واکاوی روابط ژنتیکی میان ژرم‌پلاسم‌های اهلی و وحشی بادام ایران با استفاده از نشانگر ISSR

سما رحیمی دوین [۱]، علی قرقانی [۲،۳*]، علی پورخالوئی [۴]

[۱] دانش‌آموخته دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

[۲*] دانشیار بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

[۳] مرکز مطالعات خشکسالی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

[۴] استادیار بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران.

*نویسنده مسئول: agharghani@shirazu.ac.ir

چکیده

گونه‌های بادام وحشی ایرانی منابع با ارزش ژنتیکی گیاهی هستند که می‌توانند در برنامه‌های بهنژادی رقم‌ها و پایه‌های بادام استفاده شوند. در این میان گونه *Prunus scoparia* دارای نقش برجسته‌ای است که لازم است مورد بررسی ژرف قرار گیرد. در پژوهش حاضر گوناگونی ژنتیکی هفت جمعیت از گونه *P. scoparia* در مقایسه با سه گونه دیگر بادام شامل *P. elaeagnifolia*، *P. eburnea* و *P. dulcis* جمع‌آوری شده از استان‌های فارس و چهارمحال و بختیاری با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد. فراسنجه‌های گوناگونی ژنتیکی با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.32 محاسبه شد. از غربالگری کل مواد گیاهی با ۱۲ نشانگر مولکولی ISSR در مجموع ۳۵۳ قطعه DNA به‌دست آمد که ۳۵۲ عدد از آن‌ها چندشکل (۹۹/۶۹٪) بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (Rp) به ترتیب ۰/۹۳۲، ۲۷/۲۱۱ و ۷/۸۸۲ بود که نشان دهنده بالا بودن قدرت تفکیک نشانگرها می‌باشد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که مواد گیاهی مورد مطالعه به روشنی بر اساس گونه تفکیک گردیدند. جمعیت‌های *P. scoparia* در یک گروه قرار گرفتند و *P. eburnea* نزدیک به *P. scoparia* قرار گرفت (هر دو متعلق به بخش Spartioides هستند). بادام‌های اهلی و *P. elaeagnifolia* (هر دو متعلق به بخش Euamygdalus هستند) نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند. این مطالعه نشان داد که گوناگونی قابل توجهی میان ژرم پلاسم گونه‌های بادام وحشی مطالعه شده به ویژه *P. scoparia* وجود دارد که به عنوان منابع ژنتیکی با ارزشی در برنامه‌های بهنژادی بادام به منظور تولید ارقام و پایه‌های جدید، یا به‌طور مستقیم به‌عنوان پایه و همچنین برای جنگل‌کاری و کشت در فضای سبز می‌توانند استفاده شوند.

کلمات کلیدی: *Prunus scoparia*، تجزیه خوشه‌ای، گوناگونی ژنتیکی

مقدمه

بادام [*Prunus dulcis* (L.) Batsch] از تیره وردسانان و یکی از مهم‌ترین محصول‌های خشکباری در جهان است. این محصول به تقریب از ۵۰۰۰ سال پیش در منطقه هلال حاصلخیز (Fertile Crescent) کشت می‌شده است (Velasco *et al.*, 2016). گونه‌های بادام وحشی در کوهستان‌ها و بیابان‌های آسیای مرکزی از غرب چین تا ایران و ترکیه یافت می‌شوند که می‌توانند برای استخراج روغن، کنترل فرسایش خاک، به عنوان پایه و همچنین به عنوان منبع با ارزشی برای ژن‌های جدید در برنامه‌های بهنژادی بادام استفاده شوند (Rahemi *et al.*, 2012). ایران مرکز گوناگونی ژنتیکی بادام است و به تقریب ۲۰ گونه بادام وحشی از مناطق خشک و نیمه خشک کشور گزارش شده است (Sorkheh *et al.*, 2009). برخی از گونه‌های مهم بادام وحشی شامل *Prunus scoparia*، *P. eburnea* و *P. elaeagnifolia* در مناطق مرکزی و جنوبی زاگرس ایران، که استان‌های فارس و چهارمحال و بختیاری بخشی از این مناطق را پوشش می دهند، به طور گسترده‌ای توزیع شده‌اند (Gharaghani *et al.*, 2017).

IrHC2019

گیاهان بومی منبع ژنی ارزشمندی هستند که می‌توانند برای ورود صفت‌های جدید به رقم‌های تجاری استفاده شوند. بنابراین، گونه‌های بادام وحشی می‌توانند منبع ژنی با ارزشی برای برنامه‌های بهنژادی به علت دیرگلدهی، زودرسی، سازگاری با خشکی و شوری، تحمل دمای کم در زمستان و مقاومت به حمله حشره‌ها و قارچ‌ها باشند (Gharaghani *et al.*, 2017). افزایش دانش در مورد گوناگونی ژنتیکی بادام‌های وحشی برای استفاده آن‌ها در برنامه‌های بهنژادی بادام، ضروری می‌باشد.

نشانگرهای مولکولی ابزار با ارزشی برای مطالعه گوناگونی ژنتیکی می‌باشند. در میان نشانگرهای مختلف DNA، نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) از اطمینان و تکرارپذیری بالاتری در مقایسه با نشانگر RAPD برخوردار است و از سویی هزینه آن نسبت به نشانگر AFLP و SSR پایین‌تر می‌باشد (Rodrigues *et al.*, 2013).

با وجود برخی گزارش‌ها، هنوز نیاز به اطلاعات بیشتری در مورد گوناگونی ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های بادام در ایران وجود دارد. هدف از این پژوهش، بررسی گوناگونی و روابط ژنتیکی بین مجموعه‌ای از جمعیت‌های بادام وحشی و بادام اهلی در ایران با استفاده از نشانگر ISSR با تاکید بر جمعیت *P. scoparia* جمع‌آوری شده از مکان‌های مختلف در مناطق مرکزی و جنوبی زاگرس بود. همچنین، گوناگونی و روابط ژنتیکی این جمعیت با جمعیت‌های سه گونه دیگر بادام شامل *P. eburnea*، *P. elaeagnifolia* و *P. dulcis* بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

بذرهای ۷۲ درخت بادام وحشی از مناطق مرکزی و جنوبی کوه‌های زاگرس (استان‌های فارس و چهارمحال و بختیاری) در پایان بهار تا ابتدای تابستان ۱۳۹۳ جمع‌آوری شدند. شش جمعیت *P. scoparia* از مناطق مختلف استان فارس شامل شیراز، مرودشت، فیروزآباد، اقلید، نورآباد، میانجنگل‌فسا و یک جمعیت از منطقه لردگان در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری شد. افزون بر این، یک جمعیت *P. elaeagnifolia* و یک جمعیت *P. eburnea* از منطقه جغرافیایی مشابه مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین یک جمعیت *P. dulcis* بررسی شد. برای به دست آوردن فراوانی آللی، به طور میانگین حداقل ۷ فرد به ازای هر جمعیت بررسی شد.

پس از خراشدهی مکانیکی، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب شناور شدند. و سپس به مدت ۴۵ روز در دمای ۱ ± ۴ درجه سلیسیوس در پرلایت مرطوب و در یخچال قرار گرفتند. در پایان تیمار چینه سرمایی، بذرها در گلدان‌های ۵ کیلویی حاوی آمیخته شن، خاک و خاک‌برگ کاشته و به گلخانه با دمای ۳ ± ۲۶ درجه سلیسیوس منتقل شدند. در آذر ماه ۱۳۹۶، DNA نمونه‌ها با تغییرهای جزئی در روش CTAB از نمونه‌های ساقه استخراج شد (Doyle and Doyle, 1987).

واکنش PCR حاوی ۱۰ نانوگرم از DNA الگو و ۱۰ پیکومول از آغازگر بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل: ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس، ۴۵ ثانیه در ۶۱-۳۸ درجه سلیسیوس (بسته به آغازگر)، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس و تکثیر انتهایی در ۷۲ درجه سلیسوس به مدت ۷ دقیقه طراحی گردید. محصول این واکنش روی ژل ۱٪ آگارز مشاهده گردید. باندها به صورت سیستم صفر و یک امتیازدهی شدند و ماتریس حاصل برای محاسبه شاخص‌های گوناگونی ژنتیکی با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) به کار رفت.

نتایج و بحث

مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۸۴۵ (آغازگر ۴) تا ۰/۹۷۳ (آغازگر ۱) متغییر بود، به طوری که میانگین PIC برای همه جایگاه‌های ژنی ۰/۹۳۲ بود که نشان دهنده چندشکلی و کارایی بالای آن‌ها در تفکیک جمعیت‌ها می‌باشد. بالاترین (۳۶/۹۷) و پایین‌ترین (۱۹) مقدار شاخص نشانگر (MI) به ترتیب در آغازگرهای ۱ و ۱۲ با میانگین ۲۷/۲۱۱ در هر آغازگر مشاهده شد. بالاترین قدرت تفکیک (Rp) در آغازگر ۱ (۱۳/۱۸۳) و پایین‌ترین آن در آغازگر ۴ (۳/۵۱۸) با میانگین ۷/۸۸۲ مشاهده شد (جدول ۱).

IrHC2019

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه و شاخص‌های کارایی آن‌ها.

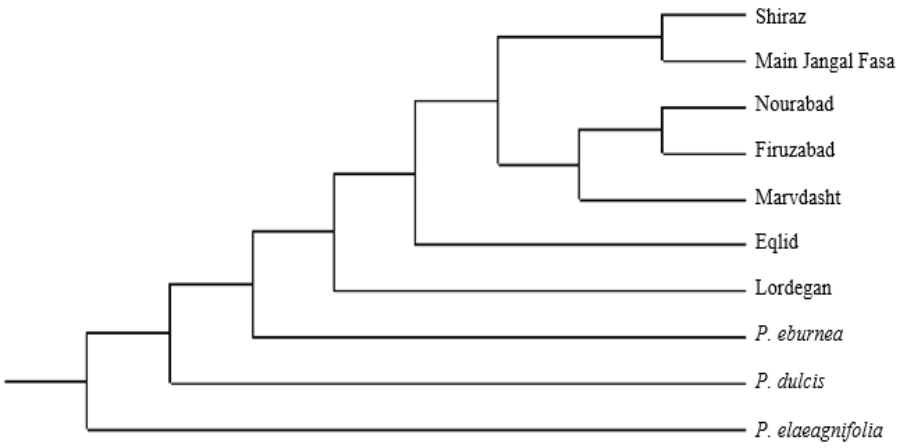
Primers	Primer sequences (5'-3')	Tm	Total number of alleles (a)	Number of polymorphic alleles (b)	% Polymorphism (b/a)*100	PIC	MI	Rp
1	GAC AGA CAG ACA GAC A	48	38	38	100	0.973	36.97	13.183
2	GTG CGT GCG TGC GTG C	58	30	30	100	0.952	28.56	4.932
3	GTG GTG GTG GTG GTG GTG	61	27	26	96.29	0.948	23.72	8.132
4	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	54	27	27	100	0.845	22.68	3.518
5	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50	23	23	100	0.953	21.85	9.160
6	CAC CAC CAC GC	38	33	33	100	0.947	31.02	9.946
7	ACA CAC ACA CAC ACA CCT	54	23	23	100	0.855	19.55	4.889
8	GAA GAA GAA GAA GAA GAA AA	50	28	28	100	0.958	26.60	8.172
9	GTC GTC GTC GTC GTC GTC	61	32	32	100	0.873	27.84	4.692
10	GAG AGA GAG AGA CC	44	35	35	100	0.961	33.60	12.177
11	BDB ACA ACA ACA ACA ACA	49	37	37	100	0.956	35.15	9.531
12	YHY GTG TGT GTG TG	42	20	20	100	0.959	19.00	6.252
Min.	---	---	20	20	96.29	0.845	19.00	3.518
Max.	---	---	38	38	100	0.973	36.97	13.183
Means	---	---	29.41	29.33	99.69	0.932	27.21	7.882
Total	---	---	353	352	---	---	326.54	---

Where: Y = (C, T); D = (A,G,T); V = (A,C,G); B = (C,G,T); R = (A,G)
PIC: polymorphism information content; MI: marker index; Rp: resolving power of primer.

کارایی یک سیستم نشانگر مولکولی در تشخیص ژنوتیپ‌ها بستگی زیادی به چندشکلی دارد که نشانگر می‌تواند مشخص کند (Guo *et al.*, 2014). بر اساس مقادیر بالای PIC، MI و Rp مشخص شد که نشانگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه برای ارزیابی گوناگونی ژنتیکی بادام، مناسب می‌باشند. اندازه‌گیری Rp و MI نشان دهنده توزیع و شمار آلل‌ها درون نژادگان‌های مورد مطالعه می‌باشد. باندهایی که در نیمی از نژادگان‌ها امتیازدهی می‌شوند دارای قدرت تفکیک مطلوب هستند و با افزایش شمار باندها، Rp آغازگر افزایش می‌یابد (Kayis *et al.*, 2010). بنابراین، آغازگرهایی که بالاترین مقادیر PIC، MI و Rp (ISSR1, ISSR10, ISSR11) را نشان دادند، بیشترین کارایی را در تشخیص میان نمونه‌ها دارند و می‌توانند در پژوهش‌های آتی گوناگونی ژنتیکی بادام استفاده شوند.

در مجموع ۳۵۳ باند امتیازدهی شدند و میانگین شمار ۲۹/۳۳ باند به ازای هر آغازگر، برای تمامی نمونه‌ها به‌دست آمد. از ۳۵۳ باند، ۳۵۲ باند (۹۹/۶۹ ٪) چندشکل بودند. درصد چندشکلی از ۹۶/۲۹ ٪ برای آغازگر ۳ تا ۱۰۰٪ در آغازگرهای دیگر متغیر بود.

دندروگرام با تجزیه خوشه‌ای UPGMA برای همه جمعیت‌ها به ترسیم شد. از میان ۷ گروه مستقل تشکیل شده در دندروگرام، جمعیت‌های *P. scoparia* در ۴ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل دو جمعیت (شیراز و میانجنگل فسا) می‌باشد. گروه دوم شامل ۳ جمعیت دیگر استان فارس (شامل نور آباد، فیروزآباد و مرودشت) است. جمعیت اقلید در گروه سوم قرار گرفت. جمعیت لردگان گروه چهارم را تشکیل داد. گروه پنجم، ششم و هفتم نیز به ترتیب شامل جمعیت‌های *P. eburnea*، *P. dulcis* و *P. elaeagnifolia* است (شکل ۱).



شکل ۱: دندروگرام به دست آمده با استفاده از روش UPGMA برای ۱۰ جمعیت بادام.

IrHC2019

تجزیه خوشه‌ای به طور گسترده‌ای برای مطالعه روابط ژنتیکی میان ژرم پلاسم‌ها استفاده می‌شود (Li et al., 2010). دندروگرام UPGMA در این مطالعه به روشنی گونه‌های مختلف را از یکدیگر تفکیک کرد. جمعیت شیراز و میانجنگل‌فسا در یک گروه قرار گرفتند، که با توجه به اینکه جمعیت شیراز غالبا به صورت کشت شده است تا طبیعی، به نظر می‌رسد بعضی از بادام‌های کشت شده در منطقه شیراز ممکن است از میانجنگل فسا منشا گرفته باشد. جمعیت لردگان و اقلید در گروه‌های نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند که ممکن است به دلیل شباهت آب و هوایی و همچنین نزدیکی جغرافیایی بین این دو مکان باشد. نزدیکی بعضی از گروه‌ها یا جمعیت‌ها از مناطق مختلف به عنوان مثال نورآباد و فیروزآباد می‌تواند به‌دلیل نزدیکی جغرافیایی مناطق، مبادله مواد گیاهی بین مکان‌ها و به احتمال، وجود اجداد مشترک توضیح داده شود. گونه *P. eburnea* نزدیک به *P. scoparia* (لردگان) قرار گرفت. این رابطه نزدیک منطقی است زیرا هر دو متعلق به بخش Spartioides درون جنس *Prunus* می‌باشند (Kester and Gradziel, 1996). افزون بر این، ارتباط نزدیک بین بادام‌های اهلی (*P. dulcis*) و *P. elaeagnifolia* می‌تواند به همین صورت توضیح داده شود، زیرا هر دو متعلق به بخش Euamygdalus درون جنس *Prunus* هستند (Kester and Gradziel, 1996).

نتایج این پژوهش نشان داد که آغازگرهای ISSR که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند توانایی قابل توجهی برای ارزیابی چندشکلی در جمعیت‌های مختلف بادام داشتند. همچنین، گوناگونی قابل توجهی میان ژرم پلاسم گونه‌های بادام وحشی مطالعه شده به ویژه *P. scoparia* وجود دارد که به عنوان منابع ژنتیکی با ارزشی در برنامه‌های بهنژادی بادام به منظور تولید ارقام و پایه‌های جدید، یا به‌طور مستقیم به‌عنوان پایه و برای برنامه‌های محافظتی بادام‌های وحشی و همچنین برای جنگل‌کاری و کشت در فضای سبز می‌توانند استفاده شوند.

منابع

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.

Gharaghani, A., Solhjoo, S. and Oraguzie, N. 2017. A review of genetic resources of almonds and stone fruits (*Prunus* spp.) in Iran. Genetic Resources and Crop Evolution, 64(3): 611-640.

Guo, Z. H., Fu, K. X., Zhang, X. Q., Bai, S. Q., Fan, Y., Peng, Y., Huang, L. K., Yan, Y. H., L, W. and Ma, X. (2014). Molecular insights into the genetic diversity of *Hemarthria compressa* germplasm collections native to southwest China. Molecules, 19(12): 21541-21559.

Kayis, S. A., Hakki, E. E. and Pinarkara, E. 2010. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research, 5(21): 2925-2933.

Kester, D.E. and Gradziel, T.M. 1996. Almonds. In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), Fruit Breeding. Wiley, New York, USA.

Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K. and Chaparro, J. 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. Plant systematics and evolution, 298(1): 173-192.

Rodrigues, L., van den Berg, C., Póvoa, O. and Monteiro, A. 2013. Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications for conservation. Biochemical systematics and ecology, 50: 51-61.

Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Asadi, E., Jahanbazi, H., Moradi, H., Gradziel, T. M. and Martínez-Gómez, P. 2009. Phenotypic diversity within native Iranian almond (*Prunus* spp.) species and their breeding potential. Genetic resources and crop evolution, 56(7): 947-961.

Sreekanth, P. M., Balasundaran, M., Nazeem, P. A. and Suma, T. B. 2012. Genetic diversity of nine natural *Tectona grandis* L.f. populations of the Western Ghats in Southern India. Conservation genetics, 13(5): 1409-1419.

Velasco, D., Hough, J., Aradhya, M. and Ross-Ibarra, J. 2016. Evolutionary genomics of peach and almond domestication. G3: Genes, Genomes, Genetics, g3-116.

Yeh, F. C., Yang, R. C. and Boyle T. B. J. 1999. POPGENE version 1.32, Microsoft Window-based free ware for population genetic analysis. Computer program and documentation distributed by University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada. http://www.ualberta.ca/;fyeh/index.htm

IrHC2019

Analysis of Genetic Relationships among Some Iranian Wild and Domesticated Almond Germplasms Using ISSR Marker

Sama Rahimi Dvin[1], Ali Gharaghani [2,3]*, Ali Pourkhaloee[4]
[1] Graduated PhD Student, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[2] Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[3] Drought Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[4] Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.
*Corresponding Author: agharghani@shirazu.ac.ir

Abstract

Iranian wild almond species are valuable plant genetic resources which can be used in breeding programs of almond cultivars and rootstocks. Among them, *Prunus scoparia*, holds an outstanding position that needs to be clarified more deeply. The present research focused on molecular diversity of seven populations of *P. scoparia* along with other three almond species including *P. elaeagnifolia*, *P. eburnea* and *P. dulcis* collected from Fars and Chaharmahal and Bakhtiari provinces by using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Parameters for genetic diversity were calculated using POPGENE 1.32 software. Molecular characterization of all plant materials by 12 ISSR markers showed that a total number of 353 DNA fragments were obtained of which 352 were polymorphic (99.69 %). The average of polymorphism information content (PIC), marker index (MI), and resolving power (Rp) were 0.932, 27.211, and 7.882, respectively which indicated high discriminatory power of markers. Cluster analysis showed that the studied plant materials were separated clearly based on the species. *P. scoparia* populations lay in the same group and *P. eburnea* stood close to *P. scoparia* (both of them belong to Spartioides section). The cultivated almond and *P. elaeagnifolia* (both of them belong to Euamygdalus section) lay close to each other. This study demonstrated that there were considerable variations among the studied wild almond germplasm; especially with respect to *P. scoparia* which can present a substantial genetic resource to be used in future almond breeding programs to produce new scion and rootstock cultivars or directly as rootstock, forest and landscape purposes.

***Keywords*:** *Prunus scoparia*, Cluster analysis, Genetic diversity.

IrHC2019