

کاربرد نشانگرهای AFLP در مطالعه ساختار ژنتیکی هیریدهای 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 زنجانی^۴، علی ایمانی^۵، علی سلیمانی^۶، محسن مردی^۷

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

۲- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی

۳- استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

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

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

۱,2,7. 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: mzeinalabedini@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 ۲۲۸ نوار چند شکل با الگوی نواری واضح نشان دهد. با استفاده از نرم افزارهای gCLUTO و Structure 2.3، SplitsTree 4 v. 1.0 و 2.14.1 R اغلب دورگهای (هلو × بادام) از دورگهای دارای یک والد آلو یا گوجه تقسیک 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،

فیلوجنتیک،

AFLP

Prunus

مقدمه

تنوع ژنتیکی چهار گونه وحشی ایرانی جنس *Prunus* شامل *P. lycioides*, *P. scoparia*, *P. hauskentchii*, *eleagnifolia* و *P. persica* نیز 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 خوشبندی صحیحی برای جمعیت‌های متفاوت گیاهی به دست آورد. از نشانگر AFLP در انگشت نگاری و تشخیص ژنتیکی ژرم پلاسم‌ها، 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). اولين نقهه پيوستگي ژنتيكي جمعيت پاييه های Prunus و شناسايي نشانگرهای پيوسته با مقاومت در پاييه ها با استفاده از AFLP ايجاد شد که می تواند دليل بر اهميت بكارگيري اين نشانگر در مطالعات پاييه های اين جنس باشد (Lu et al. 1998). هدف از اين تحقیق، بررسی مولکولی پایه‌های انتخابی و تجاری حاصل از برنامه‌های اصلاحی جنس *Prunus*، بررسی تنوع ژنتیکی دورگ‌های بین‌گونه‌ای مختلف و همچنین ارزیابی روابط فیلوجنتیکی بین والدین دورگ‌ها است.

مواد و روش‌ها

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

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. armeniaca*), زردآلو (*P. dulcis*) و آلو گیلاس (*P. avium*), آبلالو (*P. cerasus*), هلو (*P. domestica*) و *P. cerasifera*, *P. salicina* (منابع درختان میوه، گیاهان روغنی، چوبی، زیستی، خشکباری و پایه مورد توجه می‌باشد (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 مزروعه‌ای 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 گروه‌بندی‌های حاصل با برخی از ویژگی‌های مورفولوژی منطبق بود (Casas et al. 1999).

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

| ردیف | نام | منشاء | ردیف | نام اختصار | منشاء | ردیف | نام | منشاء |
|------|--------|------------------|------|------------|----------------|------|---------|------------------|
| 1 | HS703 | میروبلان × بادام | 47 | 'AM1' | سنهند | 48 | 'AM2' | میروبلان × بادام |
| 2 | HS721 | میروبلان × بادام | 49 | 'AM3' | 10_11 | 50 | 'APPU1' | میروبلان × بادام |
| 3 | HS704 | میروبلان × بادام | 51 | 'APPU2' | 14_24 | 52 | 'APPU3' | گوجه × زردآلو |
| 4 | HS522 | گوجه × زردآلو | 53 | 'APPU4' | A230 | 54 | 'APPU5' | گوجه × زردآلو |
| 5 | HS304 | گوجه × زردآلو | 55 | 'APH1' | بادام | 56 | 'APH2' | گوجه × زردآلو |
| 6 | HS303 | گوجه × زردآلو | 57 | 'APH3' | بادام | 58 | 'APH4' | هلو × بادام |
| 7 | HS117 | گوجه × زردآلو | 59 | 'APH5' | بادام | 60 | 'APH6' | هلو × بادام |
| 8 | HS302 | گوجه × زردآلو | 61 | 'APH7' | بادام | 62 | 'APH8' | هلو × بادام |
| 9 | HS811 | هلو × بادام | 63 | 'APH9' | بادام | 64 | 'APH10' | هلو × بادام |
| 10 | HS-401 | هلو × بادام | 65 | 'APH11' | بادام | 66 | 'AGF' | GF677 × بادام |
| 11 | HS-403 | هلو × بادام | 67 | 'APPL1' | زردآلو | 68 | 'APPL2' | آلوا × زردآلو |
| 12 | HS737 | هلو × بادام | 69 | 'APPL3' | کائیز | 70 | 'APPL4' | آلوا × زردآلو |
| 13 | GF677 | هلو × بادام | 71 | 'SC1' | زردآلو | 72 | 'SC2' | آلوا |
| 14 | HS314 | هلو × بادام | 73 | 'SC3' | زردآلو | 74 | 'SC4' | آلوا |
| 15 | HS411 | هلو × بادام | 75 | 'SC5' | زردآلو | 76 | 'SC6' | آلوا |
| 16 | HS126 | هلو × بادام | 77 | 'SC7' | زردآلو | 78 | 'SC8' | آلوا |
| 17 | HS-202 | هلو × بادام | 79 | 'SC9' | زردآلو | 80 | 'SC10' | آلوا |
| 18 | HS503 | هلو × بادام | 81 | 'PH1' | بادام | 82 | 'PH2' | هلو |
| 19 | HS-402 | هلو × بادام | 83 | 'PH3' | گوجه | 84 | 'PH4' | هلو |
| 20 | HS507 | GF677 × بادام | 85 | 'PH5' | زردآلو × بادام | 86 | 'PH6' | هلو |
| 21 | HS412 | آلوا × زردآلو | 87 | 'PH7' | زردآلو × بادام | 88 | 'PH8' | هلو |
| 22 | HS407 | آلوا × زردآلو | 89 | 'PH9' | — | 90 | 'PH10' | هلو |
| 23 | HS409 | آلوا × زردآلو | 91 | 'A1' | بادام | 92 | 'A2' | بادام |
| 24 | | آلوا | 93 | 'A3' | بادام | 94 | Falsa | |
| 25 | | k-3 | 95 | | | 96 | بالا | |
| 26 | | stant | 97 | | | 98 | | |
| 27 | | pre | 99 | | | 100 | | |
| 28 | | A=St | 101 | | | 102 | | |
| 29 | | BL-R | 103 | | | 104 | | |
| 30 | | OB | 105 | | | 106 | | |
| 31 | | K1 | 107 | | | 108 | | |
| 32 | | Z-12 | 109 | | | 110 | | |
| 33 | | AL-T | 111 | | | 112 | | |
| 34 | | بی نام | 113 | | | 114 | | |
| 35 | | شلیل انجیری | 115 | | | 116 | | |
| 36 | | A-S | 117 | | | 118 | | |
| 37 | | RH | 119 | | | 120 | | |
| 38 | | B1 | 121 | | | 122 | | |
| 39 | | B2 | 123 | | | 124 | | |
| 40 | | FR | 125 | | | 126 | | |
| 41 | | K9 | 127 | | | 128 | | |
| 42 | | H-L | 129 | | | 130 | | |
| 43 | | هلوی سنهند | 131 | | | 132 | | |
| 44 | | Falsa | 133 | | | 134 | | |
| 45 | | بالا | 135 | | | 136 | | |
| 46 | | بوته | 137 | | | 138 | | |

ژنتیکی، گروه‌بندی، ساختار ژنتیکی و تفسیر روابط ژنتیکی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* از روش‌های آماری RB و UPGMA و Bayesian با کمک نرم‌افزارهای v.1.0 gCLUTO و Structure2.3 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 RB¹ 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 $\ln P(D)$ انتخاب شد (Evanno et al. 2005).

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای فاصله با روش Neighbor-net (تغییر یافته روش Neighborjoining) و با ضریب Dice به کمک نرم (Huson and Bryant 2006). در نهایت، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز توسط نرم‌افزار Arlequin3.5 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 (PIC) 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) و M-GT/E-TC پایین‌ترین مقدار این شاخص 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 TG-M-GAG/E-TG با بالاترین مقادیر PIC و شاخص شانون، کارآمدترین نشانگر در بین نشانگرهای MI محسوب شدند.

¹ Partial repeated bisection

(جدول ۱). پایه‌های دورگ تحت بررسی، نتایج طرح پژوهشی ایستگاه تحقیقات باستانی 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، گرینش اولیه شدند (Dejampour et al. 2007).

به منظور سهولت تفسیر نتایج حاصل از آنالیزها، نمونه‌ها با علامت اختصاری به شرح زیر نام‌گذاری شدند: گروه ۱۰ (AP) 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)؛ (۱۱ نمونه از دورگ‌های هلو×بادام)؛ APAP (دو نمونه از دورگ-های زردآلو×زردآلو)؛ UN (دو ژنوتیپ ناشناخته)؛ (یک دورگ ۲۳ ژنوتیپ بادام)؛ PH (۱۰ ژنوتیپ بادام)؛ A (۱۰ ژنوتیپ GF677 بادام)؛ SC (۱۰ ژنوتیپ آلو و گوجه)؛ PU (یک ژنوتیپ گوجه) و PLW (یک دورگ طبیعی) (جدول ۱). به منظور استخراج CoreBio DNA 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 *Mse*I مورد استفاده قرار گرفتند و آغازگرهای EcoRI با IRDye700 و IRDye800 با EcoRI نشاندار شدند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترمال‌سایکر Applied Biosystem انجام شد و محصولات حاصل از PCR در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶/۵ درصد و با کمک دستگاه Licor DNA Analyser 4300 (Licor) تکنیک 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 $PIC = \sum_i P_i^2$ و $MI = PIC / (PIC + P_i)$ و تعداد کل نوارها محاسبه شدند. در نهایت به منظور بررسی تنوع

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' 3'-TACTCAGGACTCAT-5' | |
| <i>EcoR I</i> | 5'-GACTGCGTACCAATT-TG-3' 5'-GACTGCGTACCAATT-TC-3' 5'-GACTGCGTACCAATT-TA-3' 5'-GACTGCGTACCAATT-GA-3' 5'-GACTGCGTACCAATT-GT-3' | 5'-GACTGCGTACCAATT-3' | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' |

جدول ۳- روش‌ها، نرم‌افزارها و مؤلفه‌های استفاده شده برای تجزیه کلاستر

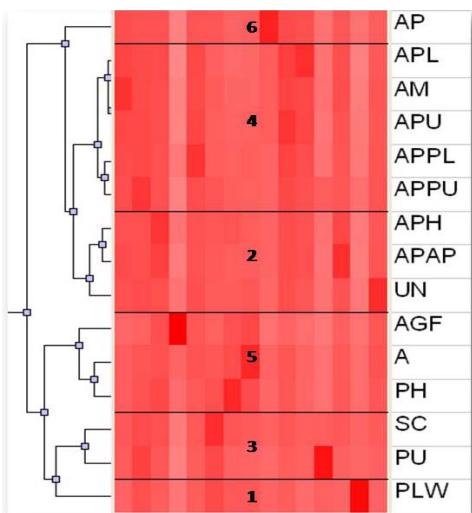
| منبع | مؤلفه‌ها | نرم‌افزار | روش |
|---|---|---------------|----------|
| Rasmussen and Karypis (2004) | Simfun = cosine; CRfun = UPGMA; of bootstrap replications = 1,000 | GCluto v. 1.0 | UPGMA |
| Rasmussen and Karypis (2004) | Simfun = cosine; Cstype = large; CRfun = H2; Number of trials = 1,000; 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 I_2/E_1 , where I_2 is the cosine similarity between each object and its own cluster centroid, and E_1 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 نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی، شاخص‌های PIC، MI

| ترکیب آغازگر | تعداد کل نوارها | تعداد کل نوارهای چند شکل | درصد چند شکلی(%) | PIC* | MI** | I*** |
|--------------|-----------------|--------------------------|------------------|---------|---------|--------|
| M-GAG/E-TG | ۱۵۹ | ۱۵۸ | ۹۹/۳ | ۰/۴۰۱۸ | ۶۳/۸۸۶۲ | ۰/۵۸۴۸ |
| M-GAG/E-TC | ۱۵۸ | ۱۳۸ | ۸۷/۳ | ۰/۳۱۵۹ | ۴۹/۹۱۲۲ | ۰/۴۷۷۶ |
| M-CCC/E-TA | ۱۰۴ | ۹۱ | ۸۷/۵ | ۰/۳۵۸۷ | ۳۷/۳۰۴۸ | ۰/۵۲۹۹ |
| M-GC/E-GA | ۱۶۱ | ۱۳۳ | ۸۲/۶ | ۰/۳۲۷۵ | ۵۲/۷۷۷۵ | ۰/۴۹۰۴ |
| M-GAG/E-GT | ۴۱ | ۳۳ | ۸۰/۵ | ۰/۲۳۷۶ | ۱۲/۸۴۱۶ | ۰/۵۰۰۳ |
| M-GT/E-TC | ۹۲ | ۵۰ | ۵۴/۳ | ۰/۳۵۴ | ۱۹/۲۳۹ | ۰/۱۷۲ |
| M-TT/E-TG | ۶۲ | ۴۷ | ۷۵/۸ | ۰/۳۸۹ | ۲۹/۴۸۹ | ۰/۳۰۷ |
| M-CAG/E-GT | ۹۸ | ۷۸ | ۷۹/۶ | ۰/۳۲۷ | ۲۶/۰۲۶ | ۰/۲۷۶ |
| میانگین | ۱۰۹/۳۷۵ | ۹۱ | ۸۰/۸۷ | ۰/۳۵۱۴۳ | ۳۶/۵۵۳ | ۰/۴۱۷۲ |

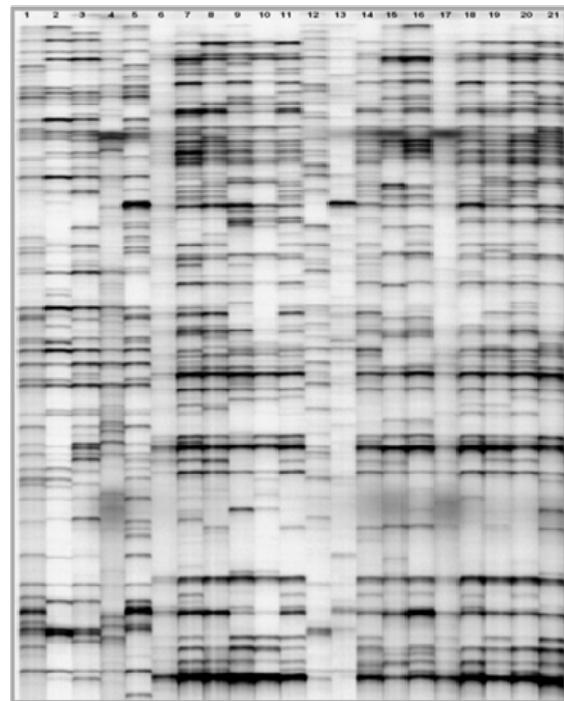
* (PIC) محتوای اطلاعات چند شکلی؛ ** (MI) شاخص نشانگر؛ * (PIC) درصد پلی مورفیسم؛ *** (I) شاخص اطلاعات شانون



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

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 دنдрوگرام 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 و 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 خوش‌ای با کمک نرم افزار 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*

| تعداد خوشه‌ها | تعداد اعضای هر خوشه | ISim* | ISdev*** | ESim** | Stability |
|---------------|---------------------|-------|----------|--------|-----------|
| ۱ | ۱ | ۱ | ۰/۹۷۹ | ۰ | ۰/۸۳ |
| ۲ | ۱۵ | ۰/۹۹۸ | ۰/۰۰۱ | ۰/۹۹۱ | ۰/۴۶ |
| ۳ | ۱۱ | ۰/۹۹۶ | ۰/۰۰۷ | ۰/۹۸۷ | ۰/۶۸۵ |
| ۴ | ۱۸ | ۰/۹۹۸ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۸۹ | ۰/۸۹۶ |
| ۵ | ۳۴ | ۰/۹۹۲ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۸۴ | ۰/۷۷۷ |
| ۶ | ۱۰ | ۰/۹۸۸ | ۰ | ۰ | ۰/۶۵ |

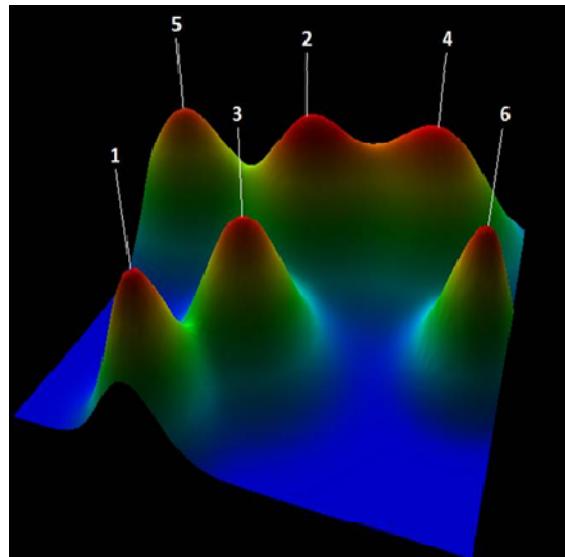
* ISim متوسط شباهت‌ها داخلی؛ ** ESim؛ *** ISdev ESdev متوسط انحراف استاندارد داخلی و خارجی از این شباهت‌ها.

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

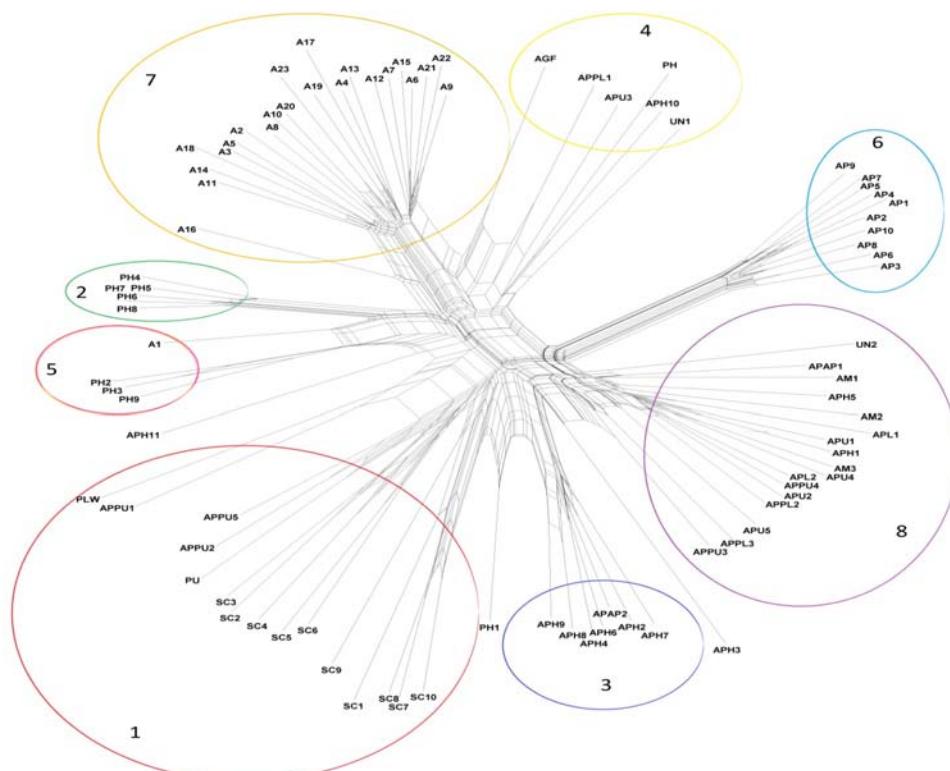
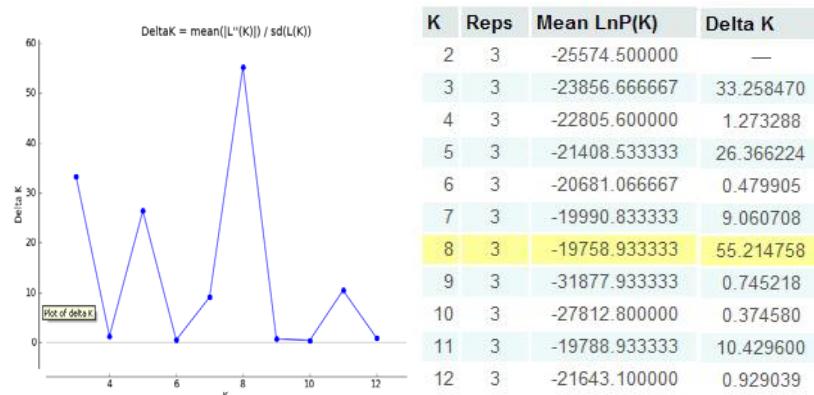
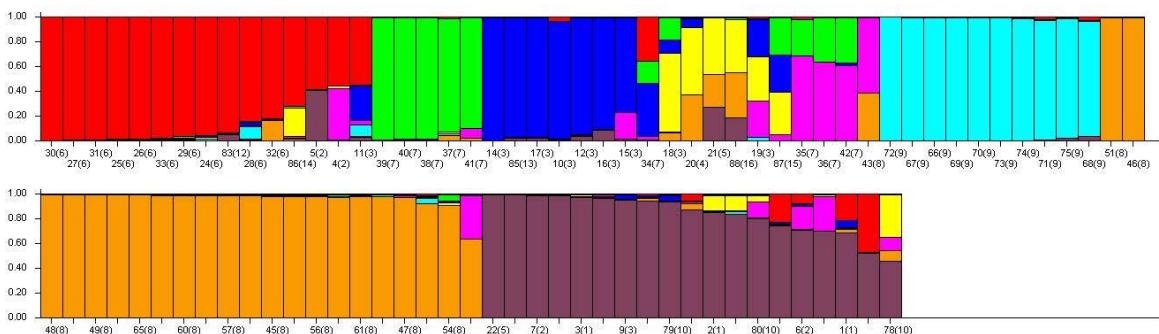
| منبع تنوع | مجموع مربعات | اجزای واریانس | درصد تنوع |
|------------|--------------|---------------|-----------|
| بین جمعیت | ۳۳۲۷/۹۵۳ | ۳۲/۱۰۵۹۷ | ۳۳/۷۸۷۱۹ |
| درون جمعیت | ۴۵۵۷/۲۱۷ | ۶۲/۹۱۸۱۴ | ۶۶/۲۱۲۸۱ |
| کل | ۷۸۸۵/۱۷۰ | ۹۵/۰۲۴۱۱ | --- |

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 K صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد (شکل ۵). بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی $\ln P(D)$ و بیشترین مقدار عددی K نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته بندی جمعیت‌های مورد مطالعه بشمار می‌رودند. 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 کلد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضریب 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 پهنه‌ای رنگی آن کلاستر را دارا باشد (شکل ۶).

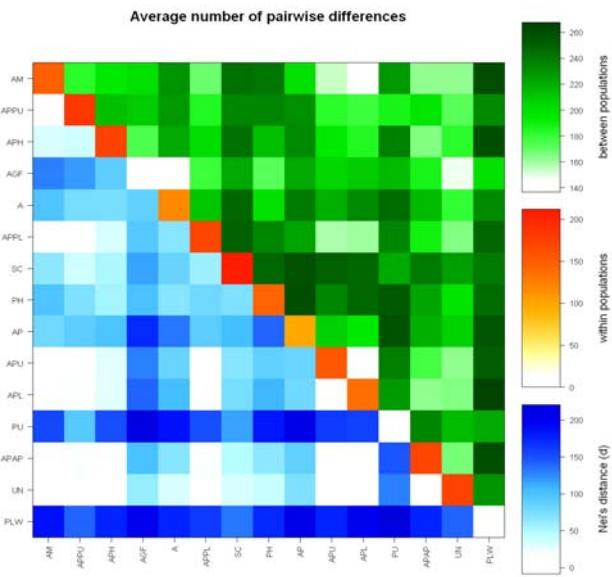
رنگ‌های قرمز، سبز، آبی، زرد، صورتی، فیروزه‌ای، نارنجی و بنفش به ترتیب برای گروه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و مشابه گروه‌های دسته بندی شده با نرم‌افزار SplitsTree 4 در نظر گرفته شد (شکل ۴). وجود چند رنگ در ستون مربوط به یک فرد،



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 = نشان‌هnde 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 گروه‌های است.

شکل ۴- گروه‌بندی اعمال شده برای ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار SplitsTree4شکل ۵- تعیین بهترین تعداد کلاستر (K): مقادیر عددی ΔK و $\text{Ln}P(D)$ سمت راست و نمودار ΔK سمت چپ.شکل ۶- گروه‌بندی 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 (Aradhya 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. علاوه این امر می‌تواند تنوع الی مورد نیاز برای برنامه‌های اصلاحی آینده را تضمین کند. در تحقیقی مشابه، با بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوزنوتیکی *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 ووضوح بالای آن‌ها، نسبت به روش قدیمی AFLP کارایی بیشتری دارد.

نشان دهنده 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 ارت 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 مشابه 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 دورگه GF677 × بادام) می‌باشد. بر اساس شاخص Nei محاسبه شده، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های (زردآلو - هلو) و (زردآلو - بادام) می‌باشد و کمترین فاصله بین جمعیتی به جمعیت‌های (گوجه × بادام - آلو × بادام)، (آلو × بادام - گوجه × بادام) تعلق داشت (شکل ۷). با مشاهده دنдрوگرام حاصل از این نرمافزارها، ژنوتیپ‌های والدینی و دورگ‌های بین گونه‌ای 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 تاکسونومیکی ارائه شده برای جنس Prunus مطابقت داشت (Hummer and Janick 2009). علاوه اغلب دورگ‌های (هلو × بادام) از دورگ‌های شامل یک والد آلو یا گوجه متمایز شدند. همچنین در مقایسه‌های بین گروهی، 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: Folta 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, Dejmpour 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, Torchí 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.