

ارزیابی ملکولی برخی ژنوتیپ‌های آنبه ایران با استفاده از

نشانگرهای ریز ماهواره

منصوره شمیلی^۱، محمدرضا فتاحی مقدم^۲، علیرضا طلایی^۳

۱- دانشجوی سابق دکتری گروه علوم باگبانی و عضو هیات علمی فعلی

دانشگاه هرمزگان

۲- دانشیار گروه علوم باگبانی دانشگاه تهران

۳- استاد گروه علوم باگبانی دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت:) - تاریخ پذیرش:)

چکیده

آنبه یکی از میوه‌های مهم مناطق گرمسیر و سرشار از مواد و عناصر غذایی است که در نواحی جنوبی ایران کشت و کار می‌شود. شناسایی ملکولی ژنوتیپ‌های آنبه به مدیریت ژرم پلاسم و جلوگیری از نامگذاری اشیاه آنها کمک می‌نماید. در این تحقیق از ۱۶ نشانگر اختصاصی ریزماهواره جهت بررسی ارتباط ژنتیکی و تنوع موجود بین ۴۱ ژنوتیپ آنbe موجود در ایران استفاده شد. در مجموع ۵۵ آلل با متوسط تعداد آلل موثر ۳/۵ عدد مشاهده شد. تعداد آلل بدست آمده بین ۲ تا ۶ عدد بود. مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و هتروزایگوسیتی مورد انتظار به ترتیب $0/30$ تا $0/87$ و $0/29$ تا $0/84$ بود. الگوی باندی حاصل از این ۱۶ جفت آغازگر توافضت ژنوتیپ‌های پاکستانی را از هندی تفکیک نماید. به جز اکلک سرخ'۲ و اکلک سرخ'۳ سایر ژنوتیپ‌های همنام در شاخه‌های متفاوت قرار گرفته‌اند همچنین تعداد ۱۸ اختصاصی در مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی بدست آمد که بیشترین تعداد ان متعلق به 'سندری'۲ و 'لانگرا'۱ بودند.

واژه‌های کلیدی

آنبه،
تنوع ژنتیکی،
نشانگر مولکولی،
ریزماهواره،

مقدمه

هسته، میزان ویتامین C میوه، میزان TSS آب میوه، درصد اسیدیته میوه، pH آب میوه و عملکرد درخت بود. نتایج این تحقیق نشان داد که اکثر صفات مربوط به میوه، مواد درونی و زمان گل دهی عوامل اصلی در تجزیه به عامل‌ها را تشکیل دادند. به طور کلی صفات موثر در ۱۶ گروه عاملی قرار گرفته‌اند که در مجموع ۸۳٪ از کل تغییرات را توجیه نمودند. تجزیه کلاستر با استفاده از این عوامل توانست ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به دو گروه اصلی شامل ژنوتیپ‌های هندی و پاکستانی تفکیک نماید (۵).

با وجود این که بررسی‌های مورفولوژیک همچنان به عنوان مبنا و اولین مرحله در مطالعه پتانسیل ژرم پلاسم و طبقه بنده آنها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸)، اما اغلب به تنهایی نمی‌توانند برای شناسایی روابط ژنتیکی ارقام استفاده شوند (۱۵ و ۱۷). امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای انگشت نگاری ژنتیکی جایگاه ویژه‌ای پیدا نموده است و نشانگرهای مولکولی خصوصاً در آشکار نمودن تنوع ژنتیکی گیاهان خویشاوند وقتی نشانگرهای فنوتیپی قادر به تشخیص آن نیستند، مفید می‌باشند. نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی کاراتر و قابل اعتمادتر بوده، از نظر تعداد نامحدود و معمولاً کمتر تحت تاثیر شرایط رشدی گیاه قرار می‌گیرند (۸ و ۱۷).

اولین گزارش استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت تشخیص ارتباط ژنتیکی بین گونه‌های انبه و همچنین تشخیص ارقام آن در سال ۱۹۹۳ توسط اشنل و نایت صورت گرفت. آنها روابط ژنتیکی ۹ گونه از *Mangifera* را توسط آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی مورد بررسی قرار دادند (۲۳). پس از آن گزارش‌های متعددی در زمینه موفقیت کاربرد نشانگرهای مولکولی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در انبه ارائه شده است (۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۲۰ و ۲۱). ریزماهواره‌ها که به عنوان توالی‌های کوتاه تکراری^۱ (STRs) شناخته شده‌اند، واحدهای تکراری پشت سر هم به طول ۱-۱۰ جفت باز می‌باشند. این نشانگرهای به طور فراوان در ژنوم وجود داشته و چندشکلی مناسبی نشان می‌دهند. علاوه بر آن دارای خصوصیاتی مانند قابلیت اتوماسیون، توارث همباز و سهولت در استفاده می‌باشند (۸).

انبه سلطان میوه‌ها، گیاهی دیپلویید ($x=40$) با ژنوم حدود 10^8 x ۸/۸ جفت باز است (۸). تولید جهانی انبه در سال ۲۰۰۷ (حدود ۷۰ میلیون تن) آن را همراه با موز، مرکبات، سیب و انگور، جزء پنج میوه اصلی دنیا از نظر تولید قرار داده است. کشورهای هند، چین، تایلند، مکزیک، پاکستان و اندونزی حدود ۷۵ درصد تولید جهانی آن را دارا می‌باشند و کشور هند به تنهایی ۴۰۰۰ سال است که انبه در هند و جنوب شرق آسیا کشت و کار می‌شود. مطالعات انجام شده راجع به منشاء و ناحیه پراکنش جغرافیایی این گیاه حاکی از آن است که هند با داشتن حدود ۱۰۰۰ رقم شناخته شده دارای بیشترین تنوع ژنتیکی از این گیاه بوده و به عنوان مبدا اولیه تنوع آن شناخته می‌شود. با این حال به دلیل وجود تنوع بسیار بالا از ژرم پلاسم این گیاه در کشورهای واقع در جنوب شرق آسیا، ناحیه تنوع ثانویه انبه را کشورهای میانمار، بنگلادش و فیلیپین در نظر گرفته‌اند (۱۷ و ۲۴).

بنا بر شواهد موجود، انبه ۴۰۰ سال پیش وارد ایران شده است. اکثر ارقامی که امروزه در کشور کشت و کار می‌شوند از کشورهای پاکستان و هندوستان وارد و در مناطق مختلف به اسامی متفاوت نامگذاری شده اند درنتیجه گاهی ژنوتیپ‌هایی که حتی ظاهر مشابهی ندارند دارای نام واحد می‌باشند که تشخیص آنها را مشکل ساخته است. علاوه بر آن گرده افسانی آزاد باعث تولید مجموعه‌ای هتروزایگوت از این نمونه‌ها در کشور شده است. انتخاب ارقام محلی بر اساس دارا بودن برخی صفات مطلوب منجر به گرینش نمونه‌های موجود شده است، اما روابط خویشاوندی ژنتیکی بین این ژنوتیپ‌ها و میزان قرابت و نزدیکی آنها تاکنون مورد توجه قرار نگرفته است (۱).

پژوهش‌های انجام شده روی گیاه انبه در ایران از سابقه چندانی برخوردار نمی‌باشد، ضمن این که این مطالعات عمدها بر صفات مورفولوژیک استوار بوده است و بیشتر صفات میوه را مورد تأکید قرار داده است (۲، ۳، ۴ و ۶). شمیلی و همکاران (۱۳۸۸) ۴۸ صفت کمی و کیفی را در ۴۸ ژنوتیپ انبه مورد بررسی قرار دادند. صفات مورد بررسی شامل مشخصات گل، برگ و دمبرگ، میوه و

^۱ Short Tandom Repeats (STRs)

میناب، روستای گلشوار، روستای تمبانو، روستای عظیم آباد، روستای فخر آباد)، روdan (روستای بند مولا، روستای کهنوج بالا، روستای برنتین) و همزمان با شروع رشد رویشی جدید شاخه‌ها در خرداد ماه جمع آوری گردید. به جز دو ژنتیپ پاکستانی 'سندری' و 'لانگرا' که طی چند سال اخیر وارد کشور گردیده‌اند و جزء ارقام کاملاً شناخته شده در منطقه هستند، سایر نمونه‌ها ژنتیپ‌هایی بودند که از سالیان طولانی وارد کشور شده ولی اطلاعات زیادی از نحوه ورود بسیاری از این ژنتیپ‌ها به ایران درد دسترس نمی‌باشد. بنا به اظهارات مالکان درختان از مجموع نمونه‌های جمع آوری شده منشاء احتمالی چهار ژنتیپ از پاکستان و سایر ژنتیپ‌ها از هندوستان بود. اسامی، محل جمع آوری و منشاء احتمالی نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA با استفاده از روش موری و تامسون با اندکی تغییرات (۱۹) و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم باگبانی دانشگاه تهران انجام شد. تکثیر DNA در حجم ۱۵ میکرولیتر (هر تیوب حاوی $0/4$ میکرولیتر از هر آغازگر ($0/0$ میلی مولار) بود WELLRED نشاندار شده بود، $0/6$ میکرولیتر از هر نوکلئوتید ($0/0$ میلی مولار)، $1/2$ میکرولیتر MgCl₂ ($0/0$ میلی مولار)، $0/0/0/1$ از Tween 20 ($0/0/0/5$ میکرولیتر از بافر Tris-HCl pH = 8/8)، $0/0/0/8/3$ میکرولیتر آب، 2 میکرولیتر از DNA ژنومی (۲۵ نانو گرم) و $0/6$ میکرولیتر ($0/5$ واحد) از DNA پلی مراز BioTaqTm (انجام شد (۲۴). واکنش تکثیر DNA توسط دستگاه ترموسایکلر بیوراد^۲ با برنامه PCR شامل یک دقیقه دمای 94 درجه سانتی گراد، سپس 30 چرخه شامل 30 ثانیه و اسرشت در 94 درجه سانتی گراد، 72 ثانیه اتصال در 55 درجه سانتی گراد و 1 دقیقه بسط در 72 درجه سانتی گراد و سپس مرحله پایانی بسط 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد صورت گرفت. طول یابی آلل‌ها توسط دستگاه الکتروفورز کاپیلاری مدل 8000 CEQ TMsans مورد بررسی قرار گرفت. این عمل 3 بار تکرار گردید تا از صحت داده‌ها اطمینان کامل حاصل شود. تشخیص و تفکیک قطعات DNA در سیستم الکتروفورز کاپیلاری توسط لیزرهای حساس به نور فلورسنت

هرچند در انبه گزارش‌هایی از کاربرد موفقیت آمیز نشانگرهای ریزماهواره در ارزیابی نوع ژنتیکی موجود می‌باشد، اما مکان آغازگرها بر روی کروموزوم‌های آن مورد بررسی قرار نگرفته است. در تحقیق آداتو و همکاران (۱۹۹۵) انگشت نگاری DNA توسط پروب‌های ریز ماهواره جهت شناسایی و تشخیص روابط ژنتیکی ۲۶ رقم و ۱۴ پایه انبه به کار گرفته شد (۷). ایدانگ و همکاران (۱۹۹۹) به منظور تفکیک ارقام انبه تک جنین از چند جنین از نشانگر ریزماهواره استفاده نمودند اما این نشانگر نتوانست ژنتیپ‌ها را بر این اساس تشخیص دهد (۱۱).

اشلن و همکاران (۲۰۰۵) تعداد ۱۵ مکان ریز ماهواره را از گونه Mangifera indica شناسایی و با آزمایش آنها روی ۵۹ رقم از فلوریدا و همچنین ۴ گونه دیگر از جنس Mangifera به این نتیجه رسیدند که ۱۳ مکان از آنها دارای چند شکلی می‌باشند. نتایج این تحقیق حاکی از مفید بودن این نشانگرها به منظور تشخیص ارقام و گونه‌های Mangifera بود (۲۲). دووال و همکاران (۲۰۰۵) موفق به معرفی مکان‌های جدید ریزماهواره‌ای در انبه شدند. در تحقیق مذکور ۲۸ جفت آغازگر قادر به تشخیص چند شکلی در 15 رقم انبه و ۲ گونه نزدیک به آن شدند. تعداد آلل‌ها بین $3-13$ و میزان هتروزایگوسیتی بین $0/0/0/85$ بود (۱۰).

با توجه به برنامه وزارت جهاد کشاورزی ایران در توسعه باغات انبه در استان هرمزگان، تشخیص ژنتیپ‌های هم نام از یکدیگر و کاهش اشتباه در نام گذاری‌ها می‌تواند گام موثری در ایجاد و گسترش کلکسیون آن در کشور باشد، ضمن اینکه انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی احتمالی با دقت کافی انجام خواهد شد. به دلیل برتری نشانگرهای ریزماهواره در بررسی چندشکلی ژنتیکی در انبه، در این تحقیق از آنها به منظور بررسی روابط ژنتیکی 41 ژنتیپ انبه ایران مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ژنتیپ‌های مورد مطالعه شامل 41 ژنتیپ بودند (جدول ۱) که نمونه‌های برگی آنها از شهرستان‌های بندرعباس (دهستان سیاهو، روستای وایکان)، شهرستان میناب (مرکز تحقیقات کشاورزی

² Bio-Rad Laboratories- Hercules- CA USA

نمایش داده می‌شود (شکل ۱). این بخش از کار در موسسه تحقیقاتی CSIC واقع در کشور اسپانیا انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده از سری آغازگرهای معرفی شده توسط ویروئل و همکاران بود که مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است.

صورت می‌گیرد. در صورت ردیابی رنگ فلورسنت در انتهای' قطعه DNA تکثیر شده با آغازگر فلورسنت، لیزر دستگاه تحریک می‌گردد. با هر بار تحریک لیزر، نور فلورسنت در طول موج‌های مختلف ساطع می‌شود که در نهایت به وسیله یک ردیاب دریافت شده و توسط سیستم به صورت اندازه باند (بر حسب جفت باز)

جدول ۱- اسامی ژنتیپ‌های آنبه مورد استفاده، منطقه جمع آوری و منشاء احتمالی آنها برای مطالعه با نشانگر ملکولی SSR

منشاء / احتمالی	محل جمع آوری	نام اختصاری	ژنتیپ	شماره	منشاء / احتمالی	محل جمع آوری	نام اختصاری	ژنتیپ	شماره
هندوستان	رودان	KILOO	کیلو	۲۲	پاکستان	میناب	LANGRA-I	لانگرا-۱	۱
هندوستان	رودان	MIKHAKI-2	میخکی-۲	۲۳	پاکستان	میناب	SENDERI-I	سندری-	۲
هندوستان	رودان	NABATI-2	نباتی-۲	۲۴	هندوستان	میناب	HELOV	هلو	۳
هندوستان	رودان	BELERSAN	بلرسان	۲۵	هندوستان	میناب	ANONYM-I	بی نام-۱	۴
هندوستان	رودان	ALMEHTA-2	آلمهتری-۲	۲۶	هندوستان	میناب	DOODOO	دودو	۵
هندوستان	رودان	SHAHANI	شاهانی	۲۷	هندوستان	میناب	ALMEHTA-I	آلمهتری-	۶
هندوستان	رودان	ANONYM-5	بی نام-۵	۲۸	هندوستان	میناب	ARBABI	اربابی	۷
هندوستان	رودان	ANONYM-6	بی نام-۶	۲۹	هندوستان	میناب	ZARAK	زرک	۸
هندوستان	رودان	ANONYM-7	بی نام-۷	۳۰	هندوستان	میناب	MAJLESI	مجلسی	۹
هندوستان	رودان	ANONYM-8	بی نام-۸	۳۱	هندوستان	میناب	ANONYM-2	بی نام-۲	۱۰
هندوستان	رودان	ANONYM-9	بی نام-۹	۳۲	هندوستان	میناب	MOSHK	مشک	۱۱
هندوستان	رودان	KALAK-2	کلاک سرخ-۲	۳۳	هندوستان	میناب	ANONYM-3	بی نام-۳	۱۲
هندوستان	رودان	CHARAK-2	چارک-۲	۳۴	هندوستان	میناب	KALAK-I	کلاک	۱۳
هندوستان	رودان	KHIYAR-2	خیار-۲	۳۵	هندوستان	میناب	CHARAK-I	چارک-۱	۱۴
هندوستان	رودان	KALAK-3	کلاک سرخ-۳	۳۶	هندوستان	میناب	KHIYAR-I	خیار-۱	۱۵
هندوستان	سیاهو	GOL	گل	۳۷	هندوستان	میناب	HABI	حاجی	۱۶
هندوستان	سیاهو	KHODROO	خودرو	۳۸	پاکستان	میناب	SENDERI-2	سندری-	۱۷
هندوستان	سیاهو	ANONYM-12	بی نام-۱۲	۳۹	هندوستان	میناب	ANONYM-4	بی نام-۴	۱۸
هندوستان	سیاهو	NESAA	نساء	۴۰	پاکستان	رودان	LANGRA-2	لانگرا-۲	۱۹
هندوستان	سیاهو	ZAPAK	زاپاک	۴۱	هندوستان	رودان	KHOOSHEI	خوشیه ای	۲۰
					هندوستان	رودان	MIKHAKI-I	میخکی-	۲۱

جدول ۲- اسامی آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای بررسی ۴۱ ژنوتیپ انبه*

توالی جفت آغازگر (۵'-۳')	شماره دسترسی به نشانگر در GenBank	جایگاه ریزماهواره
F:ATGGAGACTAGAATGTACAGAG R:ATTAATCTCGTCCACAAGT	AY628373	LMMA1
F:AAATAAGATGAAGCAACTAAAG R:TTAGTGTATTTGTTCTTG	AY628374	LMMA2
F:AAAAACCTTACATAAGTGAATC R:CAGTTAACCTGTTACCTTTT	AY628375	LMMA3
F:AGATTTAAAGCTCAAGAAAAAA R:AAAGACTAATGTGTTCCCTTC	AY628376	LMMA4
F:AGAATAAGCTGATACTCACAC R:TAACAAATATCTAATTGACAGG	AY628377	LMMA5
F:ATATCTCAGGCTTCGAATGA R:TATTAATTTCACAGACTATGTTCA	AY628378	LMMA6
F:ATTAACTCTCAACTTCAAC R:AGATTTAGTTTGATTATGGAG	AY628379	LMMA7
F:CATGGAGTTGTGATAACCTAC R:CAGAGTTAGCCATATAGAGTG	AY628380	LMMA8
F:TTGCAACTGATAACAAATATAG R:TTCACATGACAGATATACTT	AY628381	LMMA9
F:TTCTTAGACTAACAGACATT R:AGTTACAGATCTCTCCAATT	AY628382	LMMA10
F:ATTATTTACCTACAGAGTGC R:GTATTATCGGTAAATGTCTTCAT	AY628383	LMMA11
F:AAAGATAGCATTTAATTAAGGA R:GTAAGTATCGCTGTTGTTATT	AY628384	LMMA12
F:CACAGCTCAATAAACTCTATG R:CATTATCCCTAATCTAATCATC	AY628385	LMMA13
F:ATTATCCCTATAATGCCCTAT R:CTCGGTTAACCTTGACTAC	AY628386	LMMA14
F:AACTACTGTGGCTGACATAT R:CTGATTAACATAATGACCACAT	AY628387	LMMA15
F:ATAGATTCATATCTCTTGCAT R:TATAAATTATCATCTTCACTGC	AY628388	LMMA16

شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR در دستگاه کاپیلاری برای دو مکان مورد بررسی که با رنگ‌های مختلف فلورستی انجام شده و اندازه آلل‌ها به صورت پیک گراف ثبت شده است

مربوط به مکان‌های LMMA3 و LMMA6 با ۶ آلل چند شکل و پس از آنها LMMA15 و LMMA11 با ۵ آلل چند شکل بودند. تعداد آلل موثر بین ۱ تا ۲/۷ محاسبه شد. ویروئل و همکاران و دووال و همکاران نیز به ترتیب تعداد آلل موثر ۳/۵ و ۳/۱ را در بین نمونه‌های انبه مورد بررسی گزارش کردند (۱۰ و ۲۴). بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده در مکان‌های LMMA3 و LMMA11 برابر ۰/۸۷ و ۰/۸۳ و کمترین آن در نشانگر LMMA2 و LMMA14 برابر ۰/۳۰ و ۰/۴۸ بود. مکان‌های LMMA3 و LMMA11 همچنین بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار (به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۸۱) و نشانگر LMMA14 کمترین مقدار (۰/۲۹) را نشان دادند. با توجه به نتایج بدست آمده میتوان گفت که نشانگرهای LMMA3 و LMMA11 با بیشترین هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، بیشترین شاخص چندشکلی را نشان داده و نسبت به سایر مکان‌ها توانسته است نمونه‌ها را بهتر تفکیک کند. هتروزایگوسیتی مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های انبه که توسط ویروئل و همکاران و دووال و همکاران گزارش شده است نیز به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۸۶ و ۰/۳۹ تا ۰/۸۶ بوده است (۱۰ و ۲۴).

با توجه به پراکنش آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، مقدار عددی احتمال یکسانی (PI) آنها پائین بود. کمترین مقدار PI نشان دهنده تنوع حداقل ژنوتیپ‌ها و قدرت تمایز بالای آن می‌باشد، مربوط به نشانگرهای LMMA6 و LMMA10 و LMMA14 (۰/۱۳) بود. نشانگر LMMA9 بیشترین مقدار PI برابر با ۰/۵۵ را دارا بود که نشان از توانایی پایین این مکان در جداسازی ژنوتیپ‌ها دارد. در تحقیق ویروئل و همکاران که از نشانگرهای مذکور به منظور تفکیک تعدادی از ارقام انبه استفاده شده بود، بیشترین مقدار شاخص احتمال یکسانی معادل ۰/۶۶ و مربوط به نشانگر LMMA5 و کمترین میزان آن در نشانگر LMMA1 (۰/۱۱) مشاهده گردیده است (۲۴). منفی شدن مقدار شاخص ثبتیت ژنی (F) نشان از بالاتر بودن هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به قابل انتظار بوده است. با توجه به تمایل ژنوتیپ‌های انبه به گرده افسانی آزاد که علت اصلی آن خود ناسازگاری شدید ژنوتیپها است و همچنین رابطه عکس بین

تجزیه و تحلیل داده‌ها: قطعات DNA تکثیر شده توسط نشانگرها بر اساس اندازه آلل‌ها (جفت باز) امتیازدهی شدند. نرم افزار ARLEQUIN(3.1) به منظور محاسبه تعداد آلل‌ها، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و هتروزایگوسیتی مورد انتظار، نرم افزارهای GENEPOP و POPGENE(32) جهت محاسبه تعداد آلل موثر، فراوانی آلل‌ها و شاخص ثبتیت ژنی به کار گرفته شدند. MSAT2 حضور آلل‌های اختصاصی در جمعیت توسط نرم افزار محاسبه شد. احتمال شباهت هر ژنوتیپ توسط نرم افزار IDENTITY(1.0) محاسبه گردید.

گروه بندی ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه دایس و ترسیم دندروگرام بر اساس روش UPGMA انجام شد. ضریب کوفتیکی به منظور تعیین میزان برازش ماتریس تشابه و دندروگرام حاصله مورد محاسبه قرار گرفت. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)^۳ توسط برنامه NTSYS(2.11) صورت گرفت.

نتایج و بحث

جدول ۳ مکان‌های SSR مورد بررسی، تعداد آلل بدست آمده، تعداد آلل موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده، هتروزایگوسیتی مورد انتظار، شاخص ثبتیت و احتمال یکسانی محاسبه شده برای این مکان‌ها را نشان می‌دهد. فراوانی آلل‌های حاصل از مکان‌های SSR به کار رفته در جدول ۴ آمده است. تمامی مکان‌های SSR مورد مطالعه به جز مکان LMMA5 چندشکل بودند و در نهایت ۵۵ آلل در محدوده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تولید نمودند. ایدانگ و همکاران، اشنل و همکاران، ویروئل و همکاران و دووال و همکاران به ترتیب با استفاده از ۱۶، ۱۵، ۲۸ و ۲۸ مکان ریزماهواره توانستند ۵۶، ۱۳، ۸۸ و ۱۲۱ آلل چند شکل را در محدوده ۱۴، ۱۱، ۲۲ و ۲۴ ژنوتیپ انبه مورد مطالعه مشاهده نمایند (۱۰، ۱۱، ۲۲ و ۲۴).

بر اساس نتایج، متوسط تعداد آلل مشاهده شده معادل ۳ عدد بود که تعداد آلل بین ۲ تا ۶ در مکان‌های مختلف مورد بررسی متفاوت بود. در نشانگر LMMA5 یک باند ۲۸۳ جفت بازی در تمام ژنوتیپ‌ها به صورت مشترک مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل

³ Principal Co-Ordinates Analysis

نشان دادند. اکثر ژنوتیپ‌های باقی مانده در حد تشابه ۰/۶ در یک شاخه گروه‌بندی شدند.

نتایج دسته بندی ژنوتیپ‌ها با نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیکی که در مورد همین نمونه‌ها صورت گرفته بود (۵) هماهنگی دارد. شمیلی و همکاران به این نتیجه رسیدند که انبه‌های پاکستانی در مقایسه با انبه‌های هندی میوه و بذر بزرگ‌تری دارند، ضمن اینکه از نظر شکل، طعم، رنگ و عطر میوه، میزان فیبر، قند و ویتامین ث میوه رسیده نیز تفاوت‌هایی نشان دادند (۵). بر اساس نتایج شمیلی و همکاران ژنوتیپ‌های سندری-۱ و سندری-۲ که در این بررسی نیز بصورت جداگانه از سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند، بیشترین مقدار وزن، طول، عرض و حجم میوه را دارا بودند (۵). قرار گرفتن برخی ژنوتیپ‌ها در فواصل بسیار نزدیک حاکی از تشابه ژنتیکی بالای آنها می‌باشد که نشان می‌دهد برخی از آنها در واقع کلون‌های رویشی از یک والد مادری می‌باشند و تفاوت مشاهده شده ناشی از جهش در یک صفت است. نتایج مشابهی از گروه‌بندی برخی ژنوتیپ‌های انبه بر اساس شکل میوه، نوع جنین و منشاء جغرافیایی توسط ویرؤل و همکاران و ایدانگ و همکاران گزارش شده است (۱۱ و ۲۴).

نتایج این آزمایش نشان داد که به جز کلک سرخ-۲ و کلک سرخ-۳ سایر ژنوتیپ‌های همنام در شاخه‌های متفاوت و دور از یکدیگر قرار دارند. همچنین ژنوتیپ 'مشک' با چارک-۲ و 'بی نام-۶، خودرو' با 'بی نام-۱۲' و ژنوتیپ‌های 'مجلسی' و 'بی نام-۱' یکسان تشخیص داده شدند. نتایج تحقیق شمیلی و همکاران قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های همنام نبود که این مساله نیاز به استفاده همزمان از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی را در تفکیک ژنوتیپ‌ها آشکار می‌سازد (۵).

در این بررسی ۴۱ ژنوتیپ توسط ۱۶ جفت مکان ریزماهواره انجام شد که به طور متوسط حدود ۴ الی در هر مکان بدست آمد و درصد بالایی از آلل‌های اختصاصی در مکان‌های مورد بررسی (۳۲ درصد مکان‌ها) مشاهده شد که اکثر این آلل‌های اختصاصی متعلق به نمونه‌های پاکستان بودند.

میزان هتروزایگوسیتی و تعداد آلل موثر با احتمال یکسانی و بالا بودن هتروزایگوسیتی مشاهده شده در مورد آنها میتوان منفی بودن شاخص تثییت زنی را توجیه کرد.

تعداد ۱۸ آلل اختصاصی در مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده شد که اکثر آنها مربوط به ژنوتیپ‌های 'سندری-۲' و 'لانگرا-۱' بودند. ژنوتیپ‌های 'سندری-۱' دو آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA10، 'سندری-۲' دو آلل در مکان ریزماهواره LMMA2 و دو آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA10، 'حوشه ای' یک آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA2 و یک آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA3، 'لانگرا-۱' دو آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA6، یک آلل اختصاصی در هر یک از مکان‌های ریزماهواره LMMA9، 'LMMA13، LMMA11 و LMMA16' یک آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA8، 'بی نام-۳' یک آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA15 و 'خیار-۱' یک آلل اختصاصی در مکان ریزماهواره LMMA15 را دارا بودند. با مشاهده آلل‌های اختصاصی، می‌توان ژنوتیپ‌های نامبرده را با احتمال بالا و گاهی استفاده از تک مکان SSRs تفکیک کرد. در تحقیقات دیگر نیز به قدرت نشانگر SSRs در تفکیک ژنوتیپ‌ها اشاره شده است (۹).

آنالیز کلاستر توانست ژنوتیپ‌های منطقه را بر اساس منشاء جغرافیایی تفکیک نماید (شکل ۲). ضریب کوفتیکی بالایی (۰/۹۳۶) بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفتیکی مشاهده شد. دو ژنوتیپ پاکستانی 'سندری-۱' و 'سندری-۲' که از نظر ژنتیکی از سایر ژنوتیپ‌ها متفاوت بودند در شاخه‌های جداگانه قرار گرفتند، بدین ترتیب دو ژنوتیپ یاد شده به ترتیب با داشتن ۲ و ۴ آلل اختصاصی از سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفکیک شدند. گروه دیگر شامل ژنوتیپ‌های هندی و قدیمی موجود در منطقه بود که در طول سالیان متمادی با شرایط آب و هوایی منطقه سازگار شده‌اند. در این مجموعه 'لانگرا-۱' و 'لانگرا-۲' نیز که دارای ۷ و ۱ آلل اختصاصی بودند در کلاستر مربوطه در شاخه‌های متمایزی قرار گرفتند و از نظر ژنتیکی الگوی متفاوتی از سایر ژنوتیپ‌ها

وارد کشور شده به تدریج از طریق پیوند و یا از طریق انتخاب دانهال‌های بذری برتر در سراسر کشور گسترش یافته باشد. به طوریکه ژنوتیپ‌های جدیدتر پاکستانی و یا هندی فاصله ژنتیکی بیشتری با آنها نشان دادند.

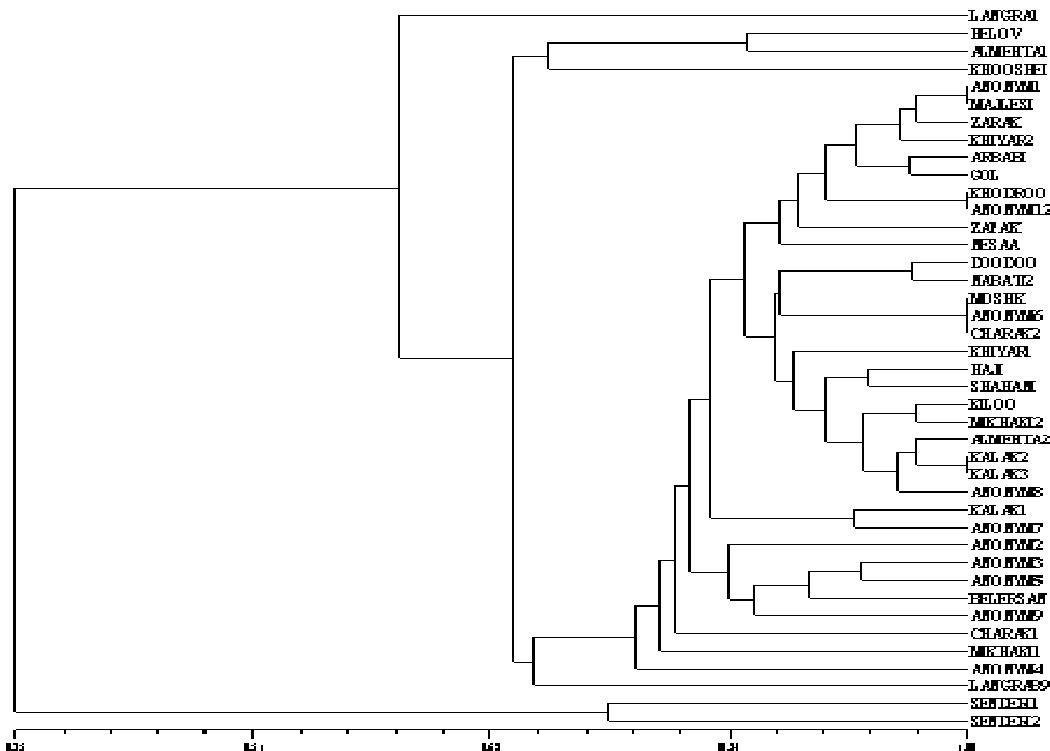
بطور کلی میتوان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های آنبه موجود در ایران تنوع نسبتاً بالایی در مکان‌های SSR مورد بررسی دارند و با توجه به اینکه در هر مکان یک یا دو آلل از فراوانی نسبتاً بالاتری برخوردار بودند لذا احتمال مشترک بودن جد اولیه این ژنوتیپ‌ها بسیار بالاست که میتواند از ژنوتیپ‌های قدیمی‌تر پاکستان یا هند

جدول ۳- پارامترهای ژنتیکی ۱۶ نشانگر SSR استفاده شده در ۴۱ ژنوتیپ آنبه ایران

احتمال یکسانی (PI)	شاخص ثبتی (F)	هتروزاکوستی مورد انتظار (He)	هتروزاکوستی مشاهده شده (Ho)	تعداد آلل موثر	تعداد آلل مشاهده شده	جایگاه ریزماهواره
۰/۱۹	-۰/۰۴	۰/۶۵	۰/۶۸	۲/۰۹	۳	LMMA1
۰/۲۱	-۰/۰۳	۰/۳۹	۰/۴۸	۱/۰۷	۴	LMMA2
۰/۱۵	-۰/۰۳	۰/۸۴	۰/۸۷	۱/۰۱	۶	LMMA3
۰/۲۲	-۰/۰۲	۰/۴۷	۰/۵۳	۱/۰۹	۳	LMMA4
۰/۱۳	-۰/۰۱	۰/۳۹	۰/۰۵	۲/۰۹	۶	LMMA6
۰/۲۶	-۰/۰۹	۰/۵۴	۰/۰۹	۱/۰۸	۳	LMMA7
۰/۲۲	-۰/۰۶	۰/۰۰	۰/۰۳	۱/۰۱	۳	LMMA8
۰/۰۰	-۰/۰۳	۰/۷۱	۰/۷۳	۱/۰۷	۳	LMMA9
۰/۱۳	-۰/۰۱	۰/۶۱	۰/۶۲	۱/۰۵	۳	LMMA10
۰/۱۵	-۰/۰۳	۰/۶۱	۰/۸۳	۲/۰۱	۵	LMMA11
۰/۱۵	-۰/۰۸	۰/۴۷	۰/۰۱	۱/۰۹	۳	LMMA12
۰/۰۰	-۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۶۴	۱/۰۳	۳	LMMA13
۰/۱۳	-۰/۰۳	۰/۲۹	۰/۳۰	۱/۰۷	۲	LMMA14
۰/۱۹	-۰/۰۲	۰/۷۷	۰/۷۹	۱/۰۹	۵	LMMA15
۰/۱۹	-۰/۰۱	۰/۷۵	۰/۷۶	۱/۰۹	۴	LMMA16
۰/۲۲	-۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۶۲	۱/۰۰	۳/۷	مانگن

جدول ۴- فراوانی آلل‌های حاصل از ۱۶ مکان SSR استفاده شده در ۴۱ ژنوتیپ آنبه ایران

مکان ریز ماهواره مورد بررسی															آلل مشاهده شده
LMMMA16	LMMMA15	LMMMA14	LMMMA13	LMMMA12	LMMMA11	LMMMA10	LMMMA9	LMMMA8	LMMMA7	LMMMA6	LMMMA5	LMMMA4	LMMMA3	LMMMA2	LMMMA1
۰/۱۱	۰/۰۵	۰/۸۲	۰/۰۲	۰/۳۷	۰/۱۴	۰/۹۱	۰/۹۳	۰/۱۳	۰/۰۲	۰/۰۵	۱	۰/۳۸	۰/۱۲	۰/۹۳	۰/۰۷
۰/۷۵	۰/۰۴	۰/۱۸	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۱۴	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۰۹	B
۰/۰۶	۰/۰۲		۰/۸۹	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	C
۰/۰۸	۰/۰۷				۰/۴۶	۰/۰۲				۰/۲۹		۰/۷۱	۰/۰۲		D
۰/۰۲					۰/۳۲	۰/۰۲				۰/۰۲		۰/۰۵		۰/۰۲	E
										۰/۰۲				۰/۰۲	F



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه بندی ۴۱ ژنوتیپ انبه مورد بررسی با نشانگرهای SSR، بر اساس ماتریس تشابه دایس و روش گروه بندی UPGMA (اسامی ژنوتیپ‌ها به همراه نام اختصاری آنها در جدول ۱ آمده است)

۴- سماوی اوزی ح و سعیدی غ (۱۳۷۰) شناسایی و جمع آوری اقام انبه استان هرمزگان، گزارش سالانه مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر هرمزگان.

۵- شمیلی م، طلائی ع، فتاحی مقدم م ر (۱۳۸۸) بررسی تنوع ژنتیکی و الگوی باردهی ژنوتیپ‌های انبه ایران. رساله دکتری گروه علوم باگبانی دانشگاه تهران

۶- لطیفی خواه الف (۱۳۸۱) بررسی تنوع ژنتیکی دانهال‌های انبه در برخی از نقاط استان سیستان و بلوچستان با استفاده از برخی صفات مورفوژیکی و فیزیکوشیمیایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

7- Adato A, D Sharon, U Lavi, J Hillel, and S Gazit (1995) Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of mango (*Mangifera indica*) genotypes, Journal of American Society for Horticultural Sciences, 120:259-264.

سپاسگذاری: از معاونت پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و همچنین موسسه تحقیقاتی CSIC کشور اسپانیا به جهت فراهم نمودن هزینه‌ها و امکانات انجام این آزمایش سپاسگذاری می‌شود.

منابع

- ۱- امامی س (۱۳۸۰) کشت و پرورش انبه، دفتر تولید برنامه‌های ترویجی و انتشارات فنی.
- ۲- راستگو س (۱۳۸۰) بررسی تنوع ژنتیکی دانهال‌های انبه در برخی از نقاط استان هرمزگان با استفاده از برخی صفات مورفوژیکی و فیزیکوشیمیایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران.
- ۳- سابکی الف و حاجیان س (۱۳۸۳) شناسایی جمع آوری و مقایسه ژنوتیپ‌های مختلف ارقام انبه، مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر سیستان و بلوچستان.

- 8- Ciofi C, S M Funk, T Coote, D J Cheesman, R L Hammon, I J Saccheri and M W Bruford, (2001) Molecular tools for screening biodiversity in plants and animals. Karp A P, G Isaac and D S Ingram(ed), Kluwer academic publication, pp 288 -296.
- 9- Degani C, R El-Batsri, and S Gazit (1990) Enzyme polymorphism in mango, Journal of American Society for Horticultural Sciences, 115:844-847.
- 10- Duval M F, J Bunel, C Sitbon, and A Risterucc (2005) Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.), Molecular Ecology Notes, 5:824-826.
- 11- Eiadthong W, K Yonemori, A Sugiura, N Utsunomiya, and S Subahadrabandhu (1999) Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat (-SSR-) anchored primers, Scientia Horticulturae, 82:57-66.
- 12- He Xin-Hua G, L Yong-ze, I Yang-mi, and O U Sh-jin (2007) Assessment of the genetic relationship and diversity of mango and its relatives by cpISSR marker, Agriculture Science in China, 6:137-142.
- 13- Ishtiaq A R, N Tabbasam, A Ullah Malik, S Ahmad Malik, Y Zafar, and M Rahman (2008) Assessment of genetic diversity among mango (*Mangifera indica* L.) genotypes using RAPD markers, Scientia Horticulturae, 117:297-301.
- 14- Jintanawongse S, and S Changtragoon (2000) Identification of cultivars and certification of hybrids in mango (*Mangifera indica*) by isoenzyme gene markers, Acta Horticulturae, 509:177-184.
- 15- Karihaloo J L, and Y K Dwivedi (2003) Analysis of Indian mango cultivars using RAPD markers, Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78:285-289.
- 16- Kashkush k, F Jinggui, E Tomer, and U Lavi (2001) Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*), Euphytica, 122:129-136.
- 17- Lopez J A, O Martinez, and O Paredes-Lopez (1997) Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* cultivars using RAPD markers, Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 32:1105-1108.
- 18- Mukherji S K (1989) Descriptors for mango, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- 19- Murray M G, and W F Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Research, 8:4321-4326.
- 20- Ravishankar K V, L Anand , and M R Dinesh (2000) Assessment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD markers, Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 15:198-201.
- 21- Schnell R J, C M Ronning, and R J Knight (1995) Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* using RAPD markers, Theoretical and Applied Genetics, 90:269-274.
- 22- Schnell R J, C T Olano, W E Quintanilla, and A W Meerow (2005) Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa, Molecular Ecology Notes, 5:625-627.
- 23- Schnell R J, and R J Knight (1993) Genetic relationships among *Mangifera spp.* based on RAPD markers, Acta Horticulturae, 341:86-92.
- 24- Viruell M A, P Escribano, M Barbieri, M Ferri, and J I Hormaza (2005) Fingerprinting embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* Anacardiaceae) with micro-satellites, Molecular Breeding, 15:383-393.