مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گل رز (*Rosa hybrid*) با استفاده از نشانگرهای CDDP و RAPD

یزدان اقبال نژاد[1]، عباس سعیدی*[1]، ابراهیم بیرامی زاده[2]

[1]گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی،تهران، ایران.

[2]هیئت علمی موسسه ملی گیاهان زینتی (NIOP)، تحقیقات باغبانی علوم، تحقیقات کشاورزی، آموزش و توسعه، محلات، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم) در پیش‌برد اهداف به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان دارای نقش اساسی می‌باشد. از این‌رو، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ رز با استفاده از ٦ نشانگر CDDP و ۲۰ نشانگر RAPD صورت گرفت. برای تعیین تشابه بین ژنوتیپ‌های رز از ضریب تشابه جاکارد استفاده گردید و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش اتصال همسایگی (NJ) انجام شد. دامنه ضریب تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۰/۰٤ تا ۰/۷۷ برای نشانگر CDDP و برای نشانگر RAPD بین ۰/۰۵ تا ۰/۷۹ به‌دست‌آمد. درصد چندشکلی نشانگرهای CDDP و نشانگر RAPD، ۱۰۰ درصد برآورد گردید. تجزیه خوشه‌ای نشانگرهایCDDP و RAPD ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم‌بندی کرد. مطالعه حاضر نشان داد نشانگر CDDP به خوبی ژنوتیپ‌های رز را از هم تفکیک نمودند و این اولین گزارش آنالیز تنوع ژنتیکی رز با استفاده از نشانگر مولکولی که براساس ناحیه DNA هدف‌گذاری‌شده (CDDP) در مقایسه با نشانگر RAPD، است. نشانگر CDDP به‌عنوان سیستم مولکولی جدید برای ارزیابی ژرم‌پلاسم رز معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: *تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD، نشانگر CDDP، تجزیه خوشه‌ای، رز*

*نویسنده مسئول: عباس سعیدی تلفن: ۰۹۱۲۱۰۵٦۵۹۹ Email: abbas.saidi@gmail.com

مقدمه

گل رز که متعلق به خانواده گل سرخیان و زیر خانواده *Rosoideae* می‌باشد، دارای بیش از ۲۰۰ گونه و ۱۸۰۰۰ رقم بوده و یکی از معروف-ترین گیاهان زینتی است (Gudin, 2000). اگر چه حدود ۲۰۰ گونه مختلف رز وجود دارد اما تنها ۱۱ گونه از آنها در تولید ارقام مهم امروزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Rout, 1999). تعداد کروموزوم‌های پایه در جنس رز هفت عدد (n=۷) می‌باشد و در بین آنها از گونه‌های x = ١٤ ۲n =۲ تا n=۸x=٥٦ ۲ دیده می‌شود. (Rout, 1999). بیشتر گونه‌های رز دیپلویید هستند در حالیکه بیشتر ارقام تولید شده جدید تتراپلویید می‌باشند. هیبرید بین آنها امکان تولید تریپلوییدهایی با باروری بسیار پایین را ایجاد می-کند. این مساله می‌تواند بوسیله تولید آلوتتراپلوییدها از دیپلوییدها و یا تولید هگزاپلوییدهای بارور بوسیله دوبل کردن کروموزوم‌های گیاهان تریپلویید عقیم حل شود (Zielinski *et al*., 2004). گل رز از دیرباز یک گیاه ارزشمند در زمینه‌ی دارویی، غذایی و مورد توجه ایرانیان بوده‌است (Ozkan *et al*., 2004). اصلاح گل رز از ابتدای شروع کشت آن یعنی در حدود ٤۰۰ سال پیش از میلاد توسط کشاورزان و با استفاده از روش قلمه‌زدن و گسترش پایه‌های بهتر و پر محصول‌تر صورت می‌گرفته‌است (Streeper, 1990). اطلاع از روابط ژنتیکی گونه-های مختلف برای بهره‌وری موفق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود ضروریست. ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهی شانس بروز ژن‌های مفید را بالا می برد که از اولین پیش نیازهای ضروری برای برنامه ریزی در جهت حفاظت و اهلی‌کردن و بهره-برداری پایدار از آنها است (Tilman, 1996 & Wedin) با پیشرفت علم، کشاورزان با استفاده از تلاقی‌های هدفمند اقدام به ایجاد پایه‌های جدید و پرمحصول کردند و انتخاب پایه‌ها بر مبنای خصوصیات ظاهری گیاه انجام گرفت (Zhang & Gandelin, 2003). حفظ و نگهداری ذخایر توارثی آن بررسی تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های رز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Teyssier *et al*., 1996). بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان با استفاده از صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی همواره معمول بوده است (Chtourou-Ghorbel *et al*., 2002). اگر چه نشانگرهای مورفولوژیکی به طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند با توجه به محدودیت‌های این صفات از جمله تعداد اندک این صفات و نیز تاثیر سن و محیط بر روی صفات مذکور، به موجب آن توجه محققین این علوم به انواع نشانگرهای ژنتیکی معطوف شده است (Gharehyazi, 1996). در دهه‌های اخیر با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختلاف ژنتیکی پایه‌های والد با دقت بیشتری برآورد می‌شود و این امر موجب تسریع و دقت بالاتر در روند اصلاح گل رز شده‌است (Rout *et al*., 2003). جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های

گیاهی نشانگرهای مولکولی از جمله Li RAPD[1] (*et al*., 2006)، AFLP[2] و SSR[3] (Baydar *et al*., 2004) برای ارزیابی تنوع زیستی گونه‌های مختلف رز در مناطق مختلف بکار برده شده‌اند. نشانگرهای مولکولی RAPD از جمله نشانگرهای مبتنی بر DNA است که به طور وسیع در برنامه های تعیین تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در گونه‌های گیاهی بکار می‌روند. در ابتدا نشانگر RAPD بطور وسیع جهت نقشه‌یابی ژنی و شناسایی مکان‌های ژنی صفات کیفی بکار گرفته می‌شد و سپس بطور گسترده جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی بکار رفته‌است (Prasad *et al*., 2006). بررسی تنوع ژنتیکی رازیانه با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد و مشاهده شد که این نشانگر به خوبی پلی‌مورفیسم بین اکوتیپ‌ها را نشان می‌دهد (Taheri *et al*., 2016) ارزیابی تنوع ژنتیکی به کمک ۲۵ آغازگر RAPD در بین ۳۰ ژنوتیپ گل رز انجام شد و میزان ۱۰۰ درصد چند شکلی برآورد گردید و آنالیز نتایج نشان داد که این نشانگر در شناسایی نواحی چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم این گونه می‌تواند مفید باشد (Azeem, *et al*., 2012).

نشانگرهای RAPD از متداولترین نشانگرها در روش‌های آنالیز تنوع ژنتیکی به دلیل سادگی روش، هزینه کم و نیاز به تجهیزات بسیار ساده در گیاهان می‌باشند (Upadhya *et al*., 2004). پاسخ‌های آن اغلب تکرارناپذیر است (Masuzaki *et al*., 2007) و لازم است از تکنیک‌های نشانگرهای مولکولی مدرن استفاده شود که متکی به اطلاعات توالی ژنوم بوده و همچنین تکنیک‌های نشانگری مبتنی بر نواحی محافظت‌شده ژن استفاده گردد که از جمله این نشانگرها می‌توان به نشانگر CDDP اشاره نمود. نشانگر CDDP در مقایسه با RAPD پرایمرهایی با طول بیشتر و با دمای اتصال بالاتر ۵۰ تا ۷۰ درجه بوده که در نهایت باعث بهبود قابلیت تکثیر می‌شود. علاوه بر این، روش مذکور بر روی مناطق ژنی متمرکز است و اطلاعات کاملی از ژنوم در مقایسه با RAPD که نشانگری تصادفی است این نشانگربه ما می‌دهد (Hajibarat *et al*., 2015). با توجه به رشد فوق العاده پایگاه داده‌های عمومی زیستی و توسعه نشانگرهای حفاظت‌شده DNA (Andersen & Lubberstedt, 2003) و آغاز روند عبور از نشانگرهای مولکولی تصادفی به سمت نشانگرهای اختصاصی متصل شونده به ژنهای خاص است. به موجب این امر سیستم‌های نشانگری جدیدی مانند چندشکلی DNA حفاظت‌شده (Collard & Mackill, 2009) (CDDP[4]) مورد توجه بیشتری قرار گرفت. مناطق حفاظت شده DNA اغلب در گونه‌های مختلف گیاهی حفظ شده‌اند (Andersen & Lubberstedt, 2003). این روش بر روی بستر آگارز اعمال‌شده و روشی ساده و نسبتاً ارزان

[1] Random Amplification of Polymorphic DNA
[2] Amplified Fragment Length Polymorphism
[3] Simple Sequence Repeat
[4] conserved DNA-Derived Polymorphism

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

است و می‌تواند معایب نشانگر RAPD را پوشش دهد. اساساً روش‌های CDDP و RAPD مشابه روش ISSR هستند زیرا در هر دو مورد از یک پرایمر واحد به عنوان پرایمرهای پیشرو و پسرو استفاده می‌شود (Collard & Mackill, 2009; Gorji *et al*., 2011). به دلیل سهولت کار (ساده و نسبتا ارزان) و نیز تکرارپذیری بالای نشانگرCDDP نسبت به RAPD استفاده از این نشانگر به عنوان سیستم نشانگری جدید و همچنین مکمل سایر نشانگرها در تهیه نقشه‌یابی QTL و تجزیه تفرق بالک را می‌توان پیشنهاد نمود (Wang *et al.*, 2009). استفاده نشانگرهای CDDP در مطالعه حاضر برای اولین بار بر روی ژنوتیپ‌های رز گزارش شد. هدف از این مطالعه تعیین پتانسیل ایجاد چندشکلی توسط نشانگرهای مولکولی در رز و همچنین تعیین تنوع ژنتیکی میان این ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در پژوهش حاضر شامل ۲۰ ژنوتیپ رز بوده که از پژوهشکده گل و گیاه زینتی محلات تهیه شد و مورد بررسی تنوع ژنتیکی قرار گرفتند. این تحقیق در دانشگاه شهید بهشتی و دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین صورت گرفت (جدول۱).

فرآیند استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه روییده و جوان رز به کمک روش CTAB تغییریافته انجام شد (Saghai-Maroof *et al*., 1984). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از اسپکتوفتومتر (ND1000) در طول جذب ۲٦۰ نانومتر تعیین شد. پس از تعیین غلظت نمونه های DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ٦ نشانگرCDDP و ۲۰ نشانگر RAPD صورت گرفت. مشخصات نشانگرها در (جدول۲) آورده‌شده‌است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده در حجم ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ U ،۰/۹ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر با غلظت X ۱۰ ،۰/۲ میکرولیتر تک پلیمراز با غلظت 5 U و ۵/۸ میکرولیتر آب دو بار استریل بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف) که برای ۳۵ سیکل برنامه‌ریزی شده بود به شرح زیر صورت گرفت:۳ دقیقه در ۹۲°C جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ سیکل هرکدام شامل۱ دقیقه در ۹۲°C، ۱/۵ دقیقه در°C ٤۸ و ۲ دقیقه در C °۷۲ جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم در میکرولیتر و عکس‌برداری ژل با استفاده از دستگاه ژل داک (Axygen) صورت گرفت.

جدول ۱ – اسامی ژنوتیپ‌های استفاده شده در تحقیق حاضر.

Table 1- Names of rose genotypes used in present study.

ردیف No.	نام ژنوتیپ Name Genotype	ردیف No.	نام ژنوتیپ Name genotype
1	وندنتا (Vandenta)	11	رز معطر(Musk rose)
2	رز Cool water (Cool water)	12	رز دورگه حاصل از صورتی و بنفش (PV6)
3	رز مویاسی (Rosa moyesii)	13	(Mol) Mo1
4	رز سیاه مینیاتوری (Meinyature)	14	رز ابلق خارجی(Rose sp. Ablgh)
5	ساناز مینیاتوری قرمز (S. meinyature (red	15	رز مشکی(Black)
6	رز مینیاتوری ابلق (Ablagh (meinyature	16	رز دورگه صورتی و نارنجی(PO1)
7	رز وندنتای (R.vandenta)	17	رز دورگه صورتی و زرد (PY3)
8	رز مینیاتوری قرمز(Red meiyature)	18	رز هفت رنگ(Rosa sp. Color)
9	ماراسیا (Marociya)	19	رز صورتی وندنتا (P.R. vandenta)
10	ماروسیا قرمز (R.marociya)	20	رز دورگه صورتی و زرد(PY52)

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی براساس وجود و یا عدم وجود نوار به ترتیب با اعداد ۰ و ۱ برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. برای بدست آوردن ماتریس فاصله ژنتیکی از نرم افزار(NTSYS pc (Ver 2.02 استفاده شد. آزمون مانتل برای مقایسه ماتریس‌های عدم تشابه با دندروگرام‌های بدست‌آمده توسط نشانگرهای CDDP و RAPD توسط نرم‌افزار NTSYS محاسبه گردید. به منظور گروه‌بندی و تفسیر روابط ژنتیکی از روش تجزیه خوشه‌ای اتصال همسایگی با استفاده از نرم‌افزار Splitstree Ver (4.13.1) انجام شد. اندازه‌گیری پارامترهای ژنتیکی (محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر) برای هر دو نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Power Marker نیز محاسبه شد. مقادیر PIC[1] برای هر جفت آغازگر بر پایه رابطه PIC=∑ [2Pi (1-Pi)] (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000) محاسبه گردید. به طوری که Pi برابر با فراوانی آلل تکثیرشده و (1-Pi) فراوانی آلل غایب در نظر گرفته‌شد. شاخص نشانگر[2](MI) براساس تعداد باندهای چندشکل در هر واحد سنجش و با

[1] Polymorphism Information Content
[2] Marker Index

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

استفاده از معادله MI=DI×EMR محاسبه گردید. در این رابطه DI شاخص تنوع (Diversity Index) و EMR ضریب موثر چندگانه (Effective Multiplex Ratio) هستند که DI=1- $\sum p_i^2$ و EMR= npβi است.Pi فراوانی آلل iام، np تعداد مکان‌های چندشکل و βi نسبتی از مکان های چندشکل و به صورت $\beta=n_{np}/(np+\beta)$ محاسبه گردید که n_{np} تعداد مکان‌های تک‌شکل است (Roldan-Ruiz *et al.*,2000).صحت دندروگرام حاصل توسط بوت استرپ با ۱۰۰ تکرار بررسی شد که این کار برای تعیین میزان دقت برآوردگرهای حاصل از داده نمونه صورت می‌گیرد (Efron & Tibshirani, 1993).

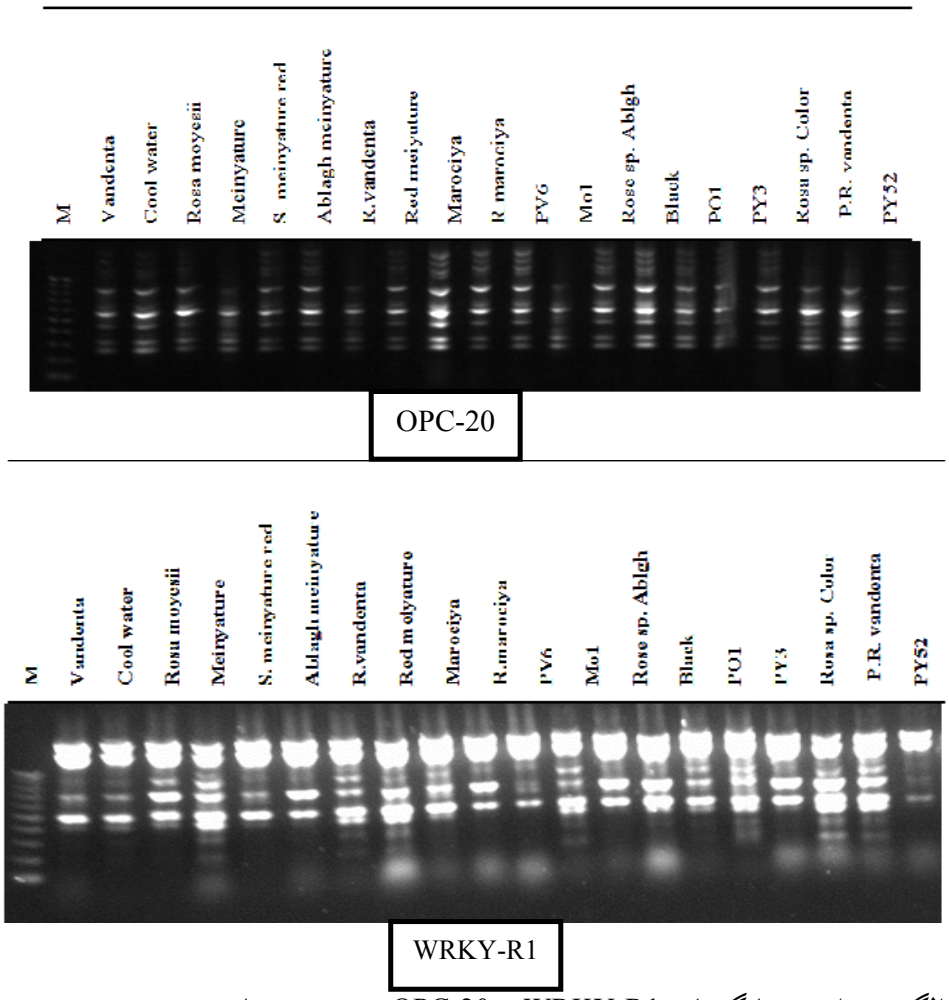
جدول۲- آغازگرهایRAPD، CDDP و توالی آن‌ها.

Table2-RAPD and CDDP markers and their sequences.

نوع Type	نام آغازگر Marker Name	توالی ′ ۳ – ′۵ Sequence (5′to 3′)	دمای اتصال (°C) Annealing temperature
RAPD	OPAA-04	AGGACTGCTC	40
	OPC-20	ACTTCGCCAC	40
	OPL-08	AGCAGGTGGA	40
	OPAG13	GGCTTGGCGA	40
	OPAD-06	AAGTGCACGG	40
CDDP	KNOX-1	AAGGGSAAGCTSCCSAAG	48
	KNOX-2	CACTGGTGGGAGCTSCAC	48
	KNOX-3	AAGCGSCACTGGAAGCC	48
	WRKY-1R	GTGGTTGTGCTTGCC	48
	WRKY-2R	GCCCTCGTASGTSGT	48
	WRKY-3R	GCASGTGTGCTCGCC	48

نتایج و بحث

میزان محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای CDDP و RAPD، تعداد نوارهای چندشکل، شاخص نشانگر و درصد چندشکلی (جدول۳) محاسبه شده است. الگوی باندی هر دو نشانگر در شکل ۱ آورده‌شده‌است. از مجموع ۲۰ نشانگر مورد استفاده در تحقیق ۵ نشانگر RAPDپلی مورفیسم نشان دادند. مجموع کل نوارهای بدست آمده از نشانگر RAPD، ۲۸ نوار می‌باشد که اکثر نوارها چند شکل بودند. میزان محتوای چند شکلی نشانگر RAPD از ۰/۳۳ تا ۰/٤۳متغیر بود و میانگین محتوای چندشکلی ۰/۳۹ برآورد گردید. بیشترین و کمترین میزان محتوای چندشکلی نشانگر RAPD مربوط به آغازگر OPC-20 با مقدار ٤۳ درصد و آغازگر OPL-08 با مقدار ۳۳ درصد اختصاص یافت. تعداد آلل‌های مشاهده‌شده نشانگر RAPD در دامنه‌ی بین ۳ تا ۸ باند و درصد چند شکلی این نشانگر۱۰۰ درصد برآورد گردید.



شکل۱- الگوی نواری نشانگرهای WRKY-R1 و OPC-20 در ژنوتیپ‌های رز.

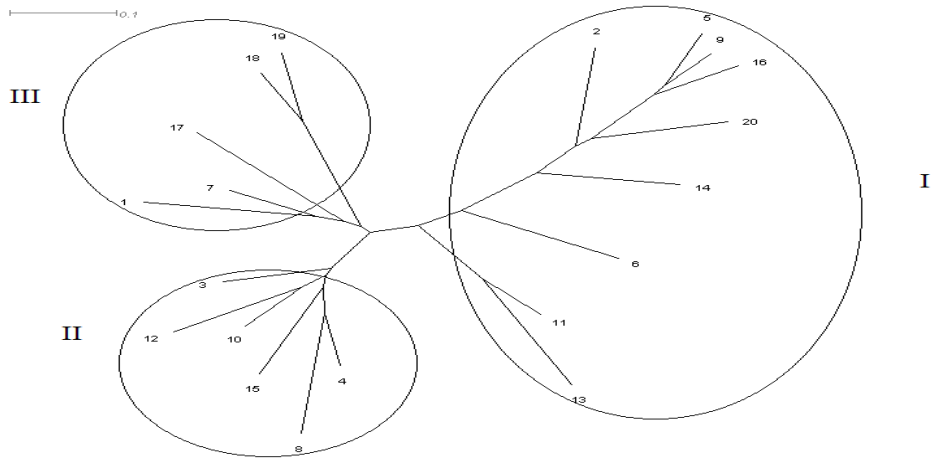
Figure1-Banding pattern of OPC-20 and WRKY-R1 markers in some rose genotypes.

مجموع کل نوارهای بدست‌آمده توسط نشانگرهای CDDP، ۳۲ باند بود که اکثر این نوارها چند شکل بودند. میزان محتوای چندشکلی از ۰/۲۵تا ۰/٤۱ با میانگین ۰/۳٦ محاسبه گردید. بیشترین و کمترین میزان محتوای چند شکلی به ترتیب به نشانگر KNOX2 و WRKY-3R به میزان ۰/۲۵تا۰/٤۱ اختصاص یافت. مقادیر محاسبه شده شاخص نشانگر ، آغازگرهای مورد مطالعه در محدوده‌ی بین ۰/۵تا ۲/۸۲ برآورد گردید. اندازه قطعات تکثیرشده با استفاده از نشانگر RAPD بین ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ بوده‌است و نیز اندازه این قطعات با استفاده از نشانگر CDDP به میزان ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ محاسبه شد.

جدول۳ – نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپ‌های رز با استفاده از نشانگرهای CDDP وRAPD.

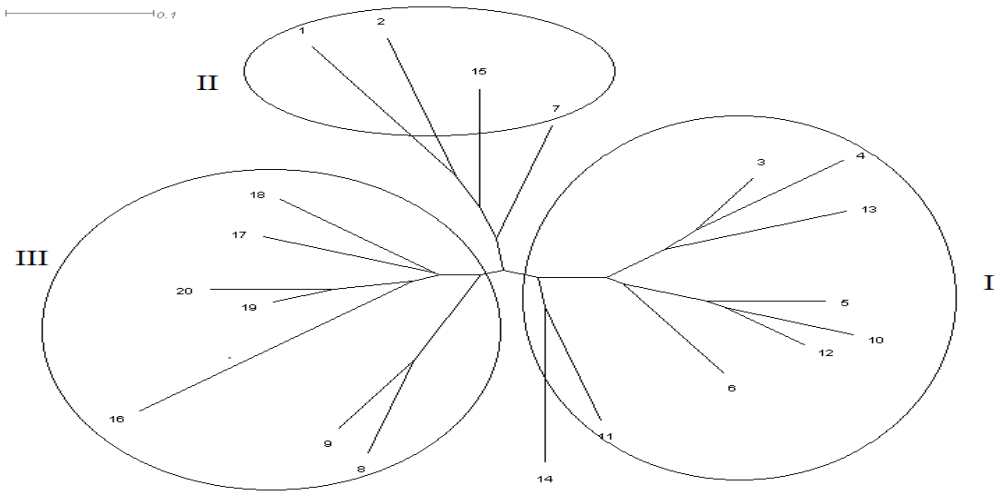
Table 3-Results of the survey genotypes rose using CDDP and RAPD markers.

نوع Type	پرایمر Primer	کل باند Total band	تعداد باند پلی‌مورف No.of polymorphic bands	تعداد باند منومورف No.of monomorphic bands	پلی مورفیسم PIC value	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	شاخص نشانگر MI
CDDP	KNOX-1	4	4	0	0.37	100	1.48
	KNOX-2	2	2	0	0.25	100	0.5
	KNOX-3	6	6	0	0.39	100	2.32
	WRKY-1R	7	7	0	0.40	100	2.82
	WRKY-2R	7	7	0	0.37	100	2.78
	WRKY-3R	6	6	0	0.41	100	2.46
RAPD	OPAA-04	6	6	0	0.41	100	2.49
	OPC-20	8	8	0	0.43	100	3.42
	OPL-08	3	3	0	0.33	100	0.10
	OPP-13	6	6	0	0.41	100	2.48
	OPAD-06	5	5	0	0.38	100	1.92



شکل۲-تجزیه کلاستر۲۰ ژنوتیپ‌های رز با استفاده از نشانگرهای RAPD به روش NJ.

Figure 2-Dendrogram of twenty genotypes of rose using RAPD markers based on Neighbor-Joining method.



شکل۳- تجزیه کلاستر ۲۰ ژنوتیپ‌های رز با استفاده از نشانگرهای CDDP به روش NJ.

Figure 3-Dendrogram of twenty genotypes of rose using CDDP markers based on Neighbor-Joining method.

بیشترین مقدار شاخص نشانگر(MI) متعلق به نشانگر WRKY-1R بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالای این نشانگر نسبت به سایر نشانگرها می‌باشد. دامنه تشابه ژنتیکی نشانگر RAPD از ۰/۰٤تا ۰/۷۷ متغیر بود و میانگین آنها بین تمامی نمونه‌ها ۰/٤۱ و برای داده‌های CDDP تشابه ژنتیکی بین ۰/۰۵ تا ۰/۷۹ متغیر بود و میانگین آنها ۰/٤۲ بین نمونه‌ها تعیین شد. با توجه به تفاوت قابل ملاحظه‌ای که بین ژنوتیپ‌های رز با استفاده از نشانگر RAPD و CDDP مشاهده شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به احتمال زیاد این دو ژنوتیپ باید مبدا متفاوتی داشته باشند و همچنین این امکان وجود دارد که ژنوتیپ‌های یکسانی در طی زمان و بر اثر مهاجرت به نقاط مختلف منتقل و تحت شرایط محیطی دچار تغییر شدند (Ramazani, 2006).

در مطالعه تنوع ژنتیکی سه جمعیت مختلف گل‌های زنبق با هشت نشانگر RAPD چندشکلی مشخص شده به میزان ۳۵ درصد برآورد گردید (Artyukova & Etal,__2001). نشانگرهای RAPD همچنین کارایی خود را در تعیین روابط ژنتیکی و تلاقی‌های درون گونه‌ای میان گونه‌های وحشی گلایول جنوب آفریقا به اثبات رسانده‌اند (Takatsu *et al*., 2001). مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در ۲۰ توده بومی بابونه آلمانی همراه با ۵ واریته وارداتی از اروپا با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر RAPD نیز توسط محققان صورت گرفته‌است (Solouki *et al*., 2008). نشانگرهای مولکولی RAPD برای ارزیابی و مطالعه تنوع ژنتیکی ذخایر گیاهی که هیچ گونه اطلاعات اولیه ژنومی ندارند و تنوعی بین آنها مشاهده نمی‌شود، از کارایی بالایی برخوردار می‌باشد. به طورکلی با توجه به نتایج

این تحقیق و همسویی آن با نتایج بدست‌آمده سایر محققان می‌توان اعلام نمود که روش RAPD روشی مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه رز می‌باشد (Solouki *et al*., 2008).

روابط ژنتیکی بین نشانگرها با استفاده از تجزیه کلاستر برای RAPD و CDDP در شکل ۲ و ۳ نشان داده‌شده‌است. تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های RAPD و CDDP ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم‌بندی نمود (شکل۲و۳). کلاستر اول و دوم در هر دو نشانگر ژنوتیپ‌های مشابهی (cool water، مویاسی، رز سیاه مینیاتوری، مینیاتوری ابلق، رز معطر، Mol1، ابلق خارجی،PV6 ، مشکی، ساناز مینیاتوری قرمز) را در برداشتند و در تجزیه خوشه‌ای هر دو نشانگر کلاستر سوم شامل ژنوتیپ‌های (PY3، رز هفت رنگ، رز صورتی وندنتا، PY52) بود. الگوی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در نشانگر RAPD و CDDPنسبتاً مشابه است. ضریب همبستگی بین دو نشانگر با استفاده از نرم افزار NTSYS محاسبه شده و به میزان RAPD و CDDP ۰/۸۷ بود و میزان بالای این ضریب نشان‌دهنده آن است که این دو نشانگر به جای یکسانی از ژنوم متصل شده‌اند و در نتیجه می‌توان گفت ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی توسط هر دو نشانگر آشکار شده‌است. همچنین آزمون مانتل جهت مطالعه تحلیل تنوع ژنتیکی محصولات زراعی به ویژه معلوم نمودن تطابق ماتریس‌های حاصل از سیستم نشانگری مختلف بر روی یک مجموعه ژنوتیپ مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Mohammadi & Prasanna, 2003). نشانگر CDDP نشانگر پلی‌مورفی هستند که برای بررسی تنوع ژنتیکی گل رز در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته و سایر محققان دیگر نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی ٤٠ رقم گندم اصلاح‌شده ایرانی از دو نشانگر CDDP و SCOT استفاده شد. نتایج ارزیابی مولکولی نشان داد که نشانگرهایCDDP توانایی بالایی در ارزیابی تنوع و تفکیک‌کردن ارقام گندم را دارند (Hamidi *et al*., 2014). در پژوهش دیگری که بر روی گل داوودی با استفاده از نشانگر CDDP صورت گرفت مشاهده شد که این نشانگر به عنوان سیستم مارکری جدید می‌تواند به خوبی آنالیز تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم موجود را انجام دهد (Tian *et al*., 2013). نتایج دیگر محققان با تحقیق ما مطابقت داشت. مطالعه حاضر اهمیت تحقیقات مولکولی را تاکید می‌کند که در تشخیص تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ-ها و در انتخاب والدین متنوع و مناسب برای انجام یک برنامه اصلاحی موفق مبتنی بر تلاقی باید مورد توجه قرار گیرد. با توجه به محدودیت های تکرارپذیری و تصادفی‌بودن نشانگرهای RAPD در این مطالعه از نشانگر جدیدی مثل CDDP به عنوان یک روش جدید نشانگر DNAکه بخش خاصی از ژنوم یا ژنهای منتخب را از طریق طراحی پرایمر مناسب شناسایی می-کند، برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی رز استفاده شده‌است. نشانگر CDDP گزینه‌ای برتر نسبت به نشانگرهایی نظیر RAPD یا ISSR می‌باشد و

نشانگر CoRAP مانند نشانگر CDDP بوده که می‌تواند به خوبی برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار گیرد (Karami et al., 2015; Ghorbani et *al*., 2000 Wang *et* al., 2013;). پژوهشی برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ نخود از ۱۱ نشانگر CDDP و ۹ نشانگر SCoTاستفاده شد. درصد چند شکلی و میزان پلی مورفیسم نشانگر CDDP، نسبت به SCoT بالاتر بوده‌است و بیانگر آن است که این نشانگر برای تشخیص میزان پلی‌مورفیسم مناسب می‌باشد (Hajibarat *et al*., 2015). این پژوهش هم نشان داد که نشانگر CDDP به خوبی توانایی شناسایی چندشکلی را دارد و به عنوان جایگزین برای سایر نشانگرهای تصادفی برای آنالیز ژنتیکی و تهیه نقشه صفات کمی می‌توان از آن استفاده نمود. نشانگر CDDP استفاده‌شده در این تحقیق ابزار سودمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، تشخیص و شناسایی سریع و قابل اعتماد ژنوتیپ-های رز می‌باشند. لذا می‌توان از این داده‌های مولکولی بعنوان ابزاری کارآمد در برنامه‌های اصلاحی این گیاه، بخصوص برنامه‌های گزینش و هیبریداسیون جهت تهیه ارقام هیبرید استفاده نمود (Rabiei *et al*.,2012). این مطالعه نه‌تنها برای بررسی منشاء این محصول، بلکه برای مدیریت منابع ژنتیک و استفاده‌های آن در برنامه-های اصلاحی کاربردی، علی الخصوص برای توسعه یک مجموعه مرکزی کاربرد دارد. اطلاعات موجود در مورد تنوع ژنتیکی ما را قادر می‌سازد که ژرم‌پلاسم در دسترس را به گروه‌های هتروتیک مختلف طبقه‌بندی نمائیم که از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های مبتنی بر تلاقی رز برخوردار است.

منابع

Andersen JR, Lubberstedt T (2003). Functional markers in plants. Trends in Plant Science Cell 8: 554–560.

Artyukova E, Etal V (2001). Genetic variability of Iris setosa. Molecular Biology 35: 134-138.

Azeem S, Iqbal Khan A, Awan FS, Riaz A, Bahadur S (2012). Genetic diversity of rose germplasm in Pakistan characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Biotechnology 11: 10650-10654.

Baydar GN, Baydar H, Debener T (2004). Analysis of genetic relationships among Rosa damascena plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. Journal of biotechnology 111: 263-267.

Chtourou-Ghorbel N, Lauga B, Brahim NB, Combes D, Marrakchi M (2002). Genetic variation analysis in the genus Lathyrus using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 49: 363-370.

Collard BCY, Mackill DJ (2009). Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants. Plant Molecular Biology and Reproduction 27: 558–562.

Efron B, Tibshirani R(1993). An Introduction to the Bootstrap. London: Chapman and Hall.

Ghorbani Jamalabadi J, Saidi A, Karami E, Kharkesh M, Talebi R (2013). Molecular Mapping and Characterization of Genes Governing Time to Flowering, Seed Weight, and Plant Height in an Intraspecific Genetic Linkage Map of Chickpea (Cicer arietinum). Biochemical Genetics 51: 387–397.

Gorji AM, Poczai P, Polgar Z, Taller J (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. American journal of potato research 88: 226–237.

Gudin S (2000). Rose: genetics and breeding. Plant Breeding Reviews 17: 59-189.

Hajibarat Z, Saidi A, Hajibarat Z, Talebi R (2015). Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP). Physiology and Molecular Biology of Plants 21: 365-73.

Hamidi H, Talebi R, Keshavarzi, F(2014). Comparative efficiency of functional gene-based markers,start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved dNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (Triticum aestivum L.). Cereal Research Communications 42: 558-567.

Karami E, Talebi R, Kharkesh M, Saidi A (2015). A Linkage map of chickpea (Cicer arietinum L.) based on population from ILC3279×ILC588 crosses: location of genes for time to flowering, seed size and plant height. Genetika 1: 253-263.

Li JJ, Pei GL, Pang HX, Bilderbeck A, Chen SS, Tao SH (2006). A new method for RAPD primers selection based on primers bias in nucleotide sequence data. Journal of Biotechnology 126: 415- 423.

Masuzaki S, Yaguchi S, Yamauchi N, Shigyo M (2007). Morphological characterization of Allium multiple alien addition lines reveals chromosomal locations of gene(s) related to bulb formation in Allium cepa. The Journal of Horticulture Science and Biotechnology 82: 393-396.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant-salient statistical tools and consideration. Crop Science 43: 1235- 1248.

Ozkan G, Sagdic O, Baydar NG, Baydar H (2004). Antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts. Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos 10: 277-281.

Prasad KV, Kumar S, Choudhary M L, (2006). Molecular characterisation of fragrant rose cultivars. Indian Journal of Horticulture 63: 229-234.

Rabiei V, Saadati M, Azimkhani R, Jafari S, Mohammadi S (2012). An Investigation of the Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes Prevailent in Tarume - Zanjan Using RAPD Markers. Iranian Journal of Horticulture Sciences 44: 109-118.

Ramazani A (2006). An investigation on grape genetic diversity, using SSR marker. MSc thesis. IKIU, Qazvin, Iran.

Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). Molecular Breeding 6: 125–134.

Rout GR, Bhatacharya D, Nanda RM, Nayak S, Das P (2003). Evaluation of genetic relationships in Dalbergia species using RAPD markers. Biodiversity and Conservation 12: 197-206.

Rout GR, Samantaray S, Mottley J, Das P(1999). Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulture 81: 201-228.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen, RA Allard RW (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dymnamics. Proceedings of National Academy of Sciences, USA 81: 8014-8018.

Solouki M, Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh AA (2008). Study of genetic diversity in Chamomile (Matricaria chamomilla) based on morphological traits and molecular markers. Scientia Horticulturae 117: 281-287.

Streeper RD (1990). Where the roses grow. Amer. Rose Annu. 75: 23–25.

Taheri S, Zabet M, Izanlo A, Izadi Darbandi A (2016). Assessment of genetic diversity of fennel ecotypes using RAPD and ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 4: 113-128.

Takatsu Y M, Miyamoyo E, Inove T, Yamada T, Manabe M, Kasumi M, Hayashi F, Sakuma W, Marubashi M, Niwa (2001). Interspecific hybridization among wild Gladiolus species southern Africa based on randomly amplified polymorphic DNA markers. Scientia Horticulturae 91: 339-348.

Teysseier C, Reynders-Aloisi S, Jacob Y (1996). Characterization of collection of botanical rose tress by phenotypic data analysis. Acta Horticulturae 424: 305-307.

Tian L , Jun'e G, Yingying L, Hua N, Xia S, Chengshu Z (2013). Genetic diversity assessment of chrysanthemum germplasm using conserved DNA-derived polymorphism markers Scientia Horticulturae 162: 271-277.

Upadhya A, Jayadev K, Manimekalai R, Parthasarathy VA (2004). Genetic relationship and diversity in Indian account accessions based on RAPD markers. Scientia Horticulturae 99: 353-362.

Wang Q, Zhang B, Lu G (2009). Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in Salvia miltiorrhiza. Plant Molecular Biology Reporter 27: 139–143.

Zhang D, Gandelin MH (2003). Cultivar identification by image analysis. In: Encyclopedia of Rose Science, Vol. 1 (Roberts A. V., Debener T., and Gudin S., eds.). Elsevier Ltd., Oxford, UK, pp. 124-135.

Zielinski J, Petrova A, Tan K (2004). Taxonomic status of the roses (Rosa) described by S.G. Dimitrov from Bulgaris. In Annales Botanici Fennici 41: 449-451. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.

Evaluation of Genetic diversity Rose (*Rosa hybrid*) flower genotypes using CDDP & RAPD markers

Eghbalneghad Y.[1], Saidi A.[*1], Beiramizadeh E.[2]

[1]Department of Plant Sciences & Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology , Shahid Beheshti University, G.C. Tehran, Iran.
[2]Scientific Board of National Institute of Ornamental Plants (NIOP), Research Horticultural Science, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Mahallat, Iran.

Abstract

Identification of genetic diversity and classification of genetic resources (germplasm) are of important and essential activities in breeding and management of plant genetic resources. In order to study the genetic diversity of rose, twenty genotypes were analyzed using six Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP) and 20 RAPD markers. Matrix genetic distance ranged from 0.04 to 0.77 in CDDP and from 0.05 to 0.79 in RAPD marker analysis. The level of polymorphism generated by CDDP markers (100%) was similar to RAPD marker. Cluster analysis for CDDP and RAPD markers revealed that genotypes were grouped in three clusters. The current study showed CDDP marker very well differentiated rose genotypes from each other. This is the first report of using targeted DNA region molecular marker (CDDP) for genetic diversity analysis in rose in comparison with RAPD markers. We introduce CDDP as a new molecular markers system for evaluating Rose germplasm.

Keywords: *Genetic Diversity, RAPD Marker, CDDP Marker, Cluster Analysis, Rose.*

[*] Corresponding Author: Saidi A. Tel: 09121056599 Email: : abbas.saidi@gmail.com