ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۲۵۰- ۲۴۱

کاربرد نشانگرهای AFLP در مطالعه ساختار ژنتیکی هیبریدهای امیدبخش *Prunus*

Application of AFLP markers in genetic structure study of promising hybrids in *Prunus* genus

مطهره خاکزاد[۱]، مهرشاد زین العابدینی*[۲]، جلیل دژم پور[۳]، بهرام ملکی زنجانی[۴]، علی ایمانی[۵]، علی سلیمانی[۶]، محسن مردی[۷]

۱،۲و۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
۳- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی
۴و۶- استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۵- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

Khakzad M[1], Zeinalabedini M[*2], Dejampour J[3], Maleki B[4], Imani A[5], Soleymani A[6], Mardi M[7]

1,2,7. Msc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj
3. Assistant Professor, Agricultural research center of East Azarbaijan, Tabriz, Iran
4,6. Assistant Professors, Agronomy and Plant Breeding Department, University of Zanjan , Zanjan, Iran
5. Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mzeinolabedini@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶- تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

جنس *Prunus* متعلق به خانواده Rosaceae شامل گونه‌های مهم اقتصادی متعددی است که در نیمکره شمالی زمین از جمله ایران توزیع شده است. امروزه در میوه کاری نوین و صنعتی، استفاده از دورگ‌های بین گونه‌ای برای دست‌یابی به پایه‌های پیوندی سودمند، مورد توجه می‌باشد. اخیراً با توسعه نشانگرهای مولکولی مختلف، امکان تشخیص و گزینش پایه‌های درختان میوه میسر شده است. هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع، ساختار و روابط ژنتیکی پایه‌های امیدبخش جنس *Prunus* با استفاده از آغازگرهای AFLP می‌باشد. بر این اساس ۸۹ ژنوتیپ از جنس *Prunus* شامل دورگ های آلو × بادام، گوجه × بادام، هلو × بادام، گوجه × زردآلو، آلو × زردآلو، برخی از ژنوتیپ‌های بادام، زردآلو، هلو، آلو و گوجه و نیز ژنوتیپ‌هایی با منشاء نامشخص، مورد بررسی قرار گرفتند. از بین ۲۰ ترکیب آغازگر انتخابی مورد آزمایش، ۸ ترکیب آغازگری توانست ۷۲۸ نوار چند شکل با الگوی نواری واضح نشان دهد. با استفاده از نرم افزارهای gCLUTO v. 1.0، SplitsTree 4، Structure 2.3 و R 2.14.1 اغلب دورگ های (هلو × بادام) از دورگ‌های دارای یک والد آلو یا گوجه تفکیک شدند و ژنوتیپ‌های والدینی نیز در خوشه‌های مجزا گروه‌بندی شدند. همچنین در این تحقیق استفاده از ترکیب آغازگرهای نشاندار AFLP و آشکارسازی نوارها با کمک دستگاه Licor در مقایسه با روش قدیمی AFLP نتایج کارآمدتری را نشان داد. بنابراین مطالعه حاضر می‌تواند در شناسایی دورگ‌های امیدبخش بر اساس والدین و نیز تهیه شناسنامه مولکولی به منظور ثبت و حفظ مالکیت معنوی آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
دورگ‌گیری،
فیلوژنتیک،
AFLP،
Prunus

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

مقدمه

با توجه به اهمیت اقتصادی، تنوع ژنتیکی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی جنس *Prunus* (خانواده Rosaceae)، مطالعات متعدد مولکولی و کلاسیک در این جنس انجام گرفته است. گونه‌های این جنس شامل بادام (*P. dulcis*)، زردآلو (*P. armeniaca*)، گیلاس (*P. avium*)، آلبالو (*P. cerasus*)، هلو (*P. persica*) و آلو (*P. salicina*، *P. cerasifera* و *P. domestica*) بوده که به عنوان منابع درختان میوه، گیاهان روغنی، چوبی، زینتی، خشکباری و پایه مورد توجه می‌باشند (Aradhya et al. 2004). ایران دارای سطح زیر کشت و تولید قابل توجهی برای برخی از این محصولات بوده و خاستگاه ژنتیکی تعدادی از آن‌ها به شمار می‌رود (FAOSTAT 2010). تلاقی‌های بین گونه‌ای جنس *Prunus* به صورت طبیعی و یا در شرایط کنترل شده مزرعه‌ای ایجاد می‌شود. در چند دهه اخیر شناسایی و معرفی برخی از پایه های مفید که عاری از بیماری بوده و با انواع خاک و شرایط اقلیمی سازگار هستند، منجر به افزایش عملکرد و تولید در این جنس شده است. یکی از اهداف برنامه‌های به نژادی پایه‌ها، شناسایی و استفاده از تنوع ژنتیکی در دسترس و افزایش آن در جهت حل معضلات موجود می‌باشد. به این منظور از ارقام، ژنوتیپ ها و برخی از گونه‌های خویشاوند این جنس که دارای خصوصیات مطلوب زراعی هستند، در برنامه‌های دورگ‌گیری بین گونه‌ای و در نهایت گزینش دورگ‌های سودمند استفاده می‌شود (Giorgi et al. 2005 ; Bouhadida et al. 2009). بنابراین شناسایی تنوع ژنتیکی پایه‌ها به کمک ابزارهای مختلف، از اهمیت زیادی برخوردار خواهد بود. امروزه با توسعه ژنتیک مولکولی، دست‌یابی به نشانگرهای مولکولی به طور قابل توجهی افزایش یافته و امکان تشخیص و گزینش پایه‌ها در هر یک از مراحل توسعه گیاه و مستقل از عوامل محیطی را میسر می‌سازد. همچنین از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ ژنوتیپ از پایه های جنس *Prunus* استفاده شد و نشانگرهای مورد استفاده توانستند پایه‌های مختلف را به خوبی تفکیک کنند که گروه بندی‌های حاصل با برخی از ویژگی‌های مورفولوژی منطبق بود (Casas et al. 1999).

تنوع ژنتیکی چهار گونه وحشی ایرانی جنس *Prunus* شامل *P. eleagnifolia*، *P. hauskenchtii*، *P. scoparia* و *P. lycioides* نیز که می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی پایه‌ها مورد استفاده قرار گیرند، با استفاده از نشانگرهای DNA، پروتئینی و برخی از صفات مورفولوژی بررسی شد (Zeinalabedini et al. 2008).

به منظور بررسی سطوح تنوع و ساختار ژنتیکی در گیاهان، نشانگرهای AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا، توزیع وسیع در ژنوم و سنجش مکان‌های ژنی متعدد در یک آزمون و زمان کوتاه، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد به شمار می‌رود، در نتیجه بر اساس داده‌های حاصل از این نشانگر، می‌توان خوشه‌بندی صحیحی برای جمعیت‌های متفاوت گیاهی به دست آورد. از نشانگر AFLP در انگشت نگاری و تشخیص ژنتیکی ژرم پلاسم‌ها، برقراری روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی گونه‌های جنس *Prunus* نیز استفاده شده است (Hurtado et al. 2002; Martinez-Gomez et al. 2003). روابط ژنتیکی ۷ رقم و گونه وحشی جنس *Prunus* با استفاده از ۵ جفت آغازگر AFLP بررسی شد و آنالیزهای انجام شده به کمک این داده‌ها، ۴ گروه را که نماینده بخش‌های Amygdalus، Armeniaca، Cerasus و Prunophora بودند، به خوبی گروه‌بندی کرد (Aradhya et al. 2004).

اولین نقشه پیوستگی ژنتیکی جمعیت پایه‌های *Prunus* و شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت در پایه‌ها با استفاده از AFLP ایجاد شد که می‌تواند دلیل بر اهمیت بکارگیری این نشانگر در مطالعات پایه‌های این جنس باشد (Lu et al. 1998). هدف از این تحقیق، بررسی مولکولی پایه‌های انتخابی و تجاری حاصل از برنامه‌های اصلاحی جنس *Prunus*، بررسی تنوع ژنتیکی دورگ‌های بین‌گونه ای مختلف و همچنین ارزیابی روابط فیلوژنتیکی بین والدین دورگ‌ها است.

مواد و روش‌ها

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

جدول۱- نام دورگه‌ها و ارقام والدینی جنس *Prunus*

ردیف	نام	منشاء	نام اختصار	ردیف	نام	منشاء	نام اختصار
1	HS703	میروبالان × بادام	'AM1'	47	سهند	بادام	'A4'
2	HS721	میروبالان × بادام	'AM2'	48	D99	بادام	'A5'
3	HS704	میروبالان × بادام	'AM3'	49	10_11	بادام	'A6'
4	HS522	گوجه × زردآلو	'APPU1'	50	14_24	بادام	'A7'
5	HS304	گوجه × زردآلو	'APPU2'	51	A230	بادام	'A8'
6	HS303	گوجه × زردآلو	'APPU3'	52	13_40	بادام	'A9'
7	HS117	گوجه × زردآلو	'APPU4'	53	D124	بادام	'A10'
8	HS302	گوجه× زردآلو	'APPU5'	54	D101	بادام	'A11'
9	HS811	هلو × بادام	'APH1'	55	شکوفه	بادام	'A12'
10	HS-401	هلو × بادام	'APH2'	56	شماره ۷	بادام	'A13'
11	HS-403	هلو × بادام	'APH3'	57	فرتز	بادام	'A14'
12	HS737	هلو × بادام	'APH4'	58	پایین 8-6	بادام	'A15'
13	GF677	هلو × بادام	'APH5'	59	Flip	بادام	'A16'
14	HS314	هلو × بادام	'APH6'	60	A200	بادام	'A17'
15	HS411	هلو × بادام	'APH7'	61	5_6	بادام	'A18'
16	HS126	هلو × بادام	'APH8'	62	Tonuo	بادام	'A19'
17	HS-202	هلو × بادام	'APH9'	63	پادری	بادام	'A20'
18	HS503	هلو × بادام	'APH10'	64	16-25	بادام	'A21'
19	HS-402	هلو × بادام	'APH11'	65	14-12	بادام	'A22'
20	HS507	بادام × GF677	'AGF'	66	10_12	بادام	'A23'
21	HS412	آلو× زردآلو	'APPL1'	67	ارداباد	زردآلو	'AP1'
22	HS407	آلو× زردآلو	'APPL2'	68	کانیز	زردآلو	'AP2'
23	HS409	آلو× زردآلو	'APPL3'	70	قربان مراغه	زردآلو	'AP3'
24	k-3	آلو	'SC1'	70	HS216	زردآلو	'AP4'
25	stant	آلو	'SC2'	71	AC415	زردآلو	'AP5'
26	pre	آلو	'SC3'	72	HS206	زردآلو	'AP6'
27	A=St	آلو	'SC4'	73	HS517	زردآلو	'AP7'
28	BL-R	آلو	'SC5'	74	HS416	زردآلو	'AP8'
26	OB	آلو	'SC6'	75	GM	زردآلو	'AP9'
30	K1	آلو	'SC7'	76	تبریز ۱۰۰	زردآلو	'AP10'
31	Z-12	آلو	'SC8'	77	HS702	گوجه × بادام	'APU1'
32	AL-T	آلو	'SC9'	78	HS706	گوجه × بادام	'APU2'
33	بی نام	آلو	'SC10'	79	HS405	گوجه × بادام	'APU3'
34	A-N	هلو	'PH1'	80	HS403	گوجه × بادام	'APU4'
35	شلیل انجیری	هلو	'PH2'	81	HS-702	گوجه × بادام	'APU5'
36	A-S	هلو	'PH3'	82	HS802	آلو × بادام	'APL1'
37	RH	هلو	'PH4'	83	HS602	آلو × بادام	'APL2'
38	B1	هلو	'PH5'	84	HS524	گوجه	'PU'
39	B2	هلو	'PH6'	85	HS-201	زردآلو × زردآلو	'APAP1'
40	FR	هلو	'PH7'	86	HS-203	زردآلو × زردآلو	'APAP2'
41	K9	هلو	'PH8'	87	PLW	_	'PLW'
42	H-L	هلو	'PH9'	88	HS-603	_	'UN1'
43	هلوی سهند	هلو	PH	89	HS724	_	'UN2'
44	Falsa	بادام	'A1'				
45	بالا 8-6	بادام	'A2'				
46	بوتی	بادام	'A3'				

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

(جدول۱). پایه‌های دورگ تحت بررسی، نتایج طرح پژوهشی ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند از سال ۱۳۷۷ هستند، که با توجه به مشاهدات مزرعه‌ای منطبق با توصیف نامه بین‌المللی درختان میوه هسته‌دار، از بین ۱۰۶ دورگ بین گونه‌ای مصنوعی و طبیعی و بر اساس فاکتورهای رویشی و زایشی، مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی، گزینش اولیه شدند (Dejampour et al. 2007). به منظور سهولت تفسیر نتایج حاصل از آنالیزها، نمونه‌ها با علامت اختصاری به شرح زیر نام‌گذاری شدند: گروه AP (۱۰ ژنوتیپ زردآلو)؛ APL (دو نمونه از دورگ‌های‌آلو×بادام)؛ AM (۳ نمونه از دورگ‌های میروبالان×بادام)؛ APU (۵ نمونه از دورگ‌های گوجه×بادام)؛ APPL (۳ نمونه از دورگ‌های آلو×-زردآلو)؛ APPU (۵ نمونه از دورگ‌های گوجه×زردآلو)؛ APH (۱۱ نمونه از دورگ‌های هلو×بادام)؛ APAP (دو نمونه از دورگ-های زردآلو×زردآلو)؛ UN (دو ژنوتیپ ناشناخته)؛ AGF (یک - دورگGF677×بادام)؛ A (۲۳ ژنوتیپ بادام)؛ PH (۱۰ ژنوتیپ هلو)؛ SC (۱۰ ژنوتیپ آلو و گوجه)؛ PU (یک ژنوتیپ گوجه) و-PLW (یک دورگ طبیعی) (جدول۱). به منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان، از کیت استخراج DNA (CoreBio) استفاده شد و کیفیت و کمیت آن‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری (NANODROP 1000) و ژل آگارز (یک درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق، بعد از غربالگری اولیه ۲۰ ترکیب آغازگر، ۸ ترکیب *Eco*RI و *Mse*I مورد استفاده قرار گرفتند و آغازگرهای *Eco*RI با IRDye700 و IRDye800 نشاندار شدند (جدول۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترمال‌سایکر Applied Biosystem انجام شد و محصولات حاصل از PCR در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶/۵ درصد و با کمک دستگاه DNA Analyser 4300 (Licor) تفکیک و ارزیابی گردید. در امتیازدهی نوارها، یک برای وجود نوار و صفر برای عدم حضور نوار در نظر گرفته شد (Majidian et al. 2011). اطلاعات مربوط به نشانگر از قبیل درصد چند شکلی و شاخص شانون (I) با کمک نرم افزار POPGene و مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) با استفاده از فرمول‌های $PIC=1-\sum P_i^2$ (P_i: فراوانی نوار i ام) و تعداد کل نوارها×PIC= MI محاسبه شدند. در نهایت به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، گروه‌بندی، ساختار ژنتیکی و تفسیر روابط ژنتیکی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* از روش‌های آماری UPGMA، RB و Bayesian با کمک نرم‌افزارهای gCLUTO v.1.0 و Structure2.3 استفاده شد. پارامترهای تنظیمی هر یک از این نرم افزارها در جدول ۳ آورده شده است.

به منظور بررسی نتایج حاصل از اجرای فرضیه K=۲ تا K=۱۲ و به منظور تعیین روش و تعداد گروه مناسب (K تعداد گروه‌های مناسب)، از روش‌های UPGMA و RB استفاده شد و بر اساس میزان پایداری، مقادیر *Isim* (میانگین شباهت جفتی نمونه‌های درون یک خوشه) و *Esim* (میانگین شباهت جفتی نمونه‌های یک خوشه با خوشه دیگر)، روش RB [1] برای انجام آنالیزها انتخاب شد (Rasmussen and Karypis 2004; Sharifi et al. 2009) . روش تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل نیز با استفاده از نرم افزار Structure 2.3 انجام گرفت و بهترین K با توجه به معیارهای $\ln P(D)$ و ΔK انتخاب شد (Evanno et al. 2005).

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای فاصله با روش Neighbor-net (تغییر یافته روش Neighborjoining) و با ضریب Dice به کمک نرم افزار SplitsTree4 صورت پذیرفت (Huson and Bryant 2006). در نهایت، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز توسط نرم‌افزار Arlequin3.5 انجام شد و با کمک نرم‌افزار R-2.14.1 تفاوت‌های درون جمعیتی و بین جمعیتی افراد آشکار شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، از بین ۸ ترکیب نشانگر انتخابی AFLP مورد بررسی، دو ترکیب M-GAG/E-TG و M-GAG/E-TC به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) معادل ۰/۴۰۱۸ و ۰/۳۱۵ را دارا بودند. همچنین ترکیب نشانگر M-GAG/E-TG بالاترین مقدار شاخص شانون (I)، ۰/۵۸۴۸ و M-GT/E-TC پایین‌ترین مقدار این شاخص ۰/۱۷۲ را نشان داد. در مجموع از بین ۸۷۵ نوار حاصل، ۷۲۸ نوار چند شکل مشاهده شد (جدول ۴). با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب نشانگر M-GAG/E-TG با بالاترین مقادیر PIC، MI و شاخص شانون، کارآمدترین نشانگر در بین نشانگرهای

[1] Partial repeated bisection

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

جدول۲- توالی سازگار سازها و آغازگرهای AFLP

آنزیم	آغازگر مرحله انتخابی	آغازگر مرحله پیش تکثیر	سازگار ساز
Mse I	5′-GATGAGTCCTGAGTAA-GAG-3′ 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-CCC-3′ 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-GC-3′ 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-GT-3′ 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-TT-3′ 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-CAG-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTA-3′	5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′ 3′-TACTCAGGACTCAT-5′
*Eco*R I	5′-GACTGCGTACCAATTC-TG-3′ 5′-GACTGCGTACCAATTC-TC-3′ 5′-GACTGCGTACCAATTC-TA-3′ 5′-GACTGCGTACCAATTC-GA-3′ 5′-GACTGCGTACCAATTC-GT-3′	5′-GACTGCGTACCATT-3′	5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′ 3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′

جدول۳- روش‌ها، نرم‌افزارها و مؤلفه‌های استفاده شده برای تجزیه کلاستر

روش	نرم‌افزار	مؤلفه‌ها	منبع
UPGMA	GCluto v. 1.0	Simfun = cosine; CRfun = UPGMA; of bootstrap replications = 1,000	Rasmussen and Karypis (2004)
RB	GCluto v. 1.0	Simfun = cosine; Cstype = large; CRfun = H2; Number of trials = 1,000; of iterations = 1,000; Number of bootstrap replications = 1,000	Rasmussen and Karypis (2004)
Bayesian	STRUCTURE 2.3	Ancestry model = admixture; allele frequencies model = correlated; of runs per K = 5; burnin = 30,000; Number of iterations = 70,000	Pritchard et al. (2000), Falush et al. (2007)

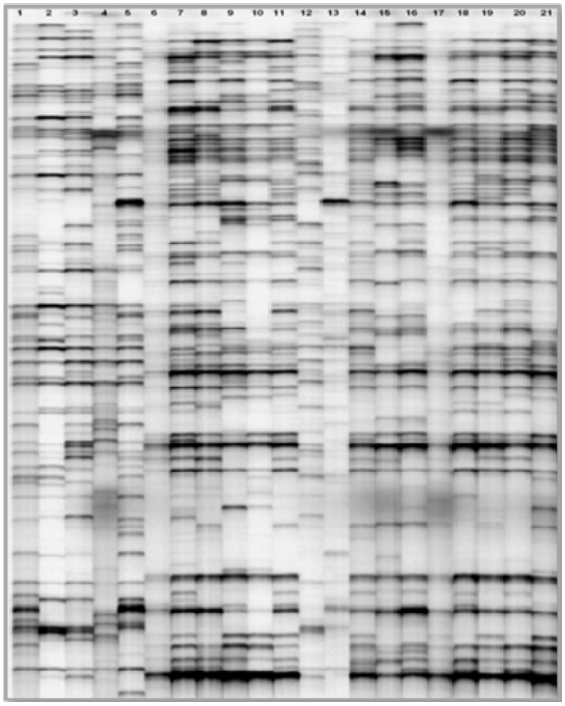
Parameter options: Simfun similarity function, CRfun criterion function, Cstype partitional clustering algorithm, K number of clusters, H2 maximizes the ratio I2/ E1, where I2 is the cosine similarity between each object and its own cluster centroid, and E1 is the cosine between the centroid vector of each cluster and the centroid vector of the entire collection.

جدول۴- ترکیبات آغازگرهای AFLP ، تعداد کل نوارها، تعداد کل نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی، شاخص‌های PIC ، MI، I

ترکیب آغازگر	تعداد کل نوارها	تعداد کل نوارهای چند شکل	درصد چند شکلی(٪)	PIC*	MI**	I***
M-GAG/E-TG	۱۵۹	۱۵۸	۹۹/۳	۰/۴۰۱۸	۶۳/۸۸۶۲	۰/۵۸۴۸
M-GAG/E-TC	۱۵۸	۱۳۸	۸۷/۳	۰/۳۱۵۹	۴۹/۹۱۲۲	۰/۴۷۷۶
M-CCC/E-TA	۱۰۴	۹۱	۸۷/۵	۰/۳۵۸۷	۳۷/۳۰۴۸	۰/۵۲۹۹
M-GC/E-GA	۱۶۱	۱۳۳	۸۲/۶	۰/۳۲۷۵	۵۲/۷۲۷۵	۰/۴۹۰۴
M-GAG/E-GT	۴۱	۳۳	۸۰/۵	۰/۳۳۷۶	۱۳/۸۴۱۶	۰/۵۰۰۳
M-GT/E-TC	۹۲	۵۰	۵۴/۳	۰/۳۵۴	۱۹/۲۳۹	۰/۱۷۲
M-TT/E-TG	۶۲	۴۷	۷۵/۸	۰/۳۸۹	۲۹/۴۸۹	۰/۳۰۷
M-CAG/E-GT	۹۸	۷۸	۷۹/۶	۰/۳۲۷	۲۶/۰۲۶	۰/۲۷۶
میانگین	۱۰۹/۳۷۵	۹۱	۸۰/۸۷	۰/۳۵۱۴۳	۳۶/۵۵۳	۰/۴۱۷۲

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

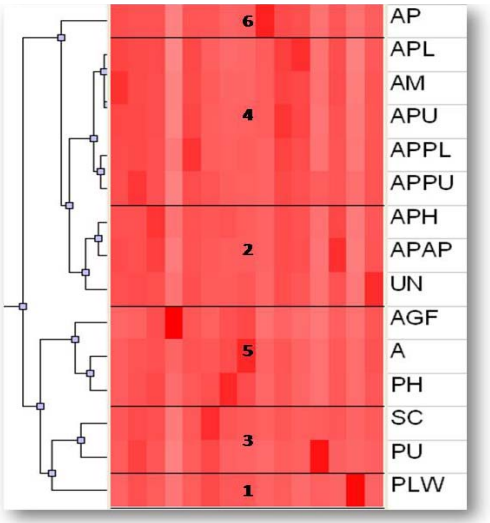
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]



شکل۱- نمونه‌ای از ژل اکریل آمید حاصل از آغازگرهای AFLP (MGAG/ETG).

بکار رفته است و این ترکیب نشانگر، بهتر از سایر ترکیب‌های استفاده شده می‌تواند فاصله ژنتیکی ارقام و دورگ‌ها را مشخص کند (شکل۱). در تحقیق دیگری نیز که تنوع ژنتیکی ۴۲ رقم و ژنوتیپ زردآلو با استفاده از ۵ آغازگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت، نشانگر M-GAG/E-TG بهتر از سایر نشانگرها مواد گیاهی را گروه‌بندی کرد (Majidian et al. 2011).

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با کمک نرم‌افزار gCLUTO v. 1.0 ارقام و دورگ‌های مورد استفاده در این پژوهش، در ۶ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل۲). این گروه‌ها عبارت بودند از: گروه یک تنها شامل نمونه PLW، گروه دو دارای ۱۵ عضو با بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام)، گروه ۳ دارای ۱۱ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی آلو و گوجه، گروه ۴ با ۱۸ عضو شامل دورگ‌های (آلو × بادام)، (گوجه × بادام)، (گوجه × زردآلو)، (آلو × زردآلو)، گروه ۵ با ۳۴ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی بادام، هلو و دورگ (GF677 × بادام) و گروه ۶ با ۱۰ عضو شامل ژنوتیپ‌های والدینی زردآلو.



شکل۲- گروه‌بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار gCLUTO v. 1.0 به روش خوشه‌ای.

در تصویر گروه‌بندی سه‌بعدی، با در نظر گرفتن فواصل قرار گرفتن قله‌ها از یکدیگر، دو گروه ۲ و ۴ و گروه‌های ۱، ۳ و ۵ کمترین فاصله را نسبت به یکدیگر نشان دادند (شکل۳). گروه یک با بیشترین مقدار *Isim* (برابر یک) بالاترین شباهت درون گروهی و گروه ۵ با داشتن *Isim* معادل ۰/۹۹۲ کمترین شباهت درون‌گروهی را نشان دادند (جدول۵). در گروه ۴، دورگ‌های (آلو × بادام)، (گوجه × بادام)، (آلو × زردآلو) و (گوجه × زردآلو) با مقدار *Isim* معادل ۰/۹۹۸ قرار گرفتند. با در نظر گرفتن تمامی ارقام و دورگ‌ها و بر مبنای مقدار *Esim*، گروه یک با کمترین مقدار، بیشترین تفاوت ژنتیکی را با سایر گروه‌ها دارد. همچنین ارقام زردآلو قرار گرفته در گروه ۶، بیشترین فاصله را از گروه‌های والدینی ۳ و ۵ نشان دادند (شکل۳).

با کمک نرم افزار SplitsTree 4، ژنوتیپ‌ها در ۸ شاخه دسته‌بندی شدند. با مشاهده دندروگرام حاصل، گروه‌های ۱، ۲، ۵، ۷ و ۶ به ترتیب شامل ژنوتیپ‌های والدینی گوجه و آلو، هلو (در دو گروه نزدیک به هم)، بادام و زردآلو بودند. در این گروه‌بندی، گروه ۴ دورگ‌های مختلف، گروه ۳ بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام) و گروه ۸ بیشترین تعداد دورگ‌های (گوجه × زردآلو)، (آلو × زردآلو)، (گوجه × بادام) و (آلو × بادام) را شامل شدند. بنابراین ارقام والدینی در ۵ گروه و دورگ‌ها در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل۴).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

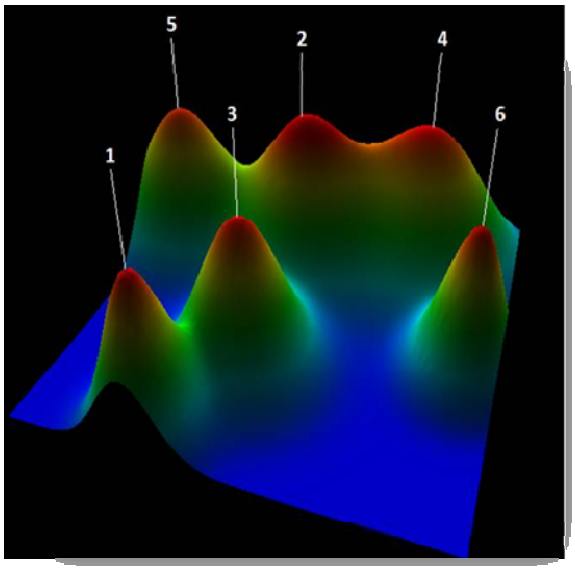
جدول۵- تجزیه خوشه‌ای حاصل از نرم افزار gCLUTO v. 1.0 در ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus*

تعداد خوشه‌ها	تعداد اعضای هر خوشه	ISim*	ISdev***	ESim**	ESdev***	Stability
۱	۱	۱	۰	۰/۹۷۹	۰	۰/۸۳
۲	۱۵	۰/۹۹۸	۰/۰۰۱	۰/۹۹۱	۰/۰۰۱	۰/۴۶
۳	۱۱	۰/۹۹۶	۰	۰/۹۸۷	۰/۰۰۷	۰/۶۸۵
۴	۱۸	۰/۹۹۸	۰	۰/۹۸۹	۰/۰۰۲	۰/۸۹۶
۵	۳۴	۰/۹۹۲	۰/۰۰۲	۰/۹۸۴	۰/۰۱	۰/۷۲۷
۶	۱۰	۱	۰	۰/۹۸۸	۰	۰/۶۵

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

جدول۶- نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها

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

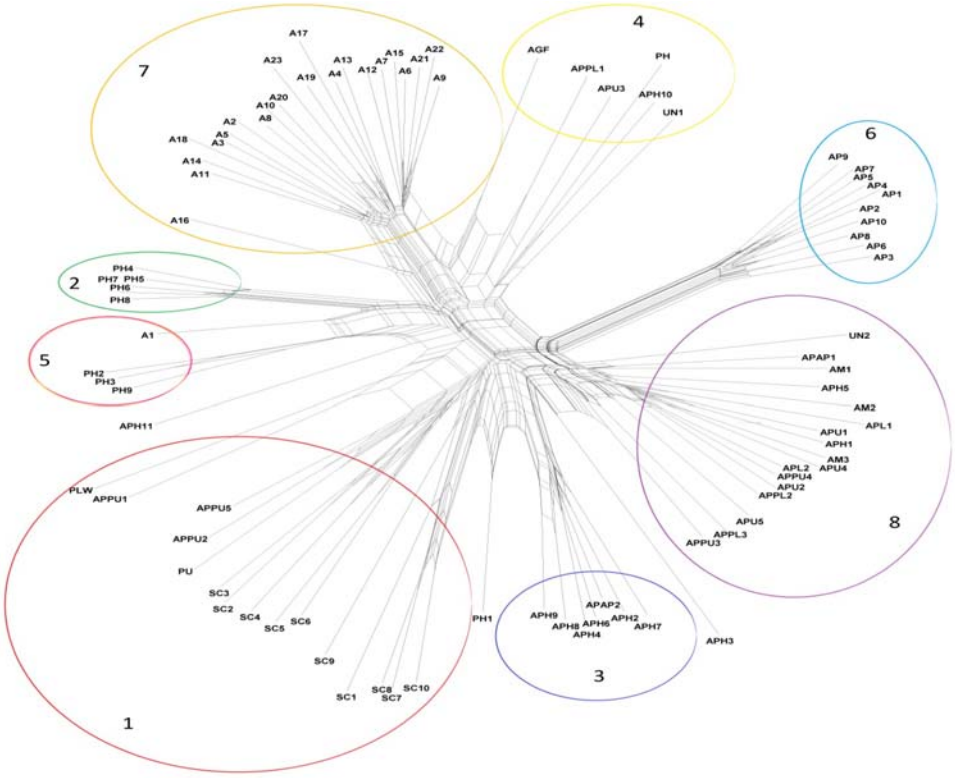


شکل۳- گروه‌بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار gCLUTO v. 1.0. پارامترهای مورد استفاده: ارتفاع قله = ISim، حجم قله = تعداد نمونه‌ها در هر گروه، رنگ قله = نشان هنده انحراف استاندارد داخلی بین نمونه‌های هر گروه. رنگ قرمز انحراف پایین و رنگ آبی انحراف بالا را نشان می‌دهد. فاصله قله‌ها از هم نمایانگر شباهت نسبی بین گروه‌هاست.

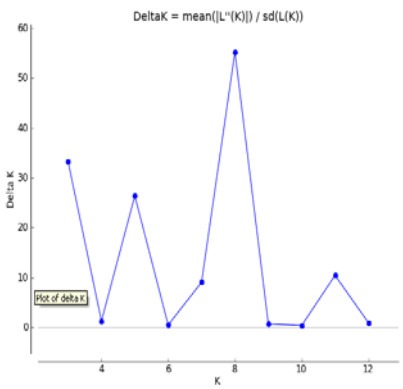
با استفاده از نرم افزار Structure2.3 بر اساس روش مبتنی بر مدل Bayesian، فرض K=۲ تا K= ۱۲ اجرا شد (K نشان‌دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای ln*P(D)* و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد (شکل ۵). بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی ln*P(D)* و بیشترین مقدار عددی ΔK نشان دهنده بهترین معیار برای دسته بندی جمعیت‌های مورد مطالعه بشمار می‌روند. در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، K= ۸ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است. هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضریب عضویت) نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد می‌باشد. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیشترین پهنای رنگی آن کلاستر را دارا باشد (شکل۶).

رنگ‌های قرمز، سبز، آبی، زرد، صورتی، فیروزه‌ای، نارنجی و بنفش به ترتیب برای گروه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ و مشابه گروه‌های دسته بندی شده با نرم‌افزار SplitsTree 4 در نظر گرفته شد (شکل۴). وجود چند رنگ در ستون مربوط به یک فرد،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

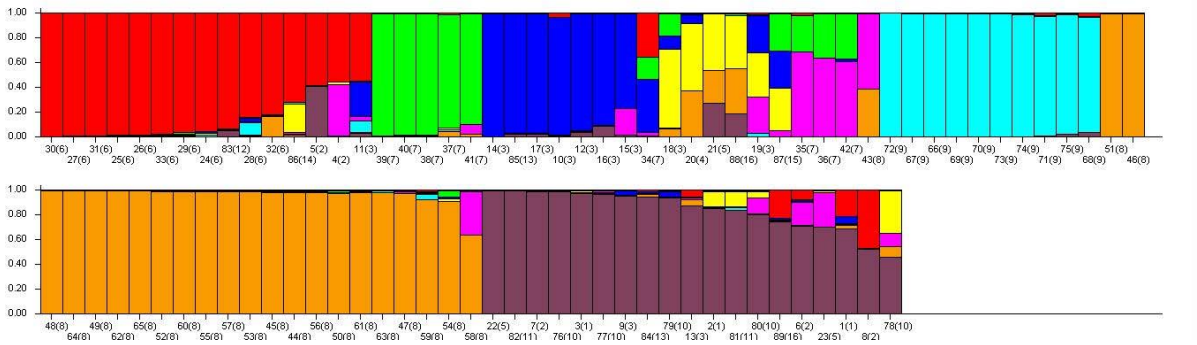


شکل۴- گروه‌بندی اعمال شده برای ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از نرم افزار SplitsTree4



K	Reps	Mean LnP(K)	Delta K
2	3	-25574.500000	—
3	3	-23856.666667	33.258470
4	3	-22805.600000	1.273288
5	3	-21408.533333	26.366224
6	3	-20681.066667	0.479905
7	3	-19990.833333	9.060708
8	3	-19758.933333	55.214758
9	3	-31877.933333	0.745218
10	3	-27812.800000	0.374580
11	3	-19788.933333	10.429600
12	3	-21643.100000	0.929039

شکل۵- تعیین بهترین تعداد کلاستر (K): مقادیر عددی ΔK و LnP(D) سمت راست و نمودار Delta K سمت چپ.



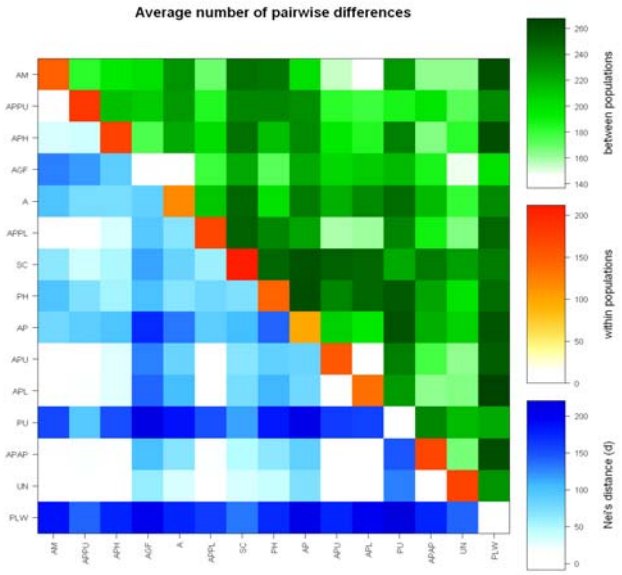
شکل۶- گروه بندی ۸۹ ژنوتیپ جنس *Prunus* با استفاده از روش مبتنی بر مدل و نرم افزار Structure

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با جمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی آن فرد است. بطوریکه در بین دورگ‌ها، اختلاط رنگ‌های حاصل از اختلاط ژنتیکی گروه‌های والدینی به خوبی نمایان است. به عبارتی ژنوتیپ ۱۸ (هلو × بادام) شامل رنگ‌های بنفش، آبی، زرد و سبز، بخش‌هایی از ژنوم خود را از ارقام هلو دسته‌بندی شده در گروه ۲ (رنگ سبز) و ارقام بادام دسته‌بندی شده در گروه ۷ (رنگ بنفش) به ارث برده و از نظر ژنتیکی به گروه ۳ (رنگ آبی) با بیشترین تعداد دورگ‌های (هلو × بادام) و گروه یک (رنگ زرد) شامل برخی از دورگ‌ها مشابهت دارد که این امر با توجه به دورگ بودن این نمونه، چندان دور از انتظار نمی‌باشد.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin3.5 اختلافات ژنتیکی بین افراد در گروه‌ها را ۶۶/۲ درصد و بین‌گروه‌ها را ۳۳/۷ درصد نشان داد (جدول ۶). همچنین با پردازش این داده‌ها در نرم‌افزار R 2.14.1 تصویری شماتیک از تفاوت‌های درون‌جمعیتی و بین‌جمعیتی آشکار شد. بر این اساس بیشترین تفاوت درون‌جمعیتی متعلق به جمعیت گوجه و آلو و کمترین تفاوت درون‌جمعیتی متعلق به ۳ جمعیت PLW (دارای ژنوتیپ PLW)، PU (دارای ژنوتیپ گوجه) و AGF (دارای دورگه GF677 × بادام) می‌باشد. بر اساس شاخص Nei محاسبه شده، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیتی به جمعیت‌های (زردآلو – هلو) و (زردآلو – بادام) می‌باشد و کمترین فاصله بین جمعیتی به جمعیت‌های (گوجه×بادام-آلو×زردآلو)، (آلو×بادام – گوجه×بادام) تعلق داشت (شکل ۷). با مشاهده دندروگرام حاصل از این نرم‌افزارها، ژنوتیپ‌های والدینی و دورگ‌های بین‌گونه‌ای در دسته‌هایی مجزا قرار گرفتند. گروه‌بندی حاصل از ژنوتیپ‌های والدینی شامل گونه‌های بادام، زردآلو، هلو، آلو و گوجه بکار رفته در این تحقیق، با طبقه‌بندی تاکسونومیکی ارائه شده برای جنس *Prunus* مطابقت داشت (Hummer and Janick 2009). بعلاوه اغلب دورگ‌های (هلو × بادام) از دورگ‌های شامل یک والد آلو یا گوجه متمایز شدند. همچنین در مقایسه‌های بین‌گروهی، گروه زردآلو نسبت به ۳ گروه والدینی دیگر فاصله ژنتیکی بیشتری نشان داد. در تحقیقی مشابه، بررسی روابط ژنتیکی ۷ گونه جنس *Prunus* با استفاده از نشانگر AFLP نشان داد که ارقام زردآلو نسبت به سایر گونه‌ها متمایزتر هستند (Aradhya et al. 2004).



شکل۷– میانگین تفاوت‌های جفتی و فواصل ژنتیکی نی به منظور مقایسه درون و بین گروه‌ها بر اساس نشانگر AFLP

در تجزیه واریانس مولکولی، اختلافات ژنتیکی بین افراد درون جمعیت‌های تعیین شده بیشتر از بین جمعیت‌ها بود که می‌تواند نشان دهنده تنوع بالای ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های هر گروه باشد. بعلاوه این امر می‌تواند تنوع آللی مورد نیاز برای برنامه‌های اصلاحی آینده را تضمین کند. در تحقیقی مشابه، با بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی *Prunus microcarpa* و گونه‌های جنس *Prunus* اختلافات ژنتیکی بین افراد درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها برآورد شد (NuriNasa et al. 2010).

در این مطالعه مشخص شد که روش AFLP به طور همزمان مکان‌های ژنی زیادی را شناسایی کرده و می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار ژنتیکی مورد نیاز برای پیشبرد اهداف مختلف برنامه‌های اصلاحی مفید باشد. همچنین استفاده از تکنولوژی AFLP به کمک آغازگرهای نشاندار با فلورسنت و به کمک دستگاه (Licor) با توجه به وجود مزایایی نظیر عدم نیاز به رنگ‌آمیزی، سرعت بالا، حساسیت زیاد در نمایان سازی نوارها و تعداد و وضوح بالای آن‌ها، نسبت به روش قدیمی AFLP کارایی بیشتری دارد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]

منابع

Aradhya MK, Weeks C, Simon CJ (2004) Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. Scientia Horticulturae 103:131-144.

Bouhadida M, Casas AM, Gonzalo MJ, Arus P, Moreno MA, Gogorcena Y (2009) Molecular characterization and genetic diversity of Prunus rootstocks. Scientia Horticulturae 120:237-245.

Casas AM, Igarta E, Balaguer G, Moreno MA (1999) Genetic diversity of Prunus rootstocks analyzed by RAPD markers. Euphytica 110:139-149.

Dejampour J, Grigorian V, Majidian E, Asgharzadeh N (2007) Evaluation of some morphological characteristics and vegetative propagation of some interspesific hybrids in *Prunus*. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 8: 43-54. (In Farsi).

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.

FAO (2010) FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at http://faostat.fao.org. FAO, Rome, Italy

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Notes 7:574-578

Giorgi M, Capocasa F, Scalzo J, Murri G, Battino M, Mezzetti B (2005) The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in the peach (cv. 'Suncrest'). Scientia Horticulturae 107:36-42.

Hummer KE, Janick J (2009) Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. In: Folta KM, Gardiner SE (eds) Genetics and Genomics of Rosaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and models 8:1-17.

Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML (2002) Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. Euphytica 127: 297-301.

Huson DH and Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Molecular Biology and Evolution 23:254-267.

Lu ZX, Sosinski B, Reighard GL, Baird WV, Abbott AG (1998) Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. Genome 41: 199-207.

Majidian P, Zeinalabedini M, Dejampour J, Krska B, Nakhoda B, Mardi M (2011) Evaluation of Genetic Relationships of Some Apricot Cultivars and Genotypes Using Fluorescent-AFLP Markers. XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Poland, Warsaw. 11-15.

Martinez-Gomez P, Sozzi GO, Sanchez-Perez R, Rubio M, Gradziel TM (2003) New approaches to *Prunus* tree crop breeding. Journal of Food, Agriculture and Environment 1:52-63.

NuriNasa M, Bolekb Y, Bardak A (2010) Genetic diversity and phylogenetic relationships of Prunus microcarpa C.A. Mey.subsp. tortusa analyzed by simple sequence repeats(SSRs). Scientia Horticulturae 127:220-227.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959

Rasmussen M, Karypis G (2004) gCLUTO an interactive clustering, visualization, and analysis system. In Technical Final Report 04-021. University of Minnasota.

Sharifi Tehrani M, Mardi M, Sahebi J, Catalan P, Diaz-Perez A (2009) Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis. Plant Systematics and Evolution 282:57-70.

Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Torchi M, Dicenta F, Martínwz-Gómez P (2008) Comparison of the use of morphological, protein, and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild Prunus species. Scientia Horticulture 116:80-88.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.3.9]