ارزیابی ساختار جمعیتی در برخی ژنوتیپ‌های سیب بومی منطقه البرز مرکزی با استفاده از نشانگر RAPD

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[1*]

[1] پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

[*] نویسنده مسئول: shjahangirzadeh@gmail.com

چکیده

جهت انجام هر کار اصلاحی نیاز به وجود و شناخت تنوع موجود احساس می‌گردد و این شناخت به اصلاحگر در مدیریت و کنترل بهتر برنامه‌های اصلاحی کمک وافری می‌نماید. برای بدست آوردن این شناخت بهتر است برای ابتدا از مارکرهای ساده و پر کاربرد مانند RAPD استفاده نمود. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۶ ژنوتیپ بومی سیب منطقه البرز مرکزی ایران توسط ۱۱ پرایمر RAPD سری TIB MOLBIOL بررسی شدند. تعداد متوسط باندها به ازای هر پرایمر ۱۰/۲۷ بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار POPGENE انجام شد و دندروگرام توسط نرم‌افزار NTSYS بر پایه UPGMA ترسیم گردید. تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص شانون (I) و ضریب تنوع ژنتیکی نی(h) به ترتیب ۰/۴۳۶، ۰/۳۱۴، ۰/۰۱۸، ۰/۶۲۶ و ۰/۴۳۶ بدست آمدند. دندروگرام حاصل از بررسی جمعیت‌ها، ژنوتیپ‌های بومی طالقان را در شباهت ژنتیکی ۰/۷۱ از ژنوتیپ‌های بومی سه منطقه دیگر (شمیران، چالوس و دماوند) تفکیک کرد. بیشترین شباهت نیز بین دو جمعیت شمیران و چالوس (۰/۸۳۵) مشاهده شد.

کلمات کلیدی: **سیب، ژرم‌پلاسم، تنوع ژنتیکی، جمعیت، RAPD**

مقدمه

جمع‌آوری و ارزیابی ذخایر ژرم‌پلاسم داخلی و خارجی، اساسی‌ترین مرحله در برنامه‌های بهنژادی درختان میوه می‌باشد. اصلاح درختان سیب، امروزه با توجه به اهمیت تغذیه سالم و تولید پایدار میوه با کیفیت سیب بیشتر بر پایه ژن‌های مقاومت می‌باشد (Crosby et al., 1992). با توجه به آنکه اکثر واریته‌های سیب به‌صورت رویشی تکثیر می‌گردند تنوع ژنتیکی کمی مورد انتظار می‌باشد اما در مورد ژنوتیپ‌های بومی که حاصل انتخاب ویژگی‌های برتر می‌باشد این تنوع مورد انتظار افزایش می‌یابد زیرا این ژنوتیپ‌ها اکثراً نتاج بذری می‌باشند. با توجه به این موارد دقت بالا در شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاحی بسیار ضروری است. بررسی این منابع ژنتیکی مهم که با شرایط اقلیمی نامناسب سازگار گشته می‌تواند به‌عنوان منابع مقاومت در برنامه‌های بهنژادی به کار گرفته شود. روند رو به رشد کاشت ارقام اصلاح شده منجر به فرسایش ژنتیکی و انقراض ژنوتیپ‌های بومی اهلی که در بردارنده ژن‌های متنوع می‌باشند، می‌گردد. برای حفظ این ذخایر توارثی می‌توان به جمع‌آوری و ذخیره ژنوتیپ‌های مختلف به‌صورت غده، بذر و ... در بانک ژن اقدام نمود. محدودیت‌های موجود در هزینه و فضا کافی جهت ذخیره‌سازی حجم عظیم مواد گیاهی، ما را بر آن می‌دارد تا از جمع‌آوری ارقام مشابه پرهیز کنیم. مناسب‌ترین راه حل برای شناسایی و تشخیص قرابت‌های ژنتیکی ارقام و حذف مواد گیاهی مشابه، استفاده از نشانگرها می‌باشد (Graham et al., 1996). روش‌های قدیمی بررسی تفاوت‌های ژنتیکی که بر اساس تنوع مورفولوژیکی هستند به دلیل آنکه تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند کمتر مورد توجه می‌باشند. اما نشانگرهای مولکولی (وابسته به DNA و آیزوزایم) فرصت بررسی مستقیم ویژگی‌ها را بدون اثر محیط بر آن‌ها را فراهم می‌کنند. امروزه روش RAPD یک روش مؤثر در بررسی ژنوم سیب می‌باشد. از این نشانگر در بررسی روابط ژنتیکی جنس Malus (Dunemann et al., 1994) شناسایی کالتیوارهای سیب (Koller et al., 1993; Mulcahy et al., 1993) و پایه‌های آن (Autio et al., 1998) و برای آنالیز والدی (Harada et al., 1993; Gardiner et al., 1996) استفاده شده است. هدف اصلی این بررسی مشخص کردن میزان تنوع ژنتیکی برخی

جمعیت‌های ژنوتیپ‌های بومی سیب موجود در منطقه البرز مرکزی و تعیین میزان شباهت بین این ژنوتیپ‌ها و مقایسه آن بود تا از این طریق به کاهش زمان برنامه‌های اصلاحی کمکی کرده باشد و در جهت حفاظت از این ژرم‌پلاسم ارزشمند اقدامی صورت پذیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برگ‌های جوان بالغ و کامل شده ۱۶نمونه سیب بومی مرکزی ایران (شش نمونه از منطقه شمیرانات، چهار نمونه از منطقه چالوس، سه نمونه از منطقه طالقان و سه نمونه از منطقه دماوند) از کلکسیون موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر (واقع در کمال‌آباد کرج) تهیه گردید (جدول ۱).تمام این نمونه‌ها در گذشته به‌صورت منطقه‌ای کشت می‌شدند اما امروزه کشت آن‌ها متوقف شده و فقط به‌صورت خاص و نقطه‌ای وجود دارند.

جدول۱- اسامی ارقام و ژنوتیپ‌های سیب مورد بررسی در این پژوهش، محل جمع‌آوری آن‌ها.

ردیف	نام نمونه	منشأ	ردیف	نام نمونه	منشأ
G1	ترش میگون	البرز مرکزی (شمیرانات)	G9	ترشک چالوس	البرز مرکزی (چالوس)
G2	شمیرانی تابستانه	البرز مرکزی (شمیرانات)	G10	عروس مشهد	البرز مرکزی (چالوس)
G3	شمیرانی دیررس	البرز مرکزی (شمیرانات)	G11	T4	البرز مرکزی (طالقان)
G4	گلدن آسیایی	البرز مرکزی (شمیرانات)	G12	بشقابی طالقان	البرز مرکزی (طالقان)
G5	گلدن آسیایی ۱	البرز مرکزی (شمیرانات)	G13	قرمز جنگلی	البرز مرکزی (طالقان)
G6	شمیرانی خطی	البرز مرکزی (شمیرانات)	G14	ترش دماوند	البرز مرکزی (دماوند)
G7	ترش چالوس	البرز مرکزی (چالوس)	G15	عروس قرمز	البرز مرکزی (دماوند)
G8	شفیع‌آبادی چالوس	البرز مرکزی (چالوس)	G16	HGH	البرز مرکزی (دماوند)

استخراج DNA

DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده بر اساس دستورالعمل معرفی شده برای نشانگر آرایه تنوع (دارت) توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DART P/L) (http://www.diversityarrays.com) استخراج گردید.

تکثیر قطعات DNA

برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۰ آغازگر تصادفی (TIB MOLBIOL, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌ها در حجم ۳۰ میکرولیتر از ترکیب دو میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، یک واحد آنزیم تکDNA پلیمراز، دو میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۱۰ برابر غلظت) بدون کلرید منیزیم و ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. دناتوره شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در ۳۰ سیکل بعدی، دناتوره شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس مرحله اتصال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله آخر یا مرحله گسترش به مدت ۲ دقیقه اعمال شد و سپس مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه انجام گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler استفاده گردید.

آنالیز داده‌ها

محصولات تکثیر شده به نسبت ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۲ میکرولیتر ژل رد در ژل آگارز ۱/۲ درصد تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه تفکیک گردیدند. به باندهای دارای وضوح مطلوب بر اساس حضور باند یا عدم حضور باند یک و صفر داده شد. جهت آنالیز جمعیتی نیز از نرم‌افزار POPGENE,Ver.32 استفاده شد و دندروگرام جمعیتی توسط نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.02 رسم گردید.

نتایج و بحث

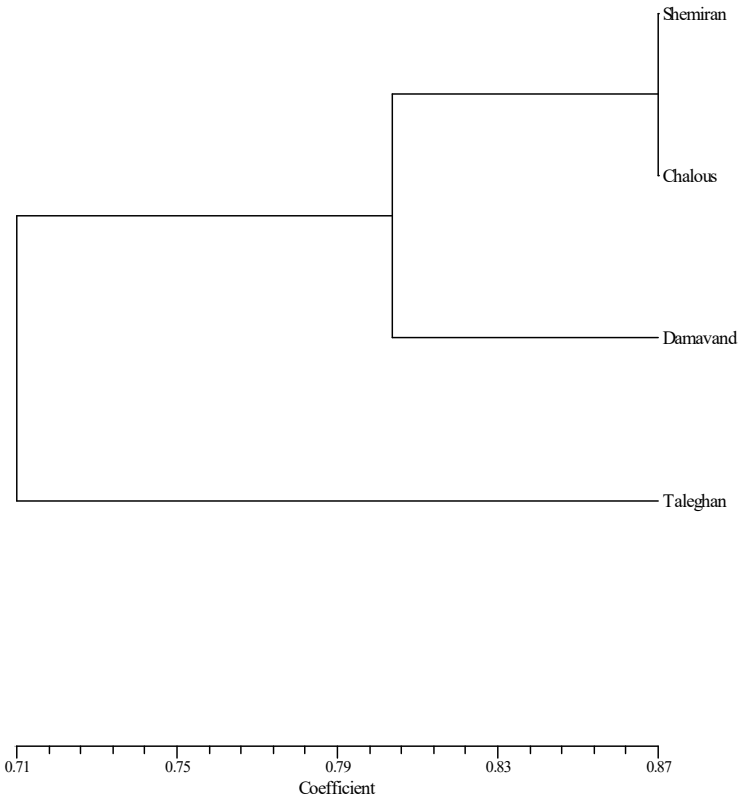
از کل ۱۱ پرایمر بکار رفته ۱۱۳ باند دارای ویژگی‌های مطلوب برای بررسی شناسایی شدند که ۷۷ باند حالت پلی‌مورف نشان دادند (جدول ۲). پرایمر TIBMBC20 با توالی AGCACTGGGG بالاترین تعداد باند را تولید کرد و همین پرایمر دارای بالاترین تعداد باند پلی‌مورف بود اما پرایمر TIBMBD16 با توالی GAACTCCCAG با تولید هفت باند قابل بررسی دارای حداقل تعداد باند تکثیری بود. پرایمر TIBMBE08 با توالی GGGAAGCGTC با تولید نه باند که تماماً حالت پلی‌مورف داشتند بهترین پرایمر از نظر تفکیک نمونه‌ها بود.در بررسی انجام شده روی برخی ژنوتیپ‌های سیب بومی ایران توسط جهانگیرزاده و همکاران (۱۳۹۲) و ارقام گیلاس ایرانی توسط خدیوی و همکاران (۱۳۸۸) که همین پرایمرها بکار برده شده بود از نظر قدرت تکثیر نتایج مشابهی بدست آمده بود بدین معنا که پرایمرهای دارای قدرت تکثیر بالا در گیلاس در گیاه سیب نیز تقریباً قدرت تکثیر بالایی داشتند. متوسط تعداد باند برای هر پرایمر ۱۰/۳ و متوسط تعداد باند پلی‌مورف برای هر پرایمر هفت باند بود (جدول۲). بالاترین در صد چندشکلی در پرایمر TIBMBE08 با ۱۰۰٪ و کمترین درصد در پرایمرهای TIBMBB17 و TIBMBB05 با ۵۰٪ مشاهده شد.

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی ده نوکلئوتیدی RAPD مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی ۲۳ ژنوتیپ سیب بومی ایران و یک رقم تجاری و در صد چندشکلی حاصل از آن‌ها

پرایمر	توالی	کل باندها (a)	باندهای پلی‌مورف (b)	درصد چندشکلی (b/a×100)
TIBMBA-06	GGACGACCGT	8	5	62.50
TIBMBA-08	CCACAGCCGA	10	7	70.00
TIBMBC-20	AGCACTGGGG	15	10	66.67
TIBMBD-16	GAACTCCCAG	7	4	57.14
TIBMBA-20	GAGCGCTACC	12	9	75.00
TIBMBB-05	GGGCCGAACA	10	5	50.00
TIBMBD-17	GTTCGCTCCC	8	6	75.00
TIBMBB-17	ACACCGTGCC	14	7	50.00
TIBMBC-04	CCACGTGCCA	11	9	81.82
TIBMBE-08	GGGAAGCGTC	9	9	100.00
TIBMBC-12	CCTCCACCAG	9	6	66.67
Total	--	113	77	--
Mean.	--	10.27	7.00	68.14

در بررسی جمعیتی نمونه‌ها، تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص شانون (I) و ضریب تنوع ژنتیکی نی(h) به ترتیب ۰/۴۳۶، ۰/۳۱۴، ۰/۰۱۸، ۰/۶۲۶ و ۰/۴۳۶ بدست آمدند.

در بررسی دندروگرام حاصل از بررسی جمعیتی (شکل-۱) بر اساس شباهت ژنتیکی نی (۱۹۷۳) (جدول-۳) مشخص شد که جمعیت متعلق به منطقه طالقان در حد تشابه ۷۱٪ از جمعیت‌های شمیران، چالوس و دماوند جدا گردید و حداکثر فاصله را از آن‌ها نشان داد. در سه جمعیت باقی‌مانده جمعیت منطقه دماوند که نسبت به دو جمعیت دیگر (شمیران و چالوس) در سطح تشابه حدود ۰/۸۱ از دو جمعیت مذکور جدا گردید. دو جمعیت شمیران و چالوس حداکثر تشابه (۸۷٪) را با یکدیگر داشتند.



شکل (۲) دندروگرام بدست آمده بر اساس آنالیز جمعیتی
(جمعیت‌ها شامل: Shemiran: شمیرانات، Chalus: چالوس،Damavand: دماوند و Taleghan: طالقان)

جدول (۵). میزان تشابه (اعداد بالا چپ) و فاصله ژنتیکی (اعداد پایین راست) جمعیت‌ها با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۲) در جنس *Malus* ssp.

جمعیت	شمیرانات	چالوس	طالقان	طالقان
شمیرانات	-	۰/۸۷۴	۰/۷۲۰	۰/۷۷۴
چالوس	۰/۱۳۵	–	۰/۷۲۵	۰/۸۳۵
طالقان	۰/۳۲۸	۰/۳۲۱	–	۰/۶۷۱
طالقان	۰/۲۵۷	۰/۱۸۱	۰/۳۹۹	–

بر اساس این دندروگرام می‌توان این‌گونه برداشت نمود که انتقال ژنوتیپ‌های بهتر در زمان‌های گذشته در بین این دو منطقه (شمیران و چالوس) صورت گرفته که اطلاعات حاصل از دندروگرام تأییدی بر این موضوع می‌باشد.

منابع

جهانگیرزاده خیاوی، ش.، نورافکن، ح.، دامیار، س. ۱۳۹۲، ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از نشانگر RAPD، فصل‌نامه دانش نوین کشاورزی پایدار، ۹ (۱): ۲۱-۲۹

خدیوی خوب، ع.؛ زمانی، ذ.الف.، بوذری، ن.، فتاحی مقدم، م.ر. ۱۳۸۸، ارزیابی گوناگونی ژنتیکی برخی از ارقام گیلاس ایرانی با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و نشانگر RAPD، مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۲۵(۱): ۱۹۵-۲۰۹

Graham, J., McNicol, R.J., McNicol, J. W., 1996. Acomparision of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. Theoretical and Applied Genetics. 93:402-406.

Crosby, J.A., Janick, J., Pecknold, P.C., Korban, S.S., O'Connor, P.A., Ries, S.M., Goffreda, S, Voordeckers, A., 1992. Breeding apple for scab resistance. Acta Horticulturae. 317: 43-70.

Duneman, F., Kahnau, R., Schmidt, H., 1994. Genetic Relationships In Malus Evaluated by RAPD Fingerprinting of cultivars and wild species. Plant Breeding, 113: 150-159

Mulcahy, D.L., Cresti, M., Sansavini, S., Douglas, G.C., Linskens, H.F., Mulcahy, G.B., Vignani, R., Pancaldi, M., 1993. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genomes. Scientia Horticulturae, 54: 89-96.

Koller, B.A., Lehmann, J., Modermott, M., Gessier, C., 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics. 85: 6-7.

Autio, W.R., Schupp, J.R, Ferree, D.C., Glavin, R., Mulcahy, D.L., 1998. Application of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks. HortScience. 33: 333-335.

Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Madie, C., Noition, D.A.M., 1996. Isozyme, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragmentlength polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. Journal of the American Society for Horticultural Science. 121: 996-1001.

Harada, T., Maksukawa, K., Sato, T., Ishikawa Niizeki, R., Saito, K.M., 1993. DNA-RAPD detectgenetic variation and paternity in Malus. Euphytica, 65: 87-91.

http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf

Assessment of Population Structure of Some Endemic Apple Genotypes of Central Alborz by RAPD Markers

Shahin Jahangirzadeh Khiavi[1*]
[1] Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran
**Corresponding author: Shjahangirzadeh@gmail.com*

Abstract

Each breeding program required to identify and recognize the diversity that exists. This knowledge was helped the breeder to better controlled and management of program. For achievement to this identification, it's better to used simple and useful marker like RAPD.In this research, the genetic diversity of 16 apple indigenous genotypes of Iran, Central Alborz region were evaluated by the 11, RAPD primers TIB MOLBIOL series.The average number of bands was 10.27 for each primer. Data were analyzed using and dendrogram was drawn based on UPGMA by NTSYS software.The total genetic diversity in populations (HT), and a major portion of it was within populations (HS), the genetic differentiation among populations (GST), Shannon's Information index (I) and Nei's gene diversity (h) was calculated 0.436, 0.314, 0.018, 0.626 and 0436214 (respectively).Resulted dendrogram from population study, discriminated Taleghan genotypes from other three populations (Shemiranat, Chalous and Damavand) by 0.71 genetic similarities (approximately). Maximum similarity were observed between Shemiranat and Chalous (0.835 approximately).

Keywords: **Apple, germplasm, genetic diversity, population, RAPD**