بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر آلبالوی ایران با ارقام خارجی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

رقیه نجف‌زاده [1]، کاظم ارزانی [2*]، ناصر بوذری [3]، علی ساعی [4]

۱ و ۲-به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد فیزیولوژی و اصلاح درختان میوه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۳- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج. ۴- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور، اصفهان.

چکیده

در جریان برنامه‌های اصلاحی جمع‌آوری و ارزیابی ژرم پلاسم‌های بومی آلبالو از مناطق مختلف ایران در جهت دستیابی به پایه و ارقام مناسب، برخی از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نظر خصوصیات رشدی وکیفیت میوه کاملا برتری داشته و می‌توانند برای معرفی ارقام جدید مورد توجه قرار بگیرند. در این پژوهش به بررسی گوناگونی ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی آلبالوهای برتر ایرانی با ارقام خارجی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR پرداخته شد. بر اساس الگوی نواری حاصل از ۳۰ آغازگر مورد استفاده، ۲۳ آغازگرتوانستند الگوی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کنند. آغازگرهای مورد استفاده ۴۸۹ باند تولید کردند که ۴۸۲ باند چندشکل بودند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل‌ها از ۹ تا ۲۹ آلل با میانگین ۲۱/۳۴ متغیر بود و محتوای اطلاعات چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۸۵ تا ۰/۹۶ با میانگین ۰/۹۳ ارزیابی شد. نتایج ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها نشان داد که محدوده تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بین ۰/۵۶ تا ۰/۷۷ متغیر بود که این نشان دهنده تنوع بالای بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را با تشابه ژنتیکی ۰/۷۲ به هشت گروه مجزا تقسیم کرد. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های ایرانی برتری‌هایی نسبت به ارقام خارجی دارند و در اکثر گروه‌ها جدا از ارقام خارجی قرارگرفتند، می‌توانند به عنوان ژنوتیپ‌های امیدبخش برای ارزیابی‌های بعدی و تکمیلی در برنامه‌های اصلاحی آلبالو جهت معرفی رقم مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: گوناگونی ژنتیکی، ژنوتیپ‌های برتر آلبالوی ایران، نشانگرهای ISSR

مقدمه

چری‌ها متعلق به خانواده رزاسه۱، زیرخانواده پرونوئیده۲، جنس پرونوس۳ و زیرجنس Cerasus (Webster and Looney, 1996) می‌باشند. طبق گزارشات FAO میزان تولید چری‌ها در ایران ۲۲۵ هزار تن می‌باشد که بعد از کشورهای ترکیه و آمریکا در مقام سوم قرار دارد (Anonymous, 2013). گونه‌های اصلی و مثمر این زیرجنس گیلاس (Prunus avium L.)، آلبالو (Prunus cerasus L.) و هیبریدهای بین گونه‌ای آنها می‌باشند (Lezzoni, 2008). ایران کشوری غنی از منابع ژنتیکی چری‌ها می‌باشد (Shahi-Gharahlar et al., 2010؛ Ganji Moghadam and Khalighi, 2007). ارزیابی و طبقه‌بندی خصوصیات این ژرم پلاسم غنی، مرحله مهمی در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب چری‌ها می‌باشد (Shahi-Gharahlar et al., 2010). شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان به طور فزاینده‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود (Lezzoni, 2008). در مقایسه با نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ISSR بر بسیاری از محدیتهای موجود فایق آمده و دارای تکنیک ساده و ارزانی می‌باشد (Godwin et al., 1997; Reddy et al., 2002). در جریان برنامه‌های اصلاحی جمع‌آوری و ارزیابی ژرم پلاسم‌های بومی آلبالو از مناطق مختلف ایران در جهت دستیابی به پایه و ارقام مناسب، برخی از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نظر خصوصیات رشدی وکیفیت میوه کاملا برتری داشته و می‌توانند برای معرفی ارقام جدید مورد توجه قرار بگیرند (بوذری، طرح ملی آلبالو و گیلاس، نتایج منتشر نشده).

[1] - *Rosaceae*
[2] - *Prunoideae*
[3] - *Prunus*

هدف از انجام این تحقیق بررسی گوناگونی ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی آلبالوهای برتر ایرانی با ارقام خارجی می‌باشد. امید است با انجام آزمون‌های تکمیلی و ارزیابی‌های بعدی بتوان ژنوتیپ‌های برتر را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی و در آینده ارقام جدیدی از آلبالو به صنعت میوه‌کاری معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر به بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر آلبالوی ایران که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری گردیده‌اند، همراه با ارقام تجاری خارجی (جدول ۱) موجود در کلکسیون موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کمال‌آباد کرج با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR پرداخته شد. بدین منظور نمونه‌های برگی تازه از ژنوتیپ‌های آلبالو جمع‌آوری و جهت بررسی‌های مولکولی به پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) انتقال داده شدند.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های آلبالوی مورد بررسی

شماره	نام ژنوتیپ	مبدأ
۱	KaThLa1SSGe21	لواسان
۲	Hamedan	همدان
۳	KaTaJo2Ge9	طالقان
۴	Ka ThMe3Ge19	چالوس
۵	KaThLa8Ge31	لواسان
۶	KrRIV4C20	کرمان
۷	EsASC1V1SS1	اصفهان
۸	KaThLa3Ge23	لواسان
۹	Bolghar	بلغارستان (رقم شاهد)
۱۰	MontMorency	فرانسه (رقم شاهد)
۱۱	ErdiJubilium	مجارستان (رقم شاهد)
۱۲	ErdiBotermo	مجارستان (رقم شاهد)

ارزیابی‌های مولکولی: استخراج DNA با استفاده از روش CTAB، مطابق روش ساندرز و همکاران انجام شد (Saunders et al., 2001). کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با نانودارپ مدل ND-1000 و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۷ درصد تعیین شد. برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1]، تعداد ۳۰ آغازگر ISSR انتخاب و پس از سنتز توسط شرکت متابیون آلمان،در این پژوهش استفاده گردید. اطلاعات مربوط به این آغازگرها در جدول ۲ آمده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر واکنش PCR به صورت 1x، ۲ mM Mgcl2، ۰/۸ mM dNTPs، ۵ µM از هر

[1] - Polymerase chain reaction

آغازگر، ۱ واحد از آنزیم Tag DNA polymerase و ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۹۴C° برای واسرشت سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه، تعداد ۴۰ چرخه بصورت ۹۴C° (۳۰ ثانیه)، دمای اتصال با توجه به هر پرایمر (۳۰ ثانیه) و ۷۲C° (۱ دقیقه) برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲C° (۵ دقیقه) برای تکمیل بسط و ۴C° (نگهدارنده) با استفاده از دستگاه ترموسایکر (Applied Biosystems, Veriti, USA) بود. جهت الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر، مقدار ۸ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر هر نمونه با ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری که شامل (۹۵ درصد فرمامید، ۰.۵ درصد برموفنول بلو، ۰.۵ درصد زایلن سیانول ،۱۰ میلی مولار EDTA و ۰/۴ درصد Gel red) مخلوط شد و سپس در چاهک های ژل آگارز ٪ ۱/۵ تهیه شده با بافر TAE 1x، تزریق شدند و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۹۵ ولت الکتروفورز شدند. برای محاسبه اندازه قطعات، از سایز مارکر 1Kb (SM0311, Fermentase) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی: امتیازبندی الگوی نواری آغازگرها به طور کامل از انتخاب باندها تا اسکوردهی، با استفاده از نرم‌افزار Phoretix pro, V. 10.4 به صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) برای هر نوار صورت گرفت. نمودار خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه ساده۱ و الگوریتم UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 انجام گرفت. درصد چندشکلی۲ و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)۳ هر آغازگر از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

درصد چندشکلی = تعداد باندهای چندشکل / کل باندها ×۱۰۰

$PIC=1-\sum(Pi/Pk)2$ آلل‌های هر باند ، $Pk=$ کل آلل‌ها $Pi=$

نتایج و بحث

بر اساس الگوی نواری حاصل از ۳۰ آغازگر مورد استفاده، ۲۳ آغازگرتوانستند الگوی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کنند. آغازگرهای مورد استفاده ۴۸۹ باند تولید کردند که ۴۸۲ باند چندشکل بودند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل‌ها از ۹ تا ۲۹ آلل با میانگین ۲۱/۳۴ متغیر بود که بیانگر تفاوت در قدرت شناسایی چندشکلی نشانگرها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای ISSR-6، ISSR-13، ISSR-14 و ISSR-19 تعداد باندهای پلی‌مورفیسم بیشتری داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۸۵ تا ۰/۹۶ با میانگین ۰/۹۳ ارزیابی شد. بیشترین PIC آغازگر که نشانه کارایی آغازگر در شناسایی ژنوتیپ‌ها است، متعلق با آغازگر ISSR-13 به میزان ۰/۹۶بود (جدول ۲). سایر مشخصات مربوط به هر آغازگر در جدول ۲ آمده است. بیشترین ضریب همبستگی با استفاده از ضریب تشابه ساده معادل r=۰/۹۱ به دست آمد. بدین منظور ضرایب تشابه ژنتیکی ساده برای ۱۲ ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفت. ضرایب تشابه ساده بین ۰/۵۶ تا ۰/۷۷ متغیر بود که این نشان دهنده تنوع بالای بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ Ka ThMe3Ge19 از چالوس و ژنوتیپ KaThLa8Ge31 از لواسان بود (۰/۷۷). کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ EsASC1V1SS1 از اصفهان و رقم بلغار (رقم شاهد) از بلغارستان به دست آمد (۰/۵۶). در تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین ضرایب تشابه (۰/۷۲)، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در هشت گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۱).گروه اول شامل ژنوتیپ KaThLa1SSGe21 از لواسان،گروه دوم شامل ژنوتیپ Hamedan از همدان، گروه سوم شامل دو ژنوتیپ KaTaJo2Ge9 از طالقان و KrRIV4C20 از کرمان بود. گروه چهارم که بزرگترین گروه را تشکیل می‌دهد شامل ژنوتیپ‌های KaThMe3Ge19 از چالوس، KaThLa8Ge31 از لواسان، KaThLa3Ge23 از لواسان و رقم

[1] - SM
[2] - Polymorphic
[3] - Polymorphism Information Content

بوترمو از مجارستان بود. گروه پنجم شامل رقم اردی جوبلیوم از مجارستان، گروه ششم شامل ژنوتیپ EsASC1V1SS1 از اصفهان، گروه هفتم شامل رقم بلغار از بلغارستان و گروه هشتم شامل رقم مونت مورنسی از فرانسه می باشد. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های ایرانی برتری‌هایی نسبت به ارقام خارجی دارند و در اکثر گروه‌ها جدا از ارقام خارجی قرارگرفتند، می‌توانند به عنوان ژنوتیپ‌های امیدبخش برای ارزیابی‌های بعدی و تکمیلی در برنامه‌های اصلاحی آلبالو جهت معرفی رقم مورد توجه قرار گیرند.

منابع

Anonymous. 2013. FAOSTAT, FAO Statistical Databases (United Nations), FAO (www.faostat.fao.org, 30 March 2013).

Ganji Moghadam, E., and A. Khalighi. 2007. Relationship between vigor of Iranian Prunus mahaleb L. selected dwarf rootstocks and some morphological characters. Sci. Hortic. 111: 209–212.

Godwin, I. D., E. A. B. Aitken, and L. W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis. 18: 1524–1528.

Iezzoni, A. F. 2008. Cherries. In: Hancock, J.F. (Ed.), Temperate Fruit Crop Breeding. Springer, pp: 151-175.

Reddy, M. P., N. Sarla, and E. A. Siddiq,. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. 128: 9–17

Saunders, J. A., J. M. Pedroni, L. D. J. Penrose and A. J. Fist. 2001. AFLP analysis of opium poppy. Crop Sci. 41: 1596–1601.

Shahi-Gharahlar, A., Z. Zamani, M. R. Fatahi, and N. Bouzari. 2010. Assessment of morphological variation between some Iranian wild Cerasus sub-genus genotypes. Hort. Environ. Biotechnol. 51: 308–318.

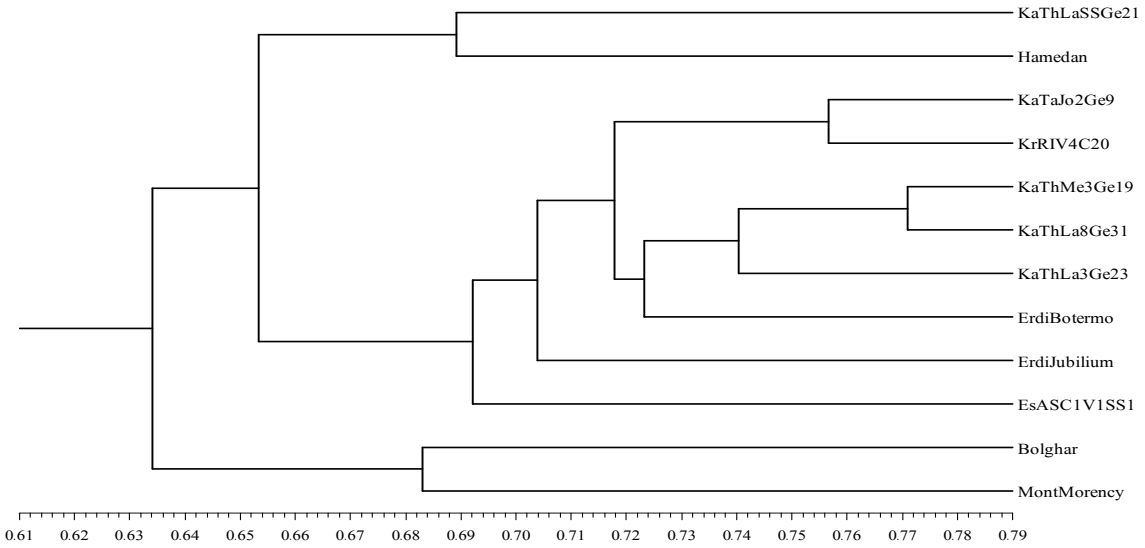
Webster, A. D. and N. E. Looney. 1996. Cherries: Crop Physiology, Production and Uses. CAB International Press, 513 pp.

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده و نتایج حاصل از آنها

آغازگر	توالی 3’ ⟵ 5 ’	دمای اتصال پرایمر (0C)	تعداد کل باندها (a)	تعداد باندهای پلی مورفیسم (b)	درصد چندشکلی (%) (b/a)×100	اطلاعات محتوای چندشکلی (PIC)	محدوده- ی باند (bp)
ISSR-1	GTGGTGGTGGC	۳۰	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰.۹۰	۱۵۰۰- ۶۰۰
ISSR-2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۴۸	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰.۹۴	۱۵۰۰- ۴۰۰
ISSR-3	CTCTCTCTCTCTCTCTG	۴۷	۲۵	۲۴	۹۶.۰۰	۰.۹۴	۲۵۰۰- ۷۰۰
ISSR-4	GAGAGAGAGAGAGAGATG	۵۲	۲۶	۲۶	۱۰۰	۰.۹۴	۱۴۰۰- ۴۰۰
ISSR-5	AGAGAGAGAGAGAGAGTT	۵۲	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰.۹۴	۲۱۰۰- ۴۰۰
ISSR-6	CTCTCTCTCTCTG	۳۹	۲۹	۲۹	۱۰۰	۰.۹۴	۲۲۰۰- ۴۰۰

ISSR-7	CTCTCTCTCTCTCTCTTG	۴۷	۱۸	۱۷	۹۴.۴۴	۰.۹۳	۱۷۰۰– ۷۰۰
ISSR-8	CACACACACACAAC	۳۹	۲۵	۲۴	۹۶.۰۰	۰.۹۵	۲۳۰۰– ۷۰۰
ISSR-9	CACACACACACAGT	۳۹	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰.۸۹	۲۸۰۰– ۷۰۰
ISSR-10	CACACACACACAGG	۳۶	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰.۹۴	۱۷۰۰– ۴۰۰
ISSR-11	CACACACACACAAG	۳۰	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰.۹۴	۳۰۰۰– ۷۰۰
ISSR-12	CACACACACACACACAGG	۴۷	۱۵	۱۴	۹۳.۳۳	۰.۸۸	۲۱۰۰– ۵۰۰
ISSR-13	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	۵۳	۲۹	۲۹	۱۰۰	۰.۹۶	۲۸۰۰– ۴۰۰
ISSR-14	DBDACACACACACACAC	۵۵	۲۹	۲۹	۱۰۰	۰.۹۵	۲۸۰۰– ۴۰۰
ISSR-15	HVHTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC	۵۷	۹	۷	۷۷.۷۷	۰.۸۵	۱۸۰۰– ۶۰۰
ISSR-16	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۳	۲۵	۲۵	۱۰۰	۰.۹۵	۳۲۰۰– ۴۰۰
ISSR-17	ACACACACACACACACC	۵۳	۱۷	۱۷	۱۰۰	۰.۹۰	۲۲۰۰– ۶۰۰
ISSR-18	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	۴۷	۱۵	۱۴	۹۳.۳۳	۰.۹۰	۱۸۰۰– ۶۰۰
ISSR-19	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۵۲	۲۹	۲۹	۱۰۰	۰.۹۵	۱۶۰۰– ۲۸۰
ISSR-20	ACACACACACACACACYG	۵۳	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰.۹۰	۲۸۰۰– ۴۰۰
ISSR-21	CACACACACACACACART	۴۸	۲۴	۲۴	۱۰۰	۰.۹۴	۱۷۰۰– ۶۰۰
ISSR-22	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	۴۷	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰.۹۳	۲۲۰۰– ۴۰۰

ISSR-23	GAGAGAGAGAGAGAGACG	۵۵	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰.۹۴	۳۲۰۰– ۴۰۰
Mean	--	--	۲۱.۳۴	۲۰.۹۵	۹۸.۴۵	۰.۹۳	--
Total	--	--	۴۸۹	۴۸۲	--	--	--



شکل ۱- نمودار خوشه‌ای ژنوتیپ‌های آلبالوی مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه ساده و الگوریتم UPGMA

Evaluation of Genetic Relationships between Iranian Superior Sour Cherries and Foreign Cultivars using ISSR Markers

R. Najafzadeh1, K. Arzani2*, N. Bouzari3 and A. Saei

1,2- Dept. of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Seed and Plant Improvement Institute, Horticultural Section, Karaj, Iran.

4- Agricultural Biotechnology Research Institute, Esfahan.

Abstract

During the breeding programs and collection and evaluation of local sour cherry germplasms from different areas of Iran in order to achieve proper cultivars and varieties, it was found that some of the collected genotypes have quite superior growth characteristics and fruit quality, and can be considered for introduction of new cultivars. In this study, the genetic diversity and relationships between Iranian superior sour cherries and foreign cultivars was identified and evaluated using ISSR markers. Based on the banding patterns obtained from 30 primer used, 23 primer could generate polymorphic and able-to-be-scored patterns. The primers produced 489 bands, of which 482 bands were polymorphic. The number of alleles per locus ranged from 9 to 29 alleles with an average of 21/34, and polymorphism information content among genotypes ranged from 0/85 to 0/96 with an average of 0/93. Similarity matrix between genotypes showed that the range of genetic similarity between genotypes ranged from 0/56 to 0/77. It indicates the high diversity among the genotypes. Cluster analysis, with genetic similarity of 0/72, divided the genotypes into eight distinct groups. Since the Iranian genotypes are superior to foreign genotypes and are separated from them in most of the groups, so they can be considered as promising genotypes for further evaluations in the framework of breeding and final new cultivar release programs.

Keywords: Genetic diversity, Iranian superior sour cherry genotypes, ISSR markers