

بررسی رابطه فیلوژنتیک تعدادی از گونه‌های وحشی بادام ایران با بهره‌گیری از توالی‌های ناحیه ITS ریبوزمی هسته و trnL کلروپلاستی

سیده زهرا حسینی^۱، بهروز شیران^۲ و محمدعلی ابراهیمی^{۳*}

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران
 - ۲- استاد، گروه اصلاح‌نیات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
 - ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۹)

چکیده

رابطه فیلوژنتیک بین ۱۲ گونه وحشی *Prunus*، یک رقم زراعی بادام و یک رقم هلو، با استفاده از توالی‌های ناحیه ITS1-5.8S rDNA-ITS2 هسته و ناحیه DNA trnL کلروپلاستی و با روش‌های حداکثر شباهت و نزدیک‌ترین همسایگی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از داده‌های ITS در این پژوهش تنها توانست گونه‌های مورد مطالعه *Prunus* را به دو گروه تقسیم کند اما در تفکیک بخش‌ها از یکدیگر کارایی لازم را نداشت. گونه *P. tenella* نسبت به سایر گونه‌های مورد مطالعه، در فاصله ژنتیکی دورتری قرار گرفت و به نظر می‌رسد این گونه به *Amygdalus* تعلق ندارد. همچنین با استفاده از داده‌های ITS می‌توان گزارش نمود، *Prunus* مونوفیلتیک می‌باشد. فواصل ژنتیکی برای هر جفت از گونه‌ها مشخص شد و میانگین فاصله ژنتیکی در بین گونه‌ها تنها کمترین فاصله ژنتیکی را در داخل جنس نشان می‌دهد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان *Prunus* را بصورت تک جنس گزارش نمود و با توجه به شباهت بسیار زیاد ناحیه trnL در گونه‌های وحشی بادام، احتمالاً جد مادری *Prunus* یکی بوده و trnL نشانگر خوبی برای جداسازی گونه‌های موجود در بادام نیست.

واژگان کلیدی: فیلوژنی، ITS1-5.8S rDNA-ITS2، *Prunus species*، trnL کلروپلاستی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ma_ebrahimi@pnu.ac.ir

مقدمه

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* متعلق به خانواده *Rosaceae* و زیر خانواده *Pronoideae* می‌باشد. این گیاه یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین محصولات آجیلی است که در چندین کشور با آب و هوای مدیترانه‌ای پرورش داده می‌شود. در ایران به دلیل تکثیر بادام از طریق جنسی، ژنوتیپ‌های متنوعی وجود دارد که می‌توان از آنها به عنوان منابع ژنی در برنامه‌های به‌نژادی بادام استفاده کرد (Kester and Assay, 1975). تنوع، پراکندگی و سازگاری وسیع بین گونه‌های وحشی *Prunus*، نامگذاری آنها را مشکل نموده است (Martinez-Gomez et al., 2003). این موضوع به پژوهش‌های متعددی در این زمینه نیاز دارد، از طرفی گوناگونی‌های زیاد در بادام‌های وحشی منجر به سردرگمی در تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف شده است. بنابراین در راستای حل این مسأله، شناخت از مرحله مورفولوژیکی فراتر رفته و استفاده از نشانگرهای مولکولی در بادام را امری اجتناب‌ناپذیر نموده است که می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری پیرامون روابط فیلوژنتیک این گیاه در اختیار قرار دهد. همچنین شناسایی خصوصیات ژنتیکی بادام وحشی بدلیل وجود ژن‌های مقاوم به شرایط نامساعد محیطی، آفات و بیماری‌ها دارای اهمیت ویژه است (Rahemi et al., 2012). بنابراین از تنوع بالای گونه‌های بادام می‌توان در جهت اصلاح صفات و اجرای هرچه بهتر برنامه‌های اصلاحی سود برد. استفاده بهینه از هر گیاه نیازمند درک منطقی و صحیح از سطح تنوع ژنتیکی آن محصول در طبیعت و همچنین آشنایی با روابط فیلوژنتیک آن گیاه دارد. چنین اطلاعاتی منجر به توجه بیشتر به‌نژادگران گیاهی و دیگر دست‌اندرکاران به حفظ منابع گیاهی و تنوع زیستی شده و از فرسایش ژنتیکی گیاهان ارزشمند جلوگیری می‌کند. به منظور بررسی روابط فیلوژنی در گیاهان از نشانگرهای گوناگونی استفاده می‌شود. برای افزایش دقت در شناسایی (*Prunus dulcis*) و واریته‌های آن، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی و روش‌های مولکولی، ضروری به نظر می‌رسد.

(Rahemi et al., 2012). محققان برای پی‌بردن به تنوع ژنتیکی میان بادام‌ها از روش‌های مختلفی به ویژه روش AFLP استفاده کرده‌اند. نشانگر ITS بخشی از DNA ریبوزومی هسته می‌باشد که ناحیه ITS1-5.8s rDNA- ITS2 را تکثیر می‌نماید. نشانگر trnL قسمتی از ژنوم بزرگ کلروپلاست است که ناحیه *trnT* را تکثیر می‌کند و در بررسی روابط فیلوژنتیک در سطح گونه‌ها استفاده می‌شود (Potter et al., 1999; Sorkheh et al., 2007).

برخی محققین (Taberlet et al., 1999) بیان نمودند که تنوع توالی DNA کلروپلاستی به طور گسترده در بررسی روابط در بین نهان‌دانگان و سایر گیاهان استفاده شده است، ولی به علت تکامل کم cpDNA، در سطح درون گونه‌ای به خوبی قابل استفاده نمی‌باشد. پژوهش‌های زیادی در زمینه بررسی رابطه فیلوژنی در خانواده *Rosaceae* صورت گرفته است. (Browicz,) Browicz (1969) و Khanuja و همکاران (Khanuja et al., 1999) جنس *Amygdalus* (ایرانی) را به دو زیرجنس *Amygdalus* و *Ddecandra* طبقه‌بندی نمودند. بخش *Amygdalus* شامل دو بخش *Amygdalus* و *Spartoides* بود. بخش *Amygdalus* شامل ۱۲ گونه می‌باشد که در دو زیرگروه رویشی کامل، تقسیم‌بندی شدند. محققین (Khanuja et al., 1999; Vadafar et al., 2010) بیان نمودند که تاکسونومی *Amygdalus* مانند سایر جنس‌های خانواده *Rosaceae* بسیار مشکل است. علت این امر میزان بالای تنوع در خصوصیات مورفولوژیکی تحت شرایط اکولوژیکی مختلف گزارش شده است (Khanuja et al., 1999). این جنس تنوع زیادی در سطح گونه، هیبریداسیون بالا در بین گونه‌ها و هوموپلاستی بالایی تحت شرایط اکولوژیکی نشان می‌دهد. بنابراین طبقه‌بندی‌های تاکسونومی ارائه شده که تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی صورت گرفته‌اند، اطلاعات کافی برای جداسازی گونه‌ها و تعیین حدود واضح بین گونه‌های این جنس ارائه نکرده‌اند. این امر ضرورت بررسی‌های مولکولی، بیوشیمیایی و میکرومورفولوژیکی

استخراج DNA انتخاب گردید. بدین منظور برگ گیاهان مورد استفاده در اوایل فصل بهار سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید و از روش تغییر یافته CTAB همراه با PVP^۲ (Khanuja et al., 1999) جهت استخراج DNA استفاده شد. فهرست آغازگرهایی که در این تحقیق برای تکثیر DNA استفاده گردید، همراه با توالی مربوط به آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف) مدل Mastercycler Gradient برای آغازگر ITS و trnL در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر حاوی بافر PCR (1x)، 2 mM MgCl₂، ۲۵۰ μM از هر dNTPs، ۰/۴ μM از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱/۵ واحد Taq DNA پلیمراز و ۵۰ نانوگرم DNA به شرح ذکر شده و بر اساس روش CTAB تغییر یافته (Murray and Thamson, 1980) همراه با PVP (Khanuja et al., 1999) انجام پذیرفت: ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد، ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مجدداً ۵ دقیقه دیگر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. فرآورده‌های تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید در ۰/۵x بافر TBE از یکدیگر تفکیک شدند. از فرآورده‌های حاصل توسط دستگاه gel documentation عکس‌برداری گردید. بعد از انجام الکتروفورز، مراحل همسانه‌سازی شامل خالص‌سازی فرآورده‌های PCR با استفاده از کیت (GeneJet PCR purification kit (Fermentas) و اتصال، انجام شد. برای تهیه سلول‌های مستعد (Competent) باکتری *E. coli* (سویه DH5A) از روش تغییر یافته کلریدکلسیم برانو استفاده شد. بعد از آن، مراحل تراریزش جهت انتقال پلاسمید مورد نظر به باکتری پذیرنده قطعه، انجام گرفت و سپس پلاسمید از باکتری‌های ترانسفورم شده؛ استخراج گردید.

را برای انجام طبقه‌بندی تاکسونومیک واضح و بررسی روابط خویشاوندی در بین گونه‌ها در این جنس را نشان می‌دهد.

در گزارش Lee and Wen (2001) (Lee and Wen) با استفاده از توالی‌های ITS، دو گروه بزرگ در داخل *Amygdaloideae* شناسایی و معرفی شدند: ۱- *Prunus* و ۲- *Maddenia*، *Exochorda*، *Oemleria* و *Pirensopia*. همچنین آنها با استفاده از این توالی‌ها دو گروه عمده را در داخل *Prunus* شناسایی نمودند که عبارتند از: ۱- *Amygdalus-Prunus* و ۲- *Cerasus-Laurocerasus-Padus*. همچنین این محققان با توجه به توالی‌های ITS، وجود روابط نزدیک بین زیرجنس‌های *Prunus* و *Amygdalus* را گزارش نمودند. Bortiri و همکاران (Bortiri et al., 2006) در پژوهش خود تلاش نمودند با استفاده از دو نشانگر ITS و trnL-F به بازسازی فیلوژنی *Prunus* بپردازند. آن‌ها نتوانستند رابطه‌ی درستی را در بین گونه‌های مربوط به زیرجنس *Amygdalus* با استفاده از trnL-F برقرار کرده و ارائه دهند و گزارش نمودند که *Amygdalus* پارافلیتیک^۱ می‌باشد. به عبارت دیگر بخشی از نوادگان این نیای مشترک تفاوت زیادی با بقیه گروه داشته و از این گروه برداشته و در دسته‌بندی‌ها جدا قرار داده شده‌اند. مطالعات مورفولوژیکی انجام شده و داده‌های مربوط به یک نشانگر مولکولی اغلب برای بررسی روابط سیستماتیک و تکاملی کافی نمی‌باشد. به همین دلیل در این پژوهش سعی شد از توالی‌های نوکلئوتیدی ITS1-5.8S rDNA-ITS2 و توالی‌های trnL کلروپلاستی برای مطالعه دقیق‌تر و جامع‌تر تاکسونومی *Prunus dulcis* و گونه‌های وحشی آن استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۲ گونه وحشی *Prunus*، یک رقم زراعی بادام و یک رقم هلو بود. اسم و مشخصات مواد گیاهی مورد استفاده در جدول ۱ آورده است. برگ به عنوان بافت مورد نظر برای

2- Polyvinylpyrrolidone

1- Paraphyletic

جدول ۱- مشخصات مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Profile of plant material used in this study

ردیف Row	نام گونه Species name	منشأ Origin	وضعیت سازگاری Compatibility status	پسوندد شماره Suffix
1	<i>P. arabica</i>	ایران	خودسازگار	KC603732
2	<i>P. bucharica</i>	افغانستان	خودسازگار	KC603733
3	<i>P. communis</i>	ایران	نامشخص	KC603734
4	<i>P. dulcis</i>	ایران	نامشخص	KC603735
5	<i>P. eleagnifolia</i>	مدیترانه	خودسازگار	KC603736
6	<i>P. glauca</i>	مدیترانه	خودسازگار	KC603737
7	<i>P. hausknechtii</i>	ایران	خودسازگار	KC603738
8	<i>P. kuramica</i>	افغانستان و پاکستان	خودسازگار	KC603739
9	<i>P. lycioides</i>	ایران	نامشخص	KC603740
10	<i>P. orientalis</i>	ایران	نامشخص	KC603741
11	<i>P. persica</i>	ایران	خودسازگار	KC603742
12	<i>P. scoparia</i>	ایران	نامشخص	KC603743
13	<i>P. tenella</i>	مدیترانه	نامشخص	KC603744
14	<i>P. webbii</i>	مدیترانه	خودسازگار	KC603745

جدول ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. The primers that used in this study

نام آغازگر (Primer name)	توالی آغازگر (5'-3') (Primer sequence (5'-3'))	منبع (Reference)
trnL-R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet <i>et al.</i> 1991
trnL-F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> 1991
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Baldwin 1993
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Baldwin 1993

پس از توالی‌یابی دو طرفه، توالی مربوط به پلاسمید، توسط برنامه EditSeq حذف شد. با توجه به یکسان بودن توالی‌های دو تکرار، در این آزمایش فقط توالی‌های مربوط به یک تکرار گزارش شد. داده‌های مربوط به توالی ناحیه^۱ trnL و ناحیه^۲ ITS1-5.8s rDNA-ITS2 و ناحیه^۳ trnL ژن کلروپلاستی ۱۲ گونه وحشی *Prunus*، یک رقم زراعی بادام و یک رقم هلو توسط برنامه CLUSTAL X هم-ردیف شدند. میزان تناسب هم‌ردیفی‌ها با آنالیز فیلوژنیک، به کمک روش آنالیز نقشه‌یابی حداکثر درست‌نمایی^۱ (LMA) و با بکارگیری نرم افزار TREE-PUZZLE-5.2 و براساس آنالیز چهار بخشی انجام گرفت. روش‌های حداکثر شباهت^۲ و اتصال همسایگی^۳ به منظور آنالیز ماتریس داده‌های حاصل، توسط نرم‌افزار PAUP*-4.0 beta مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش اطمینان از

از کیت BioReady *rTaq* (cat#:BSA12M1) ساخت شرکت BioFlux برای Colony PCR و *Taq* ساخت شرکت Qiagen برای PCR مربوط به توالی‌های trnL و ITS استفاده شد. روش Colony PCR جهت تأیید کلون-های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش جهت استخراج پلاسمید از کلونی‌های نوترکیب مثبت مورد تأیید، از کیت خالص‌سازی پلاسمید GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (#K0503) استفاده شد. غلظت هر یک از پلاسمیدهای نوترکیب مربوط به توالی‌های ITS و trnL با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندرف آلمان تعیین گردید. به منظور صحت انجام توالی‌یابی، از هر نمونه دو کلون انتخاب و استخراج پلاسمید انجام شد و نهایتاً به اندازه ۱۰۰ نانوگرم از هر پلاسمید جهت توالی‌یابی به شرکت MacroGene کره جنوبی ارسال شد.

1- Likelihood Mapping Analysis (LMA)
2- Maximum-parsimony
3- Neighbor joining

بنابراین روش حداکثر درست‌نمایی تعمیم شمارش نوترکیبی محسوب می‌شود. در واقع الگوریتم برآورد بهترین درست‌نمایی بر مبنای برآورد بهترین درست‌نمایی LOD تنظیم شده است.

با توجه به شکل ۱ (a)، تجزیه و تحلیل LMA داده‌های توالی ITS1-5.8S rDNA-ITS2 مواد ژنتیکی مورد مطالعه نشان داد که ۶۱/۹ درصد از کل داده‌های مورد مطالعه تجزیه و تحلیل فیلوژنی به خوبی دربر گیرنده اطلاعات بوده است. در ۱۱/۵ درصد تجزیه و تحلیل صورت نگرفت و ۲۶/۶٪ تکامل تدریجی را نشان داد. در حالی که تجزیه و تحلیل LMA برای داده‌های توالی trnL برای همین موارد به ترتیب ۳۳ درصد، ۶/۹ درصد و ۶۰/۱ درصد بود (شکل ۱ b). بر اساس اطلاعات این آنالیز، می‌توان گزارش نمود که trnL نشانگر خوبی برای شناسایی روابط فیلوژنی بادام نمی‌باشد.

فیلوژنی بادام با استفاده از داده‌های ناحیه ITS1-5.8S rDNA-ITS2 دندروگرام مربوط به داده‌های ناحیه ITS1-5.8S rDNA-ITS2، ارقام مورد مطالعه *Prunus* را به دو گروه (کلاد) اصلی تقسیم کرد (شکل ۲). گروه اصلی اول (شکل ۲، A1) نیز به دو گروه فرعی تقسیم شد. زیرگروه اول از گروه اصلی اول شامل گونه‌های: *P. elaeagnifolia*، *P. haussknechtii*، *P. tenella*، *P. glauca*، *P. bucharica*، *P. communis*، *P. persica*، *P. kuramica*، *P. webbii* بود. در بین این گونه‌ها، *P. haussknechtii* و *P. persica* گونه‌های اختصاصی ایران می‌باشند (Taberlet et al., 1991; Khatamsaz, 1992; Potter et al., 1999). یافته‌های این تحقیق با نتایج سایر پژوهش‌ها (Vadafar et al., 2014; Yazbek and Oh, 2013) مطابقت دارد.

زیرگروه دوم از گروه اصلی اول شامل گونه *P. dulcis* می‌باشد که این گونه از سایر گونه‌های وحشی بادام مورد مطالعه جدا می‌شود و شامل بیشتر ژنوتیپ‌های اهلی می‌باشد. در این زیرگروه (شکل ۲) *P. persica* در کنار *P. dulcis* قرار دارد که بیشترین خویشاوندی را با *P. dulcis* نشان می‌دهد. در این پژوهش *P. persica* به عنوان گونه خواهری *P. dulcis* معرفی شد.

نتایج حاصل، یکبار دیگر نیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega نسخه ۷ و روش NJ مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین برای افتراق بین گونه‌های مورد مطالعه لازم بود حداقل یک گروه خارجی^۱ در بررسی فیلوژنتیک وارد شود. در واقع این گروه خارجی، گونه همولوگ دیگری است که وابستگی کمتری به هریک از گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق، در مقایسه با وابستگی آن‌ها با یکدیگر دارد (Potter et al., 2000). گروه خارجی محل صحیح ریشه‌ی درخت را در مسیر تکاملی، مشخص می‌کند. آنالیز اولیه Outgroup چندین جنس از Rosaceae نتوانست *Prunus* را به خوبی جدا کند؛ لذا در این مطالعه، گونه *Physocarpus* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (Potter et al., 2000).

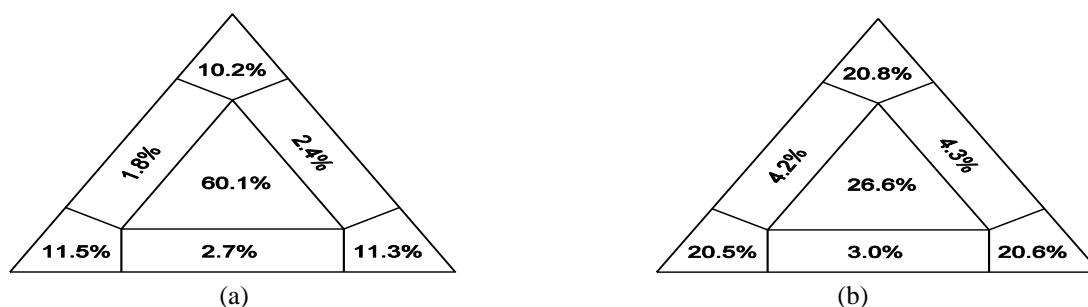
نتایج و بحث

در توالی‌های نوکلئوتیدی که با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 2.0,10 هم‌ردیف شده بودند، پس از بررسی‌های انجام شده در توالی‌های trnL و ITS مشخص شد هر چه به سمت انتهای ۳' نزدیک می‌شویم جابه‌جایی‌های بیشتری رخ داده و در توالی‌های trnL، این جابه‌جایی مربوط به جابه‌جایی گوانین به آدنین می‌باشد و بیشترین جابه‌جایی‌ها در توالی ITS مربوط به آدنین به گوانین و گوانین به آدنین می‌باشد. یک حذف مربوط به باز آدنین، در توالی trnL ژن کلروپلاستی در گونه *P. lycioides* و یک حذف در گونه *P. tenella* قابل گزارش است. یک حذف در توالی ITS ژن rDNA مربوط به باز آدنین در گونه *P. webbii* و یک حذف هم مربوط به باز گوانین در گونه *P. tenella* مشاهده شد.

آنالیز نقشه‌یابی حداکثر درست‌نمایی (LMA):

درست‌نمایی به معنای محاسبه احتمال وجود یک نقشه براساس داده‌های موجود می‌باشد؛ ولی می‌توان وجود بهترین نقشه را با حداکثر درست‌نمایی LMA تعیین نمود. منظور از بهترین نقشه، نقشه‌ای با بیشترین میزان درست‌نمایی است که از آن مقادیری از نوترکیبی به دست می‌آید. به عبارتی دیگر، اگر امکان شمارش عینی نوترکیب‌ها فراهم باشد، این نقشه بدست خواهد آمد و

1- Outgroup



شکل ۱- (a): آنالیز LMA مربوط به داده‌های ناحیه ITS1-5.8s rDNA-ITS2، (b): آنالیز LMA مربوط به داده‌های trnL ژن کلروپلاستی

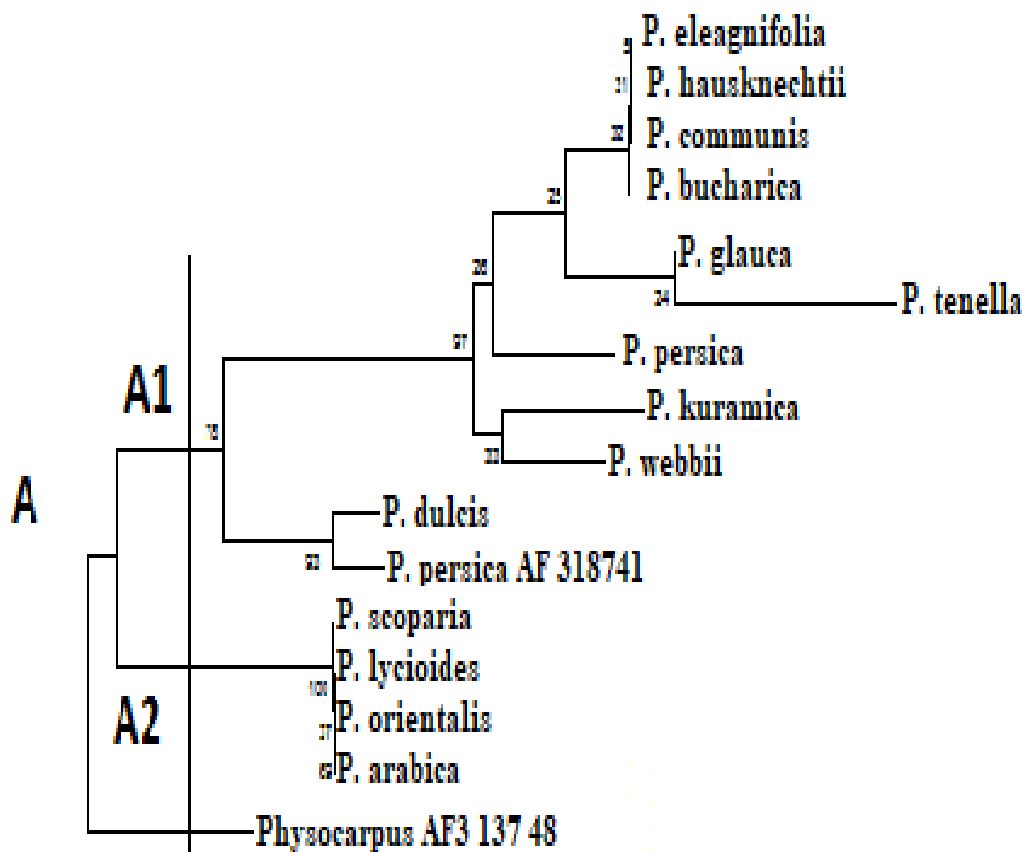
Figure 1. (a): LMA analysis related to ITS1-5.8s rDNA-ITS2 region data, (b): LMA analysis related to trnL data of chloroplastic gene.

گونه‌های *P. arabica* و *P. scoparia* در گروه اصلی دوم قرار دارند و *Socias i Company* و *Socias i Company* (i Company, 1998) نیز *P. arabica* و *scoparia.P* را در یک گروه قرار داد. Vadafar و همکاران (Vadafar et al., 2014) نیز با استفاده از خصوصیات تریکوم مورفولوژیکی میوه بر روی گونه‌های جنس *Amygdalus* این دو گونه را در یک گروه قرار دادند و بیان نمودند که یکی از خصوصیات بارز این گروه وجود شاخه‌های کوتاه^۱ می-باشد. با توجه به شکل ۲، *P. persica* و *P. dulcis* در یک گروه و نزدیک به هم قرار گرفتند.

Bortiri و همکاران (Bortiri et al., 2001) در گزارش خود بیان داشتند که *P. persica* از نظر ژنتیکی شباهت-های بسیار زیادی به *P. dulcis* دارد. همچنین *P. tenella* در گروه *Orientalis* قرار داده شد (i Company, 1998). از آنجایی که در دندروگرام حاصل از توالی ITS این پژوهش، این گونه نسبت به سایر گونه‌ها در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به *P. dulcis* قرار گرفته است، شاید دلیل آن این است که این گونه متعلق به بخش *chameamygdalus* باشد. این بخش شامل گونه‌هایی است که به سختی با گونه‌های زراعی تلاقی می‌یابند (Sorkheh et al., 2007). گزارش شده است که باید گونه *P. tenella* را از گروه *Amygdalus* جدا نمود (Yazbek and Oh, 2013). این مطلب نیز نتایج این پژوهش را تایید می‌نماید (شکل ۲).

همه گونه‌های موجود در گروه اصلی اول (به جز *P. tenella* بر اساس طبقه‌بندی سوشیاز آی کمپانی (i Company, 1998) در سری *Icosandrae* و در گروه *Amygdalus* قرار می‌گیرند. گروه (کلاد) اصلی دوم (شکل ۲، A2) شامل گونه‌های: *P. scoparia*، *P. arabica* و *P. orientalis lycioides* در بین این گونه‌ها *P. lycioides* انحصاری ایران است (Taberlet et al., 1991; Khatamsaz, 1992; Potter et al., 1999). بر اساس گزارش قبلی (i Company, 1998) نیز همه این گونه‌ها را در یک گروه (*Orientalis*) قرار گرفتند. *P. bucharica* و *P. kuramica* همراه با *P. dulcis* در گروه اصلی اول قرار دارند. همچنین با استفاده از nrDNA ITS گزارش گردید که *P. orientalis* و *P. scoparia* و *P. kuramica* در یک کلاد قرار دارند (Vadafar et al., 2014).

سرخه و همکاران (Sorkheh et al., 2007) روابط خویشاوندی گونه‌های وحشی جنس *Prunus* را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که گونه *P. bucharica* و *P. kuramica* از گونه‌های خویشاوند نزدیک بادام‌های زراعی می‌باشند. همچنین این محققان *P. communis* را به عنوان جد (نیای) بادام‌های زراعی معرفی نمودند. گونه *P. communis* که در زیرگروه اول از گروه اصلی اول قرار دارد، معمولاً به عنوان یکی از اجداد بادام‌های زراعی در نظر گرفته می‌شود. درجه شباهت بین *P. communis* با *P. dulcis* در مطالعه حاضر، تأیید کننده این مطلب است.

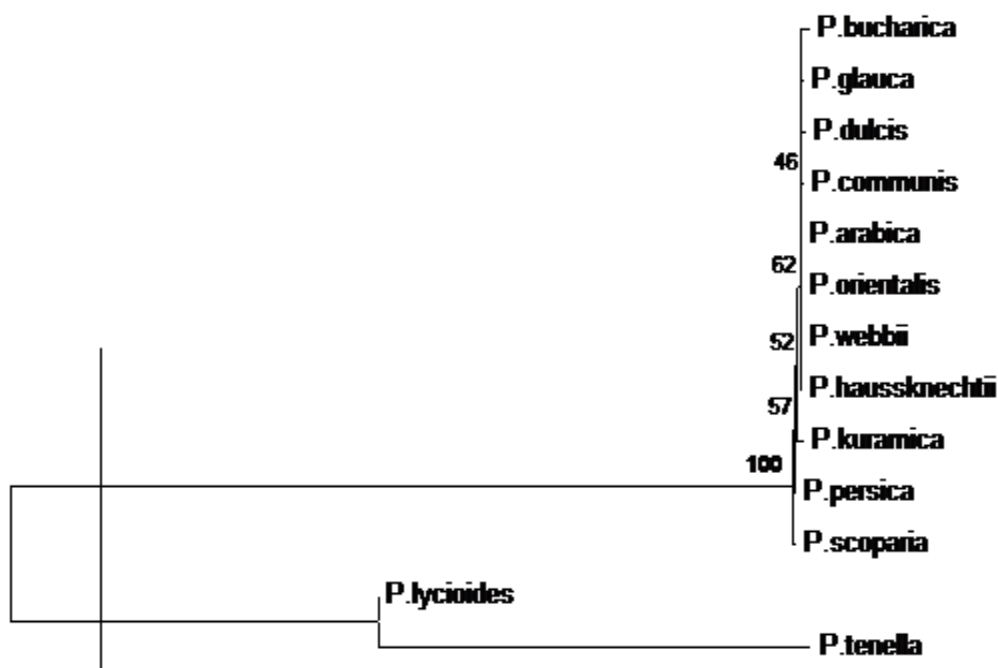


شکل ۲- گروه‌بندی گونه‌های وحشی بادام با استفاده از داده‌های ناحیه ITS1-5.8s rDNA-ITS2
Figure 2. Classification of wild almond, using data from ITS1-5.8s rDNA-ITS2 region

داده‌های ناحیه ITS دیده می‌شود، نسبت به سایر گونه‌ها در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به *P. dulcis* قرار گرفته است. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد به احتمال بسیار زیاد این گونه متعلق به بخش *chameamygdalus* است. این بخش شامل گونه‌هایی است که به سختی با گونه‌های زراعی تلاقی می‌یابند و در قسمت‌های شوروی سابق پراکنده هستند. این گونه، معروف به بادام پاکوتاه روسی می‌باشد. Sorkheh و همکاران (Sorkheh *et al.*, 2007) نیز با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی AFLP توانستند *P. tenella* را از سایر گونه‌ها جدا کنند. همان‌طور که Yazbek and Oh (Yazbek and Oh, 2013) گزارش کردند می‌توان بیان داشت که *P. tenella* به *Amygdalus* تعلق ندارد.

گونه *P. glauca* در طبقه‌بندی *Socias i Company* وجود ندارد، ولی با استفاده از دندروگرام حاصل از داده‌های ناحیه ITS و شباهت بسیار زیاد ناحیه ITS این گونه با سایر گونه‌های موجود در گروه *Amygdalus* می‌توان *P. glauca* را در گروه *Amygdalus* قرار داد. با توجه به دندروگرام حاصل از داده‌های ناحیه ITS می‌توان گفت که ITS تنها قادر به جدا کردن گروه‌های *Prunus* از یکدیگر می‌باشد و در جداسازی بخش‌ها توانایی لازم را ندارد.

فیلوژنی بادام با استفاده از داده‌های ناحیه *trnL* ژن کلروپلاستی: دندروگرام مربوط به داده‌های ناحیه *trnL* ژن کلروپلاستی (شکل ۳) که با استفاده از روش آنالیز Mega بدست آمد، به دو گروه اصلی تقسیم می‌شود. اولین گروه اصلی شامل گونه *P. tenella* و *P. lycioides* می‌باشد. *P. tenella* همچنان‌که در دندروگرام حاصل از



شکل ۳- گروه‌بندی گونه‌های وحشی بادام با استفاده از داده‌های ناحیه trnL ژن کلروپلاستی

Figure 3. Classification of wild almond species using trnL chloroplast genes data region

روابط بین گروه‌های جنس *Prunus* گزارش شده است. آن‌ها نتوانستند رابطه‌ی درستی را بین گونه‌های مربوط به زیرجنس *Amygdalus* با استفاده از trnL-F ارائه بدهند و عنوان نمودند که *Amygdalus* پارافلیتیک می‌باشد.

Gilani و همکاران (Gilani et al., 2010) با استفاده از بررسی توالی‌های trnL-F توانستند زیرجنس‌های *Amygdalus*، *Cerasus*، *Prunus*، *Padus* و *Laurocerasus* را از یکدیگر جدا کنند و همچنین *P. persica* و *P. dulcis* را در زیرجنس *Amygdalus* قرار دهند. در نتیجه می‌توان بیان داشت، trnL-F فقط قادر به جدا کردن زیرجنس‌های *Prunus* می‌باشد (Bortiri et al., 2006). همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود trnL نیز در این مطالعه تنها توانست *chameamygdalus* را از سایر بخش‌ها جدا کند و در جدا کردن بخش‌های *Euamygdalus* و *Spartioides* کارآمد نبوده است. این مطلب بیانگر شباهت زیاد توالی trnL ژن کلروپلاستی این دو بخش می‌باشد و همچنین توالی trnL بخش

قبلاً گزارش شده اسن که بخش *chameamygdalus* گونه‌هایی را در بر می‌گیرد که از نظر ژنتیکی نسبت به گونه‌های سایر بخش‌ها تنوع بیشتری پیدا کرده‌اند (Kester and Assay, 1991). بررسی توالی ژن MST توسط Bouhadida et al. و همکاران (Bouhadida et al., 2007) بیانگر روابط بسیار نزدیکی در بین هاپلوטיפ‌های *Amygdalus* (بخش *Euamygdalus*) است. آن‌ها بیان نمودند که احتمالاً DNA کلروپلاستی *P. tenella* نسبت به سایر گونه‌های *Amygdalus* بیشتر تحت عوامل ایجاد تنوع قرار گرفته است. با توجه به اندازه متفاوت ناحیه trnL ژن کلروپلاستی *P. tenella* این مطلب نیز تأیید می‌شود (اندازه توالی trnL همه گونه‌ها ۵۹۱bp بوده ولی اندازه توالی *P. tenella* ۵۹۰bp است). میزان فاصله ژنتیکی ناحیه trnL کلروپلاستی بسیار کم است که این موضوع محدودیتی در شناسایی روابط میان گونه‌های تحت بررسی می‌باشد. این محدودیت قبلاً توسط Bortiri و همکاران (Bortiri et al., 2001) نیز در شناسایی تعیین

بر اساس گزارشات قبلی (Bortiri *et al.*, 2006; Lee and Wen, 2001; Wen *et al.*, 2008) و مطالعه حاضر می‌توان گزارش نمود که ناحیه *ndhF* و *trnL-F* و *trnL* حتی در حد گونه هم حفاظت شده است. بنابر این برای جداسازی گونه‌های مربوط به زیرجنس *Amygdalus* باید نواحی دیگری از DNA کلروپلاستی مورد استفاده قرار گیرد. هرچند از نواحی ژن کلروپلاستی MST برای پیدا کردن جد مادری گونه‌های *Prunus* استفاده شد (Bouhadida *et al.*, 2007). Potter و همکاران (Potter *et al.*, 2000) روابط فیلوژنتیک *Rosaceae* را با استفاده از آنالیز پارسیمونی داده‌های حاصل از توالی‌یابی دو ناحیه از ژنوم کلروپلاست (ژن *Matk* و ناحیه *trnL-F*) مورد بررسی قرار دادند و به نتایجی مشابه با Bortiri و همکاران (Bortiri *et al.*, 2001) دست یافتند. نتایج حاصل از داده‌های *ITS* و *trnL* حاکی از آن است که *Prunus* مونوفیلیتیک می‌باشد. این نتایج با سایر مطالعات فیلوژنتیک مطابقت دارد (Bortiri *et al.*, 2001; Vadafar *et al.*, 2014). همچنین Bortiri و همکاران (Bortiri *et al.*, 2001) بیان داشتند که *Prunus* را نمی‌توان به دو یا چند جنس تقسیم کرد و دلیل آن را وجود شاخه‌های کوتاه در *Prunus* و فاصله ژنتیکی کم در بین گونه‌های *Prunus* در مقایسه با *Outgroup* می‌دانست. در دندروگرام‌های حاصل، برای هر جفت از گونه‌ها امکان تعیین فواصل ژنتیکی فراهم نشد و میانگین فاصله ژنتیکی در بین گونه‌ها کمترین فاصله ژنتیکی را در داخل جنس نشان داد. بنابراین، طبق آنالیز داده‌ها و یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت *Prunus* بصورت تک جنس^۱ می‌باشد که این مطلب با نتایج دیگران (Bortiri *et al.*, 2001) مطابقت دارد. این مطالعه می‌تواند اطلاعات مولکولی مفیدی برای حل مسأله فیلوژنتیک گونه‌های وحشی بادام ایران ارائه دهد و به طیف وسیع‌تری از گونه‌های بادام و توالی‌های مختلف مولکولی از ژن‌های مختلف و با درجه بالایی از تنوع نیاز است.

chameamygdalus نسبت به این دو بخش از تنوع بالاتری برخوردار است. با توجه به شباهت بسیار زیاد ناحیه *trnL* در گونه‌های وحشی بادام مورد مطالعه در این پژوهش، می‌توان گزارش کرد که جد مادری *Prunus* یکی می‌باشد و نشانگر *trnL* برای جداسازی گونه‌های وحشی بادام مناسب نیست.

فیلوژنی بادام با استفاده از داده‌های ناحیه ITS1-5.8s و rDNA-ITS2
 مشترک *trnL* و *ITS* با استفاده از نرم‌افزار PAUP گونه‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم نمود. Bortiri و همکاران (Bortiri *et al.*, 2006) عنوان نمودند که نتایج حاصل از داده‌های *ITS* و *trnL* همراه با هم به نتایج حاصل از آنالیز توالی‌های *ITS* شباهت بیشتری دارد و علت این موضوع را در تعداد بیشتر (دو برابر بیشتر) مکان‌های مؤثر (بیانگر اختلاف) می‌دانند و بیان می‌کنند که ترکیب داده‌های *ITS* و *trnL* باعث کاهش سطح هموپلاستی می‌شود. این موضوع نیز با نتایج حاصل از ترکیب داده‌های *ITS* و *trnL* در این تحقیق، مطابقت دارد.

Bortiri و همکاران (Bortiri *et al.*, 2006) از نواحی *ITS* و *trnL-F* به منظور ایجاد روابط فیلوژنی جنس *Prunus* استفاده نمودند و گزارش نمودند که *trnL-F* قادر به شناسایی روابط فیلوژنی *Rosaceae* نمی‌باشند و آنالیز ترکیبی *ITS* و *trnL-F* آن‌ها با آنچه Lee and Wen (Lee and Wen, 2001) گزارش نمودند، مبنی بر اینکه *trnL-F* نمی‌تواند روابط فیلوژنی *Rosaceae* را مشخص کند، همخوانی دارد. Wen و همکاران (Wen *et al.*, 2008) به بررسی ناحیه *ndhF* ژن کلروپلاستی به منظور تعیین روابط فیلوژنتیک در جنس *Prunus* پرداختند و بیان نمودند که درخت فیلوژنی مربوط به ناحیه *ndhF* با آنچه قبلاً در این باره گزارش شده بود، کاملاً توافق داشت. هرچند نتایج حاصل از توالی *ITS* آن‌ها با آنچه قبلاً گزارش شده بود (Bortiri *et al.*, 2006; Lee and Wen, 2001)، تناقض داشت.

1- Single genus

References

- Baldwin, B.G.** (1993). Molecular phylogenetic of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *American Journal of Botany*, **80**: 222-238.
- Baldwin, B.G., Sanderson, G.M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.E., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J.** (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**: 247-277.
- Bortiri, E., Oh, S.H., Jiang, J., Baggett, S., Granger, A., Weeks, C., Buckingham, M., Potter, D. and Parfitt, D.E.** (2001). Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany*, **26**: 797-807.
- Bortiri, E., Vanden, H. and Potter, D.** (2006). Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany*, **26**: 797-807.
- Bouhadida, M., Martin, J.P., Eremin, G., Pinochet, J., Moreno, M.A. and Gogorcena, Y.** (2007). Chloroplast DNA diversity in *Prunus* and its implication on genetic relationships. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **132(5)**: 670-679.
- Browicz, K.** (1969). *Amygdalus*. In: Rechinger, K.H. (ed.), *Flora Iranica: Rosaceae*, Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz. 166-187.
- Gilani, S.A., Qureshi, R.A., Khan, A.M. and Potter, D.** (2010). A molecular phylogeny of selected species of genus *Prunus* L. (Rosaceae) from Pakistan using the internal transcribed spacer (ITS) spacer DNA. *African Journal of Biotechnology*, **9(31)**: 4867-4872.
- Kester, D.E. and Assay, R.** (1975). Almond", In: Advance in fruit breeding (ed. Janick J. and J. N. Moore), Purdu Univ. Press West Lafayette, Indiana, 387-419.
- Kester, D.E., Gradziel, T.M. and Grassely, C.** (1991). Almonds (*Prunus*), In: M. Moore and J.R. Ballington. Jr. (eds). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 701-758.
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P. and Kumar, S.** (1999). *Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plant Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential oils*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Khatamsaz, M.** (1992). *Flora of Iran. No. 6: Rosaceae*, Research Institute of Forest and rangelands.
- Lee, S. and Wen, J.** (2001). A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, **88**: 150-160.
- Martinez-Gomez, P., Arulsekhar S., Potter D. and Gradziel, T.M.** (2003). An extended inter-specific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica*, **131**: 313-322.
- Potter, D., Gao, E., Oh, S.H. and Baggett, S.** (1999). Molecular phylogenetic studies in Rosaceae. P. 39. in International Botanical Congress-Abstracts.
- Potter, D., Lubyand, J.J. and Harrison, R.E.** (2000). Phylogenetic relationships among species of *ragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, **25**: 337-348.
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K. and Chaparro, J.** (2012). Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematic and Evolution*, **298**: 173-192.
- Socias i Company, R.** (1998). La taxonomie de l'amandier. *Cahiers Options Mediterr*, **33**: 91-93.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T.M., Epperson, B.K., Martinez-Gomez, P. and Asadi, E.** (2007). Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, **156**: 327-344.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J.** (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17(5)**: 1105-1109.
- Vadafar, M., Attar, F. and Maroofi, H.** (2010). Trichome micromorphology in drupe of *Amygdalus* L. (Rosaceae) from Iran. *Acta Botanica Croatica*, **69(1)**: 93-105.

- Vadafar, M., Kazempour, S.H. and Attar, F.** (2014). Molecular phylogeny of the genus *Amygdalus* (Rosaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA trnS-trnG sequences. *Turkish Journal of Botany*, **38**: 439-452.
- Wen, J., Berggren, S.T., Lee, C.H., Ickert-Bond, S., Yi, T.S., Yoo, K.O., Xie, J., Shaw, D. and Potter, D.** (2008). Phylogenetic inferences in *Prunus* (Rosaceae) using chloroplast ndhF and nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Systematics and Evolution*, **46(3)**: 322-332.
- Yazbek, M. And Oh S.H.** (2013). Peaches and almonds: phylogeny of *Prunus* subg. *Amygdalus* (Rosaceae) based on DNA sequence and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, **299**: 1403-1418.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8(19)**: 4321-4325.

Study on Phylogenetic Relationship among some of Iranian Wild Almond Species using Sequences of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and Chloroplastic trnL

Seyedeh Zahra Hosseini¹, Behroz Shiran² and Mohammad Ali Ebrahimi^{3,*}

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: June 20, 2018 – Accepted: October 20, 2018)

Abstract

Phylogenetic relations among 12 wild species of almonds, one cultivated almond and one species of peach were investigated by using of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences and trnL region of chloroplast DNA. To do this, maximum-parsimony and neighbor joining analysis adopted. Results of ITS data showed that studied species of *Prunus* only divided in two groups but incapable to separate different sections. *P. tenella* showed more diverse genetic distance in compare to other studied species and it seems that this species does not belong to *Amygdalus*. Also, by using the ITS data it can be reported that *Prunus* is monophyletic. In this research, the genetic distances for each pair of species were determined and the average genetic distance between species shows only the lowest genetic distance within the genus. Therefore, *Prunus* is a single genus. Regarding its high similarity of trnL region in wild almond species, it can be reported that maternal ancestor of *Prunus* is the same and trnL is not optimum marker to separate species of almond.

Keywords: Phylogeny, ITS1-5.8S rDNA-ITS2, *Prunus* species, trnL chloroplast

* Corresponding Author, E-mail: ma_ebrahimi@pnu.ac.ir