

کاربرد نشانگرهای AFLP در مطالعه ساختار ژنتیکی هیبریدهای امیدبخش *Prunus*

Application of AFLP markers in genetic structure study of promising hybrids in *Prunus* genus

مطهره خاکزاد^۱، مهرشاد زین العابدینی^{۲*}، جلیل دژم پور^۳، بهرام ملکی زنجان^۴، علی ایمانی^۵، علی سلیمانی^۶، محسن مردی^۷

۱، ۲، ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

۳- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی

۴ و ۶- استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۵- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

Khakzad M¹, Zeinalabedini M^{*2}, Dejampour J³, Maleki B⁴, Imani A⁵, Soleymani A⁶, Mardi M⁷

1,2,7. Msc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj

3. Assistant Professor, Agricultural research center of East Azarbaijan, Tabriz, Iran

4,6. Assistant Professors, Agronomy and Plant Breeding Department, University of Zanjan, Zanjan, Iran

5. Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mzeinolabedini@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶- تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

جنس *Prunus* متعلق به خانواده Rosaceae شامل گونه‌های مهم اقتصادی متعددی است که در نیمکره شمالی زمین از جمله ایران توزیع شده است. امروزه در میوه کاری نوین و صنعتی، استفاده از دورگ‌های بین گونه‌ای برای دستیابی به پایه‌های پیوندی سودمند، مورد توجه می‌باشد. اخیراً با توسعه نشانگرهای مولکولی مختلف، امکان تشخیص و گزینش پایه‌های درختان میوه میسر شده است. هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع، ساختار و روابط ژنتیکی پایه‌های امیدبخش جنس *Prunus* با استفاده از آغازگرهای AFLP می‌باشد. بر این اساس ۸۹ ژنوتیپ از جنس *Prunus* شامل دورگ‌های آلو × بادام، گوجه × بادام، هلو × بادام، گوجه × زردآلو، آلو × زردآلو، برخی از ژنوتیپ‌های بادام، زردآلو، هلو، آلو و گوجه و نیز ژنوتیپ‌هایی با منشاء نامشخص، مورد بررسی قرار گرفتند. از بین ۲۰ ترکیب آغازگر انتخابی مورد آزمایش، ۸ ترکیب آغازگری توانست ۷۲۸ نوار چند شکل با الگوی نواری واضح نشان دهد. با استفاده از نرم افزارهای gCLUTO 1.0، Structure 2.3، SplitsTree 4 و R 2.14.1 اغلب دورگ‌های (هلو × بادام) از دورگ‌های دارای یک والد آلو یا گوجه تفکیک شدند و ژنوتیپ‌های والدینی نیز در خوشه‌های مجزا گروه‌بندی شدند. همچنین در این تحقیق استفاده از ترکیب آغازگرهای نشاندار AFLP و آشکارسازی نوارها با کمک دستگاه Licor در مقایسه با روش قدیمی AFLP نتایج کارآمدتری را نشان داد. بنابراین مطالعه حاضر می‌تواند در شناسایی دورگ‌های امیدبخش بر اساس والدین و نیز تهیه شناسنامه مولکولی به منظور ثبت و حفظ مالکیت معنوی آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
دورگ‌گیری،
فیلوژنتیک،
AFLP
Prunus

مقدمه

با توجه به اهمیت اقتصادی، تنوع ژنتیکی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی جنس *Prunus* (خانواده Rosaceae)، مطالعات متعدد مولکولی و کلاسیک در این جنس انجام گرفته است. گونه‌های این جنس شامل بادام (*P. dulcis*)، زردآلو (*P. armeniaca*)، گیلاس (*P. avium*)، آلبالو (*P. cerasus*)، هلو (*P. persica*) و آلو (*P. salicina*)، *P. domestica* و *P. cerasifera* بوده که به عنوان منابع درختان میوه، گیاهان روغنی، چوبی، زینتی، خشکباری و پایه مورد توجه می‌باشند (Aradhya et al. 2004). ایران دارای سطح زیر کشت و تولید قابل توجهی برای برخی از این محصولات بوده و خاستگاه ژنتیکی تعدادی از آن‌ها به شمار می‌رود (FAOSTAT 2010). تلاقی‌های بین گونه‌ای جنس *Prunus* به صورت طبیعی و یا در شرایط کنترل شده مزرعه‌ای ایجاد می‌شود. در چند دهه اخیر شناسایی و معرفی برخی از پایه‌های مفید که عاری از بیماری بوده و با انواع خاک و شرایط اقلیمی سازگار هستند، منجر به افزایش عملکرد و تولید در این جنس شده است. یکی از اهداف برنامه‌های به نژادی پایه‌ها، شناسایی و استفاده از تنوع ژنتیکی در دسترس و افزایش آن در جهت حل معضلات موجود می‌باشد. به این منظور از ارقام، ژنوتیپ‌ها و برخی از گونه‌های خویشاوند این جنس که دارای خصوصیات مطلوب زراعی هستند، در برنامه‌های دورگ‌گیری بین گونه‌ای و در نهایت گزینش دورگ‌های سودمند استفاده می‌شود (Giorgi et al. 2005 ; Bouhadida et al. 2009). بنابراین شناسایی تنوع ژنتیکی پایه‌ها به کمک ابزارهای مختلف، از اهمیت زیادی برخوردار خواهد بود. امروزه با توسعه ژنتیک مولکولی، دستیابی به نشانگرهای مولکولی به طور قابل توجهی افزایش یافته و امکان تشخیص و گزینش پایه‌ها در هر یک از مراحل توسعه گیاه و مستقل از عوامل محیطی را میسر می‌سازد. همچنین از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ ژنوتیپ از پایه‌های جنس *Prunus* استفاده شد و نشانگرهای مورد استفاده توانستند پایه‌های مختلف را به خوبی تفکیک کنند که گروه بندی‌های حاصل با برخی از ویژگی‌های مورفولوژی منطبق بود (Casas et al. 1999).

تنوع ژنتیکی چهار گونه وحشی ایرانی جنس *Prunus* شامل *P. lycioides* و *P. scoparia*، *P. hauskenchtii*، *eleagnifolia* که می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی پایه‌ها مورد استفاده قرار گیرند، با استفاده از نشانگرهای DNA، پروتئینی و برخی از صفات مورفولوژی بررسی شد (Zeinalabedini et al. 2008). به منظور بررسی سطوح تنوع و ساختار ژنتیکی در گیاهان، نشانگرهای AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا، توزیع وسیع در ژنوم و سنجش مکان‌های ژنی متعدد در یک آزمون و زمان کوتاه، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد به شمار می‌رود، در نتیجه بر اساس داده‌های حاصل از این نشانگر، می‌توان خوشه‌بندی صحیحی برای جمعیت‌های متفاوت گیاهی به دست آورد. از نشانگر AFLP در انگشت نگاری و تشخیص ژنتیکی ژرم پلاسماها، برقراری روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی گونه‌های جنس *Prunus* نیز استفاده شده است (Hurtado et al. 2002; Martinez-Gomez et al. 2003). روابط ژنتیکی ۷ رقم و گونه وحشی جنس *Prunus* با استفاده از ۵ جفت آغازگر AFLP بررسی شد و آنالیزهای انجام شده به کمک این داده‌ها، ۴ گروه را که نماینده بخش‌های *Cerasus*، *Armeniaca*، *Amygdalus* و *Prunophora* بودند، به خوبی گروه‌بندی کرد (Aradhya et al. 2004). اولین نقشه پیوستگی ژنتیکی جمعیت پایه‌های *Prunus* و شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت در پایه‌ها با استفاده از AFLP ایجاد شد که می‌تواند دلیل بر اهمیت بکارگیری این نشانگر در مطالعات پایه‌های این جنس باشد (Lu et al. 1998). هدف از این تحقیق، بررسی مولکولی پایه‌های انتخابی و تجاری حاصل از برنامه‌های اصلاحی جنس *Prunus*، بررسی تنوع ژنتیکی دورگ‌های بین‌گونه‌ای مختلف و همچنین ارزیابی روابط فیلوژنتیکی بین والدین دورگ‌ها است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* شامل پایه‌های حاصل از دورگ‌گیری بین گونه‌ای، ارقام و ژنوتیپ‌های والدینی و نیز ژنوتیپ‌های با منشا نامشخص جمع آوری شده از کلکسیون‌های تبریز و کمال شهر کرج می‌باشد

جدول ۱- نام دورگه‌ها و ارقام والدینی جنس *Prunus*

ردیف	نام	منشاء	نام اختصار	ردیف	نام	منشاء	نام اختصار
1	HS703	میروبالان × بادام	'AM1'	47	سهند	بادام	'A4'
2	HS721	میروبالان × بادام	'AM2'	48	D99	بادام	'A5'
3	HS704	میروبالان × بادام	'AM3'	49	10_11	بادام	'A6'
4	HS522	گوجه × زردآلو	'APPU1'	50	14_24	بادام	'A7'
5	HS304	گوجه × زردآلو	'APPU2'	51	A230	بادام	'A8'
6	HS303	گوجه × زردآلو	'APPU3'	52	13_40	بادام	'A9'
7	HS117	گوجه × زردآلو	'APPU4'	53	D124	بادام	'A10'
8	HS302	گوجه × زردآلو	'APPU5'	54	D101	بادام	'A11'
9	HS811	هلو × بادام	'APH1'	55	شکوفه	بادام	'A12'
10	HS-401	هلو × بادام	'APH2'	56	شماره ۷	بادام	'A13'
11	HS-403	هلو × بادام	'APH3'	57	فرتز	بادام	'A14'
12	HS737	هلو × بادام	'APH4'	58	پایین 6-8	بادام	'A15'
13	GF677	هلو × بادام	'APH5'	59	Flip	بادام	'A16'
14	HS314	هلو × بادام	'APH6'	60	A200	بادام	'A17'
15	HS411	هلو × بادام	'APH7'	61	5_6	بادام	'A18'
16	HS126	هلو × بادام	'APH8'	62	Tonuo	بادام	'A19'
17	HS-202	هلو × بادام	'APH9'	63	پادری	بادام	'A20'
18	HS503	هلو × بادام	'APH10'	64	16-25	بادام	'A21'
19	HS-402	هلو × بادام	'APH11'	65	14-12	بادام	'A22'
20	HS507	بادام × GF677	'AGF'	66	10_12	بادام	'A23'
21	HS412	آلو × زردآلو	'APPL1'	67	ارداباد	زردآلو	'AP1'
22	HS407	آلو × زردآلو	'APPL2'	68	کانیز	زردآلو	'AP2'
23	HS409	آلو × زردآلو	'APPL3'	70	قریان مراغه	زردآلو	'AP3'
24	k-3	آلو	'SC1'	70	HS216	زردآلو	'AP4'
25	stant	آلو	'SC2'	71	AC415	زردآلو	'AP5'
26	pre	آلو	'SC3'	72	HS206	زردآلو	'AP6'
27	A=St	آلو	'SC4'	73	HS517	زردآلو	'AP7'
28	BL-R	آلو	'SC5'	74	HS416	زردآلو	'AP8'
26	OB	آلو	'SC6'	75	GM	زردآلو	'AP9'
30	K1	آلو	'SC7'	76	تبریز ۱۰۰	زردآلو	'AP10'
31	Z-12	آلو	'SC8'	77	HS702	گوجه × بادام	'APU1'
32	AL-T	آلو	'SC9'	78	HS706	گوجه × بادام	'APU2'
33	بی نام	آلو	'SC10'	79	HS405	گوجه × بادام	'APU3'
34	A-N	هلو	'PH1'	80	HS403	گوجه × بادام	'APU4'
35	شلیل انجیری	هلو	'PH2'	81	HS-702	گوجه × بادام	'APU5'
36	A-S	هلو	'PH3'	82	HS802	آلو × بادام	'APL1'
37	RH	هلو	'PH4'	83	HS602	آلو × بادام	'APL2'
38	B1	هلو	'PH5'	84	HS524	گوجه	'PU'
39	B2	هلو	'PH6'	85	HS-201	زردآلو × زردآلو	'APAP1'
40	FR	هلو	'PH7'	86	HS-203	زردآلو × زردآلو	'APAP2'
41	K9	هلو	'PH8'	87	PLW	—	'PLW'
42	H-L	هلو	'PH9'	88	HS-603	—	'UN1'
43	هلوی سهند	هلو	PH	89	HS724	—	'UN2'
44	Falsa	بادام	'A1'				
45	بالا 6-8	بادام	'A2'				
46	بوتی	بادام	'A3'				

ژنتیکی، گروه‌بندی، ساختار ژنتیکی و تفسیر روابط ژنتیکی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* از روش‌های آماری RB، UPGMA و Bayesian با کمک نرم‌افزارهای gCLUTO v.1.0 و Structure 2.3 استفاده شد. پارامترهای تنظیمی هر یک از این نرم افزارها در جدول ۳ آورده شده است.

به منظور بررسی نتایج حاصل از اجرای فرضیه $K=2$ تا $K=12$ و به منظور تعیین روش و تعداد گروه مناسب (K تعداد گروه‌های مناسب)، از روش‌های UPGMA و RB استفاده شد و بر اساس میزان پایداری، مقادیر *Isim* (میانگین شباهت جفتی نمونه‌های درون یک خوشه) و *Esim* (میانگین شباهت جفتی نمونه‌های یک خوشه با خوشه دیگر)، روش RB^۱ برای انجام آنالیزها انتخاب شد (Rasmussen and Karypis 2004; Sharifi et al. 2009). روش تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل نیز با استفاده از نرم افزار Structure 2.3 انجام گرفت و بهترین K با توجه به معیارهای ΔK و $\ln P(D)$ (Evanno et al. 2005).

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای فاصله با روش Neighbor-net (تغییر یافته روش Neighborjoining) و با ضریب Dice به کمک نرم افزار SplitsTree4 صورت پذیرفت (Huson and Bryant 2006). در نهایت، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز توسط نرم‌افزار Arlequin 3.5 انجام شد و با کمک نرم‌افزار R-2.14.1 تفاوت‌های درون جمعیتی و بین جمعیتی افراد آشکار شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، از بین ۸ ترکیب نشانگر انتخابی AFLP مورد بررسی، دو ترکیب M-GAG/E-TG و M-GAG/E-TC به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) معادل ۰/۴۰۱۸ و ۰/۳۱۵ را دارا بودند. همچنین ترکیب نشانگر M-GAG/E-TG بالاترین مقدار شاخص شانون (I)، ۰/۵۸۴۸ و M-GT/E-TC پایین‌ترین مقدار این شاخص ۰/۱۷۲ را نشان داد. در مجموع از بین ۸۷۵ نوار حاصل، ۷۲۸ نوار چند شکل مشاهده شد (جدول ۴). با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب نشانگر M-GAG/E-TG با بالاترین مقادیر PIC، MI و شاخص شانون، کارآمدترین نشانگر در بین نشانگرهای

(جدول ۱). پایه‌های دورگ تحت بررسی، نتایج طرح پژوهشی ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند از سال ۱۳۷۷ هستند، که با توجه به مشاهدات مزرعه‌ای منطبق با توصیف نامه بین‌المللی درختان میوه هسته‌دار، از بین ۱۰۶ دورگ بین گونه‌ای مصنوعی و طبیعی و بر اساس فاکتورهای رویشی و زایشی، مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی، گزینش اولیه شدند (Dejampour et al. 2007). به منظور سهولت تفسیر نتایج حاصل از آنالیزها، نمونه‌ها با علامت اختصاری به شرح زیر نام‌گذاری شدند: گروه AP (۱۰ ژنوتیپ زردآلو)؛ APL (دو نمونه از دورگ‌های آلو×بادام)؛ AM (۳ نمونه از دورگ‌های میروبالان×بادام)؛ APU (۵ نمونه از دورگ‌های گوجه×بادام)؛ APPL (۳ نمونه از دورگ‌های آلو×-زردآلو)؛ APPU (۵ نمونه از دورگ‌های گوجه×زردآلو)؛ APH (۱۱ نمونه از دورگ‌های هلو×بادام)؛ APAP (دو نمونه از دورگ‌های زردآلو×زردآلو)؛ UN (دو ژنوتیپ ناشناخته)؛ AGF (یک - دورگ GF677×بادام)؛ A (۲۳ ژنوتیپ بادام)؛ PH (۱۰ ژنوتیپ هلو)؛ SC (۱۰ ژنوتیپ آلو و گوجه)؛ PU (یک ژنوتیپ گوجه) و - PLW (یک دورگ طبیعی) (جدول ۱). به منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان، از کیت استخراج DNA (CoreBio) استفاده شد و کیفیت و کمیت آن‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری (NANODROP 1000) و ژل آگارز (یک درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق، بعد از غربالگری اولیه ۲۰ ترکیب آغازگر، ۸ ترکیب *EcoRI* و *MseI* مورد استفاده قرار گرفتند و آغازگرهای *EcoRI* با IRDye700 و IRDye800 نشاندار شدند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترمال‌سایکر Applied Biosystem انجام شد و محصولات حاصل از PCR در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶/۵ درصد و با کمک دستگاه DNA Analyser 4300 (Licor) تفکیک و ارزیابی گردید. در امتیازدهی نوارها، یک برای وجود نوار و صفر برای عدم حضور نوار در نظر گرفته شد (Majidian et al. 2011). اطلاعات مربوط به نشانگر از قبیل درصد چند شکلی و شاخص شانون (I) با کمک نرم افزار POPGene و مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) با استفاده از فرمول‌های $PIC=1-\sum P_i^2$ (P_i: فراوانی نوار i م) و تعداد کل نوارها $MI = PIC \times$ محاسبه شدند. در نهایت به منظور بررسی تنوع

^۱ Partial repeated bisection

جدول ۲- توالی سازگار سازها و آغازگرهای AFLP

آنزیم	آغازگر مرحله انتخابی	آغازگر مرحله پیش تکثیر	سازگار ساز
<i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-GAG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-CCC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-GC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-GT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-TT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-CAG-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTA-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
<i>Eco</i> R I	5'-GACTGCGTACCAATTC-TG-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC-TC-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC-TA-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC-GA-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC-GT-3'	5'-GACTGCGTACCATT-3'	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

جدول ۳- روش ها، نرم افزارها و مؤلفه های استفاده شده برای تجزیه کلاستر

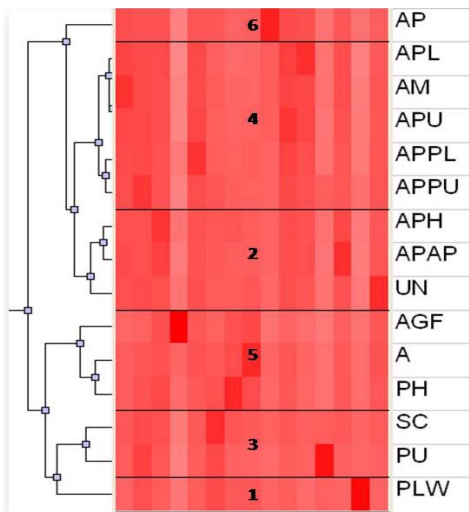
منبع	مؤلفه ها	نرم افزار	روش
Rasmussen and Karypis (2004)	Simfun = cosine; CRfun = UPGMA; of bootstrap replications = 1,000	GCluto v. 1.0	UPGMA
Rasmussen and Karypis (2004)	Simfun = cosine; Cstype = large; CRfun = H2; Number of trials = 1,000; of iterations = 1,000; Number of bootstrap replications = 1,000	GCluto v. 1.0	RB
Pritchard et al. (2000), Falush et al. (2007)	Ancestry model = admixture; allele frequencies model = correlated; of runs per K = 5; burnin = 30,000; Number of iterations = 70,000	STRUCTURE 2.3	Bayesian

Parameter options: Simfun similarity function, CRfun criterion function, Cstype partitional clustering algorithm, K number of clusters, H2 maximizes the ratio I2/ E1, where I2 is the cosine similarity between each object and its own cluster centroid, and E1 is the cosine between the centroid vector of each cluster and the centroid vector of the entire collection.

جدول ۴- ترکیبات آغازگرهای AFLP، تعداد کل نوارها، تعداد کل نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی، شاخص های I، MI، PIC

I***	MI**	PIC*	درصد چند شکلی (%)	تعداد کل نوارهای چند شکل	تعداد کل نوارها	ترکیب آغازگر
۰/۵۸۴۸	۶۳/۸۸۶۲	۰/۴۰۱۸	۹۹/۳	۱۵۸	۱۵۹	M-GAG/E-TG
۰/۴۷۷۶	۴۹/۹۱۲۲	۰/۳۱۵۹	۸۷/۳	۱۳۸	۱۵۸	M-GAG/E-TC
۰/۵۲۹۹	۳۷/۳۰۴۸	۰/۳۵۸۷	۸۷/۵	۹۱	۱۰۴	M-CCC/E-TA
۰/۴۹۰۴	۵۲/۷۲۷۵	۰/۳۲۷۵	۸۲/۶	۱۳۳	۱۶۱	M-GC/E-GA
۰/۵۰۰۳	۱۳/۸۴۱۶	۰/۳۳۷۶	۸۰/۵	۳۳	۴۱	M-GAG/E-GT
۰/۱۷۲	۱۹/۲۳۹	۰/۳۵۴	۵۴/۳	۵۰	۹۲	M-GT/E-TC
۰/۳۰۷	۲۹/۴۸۹	۰/۳۸۹	۷۵/۸	۴۷	۶۲	M-TT/E-TG
۰/۲۷۶	۲۶/۰۲۶	۰/۳۲۷	۷۹/۶	۷۸	۹۸	M-CAG/E-GT
۰/۴۱۷۲	۳۶/۵۵۳	۰/۳۵۱۴۳	۸۰/۸۷	۹۱	۱۰۹/۳۷۵	میانگین

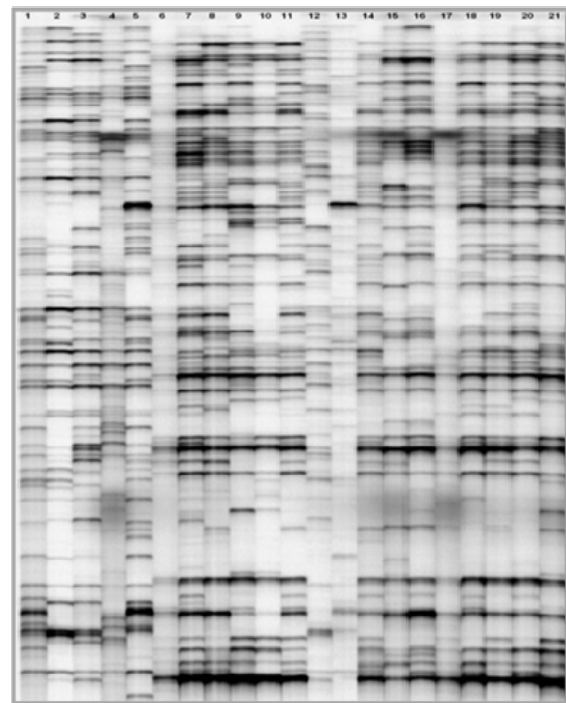
PIC* (محتوای اطلاعات چند شکلی؛ MI** (شاخص نشانگر؛ PIC*) درصد پلی مورفیزم؛ I*** (شاخص اطلاعات شانون



شکل ۲- گروه‌بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار gCLUTO v. 1.0 به روش خوشه‌ای.

در تصویر گروه‌بندی سه‌بعدی، با در نظر گرفتن فواصل قرار گرفتن قله‌ها از یکدیگر، دو گروه ۲ و ۴ و گروه‌های ۱، ۳ و ۵ کمترین فاصله را نسبت به یکدیگر نشان دادند (شکل ۳). گروه یک با بیشترین مقدار *Isim* (برابر یک) بالاترین شباهت درون گروهی و گروه ۵ با داشتن *Isim* معادل ۰/۹۹۲ کمترین شباهت درون گروهی را نشان دادند (جدول ۵). در گروه ۴، دورگ‌های (آلو × بادام)، (گوجه × بادام)، (آلو × زردآلو) و (گوجه × زردآلو) با مقدار *Isim* معادل ۰/۹۹۸ قرار گرفتند. با در نظر گرفتن تمامی ارقام و دورگ‌ها و بر مبنای مقدار *Esim*، گروه یک با کمترین مقدار، بیشترین تفاوت ژنتیکی را با سایر گروه‌ها دارد. همچنین ارقام زردآلو قرار گرفته در گروه ۶، بیشترین فاصله را از گروه‌های والدینی ۳ و ۵ نشان دادند (شکل ۳).

با کمک نرم افزار SplitsTree 4، ژنوتیپ‌ها در ۸ شاخه دسته‌بندی شدند. با مشاهده دندروگرام حاصل، گروه‌های ۱، ۲، ۵، ۷ و ۶ به ترتیب شامل ژنوتیپ‌های والدینی گوجه و آلو، هلو (در دو گروه نزدیک به هم)، بادام و زردآلو بودند. در این گروه‌بندی، گروه ۴ دورگ‌های مختلف، گروه ۳ بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام) و گروه ۸ بیشترین تعداد دورگ‌های (گوجه × زردآلو)، (آلو × زردآلو)، (گوجه × بادام) و (آلو × بادام) را شامل شدند. بنابراین ارقام والدینی در ۵ گروه و دورگ‌ها در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۴).



شکل ۱- نمونه‌ای از ژل اکریل آمید حاصل از آغازگرهای AFLP (MGAG/ETG).

بکار رفته است و این ترکیب نشانگر، بهتر از سایر ترکیب‌های استفاده شده می‌تواند فاصله ژنتیکی ارقام و دورگ‌ها را مشخص کند (شکل ۱). در تحقیق دیگری نیز که تنوع ژنتیکی ۴۲ رقم ژنوتیپ زردآلو با استفاده از ۵ آغازگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت، نشانگر M-GAG/E-TG بهتر از سایر نشانگرها مواد گیاهی را گروه‌بندی کرد (Majidian et al. 2011).

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با کمک نرم‌افزار gCLUTO v. 1.0 ارقام و دورگ‌های مورد استفاده در این پژوهش، در ۶ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). این گروه‌ها عبارت بودند از: گروه یک تنها شامل نمونه PLW، گروه دو دارای ۱۵ عضو با بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام)، گروه ۳ دارای ۱۱ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی آلو و گوجه، گروه ۴ با ۱۸ عضو شامل دورگ‌های (آلو × بادام)، (گوجه × بادام)، (گوجه × زردآلو)، (آلو × زردآلو)، گروه ۵ با ۳۴ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی بادام، هلو و دورگ (GF677 × بادام) و گروه ۶ با ۱۰ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی زردآلو.

جدول ۵- تجزیه خوشه‌ای حاصل از نرم افزار gCLUTO v. 1.0 در ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus*

Stability	ESdev ***	ESim **	ISdev ***	ISim *	تعداد اعضای هر خوشه	تعداد خوشه‌ها
۰/۸۳	۰	۰/۹۷۹	۰	۱	۱	۱
۰/۴۶	۰/۰۰۱	۰/۹۹۱	۰/۰۰۱	۰/۹۹۸	۱۵	۲
۰/۶۸۵	۰/۰۰۷	۰/۹۸۷	۰	۰/۹۹۶	۱۱	۳
۰/۸۹۶	۰/۰۰۲	۰/۹۸۹	۰	۰/۹۹۸	۱۸	۴
۰/۷۲۷	۰/۰۱	۰/۹۸۴	۰/۰۰۲	۰/۹۹۲	۳۴	۵
۰/۶۵	۰	۰/۹۸۸	۰	۱	۱۰	۶

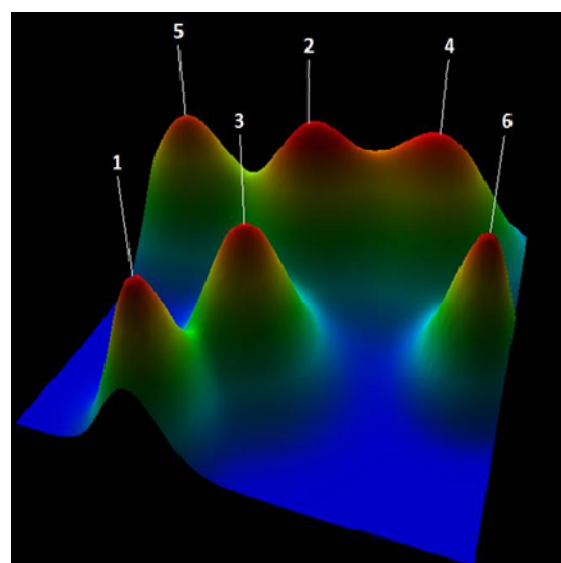
* (ISim) متوسط شباهت‌ها داخلی؛ ** (ESim) متوسط شباهت‌های خارجی؛ *** (ISdev ESdev) متوسط انحراف استاندارد داخلی و خارجی از این شباهت‌ها.

جدول ۶- نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها

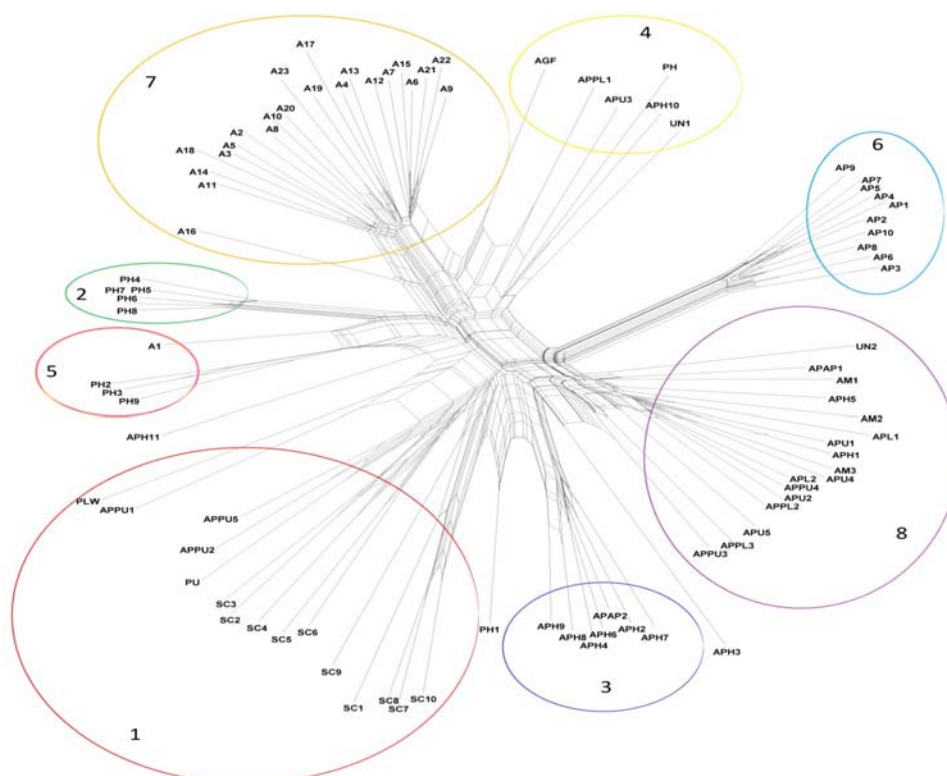
منبع تنوع	مجموع مربعات	اجزای واریانس	درصد تنوع
بین جمعیت	۳۳۲۷/۹۵۳	۳۲/۱۰۵۹۷	۳۳/۷۸۷۱۹
درون جمعیت	۴۵۵۷/۲۱۷	۶۲/۹۱۸۱۴	۶۶/۲۱۲۸۱
کل	۷۸۸۵/۱۷۰	۹۵/۰۲۴۱۱	---

با استفاده از نرم افزار Structure2.3 بر اساس روش مبتنی بر مدل Bayesian، فرض $K=2$ تا $K=12$ اجرا شد (K نشان‌دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای $\ln P(D)$ و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد (شکل ۵). بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی $\ln P(D)$ و بیشترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته بندی جمعیت‌های مورد مطالعه بشمار می‌روند. در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، $K=8$ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است. هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضربرب عضویت) نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد می‌باشد. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیشترین پهنای رنگی آن کلاستر را دارا باشد (شکل ۶).

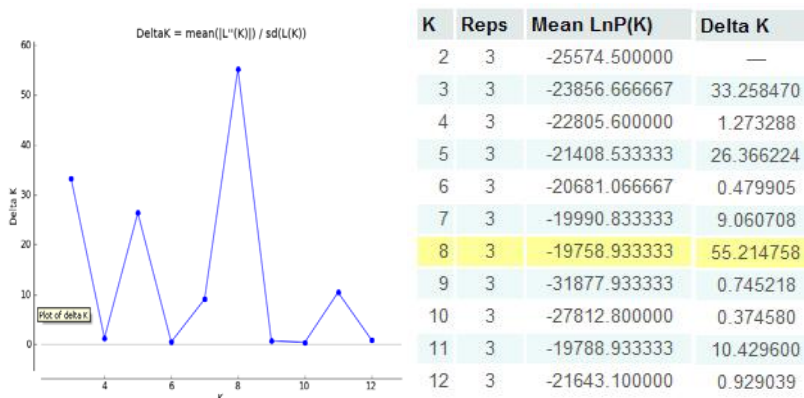
رنگ‌های قرمز، سبز، آبی، زرد، صورتی، فیروزه‌ای، نارنجی و بنفش به ترتیب برای گروه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ و مشابه گروه‌های دسته بندی شده با نرم‌افزار SplitsTree 4 در نظر گرفته شد (شکل ۴). وجود چند رنگ در ستون مربوط به یک فرد،



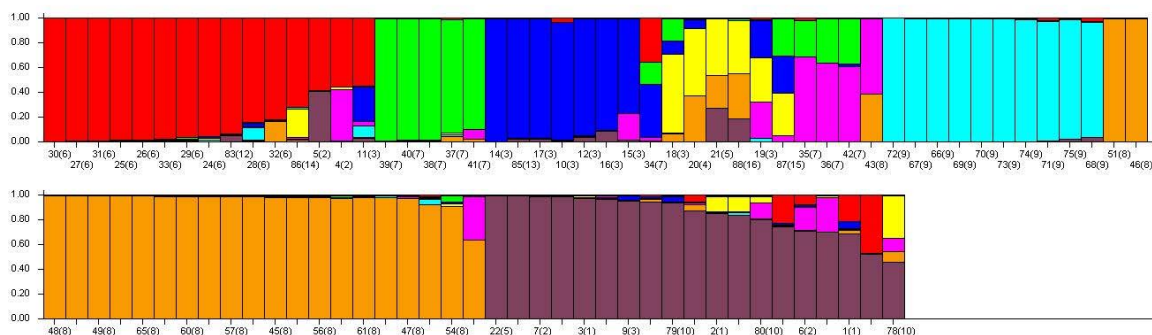
شکل ۳- گروه‌بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار gCLUTO v. 1.0. پارامترهای مورد استفاده: ارتفاع قله = ISim، حجم قله = تعداد نمونه‌ها در هر گروه، رنگ قله = نشان‌دهنده انحراف استاندارد داخلی بین نمونه‌های هر گروه. رنگ قرمز انحراف پایین و رنگ آبی انحراف بالا را نشان می‌دهد. فاصله قله‌ها از هم نمایانگر شباهت نسبی بین گروه‌هاست.



شکل ۴- گروه‌بندی اعمال شده برای ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار SplitsTree4

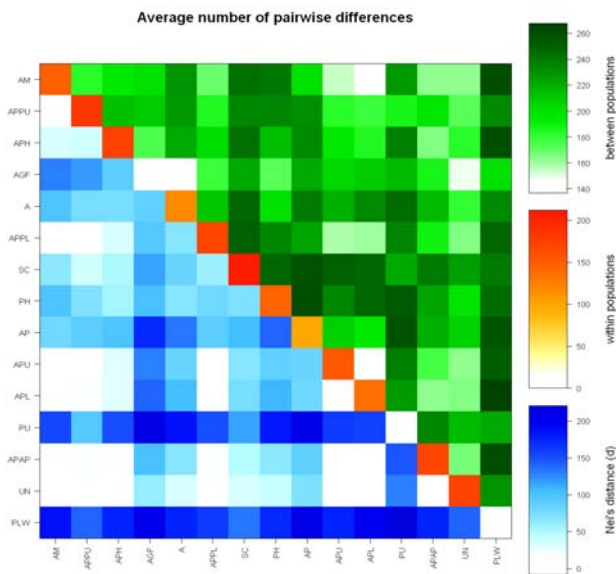


شکل ۵- تعیین بهترین تعداد کلاستر (K): مقادیر عددی ΔK و $\text{LnP}(D)$ سمت راست و نمودار ΔK سمت چپ.



شکل ۶- گروه بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از روش مبتنی بر مدل و نرم افزار Structure

Prunus با استفاده از نشانگر AFLP نشان داد که ارقام زردآلو نسبت به سایر گونه‌ها متمایزتر هستند (Aradhy et al. 2004).



شکل ۷- میانگین تفاوت‌های جفتی و فواصل ژنتیکی نی به منظور مقایسه درون و بین گروه‌ها بر اساس نشانگر AFLP

در تجزیه واریانس مولکولی، اختلافات ژنتیکی بین افراد درون جمعیت‌های تعیین شده بیشتر از بین جمعیت‌ها بود که می‌تواند نشان دهنده تنوع بالای ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های هر گروه باشد. بعلاوه این امر می‌تواند تنوع آلی مورد نیاز برای برنامه‌های اصلاحی آینده را تضمین کند. در تحقیقی مشابه، با بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی *Prunus microcarpa* و گونه‌های جنس *Prunus* اختلافات ژنتیکی بین افراد درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها برآورد شد (NuriNasa et al. 2010).

در این مطالعه مشخص شد که روش AFLP به طور همزمان مکان‌های ژنی زیادی را شناسایی کرده و می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار ژنتیکی مورد نیاز برای پیشبرد اهداف مختلف برنامه‌های اصلاحی مفید باشد. همچنین استفاده از تکنولوژی AFLP به کمک آغازگرهای نشاندار با فلورسنت و به کمک دستگاه (Licor) با توجه به وجود مزایایی نظیر عدم نیاز به رنگ‌آمیزی، سرعت بالا، حساسیت زیاد در نمایان سازی نوارها و تعداد و وضوح بالای آن‌ها، نسبت به روش قدیمی AFLP کارایی بیشتری دارد.

نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با جمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی آن فرد است. بطوریکه در بین دورگ‌ها، اختلاط رنگ‌های حاصل از اختلاط ژنتیکی گروه‌های والدینی به خوبی نمایان است. به عبارتی ژنوتیپ ۱۸ (هلو × بادام) شامل رنگ‌های بنفش، آبی، زرد و سبز، بخش‌هایی از ژنوم خود را از ارقام هلو دسته‌بندی شده در گروه ۲ (رنگ سبز) و ارقام بادام دسته‌بندی شده در گروه ۷ (رنگ بنفش) به ارث برده و از نظر ژنتیکی به گروه ۳ (رنگ آبی) با بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام) و گروه یک (رنگ زرد) شامل برخی از دورگ‌ها مشابهت دارد که این امر با توجه به دورگ بودن این نمونه، چندان دور از انتظار نمی‌باشد.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin3.5 اختلافات ژنتیکی بین افراد در گروه‌ها را ۶۶/۲ درصد و بین گروه‌ها را ۳۳/۷ درصد نشان داد (جدول ۶). همچنین با پردازش این داده‌ها در نرم‌افزار R 2.14.1 تصویری شماتیک از تفاوت‌های درون‌جمعیتی و بین‌جمعیتی آشکار شد. بر این اساس بیشترین تفاوت درون‌جمعیتی متعلق به جمعیت گوجه و آلو و کمترین تفاوت درون‌جمعیتی متعلق به ۳ جمعیت PLW (دارای ژنوتیپ PLW)، PU (دارای ژنوتیپ گوجه) و AGF (دارای دورگ GF677 × بادام) می‌باشد. بر اساس شاخص Nei محاسبه شده، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیتی به جمعیت‌های (زردآلو - هلو) و (زردآلو - بادام) می‌باشد و کمترین فاصله بین جمعیتی به جمعیت‌های (گوجه × بادام - آلو × زردآلو)، (آلو × بادام - گوجه × بادام) تعلق داشت (شکل ۷). با مشاهده دندروگرام حاصل از این نرم‌افزارها، ژنوتیپ‌های والدینی و دورگ‌های بین‌گونه‌ای در دسته‌هایی مجزا قرار گرفتند. گروه‌بندی حاصل از ژنوتیپ‌های والدینی شامل گونه‌های بادام، زردآلو، هلو، آلو و گوجه بکار رفته در این تحقیق، با طبقه‌بندی تاکسونومیکي ارائه شده برای جنس *Prunus* مطابقت داشت (Hummer and Janick 2009). بعلاوه اغلب دورگ‌های (هلو × بادام) از دورگ‌های شامل یک والد آلو یا گوجه متمایز شدند. همچنین در مقایسه‌های بین‌گروهی، گروه زردآلو نسبت به ۳ گروه والدینی دیگر فاصله ژنتیکی بیشتری نشان داد. در تحقیقی مشابه، بررسی روابط ژنتیکی ۷ گونه جنس

منابع

- Aradhya MK, Weeks C, Simon CJ (2004) Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae* 103:131-144.
- Bouhadida M, Casas AM, Gonzalo MJ, Arus P, Moreno MA, Gogorcena Y (2009) Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae* 120:237-245.
- Casas AM, Igarta E, Balaguer G, Moreno MA (1999) Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110:139-149.
- Dejampour J, Grigorian V, Majidian E, Asgharzadeh N (2007) Evaluation of some morphological characteristics and vegetative propagation of some interspecific hybrids in *Prunus*. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 8: 43-54. (In Farsi).
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- FAO (2010) FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://faostat.fao.org>. FAO, Rome, Italy
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7:574-578
- Giorgi M, Capocasa F, Scalzo J, Murri G, Battino M, Mezzetti B (2005) The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in the peach (cv. 'Suncrest'). *Scientia Horticulturae* 107:36-42.
- Hummer KE, Janick J (2009) Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. In: Foltá KM, Gardiner SE (eds) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and models* 8:1-17.
- Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML (2002) Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica* 127: 297-301.
- Huson DH and Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254-267.
- Lu ZX, Sosinski B, Reighard GL, Baird WV, Abbott AG (1998) Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome* 41: 199-207.
- Majidian P, Zeinalabedini M, Dejampour J, Krska B, Nakhoda B, Mardi M (2011) Evaluation of Genetic Relationships of Some Apricot Cultivars and Genotypes Using Fluorescent-AFLP Markers. XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Poland, Warsaw. 11-15.
- Martinez-Gomez P, Sozzi GO, Sanchez-Perez R, Rubio M, Gradziel TM (2003) New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1:52-63.
- NuriNasa M, Bolekb Y, Bardak A (2010) Genetic diversity and phylogenetic relationships of *Prunus microcarpa* C.A. Mey.subsp. *tortusa* analyzed by simple sequence repeats(SSRs). *Scientia Horticulturae* 127:220-227.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Rasmussen M, Karypis G (2004) gCLUTO an interactive clustering, visualization, and analysis system. In Technical Final Report 04-021. University of Minnesota.
- Sharifi Tehrani M, Mardi M, Sahebi J, Catalan P, Diaz-Perez A (2009) Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis. *Plant Systematics and Evolution* 282:57-70.
- Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Torchi M, Dicenta F, Martínwz-Gómez P (2008) Comparison of the use of morphological, protein, and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. *Scientia Horticulture* 116:80-88.