. Growth and yielding of some plum cultivars grafted on Wangenheim Prune seedling. Acta Hort. 478:87-90.
19. Shimada, T., H. Hayama, T. Haji, M. Yamaguchi, and M. Yoshida, 1999. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Euphytica, 109:143-147.

Archive of SID

www.SID.ir