مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تعیین تنوع ژنتیکی ارقام گلابی با استفاده از نشانگرهای ISSR

مریم صفرپور شورباخلو[1]، روح اله حسینی منفرد[2] سولماز پایدار[1]، مستانه شریفی*[1]

[1] کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

[2] دانشجوی کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰٤/۱٦

چکیده

ایران با نزدیکی به مراکز تنوع گلابی و نیز دارا بودن بیش از ده گونه از جنس *Pyrus* به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ژنتیکی گلابی در دنیا شناخته‌شده است. از طرف دیگر، کشور ایران با ۱۷۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت، یکی از مراکز تولید گلابی محسوب می شود. با وجود موقعیت ممتاز جغرافیایی، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط بین ژنوتیپ‌های مختلف گلابی در ایران وجود ندارد و مشخص نیست چه نسبت ژنتیکی بین ارقام بومی ایرانی با ارقام تجارتی وارداتی وجود دارد. در این تحقیق به منظور گروه‌بندی ۱۰ ژنوتیپ گلابی ایرانی و تعیین موقعیت ژنتیکی آن ها در بین۱۳ رقم وارداتی، از تکنیک مبتنی بر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) استفاده شد. پانزده آغازگر ISSR به کار رفته، در مجموع ۲۵۷ باند تکثیر نمود که ۲۱۳ باند دارای چندشکلی (سطح چندشکلی ۸۱/٦ درصد) بود. دندروگرام ژنوتیپ های گلابی مورد استفاده در این تحقیق با الگوهای باندی ISSR با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA با نرم افزار NTSYS V. Pc-2.02e، رسم شد. گلابی های مورد بررسی در سه دسته مجزا قرار گرفتند. در گروه اول کنفرنس، محمدعلی، سردرودی، بارتلت، ردبارتلت، هراسویت، پاس‌کراسان، دوین دوکومیس، آنجو، فلسطینی، لوئیس‌بن، دوشس و دره‌گزی، در گروه دوم کولی خوج، خوج لب ترش، خوج کته سر، دم کج، سبری، خوج مرداب انزلی و شاه‌میوه و در گروه سوم SK10 و SK13 قرار گرفتند. ارقام براساس خاستگاه جغرافیایی طبقه بندی گردید و ارقام متعلق به *P. communis* و *P. pyrifolia* کاملاً از هم جدا شدند. ارقام ایرانی تجارتی دم کج، شاه میوه و سبری همراه با خوج‌ها در یک دسته قرار گرفتند که به نظر می‌رسد از خوج‌ها منشأ گرفته باشند در حالی که سه رقم محمدعلی، دره گزی و سردرودی نزدیکی بیشتری به ارقام اروپایی نشان دادند و احتمالاً منشأ متفاوتی از خوج ها داشته و با ارقام اروپایی اجداد مشترکی دارند. نتایج این بررسی کارامد بودن نشانگر ISSR برای انگشت‌نگاری ارقام گلابی را اثبات می نماید.

کلمات کلیدی: ***گلابی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR.***

*نویسنده مسئول: مستانه شریفی تلفن: ۰۷۱۲٤۲۲۲٤۲۵ Email: sharifi_m2002@yahoo.com

مقدمه

در دهه های اخیر تنوع زیستی، به عنوان ماده خام و دستمایه اصلی اصلاح گران برای تولید فرآورده های زیستی، توجه پژوهشگران زیادی را به خود جلب کرده است. بنابراین، به موازات گسترش فنون روش های زیست فن آوری به عنوان سرمایه و ثروتی که روز به روز ارزش بیشتری می یابد، باید در رأس اولویت های تحقیقات قرار گیرد (Vejdani,1997).

درخت گلابی که از دوران قبل از تاریخ به سبب حضور طبیعی در فلات ایران مورد توجه مردم این سرزمین قرار گرفته است، از جنس *Pyrus*، عضوی از زیرخانواده *Pomoideae* و خانواده *Rosaceae* است. در این جنس ۲۲ گونه اولیه بومی اروپا، آسیا و مناطق کوهستانی شمال آفریقا، شش هیبرید بین گونه ای طبیعی و حداقل سه هیبرید مصنوعی قرار دارند (Bell, 1990). تقریباً همه گونه‌های *Pyrus* دیپلوییدهایی با ۱۷ جفت کروموزوم (2n=۳٤) هستند و به دلیل آن که به طور گامتوفیتی خودناسازگار[1] می باشند، تنوع بالایی در این جنس وجود دارد (Bell & Hought, 1986).

ارقام گلابی را به دو تیپ شرقی[2] (شرق دور) و اروپایی تقسیم می کنند. ارقام شرقی که با نام گلابی آسیایی یا با اسم ژاپنی *nashi* شناخته شده‌اند، در چین و ژاپن کشت می‌گردند و در بیرون از آسیا به ندرت دیده می‌شوند. مشخصه عمده آنها بافت ترد و مزه شیرین است و مانند سیب روی شاخه می رسند. گونه مهم اقتصادی این دسته *P. pyrifolia* می‌باشد (Bell, 1990). تیپ دوم گلابی‌های اروپایی هستند. ترکیب بافت کره مانند با مزه و عطر خوشایند از خصوصیات این دسته می‌باشد. گونه مهم اقتصادی این گروه *P. communis* می‌باشد که تقریباً ٪۹۰ واریته های گلابی کشت شده در دنیا را شامل می‌شود (Atar, 2001).

کمبود جمعیت های وحشی اجدادی به خصوص در گونه های بسیار کشت شده امروزی، محدود بودن تنوع مورفولوژیکی بین ارقام و گونه‌ها، نبود خصوصیات متمایز کننده بین گونه ها و نیز تلاقی وسیع بین گونه ای[3] که سبب بوجود آمدن ارقام و حتی گونه های وحشی با خصوصیات بینابینی شده است، عواملی هستند که دسته بندی گلابی ها را مشکل ساخته‌اند (Iketani *et al.*, 1998). گرچه خصوصیات مورفولوژیکی و تجزیه تحلیل‌های آیزوزایمی دو روش مهم برای بررسی تنوع ژنتیکی داخل جنس *Pyrus* بوده است، ولی به دلیل محدودیت نشانگرهای مورفولوژیکی و آیزوزایمی، اعتبار دسته بندی ارقام گلابی با چنین روش‌هایی مورد تردید می‌باشد. به همین جهت در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های ملکولی برای تعیین مشخصات ژنتیکی گونه و ارقام گلابی توجه بیشتری را جلب کرده است (Yamamoto *et al.*, 2001 *a,b*; Wünsch & Hormaza, 2007) در ارزیابی تنوع ژنتیکی گلابی

[1] Self-Incompatible
[2] Oriental pear
[3] Introgression

به طور وسیعی نشانگرهای RAPD (JianXin *et al.*, 2004; Sharifani & Jackson, 2000; Ye *et al*, 1996 ;Wang & Dolatowski *et al 2004.*)، AFLP (Monta–Corvo *et al.*, 2000)، SSR (Inoue *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2006; Fernández-Fernandez *et al.*, 2006; Bassil, 2004 & 2005 *et al,.*) و ISSR (Monte-Corro *et al.*, 2002 &2001) مورد استفاده قرار گرفته-اند. در میان این نشانگرها، استفاده از نشانگر ISSR به چندین دلیل توصیه می‌شود. تکنیک ISSR برخلاف SSR، به اطلاعات قبلی از توالی DNA نیاز ندارد و آغازگرهای طراحی شده دارای حقوق انحصاری نیستند. به همین دلیل هزینه اولیه برای تعیین توالی آغازگرهای ISSR پایین است (Chenneaui-Kourda *et al.*, 2007). کار با ISSR آسان و سریع می باشد و چندشکلی بالایی نشان می‌دهد (Wünsch & Hormaza 2002). محصولات تکثیر شده معمولاً ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز طول دارند و با دو روش الکتروفورز آگاروز و اکریل‌آمید قابل بررسی هستند و نیاز به استفاده از مواد رادیواکتیو ندارد (Branchard & Bornat, 2001). به سبب استفاده از آغازگرهای بلند (۱٦ تا ۲۵ مری) در مقایسه با آغازگرهای RAPD (۱۰ مری)، تکرارپذیری ISSR بسیار بالا است (Wünsch & Hormaza, 2007).

برتری ISSR نسبت به برخی تکنیک‌های مولکولی دیگر در دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی مانند برنج، گندم و سیب زمینی شیرین[1] گزارش شده است (Reddy *et al.*, 2002). در بررسی تنوع ژرم پلاسم *Poncirus trifoliata* مزیت ISSR نسبت به RFLP و RAPD مشخص شد و همچنین در جنس *Eleusine* کیفیت و کمیت داده های بدست آمده از ISSR به RFLP و RAPD ارجحیت داشت (Reddy et al., 2002).

شناسایی ارقام *Eucalyptus grandis* توسط ISSR نشان داد که این نشانگر یک روش ارزان و سریع برای دسته بندی مناسب ارقام است (Mezzena *et al.*, 2001). کارایی نشانگر ISSR در ژنوتیب های مهم سپیدار (Jianming *et al.*, 2006)، سیب (Goulão & Oliveira, 2001) و Bitter gourd (*Momordica charantia*) (Singh *et al.*, 2007) نیز نشان داده شده است.

در پژوهشی که با ۳۰ واریته توت فرنگی از مناطق جغرافیایی مختلف انجام شد، نشان داده شد که این تکنیک نیاز به DNA با کیفیت بالا ندارد و در مقایسه با نتایج حاصل از AFLP، ارزان‌تر، سریع‌تر و قابل اعتمادتر می‌باشد (Arnaud *et al.*, 2000).

استفاده از نشانگر ISSR در گونه های *Pyrus* هم گزارش شده است. در یک تحقیق که از نتایج RAPD، AFLP و ISSR در شناسایی ارقام *P. communis* استفاده شده بود، شاخص مرغوبیت[2] در ISSR (۸/۸۱) خیلی بالاتر از RAPD (۲/۰٦) بود و بیست و چهار رقم مورد آزمون را به خوبی دسته بندی کرد (Monte-Corro *et al.*, 2002).

[1] Sweet Potato

[2] Index Value

هشت آغازگر ISSR برای شناسایی ارقام گلابی اروپایی به کار رفته است. از ۳۳۷ باند تولید شده ٪۷۹/۵ چندشکلی داشت (Monte-Corro *et al.*, 2001). در تحقیقی برای شناسایی ارقام گلابی آسیایی از ۱٦ آغازگر ISSR استفاده شد. چهل و چهار قطعه حاصل شد که ارقام مورد نظر را به خوبی از هم جدا می کرد. نتایج این تحقیق نشان داد، نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگر RAPD چندشکلی بالاتری ایجاد می‌کند (Wang & Shih 2004).

مطالعه ژرم‌پلاسم گلابی با آگاهی از این که این میوه از نظر اقتصادی سومین میوه مهم منطقه معتدله پس از سیب و انگور است، ضروری به نظر می رسد. در سال های گذشته میراث ژنتیکی این جنس به سبب نابودی ارقام محلی، رو به فرسایش گذاشته است (Olivera *et al.*, 1999). تولید گلابی دنیای امروز به تعداد محدودی از ارقام مانند ویلیامز، آنجو، بوره بوسک، کنفرنس و پاس کراسان وابسته است، که همگی در قرن ۱۸ و ۱۹ انتخاب شده اند. به همین دلیل نیاز مبرمی به مدیریت ژرم‌پلاسم و شناسایی واریته‌های حفاظت شده گلابی برای بدست آوردن سطح کافی سرمایه ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی وجود دارد (Wünsch & Hormaza 2007).

کشور ما با سطح کشتی معادل ۱۷۰۰۰ هکتار و با عملکرد ۱۱٤۷۰٦ کیلوگرم در هکتار یکی از مراکز تولید گلابی محسوب می‌شود. ضمنا این کشور به سبب نزدیکی به مراکز تنوع گلابی و دارا بودن بیش از ده گونه از جنس *Pyrus*، به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ژنتیکی گلابی دنیا شناخته شده است (Maniee, 1995). گونه‌های متعدد گلابی در دامنه های البرز و زاگرس، جلگه‌های پست ساحلی کنار دریای خزر، در استان های آذربایجان شرقی و غربی، کردستان، لرستان، کوه های بختیاری، منطقه طوالیش گیلان، مازندران، گرگان و همچنین در کوهستان های استان فارس پراکنده هستند (Sabeti, 2002). علی‌رغم این موقعیت ممتاز جغرافیایی برای گلابی در ایران، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گلابی در ایران وجود ندارد و مشخص نیست ارقام بومی ایرانی چه نسبت شجره‌ای با ارقام تجارتی وارداتی دارند. کسب اطلاعات کافی در این زمینه می‌تواند به مدیریت صحیح این منابع ارزشمند ژنتیکی برای جلوگیری از انقراض ژرم‌پلاسم‌ها و بهره‌برداری مناسب از ژنوتیپ‌های محلی برای اهداف اصلاحی گلابی کمک نماید.

کسب اطلاعات کافی در این زمینه می‌تواند به بهره‌برداری مناسب از ژنوتیپ‌های محلی برای اهداف اصلاحی گلابی منجر شود. به علاوه، این اطلاعات به یافتن منشأ جغرافیایی برخی ارقام تجاری کشور که نیای ژنتیکی آنها مشخص نیست، کمک می کند. در هر حال برای برنامه ریزی در اصلاح ژنوتیپ‌های گلابی، داشتن اطلاعات کافی از زمینه ژنتیکی هر رقم و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی ارقام نسبت به یکدیگر اهمیت اساسی دارد. ضمنا گاهی ارقامی مشابه با نام‌های محلی متفاوت خوانده می شوند. مقایسه ارقام ایرانی با ارقام خارجی امکان شناسایی چنین اشتباهاتی را فراهم می کند.

ضمن این که مشخص می‌کند ارقام ایرانی چه نسبت ژنتیکی با ارقام تجارتی وارداتی دارند و آیا آنقدر زمینه ژنتیکی متفاوتی دارند که ارزش بررسی برای ژن های جدید (ژن های مقاومت به بیماری‌ها و یا تنش‌ها) در برنامه های اصلاحی را داشته باشند.

چون در مطالعات ژنتیکی انجام شده روی گلابی و سایر گیاهان توسط پژوهش‌گران دیگر، کارایی نشانگرهای ISSR به اثبات رسیده بود، لذا این نشانگرها برای تأمین اهداف این پژوهش، تعیین روابط فیلوژنتیکی ارقام گلابی ایران و مقایسه آنها با ارقام خارجی، انتخاب گردیدند.

مواد و روش‌ها

نمونه های برگ گلابی شامل ۱۳ رقم خارجی و ۱۰ رقم ایرانی (جدول ۱)، از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج جمع آوری شدند. نمونه-های انتخابی از میان ژنوتیپ هایی بود که کشت آنها مرسوم است. به علاوه چند ژنوتیپ وحشی جهت بررسی منشا ارقام تجاری استفاده گردید. نمونه های برگی بعد از انجماد سریع با نیتروژن مایع، تا زمان انجام استخراج DNA ژنومی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از برگ های جوان گلابی با روش (Murray and Thompson, 1980) انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش الکتروفورز پنج میکرولیتر از DNA به دست آمده در ژل آگاروز ٪۰/۷ در بافر TAE[1] (حاوی ۱۰ میلی مولار تریس، ۰/۵ میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استیک اسید و ۵ میلی مولار استات سدیم) و مقایسه تراکم باند آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III (λDNA برش یافته با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hin*d III) استفاده شد.

آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت Metabion International (Germany) سنتز شد. در جدول ۲ توالی این آغازگرها به همراه دمای اتصال مناسب برای هر آغازگر آورده شده است. آغازگرها طبق دستور شرکت تولیدکننده تا غلظت ۱۰pmol/µL رقیق گردید. با استفاده از PCR گرادیانت تکثیر آغازگرها در سه دمای اتصال مختلف بررسی گردید و دمای مناسب انتخاب شد که در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (حاوی کلریدمنیزیم ۱/۵ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA Polymerase (۱ واحد)، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت ۱۰pmol/µL)، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (۰/۲ میلی مولار) و ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد.

[1] Triss-Acetate-EDTA

جدول ۱- ارقام گلابی مورد استفاده در تحقیق (ارقام خوج کته سر، خوج مرداب انزلی، کولی خوج وخوج لب ترش جزو ارقام وحشی می باشند. سایر ارقام تجاری هستند).

Table 1- Pear varieties used in study (Khuj katesar, KoliKhuj, Khuj mordab anzali and Khuj labtorsh accessions are Wild genotypes and other cultivars are commercial).

گونه species	مبدأ source	کد نمونه‌ها cod	نام انگلیسی English name	نام فارسی Farsi name	ردیف Row
Pyrus communis	فرانسه	Anj	Anjou	آنجو	1
P. communis	انگلستان	Wil	Williams	ویلیامز	2
P. communis	فرانسه	Doy	Doyenneducomice	دوین دوکومیس	3
P. communis	کانادا	Har	Harrow Sweet	هراسوئیت	4
P. communis	انگلستان	Con	Conference	کنفرنس	5
P. communis	فرانسه	Duc	Duchesse	دوشس	6
P. communis	فرانسه	Lie	Lies Bonne	لیس بن	7
P. communis	فرانسه	Aba	Abate Fetel	آبت فتل	8
P. communis	فرانسه	Pal	Palestine	فلسطینی	9
P. communis	انگلستان	Red	Red Bartlett	ردبارتلت	10
P. communis	فرانسه	Pas	Pass Crassane	پاس کراسان	11
P. pyrifolia	ژاپن	S10	SK10	-	12
P. pyrifolia	ژاپن	S13	SK13	-	13
P. communis	ایران	Kkat	Khuj katesar	خوج کته سر	14
P. communis	ایران	Kmor	Khuj mordab anzali	خوج مرداب انزلی	15
P. communis	ایران	KolK	KoliKhuj	کولی خوج	16
-	ایران	Seb	Sebri	سبری	17
P. communis	ایران	Shah	Shah miveh	شاه میوه	18
P. communis	ایران	Klab	Khuj labtorsh	خوج لب ترش	19
P. communis	ایران	Dom	Dom Kaj	دم کج	۲۰
P. communis	ایران	Dar	Daregazi	دره گزی	۲۱
P. communis	ایران	Moh	Mohammad Ali	محمد علی	۲۲
P. communis	ایران	Sar	Sardroudi	سردرودی	۲۳

جدول ۲- آغازگرهای ISSR استفاده شده در تحقیق.

Table 2- ISSR primers used in study.

دمای اتصال (oC) Annealing temp.	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	ردیف Row
50	(AC)8YG	1
50	(GA)8YC	2
55	BDB(CAC)5	3
51	HVH(TGT)5	4
49	VBV(AC)7	5
50	(AGTG)4	6
54	(CA)8GT	7
53	(AC)8YT	8
54	(AC)8YA	9
54	(GT)8YC	10
52	(GT)8C	11
49	(GATA)5	12
49	(TCT)6	13
54	HBH(CT)7	14
54	(TC)8RG	15

H = A یا C یا T　　D = A یا G یا T　　Y = T یا C

V = A یا C یا G　　B = G یا C یا T　　R = A یا G

پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی استریل به هر نمونه، لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Maste cycler–gradient Eppendorf) قرار گرفتند که در آن آنجام واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی[1] اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه، ۳۳ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها[2] به رشته DNA در دمای بهینه شده برای هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ٤٥ ثانیه و تکثیر قطعات[3] DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه و نیز یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، برنامه ریزی شد.

مقدار ٦ میکرولیتر از محصول PCR با مقدار ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری[4] مخلوط شد. مقدار پنج میکرولیتر از آن در یک چاهک ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE (حاوی ۹۰ میلی مولار تریس، ۹۰ میلی مولار اسید بوریک و دو میلی مولار اتیلن دی آمین تترااستیک اسید) بار گذاری شد. سه میکرولیتر نشانگر اندازه ۵۰ (از شرکت Fermentas) نیز به عنوان نشانگر جهت تخمین اندازه قطعات DNA تکثیر شده تزریق شد و به

[1] Denaturing
[2] Annealing
[3] Extension
[4] Loading buffer

مدت ۸ ساعت با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ آمیزی به روش اتیدیوم بروماید[1] (۰/۵ mg/L) استفاده شد.

وجود یا عدم وجود باندها با اعداد یک و صفر برای هر رقم مشخص شد. داده های گم شده با عدد ۹ رتبه‌دهی گردید. به دلیل ماهیت غالب نشانگرهای ISSR از نرم افزار V.Pc-2.02e NTSYS برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده ها شامل تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه خوشه انجام شد. همچنین با استفاده از این نرم افزار پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی[2] (PIC) محاسبه شد. مقادیر PIC بر پایه رابطه $PIC = 1-\sum^{n}_{j} P_{ij}^{2}$ محاسبه گردید (Roldan-Ruize *et al.*, 2000)، که در آن pij فراوانی الگوی j برای نشانگر i است که برای n الگو جمع زده می‌شود. همچنین ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه و آزمون مانتل (Mantel, 1967) برای ارزیابی همبستگی بین ماتریسهای تشابه و دندروگرام نهایی، بر پایه ضریب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده انجام شد. درنهایت دندروگرام به دست آمده از گروه-بندی نمونه ها، بر اساس روش دایس و روش اتصال میانگین[3] (UPGMA) تهیه شد.

نتایج و بحث

پانزده آغازگر ISSR به کار رفته توانستند در همه ۲۳ رقم گلابی مطالعه شده، به جز موتانت‌ها، تکثیر قابل تشخیصی داشته باشند. در کل ۲۵۷ باند مشاهده شد که ۸۱/٦ درصد آن‌ها، یعنی ۲۱۳ باند، چند شکلی نشان دادند. درجه چند شکلی به دست آمده بالاتر از درصد چند شکلی حاصل از RAPD (۷٤٪) و AFLP (۷۵٪) در مطالعه ۲۵ رقم گلابی بود (Monta–Corvo *et al.*, 2000). چنین به نظر می‌رسد نشانگر ISSR چندشکلی بالاتری از این دو نشانگر ایجاد می‌کند. به علاوه، چندشکلی حاصل طبیعت خود ناسازگار گلابی را نیز اثبات می‌نماید.

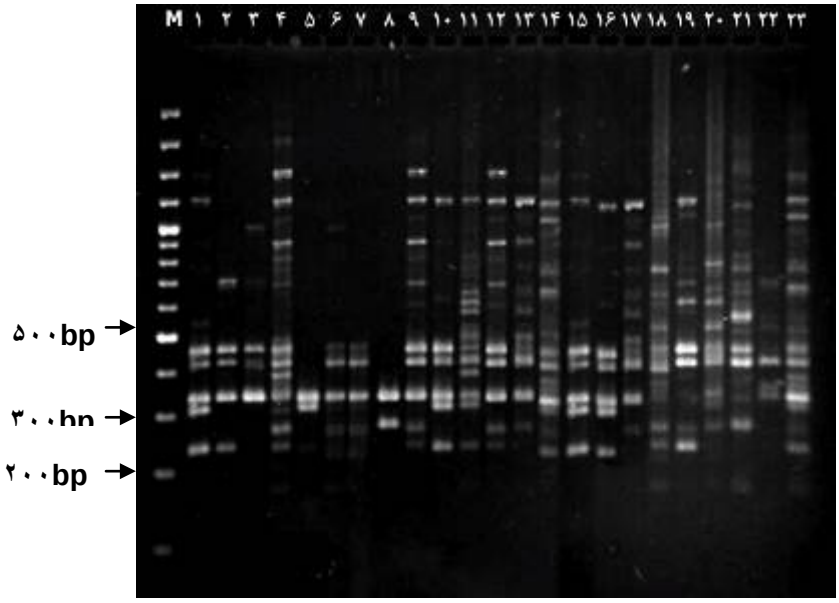
نتایج به دست آمده از هر آغازگر در جدول ۳ خلاصه شده است. تعداد باندهای چند شکلی از ۵ باند در نشانگر (GATA)5 تا ۲۱ باند چندشکل در نشانگرهای (AC)8YA و HBH(CT)7 متغیر بود. به این ترتیب متوسط آلل‌های تولیدشده برای هر آغازگر ۱٤/۲ باند چندشکل بود. محدوده قطعات تکثیر شده از ۲۰۰ تا ۱٤۰۰ جفت باز بود. الگوی تکثیر دو آغازگر (GA)8YC و (CA)8GT به عنوان مثال در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

[1] Ethidium bromide
[2] Polymorphic Information Content (PIC)
[3] Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

جدول ۳- لیست آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق.

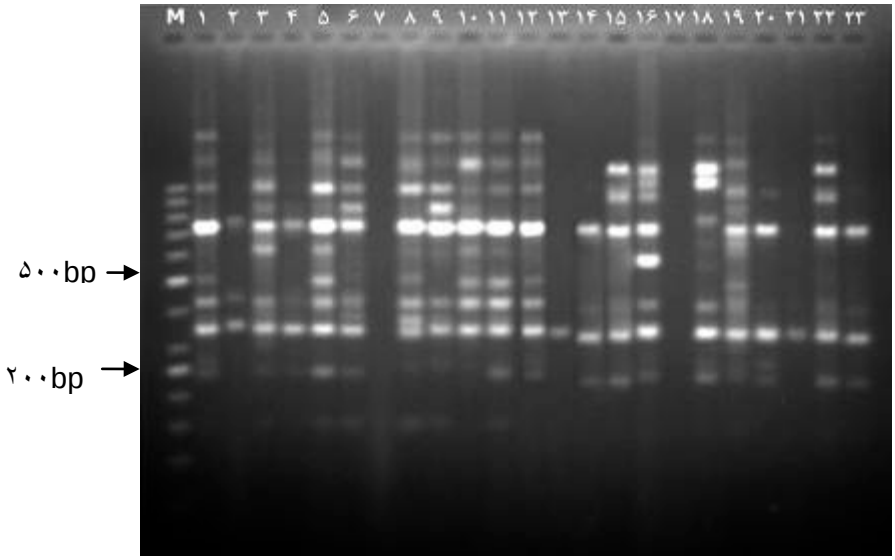
Table 3- The name of ISSR primers used in study.

محتوای اطلاعات چند شکلی PIC	درصد باندهای پلی مورف Percent of polymorphism band	تعداد باندهای چندشکل Numberof polymorphism band	تعداد باندهای مشاهده شده Number of bands	آغازگر primer	ردیف Row
0.22	88.88	8	9	(AGTG)4	1
0.18	71.45	5	7	(GATA)5	2
0.37	80	8	10	(TCT)6	3
0.39	75	15	20	(AC)8YG	4
0.30	91.66	11	12	(GA)8YC	5
0.30	93.78	15	16	(CA)8GT	6
0.26	85.71	18	21	(AC)8YT	7
0.45	84	21	25	(AC)8YA	8
0.28	86.66	13	15	(GT)8YC	9
0.29	77.77	14	18	(GT)8C	10
0.28	66.66	10	15	(TC)8RG	11
0.39	85.71	18	21	BDB(CAC)5	12
0.38	94.44	17	18	HVH(TGT)5	13
0.39	67.82	19	22	VBV(AC)7	14
0.43	75	21	28	HBH(CT)7	15
	81.6	14.2	17.13	mean	
		213	257	total	



شکل ۱- الگوی باندی ISSR حاصل از تکثیرآغازگر (CA)8GT روی ارقام مختلف گلابی (ژل آگاروز دو درصد، رنگ آمیزی اتیدیوم برماید).

Figure 1- ISSR band- pattern of pear genotypes analyzed with the (CA)8GT marker (Ethidium bromide-stained 2% agarose gel).



شکل ۲- الگوی باندی ISSR حاصل از تکثیر آغازگر (GA)8YC روی ارقام مختلف گلابی (ژل آگارز ۲ درصد، رنگ آمیزی اتیدیوم برماید).

M: نشانگر اندازه جفت بازی۱۰۰، ۱-کنفرنس، ۲-دوشس، ۳-لوئیس بن، ٤-SK10، ٥-آبت فتال، ٦-بارتلت، ۷-ردبارتلت، ۸-پاس‌کراسان، ۹-دوین دوکومیس، ۱۰-آنجو، ۱۱-SK13 ، ۱۲-هراسویت، ۱۳- فلسطینی، ١٤-سردرودی، ١٥-محمدعلی، ١٦-دره‌گزی، ۱۷-سبری، ۱۸-دم کج، ۱۹-خوج مرداب انزلی، ۲۰-خوج لب ترش، ۲۱-شاه میوه، ۲۲-خوج کته‌سر، ۲۳-کولی‌خوج.

Figure 1- ISSR band- pattern of pear genotypes analyzed with the (GA)8YC marker (Ethidium bromide-stained 2% agarose gel).

M: 100 bp DNA Ladder. 1—Conference, 2- Duchesse, 3- Lies Bonne, 4- SK10-4, 5- Abate Fetel, 6- Bartlett,7- Red Bartlett, 8- Pass Crassane, 9- Doyenneducomice, 10- Anjou, 11- SK13, 12- Harrow Sweet, 13- Palestine, 14- Sardrood, 15- Mohammad Ali, 16- Daregazi, 17- Sebri, 18- Dom Kaj, 19- Khuj mordab anzali, 20- Khuj labtorsh, 21- Shah miveh, 22- Khuj katesar, 23- KoliKhuj.

مطالعات نشان می‌دهد آغازگر های ISSR دارای تکرار های CA، AC، TC، CT، GA، AG چند شکلی بالاتری از سایر تکرار های دی، تری و ترانوکلئوتیدی نشان می‌دهند (Reddy *et al.*, 2002). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز با این فرضیه مطابقت داشت. به طوری که آغازگرهای (AC)8YA و HBH(CT)7 با تولید ۲۱ باند چندشکل بیشترین چندشکلی را نشان دادند. همان طور که انتظار می‌رفت، آغازگرهای فاقد باز اضافی تری و تترا نوکلئوتیدی (TCT)6، (GATA)5 و (AGTG)4 کمترین میزان باندهای چند شکل (متوسط هفت) را تولید نمودند. زیرا این تکرار ها در طول ژنوم به نسبت تکرار های دی نوکلئوتیدی کمتر دیده می‌شوند و استفاده از آنها در نشانگرهای ISSR کم اهمیت تر از دی نوکلئوتید ها است (Katti et al., 2001). در مطالعه دیگری که روی ٢٤ رقم گلابی با استفاده از نشانگر ISSR انجام شده بود، ثابت شد که آغازگرهای حاوی تکرارهای دی نوکلئوتیدی از آغازگرهای حاوی تکرارهای تری، تترا و پنتانوکلئوتیدی بازده بیشتری دارند و استفاده از آنها بیشتر توصیه شده است (Monte-corvo *et al.*, 2001). مطالعه ای هم که روی برنج (*Oryza sative*) انجام گرفت همین

نتایج را اثبات نمود (Monte-corvo *et al* ., 2001). در نتایج حاصل از تحقیق حاضر معمولاً بیشترین تعداد باندهای مشاهده شده به آغازگرهایی که حاوی تکرار دی نوکلئوتیدی AC هستند مربوط می‌شود. بر این اساس، به نظر می‌رسد که تکرار دی نوکلئوتیدی AC در ژنوم گلابی بیشتر وجود دارد. از این نتایج می توان در طراحی آغازگرهای ریزماهواره برای گلابی استفاده نمود. در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی گندم نانوایی و سیب زمینی هم نشان داده شد آغازگرهای حاوی تکرارAC در مقایسه با سایر آغازگرهای ISSR، بازده بیشتری دارند (Reddy *et al*., 2002). بررسی ژنوم گندم ماکارونی با نشانگر ISSR هم حضور بالای تکرارهای AC را تأیید می‌کند (Reddy *et al*., 2002).

در میان آغازگرهای دارای باز اضافی در جهت '۵، آغازگرهای BDB(CAC)5 و HVH(TGT)5 باندهایی با وزن مولکولی بالا (بالاتر از ۱۰۰۰ جفت باز) تکثیر کردند که امتیازدهی آنها مشکل بود. قبلاً هم در مطالعه ژنوم جو، فشردگی باندها در قسمت بالای ژل آغازگرهای دارای باز اضافی در جهت '۵ گزارش داده شده بود (Monte-corvo *et al*., 2002). در تحقیقی که برای تعیین تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گلابی با استفاده از آغازگرهای ISSR صورت گرفت، حضور باندهایی با طول بالای ۸۰۰ جفت باز در مورد آغازگرهای HVH(TG)7، DBD(AC)7، DBD(AC)7 و HVH(CA)7 مشاهده شد (Reddy *et al*., 2002). از آنجایی که نواحی تکثیر شده توسط آغازگرهای لنگرشده در جهت '۵ شامل مناطق بین ریزماهواره ها و توالی‌های ریزماهواره‌ای هستند، ایجاد محصولات با طول بزرگ تر از محصولات سایر آغازگرها که شامل مناطق بین ریزماهواره‌ای هستند، منطقی به نظر می‌رسد(Reddy *et al*., 2002).

ضریب تشابه از صفر تا یک متغیر است. زمانی که نشانگرها برای دو رقم کاملاً یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت باشند. دامنه ضریب تشابه به دست آمده از نشانگرهای ISSR در این تحقیق از ۰/۰۵ بین ارقام دره گزی و SK13 تا یک بین دو رقم ردبارتلت و بارتلت متغیر بود.

برای انتخاب مناسب ترین الگوریتم جهت دسته‌بندی ارقام از ضریب همبستگی کوفنتیک (r=۰/۸۲٤) استفاده شد. بهترین روش انتخاب شده روش UPGMA بود و دندروگرام بر اساس این روش ترسیم گردید (شکل ۳). براساس دندروگرام حاصله در شباهت ژنتیکی ۰/۳٦ نمونه‌های مورد بررسی، به سه دسته و یک ژنوتیپ مستقل تقسیم شد. در گروه اول کنفرنس، محمدعلی، سردرودی، بارتلت، ردبارتلت، هراسویت، پاس‌کراسان، دوین دوکومیس، آنجو، فلسطینی، لوئیس‌بن، دوشس و دره‌گزی، در گروه دوم کولی خوج، خوج لب ترش، خوج کته سر، دم کج، سبری، خوج مرداب انزلی و شاه‌میوه و در گروه سوم SK10 و SK13 قرار گرفتند. ژنوتیپ

آبت فتال به صورت مستقل از بقیه گلابی‌ها قـرار گرفت.

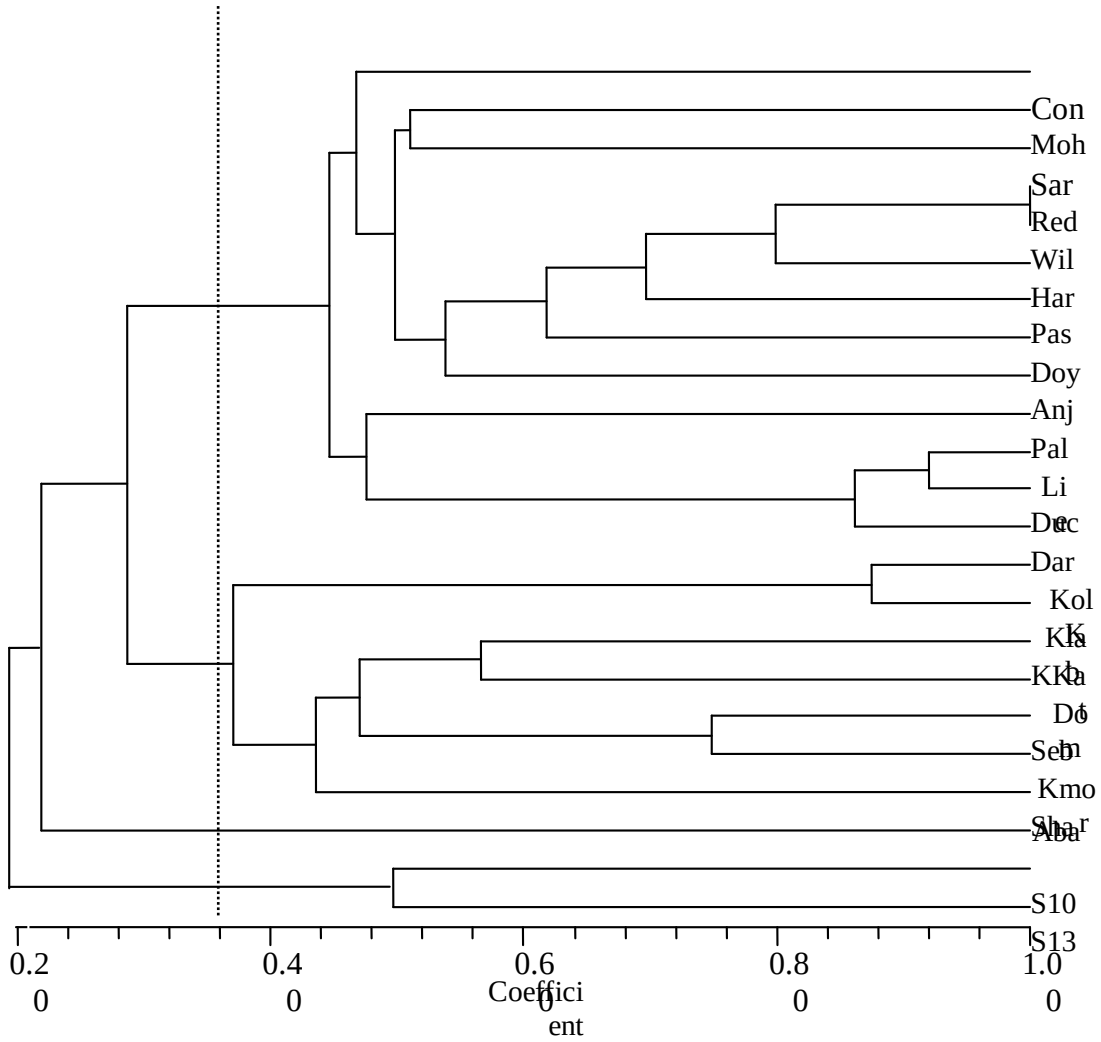
همه ارقام غرب اروپا در دسته اول قرار گرفتند. حضور سه رقم ایرانی محمدعلی، سردرودی و دره‌گزی در این دسته نشان می‌دهد که این سه رقم نزدیکی زیادی با ارقام اروپایی دارند و به احتمال زیاد از اجداد مشترکی اشتقاق پیدا کرده اند. در این دسته بارتلت و ردبارتلت با شباهت کامل (ضریب تشابه یک) از هم تفکیک نشدند. رقم گلابی هراسویت نیز با اجداد خود بارتلت و ردبارتلت در یک زیردسته قرار گرفت. ژنوتیپ گلابی ایرانی دره‌گزی همراه با لوئیس بن و دوشس که ارقامی از فرانسه هستند به یک زیر دسته دیگر تعلق یافتند. ارقام محمدعلی و سردرودی نیز در مقایسه با دره‌گزی شباهت بیشتری به هم نشان دادند که به تأیید این فرضیه کمک می‌کند که آنها جد مشترکی دارند.

در دسته دوم ژنوتیپ‌های کولی خوج و خوج لب ترش از سایر ارقام ایرانی جدا شدند که شاید دلیلی بر زمینه ژنتیکی متنوع تر این دو رقم باشد. سایر خوج ها و ارقام تجارتی سبری، شاه‌میوه و دم کج فاصله ژنتیکی کمتری از هم داشتند. سبری که به نظر عده‌ای جزو ارقام گلابی‌های آسیایی است (Sabeti, 2002; Maniee, 1995)، در دسته خوج ها قرار گرفته بود و به احتمال قوی متعلق به گونه *P. communis* است.

دسته سوم شامل دو رقم ژاپنی SK10 و SK13 از گونه *P. pyrifolia* بود. این دو رقم کاملاً از سایر ارقام که همگی متعلق به گونه *P. communis* هستند جدا شده اند. اگر رقم سبری متعلق به گلابی های ژاپنی بود، انتظار می‌رفت در این دسته قرار گیرد در حالی که چنین اتفاقی نیفتاد.

در دندروگرام حاصل، رقم آبت فتال از سایر ارقام فرانسوی جدا شد و به صورت یک شاخه تنها قرار گرفت. قرارگیری دور از انتظار آبت فتال شاید به ماهیت نشانگرهای ISSR مربوط باشد لذا این نتیجه دور از انتظار باید مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

ارقام شاه‌میوه، دم کج و سبری با ارقام وحشی خوج (خوج لب ترش، کولی خوج، خوج مرداب انزلی و خوج کته سر) در یک دسته قرار گرفتند که نشان داد احتمالاً این سه رقم تجارتی از ژنوتیپ‌های خوج‌ها، که در مناطق شمالی کشور پراکنده‌اند، مشتق شده‌اند و بعداً به قسمت مرکزی ایران وارد شده‌اند. سه رقم محمدعلی، سردرودی و دره‌گزی نزدیکی زیادی با ارقام اروپایی نشان دادند و در گروهی متفاوت از ارقام ایرانی قرار گرفتند. این یافته به تأیید این فرضیه کمک می‌کند که ارقام مزبور به احتمال زیاد با ارقام اروپایی اجداد مشترکی دارند. به علاوه ارقام محمدعلی و سردرودی نزدیکی قابل توجهی نشان دادند. با توجه به این که منشأ رقم سردرودی آذربایجان است، می‌توان احتمال داد رقم محمدعلی و سردرودی هر دو جزو ارقامی باشند که از ناحیه قفقاز وارد ایران شده اند.



شکل ۳- دندروگرام ژنوتیپ های گلابی مورد بررسی بر اساس الگو های باندی ISSR، با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA. کد نمونه‌ها بر اساس جدول ۲-۱ انتخاب شده است

Figure 3- Phenogram for the 23 genotypes of pear evaluated in this study, using the UPGMA method and Dice Similarity Matrix between varieties. samples Code selected according to Table 1-2.

منابع

Arnaud G, Lallemand J, Bourgoin M (2000). ISSR versus AFLP for variety identification. Plant and Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA. PP. 552.

Atar A (2001). Specification of Europe and U.S. commercial cultivars of apple and pear. Publication of Agricultural Education 70P

Bassil NV, Neou C and Postman J (2005). EST-SSR utility in managing the pear collection at the national germplasm repository. Plant and Animal genome XIII conference, San Diego, CA. pp. 134.

Bassil NV, Postman JD, Neou C (2004). *Pyrus* microsatellite markers from gene bank sequences. Acta Horticulturae 671: 42.

Bell RL (1990). Pears (*pyrus*) *Genetic resources of temperate fruit and nut crops In*: J. N. Moore and J. R. Ballington (Eds), *I.* International society for horticultural science, wageningen, the Netherland 665-697.

Bell RL, Hough LF (1986). Interspecific hybridization of *pyrus.*, Horticultural science 21: 62-64.

Bornat B, Branchard M (2001). Nonanchored inters simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.

Chenneaui-Kourda H, Marghali S, Marrakchi M, Trif-Farah N (2007). Genetic diversity of *sulla* genus (Hedysarea) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Biochemical Systematic and Ecology 35:682-688.

Dolatowski J, Nowosielski J, Podyma W, Szymanska M , Zych M (2004). Molecular studies on the variability of polish semi-wild pears *(Pyrus*) using AFLP. Fruit Ornamental Plant Research 12: 22-26.

Fernández-Fernandez F, Harvey NG, James CM (2006). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis*). Molecular Ecology Notes 6(4): 1036-1041.

Ghosh AK, Lukens LN, Lukens DM, Hunter DM , Strommer JN (2006). European and Asian pears: simple sequence repeat–polyacrilamide gel electrophoresis-based analysis of commercially important North American cultivars. Horticultural Science 41: 304-309.

Goulão L, Oliveira CM (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.

Iketani H, Manabe T, Matsuta N, Akihama T, Hayashi T (1998). Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). Genetic Resources and Crop Evolution 45:533-539

Inoue E, Matsuki Y, Anzai H , Evans K (2007). Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus* pyrifolia). Molecular Ecology Notes 7:445-447.

Jianming G, Shougong Z, Liwang Q, Yong Z ,Chunguo W (2006). ISSR and AFLP identification and genetic relationships accessions from the genus *Populus.* Annals of Forest Science 63: 499-506.

JianXin N, Gany MB, Lizhong P, Jian Rong F , Yan LX (2004). Study on the genetic relationships among 18 pears cultivars by RAPD. Journal of Fruit Science 21: 521-525.

Katti MV, Ranjeker RK, Gupta VS (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in Eukaryotic genome sequences. Molecular Biology and Evolution 18: 1161-1167.

Kimura T, Ban Y, Yamamoto T, Shi YZ, Kotobuki K, Matsuta N, Hayash T (1999). The Japanese pear genome program I. Development of SSR markers and identification of pears. Acta Horticulturae 587: 237-242.

Kimura T, Yamamoto T, Mochida K, Lmai T, Matsuta N, Ban Y, Hayashi T(2002). Development and mapping of SSR markers in peach and pear. Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference, San Diego, CA. 191-206.

Maniee A (1995). Pear and Foster and their training. Technical publication of Iran 50p

Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220

Mezzena L, Paris A, Gimene M As, Bonine C, Valle CF(2001). Identification of ISSR (inter simple sequence repeat) codominant markers in Eucalyptus grandis. Plant and Animal Genome IX Conference San Diego, CA. P24.

Monta–Corvo L, Caberita L, Leitao J (2000). Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 47 : 257-265.

Monte-Corro L, Goulão L, Oliveira C (2002). Discrimination of pear cultivars with RAPD, AFLP and ISSR. Acta Horticulturae 596: 187-191.

Monte-corvo L, Goulão L , Oliveira C (2001). ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. Journal of the American Society for Horticultural Science 126(5): 517-522.

Murray GC and Thompson WF(1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Research.* 8: 4321–4325.

Olivera CM, Mota M, Monte-Corvo L, goulão L, Silva DM (1999). Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Scientia Horticulturae Amsterdam 79: 163-174.

Pan Z, Kawabata S, Sugiyama N, Sakiyama R, Cao Y (2002). Genetic diversity of cultivated resources of pear in north china. Acta Horticulturae 587: 187-194.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9-17.

Roldan-Ruize I, Calsyn E, Gilliand TJ, Coll R, Vaneijk MJT, De Loose M (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. Molecular Breeding 6:593-602

Sabeti H (2002). Forests, trees, and shrubs of Iran. Puplication of Tehran Research Center and Natural Resources.

Sharifani, MM, Jackson JF (2000). Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers. Acta Horiculturae 538: 499-504.

Singh, AK, Behera TK, Chandel D, Sharma P, Singh NK (2007). Assessing genetic relationships among bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of Horticultural and Science and Biotechnology 82: 217-222.

Vejdani M (1997). Importance of safeguarding procedures in the natural growth and its rolls in Preservation and Operation of Reserve plant inheritance. Proceeding of the 4th Iranian Congress of Crop Science, Esfahan pp 554-573.

Wang JY, Shih JC (2004) Molecular for fingerprinting cultivar of oriental pear (*Pyrus pyrifolia* Scientia Horticulturae Amsterdam 107: 441-421.

Wünsch A, Hormaza JI (2007). Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. Scientia Horticulturae Amsterdam 113: 37-43.

Wünsch A, Hormaza JI (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica 125: 59-67.

Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Ban Y, Aayashi T, Matsuta N (2001). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theoretical and Applied Genetics 102: 865-870.

Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Mastuta N (2002). Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica*, 124: 129-137.

Ye G N, Hemmat M, Lodhi MA, Weeden NF and Reisch BI (1996). Long primers for RAPD mapping and fingerprinting of grape and pear. Bio Techniques 20: 368-371.

Determination of genetic diversity in pear genotypes using ISSR markers

Safarpoor Shorbakhlo M.[1], Hosseini Monfared R.[2], Paydar S.[1], Sharifi M.[*1]

[1] Fars Agricultural and Natural Resources Research Center
[2] Graduated students Islamic Azad University, Arsenjan Branch

Abstract

Iran is known as one of the most important pear genetic resources because of being near to the pear diversity centers and having more than 10 species of genus *Pyrus*. On the other hand, Iran with acreage of 17,000 hectares, is one of the pear production centers .Despite its unique geographical location, there is no sufficient genetic information among pear germplasm in Iran and it is not clear what genetic relationship is between Iranian local genotypes and imported genotypes. In this study, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers was used for clustering of 10 Iranian Pear genotypes and positioning of their genetic variation among 13 imported genotypes. Fifteen ISSR primers were screened that yielded a total of 257 amplified products, of which 213 bands (81.6%) were polymorphic. Dendrogram of pear cultivars with ISSR banding patterns was drawn with NTSYS V. Pc-2.02e software using Dice coefficient and UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average), method .The 23 genotypes of pear were clustered in to three groups. The first group includes Conference, Mohammad Ali, Sardroudi, Bartlett, Red Bartlett, Harrow Sweet, Pass Crassane, Doyenneducomice, Anjou, Palestine,Lies Bonne, Duchesse and Daregazi. Kolikhaj, Sebri, Khuj labtorsh, Dom kaj, Khuj Katesar, Khuj Mordab Anzali and Shah Miveh belong to the second group. The third group includes SK10 and SK13. Cultivars were classified according to the geographical origin and the figures belonging to *P. communis* and *P. pyrifolia*, were completely separated. Iranian commercial cultivars including: Dom kaj, Shah miveh, Sebri with different Khuj accessions were placed in a group, that seems that thay have originated from different Khuj. While the three cultivars: Mohammad Ali, Sard roudi and Daregazi revealed closer to the European figures and possibility they have different origin than different Khuj And have a common ancestor with European figures. The results of this study indicate that ISSR markers have higher level of discrimination in evaluating genetic diversity and fingerprinting of pear genotypes.

Keywords: *Genetic diversity, ISSR markers, Pear.*

[*] Corresponding Author: Sharifi M. Tel: 07124222425 Email: sharifi_m2002@yahoo.com