بررسی تنوع ژنتیکی نمونه های آلوی وحشی و تجاری با استفاده از مارکر مولکولی SSR

مرضیه اتحادپور (١)، محمدرضا فتاحی مقدم (٢)، ذبیح اله زمانی (٣)

١- دانشجوی کارشناسی ارشد ٢ و ٣- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی و مشخص نمودن روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های آلوی ایران (رامسر، کرج و مشهد) و ژنوتیپ-های تجاری موجود در مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران و همچنین نمونه میروبالان از ٨ نشانگر ریزماهواره استفاده شد. این نشانگرها تعداد ٦٨ آلل در ژنوتیپ‌های مورد بررسی تولید کردند. مکان‌های ریزماهواره UDA-005 و UDP98410 با ١٢ آلل بیشترین و مکان ریزماهواره CPSCT026 با ٤ آلل کمترین تعداد آلل را تولید کردند. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در بین مکان‌ها ٠/٧٣ بود که از ٠/٥٨ در ASSR71 تا ٠/٨٦ در مکان ریزماهواره UDA-005 متفاوت بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده ٠/٤٩ بود که از ٠/٣٤ در UDP98410 تا ٠/٧١ **در مکان ASSR72 متغیر** بود. برای گروه‌بندی نمونه‌ها از روش تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه SMC استفاده گردیده و دندروگرام روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA رسم گردید. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با مناطق جغرافیایی مطابقت نداشت به طوریکه آلوهای مناطق متفاوت در گروه‌های ژنتیکی مجاور هم قرار گرفتند. کمترین تشابه ژنتیکی (٠/٥٠٦) و بیشترین آن (٠/٩٢) و متوسط تشابه بین کل ژنوتیپ ها ٠/٧٧ بود که با متوسط تشابه گزارشات قبلی در ژنوتیپ‌های مشابه با استفاده از نشانگر RAPD (٠/٧١) مطابقت نشان داد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، آلوچه، پایه، میروبالان

مقدمه: آلو و گوجه از نظر رده بندی از جنس *Prunus* زیر جنس Prunophora و از خانواده Rosaceae می باشند. آلوی ژاپنی(*Prunus saliciana* Lindl.)، آلوی میروبالان (*Prunus cerasifera* Ehrh) وآلوهای آمریکایی (*P. americana*) دیپلوئید هستند (٢n=٢x=١٦) در مقابل *Prunus spinosa* L. تتراپلوئید (٢n=٤x=٣٢) و گونه های اروپایی (*P.domestica*) هگزا پلوئید (٢n=٦x=٤٨) هستند. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی وتعیین قرابت ژنتیکی برخی از ژنوتیپ های وحشی و ژنوتیپ‌های تجاری آلو، با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مواد گیاهی در این تحقیق شامل ٣٤ ژنوتیپ آلو موجود در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران در کرج که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است به همراه ٥ رقم تجاری و نمونه میروبالان بودند (جدول ١).

جدول ١- اسامی ژنوتیپ‌های آلوی مورد بررسی و منطقه جمع آوری

شما	ژنوتیپ	منط	شما	ژنوتیپ	منطق	شما	ژنوتیپ	منطق	شما	ژنوتیپ	منط
١	جواهر	رام	١١	4M-47	رام	٢١	برجی نیشابور ٢	نیشا	٣١	86-n-	–
٢	جواهر	رام	١٢	86-	رام	٢٢	آلوی وحشی	نیشا	٣٢	18-3	–
٣	جواهر	رام	١٣	ولیان ١	کرج	٢٣	آلوی شیرین هسته جدا	مشه	٣٣	86-	–
٤	جواهر	رام	١٤	ولیان ٢	کرج	٢٤	اسجیل (چناران)	مشه	٣٤	درگزی	–
٥	4M-	رام	١٥	ولیان ٣a	کرج	٢٥	آلوچه کلات نادر٢	مشه	٣٥	*سانتار	
٦	4M-	رام	١٦	ولیان ٣b	کرج	٢٦	آلوچه کلات نادر٤	مشه	٣٦	*شابرو	
٧	4M-	رام	١٧	ولیان ٤	کرج	٢٧	بی نام١	–	٣٧	*مجار	
٨	4M-	رام	١٨	ولیان ٥	کرج	٢٨	٨٦-٥١-٣	–	٣٨	*	
٩	4M-	رام	١٩	ولیان ٦	کرج	٢٩	بی نام ٢	–	٣٩	*قطره	
١٠	4M-	رام	٢٠	برجی	نیشا	٣٠	n-1	–	٤٠	*میرو	

* ژنوتیپ‌های موجود در مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

استخراج DNA از نمونه های برگی و با استفاده از روش موری و تامسون (١٩٨٠) با اندکی تغییرات بود. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ٨ جفت آغازگر SSR اختصاصی استفاده شد. جهت آشکارسازی قطعات DNA تکثیر شده در ژل، از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده گردید.

تجزیه داده‌ها: رتبه دهی باندها به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای داده ها بر اساس ضریب تشابه SMC به روش UPGMA انجام شد و تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 انجام گرفت. نرم افزار Pop Gene (1.32) برای محاسبه هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، تعداد آلل‌های قابل مشاهده (na)، تعداد آلل مؤثر ($ne = 1/\sum(p_i)^2$) که در آن p فراوانی آلل i^{th} است استفاده شد. هتروزیگوتی قابل مشاهده (Ho) در هر مکان ژنی از نسبت تعداد ژنوتیپ‌هایی که دو باند نشان دادند به کل ژنوتیپ‌ها به دست آمد. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) با استفاده از نرم افزار Power Marker V3.25 مطابق فرمول زیر محاسبه شد Botstein et al., 1980).

$$PIC = 1 - \sum(pi)^2 - \sum\sum 2(pi)^2(pj)^2$$

فراوانی آلل = p

$i - p_i = p_j$

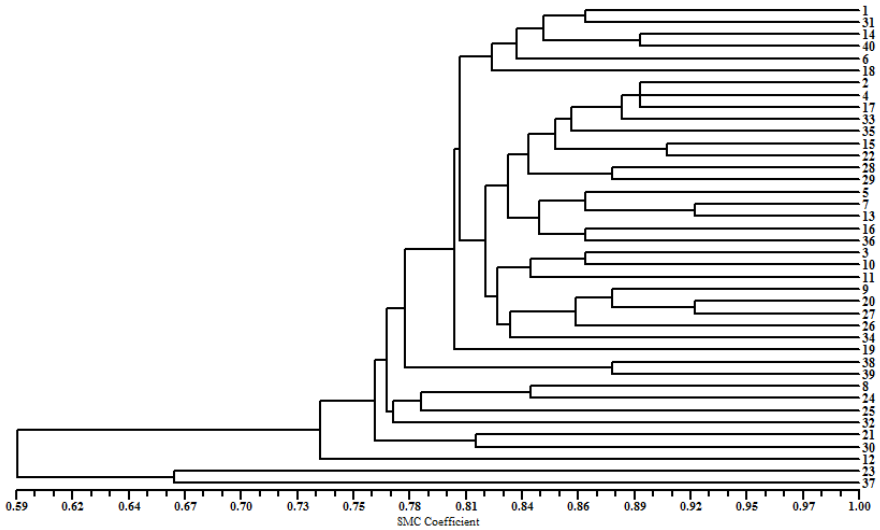
نتایج و بحث: در این تحقیق ٨ نشانگر ریزماهواره که دارای تکثیر و چند شکلی مناسب بودند استفاده شدند. تمام نشانگرهای بکار رفته تک مکانه بودند و یک یا دو باند در ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تا ٦ باند در ژنوتیپ‌های مجار و آلوی شیرین هسته جدا تولید کردند که دال بر هگزاپلوئید بودن این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. مقادیر محاسبه شده به تفکیک هر جایگاه ریزماهواره‌ای در آلو در جدول ٢ بدست آمده است.

جدول ٢– مقادیر محاسبه شده به تفکیک هر جایگاه ریزماهواره‌ای در آلو

جایگاه	تعداد	تعداد آلل	هتروزیگوتی مورد	هتروزیگوتی مشاهده	محتوای اطلاعات چند
UDA-005	١٢	٦/٦	٠/٨٦	٠/٦٣	٠/٨٠
CPSCT044	٨	٣/٨	٠/٧٥	٠/٤٢	٠/٧١
CPDCT025	٩	٥/٢	٠/٨٢	٠/٤٧	٠/٧٨
CPSCT026	٤	٢/٧	٠/٦٤	٠/٤٢	٠/٥٧
ASSR71	٥	٢/٣	٠/٥٨	٠/٤٥	٠/٥٢
ASSR72	٨	٤/٣	٠/٧٨	٠/٧١	٠/٧٤
UDP98410	١٢	٥	٠/٨١	٠/٣٤	٠/٧٦
BPPCT 001	١٠	٣	٠/٦٢	٠/٤٥	٠/٦
میانگین	٨	٤/١	٠/٧٣	٠/٤٩	٠/٦٩

ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS بر اساس ضریب تشابه SMC بدست آمد. بر اساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ آلوی شیرین هسته جدا و ژنوتیپ‌های ٤٧- 4M (٠/٥٠٦)، جواهرده ٢ (٠/٥٠٦) و ٣–١٨ (٠/٥٠٦) و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ های نیشابور برجی و بی نام (٠/٩٢)، ولیان ١ و ٩١– 4M (٠/٩٢) مشاهده شد. متوسط تشابه بین کل ژنوتیپ ها ٠/٧٩ بود. آران (١٣٨٨) متوسط تشابه روی ژنوتیپ‌های مشابه را با استفاده از نشانگر RAPD ٠/٧١ بدست آوردند.

تجزیه خوشه‌ای: بر اساس دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در فاصله ٠/٨ به ١٠ گروه تقسیم شدند که در یک گروه ژنوتیپ آلوی شیرین هسته جدا (چناران) و در گروه دیگر ژنوتیپ مجار قرار گرفت. این دو ژنوتیپ در فاصله ٠/٥٩ از سایر ژنوتیپ‌ها و در فاصله ٠/٦٦ از هم جدا شدند.



شکل ۱- دندروگرام مربوط به گروهبندی٤٠ ژنوتیپ آلو با استفاده از داده های SSR و محاسبه ضریب تشابه SMC و روش گروهبندی UPGMA (اسامی کامل ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آمده است).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد تنوع گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با مناطق جغرافیایی مطابقت ندارد به طوریکه آلوهای مناطق متفاوت در گروه‌های ژنتیکی مجاور هم قرار گرفتند که با یافته‌های Tamarzizt و همکاران (۲۰۰۹) مبنی بر اینکه در بیشتر موارد گروه بندی ژنوتیپ های آلو مستقل از منشاء جغرافیایی ژنوتیپ ها بود مطابقت دارد. عدم گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مربوط به یک منطقه جغرافیایی خاص دلیل بر عدم توانایی نشانگرها در گروه‌بندی نیست بلکه می‌تواند نشان-دهنده تبادل ژرم‌پلاسمی نواحی مختلف به صورت‌های مختلف باشد. همچنین نزدیکی ژنتیکی می‌تواند ناشی از داشتن اجداد مشترک باشد.

منابع

1. Bianchi, V.J., Sansavini, S. and Fachinello, J.C. 2004. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp rootstocks. *Science Agricaltural*. 61: 303-306.
2. Wünsch, A. 2009. Cross-transferable polymorphic SSR loci in Prunus species. *Scientia Horticulturae.* 120: 348–352.
3. Xie, H., Sui, Y., Chang, F. and Xu, Y. 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 366–372.

Abstract

Genetic diversity of wild and commercial genotypes of plum using SSR molecular marker For assessing genetic diversity and relationship among genotypes of Iran (Ramsar, Velyan Karaj and Mashhad) and four commercial cultivars as well as Mirobolan cultivar, eight microsatellite loci were used. These markers produced a total of 68 bands in studied genotypes. UDA-005 and UDP98410 loci produced the highest number of alleles (12) and CPSCT026 locus produced the lowest number of alleles (4). The average of expected heterozigosity in all loci was 0.73 varied from 0.58 at ASSR71 to 0.86 at UDA-005 microsatellite locus. The average of observed heterozigosity was 0.49 different from 0.34 at UDP98410 to 0.71 at ASSR72 locus. Cluster analysis based on SMC similarity coefficients and UPGMA method was performed. According to clusters, groups were not in accordance with the geographical distribution so that genotypes with different distribution located in same groups. Based on the results of similarity matrix, the lowest and the highest genetic similarity was (0.506) and (0.92) respectively. Average similarity among genotypes was 0.77 that corresponds to the previous report with average similarity in the same stedied genotypes using RAPD markers (0.71).
Key words: Genetic diversity, plum, Rootstock, Mirobalan