

انگشت نگاری DNA ارقام گیلاس با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

فرشته مشیری^۱، فرهاد شکوهی فر^{۲*}، و عبدالرضا باقری^۱

۱- دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول، آدرس الکترونیکی: Shokouhifar@um.ac.ir

چکیده

تشخیص دقیق و مطمئن ژنوتیپ های گیاهی بخصوص درختان میوه در اجرای برنامه های اصلاحی و حفظ ذخائر ژنتیک اهمیت بالایی دارد. نشانگرهای RAPD از جمله روش های مولکولی مبتنی بر DNA است که بطور گسترده ای در انگشت نگاری ذخائر ژنتیک و مطالعه تنوع ژنتیک جوامع زیستی مختلف مورد استفاده قرار می گیرند. در این مطالعه با هدف تمایز ارقام مختلف گیلاس و ارائه نشانگرهای مولکولی مناسب، تنوع موجود در سطح DNA ۱۰ رقم ایرانی و دو رقم خارجی گیلاس با استفاده از ۲۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آغازگرها توانستند مناطقی از ژنوم ارقام مورد مطالعه را تکثیر نمایند، که در این بین، ۱۴ آغازگر توانستند ۵۰ باند چند شکل را تکثیر نمایند. بالاترین چندشکلی توسط آغازگر UBC138 شناسایی شد در حالیکه بیشترین شاخص تنوع ژنتیک توسط آغازگر (UBC7) ۰/۸۲ تعیین شد. فاصله ژنتیک ارقام بر اساس شاخص فاصله ی بین ۰/۳۲ تا ۰/۸۸ محاسبه شد. تجزیه کلاستر با استفاده از روش UPGMA نشان داد که کمترین فاصله ژنتیکی بین ارقام شماره ۴ و ۱۰ و بیشترین فاصله بین ارقام ۱ و ۶ وجود دارد. کلیه ارقام بوسیله ۱۲ نشانگر انتخاب شده کاملاً از یکدیگر متمایز شدند. در این بین برای پنج رقم (شامل ارقام شماره ۱، ۲، ۳، ۵ و ۶) نشانگرهای اختصاصی بدست آمد که هر یک بوسیله یک نشانگر اختصاصی قابل تشخیص بودند. تمایز هفت رقم دیگر نیز با استفاده از ترکیبی از نشانگر های معرفی شده امکان پذیر شد.

واژه های کلیدی

·RAPD

انگشت نگاری DNA

گیلاس،

UPGMA

مقدمه

گیلاس (*Prunus avium*. L) از خانواده Rosacea و با سطح پلویدی $2n=16$ در مناطق معتدل جهان کشت می شود. به نظر می رسد منشاء اصلی گیلاس، مناطق حاشیه دریای خزر و دریای سیاه باشد (۴) و واریته های زراعی گیلاس در جریان اهلی شدن گونه های بومی در سرتاسر اروپا و

آسیای غربی پراکنده شده‌اند. کشت زراعی گیلاس در اواخر قرن گذشته آغاز شده است، لذا گونه‌های زراعی طی دوره زمانی نسبتاً کوتاهی انتخاب شده‌اند و انتظار می‌رود از تنوع ژنتیک کمتری نسبت به سایر گیاهان برخوردار باشند (۵).

بررسی تنوع و شناسایی ژنوتیپ‌های گیاهی بخصوص در درختان میوه که بطور غیر جنسی تکثیر می‌شوند، حائز اهمیت بالایی است. در این گیاهان با تعیین ریخته ژنتیک یک گیاه می‌توان آن را با حفظ ژنوتیپ به تعداد زیادی تکثیر نمود و از آن به عنوان پایه در ایجاد باغ‌های میوه استفاده کرد (۶). علاوه بر این در درختان میوه به دلیل عواملی مانند دوره رشدی طولانی، جثه بزرگ، فضای زیاد مورد نیاز و بلوغ دیررس، انجام برنامه‌های اصلاحی بسیار پر هزینه و زمان‌بر است (۷). وجود این عوامل، شناسایی ژنوتیپ ارقام مختلف و فراهم کردن ابزار تشخیص مجدد آن‌ها را در جهت بالا بردن راندمان برنامه‌های اصلاحی ضروری می‌سازد. با فراهم شدن امکان تشخیص صحیح هر ژنوتیپ، برنامه‌های حفظ ذخائر ژنتیک با دقت بیشتری انجام خواهد شد و از دوباره‌کاری در حفظ یک ژنوتیپ خاص و یا حذف یک ژنوتیپ نادر به دلیل شباهت‌های ظاهری جلوگیری می‌شود (۶). لذا جهت حفظ ژنوتیپ‌های مورد نظر تکنیک‌های دقیقی مورد نیاز است.

روش‌های مختلفی برای تمایز تنوع ژنتیک گونه‌های باغی مورد استفاده قرار گرفته است. بطور معمول گروه بندی ارقام گیلاس بر اساس صفاتی مانند زمان رسیدن، طول دم میوه، اندازه و رنگ میوه صورت می‌گیرد (۸). این صفات به شدت تحت تاثیر محیط بوده و در مراحل اولیه رشد تظاهر نمی‌یابند (۹). لذا شناسایی یک رقم بر اساس این صفات تنها در مراحل رشدی خاص امکان‌پذیر خواهد بود. به عنوان مثال در هنگام تهیه و کاشت نهال جهت احداث باغ امکان شناسایی دقیق ارقام وجود نخواهد داشت و به نشانگرهای دقیق دیگری نیاز خواهد بود. به منظور شناسایی تنوع و تمایز ارقام گیلاس از نشانگرهای بیوشیمیایی از جمله ایزوزایم‌ها (۱۰)، محتوی فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی نیز استفاده شده است (۸) ولی تعداد محدود این نشانگرها، دشواری امتیاز بندی و نیاز به زمان و شرایط خاص برای بروز برخی از آنها، توجه محققان را به روش‌های نوینی معطوف داشته است که قابلیت بالایی در شناسایی گونه‌های گیاهی در سطح مولکولی دارند. طی دو دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی DNA چشم انداز نوینی

را جهت ارزیابی تنوع زیستی فراهم آورده‌اند و از انگشت نگاری DNA به عنوان یک راهبرد سودمند و مطمئن در تشخیص ژنوتیپ‌ها و تهیه شناسنامه نمونه‌های نگهداری شده در مخازن ژرم پلاسما استفاده می‌شود (۱۱). از آنجا که روش‌های مولکولی بطور مستقیم تنوع موجود در سطح DNA را شناسایی می‌کنند، تنوع ناشی از عوامل غیر ژنتیک تظاهر یافته در گیاه، نمی‌تواند در تشخیص یک نمونه مشکلی ایجاد نماید.

روش RAPD یکی از روش‌های مولکولی است که به دلیل مزایایی چون عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، تعداد باند نامحدود، مراحل کاری کوتاه، نیاز به DNA ژنومی کم، عدم نیاز به وجود اطلاعاتی در مورد توالی ژنومی نمونه‌ها و هزینه پایین در مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین تنوع بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). این روش در مطالعه روابط ژنتیک درختان میوه از جمله سیب (۱۳، ۱۴)، گلابی (۱۵)، هلو (۱۶)، لیمو (۱۷)، انگور (۱۸) و آلو (۱۹) با موفقیت بکار گرفته شده است. بعنوان مثال در گلابی ویژگی‌های مولکولی و شباهت‌های میان ۱۲ رقم با استفاده از RAPD مورد بررسی قرار گرفته است و برای ۱۰ رقم باندهای اختصاصی ارائه شده است (۶). این روش در گیلاس نیز با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. یانگ و اسمیت (۱۹۹۴) از این روش جهت شناسایی جهش‌های ایجاد شده در جوانه‌های جانبی گیلاس در اثر تیمار با اشعه ایکس استفاده نمودند و با استفاده از آغازگر OPJ05 توانستند واریته ۲۰۹/۱ و نمونه جهش یافته آن را از یکدیگر متمایز نمایند (۲۰). استوکینگر در سال ۱۹۹۶ توانست با استفاده از روش RAPD منطقه اختصاصی را جهت تمایز و تشخیص واریته ایمپروور فرانسیز (Emperor Francis) معرفی نماید (۲۱). در مطالعه دیگری به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مناسب جهت تمایز ارقام گیلاس از ۲۰۰ آغازگر تصادفی استفاده شد و در نهایت ۲۳ آغازگر جهت شناسایی تنوع موجود در سطح DNA ارقام معرفی شدند (۸). در این مطالعه برای ۱۴ واریته از میان ۱۸ واریته مورد مطالعه باندهای اختصاصی ارائه شد. در سال ۲۰۰۷ کای و همکاران تنوع ژنتیکی نمونه‌هایی از هشت گونه مختلف گیلاس را با استفاده از ۴۸ آغازگر در تکنیک RAPD مورد تجزیه قرار دادند و چند نشانگر اختصاصی برای تمایز گونه‌های مختلف ارائه نمودند. آنها استفاده از این نشانگرها را جهت تمایز نتاج حاصل از تلاقی این

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

۱۲ رقم گیلاس (جدول ۱) از نهالستان شرکت طوس خاوران، مشهد تهیه شد و سه نهال از هر رقم کدگذاری و جهت استخراج DNA از برگ آنها نمونه گیری شد. مطالعات اولیه نشان داد که کیفیت DNA استخراج شده از گیلاس در روش‌های مختلف متفاوت است (۲). بر این اساس روش CTAB تغییر یافته در حجم بالا جهت استخراج DNA ارقام گیلاس مورد استفاده قرار گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (ساخت شرکت Biometra) تعیین شد.

تجزیه RAPD

برای این مطالعه ۲۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی بر اساس گزارش‌های موجود (۷، ۸) انتخاب شد (جدول ۲). واکنش PCR بر اساس مطالعه اولیه در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (سینا ژن) و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl با

ارقام در مراحل اولیه رشد در پیش برد برنامه های اصلاحی بسیار مفید دانستند (۲۲). در مطالعه دیگری با ادغام دو روش کشت این ویترو و نشانگرهای مولکولی RAPD شرایطی جهت گزینش نمونه های گیلاس در مراحل اولیه رشدی فراهم شده است (۷).

در ایران مطالعات محدودی در خصوص ارزیابی تنوع ارقام باغی و نمونه‌های وحشی گیلاس با استفاده از صفات ظاهری (۳) و با ایزوایم‌ها (۱) صورت گرفته است و همچنین مطالعه مقدماتی بمنظور مقایسه روش های استخراج DNA از ارقام گیلاس (۲) انجام شده است. با توجه به وجود ارقام بومی و همچنین سطح زیر کشت بالای این گیاه در مناطق مختلف کشور بخصوص استان خراسان که یکی از مراکز عمده تولید این محصول در کشور بشمار می رود، شناسایی و تمایز ارقام موجود و معرفی شده در جهت حفظ و طراحی برنامه‌های اصلاحی ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر تنوع ژنتیک و میزان قرابت تعدادی از نمونه‌های گیلاس ایرانی و دو رقم معرفی شده خارجی با استفاده از روش مولکولی RAPD مورد مطالعه قرار گرفت تا نشانگرهای مولکولی مناسبی جهت تمایز این ارقام شناسائی گردد.

جدول ۱- مشخصات ارقام گیلاس مورد مطالعه

شماره	کد رقم	نام رقم	اندازه میوه (میلی متر)	طول دم میوه (سانتی متر)	حفره دم	رنگ پوست میوه	رنگ گوشت میوه	رنگ هسته
۱	۳-۲۶	محلّی	۱۲	۵/۳	تنگ	قرمز تیره	قرمز تیره	سفید
۲	۲/۳-۳۰	فرنگی	۳۰	۳	تنگ و عمیق	سیاه	براق جگری	زرد
۳	۵/۳-۱۲	-	۲۰	۵	متوسط	صورتی	سفید	زرد
۴	۵/۳-۳۰	فرنگی	۳۰	۵/۳	تنگ و عمیق	سیاه	براق جگری	-
۵	۴-۵/۳-۲۴	فرنگی	۲۴	۵/۴	متوسط	سیاه	جگری	کدر
۶	۴-۲۸	فرنگی	۳۰	۶	متوسط	قرمز براق	قرمز براق	-
۷	۵/۴-۲۴	چینی	۲۶	۳	عمیق	قرمز	سفید	کدر
۸	۵-۲۰	فرنگی	۲۸	۶	-	-	قرمز	زرد
۹	۶-۲۸	فرنگی	۲۸	۴	پهن	قرمز براق	قرمز براق	سفید
۱۰	۶-۳۰	قطره طلا	۲۴	۵/۳	متوسط	زرد - صورتی	زرد - صورتی	سفید
۱۱	Bing	بینگ	۲۸	۵	-	قرمز - سیاه	-	سفید
۱۲	HF	فینگر	۳۰	۳	-	متماثل به سیاه	قرمز	سفید

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش RAPD

ردیف	نام	توالی	ردیف	نام	توالی
۱	UBC-1	5'-CCT GGG CTT C-3'	۱۴	UBC-135	5'-AAG CTG CGA G-3'
۲	UBC-7	5'-CCT GGG GGT T-3'	۱۵	UBC-138	5'-GCT TCC CCT T-3'
۳	UBC-9	5'-CCT GCG CTT A-3'	۱۶	UBC-152	5'-CGC ACC GCA C-3'
۴	UBC-29	5'-CCG GCC TTA C-3'	۱۷	UBC-153	5'-GAG TCA CGA G-3'
۵	UBC-42	5'-TTA ACC CGG C-3'	۱۸	UBC-159	5'-GAG CCC GTA G-3'
۶	UBC-43	5'-AAA ACC GGG C-3'	۱۹	UBC-168	5'-CTA GAT GTG C-3'
۷	UBC-46	5'-TTA AGG GGG C-3'	۲۰	UBC-170	5'-ATC TCT CCT G-3'
۸	UBC-90	5'-GGG GGT TAG G-3'	۲۱	UBC-183	5'-CGT GAT TGC T-3'
۹	UBC-111	5'-AGT AGA CGG G-3'	۲۲	UBC-191	5'-CGA TGG CTT T-3'
۱۰	UBC-114	5'-TGA CCG AGA C-3'	۲۳	UBC-200	5'-TCG GGA TAT G-3'
۱۱	UBC-115	5'-TTC CGC GGG C-3'	۲۴	OPN-06	5'-GAG ACG CAC A-3'
۱۲	UBC-128	5'-GCA TAT TCC G-3'	۲۵	OPG-05	5'-CTG AGA CGG A-3'
۱۳	UBC-134	5'-AAC ACA CGA G-3'			

فاصله ژنتیکی (Genetic distance matrix) با استفاده از برنامه NTSYSpc Version 2.02e بر اساس فرمول اصلاح شده نی (۲۳) محاسبه شد. تجزیه کلاستر از طریق منوی SAHN در برنامه NT-SYS به روش UPGMA (میانگین حسابی غیر وزنی) انجام شد. دندروگرام نشان دهنده روابط خویشاوندی نمونه ها با استفاده از زیرمنوی Tree-plot رسم شد. شاخص تنوع ژنتیک (genetic diversity index) قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای RAPD با استفاده از معادله نی (۲۴) با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد.

$$H = [n/(n-1)] [1 - \sum X_i^2]$$

H شاخص تنوع ژنتیک، n تعداد افراد مورد مطالعه و X_i فراوانی نسبی هر آلل می باشد.

نتایج و بحث

تمامی ۲۵ آغازگر بکاربرده شده توانستند مناطقی از ژنوم ارقام گیلاس مورد مطالعه را تکثیر نمایند اما فقط ۱۴ آغازگر، الگوی چند شکلی مناسب را میان ارقام ظاهر ساختند. بوسیله آنها در مجموع ۱۱۲ باند تکثیر شد که در بین آنها ۵۰ باند (حدود ۴۵/۵ درصد از باندهای تکثیر شده) چند شکل بودند (جدول ۳). آغازگر UBC138 با تکثیر ۱۲ باند، که در این بین ۱۰ باند چند

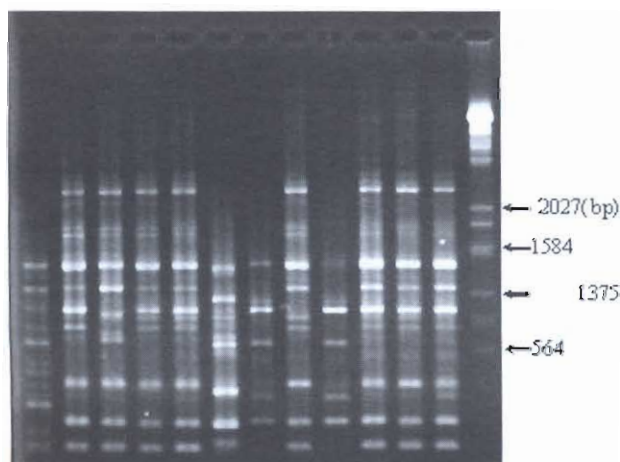
۰/۰۰۱، pH=۸، ۵۰ میلی مولار KCl)، ۲۰ میکرومول آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی، یک واحد آنزیم تک پلیمرز (سینا ژن) و ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی تهیه شد و با برنامه حرارتی ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد و ۴۰ چرخه با یک دقیقه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۳۶ درجه سانتیگراد (متناسب با آغازگر متفاوت بود)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه ترمو سائیکلر (ساخت شرکت WMG آلمان) انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱٪ و بافر TAE (۸۹ میلی مولار Tris-HCl با pH=۸، ۸۹ میلی مولار اسید استیک، ۲ میلی مولار EDTA) به مدت سه ساعت با ولتاژ ثابت ۷۵ میلی ولت الکتروفورز شد و سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه GelDoc از آن عکس تهیه شد.

تجزیه داده ها

تصاویر بدست آمده با استفاده از نرم افزار UVITEC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تنها باندهای قوی انتخاب و بر اساس حضور یا عدم حضور، به کدهای صفر- یک تبدیل و پس از انتقال داده‌ها به برنامه Excel، تنها مکان هایی که چندشکلی نشان داده بودند برای انجام محاسبات بعدی انتخاب شدند. داده ها جهت محاسبه فاصله ژنتیک به فایل NTSYS تبدیل شد. ماتریس

جدول ۳- نتایج تجزیه ژنوم ۱۲ رقم گیلاس با استفاده از ۱۴ آغازگر تصادفی در روش RAPD.

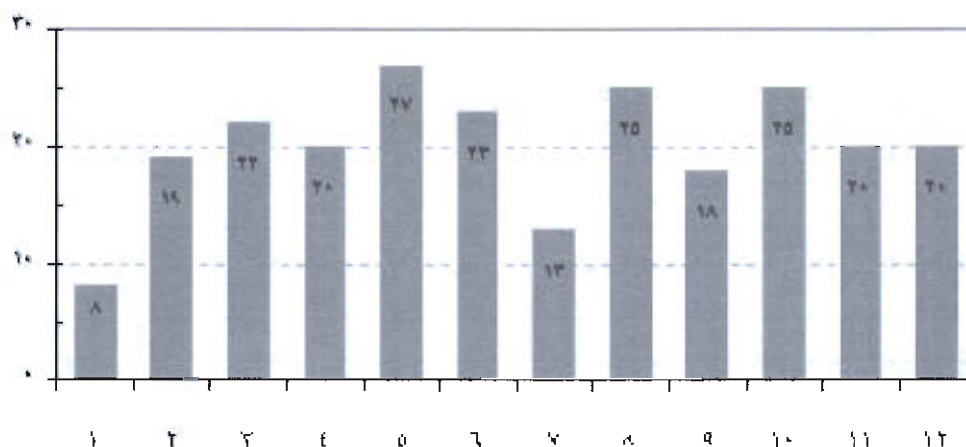
ردیف	نام آغازگر	مکان تکثیر شده	باند چند شکل	نسبت چند شکلی	تعداد ژنوتیپ	شاخص تنوع ژنتیک
۱	OPG05	۴	۱	۰/۲۵	۲	۰/۱۸
۲	UBC115	۱۰	۳	۰/۳۰	۶	۰/۸۰
۳	UBC134	۱۲	۳	۰/۲۵	۴	۰/۷۸
۴	UBC135	۵	۳	۰/۴۰	۳	۰/۵۹
۵	UBC138	۱۲	۱۰	۰/۸۳	۶	۰/۷۶
۶	UBC152	۶	۲	۰/۳۳	۴	۰/۷۲
۷	UBC153	۹	۵	۰/۵۶	۳	۰/۵۱
۸	UBC159	۸	۶	۰/۷۵	۵	۰/۵۸
۹	UBC200	۹	۳	۰/۳۳	۴	۰/۷۸
۱۰	UBC29	۶	۲	۰/۳۳	۳	۰/۷۱
۱۱	UBC43	۸	۳	۰/۲۹	۳	۰/۷۶
۱۲	UBC7	۶	۴	۰/۶۷	۵	۰/۸۲
۱۳	UBC9	۵	۴	۰/۸۰	۷	۰/۶۶
۱۴	UBC90	۱۲	۲	۰/۱۷	۴	۰/۷۱



شکلی ۱- الگوی بانندی ارقام گیلاس با بکارگیری آغازگر UBC138 در تکنیک RAPD. چاهک های ۱ تا ۱۴ شماره ارقام مطابق با جدول ۱ و M مارکر وزنی (Fermentas, #SM0192)

شکل بودند بالاترین تعداد باند چند شکل را بخود اختصاص داد (شکل ۱) در حالی که آغازگر OPG5 تنها با تکثیر سه باند تنها یک منطقه چند شکلی را شناسایی کرد و پائین ترین تعداد باند چند شکل را داشت. حدود ۸ باند توسط هر آغازگر تکثیر شد که به طور متوسط ۳/۶ از آنها چند شکل بودند.

نسبت تعداد باندهای چندشکل به تعداد باندهای تکثیر شده توسط هر آغازگر به عنوان شاخصی جهت تعیین کارایی هر آغازگر مورد توجه قرار گرفت. براین اساس آغازگر UBC90 با ۰/۱۷ پایین ترین و آغازگر UBC138 با ۰/۸۳ بالاترین نسبت را دارا بودند. در میان ۱۴ آغازگر انتخاب شده سه آغازگر UBC9، UBC138 و UBC115 به ترتیب با ۶، ۷ و ۶ ژنوتیپ، توانستند بالاترین تعداد گروه ژنوتیپی را در ارقام مورد مطالعه شناسایی نمایند. در حالیکه آغازگر OPG05 با شناسایی یک باند چند شکل تنها ۲ ژنوتیپ را متمایز نمود. میانگین تعداد ژنوتیپ تعریف شده توسط هر آغازگر حدود ۴/۴ بود.



شکل ۲- تعداد باندهای چند شکل شناسایی شده در ارقام گیلاس مورد مطالعه

تنوع ژنتیکی

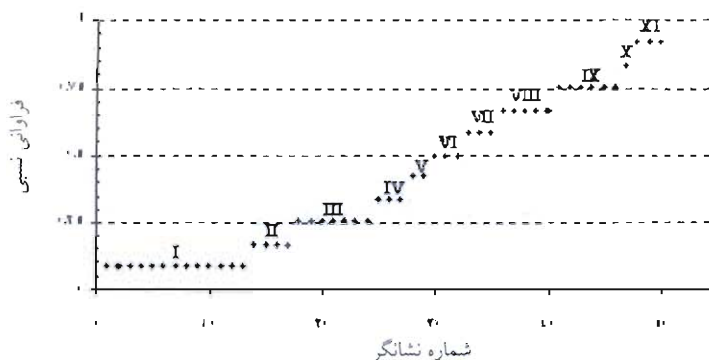
شاخص تنوع ژنتیک محاسبه شده توسط هر آغازگر بین ۰/۱۸ تا ۰/۸۲ متغیر بود که به ترتیب به آغازگرهای OPG05 و UBC7 مربوط بود (جدول ۳). شاخص تنوع ژنتیک کل بر اساس تمامی نشانگرهای حاصل از RAPD برابر یک بود. در واقع با استفاده از نشانگرهای حاصل، الگوی بانندی کاملاً متمایزی برای هر یک از ۱۲ ژنوتیپ مورد مطالعه، بدست آمد. بالا بودن شاخص تنوع ژنتیک، حاکی از تفاوت‌های ژنتیکی ارقام گیلاس مورد مطالعه است.

انگشت نگاری ارقام

در این مطالعه برای ۵ رقم از ۱۲ رقم مورد مطالعه، سیزده تک باند اختصاصی بدست آمد. شناسایی تک باندهای اختصاصی در تمایز ارقام ارزش بسیار بالایی دارد. از این میان ۵ تک باند به رقم ۱ و ۵ تک باند دیگر به رقم ۶ اختصاص داشت. از ۵۰ باند چند شکل شناسایی شده، تنها ۸ باند در رقم ۱ تکثیر شده بود که در این بین ۵ باند اختصاصی این رقم بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل (۲۷ باند) در رقم شماره ۵ مشاهده شد که در بین آنها تنها یک باند اختصاصی برای این رقم شناسایی شد (شکل ۳). بطور متوسط ۲۰ باند چند شکل در هر رقم مشاهده شد. در مطالعه مشابهی در گیلاس تعداد نشانگرهای شناسایی شده در یک رقم بین ۲۳ تا ۳۹ باند گزارش شده است (۵) که در مقایسه با مطالعه حاضر این تعداد بین ۸ تا ۲۷ باند متغیر است.

بمنظور انتخاب نشانگرهای مناسب جهت تمایز ارقام مورد مطالعه روش خاصی در نظر گرفته شد و از فراوانی باندهای چند شکل به عنوان شاخصی در انتخاب این نشانگرها استفاده شد. با توجه به این نکته که فراوانی نسبی هر باند معادل تعداد مشاهده آن در کل افراد است لذا در صورتی که فراوانی نسبی یک باند معادل با یک باشد نشان می‌دهد که این باند در تمامی ارقام ظاهر شده است و فراوانی نسبی صفر نیز به معنی عدم مشاهده یک باند می باشد. بنابراین فراوانی یک باند چند شکل باید بین صفر و یک باشد. از سوی دیگر هرچه فراوانی نسبی یک باند کوچکتر باشد نشان می‌دهد که در افراد کمتری مشاهده شده است، لذا از آن میتوان بعنوان یک باند اختصاصی برای نمونه‌ها استفاده نمود. در مقابل هرچه فراوانی نسبی یک باند به یک نزدیکتر باشد نشان می‌دهد که در افراد بیشتری مشاهده شده است و از نظر گرینشی ارزشی زیادی نخواهد داشت.

در این مطالعه فراوانی نسبی باندهای چند شکل بین ۰/۰۸۳ تا ۰/۹۱۶ متغیر بود (شکل ۴). فراوانی ۰/۰۸ نشان دهنده تک باندهای اختصاصی بود و فراوانی ۰/۹۶ به باندهایی مربوط بود که تنها در یکی از ارقام مشاهده نشده‌اند. بیشترین تعداد باند (۱۳ باند) در فراوانی ۰/۰۸۳ مشاهده شد در حالیکه کمترین تعداد (یک باند) در فراوانی نسبی ۰/۸۳ دیده شد. بدیهی است باندهایی که فراوانی کمتری دارند در تمایز ارقام بیشتر مورد توجه می باشند و ارزش تمایز دهی آنها بیشتر است. هرچند باندهائی که در تمام نمونه‌ها مشاهده شده‌اند ولی در یک نمونه خاص وجود ندارند



شکل ۳- فراوانی نسبی نشانگرهای چندشکل در میان ارقام گیلاس مورد مطالعه

باند‌هایی بعنوان نشانگر اختصاصی برای ارقام ۱، ۲، ۳، ۵ و ۶ ارائه شده است. بعنوان مثال حضور نشانگر شماره ۱ می تواند برای تمایز رقم شماره ۱ از یازده رقم دیگر مورد مطالعه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مشاهده باند شماره ۵ بعنوان نشانگر رقم شماره ۵ بشمار می رود. توجه به این نکته ضروری است که تک باندهای اختصاصی شناسایی شده تنها برای تمایز ارقام مورد مطالعه کاربرد دارند و در خصوص دیگر ارقام باید مجدد کنترل شوند تا اختصاصی بودن آنها تعیین گردد.

را نیز می توان به عنوان شاخصی جهت تمایز آن نمونه استفاده کرد. با این حال در این مطالعه باندهایی که فراوانی نسبی کمتری داشتند در انتخاب نهایی بعنوان نشانگر در اولویت قرار گرفتند. از میان ۵۰ باند چند شکل، ۱۲ باند بعنوان نشانگر از بین باندهای مشاهده شده در سطوح فراوانی I، II و III و IV انتخاب شدند که به ترتیب ۵، ۳، ۲ و ۲ نشانگر از میان سطوح I تا IV را شامل می شدند. انگشت نگاری ۱۲ رقم مورد مطالعه براساس این ۱۲ نشانگر در جدول ۵ ارائه شده است. در این جدول تک

جدول ۵- انگشت نگاری ارقام گیلاس با استفاده از ۱۲ نشانگر مولکولی RAPD.

ارقام												نشانگر*	ردیف	
۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲			
X													0.73-UBC159	۱
	X												0.813-UBC43	۲
		X											1.279-UBC159	۳
		X	X						X				0.62-UBC134	۴
				X									1.728-UBC200	۵
					X								0.921-ubc138	۶
		X				X							0.77-UBC159	۷
					X		X						0.82-ubc138	۸
						X		X					0.285-ubc138	۹
			X	X	X					X			0.734-UBC200	۱۰
X		X		X							X		1.321-UBC9	۱۱
		X					X					X	0.898-UBC7	۱۲

* مشخصات هر نشانگر از چپ به راست شامل نام آغازگر و وزن مولکولی نشانگر را در بر می گیرد.
 † باند های اختصاصی هر رقم با زمینه خاکستری از دیگر نشانگرها متمایز شده است.

فاصله ژنتیکی

ماتریس فاصله ژنتیکی ارقام بر اساس داده های حاصل از تجزیه RAPD نشان داد که فاصله ژنتیکی میان ارقام در محدوده ۰/۳۲ تا ۰/۸۸ متغیر بود (جدول ۳).

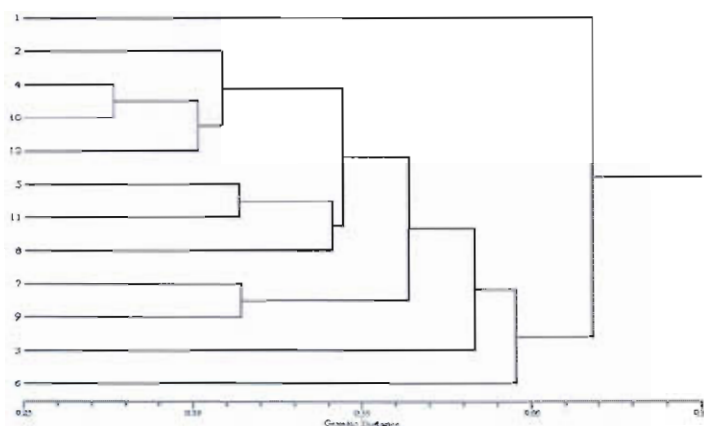
در مطالعه مشابهی تفاوت ۱۸ رقم گیللاس با استفاده از تجزیه RAPD و محاسبه ضریب جاکارد بین ۰/۲۶ تا ۰/۸۹ گزارش شده است (۵). این ضریب در مطالعه دیگری بین ۰/۳۹ تا ۰/۷۶ گزارش شده است (۹). محدوده فاصله ژنتیکی نشان دهنده تنوع بالای موجود در سطح ژنوم ارقام مورد مطالعه می باشد. در میان ارقام مورد مطالعه ارقام شماره ۱۰ و ۴ در کمترین فاصله و ارقام شماره ۶ و ۱ در بیشترین فاصله از یکدیگر قرار داشتند. فاصله ژنتیک رقم خارجی شماره ۱۲ (Hedelfinger) به ترتیب با ارقام شماره ۱۰ و ۴ به ترتیب حدود ۰/۳۷ و ۰/۴۰ بود که نشان دهند قرابت بیشتر آنها نسبت به دیگر ارقام است. از سوی دیگر فاصله ژنتیکی رقم خارجی شماره ۱۱ (Bing) با رقم شماره ۵ نشان دهنده شباهت بین آنها است. این قرابت با مشاهده صفات آنها (اندازه میوه، اندازه دمبرگ، رنگ پوست میوه) در جدول ۱ قابل تایید است.

در مواردی که ارقام تک باند اختصاصی ندارند باید از دو یا چند نشانگر جهت تشخیص و تمایز آنها استفاده کرد. بعنوان مثال جهت تمایز رقم شماره ۱۰ از دیگر ارقام، می توان از نشانگر شماره ۱۰ استفاده کرد. ولی باید توجه داشت که این نشانگر علاوه بر تکثیر رقم شماره ۱۰ در ارقام ۴، ۵ و ۶ نیز مشاهده خواهد شد. لذا جهت تمایز این رقم از سه رقم دیگر باید از نشانگر های دیگر نیز استفاده کرد. هر چند ارقام ۵ و ۶ دارای باند اختصاصی هستند و به راحتی قابل تفکیک خواهند بود ولی جهت تمایز رقم ۴ با رقم ۱۰ باید از نشانگر ۴ استفاده کرد. این نشانگر در رقم ۴ قابل مشاهده است ولی رقم ۱۰ وجود ندارد. در نتیجه رقمی که بوسیله نشانگر ۱۰ تکثیر شود ولی توسط نشانگر ۴ تکثیر نشود (به شرطی که رقم ۵ یا ۶ نباشد) رقم ۱۰ خواهد بود و در مقابل رقمی که هم توسط نشانگر ۴ و هم نشانگر ۱۰ تکثیر شود رقم ۴ خواهد بود. در خصوص دیگر ارقام نیز بهمین صورت میتوان عمل نمود. بهتر است جهت شناسایی یک نمونه مجهول ابتدا از نشانگرهای اختصاصی استفاده نمود و سپس از دیگر نشانگرها کمک گرفت.

جدول ۳- ماتریس شباهت ژنتیکی (قطر بالا) و فاصله ژنتیکی (قطر پایین) ۱۲ رقم گیللاس مورد مطالعه

ارقام	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱	***	۰/۲۸۰	۰/۲۵۵	۰/۳۰۶	۰/۲۵۵	۰/۱۱۸	۰/۳۲۳	۰/۲۵۵	۰/۳۹۱	۰/۲۵۵	۰/۳۶۲	۰/۳۶۲
۲	۰/۱۷۲۰	***	۰/۳۲۲	۰/۵۹۲	۰/۵۱۰	۰/۲۰۰	۰/۳۹۷	۰/۲۳۲	۰/۴۹۰	۰/۶۰۰	۰/۴۹۰	۰/۵۷۶
۳	۰/۱۷۲۵	۰/۶۷۸	***	۰/۴۰۵	۰/۳۵۲	۰/۲۶۵	۰/۳۷۲	۰/۴۵۲	۰/۳۳۷	۰/۳۸۴	۰/۴۰۰	۰/۲۳۴
۴	۰/۶۹۴	۰/۴۰۸	۰/۵۹۵	***	۰/۴۴۱	۰/۳۵۵	۰/۲۶۱	۰/۲۸۰	۰/۵۲۱	۰/۶۷۷	۰/۴۸۰	۰/۵۹۲
۵	۰/۱۷۴۵	۰/۴۹۰	۰/۶۴۸	۰/۵۵۹	***	۰/۳۳۷	۰/۳۴۹	۰/۵۱۰	۰/۳۸۴	۰/۵۵۳	۰/۵۷۶	۰/۴۵۲
۶	۰/۸۸۱۹۴	۰/۶۰۰	۰/۱۷۳۵	۰/۶۴۶	۰/۶۶۳	***	۰/۳۷۲	۰/۳۳۷	۰/۳۵۲	۰/۴۳۴	۰/۲۹۳	۰/۳۵۲
۷	۰/۶۷۷	۰/۶۰۳	۰/۶۲۸	۰/۵۳۹	۰/۶۵۱	۰/۶۲۸	***	۰/۳۴۹	۰/۵۷۴	۰/۴۳۳	۰/۴۳۳	۰/۴۳۳
۸	۰/۱۷۴۵	۰/۵۶۶	۰/۵۴۸	۰/۵۲۰	۰/۴۹۰	۰/۶۶۳	۰/۴۵۱	***	۰/۴۱۷	۰/۵۵۳	۰/۴۹۰	۰/۵۳۱
۹	۰/۶۰۹	۰/۵۱۰	۰/۶۶۳	۰/۴۷۹	۰/۶۱۶	۰/۶۴۸	۰/۲۲۶	۰/۵۸۳	***	۰/۴۹۰	۰/۴۰۰	۰/۶۰۰
۱۰	۰/۱۷۴۵	۰/۴۰۰	۰/۶۱۶	۰/۳۶۲*	۰/۴۴۷	۰/۵۶۶	۰/۵۷۷	۰/۴۴۷	۰/۵۱۰	***	۰/۴۹۰	۰/۶۶۶
۱۱	۰/۶۳۸	۰/۵۱۰	۰/۶۰۰	۰/۵۲۰	۰/۴۲۴	۰/۷۰۷	۰/۵۷۷	۰/۵۱۰	۰/۶۰۰	۰/۵۱۰	***	۰/۴۷۱
۱۲	۰/۶۳۸	۰/۶۶۶	۰/۵۶۶	۰/۴۰۸	۰/۵۴۸	۰/۶۴۸	۰/۵۷۷	۰/۴۶۹	۰/۴۰۰	۰/۳۷۴	۰/۵۲۹	***

† بیشترین فاصله ژنتیکی * کمترین فاصله ژنتیکی



شکل ۴- روابط ژنتیک ۱۲ رقم گیلاس بر اساس روش UPGMA با استفاده از ماتریکس فاصله ژنتیک حاصل از محاسبه فاصله ژنتیک نی بر اساس نشانگرهای RAPD

تجزیه کلاستر

مرتبط با این صفات تعیین گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دفتر ارتباط با جامعه دانشگاه فردوسی مشهد و شرکت طوس خاوران مشهد که منابع مالی و اجرایی این مطالعه را فراهم نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- ۱- آزادفر د (۱۳۷۷) بررسی اکولوژیک و کلاسه‌بندی ژنتیکی درختان گیلاس وحشی (*Prunus avium*) جنگل تحقیقاتی واز، پایان نامه (کارشناسی ارشد). دانشگاه تربیت مدرس، ص ۱۴۹.
- ۲- شکوهی فر ف و مشیری ف (۱۳۸۴) مقایسه چند روش استخراج DNA از برگ ارقام مختلف گیلاس. چهارمین گنگره علوم باغبانی، آبان ۱۳۸۴، دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۴۵۳.
- ۳- گوهرخای ش (۱۳۷۱) ارزیابی صفات کمی و کیفی میوه و ویژگی‌های رویشی ارقام گیلاس و تعیین رابطه همبستگی بین برخی از این صفات، نهال و بذر. دوره: ۸، شماره: ۳ و ۴، ص ۳۹-۴۴.
- 4-Wunsch A and Hormaza J I (2004) Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 635-641.
- 5-Wunsch A and Hormaza J I (2002) Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) geno-

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بخوبی اختلاف بالای رقم ۱ و ۶ با دیگر ارقام را نشان داد. ۱ با منشاء ایران در تمام الگوهای تکثیر شده توسط آغازگرهای مختلف با دیگر ارقام کاملاً متفاوت بود. این تفاوت در دندروگرام حاصل بخوبی نمایان است. این رقم از لحاظ اندازه میوه و دیگر صفات مورفولوژیکی ارائه شده در جدول ۱ نیز با دیگر ارقام متمایز بود. همچنین قرابت میان رقم شماره ۱۲ (خارجی) با سه رقم ۲، ۴ و ۱۰ و قرار گرفتن آنها در یک گروه، بخوبی قابل مشاهده است. قرار گرفتن رقم شماره ۱۱ (خارجی) به همراه ارقام ۵ و ۸ در گروه دیگر نشان دهنده قرابت بالای این ارقام می‌باشد. یک گروه دو عضوی دیگر نیز شامل ارقام شماره ۷ و ۹ در دندروگرام مشخص می‌باشد. هرچند شباهت زیادی در صفات مورفولوژیکی این ارقام در جدول ۱ ارائه نشده است ولی بنظر می‌رسد در مناطق تکثیر شده، این دو رقم شباهت بیشتری با یکدیگر داشته‌اند. سه رقم ۱، ۶ و ۳ بیشترین اختلاف را با خود و دیگر ارقام نشان دادند و بصورت گروه‌های متمایز تک عضوی در دندروگرام قابل مشاهده هستند (شکل ۴).

در این مطالعه بین صفات مورفولوژیکی ارقام و روابط خویشاوندی آنها ارتباط اندکی مشاهده شد. به نظر می‌رسد در صورت مطالعه صفات کمی و کیفی بیشتر می‌توان انطباق بالاتری بین نتایج مولکولی و مورفولوژیکی مشاهده نمود. لذا توصیه می‌شود تنوع صفات اقتصادی گیلاس در قالب آزمایشی مورد بررسی قرار گیرد تا صفات توارث پذیر آنها شناسایی و سپس نشانگرهای مولکولی

- types using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63 .
- 6-Oliveira CM, M M, Monte-Corvo L, Goulao L and Silva DM(1999): Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 79: 163-174.
- 7-Hormaza J I:(1998) Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Scientia Horticulture*,79: 121-126 .
- 8-Gerlach H K and Stosser R(1997) Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Journal of Applied Botany* 71: 212-218, .
- 9-Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arus P and Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*,105: 127-138 .
- 10-Granger A R, Clark G R and Jackson J F (1993) Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theoretical and Applied Genetic*, 86: 458-464 .
- 11-Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M and Struss D (2001) DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 205-209 .
- 12-Vornom B and Gebhardt K (1999) Application of cpDNA - and RAPD - markers in characterization of Clone Collections of wild Cherries and performance of micro propagated plus trees. In: Espinel S and Ritter E (eds). *Congress Application of biotechnology to forest genetics*. Vitoria - Gasteiz, pp 61-71.
- 13-Harada T, Matsukawa K, Sato T, Ishikama R, Nizeki M and Saito K(1993) DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* ,65: 87-91.
- 14-Koller B, Lehmann A, Mcdermott JM and Gessler C(1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 85: 901-904 .
- 15-Chevreau E, Leuliette S and Gallet M(1997) Inheritance and linkage of isozyme loci in pear (*Pyrus communis* L.) *Theor Appl Genet*, 94: 498-506.
- 16-Warburton ML and Bliss FA (1996) Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *J Am Soc Hortic Sci*, 121: 1012-1019.
- 17-Deng ZN, Gentile A, Nicolosi E, Domina VA and Tribulato E (1995) Identification of in vivo and in vitro lemon mutants RAPD markers. *J. Hortic. Sci* 70: 117-125 .
- 18-Qu X, Lu J and Lamikanra O (1996) Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analyses. *J Am Soc Hortic Sci*, 121: 1020-1023.
- 19-Ortiz A, Renaud R, Calzada I and Ritter R(1997) Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *J Hortic Sci* 72: 163-174.
- 20-Yang HY and Schmidt H(1994) Influence of different auxins on in vitro rooting of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Gartenbauwissenschaft* 59: 45-47 .
- 21-Stockinger EJ, Mulinix CA, Long CM, Brettin TS and Iezzoni AF(1996) A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore- derived callus culture population. *Journal of Heredity* 87: 214-218 .
- 22-Cai YL, Cao DW and Zhao GF(2007) Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* ,111: 248-254.
- 23-Nei M and Li WH(1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. , pp 5269-5273.
- 24-Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York .