بررسی تنوع ژنتیکی توده های بادام دیرگل با استفاده از نشانگر ISSR جهت انتخاب ارقام مقاوم به سرما

محمدرضا غفاریان و سعید ترکش

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های دیرگل بادام در استان یزد با استفاده از نشانگر مولکولی و نیز ارزیابی قابلیت این نشانگر در انگشت نگاری ژنتیکی و شناسایی ارقام بادام، آزمایشی در فاصله زمانی فروردین تا شهریورماه ۱۳۸۷ انجام گرفت. مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعات شامل ۱۹ ژنوتیپ و رقم مختلف بادام بود که از مناطق مختلف سطح استان جمع‌آوری گردید. نتایج نشان داد که ۱۰ آغازگر در مجموع ۱۰۱ باند پلی‌مورف را ایجاد کردند که در این بین، آغازگر `5-G(AG)$_7$ASG-3` با ۱۷ باند و آغازگر `5-A(GA)$_7$GSC-3` با ۳ باند به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند چندشکل تولیدی را داشتند. توجیه بخش کمتری از تنوع کل توسط چند مؤلفهٔ اول و توزیع واریانس بین این مؤلفه ها, حاکی از توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم است که اعتبار داده‌های ISSR در مطالعات ژنتیکی بادام را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی کوفنیتیکی به دست آمده بر اساس ضریب تشابه جاکارد، برابر با ۰/۸۲ و آمارهٔ t منتل ۶/۳۹ بود که نشان‌دهندهٔ برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی می‌باشد. در بین مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی، بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ۱۹۱ و ۸۸ دیده شد. مشابهت و نزدیکی ژنتیکی بین بعضی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌تواند ناشی از یکسان بودن منشأ اولیه آنها و یا مشابهت جغرافیایی بین مناطق کشت و اصلاح آنها باشد. عدم تفکیک کامل ارقام موجود در یک منطقه از سایر ارقام، نشان داد که انتقال و جابجایی این ژنوتیپ‌ها بین مناطق مورد مطالعه که از نظر موقعیت به هم نزدیک هستند، به وفور اتفاق افتاده است. عدم تفکیک کامل بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مورد مطالعه نشان داد که تنوع بین ژرم‌پلاسم موجود در این مناطق نقش اندکی در تنوع کل محاسبه‌شده، دارد.

مواد و روش

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های دیرگل بادام در استان یزد با استفاده از نشانگر مولکولی و نیز ارزیابی قابلیت این نشانگر در انگشت‌نگاری ژنتیکی و شناسایی ارقام بادام، آزمایشی در فاصله زمانی فروردین تا شهریورماه ۱۳۸۷ انجام گرفت. مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعات شامل ۱۹ ژنوتیپ و رقم مختلف بادام بود که از مناطق مختلف سطح استان جمع‌آوری گردید. استخراج DNA از بافت برگ طبق روش تغییر یافتهٔ CTAB (تامسون و موری،۱۹۹۸) و روش ارائه شده توسط گردزیل و همکاران انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که به دلیل حذف پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنول‌های فراوان موجود در برگ گیاه بادام توسط PVP، روش تغییر یافتهٔ CTAB با استفاده از PVP، روش مناسب‌تری جهت استخراج DNA گیاه بادام می‌باشد. ۱۴ آغازگر روی ژنوتیپ‌های مختلف بادام مورد بررسی قرار گرفت و از این میان، ۱۰ آغازگر با چندشکلی بالا و الگوی باندی مشخص جهت تجزیهٔ داده‌های حاصل از نشانگر ISSR انتخاب شدند.

نتایج و بحث

۱۰ آغازگر در مجموع ۱۰۱ باند پلی‌مورف را ایجاد کردند که در این بین، آغازگر `5-G(AG)7ASG-3` با ۱۷ باند و آغازگر `5-A(GA)7GSC-3` با ۳ باند به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند چندشکل تولیدی را داشتند. تجزیه به مؤلفه‌های متعادل (PcoA) بر اساس ماتریس شباهت به دست آمده از ضریب جاکارد با استفاده از نرم‌افزار e NTSYS pc 2.02 انجام گردید (رولف،۱۹۹۲). ۳ مؤلفهٔ اول حدود ۵۰ درصد و ۸ مؤلفه اول مجموعاً حدود ۸۰ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کنند. توجیه بخش کمتری از تنوع کل توسط چند مؤلفهٔ اول و توزیع واریانس بین این مؤلفه‌ها, حاکی از توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم است که اعتبار داده‌های ISSR در مطالعات ژنتیکی بادام را نشان می‌دهد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزارe NTSYS pc 2.02 انجام شد (رولف،۲۰۰۲). تست منتل (منتل،۱۹۶۷) برای ضرایب تشابه جاکارد، تطابق ساده و دایس بر اساس روش UPGMA انجام گردید. ضریب همبستگی کوفنیتیکی به دست آمده بر اساس ضریب تشابه جاکارد، برابر با ۰/۸۲ و آمارهٔ t منتل ۶/۳۹ بود که نشان‌دهندهٔ برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی می‌باشد. بر این اساس ضریب جاکارد برای تجزیه خوشه‌ای بر روی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه انتخاب گردید. در الگوهای الکتروفورز حاصل از نشانگرهای ISSR، هیچ نشانگر (باند) مکان- اختصاصی برای ارقام مربوط به یک منطقه (باندی که در تمامی ژنوتیپ‌های متعلق به یک منطقه وجود داشته و در هیچ یک از ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق دیگر وجود نداشته باشد) مشاهده نگردید. در بین مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی، بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ۱۹۱ و ۸۸ دیده می‌شود. مشابهت و نزدیکی ژنتیکی بین بعضی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌تواند ناشی از یکسان بودن منشأ اولیه آنها و یا مشابهت جغرافیایی بین مناطق کشت و اصلاح آنها باشد. عدم تفکیک کامل ارقام موجود در یک منطقه از سایر ارقام، نشان می‌دهد که انتقال و جا به جایی این ژنوتیپ‌ها بین مناطق مورد مطالعه که از نظر موقعیت به هم نزدیک هستند، به وفور اتفاق افتاده است. نحوه تفکیک ژنوتیپ Z-5 ناشی از حفظ شدن خواص بادام وحشی در این ژنوتیپ و یا متفاوت بودن آن با سایر ژنوتیپ‌ها در سطح گونه می‌باشد. احتمال دیگر آن است که این ژنوتیپ هیبرید بین‌گونه‌ای یا بین‌جنسی از بادام باشد. نتایج حاکی از وجود تنوع گونه‌ای در مجموعه ژنوتیپ‌های کاشته شده بادام در مناطق مختلف استان یزد می‌باشد. تعدادی از ارقام که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی بسیار متفاوت بودند در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفته‌اند. دلیل این امر را می‌توان به ماهیت ژنتیکی نشانگرهای ISSR به کار برده شده در این مطالعه نسبت داد، به طوری که مناطقی از DNA که توسط نشانگرهای ISSR تکثیر و نمونه برداری شده‌اند، مربوط به نواحی از ژنوم باشند که ترجمه نشده و در کنترل صفات مورفولوژیکی نقشی ندارند. از طرفی پاره‌ای از صفات، وراثت خارج هسته‌ای دارند که ژن‌های کنترل‌کنندهٔ آنها در اندامک‌های سیتوپلاسمی قرار می‌گیرد. ارقام زودگل (Z-21، Z-4 و Z-5) در این گروه‌بندی از ارقام دیرگل جدا نشده‌اند و به صورت پراکنده در دندروگرام مشاهده می‌شوند. بنابراین نشانگر ISSR نتوانسته است در تفکیک ارقام دیرگل از ارقام زودگل موفق عمل نماید. نشانگر ISSR، ابزار مناسبی جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها و گونه‌های وحشی بادام بوده و توصیه می‌شود به منظور افزایش کارآیی برنامه‌های اصلاحی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی در بادام و جنس‌ها و گونه‌های نزدیک مورد استفاده قرار گیرد. نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها و ارقام بادام جمع‌آوری شده از مناطق نزدیک به هم در استان یزد به طور کلی دارای یکنواختی ژنتیکی هستند و نتایج حاکی از پایین بودن نسبی درصد چندشکلی در ژنوم افراد مورد مطالعه و شباهت بین آنها می‌باشد. با توجه به طبیعت خودناسازگار بادام مشخص می‌شود که ارقام اهلی شده و ژنوتیپ‌هایی از بادام که در مناطق

مورد مطالعه کشت و کار می‌شوند، اختلاط بسیار کمی با ژرم‌پلاسم خارجی داشته‌اند و بخش زیادی از تنوع ژنتیکی موجود بین آنها ناشی از تنوع بین خود افراد موجود مجموعه است. به عبارتی عدم تفکیک کامل بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مورد مطالعه نشان می‌دهد که تنوع بین ژرم‌پلاسم موجود در این مناطق نقش اندکی در تنوع کل محاسبه‌شده دارد و برای بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم بادام، نمی‌توان تنها از مناطق مجاور یکدیگر نمونه‌برداری انجام داد، بلکه لازم است مجموعه‌های متنوع‌تر و غنی‌تری از سایر مناطق وسیع‌تر در کشور نیز مورد بررسی قرار گیرند تا با شناسایی منابع جدیدی از تنوع و مراکز اصلی تنوع گونه‌ای بادام در کشور، امکان بهره‌برداری از آن در اصلاح صفات زراعی بادام فراهم گردد.

منابع

1-Aranzana, M., A. Pineda, P. Cosson, E. Dirlewanger, J. Ascasibar, G. Cipriani, C. Ryder, R. Testolin, A. Abbott, G. King, A. Lezzoni and P. Arus, "A set of simple sequence repeat (SSR) markers covering most of the *prunus* genome", Theo. Appl. Genet., 106: 819-825, 2003.

2-Martins, M., R. Tenreiro and M. Oliveira, "Genetic relatedness of Portuguese almond Cultivars assessed by RAPD and ISSR markers", Plant Cell Rep., 22: 71-78, 2003.

3-Ovesna, J., K. Polakova and L. Leisova, "DNA analysis and their applications in plant breeding", Czech J. Genet. Plant breeding, 38(1): 29-40, 2002.

4-Pardeep, R., E. A. Siddiq, "Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding" Euphytica, 128 : 9-17, 2002.

Abstract:

The current study was conducted in order to assess the genetic diversity of late flowering almond genotypes in Yazd province using ISSR markers as well as to evaluate the capability of that marker in genetic fingerprinting and identification of almond varieties. The plant material comprised of 19 different almond genotypes and varieties collected from various regions through the Yazd province. DNA extraction from leaf tissue was carried out using both modified CTAB and Gradzil et al. procedures. The results showed that the modified CTAB method was more convenient for almond plant because of elimination of polysacharides and polyphenoles by involvement of PVP. 14 primers were examined on almond genotypes out of which 10 with higher polymorphism level and clear electrophoresis patterns were selected for analysis. The 10 selected primers revealed 101 polymorphic bands among which the 5`-G$(AG)_7$ASG-3` with 17 and 5`-A$(GA)_7$GSC-3` with 3 bands had the most and the least polymorphic bands respectively.

The explanation of a minor part of the total diversity by few prior components as well as the distribution of total variance among different components, indicate the relevant scattering of the ISSR primers through the genome and the validity of ISSR data for the genetic analysis in almond germplasm. The cophenetic correlation coefficient obtained for the Jaccard method was 0.82 and the t value was 6.39 which indicate the good fitness between the dendrogram and the original similarity matrix. Among the studied genotypes, the most genetic similarity was observed between the genotypes 88 and 191. The high genetic similarity between some genotypes may be caused by the same origin of those genotypes or by the geographical similarity between their regions of cultivation and improvement.