

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب بومی سیستان با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMP

مجتبی شهرکی^۱، نفیسه مهدی‌نژاد^{۲*}، براتعلی فاخری^۳، لیلا فهمیده^۴ و مهدی آران^۵

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۳)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ سیب از سه منطقه هامون، بنجار و امامیه شهرستان زابل و یک منطقه زاهدان از ۱۱ آغازگر IRAP و ۳ آغازگر REMAP استفاده شد. ۱۴ آغازگر مورد استفاده در مجموع توانستند ۶۱ مکان ژنی چندشکل را شناسایی کنند. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مطالعه شده برابر ۳۹/۷۹ درصد بود که کمترین درصد چندشکلی به آغازگر K001+۸۳۰۰۳ و بیشترین درصد چندشکلی به آغازگر ۸۵۶۵ اختصاص داشت. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرها بین ۰/۰۲ تا ۰/۲۸ و شاخص نشانگر (MI) بین ۰/۲۹ تا ۰/۵۴ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متغیر بود. بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگر K006 و کمترین میزان PIC مربوط به نشانگرهای K001+۸۳۰۰۳ بود. همچنین بیشترین میزان MI مربوط به ۸۵۶۵ و کمترین میزان MI مربوط به آغازگر K001+۸۳۰۰۳ بود. نتایج حاصل این احتمال را تقویت کرد که رتروترانسپوزون‌هایی که بیشترین چندشکلی را تولید نموده‌اند در تکامل گیاهان مورد تحقیق بیشتر جابجا شده و تعداد نسخه‌های بیشتری را داخل ژنوم تکثیر کرده‌اند. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مورفولوژیکی و صفات باغبانی یکسان در زیر گروه‌های متفاوت قرار گرفتند که علت این دسته‌بندی می‌تواند به دلیل میزان متفاوت عناصر متحرک موجود در این ژنوتیپ‌ها باشد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، رتروترانسپوزون، ژنوم، شاخص نشانگر، مکان ژن

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
 - ۲- استادیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
 - ۳- استادیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
 - ۴- دانشیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
 - ۵- استادیار گروه باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- * پست الکترونیک: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

مقدمه

سیب با نام علمی *Malus domestica* Borokh از خانواده Rosacea می‌باشد که در شرایط مختلف آب و هوای کشت می‌گردد (هریس^۱ و همکاران، ۲۰۰۲). اکثر ارقام سیب زراعی متعلق به *Malus × domestica Borkh* و دیپلوئید می‌باشند. در برخی گونه‌ها سطوح مختلف پلیپیدی نیز دیده می‌شود که یک مجموعه ژنتیکی پیچیده‌ای را تشکیل داده‌اند که همگی تحت تأثیر جنس *Malus* می‌باشند (دار^۲ و همکاران، ۲۰۱۷). گونه *M. sieversii* (Ledeb.) Roem از آسیای میانه را محتمل‌ترین نامزد برای جد مادری سیب اهلی می‌دانند. به دلیل نزدیکی ایران به خاستگاه سیب در ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان تنوع ژنتیکی زیادی در رقم‌های سیب ایرانی مشاهده می‌شود (جونپیر^۳ و همکاران، ۱۹۹۶). مطالعه و تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی دارای اهمیت فوق‌العاده در اصلاح نباتات است که این تنوع از تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی ناشی می‌گردد و گام اولیه و اساسی برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی می‌باشد. اصلاح و تولید ارقام جدید وابسته به قدرت انتخاب دقیق بین گیاهان می‌باشد که این خود بستگی به شناسایی ارقام و تنوع موجود در آن‌ها دارد (اومشوا^۴ و همکاران، ۲۰۱۸).

از طرفی شناسایی و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم‌ها یک ضرورت می‌باشد و به اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا از نمونه‌گیری مجدد از جمعیت‌ها جلوگیری نمایند (گویندراج^۵ و همکاران، ۲۰۱۵). در ارزیابی تنوع ژنتیکی سیب به طور وسیعی از نشانگرهای RAPD (اوکسو^۶ و همکاران، ۲۰۱۵؛ گیومارایس^۷ و همکاران، ۲۰۱۳)، RFLP (جاراوش^۸ و همکاران، ۲۰۰۰)، AFLP (کنیس و کیولومانس^۹، ۲۰۰۵؛ ساویلویا و کدراپوتسویو^{۱۰}، ۲۰۱۵) و SSR و ISSR (فرخی^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۱؛ پاتزاک^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۲) استفاده شده است. در سال‌های اخیر از مارکرهای

Retrotransposon- Microsatellite (REMAP) Inter- (IRAP) و Amplified Polymorphism

retrotransposon Amplified Polymorphism برای شناسایی ژرم‌پلاسم، شناسایی و نقشه‌یابی و تنوع ژنتیکی بین گونه‌های گیاهان مختلف استفاده شده است. رتروترانسپوزون‌ها عناصر اصلی متحرک در ژنوم گیاهان هستند و از طریق یک RNA حد واسط در ژنوم جابه‌جا می‌شوند. این عناصر ژنتیکی متحرک هم در نواحی هتروکروماتینی و هم در نواحی یوکروماتینی جابه‌جا شده و با ادغام متفاوت در نواحی مختلف باعث ایجاد چندشکلی و تنوع در ژنوم‌های گیاهی می‌شوند و می‌توانند به عنوان یک منبع ژنومی عالی جهت توسعه آغازگرهای مولکولی چندشکل مطرح باشند (د-اون فریو^{۱۳} و همکاران، ۲۰۱۰). الحاقات رتروترانسپوزون‌ها یک حادثه بیولوژیکی است، یعنی رتروترانسپوزون‌ها در گیاهان مختلف تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده فعال شده و در ژنوم جابجا می‌شوند (گراندینستین^{۱۴}، ۱۹۹۸) و به این روش، تولید موتاسیون‌های زیادی در ژنوم می‌کنند و میزان بیان ژن-های اطراف ناحیه الحاق را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به همین دلیل نقش بسیار مهمی را در تکامل بازی کرده‌اند (شاپیرو^{۱۵}، ۱۹۹۹).

در مطالعات انجام شده بر روی سیب در ایران، خدادوست و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus Orientalis* Uglitz) جنگل هیرکانی ایران با استفاده از نشانگر ISSR-PCR پرداختند که این تحقیق نشان داد علی‌رغم شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد جمعیت‌ها از یکدیگر، سطح تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه (به استثنای جمعیت جلگه‌ای سیاه بیل) پایین و هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها بسیار مشابه با یکدیگر است. این مسئله می‌تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب جنگلی شمال ایران باشد. جهانگیرزاده‌خیلوی و همکاران (۱۳۹۲) تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از نشانگر RAPD را بررسی کردند و نشان دادند تنوع ژنتیکی بالایی در ژنوتیپ‌های سیب مناطق مختلف وجود دارد.

1. Harris
2. Dar
3. Juniper
4. Omasheva
5. Govindaraj
6. Okcu
7. Guimarães
8. Jarausch
9. Kenis and Keulemans
10. Saveljeva and Kudryavtsev
11. Farokhi
12. Patzak

13. D'Onofrio
14. Grandbastien
15. Shapiro

را داشتند، جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب معرفی گردند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق بر روی ۲۵ ژنوتیپ سیب که از مناطق هامون (کد ۱ تا ۱۵)، امامیه (کد ۱۶ تا ۲۰)، بنجار (کد ۲۱ تا ۲۴) در منطقه سیستان و یک نمونه از شهر زاهدان (کد ۲۵) جمع‌آوری شده بودند، انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی جوان به طور جداگانه جمع‌آوری شد و سپس هر نمونه درون کیسه‌های نایلونی همراه با اسم ژنوتیپ بسته‌بندی شد و بلافاصله درون ظرف یخ نگهداری و به آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه زابل منتقل و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA از بافت برگ

استخراج DNA از بافت برگ و به استفاده از روش CTAB (موری و تامپسون، ۱۹۸۰) صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین گردید. DNAهای ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های PCR در غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

واکنش‌های PCR

۱۱ آغازگر منفرد IRAP و ۳ ترکیب آغازگری REMP (آنتونیوس-کلمولا و همکاران، ۲۰۰۶) برای مطالعه الگوی توزیع، فعالیت و چندشکلی ادغامی رتروترانسپوزن‌های LTR در ۲۵ ژنوتیپ سیب استفاده شد (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۲/۵ unit/ μ l، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ ppm، ۲/۵ میکرولیتر $1 \times$ PCR Buffer دارای غلظت $10 \times$ (بافر 10 X PCR شامل ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCL با اسیدیتته ۸/۳، ۵۰۰ میلی مولار کلرید پتاسیم (KCl)، ۱۵ میلی مولار منیزیم کلرید ($MgCl_2$) و ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی)

کیان امیری و همکاران (۱۳۹۰) تنوع ژنتیکی برخی از پایه‌های پاکوتاه کننده سیب با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD را مورد مطالعه قرار دادند که این تحقیق تفاوت ژنتیکی در بین پایه‌های بومی پاکوتاه کننده سیب توسط نشانگر RAPD را مشخص نمود. پایه‌های بومی که از یک منطقه جمع‌آوری شده بودند از نظر تشابه به هم نزدیکتر بودند که این نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی بیشتر گیاهان یک منطقه می‌باشد.

کایا و یلماز^۱ (۲۰۱۶) با استفاده از آغازگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP ویژگی‌های مولکولی ۴۶ رقم زیتون را با آغازگرهای LTR و ISSR مورد بررسی قرار دادند. آنالیز این آغازگرها سطح بالای تغییرات ژنتیکی در بین ارقام زیتون مورد بررسی در این مطالعه را نشان دادند که می‌تواند ابزاری مفید برای برنامه‌های انتخاب کلون باشد.

در یک مطالعه که بر روی زردآلوی ژاپنی در چین انجام پذیرفت، رابطه ژنتیکی ۸۴ کولتیوار زردآلوی ژاپنی (*Prunus mume*) (۴۱ زردآلوی میوه‌دار و ۴۳ ژنوتیپ گل دهنده) با استفاده از تکنیک‌های IRAP و REMAP بررسی گردید و این واریته‌های زردآلو بر اساس شباهت کوفنتیکی به ۱۸ گروه تقسیم گردیدند (یویینگ^۲ و همکاران، ۲۰۱۱).

آنتونیوس-کلمولا^۳ و همکاران (۲۰۰۶) تنوع ژنتیکی در ۹۰ ژنوتیپ ژاپنی سیب را با استفاده از آغازگرهای IRAP و REMP بررسی نمودند. آغازگرها بر اساس نواحی تکرار شونده طولانی (LTR) طراحی شده بودند.

در مورد تنوع فنوتیپی و ژنتیکی ارقام سیب در خارج کشور تحقیقات زیادی انجام شده است اما در مورد سیبهای بومی و وارداتی کشت شده در بعضی مناطق کشور نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق، بررسی تحرک و چندشکلی برخی رتروترانسپوزن‌های LTR در ژنوتیپ‌های مختلف سیب با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMP می‌باشد. تا علاوه بر تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسما، آغازگرهایی که کارایی بالا در تمایز ژنوتیپ‌های سیب مورد مطالعه در این تحقیق

1. Kaya and Yilmaz
2. Yuying
3. Antonius-Klemola

4. Murry and Thompson

آنتونیوس-کلمولا و همکاران، ۲۰۰۶). محصول PCR برای هر آغازگر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد (W/V) در (1×) TBE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شدند. جهت رنگ‌آمیزی ژل از ژل رد و دستگاه ترانس لی میناتور جهت نمایان شدن باندها استفاده شد.

ژلاتین (موجب پایداری Taq پلیمرز و افزایش تکثیر می‌باشد) و ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل انجام شد. چرخه دمایی PCR شامل مرحله اول با ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه آغاز گردید و مرحله دوم شامل ۳۴ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۵۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۵۰ ثانیه) و مرحله سوم ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای نشانگر IRAP مورد استفاده

primer	(5' - 3') sequence	TM	Rference
K001	TGATCCACTCCCCTGGGCGATGTGG	72.4	Antonius-Klemola et al.,2016
K002	AGCTCCCAAAGGCCTCGTGC	65.3	Antonius-Klemola et al.,2016
K003	TCCCAAAGGCCTCGTGCTAGGTAG	69.1	Antonius-Klemola et al.,2016
K004	TCCACATCGCCAGGGAGTGGATC	74.2	Antonius-Klemola et al.,2016
K005	AGGCCTTTTGGGAGCTCACTG	63.3	Antonius-Klemola et al.,2016
K006	TGGAGCCCGGGTCAGGATGTGAC	70	Antonius-Klemola et al.,2016
K007	TAGCACGATATTGTCCGCTTTGG	62.9	Antonius-Klemola et al.,2016
K008	GCGACAATATCGTGCTACGGTG	66.4	Antonius-Klemola et al.,2016
K009	AAAGCGGACAATATCGTGCTACG	62.9	Antonius-Klemola et al.,2016
83003	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	57.3	Antonius-Klemola et al.,2016
8565	GTCACCACCACCACCACCACCAC	70	Antonius-Klemola et al.,2016

جدول ۲- توالی آغازگرهای نشانگر REMP مورد استفاده (آنتونیوس-کلمولا و همکاران، ۲۰۰۶)

primer	(5' - 3') sequence	Tm
83003+K001	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCTGATCCACTCCCCTGGGCGATGTGG	60
8565+K007	GTCACCACCACCACCACCACCCTAGCACGATATTGTCCGCTTTGG	56.2
K008+83003	GCGACAATATCGTGCTACGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	59

شاخص شانون (SI) و هترزیگوسیتی مورد انتظار (He) و تعداد آلل‌های موثر (Ne) توسط نرم‌افزار GENALEX نسخه (Peakall and Smouse) برآورد شد. شاخص چندشکلی که میزان آن بین صفر تا یک است (اگرما و توینسترا، ۲۰۰۳)، با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum P_j^2$ (P_j فراوانی باندز ام در بین تمام الل‌های تولیدی ژنوتیپ-های مورد استفاده) محاسبه شد (برایان^۳ و همکاران، ۱۹۹۷). شاخص نشانگری (Index Marker) نشان‌دهنده کارایی نشانگر است و با استفاده از فرمول $MI = PIC * EMR$ که در آن EMR نسبت چندگانه مؤثر بوده و بیانگر

تجزیه داده‌ها

الگوی بانندی حاصل، بر اساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها، به صورت یک و صفر امتیازدهی شد. ماتریس تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای نشانگرهای IRAP و REMP براساس ضریب تشابه دایس تشکیل شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و توسط نرم‌افزار NTSYS-pc انجام گرفت. جهت تعیین همبستگی بین ماتریس کوفنتیک حاصل از داده‌های IRAP و REMP از آزمون مانتل با ۱۰۰۰ جایگشت از نرم‌افزار NTSYS-pc (رولف^۱، ۲۰۰۰) استفاده شد.

2. Agrama and Tuinstra
3. Bryan

1. Rohlf

آغازگر می‌باشد که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر قدر این عدد بزرگ‌تر باشد بیانگر وجود تعداد آل‌های زیاد و فراوانی زیاد چندشکلی برای آن مکان ژنی در جمعیت است (بوستین^۳ و همکاران، ۱۹۸۰).

شاخص نشانگر (MI) برآورد مناسبی برای کارایی آغازگرها است که به تعداد باندهای چندشکل به دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود. زیاد بودن شاخص نشانگر نشان‌دهنده تولید تعداد بیشتری باند چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است (اسپونر^۴ و همکاران، ۲۰۰۵). آغازگر K006 دارای بیشترین میزان MI و PIC بود که نشان می‌دهد این نشانگر توانایی بیشتری در مشخص کردن فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها دارد. بنابراین نتایج این تحقیق این احتمال را تقویت می‌کند که رتروترانسپوزون K006 در طی تکامل در این گیاه بیشتر جابجا شده است، یعنی در طی تکامل داخل ژنوم بیشتر جابجا شده و نسخه‌های بیشتری از خود را در ژنوم ایجاد کرده است. لذا پیشنهاد می‌شود از آغازگر K006 که بر اساس هر دو شاخص MI و PIC بیشترین چندشکلی را نشان دادند برای آنالیز تنوع ژنتیکی استفاده گردد.

نشانگرهای REMP

در کل ۳ ترکیب آغازگری REMP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۲۵ ژنوتیپ از چهار جمعیت سیب استفاده شد. هر سه این ترکیب نشانگری مکان‌های چند شکل و قابل امتیازدهی تولید کردند. این سه ترکیب آغازگری در مجموع ۲۰ مکان تکثیر کردند که از این تعداد ۱۰ مکان چند شکل بودند. ترکیب آغازگری K007+8565 بیشترین تعداد مکان (۷) و مکان‌های چند شکل (۴) تولید نمود. بیشترین میزان میانگین PIC مربوط به ترکیب آغازگری K007+565 و بیشترین میزان میانگین MI مربوط به ترکیب آغازگری K008+83003 بود (جدول ۳). آغازگرهای که دارای بیشترین میزان MI و PIC هستند نشان می‌دهد این نشانگرها توانایی بیشتری در مشخص کردن فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها دارد. لذا پیشنهاد می‌شود از آغازگرهای که بر اساس هر دو شاخص MI و PIC بیشترین چندشکلی را نشان دادند برای آنالیز تنوع

تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژنوم است به دست آمد EMR. با استفاده از فرمول $EMR = \beta * Na$ که در آن Na تعداد مکان‌های چندشکل و β نیز نسبت مکان‌های چندشکل به تعداد کل مکان‌ها است محاسبه شد (خالد^۱ و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج و بحث

در این تحقیق برای اولین بار الگوی توزیع و چندشکلی ادغامی برخی خانواده‌های رتروترانسپوزونی LTR با استفاده از نشانگرهای REMAP و IRAP در ژنوتیپ‌های سیب سیستان مطالعه شد. در کل یازده آغازگر منفرد IRAP و ۳ ترکیب آغازگری REMP برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ سیب مورد استفاده قرار گرفت.

نشانگرهای IRAP و الگوی توزیع خانواده‌های

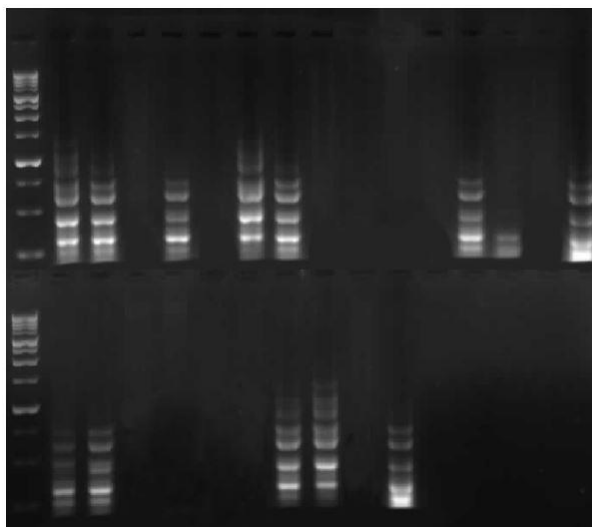
رتروترانسپوزونی در ژنوم سیب

یازده ترکیب آغازگری IRAP برای بررسی الگوی توزیع رتروترانسپوزون‌ها و تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ سیب مورد استفاده قرار گرفت. همه آغازگرهای IRAP الگوی نواری چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند که نشان می‌دهد این رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم سیب حضور فعال داشته و در نواحی نزدیک به هم و قابل تکثیر قرار گرفته‌اند. مجاورت رتروترانسپوزون‌های مربوط به یک خانواده در ژنوم و تکثیر با تک آغازگرهای مبتنی بر این خانواده‌ها در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (عبداللهی‌مندولکانی^۲ و برنوسی، ۲۰۱۲).

در کل این ۱۱ آغازگر ۷۰ مکان تکثیر کردند که از این تعداد ۵۱ مکان چند شکل بودند. آغازگر ۸۵۶۵ بیشترین تعداد مکان (۸) و مکان‌های چند شکل (۷) و آغازگر k004 کمترین تعداد مکان (۳) و مکان‌های چندشکل (۲) را تولید کردند. بیشترین میزان میانگین PIC مربوط به آغازگر K006 و بیشترین میزان میانگین MI مربوط به آغازگر ۸۵۶۵ بود (جدول ۳). PIC یا تنوع ژنی، معیار دیگری در جهت انتخاب بهترین نشانگر است. PIC بالا نشان‌دهنده چندشکلی بالا و وجود آل‌های نادر در یک مکان ژنی می‌باشد که می‌تواند در تمایز موثر ارقام استفاده شود. PIC پارامتر نشان‌دهنده میزان چندشکلی یک

3. Botstein
4. Spooner

1. Khaled
2. Abdollahi Mandoulakani and Bernousi



شکل ۱- الگوی نواری تکثیر شده در نشانگر IRAP با استفاده از آغازگر (۸۵۶۵)

ژنتیکی استفاده گردد.

تجزیه کلاستر

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از روش دایس انجام شد که با ضریب کوفنتیک ۰/۸۸ مناسب‌ترین روش جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از بین روش‌های مورد بررسی بود. گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه دایس با ترسیم برش در فاصله ۰/۶۸، ۲۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۴ گروه قرار داد.

نمودار درختی حاصل (شکل ۱) از تجزیه خوشه‌ای از گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ براساس مارکرهای مولکولی IRAP و REMP نشان داد که ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های هامون ۱، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های هامون با کدهای ۲، ۷، ۱۵، ۶ و ژنوتیپ بنجار با کد ۲۲، گروه سه شامل ژنوتیپ‌های هامون با کدهای ۴ و ۱۲، ژنوتیپ‌های امامیه با کدهای ۱۶ و ۱۷، ژنوتیپ بنجار با کد ۲۳ و ژنوتیپ زاهدان با کد ۲۵ بود. در گروه چهارم ژنوتیپ‌های هامون ۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۸، ۹، ۱۳ و ۱۴، ژنوتیپ‌های امامیه ۱۸، ۱۹ و ۲۰ و ژنوتیپ‌های بنجار ۲۱ و ۲۴ قرار گرفتند.

نمودار درختی حاصل نشان داد که تنوع ژنتیکی نشان دهنده الگوی جغرافیایی آشکار نبود. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها از مناطق مختلف در تمام خوشه‌ها بیانگر این امر است که تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند. علت چنین دسته‌بندی میزان متفاوت عناصر متحرک موجود در این ژنوتیپ‌ها است، چرا که ژنوتیپ‌های متفاوت حاصل توازن بین عوامل تکامل (انتخاب، مهاجرت و انحطاط

ژنتیکی)، حالات بسیار پیچیده از ناهمگنی‌های محیطی و عوامل تحمیلی انسان در حال و گذشته و تبادل فیزیکی نمونه‌ها بین مناطق مختلف می‌باشند. کدهای ۱۱ و ۱۹ که به ترتیب متعلق به هامون و امامیه بودند، بیشترین شباهت را نشان دادند. با توجه به تفاوت شرایط محیطی هامون و امامیه، چنین می‌توان نتیجه گرفت که منشأ سیب‌های هر دو منطقه یکسان بوده است و یا احتمالاً این ژنوتیپ‌ها تحت تأثیر شرایط محیطی (تنش غیرزنده) یکسانی قرار گرفته‌اند و عناصر متحرک به میزان تقریباً یکسانی در آن‌ها بیان شده است. پس از آن کدهای ۱۰ و ۲۰ که باز هم متعلق به هامون و امامیه بودند، بیشترین شباهت را دارا بودند. کد ۱ متعلق به هامون بیشترین فاصله را از سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد و در دورترین فاصله و کلاستر جدا قرار گرفت. همچنین ژنوتیپ‌های ۳، ۵، ۱۳، ۱۸، ۲۱ و ۲۴ نیز با توجه به نمودار درختی در یک کلاستر قرار گرفتند و از لحاظ صفات مورد بررسی شباهت زیادی داشتند.

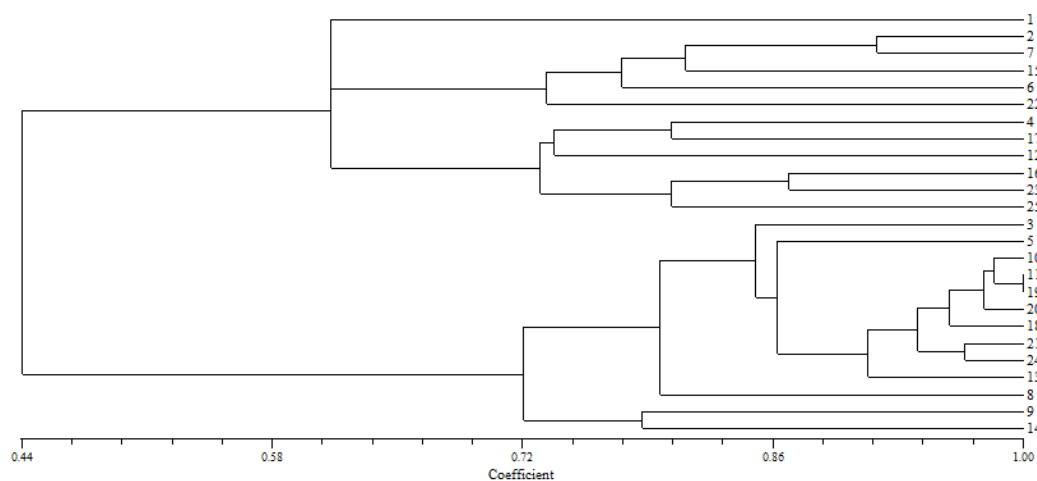
پیریرا-لورنزو^۱ و همکاران (۲۰۱۷) و لارسن^۲ و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص قرارگرفتن ژنوتیپ‌های سیب یک منطقه در خوشه‌های متفاوت اعلام کردند که ممکن است ارقام سیب یک منطقه جغرافیایی در اصل از مکان دیگری نشأت گرفته و تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشد. چنین نتایجی به این دلیل اتفاق می‌افتد که جابجایی

1. Pereira-Lorenzo

2. Larsen

جدول ۳- درصد چندشکلی، تعداد کل باند، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگری در آغازگرهای مورد بررسی

MI	PIC	Poly Morphism (%)	Number of polymorphic bands	Total number of Bands	Primer sequence	Primer
0.42	0.23	37.5	3	5	TCCCAAAGGCCTCGTGCTAGGTA G	K003
0.51	0.13	45.5	5	6	TAGCACGATATTGTCCGCTTTGG	K007
0.50	0.12	42.76	6	8	AAAGCGGACAATATCGTGCTACG	K009
0.54	0.08	46.6	7	8	GTCACCACCACCACCACCAC	8565
0.47	0.28	42	3	4	TGGAGCCCGGGTCAGGATGTGAC	K006
0.50	0.15	45.45	5	6	AGTCCCAAAGGCCTCGTGC	K002
0.41	0.14	33.33	4	8	TGATCCACTCCCCTGGGCGATGTG G	K001
0.43	0.16	40	2	3	TCCCACATCGCCCAGGGGAGTGGA TC	K004
0.46	0.03	40	4	6	AGGCCTTTTGGGAGCTCACTG	K005
0.52	0.15	43.75	7	9	GCGACAATATCGTGCTACGGTG	K008
0.48	0.07	41.66	5	7	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	83003
0.29	0.02	22.22	2	7	AGAGAGAGAGAGAGAGAGCTGAT CCACTCCCCTGGGCGATGTGG	83003+K00 1
0.43	0.21	36.35	4	7	GTCACCACCACCACCACCACCT AGCACGATATTGTCCGCTTTGG	8565+K007
0.46	0.04	40	4	6	GCGACAATATCGTGCTACGGTGA GAGAGAGAGAGAGAGAGC	K008+8300 3
0.45	0.12	37.99	61	90		Mean



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سیب مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی مولکولی با آغازگرهای REMAP و IRAP نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت و آغازگرهای استفاده شده برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب مناسب هستند. بر اساس نتایج ما ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر مولکولی مورفولوژی تفاوت‌هایی داشتند که این تفاوت‌ها در بررسی مولکولی دقیق‌تر و متمایزتر بود که نشان‌دهنده اثر محیط و مکان بر فنوتیپ و ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی بود. با توجه به اینکه آغازگرهای K003، K006 و 8565+K007 دارای مقادیر بالای PIC و MI بودند، می‌تواند به‌عنوان آغازگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. وجود تنوع بالای مورفولوژیکی و ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها، منابع ژنتیکی مناسبی را برای انجام برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌کند. از آنجایی که اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به وجود تنوع بوده، انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری می‌باشد. بنابراین باید والدین دور از هم را که از گروه‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای هستند، انتخاب کرد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین والدین، هتروزیس بیشتری به دست می‌آید. همچنین تنوع زیادی در نتاج حاصل از تلاقی در نسل‌های در حال تفرق ایجاد می‌شود که در برنامه‌های گزینش برای صفات مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرد و با توجه به آن‌ها می‌توان در آینده ژنوتیپ‌هایی که در اکثر صفات ایده‌آل هستند، اصلاح نمود.

سپاسگذاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل برای حمایت مالی آن‌ها در انجام این پروژه با شماره ۹۶۱۸-۱۵۸-UOZ-GR- تشکر و قدردانی می‌گردد.

ژنوتیپ‌ها از منطقه‌ای به منطقه دیگر بیشتر بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی می‌باشد که این امر لزوم دقت در نام‌گذاری نمونه‌ها و استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی را به‌طور همزمان آشکار می‌سازد. همچنین از آنجا که فعالیت رتروترانسپوزون‌ها تابعی از تنش‌هاست و در اثر تنش‌هایی از جمله حمله آفات و بیماری‌ها و یا خشکسالی‌ها فعال می‌شوند می‌تواند علت چنین تقسیم بندی باشد (گراندباستین، ۱۹۹۲).

عدم تطبیق منشا جغرافیایی با تنوع ژنتیکی در پژوهش غلامزاده‌خویی^۱ و همکاران (۲۰۱۵) در ارزیابی خریزه با استفاده از REMAP و یوپی‌ینگ و همکاران (۲۰۱۱) در ارزیابی کولتیوارهای زردآلو با استفاده از IRAP و REMAP نیز مشاهده شده که با تحقیق حاضر مطابقت داشتند.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خانواده‌های رتروترانسپوزونی LTR هم به حالت منفرد و هم به حالت ترکیب در ژنوم سیب ادغام شده‌اند. همچنین این عناصر دارای فعالیت انتقالی و چندشکلی زیادی در این گونه می‌باشند و می‌توان از نشانگرهای REMAP و IRAP مبتنی بر این عناصر در مطالعات ژنتیکی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی گروه‌های هتروتیک، بررسی روابط تکاملی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها در گونه‌های مختلف جنس سیب استفاده نمود. حضور و گستردگی این عناصر در سراسر ژنوم سیب به وسیله آنتونیوس-کلمولا و همکاران (۲۰۰۶) برای توالی رتروترانسپوزونی LTR قبلاً گزارش شده است. نتایج آن‌ها نشان داده است که این رتروترانسپوزون‌ها قبلاً در سیب‌های خاصی وجود داشته است و همچنین در طی تکامل ارقام سیب نقش داشته‌اند. همچنین اینکه آن‌ها احتمالاً نقش مهمی را در ساختار و سازمان‌دهی ژنوم بازی کرده‌اند. پیشنهاد می‌شود که جمعیت‌های بیشتری از گونه‌های و جنس‌ها مختلف سیب از نواحی مختلف کشور جمع‌آوری شود و نسبت به سامان‌دهی آن‌ها در ژرم‌پلاسما با استفاده از این نشانگرها اقدام شود. با توجه به اینکه هر خانواده رتروترانسپوزونی تاریخچه و الگوی ادگامی متفاوتی در ژنوم دارد، توصیه شود از خانواده‌های مختلف به‌عنوان نشانگر مولکولی استفاده شود.

1. Gholamzadeh Khoei

منابع

- خدادوست، ع.، یوسف‌زاده، ح.، امیرچخماقی، ن.، عبداللهی، ح. و حسین‌زاده، ا. ۱۳۹۵. تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus orientalis* Uglitz.) جنگل هیرکانی ایران، با استفاده از نشانگر ISSR-PCR. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۹(۴): ۳۵۹-۳۶۹.
- جهانگیرزاده، ش.، نورافکن، ح. و دامیار، س. ۱۳۹۲. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از نشانگر RAPD. بوم‌شناسی گیاهان زراعی، ۹(۱): ۲۱-۲۹.
- کیان‌امیری، ش.، حسنی، م. و زمانی، ذ. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از پایه‌های پاکوتاه کننده سیب با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۳(۱): ۴۳-۵۲.
- Abdollahi Mandoulakani, B. and Bernousi, I. 2015. Genetic diversity in iranian melon populations and hybrids assessed by IRAP and REMAP markers. Journal of Agricultural Science and Technology, 17(5): 1267-1277.
- Agrama, H. and Tuinstra, M. 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African journal of biotechnology, 2(10): 334-340.
- Antonius-Klemola, K., Kalendar, R., Schulman, A.H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. Theoretical and Applied Genetics, 112(6): 999-1008.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32(3): 314-331.
- Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B. and Gale, M.D. 1997. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 94(5): 557-563.
- D'Onofrio, C., De Lorenzis, G., Giordani, T., Natali, L., Cavallini, A. and Scalabrelli, G. 2010. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. Tree Genetics and Genomes, 6(3): 451-466.
- Dar, J.A., Wani, A.A. and Dhar, M.K. 2019. Assessment of the genetic diversity of apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars grown in the Kashmir Valley using microsatellite Markers. Journal of King Saud University-Science, 31(2): 194-201.
- Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Naseri, L., Azar, M.M. and Maleki, H.H. 2011. Evaluation of Genetic Diversity Among Iranian Apple (*'Malus domestica'* Borkh.) Cultivars and Landraces Using Simple Sequence Repeat Markers. Australian Journal of Crop Science, 5(7): 815-821.
- Gholamzadeh Khoei, B., Mandoulakani, A. and Bernousi, L. 2015. Genetic Diversity in Iranian Melon Populations and Hybrids Assessed by IRAP and REMAP Markers. Journal of Agricultural Science and Technology, 17(5): 1267-1277.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. Genetic Research International, 1-14.
- Grandbastien, M.A. 1992. Retroelements in higher plants. Trends in Genetics, 8(3): 103-108.
- Grandbastien, M.A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends Plant Science, 3: 181-187.
- Guimarães, J.F.R., Nietsche, S., Costa, M.R., Moreira, G.B.R., Pereira, M.C.T. and Vendrame, W., 2013. Genetic diversity in sugar apple (*Annona squamosa* L.) by using RAPD markers. Revista Ceres, 60: 428-431.
- Harris, S.A., Robinson, J.P. and Juniper, B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. TRENDS in Genetics, 18(8): 426-430.
- Jaraus, W., Saillard, C., Helliot, B., Garnier, M. and Dosba, F. 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. Molecular and Cellular Probes, 14(1): 17-24.
- Juniper, B.E., Watkins, R. and Harris, S.A. 1996. The origin of the apple. In Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 484: 27-34.

- Kaya, E. and Yilmaz-Gokdogan, E. 2016. Using Two Retrotransposon Based Marker Systems (IRAP and REMAP) for Molecular Characterization of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1): 167-174.
- Kenis, K. and Keulemans, J. 2005. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus× domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. *Mole Breed*, 15: 205-219.
- Khaled, A.G.A., Motawea, M.H. and Said, A.A., 2015. Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2): 243-252.
- Larsen, B., Toldam-Andersen, T.B., Pedersen, C. and Ørgaard, M. 2017. Unravelling genetic diversity and cultivar parentage in the Danish apple gene bank collection. *Tree Genetics and Genomes*, 13(1): 14.
- Murry, M. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-4325.
- Okcu, M., Kalkışım, Ö., Okcu, Z., Karabulut, B., Yildirim, N. and Agar, G. 2015. Determination of genetic diversity among wild grown apples from eastern black sea region in Turkey using ISSR and RAPDs markers. *Erwerbs-Obstbau*, 57(4): 171-177.
- Omasheva, M.E., Pozharsky, A.S., Smailov, B.B., Ryabushkina, N.A. and Galiakparov, N.N. 2018. Genetic diversity of apple cultivars growing in Kazakhstan. *Russian journal of genetics*, 54(2): 176-187.
- Patzak, J., Paprštejn, F., Henychová, A. and Sedlák, J. 2012. Comparison of genetic diversity structure analyses of SSR molecular marker data within apple (*Malus×domestica*) genetic resources. *Genome*, 55: 647-665.
- Pereira-Lorenzo, S., Urrestarazu, J., Ramos-Cabrera, A.M., Miranda, C., Pina, A., Dapena, E., Moreno, M.A., Errea, P., Llamero, N., Díaz-Hernández, M.B. and Santesteban, L.G. 2017. Analysis of the genetic diversity and structure of the Spanish apple genetic resources suggests the existence of an Iberian genepool. *Annals of Applied Biology*, 171(3): 424-440.
- Rohlf, F. J [computer software]. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York.
- Savelyeva, E.N. and Kudryavtsev, A.M., 2015. AFLP analysis of genetic diversity in the genus *Malus* Mill. (Apple). *Russian Journal of Genetics*, 51(10): 966-973.
- Shapiro, J. 1999. Transposable elements as the key to a 21st century view of evolution. *Genetica*, 107: 171-179.
- Spooner, D., Van Treuren, R., de Vicente, M.C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Yuying, S., Xiajun, D., Fei, W., Binhua, C., Zhihong, G. and Zhen, Z. 2011. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 132, 50-58.