

شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر آلبالوی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

رقیه نجف‌زاده¹، کاظم ارزانی²، ناصر بوذری³، علی ساعی⁴

1 و 2- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد فیزیولوژی و اصلاح درختان میوه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

3- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج. 4- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور، اصفهان.

چکیده

ایران دارای تنوع نسبتاً بالایی از درختان آلبالو می‌باشد. در جریان برنامه‌های اصلاحی جمع‌آوری و ارزیابی ژرم پلاسماهای بومی آلبالو از مناطق مختلف ایران در جهت دستیابی به پایه و ارقام مناسب، برخی از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نظر خصوصیات رشدی و کیفیت میوه کاملاً برتری داشته و می‌توانند برای معرفی ارقام جدید مورد توجه قرار بگیرند. در این پژوهش به شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) پرداخته شد. هدف از انجام این پژوهش بررسی گوناگونی ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی آلبالوهای برتر ایرانی با ارقام خارجی می‌باشد. بر اساس الگوی نواری حاصل از 23 جفت آغازگر مورد استفاده، 19 جفت توانستند الگوی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کنند. آغازگرهای مورد استفاده 148 باند تولید کردند که 122 باند چندشکل بودند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل‌ها از 2 تا 15 آلل با میانگین 7/78 متغیر بود و محتوای اطلاعات چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها از 0/47 تا 0/89 با میانگین 0/79 ارزیابی شد. نتایج ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها نشان داد که محدوده تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بین 0/38 تا 0/90 متغیر بود که این نشان دهنده تنوع بالای بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را با تشابه ژنتیکی 0/60 به هفت گروه مجزا تقسیم کرد. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های ایرانی برتری‌هایی نسبت به ارقام خارجی دارند و در اکثر گروه‌ها جدا از ارقام خارجی قرار گرفتند، 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 SSR

مقدمه

آلبالو (*Prunus cerasus* L.) متعلق به خانواده رزاسه، جنس پرونوس، زیر جنس *Cerasus* (Webster and Looney, 1996) با خواص غذایی بالا، برای سلامتی انسان و جلوگیری از از بیماری‌ها، سرطان‌ها و دیابت‌ها مفید می‌باشد. چری‌ها از میوه‌های مهم باغبانی می‌باشند. منشا پیدایش دو گونه مهم چری‌ها یعنی آلبالو و گیلاس از مناطق آسیایی، ایران، عراق و سوریه می‌باشد (نجف‌زاده، 1391). طبق گزارشات FAO میزان تولید چری‌ها در ایران 225 هزار تن می‌باشد که بعد از کشورهای ترکیه و آمریکا در مقام سوم قرار دارد (Anonymous, 2013). ایران کشوری غنی از منابع ژنتیکی چری‌ها می‌باشد (Ganji Moghadam and Shahi-Gharahlar et al., 2010; Khalighi, 2007). ارزیابی و طبقه‌بندی خصوصیات این ژرم پلاسما 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). نشانگرهای مولکولی SSR برای این کار مناسب می‌باشند و در ده سال گذشته اکثر بررسی‌های تنوع ژنتیکی آلبالو با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR می‌باشد (Ohta et al., 2005; Holtken and Gregorius, 2006; Pedersen, 2006).

در جریان برنامه‌های اصلاحی جمع‌آوری و ارزیابی ژرم پلاسماهای بومی آلبالو از مناطق مختلف ایران در جهت دستیابی به پایه و ارقام مناسب، برخی از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نظر خصوصیات رشدی و کیفیت میوه کاملاً برتری داشته و می‌توانند برای

معرفی ارقام جدید مورد توجه قرار بگیرند (بوذری، طرح ملی آلبالو و گیلاس، نتایج منتشر نشده). 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 1) موجود در کلکسیون موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کمال‌آباد کرج با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR 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 1- اسامی ژنوتیپ‌های آلبالوی مورد بررسی

شماره	نام ژنوتیپ	مبدأ
1	KaThLa1SSGe21	لواسان
2	Hamedan	همدان
3	KaTaJo2Ge9	طالقان
4	Ka ThMe3Ge19	چالوس
5	KaThLa8Ge31	لواسان
6	KrRIV4C20	کرمان
7	EsASC1V1SS1	اصفهان
8	KaThLa3Ge23	لواسان
9	Bolghar	بلغارستان (رقم شاهد)
10	MontMorency	فرانسه (رقم شاهد)
11	ErdiJubilium	مجارستان (رقم شاهد)
12	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 0/7 درصد تعیین شد و سپس غلظت یکسان از DNA نمونه‌ها (10 نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد. برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز¹، تعداد 23 جفت آغازگر اختصاصی آلبالو بر اساس مطالعات قبلی انتخاب و پس از سنتز توسط شرکت متابیون آلمان، در این پژوهش استفاده

¹ - Polymerase chain reaction

گردید. اطلاعات مربوط به این آغازگرها در جدول 2 آمده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم 25 میکرولیتر شامل بافر واکنش PCR به صورت 1x، 2 mM MgCl₂، 0/8 mM dNTP_s، 5 μM از هر آغازگر، 1 واحد از آنزیم Tag DNA polymerase و 25 نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه 94°C برای واسرشت سازی اولیه به مدت 3 دقیقه، تعداد 40 چرخه بصورت 94°C (30 ثانیه)، دمای اتصال با توجه به هر پرایمر (30 ثانیه) و 72°C (1 دقیقه) برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه 72°C (5 دقیقه) برای تکمیل بسط و 4°C (نگهدارنده) با استفاده از دستگاه ترموسایکر (Applied Biosystems, Veriti, USA) بود. جهت الکتروفورز محصول PCR، مقدار 2 میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر هر نمونه با 6 میکرولیتر بافر بارگذاری (98 درصد فرمامید، 20 میلی‌گرم برموفنول بلو و 2 درصد از EDTA 0.5 M pH= 8.0) مخلوط شد و پس از 7 دقیقه گرم کردن در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و سرد کردن در یخ، مقدار 3 میکرولیتر در چاهک ژل اکریل آمید 6 درصد واسرشت حاوی 7 مولار اوره بارگذاری شد. ژل با شدت جریان 200 میلی‌آمپر به مدت 1 ساعت الکتروفورز شد و جهت نمایان کردن ژل از روش رنگ آمیزی نیترا نقره (Bassam *et al.*, 1991) استفاده گردید.

امتیازدهی و 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 (1) و عدم حضور (0) برای هر نوار صورت گرفت. نمودار خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد¹ و الگوریتم UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 انجام گرفت. درصد چندشکلی² و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)³ هر آغازگر از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$100 \times \text{کل باندها} / \text{تعداد باندهای چندشکل} = \text{درصد چندشکلی}$

$$PIC = 1 - \sum (P_i/P_k)^2$$

$P_i =$ آلل‌های هر باند ، $P_k =$ کل آلل‌ها

نتایج و بحث

بر اساس الگوی نواری حاصل از 23 جفت آغازگر مورد استفاده، 19 جفت توانستند الگوی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کنند. آغازگرهای مورد استفاده 148 باند تولید کردند که 122 باند چندشکل بودند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل‌ها از 2 تا 15 آلل با میانگین 7/78 متغیر بود که بیانگر تفاوت در قدرت شناسایی چندشکلی نشانگرها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای PMS49، EMPA018 و Pchgms3 بالاترین درصد چندشکلی را به خود اختصاص دادند. محتوای اطلاعات چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها از 0/47 تا 0/89 با میانگین 0/79 ارزیابی شد. بیشترین PIC آغازگر که نشانه کارایی آغازگر در شناسایی ژنوتیپ‌ها است، متعلق با آغازگر PMS3 به میزان 0/89% بود (جدول 2). سایر مشخصات مربوط به هر آغازگر در جدول 2 آمده است.

بیشترین ضریب همبستگی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد معادل $r=0/96$ به دست آمد. بدین منظور ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد برای 12 ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفت. ضرایب تشابه جاکارد بین 0/38 تا 0/90 متغیر بود که نشان دهنده تنوع بالای بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ KrThMe3Ge19 از چالوس و ژنوتیپ KrRIV4C20 از کرمان بود (0/90). کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ KrRIV4C20 از کرمان و رقم مونت مورنسی (رقم شاهد) از فرانسه به دست آمد (0/38). در تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین ضرایب تشابه (0/60)، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در هفت گروه مجزا قرار گرفتند (شکل 1). گروه

¹ - Jacard

² - Polymorphic

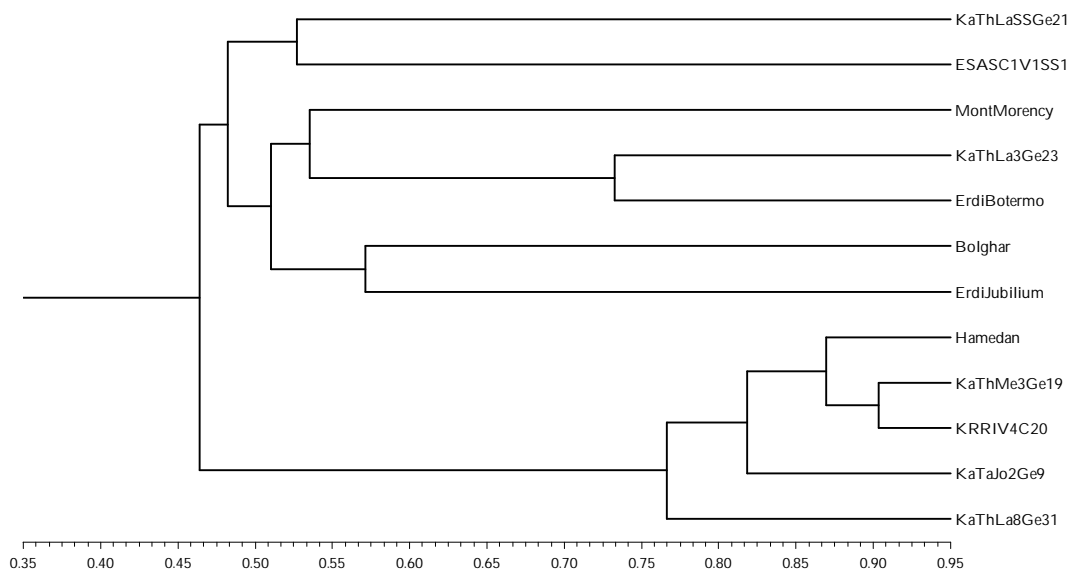
³ - Polymorphism Information Content

اول شامل ژنوتیپ KaThLa1SSGe21 از لواسان، گروه دوم شامل ژنوتیپ EsASC1V1SS1 از اصفهان، گروه سوم شامل رقم مونت مورنسی از فرانسه، گروه چهارم شامل دو ژنوتیپ KaThLa3Ge23 از لواسان و رقم بوتروم از مجارستان، گروه پنجم شامل رقم بلغار از بلغارستان و گروه ششم شامل رقم اردی جوپلیوم از مجارستان بود. گروه هفتم که بزرگترین گروه را تشکیل می‌داد شامل ژنوتیپ‌های Hamedan از همدان، KaTaJo2Ge9 از طالقان، KaThMe3Ge19 از چالوس، KaThLa8Ge31 از لواسان و KrRIV4C20 از کرمان بود. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های ایرانی برتری‌هایی نسبت به ارقام خارجی دارند و در اکثر گروه‌ها جدا از ارقام خارجی قرار گرفتند، می‌توانند به عنوان ژنوتیپ‌های امیدبخش برای ارزیابی‌های بعدی و تکمیلی در برنامه‌های اصلاحی آلبالو جهت معرفی رقم مورد توجه قرار گیرند.

جدول 2- جفت آغازگرهای SSR مورد استفاده و نتایج حاصل از آنها

آغازگر	توالی 3' → 5'	دمای اتصال پرایمر (°C)	تعداد کل باندها (a)	تعداد باندهای پلی مورفیسیم (b)	درصد چندشکلی (%) (b/a)×100	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)	محدوده‌ی باند (bp)
PceGA25	F:GCAATTCGAGCTGTATTTTCAGATG R:CAGTTGGCGGCTATCATGTCCTTAC	58.5	9	6	66.67	0.83	108-222
PceGA34	F:GAACATGTGGTGTGCTGGTT R:TCCACTAGGAGGTGCAAATG	53	12	12	100	0.88	140-174
PceGA59	F:AGAACCAAAAAGAACGCTAAAATC R:CCTAAAATGAACCCCTCTACAAAT	54	7	5	71.43	0.82	181-221
PS12A02	F:GCCACCAATGGTTCTTCC R:AGCACCAGATGCACCTGA	51	13	12	92.31	0.87	112-185
PMS3	F:TGGACTTCACTCATTTCAGAGA R:ACTGCAGAGAATTCACAACCA	53	15	14	93.33	0.89	155-212
BPPCT021	F:TGCATGAGAACTTGTGGC R:CCAAGAGCCTGACAAAGC	50.5	10	8	80.00	0.86	185-292
BPPCT027	F:CTCTCAAGCATCATGGGC R:TGTTGCCCGGTTGTAATATC	51	2	1	50.00	0.47	262-285
PMS49	F:TCACGAGCAAAAAGTGTCTCTG R:CACTAACATCTCTCCCCCTCC	56	4	4	100	0.69	75-185
PMS67	F:AGTCTCTCACAGTCAGTTTCT R:TTAACTTAACCCCTCTCCCTCC	54.5	4	3	75.00	0.62	85-165
EMPA004	F:TACGGTAGGCTTCTGCAAGG R:TTGGCAGGTTCTGTTACAT	53	4	3	75.00	0.72	145-180
EMPA015	F:TTTTGGTCAATCTGCTGCTG R:CTCTCATCTTCCCCCTCCTC	54.5	7	6	85.71	0.80	85-219
EMPA018	F:TCCAAGAACAAGCCAAAATC R:AATTTCAATGCATTCTGGATAG	50	10	10	100	0.88	75-135
EMPAS02	F:CTACTTCCATGATTGCCTCAC R:AACATCCAGAACATCAACACAC	53.5	7	5	71.43	0.82	185-270
EMPAS06	F:AAGCGGAAAGCACAGGTAG R:TTGCTAGCATAGAAAAGAATTGTAG	53	8	5	62.50	0.86	112-285
UCD-CH31	F:TCCGTTCTCTGTGAGTGTG R:CGATAGTTTCTTCCCAGACC	55.5	4	2	50.00	0.69	175-184
Pchgms1	F:GGGTAATATGCCCATTTGTGCAATC R:GGATCATTGAACTACGTCAATCCTC	59	8	7	87.50	0.83	145-184

Pchgms3	F:ACGGTATGTCCGTACACTCTCCATG R:CAACCTGTGATTGCTCCTATTAAC	60	10	10	100	0.88	152-191
UDP96001	F:AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R:TGCCATAAGGACCGGTATGT	52.5	9	5	55.56	0.87	95-132
UDP96005	F:GTAACGCTCGCTACCACAAA R:CCTGCATATCACCACCCAG	53.5	5	4	80.00	0.74	75-178
Mean	--	--	7.78	6.42	78.76	0.79	--
Total	--	--	148	122	--	--	--



شکل 1- نمودار خوشه‌ای ژنوتیپ‌های آلبالوی مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA

منابع

- نجف‌زاده، ر. 1391. کشت ارگانیک آلبالو و گیلاس. انتشارات سروا، چاپ اول، 157 ص.
- Anonymous. 2013. FAOSTAT, FAO Statistical Databases (United Nations), FAO (www.faostat.fao.org, 30 March 2013).
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 19: 680-683.
- 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.
- Holtken, A. M., and H. R. Gregorius. 2006. Detecting local establishment strategies of wild cherry (*Prunus avium* L.). *BMC Ecology* 6, 13 DOI: 10.1186/1472-6785-6-13.
- Iezzoni, A. F. 2008. Cherries. In: Hancock, J. F. (Ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding*. Springer, pp: 151-175.
- Ohta, S., T. Katsuki, T. Tanaka, T. Hayashi, Y. I. Sato, and T. Yamamoto. 2005. Genetic variation in flowering cherries (*Prunus subgenus Cerasus*) characterized by SSR markers. *Breed. Sci.* 55: 415-424.
- Pedersen, B. H. 2006. DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accessions using Simple Sequence Repeats. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 81(1): 118-124.
- 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.

Identification and evaluation of Iranian superior sour cherry genotypes using microsatellite markers (SSR)

R. Najafzadeh¹, K. Arzani^{2*}, 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

Iran has a relatively high variety of sour cherry trees. 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 of these genotypes was identified and evaluated using microsatellite markers (SSR). The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and determine genetic relationships between Iranian superior sour cherries and foreign cultivars. Based on the banding patterns obtained from 23 primer pairs used, 19 pairs could generate polymorphic and able-to-be-scored patterns. The primers produced 148 bands, of which 122 bands were polymorphic. The number of alleles per locus ranged from 2 to 15 alleles with an average of 7/78, and polymorphism information content among genotypes ranged from 0/47 to 0/89 with an average of 0/79. Similarity matrix between genotypes showed that the range of genetic similarity between genotypes ranged from 0/38 to 0/90. It indicates the high diversity among the genotypes. Cluster analysis, with genetic similarity of 0/60, divided the genotypes into seven 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, Microsatellite markers (SSR)