شناسایی ارقام گیلاس با استفاده از نشانگر SSR

وحید عبدوسی (۱)، محمدرضا فتاحی مقدم (۲)، ناصر بوذری (۳)، علیرضا طلایی (۴)، احمد خلیقی (۵)

۱- استادیار و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ۲- استادیار گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳- استادیار پژوهش موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ۴- استاد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵- استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

در تحقیق حاضر تعداد ۳۹ رقم گیلاس توسط یازده مکان SSR ارزیابی گردیدند. نشانگرهای SSR بکار رفته توانستند در کل ۱۲۰ آلل تولید نمایند که تعداد آلل بدست آمده از هر نشانگر بین ۴ تا ۱۸ آلل و به طور متوسط ۱۰/۹۱ آلل برای هر نشانگر بود. اندازه آلل های بدست آمده در دامنه ۱۰۵ الی ۲۹۱ جفت باز قرار داشتند. شاخص تنوع محاسبه شده برای مکان ها بین ۰/۷۱ الی ۰/۹۲ و به طور میانگین ۰/۸۶ بود. دندروگرام نشانگرهای مولکولی بکار رفته، ۳۹ رقم گیلاس را به ۷ گروه تقسیم نمود. دندروگرام و گروه های بدست آمده نشان دادند که نشانگرهای بکار رفته در این تحقیق توانسته اند ارقام گیلاس مورد ارزیابی را از یکدیگر تفکیک نمایند. نتایج بدست آمده نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در میان ارقام مورد مطالعه بود به نحوی که می توان ایران را یکی از مراکز تنوع این محصول عنوان نمود.

واژه های کلیدی: گیلاس، نشانگر SSR ، شناسایی.

مقدمه

گیلاس (*Cerasus avium* L.) ، از خانواده *Rosaceae* بوده و از نظر اقتصادی یکی از مهم ترین میوه های مناطق معتدله می باشد. ایران یکی از کشورهای تولیدکننده این محصول در سطح دنیا در سالهای اخیر بوده است(۱). امروزه نشانگرهای مولکولی در سطح بسیار وسیع در علوم مختلف نظیر علوم گیاهی و در زمینه های مختلف آن از جمله تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه های ژنتیکی، همسانه سازی ژنها، تشخیص بیماریهای گیاهی و همچنین در مدیریت بهتر و موثر ژرم پلاسم مورد استفاده قرار می گیرد(۲). نشانگر SSR دارای مزایای بسیار زیاد در مقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی میباشد. از این نشانگر به همراه سایر نشانگرهای مولکولی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گیلاس در سراسر دنیا استفاده گردیده است(۴). با توجه به قرابت نزدیک گونه های مختلف جنس *Prunus* از نشانگرهای SSR طراحی شده برای گونه های مختلف این جنس، برای شناسایی سایر گونه های جنس *Prunus* استفاده می گردد. زیرا قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک گونه های این جنس از شباهت توالی های DNA این گونه ها ناشی می گردد. در نتیجه در اکثر تحقیقات انجام شده بر روی گونه های مختلف این جنس از نشانگرهای متعددی استفاده گردیده است.

مواد و روش ها

استخراج DNA با روش CTAB با اندکی تغییرات در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات انجام شد(۶). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط دو روش اسپکتوفوتومتری و استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام گردید. با بررسی منابع و تحقیقات انجام شده، یازده آغازگر مورد نظر بر اساس مشخصاتی چون تعداد آلل، محدوده آلل، شاخص تنوع و طول مکان انتخاب شدند. پس از تهیه محلول پایه، به هر میکروتیوب (لوله PCR ۰/۲ ml) مقدار ۱ µl از DNA هر یک از ارقام با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر افزوده شده وسپس نمونه ها سریعاً به دستگاه ترموسایکلر

انتقال یافته و با برنامه مورد نظر PCR انجام گردید. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز عمودی استفاده گردید. ژل مورد استفاده ، پلی آکریل آمید واسرشت ساز بود. از شانه با ۴۹ چاهک و از سایز مارکر با قطعات 100 bp استفاده گردید. زمان الکتروفورز حدود ۴۵ دقیقه برای گرم شدن ژل و حدود یک ساعت برای ران شدن نمونه های DNA بود. پس از پایان الکتروفورز ، رنگ آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام شد. پس از رنگ آمیزی، بهترین ژل بدست آمده برای هر پرایمر انتخاب شده و در کل ۱۱ مکان از میان بهترین مکان های تکرار شده(در هر ژل ۳۹ نمونه DNA ارقام بررسی شدند) به صورت صفر(عدم وجود باند) و یک(وجود باند) نمره دهی شدند. داده های مرتبط به صورت ماتریس ژنوتیپ در باند پلی مورفیسم به نرم افزار Excel وارد شد. پس از این مرحله، PIC (محتوی اطلاعاتی چند شکلی) محاسبه گردید و سپس با بکار گیری نرم افزار NTSYS ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد و دندروگرام آن بر اساس UPGMA رسم گردید.

نتایج و بحث

PIC معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را به واسطه تعداد آلل های لوکوس نشانگر و فراوانی نسبی این آلل ها در جمعیت تحت مطالعه را نشان می دهد. بنابراین نشانگری که تعداد آلل بیشتری در لوکوس داشته باشد دارای PIC بالاتری می باشد. گروهبندی ارقام بر اساس نمره دهی صفر و یک ژل بدست آمده توسط هر یک از نشانگرها انجام گرفت (شکل۱) و نتایج دسته بندی ارقام بر اساس اینکه خط برش در حد تشابه۰/۳۱ که میانگین تشابه ارقام مورد بررسی بود، قرار گیرد، ۳۹ رقم را در ۷ کلاستر قرار داد که عبارتند از :گروه اول شامل ارقام ویکتوریا و حاج یوسفی. گروه دوم شامل رقم لامبرت. گروه سوم شامل ارقام سیلژبلامارکا و مشکین شهر. گروه چهارم شامل ارقام صورتی لواسان ، سیاه زودرس و مجتهدی. گروه پنجم شامل ارقام گیوم ، بیگ گلیوم ، فراسیدا و همدان. گروه ششم شامل ارقام قزوین ، سیلژ بلادی باریون ، دیررس ایتالیا ، فروویا ، گیلاس شماره ۴۹ ، روشون ، قرمز باغ نو ، شاملو ، گیلاس شماره ۴۶ ، ماره موت ، ابرده ، سفید رضائیه و قرمز رضائیه. گروه هفتم شامل ارقام بینگ ، پروتیوا ، گیلاس شماره ۲۸ ، تک دانه ، اراک ، زرد دانشکده ، رأفت ، محلی کرج ، شبستر ، سیاه مشهد ، ناپلئون ، سفید و قرمز باغ نو ، سیاه دانشکده و شعاع السلطنه. بر اساس ضرایب تشابه بدست آمده، ارقام ماره موت و گیلاس شماره ۴۶ به میزان ۹۶٪ بیشترین شباهت را به خود اختصاص داده اند و ارقام قرمز باغ نو و گیوم دارای کمترین میزان تشابه در حد ۶٪ بودند. نمودار ۱ دندروگرام بدست آمده از نشانگرهای SSR بکار رفته در این آزمایش را نشان می دهد. نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده با کاربرد نشانگرهای مختلف در ارقام خارجی تطابق نزدیکی را نشان داد، به طوریکه گروهبندی انجام شده و زیر گروه های تشکیل شده در تجزیه خوشه ای بدست آمده با تحقیقات مولکولی قبلی انجام شده همخوانی نزدیکی را داشته است(۴، ۵، ۱۰). نتایج بدست آمده نشان داد که ارقام محلی از نظر ژنتیکی دارای فاصله ژنتیکی زیادی می باشند. از طرف دیگر با توجه به اینکه گیلاس دارای مسئله خودناسازگاری می باشد، ارقامی که از نظر ژنتیکی دارای فاصله کمی نسبت به یکدیگر هستند و یا به عبارت دیگر ژنوم مشابهی دارند، احتمال اینکه در آلل های S خود نیز دارای شباهت زیادی باشند را افزایش خواهند داد. در نتیجه یکی از دلایل کاهش عملکرد این محصول در مقایسه با سایر کشورهای دنیا احتمالاً کشت ارقام مشابه از نظر ژنتیکی در یک مکان می باشد. در نتیجه توصیه می گردد از کشت ارقام مشابه از نظر ژنتیکی در یک مکان به این دلیل جلوگیری گردد. به عنوان مثال رقم ماره موت و گیلاس شماره ۴۶ به میزان ۹۶٪ دارای تشابه نسبت به هم می باشند، توصیه می گردد بدلیل تشابه ژنتیکی بالای این دو رقم از کشت آنها در احداث یک باغ، در مکانی مشخص جلوگیری نمود.

منابع

۱- آمار نامه کشاورزی، (۱۳۸۵).محصولات زراعی و باغی. دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی. صفحات ۷۸-۲۳۰.

۲- نقوی ،م.ر.، ب. قره یاضی، ق. حسینی سالکده، (۱۳۸۴).نشانگرهای مولکولی.انتشارات دانشگاه تهران. ۳۲۰صفحه.

3- Boskovic, R., K.R. Tobutt. and F.J. Nicoll.(1997). Inheritance of isozymes and linkage relationship in the interspecific cherry progenies. Euphytica, 93:129-143.

4- Cantini, C., A.F. Iezzoni., W.F. Lamboy., M. Boritzki and D. Struss. (2001). DNA fingerprinting of Tetraploid Cherry germplasm using simple sequence repeats. J.Amer.Soc.Hort.Sci., 126(2), 205-209.

5-Dirlewanger ,E. and C. Bodo.(1994). Molecular genetic mapping of peach. Euphytica77:101-103.

6- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.

7- Gerlach, H. K. and R. Stosser.(1998) .Sweet cherry cultivar identification using RAPD - derived DNA fingerprints.Acta.Hort.468:63-69.

8- Struss, D., R. Ahmad., S.M. Southwick. and M. Boritzki. (2003). Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. J.Amer.Soc.Hort.Sci, 128(6), 904-909.

9- Tabutt, K.R. and R. Boskovic.(1996). A cherry gene database. Acta Hort. 410:147-153.

10- Warburton ,M.L. and F.A. Bliss.(1996).Genetic diversity in peach (*prunus persica* L.Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers and compared to inbreeding co-efficient. J.Amer. Soc.Hort.Sci. 121:1012-1019.

Characterization of some Sweet Cherry (*Cerasus avium* L.) Cultivars Using SSR Markers.

Abstract:

In this research work, Simple Sequence Repeats (SSRs) were used to evaluate sweet cherry (*Cerasus avium* L.) cultivars in Iran. The results of SSR markers analysis indicated that total of 120 allele were detected by 11 SSR primer pairs, with an average of 10.91 putative alleles per primer combination which ranged from 4 to 18 for maximum and minimum allele that were detected with primers. The size of alleles ranged from 105 to 291 bp. Heterozygosity values ranged from 0.71 to 0.92 with an average of 0.86 per primer combination. SSRs polymorphic fragments were used to calculate a similarity matrix and to perform UPGMA cluster analysis. The results of cluster analysis indicated 39 cultivars which were divided into 7 clusters. Most of the cultivars were grouped according to their pedigree. The results indicated that sweet cherry has high level of genetic variation in Iran therefore we could conclude that Iran might be regarded as one of the major location in the world where wide varieties of such crop is distributed.