بررسی تنوع ژنتیکی و وراثت‌پذیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل کل و فروزه‌های کمی میوه در نژادگان‌های تمشک سیاه (*Rubus spp.*) Blackberry

زهرا شمس*[۱]، سعید عشقی [۱]، عنایت‌الله تفضلی [۱] علی قرقانی[۱]
[۱] گروه باغبانی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول: zahrashams1987@gmail.com

چکیده

با توجه به عدم وجود کشت و کار تجاری تمشک در ایران از یک سو و وجود ژرم‌پلاسم غنی این گونه گیاهی در کشور از سوی دیگر، مطالعه حاضر جهت بررسی تنوع ژنتیکی و وراثت‌پذیری ژرم‌پلاسم وحشی تمشک ایران به عنوان اولین مرحله از یک برنامه کاربردی به‌نژادی انجام پذیرفت. در این راستا ۱۴ نژادگان وحشی از چهار گونه مختلف تمشک سیاه از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری گردید. نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده در یک آزمایش مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در دو سال زراعی ۹۶-۹۵ و ۹۷-۹۶ مورد بررسی قرار گرفته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل کل و فروزه‌های کمی میوه اندازه‌گیری شدند. نتایج بدست آمده از برآورد ضریب تغییرات ژنتیکی (CVg) نشانگر وجود تنوع ژنتیکی کافی در بین نژادگان‌های بررسی شده از نظر فروزه‌های بررسی شده بود. همچنین بر اساس میزان بالای وراثت پذیری (از ۹۶/۰۳ درصد برای فروزه طول میوه تا ۹۹/۹۹ درصد برای فروزه عملکرد) در بین نژادگان‌های مختلف، پتانسیل بالایی برای تولید رقم‌های تمشک به‌نژادی شده حاوی فعالیت و محتوای بیشتر آنتی‌اکسیدانی و فنل کل در کنار تولید بالا را نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه‌خوشه‌ای از طریق هیت مپ نژادگان‌های مطالعه شده به دو گروه مختلف تقسیم گردیدند. گروه اول دارای میزان بالا از نظر فروزه‌های کمی میوه به همراه فعالیت بالای آنتی آکسیدانی بودند در صورتی که گروه دوم عکس این شرایط را نشان دادند.

کلمات کلیدی: پارامترهای ژنتیکی، وراثت‌پذیری، تمشک سیاه.

مقدمه

تمشک گیاهی متعلق به جنس Rubus و از خانواده گلسرخیان (Rosaceae) و زیرخانواده Rosideae می‌باشد که علی‌رغم گستردگی فراوان در بیشتر اقلیم‌ها، از گیاهان مناطق معتدله محسوب می‌شود. تمشک در برخی از مناطق و به‌خصوص شمال ایران و دامنه رشته‌کوه‌های زاگرس به‌صورت وحشی رشد می‌کند (Hadadinejad, 2014). افزایش مصرف ریزمیوه‌ها از جمله تمشک‌سیاه ممکن است یک راهبرد عملی برای پیشگیری از بیماری های قلبی و عروقی، سرطان و جلوگیری از پیری باشد (Folta and Kole, 2016). با این حال، فعالیت آنتی اکسیدانی میوه ها و سبزیجات به میزان قابل توجهی متفاوت و وابسته به میزان پلی‌فنول موجود در آن‌ها می‌باشد (Ryu *et al*., 2016). از سوی دیگر با توجه به ارزش غذایی بالای تمشک سیاه ، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای کل پلی فنول و همچنین ویژگی های میوه را باید به عنوان صفات مهم در شناسایی و پرورش بررسی نمود (Clark and Finn, 2011). هدف از بررسی گیاهان، تولید ارقام بهبود یافته با صفات مطلوب است. تنوع ژنتیکی پایه ای برای بهبود گیاهان است (Bhandari *et al*., 2017). تنوع ژنتیکی می تواند با استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گیرد (Bhandari *et al*., 2017). با توجه به تاثیرات ذکر شده در مورد تغذیه و سلامت انسان و همچنین وجود ژرم پلاسمی غنی از گونه های مختلف تمشک سیاه در ایران، تا کنون اطلاعات زیادی در مورد تنوع ژنتیکی و وراثت پذیری تمشک سیاه در ایران موجود نمی‌باشد . بنابراین، این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و وراثت پذیری در نژادگان مختلف تمشک سیاه مربوط به چهار گونه مختلف موجود در ایران از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی، درصد فنل کل و فروزه‌های کمی میوه انجام گرفت.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

در مجموع ۱۴ژنوتیپ تمشک‌سیاه شامل بابلسر، فومن، سنندج، بختیاری،گرگان۵، گرگان۲، بندرگز، ناهارخوران، نمک‌آبرود، ماسوله، همدان،یاسوج،کازرون و ارومیه متعلق به چهار گونه مختلف از مناطق مختلف ایران جمع آوری گردید و در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز کشت گردید. مواد گیاهی در دو فصل رشد ۹۵-۹۶ و ۹۶-۹۷ بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میانگین بارش سالانه در مرزعه تحقیقاتی مذکور ۳۸۶ میلی متر، بستر کشت لومی-شنی و آبیاری به صورت قطره‌ای بود. به منظور اندازه‌گیری فروزه‌های طول و وزن میوه چهار نمونه ۱۰۰ گرمی میوه از هر نژادگان (یک نمونه از هر تکرار) برداشت‌شده و به آزمایشگاه انتقال یافت. وزن و طول میوه به ترتیب توسط ترازوی دیجیتالی و کولیس برای ۲۰ میوه از هر تکرار برای هر نژادگان اندازه‌گیری گردید. عملکرد میوه هم بر اساس رابطه ۱ مورد اندازه‌گیری قرارگرفت.

$$\text{Productivity (gr)} = \text{Number of Inflorescence} \times \frac{\text{Fruits}}{\text{Inflorescence}} \times \text{Fruit Weight}$$ رابطه ۱)

برای اندازه‌گیری میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه از میزان مهارکنندگی رادیکال‌آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) استفاده‌شد. ابتدا عصاره های گیاهی در غلظت های متفاوت در متانل خالص تهیه‌شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه ها با استفاده از رابطه زیر به‌دست‌آمد (Ao *et al*., 2008). $R\% = AD - AS/AD \times 100$

R%: درصد مهار AD: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر AS: جذب نمونه ها در ۵۱۷ نانومتر

برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ها از پارامتر IC50 استفاده‌شد (IC50 غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال های‌آزاد را مهار می‌کند). میزان ترکیبات فنلی کل برای وزن تازه با استفاده از فولین-سیوکالتیو ۱۰ درصد و در جذب ۷۶۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر Epoch اندازه‌گیری‌شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی ($۵۰۰-۰ mg.l^{-1}$) از اسید گالیک۱ در متانول تهیه‌گردید. نتایج بر اساس واحد میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تازه بیان‌گردید (Guerrero *et al*., 2011).

تجزیه واریانس مرکب با استفاده از نرم افزار SAS ورژن 9.4 انجام پذیرفت. پارامترهای ژنتیکی بر اساس امید ریاضی میانگین مربعات با استفاده از نرم‌افزار SAS محاسبه گردید. تجزیه واریانس خوشه‌ای بر اساس هیت‌مپ با استفاده از نرم افزار R رسم گردید. تجزیه خوشه‌ای بر اساس مقیاس فاصله‌ای اقلیدسی و روش گروه‌بندی Ward بود.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) اجزای واریانس ژنتیکی برای تمامی صفات مطالعه شده معنی معنی‌دار بود. همچنین در صفات اندازه‌گیری شده اثر سال اختلاف معنی‌داری نشان داد. در نتیجه صفات مختلف نژادگان‌های بررسی شده در طی سال‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

Sources of variation	Degree of freedom	Mean-Square					E(MS)
		IC50	Phenol	Fruit Weight	Fruit Length	Productivity	
Year	1	$1.45^{n.s}$	$3.35^{n.s}$	$0.006^{n.s}$	$0.01^{n.s}$	$661.14^{n.s}$	$\sigma_e^2 + a\sigma_{r(y)}^2 + ra\sigma_y^2$
Error	6	0.79	0.50	0.0017	0.0016	317.46	$\sigma_e^2 + a\sigma_{r(y)}^2$
Accession	13	2750.32^{**}	10249.37^{**}	1.07^{**}	0.20^{**}	5433935.98^{**}	$\sigma_e^2 + r\frac{a}{a-1}\sigma_{ya}^2 + ry\frac{\sum a^2}{(a-1)}$
Year× Accession	13	1.83^{**}	4.41^{**}	0.010^{**}	0.10^{**}	3773.29^{**}	$\sigma_e^2 + r\frac{a}{a-1}\sigma_{ya}^2$
Error	78	0.77	1.45	0.0027	0.0040	409.37	σ_e^2
CV (%)	-	1.36	0.37	6.15	4.92	3.06	-

n.s, * & ** non-significant and significant at % 5 and 1% respectively, CV: Coefficient of variation; E(MS): Expected value of mean square

تنوع ژنتیکی و برآورد وراثت پذیری

برآورد وراثت پذیری و پارامترهای ژنتیکی در جدول ۲ آمده است. دامنه تنوع فنوتیپی بین ۸/۷۹ درصد برای فروزه طول میوه تا ۱۲۴/۹۴ درصد برای عملکرد میوه بود. همچنین دامنه تنوع ژنتیکی نیز بین ۸/۶۲ درصد برای فروزه طول میوه تا ۱۲۴/۹۳ درصد برای فروزه عملکرد میوه بود. بعد از فروزه عملکرد بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به فروزه های وزن میوه (۴۲/۴۹ درصد) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۲۸/۶۱ درصد) بود. دامنه وراثت پذیری نیز بین ۹۶/۰۸ برای فروزه طول میوه تا ۹۹/۹۹ درصد برای فروزه عملکرد بود.در مجموع، تمامی صفت اندازه‌گیری شده وراثت پذیری عمومی بالایی را نشان دادند.

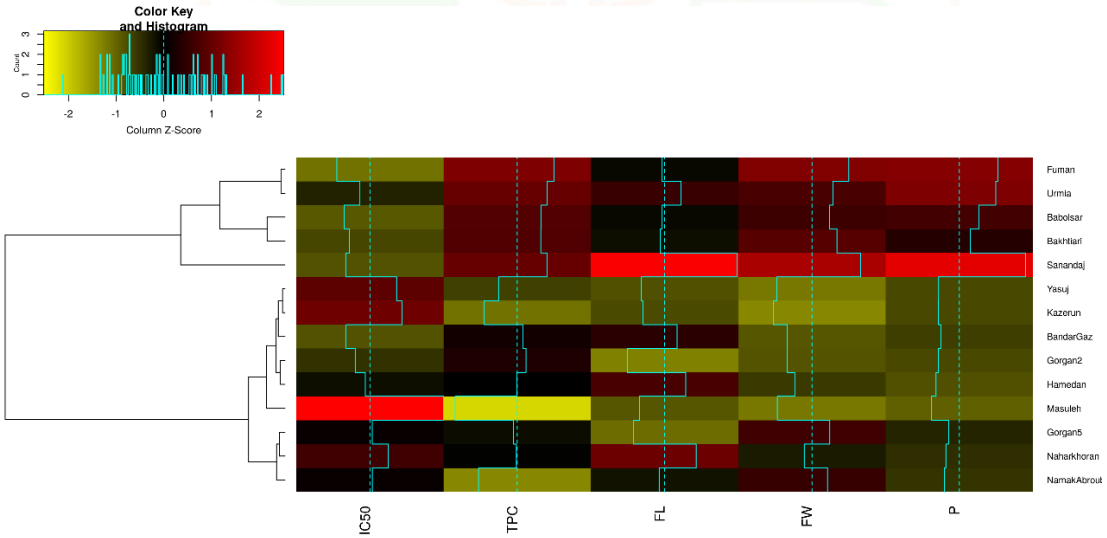
.

Traits	σ^2_g	σ^2_{ph}	CV_g	CV_{ph}	h^2	$SE(h^2)$
IC50	343.5610	343.6580725	28.6125	28.6165	0.999718	0.00011235
Total phenol content	1280.6201	1280.8017	11.2338	11.2346	0.999858	0.00005641
Fruit Weight	0.1334	0.1338	42.4911	42.5467	0.997386	0.00103301
Fruit Length	0.0123	0.0128	8.6249	8.7991	0.960802	0.00783898
Productivity	678770.3363	678821.5075	124.9381	124.9428	0.999925	0.00002998

SE stand for standard error.

تشابه بین نژادگان‌های تمشک سیاه بررسی شده

هیت مپ و دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نژادگان‌های بررسی شده در شکل ۱ آمده است. دندوگرام بدست آمده ارتباط بین نژادگان‌های مختلف (ردیف) و فروزه‌ها (ستون) را بر ساسا میانگین امتیاز عدد Z (Average Z-Score) نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده نژادگان‌های بررسی شده به دو گروه مجزا تقسم شدند. نژادگان‌های گروه اول (فومن، ارومیه، بابلسر، بختیاری و سنندج) از نظر IC50 مقدار کم و از نظر دیگر صفات مقدار بالایی را نشان دادند. نژادگان‌های یاسوج، کازرون، بندر گز، گرگان۲، گرگان۵، همدان، ماسوله، نهارخوران و نمک‌آبرود در گروه دوم قرار گرفتند که بیشترین میزان IC50 و مقدار پایین‌تری را از لحاظ دیگر صفات نشان دادند. در این گروه نژادگان ماسوله از نظر صفات بررسی شده با دیگر اعضای گروه مقداری تفاوت نشان داد.



شکل ۱- هیت مپ و دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نژادگان‌های تمشک سیاه مورد بررسی از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل کل و فروزه‌های کمی میوه. TPC، FL، FW و P به ترتیب نمایانگر محتوای فنل کل، طول میوه، وزن میوه و عملکرد میوه می‌باشد.

بحث

نتایج نشان داد که از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی در بین نژادگان‌های بررسی شده تنوع وجود دارد. وجود تنوع از لحاظ خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل کل بین رقم‌های هیبرید تمشک گزارش گردیده است (Clark *et al*., 2001). همچنین فروزه‌های کمی نیز اختلاف معنی‌داری را در بین نژادگان‌های بررسی شده نشان دادند. Moyer و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که بین ۲۷ ژنوتیپ تمشک از نظر وزن میوه تا میزان ۳/۷ برابر اختلاف وجود دارد. وزن میوه از جمله فروزه‌هایی

IrHC2019

است که اثر مستقیمی بر مقبولیت و همچنین عرضه تمشک چه به صورت تازه و چه به صورت پرورده دارد. طول میوه و قطر میوه نیز از جمله فروزه‌های بسیار مهمی هستند که در نهایت اندازه میوه نهایی را تعیین می‌کنند. طول میوه از دیرباز از جمله اهدفا به‌نژادی در بسیاری از برنامه‌ها بوده است و به عنوان یکی از اجزای مهم عملکرد می‌باشد (Daubeny, 1996). عملکرد تمشک به طور کلی با توجه به نوع رقم، سیستم مدیریت مزرعه و مکان تولید متفاوت است. با توجه به اساس ژنتیکی پیچیده عملکرد، به‌نژادی از نظر عملکرد می‌تواند یک چالش بالقوه باشد. بررسی تنوع عملکرد و اجزای عملکرد بر روی تعداد محدودی از ژنوتیپ‌های تمشک قبلاً انجام گرفته است (Takeda *et al.*, 2003). با این حال، اکثر این گزارش‌ها اشاره‌ای به روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی ندارد و بیشتر از نقطه نظر مدیریت فیزیولوژیکی و کشت عملکرد و اجزای عملکرد را مورد بررسی قرار داده‌اند. به طور کلی فروزه‌های تولید مثلی همانند طول و اندازه میوه همراه با ویژگی‌های کیفی و عملکرد از جمله اهداف اصلی اکثر برنامه‌های به‌نژادی تمشک بوده است (Clark and Finn, 2011). نتایج حاصل از پارامترهای ژنتیکی حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا بین نژادگان‌های تمشک بررسی شده از نظر فعالیت آنتی‌کسیدانی، محتوای فنل کل و فروزه‌های کمی میوه بود. تنوع ژنتیکی ارقام تمشک برزیلی در دو ناحیه مختلف انجام گرفته و نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا بود (Maro *et al.*, 2014). بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای نژادگان‌های بررسی شده به دو گروه مجزا طبقه‌بندی شدند. Gharaghani و همکاران (۲۰۱۴) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های تمشک سیاه را در دو شرایط محیطی مختلف بررسی نموده و بر این اساس بیان نمودند که ۱۶ ژنوتیپ مورد بررسی بدون توجه به خاستگاه جغرافیایی آن‌ها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند. به طور کلی، بر اساس تنوع ژنتیکی بررسی شده در نژادگان‌های تمشک ایران نشان داد که به‌نژادی به منظور تولید رقم‌های با عملکرد بالا و همچنین خصوصیات فیتوشیمیایی بیشتر امکان پذیر است.

منابع

Ao, C., Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. and Tawata, S., 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Ficus microcarpa L. fil. extract. Food control, 19(10), pp.940-948.

Bhandari, H.R., Bhanu, A.N., Srivastava, K. and Singh, M.N., Shreya and Hemantaranjan, A., 2017 .Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants-An Overview. Adv Plants Agric Res, 7(3), p.00255.

Clark, J.R. and Finn, C.E., 2011. Blackberry breeding and genetics. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology, 5(1), pp.27-43.

Clark, J.R., Howard, L. and Talcott, S., 2001, July. Antioxidant activity of blackberry genotypes. In VIII International Rubus and Ribes Symposium 585 (pp. 475-480).

Daubeny HA (1996) Brambles. In: Janick J, Moore JN (Eds) Fruit Breeding (Vol II) Vine and Small Fruits, John Wiley & Sons, Inc., New York pp 109- 190

Folta, K.M. and Kole, C. eds., 2016. Genetics, genomics and breeding of berries. CRC Press.

Gharaghani, A., Momeni, S. H. A., and Eshghi, S. (2014, April). Comparing Fruit Quantitative and Chemical Properties of Wild Blackberry (Rubus sanctus Schreb) Genotypes from North and South of Iran. In *II* International Symposium on Wild Relatives of Subtropical and Temperate Fruit and Nut Crops 1074 (pp. 59-66).

Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, A., Medel, F., Schalchli, H., Hormazabal, E., Bensch, E. and Alberdi, M., 2010. Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 70(4), pp.537-544.

Hadadinejad, M. (2014). Establishment of research collection of blackberries in east of mazandaran. In: Proceedings of 3rd national congress of organic and customary agriculture, 20-21 Aug., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, pp. 1-4. (in Farsi).

Maro, L. A. C., Pio, R., Guedes, M. N. S., Abreu, C. M. P. D., and Moura, P. H. A. (2014). Environmental and genetic variation in the post-harvest quality of raspberries in subtropical areas in Brazil. Acta Scientiarum. Agronomy, 36(3), 323-328.

Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B. and Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(3), pp.519-525.

Ryu, J., Kwon, S.J., Jo, Y.D., Jin, C.H., Nam, B.M., Lee, S.Y., Jeong, S.W., Im, S.B., Oh, S.C., Cho, L. and Ha, B.K., 2016. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activity in Blackberry (Rubus fruticosus L.) Fruits of Mutant Lines at the Different Harvest Time. Plant Breeding and Biotechnology, 4(2), pp.242-251.

Takeda F, Strik BC, Peacock D, Clark JR (2003) Patterns of floral bud deve- lopment in canes of erect and trailing blackberries. Journal of the American Society for Horticultural Science 128, 3-7.

IrHC2019

Genetic Variation and Heritability Assessment of Blackberries (*Rubus* spp.) Accessions in Terms of Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Fruit Quantitative Traits in

Zahra Shams*, Saeid Eshghi, Enayatolah Tafazoli, Ali Gharaghani
Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
**Corresponding Author: zahrashams1987@gmail.com*

Abstract

Due to the lack of commercial cultivation of blackberry in Iran and existence of valuable germplasm of this plant species, this study was conducted to evaluated genetic diversity and heritability of wild germplasm of Iranian blackberries, as first step of a plant breeding programs. In current study, fourteen accession of wild blackberry assigned to four different species which collected from different regions of Iran. These plant materials subjected to RCBD design with four replications in two consecutive years (2015 and 2016) for assessment of antioxidant activity, total phenolic content and fruit quantitative traits. Estimation of genotypic coefficients of variation demonstrated the substantial genetic variation among blackberries accession. Furthermore, according to the extremely high heritability estimates (range, from 96.03 for fruit length to 99.99 for productivity), accession with high quantity of studied traits could be effective in improved productivity with enhanced antioxidant activity. Based on heat map and hierarchical clustering, the studied accession divided in two distinct group. The group I shows low level for IC50 and high quantity for other traits, while the group II demonstrated the opposite.

***Keywords*:** Genetic parameter, Heritability, Blackberry

IrHC2019