

ارزیابی تنوع ژنتیکی سنجد با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی و مولکولی AFLP

رویا زیرک^۱، علی سلیمانی^{۲،*}، مهرشاد زین‌العابدینی^۳، حمید حاتمی ملکی^۴ و عزیزاله خیری^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۳- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۴- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

۵- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹)

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی تعداد ۳۰ ژنوتیپ سنجد متعلق به زیستگاه‌های استان آذربایجان شرقی (مناطق تبریز، مراغه و ملکان) با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی و مولکولی AFLP ارزیابی شد. نتایج آماره‌های توصیفی صفات کمی و کیفی بیانگر وجود تنوع در ژرم پلاسما مورد ارزیابی بود. با استفاده از الگوریتم UPGMA بر پایه صفات کمی و کیفی، ژنوتیپ‌ها در ۵ گروه قرار گرفتند. در گروه اول بیشتر ژنوتیپ‌های منطقه مراغه و در گروه سوم بیشتر ژنوتیپ‌های منطقه تبریز قرار گرفتند. از تعداد ۱۴ ترکیب آغازگر EcoRI-MseI برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها استفاده شد و در مجموع تعداد ۴۳۹ نوار چند شکل تکثیر شد. براساس معیار تشابه جاکارد، کمترین شباهت ژنتیکی (۲۵ درصد) بین ژنوتیپ‌های ۱۹ (منطقه ملکان) و ۲۷ (منطقه مراغه) مشاهده شد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی بیانگر پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای AFLP انتخاب شده در این مطالعه بود. بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکل (۰/۸۳ درصد) مربوط به ترکیب آغازگری EGA-MTTT و کمترین مقدار آن (۰/۳۳ درصد) مربوط به ترکیب آغازگری ETA-MGT بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌ها را در ۳ گروه قرار داد. بر این اساس توده‌هایی با توزیع مناطق جغرافیایی مشابه در کنار هم قرار نگرفتند، لیکن گروه‌بندی بر اساس صفات مرفولوژیکی کمی و کیفی تا حدود زیادی با توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها همخوانی نشان داد. این نتایج بر اساس نظریه تکامل همگرا و تا حدودی بدلیل تکثیر غیرجنسی سنجد از ژنوتیپ‌های مادری محدود و توزیع آنها در مناطق جغرافیایی مورد مطالعه، قابل تفسیر می‌باشد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، سنجد، صفات کمی، AFLP

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: asoleimani@znu.ac.ir

این نویسندگان مشارکت یکسانی در این مقاله دارند.

مقدمه

درخت سنجد با نام علمی *Elaeagnus angustifolia* L. (دیپلوئید، $2n=28$) از خانواده Elaeagnaceae بوده که در کشورهای دیگر با نام زیتون روسی^۱ نیز شناخته می‌شود (Arohonka and Rousi, 1980). از این خانواده گیاهی حدود ۷۷ گونه مختلف و از سه جنس *Elaeagnus*، *Hippophae* و *Shepherdia* در سراسر جهان وجود دارند. سنجد در نواحی سرد و معتدل رشد نموده و رویشگاه این درخت به دلیل سازگاری آن با محیط‌های مختلف در اغلب مناطق از جمله آمریکای شمالی، اروپای شرقی و غربی، آسیای مرکزی و شمالی است (Sun and Lin, 2010). سنجد یک درخت برگ‌ریز و گاهی اوقات درختچه با ارتفاع ۱۰ متر است که گل‌های آن زرد و بیضی و خودناسازگار بوده که برای تولید میوه نیاز به دگرگرده‌افشانی دارد (Pan et al., 2011). خواص دارویی درخت سنجد در تمام اندام‌های آن وجود دارد به طوری که ریشه، چوب، پوست و میوه آن دارای خواص دارویی و صنعتی متفاوتی است. مطالعات فیتوشیمیایی عصاره میوه و گل سنجد نشان دهنده حضور مواد موثره-ایی از قبیل پلی‌ساکاریدها، فلاونوئیدها، ساپونین، کارتنوئیدها و انواع مختلف تانن می‌باشد (Elmi et al., 2016). ترکیبات استری و اسیدهای آروماتیک ترکیبات اصلی در عصاره گل این گیاه می‌باشد. گیاه سنجد همچنین نقش بسیار مهمی در حفظ اکوسیستم طبیعت به دلیل تحمل بالای آن به خشکسالی شدید و شرایط شوری بالا و قلیائیت خاک ایفا می‌کند (Asadiar et al., 2012).

تنوع ژنتیکی از ملزومات به‌نژادی گیاهی است که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است. اطلاع از محتوی و سطح تنوع ژنتیکی منابع گیاهی برای هر محصول مهمترین گام در جهت برآورد اهداف به‌نژادی گیاهی می‌باشد. در این بین شناخت خویشاوندی‌های ژنتیکی به منظور مدیریت ژرم‌پلاس، حفظ و نگهداری آن، انگشت‌نگاری‌های

ژنتیکی، گزینش ژنوتیپ‌ها، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین مکان و جداسازی ژن‌ها و همچنین شناسایی والدین مطلوب جهت تولید واریته‌های هیبرید و در نهایت تدوین برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (Fufa et al., 2005). به منظور تخمین تنوع ژنتیکی انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط به‌نژادگران گیاهی استفاده می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. در این بین استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر توالی DNA امکان بررسی تنوع ژنتیکی را از طریق بررسی مستقیم ژنوم موجود زنده بدون متأثر شدن از شرایط محیطی امکان‌پذیر می‌سازد (Doveri et al., 2008). نشانگر AFLP^۲ یا چند شکلی طولی قطعات تکثیری از جمله مهمترین نشانگر-های DNA است که با استفاده از این روش به طور همزمان حدود ۱۰ - ۵۰ ناحیه ژنومی با اندازه تقریبی ۸۰-۵۰۰ جفت باز تکثیر می‌شود و دارای تکرارپذیری بالایی است (Guo et al., 2005). این نشانگر یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR است که ترکیبی از RFLP و RAPD بوده و شامل هضم DNA ژنومی با آنزیم‌های برشی خاص و اتصال سازگارهای چندنوکلئوتیدی کوتاه به انتهای قطعات برش یافته و سپس تکثیر قطعات ایجاد شده با کمک PCR می‌باشد. این روش تفاوت در مکان‌های برشی را آشکار می‌کند و حساسیت بسیار زیادی در آشکارسازی چند شکلی در سراسر ژنوم دارد و بدلیل قابلیت تکرارپذیری بالا بر RAPD برتری دارد. همچنین، به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد مطالعه و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا، امروزه به طور وسیعی برای تهیه نشانگرهای چند شکل استفاده می‌شود (Vos et al., 1995).

گزارشات مختلفی در زمینه استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی و ژنتیکی در ارزیابی ژرم‌پلاس سنجد وجود دارد. در مطالعه‌ای با استفاده از صفات مرفولوژیکی و نیز ۷ آغازگر RAPD به همراه ۱۵ آغازگر ISSR، تنوع

2- Amplified fragment length polymorphism

1- Russian Olive

تعداد ۳۰ ژنوتیپ مختلف سنجد جمع‌آوری شده از سه منطقه مرکزی (شهرستان تبریز) و جنوبی (شهرستان‌های مراغه و ملکان) استان آذربایجان شرقی (واقع در شمال غرب کشور ایران) می‌باشند (جدول ۱).

ارزیابی مورفولوژیکی و ژنتیکی: ارزیابی‌های مورفولوژیکی با استفاده از توصیف‌گرهای مربوط به گیاه سنجد (Talebi-Rad et al., 2015) انجام گردید. در این پژوهش علاوه بر صفات کمی (جدول ۲)، صفات کیفی از قبیل شکل پهنک برگ، شکل انتهای برگ، رنگ سطح زیری و رویی برگ، رنگ پوست میوه، رنگ گوشت میوه، تیپ دم‌برگ و وجود کرک در سطح میوه ارزیابی شدند. به منظور بررسی ساختار ژنوتیپی نمونه‌های سنجد، ابتدا استخراج DNA از برگ‌های سر شاخه‌های جوان گیاه توسط روش CTAB تغییر یافته (Vroh et al., 1996) انجام گرفت و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردیدند. در ادامه انگشت‌نگاری ژنوم جمعیت سنجد، با استفاده از نشانگر AFLP و مطابق با روش وس و همکاران (Vos et al., 1995) انجام شد. در این تحقیق، از آنزیم‌های برشی MseI و EcoRI و تعداد ۱۴ ترکیب آغازگری (جدول ۲) استفاده گردید.

تجزیه آماری داده‌ها: در مورد داده‌های کمی و کیفی مورد بررسی، ابتدا آزمون شناسایی داده‌های پرت، تست نرمال بودن داده‌ها کمی و خطاها صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ضرایب همبستگی فنوتیپی بین میانگین صفات محاسبه گردید. به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی، تجزیه کلاستر به روش UPGMA و مقیاس فاصله مربع اقلیدوسی با استفاده از متغیرهای استاندارد شده انجام شد. تجزیه‌های آماری از طریق نرم‌افزارهای SPSS 20 و MINITAB 16.2.0 انجام گردید.

ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف سنجد (۵۶ ژنوتیپ) مربوط به منطقه آناتولی مرکزی ترکیه مورد مطالعه قرار گرفت (Uzun et al., 2015). نتایج نشان داد که تغییرات مورفولوژیکی زیادی از نظر ویژگی‌های میوه در بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده وجود دارد و نتایج داده‌های ملکولی نیز وجود چنین تنوعی را تایید نمود. در این راستا، طالبی راد و همکاران (۲۰۱۵) نیز ترکیبی از ۱۹ صفت مورفولوژیکی را به همراه نشانگرهای RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی و وجود یا عدم وجود ارتباط بین تنوع ژنتیکی و خصوصیات مورفولوژیک را بررسی کردند. در این مطالعه پنج جمعیت سنجد جمع‌آوری شده از استان آذربایجان شرقی (شامل ۲۰ اصله درخت سنجد) مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های سنجد منطقه جلفا با میانه و بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های جلفا با مرند مشاهده شد. در پژوهش دیگری، تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاس سنجد در استان آذربایجان غربی توسط اسدی‌ار و همکاران (۲۰۱۲) در ۹ منطقه از جنوب استان آذربایجان غربی و با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بررسی گردید و کارایی این سیستم نشانگری در ارزیابی تنوع ژنتیکی سنجد به اثبات رسید.

منطقه شمال غرب کشور یکی از خاستگاه‌های مهم گیاه سنجد می‌باشد. از طرفی، با وجود ارزش دارویی و غذایی فراوان گیاه سنجد و همچنین پتانسیل بالا برای تولید و صادرات این محصول به بازارهای جهانی، متأسفانه مطالعه چندانی روی خصوصیات رویشی و ژنتیکی سنجد بویژه در این رویشگاه‌ها انجام نگرفته است. این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های مختلف سنجد در بخش مرکزی و جنوبی استان آذربایجان شرقی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر،

جدول ۱- کد، نام و مکان ژنوتیپ‌های سنجد مورد مطالعه

Table 1. The code, name and location of evaluated Russian olive genotypes

کد ژنوتیپ	مکان ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	مکان ژنوتیپ
Genotype code	Genotype location	Genotype code	Genotype location
G01	تبریز Tabriz	G16	ملکان Malekan
G02	تبریز Tabriz	G17	ملکان Malekan
G03	تبریز Tabriz	G18	ملکان Malekan
G04	تبریز Tabriz	G19	ملکان Malekan
G05	تبریز Tabriz	G20	مراغه Maragheh
G06	تبریز Tabriz	G21	مراغه Maragheh
G07	تبریز Tabriz	G22	مراغه Maragheh
G08	تبریز Tabriz	G23	مراغه Maragheh
G09	تبریز Tabriz	G24	مراغه Maragheh
G10	تبریز Tabriz	G25	مراغه Maragheh
G11	تبریز Tabriz	G26	مراغه Maragheh
G12	تبریز Tabriz	G27	مراغه Maragheh
G13	ملکان Malekan	G28	مراغه Maragheh
G14	ملکان Malekan	G29	مراغه Maragheh
G15	ملکان Malekan	G30	مراغه Maragheh

نشانگر i ام هنگام وجود نوار و (1-fi) فراوانی قطعه نشانگر i ام در حالت عدم وجود نوار است. همچنین، پارامترهای تعداد آلل مؤثر، میزان شاخص نی و شاخص شانون با استفاده از نرم افزار PopGene32 محاسبه گردیدند.

نتایج و بحث

ارزیابی مرفولوژیکی ژرم پلاسما سنجد: نتایج تجزیه واریانس صفات کمی و کیفی بیانگر وجود تفاوت معنی-

برای داده‌های نشانگر ملکولی ابتدا ماتریس صفر و یک، براساس عدم حضور و حضور باند ایجاد گردید و سپس تشابه بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد و دایس محاسبه گردیدند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ماتریس تشابه محاسبه شد و الگوریتم UPGMA در نرم افزار NTSYS انجام گرفت. شاخص محتوی اطلاعات چند شکلی^۱ مطابق با رابطه $PIC_i = 2 \text{ fi} (1-\text{fi})$ برآورد شد که در این رابطه PIC_i ، نشانگر i ام، fi فراوانی قطعه

1- Polymorphism Information Content

وزن برگ (۴۹/۴۲) مشاهده گردید که بیانگر کارا بودن چنین متغیرهایی در برنامه‌های گزینشی برای به‌نژادگران گیاهی است.

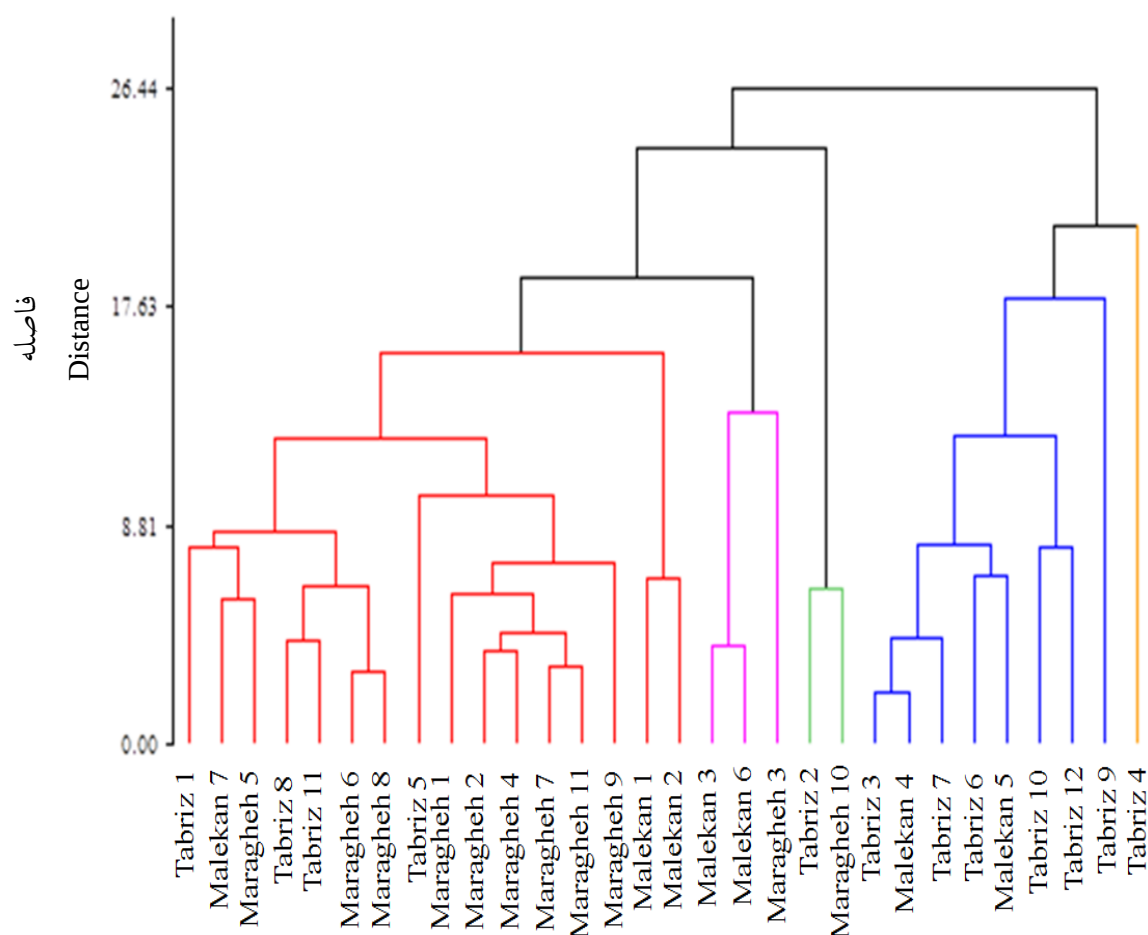
وجود تنوع در ژرم‌پلاس‌م سنجد از طریق مطالعه صفات مرفولوژیکی در گزارشات قبلی و توسط طالبی‌راد و همکاران (Talebi-Rad et al., 2015) و اوزن و همکاران (Uzun et al., 2015) نیز گزارش شده است. طالبی‌راد و همکاران (Talebi-Rad et al., 2015)، با استفاده از تعداد ۱۹ صفت مرفولوژیکی تنوع ژنتیکی را در میان پنج جمعیت سنجد جمع‌آوری شده از استان آذربایجان شرقی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت جلفا و میانه (۰/۱۶) و بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت جلفا و مرند (۰/۹۵) مشاهده شد.

دار بین ژنوتیپ‌های مختلف سنجد از لحاظ صفات ریخت‌شناسی می‌باشد (داده‌ها ارائه نشدند). چنین تنوعی، گزینش بین ژنوتیپ‌های مختلف سنجد در جهت بهبود آن از طریق برنامه‌های به‌نژادی گیاهی را امکان‌پذیر می‌سازد. آماره‌های توصیفی صفات کمی شامل میانگین، حداقل، حداکثر و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مرفولوژیکی در جدول ۲ خلاصه گردیده است. صفت طول برگ بین ۲/۸ تا ۸/۵ سانتی‌متر، عرض برگ بین ۰/۹ تا ۳ سانتی‌متر، طول دم‌برگ بین ۲ تا ۲۰ میلی‌متر، وزن تر برگ در محدوده ۰/۱۳۹ تا ۰/۲۷۷ گرم، طول دم‌برگ میوه ۱/۵ تا ۱۱ میلی‌متر، قطر طولی میوه بین ۱/۳ تا ۴ سانتی‌متر، قطر عرضی میوه ۰/۷ تا ۲/۳ سانتی‌متر، اندازه هسته بین ۱/۲ تا ۲/۹ سانتی‌متر، وزن گوشت میوه در محدوده ۰/۴۵۷ تا ۳/۰۰۲ گرم و وزن هسته در محدوده ۰/۲۰۹ تا ۰/۸۲ گرم متغیر بودند. بیشترین مقدار ضریب تغییرات در صفت

جدول ۲- آمارهای توصیفی صفات مرفولوژیکی کمی در ژنوتیپ‌های سنجد

Table 2. Descriptive statistics of morphological-quantitative traits among Russian olive genotypes

صفت Trait	میانگین Mean	ضریب تغییرات Coefficient of variation	حداقل Minimum	حداکثر Maximum
طول برگ (cm) Leaf length	5.40	21.94	2.8	8.50
عرض برگ (cm) Leaf diameter	1.56	23.78	0.9	3.00
طول دم‌برگ (mm) Petiole length	9.93	32.75	2.00	20.00
وزن برگ (gr) Leaf weight	0.10	49.42	0.01	0.27
طول دم میوه (mm) Fruit tail length	4.72	48.01	1.50	11.00
قطر طولی میوه (cm) Fruit longitudinal diameter	2.51	19.91	1.30	4.00
قطر عرضی میوه (cm) Fruit crosswise diameter	1.55	18.80	0.70	2.30
اندازه هسته (cm) Fruit stone size	2.02	18.26	1.20	2.90
وزن گوشت میوه (gr) Fruit pulp weight	1.28	37.96	0.45	3.00
وزن هسته (gr) Fruit stone weight	0.53	22.98	0.20	0.82



شکل ۱- گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سنجد براساس صفات کمی با استفاده از الگوریتم UPGMA
Figure 1. Dendrogram (UPGMA algorithm) of 30 Russian olive genotypes based on genetic distances calculated using quantitative traits

گروه‌بندی ذکر شده، بیشترین میزان فاصله بین دو گروه ۴ و ۵ (۶/۶۳) و نزدیکترین گروه‌ها، گروه ۱ و ۳ با فاصله ۳/۲۱ شناسایی شدند (جدول ۳). اطلاعات حاصل از فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌ها می‌تواند در صورت وجود پدیده هتروزیس (برتری نتاج نسبت به والدین) در برنامه‌های دورگ‌گیری مفید باشد. انتخاب کلونی و انتخاب از طریق نتاج حاصل از هیبریداسیون دو روش اساسی در برنامه به‌نژادی درختان و درختچه‌های میوه و دارویی می‌باشد. برای نمونه در گردو و با دوره نونهالی حدود ۱۰ الی ۱۲ سال برنامه‌های به‌نژادی گیاهی از طریق هیبریداسیون انجام می‌شود حال آنکه در مورد وجود

محققین معمولاً جهت انتخاب بهترین والدین در هر تلاقی در پی ارقام یا ژنوتیپ‌هایی هستند که از هم دور باشند که این امر می‌تواند از طریق بررسی فاصله بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای بدست آید. بر اساس نتایج تجزیه‌ای خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از ویژگی‌های کمی مرفولوژیک (شکل ۱)، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در ۵ دسته طبقه‌بندی شدند. از ۳۰ ژنوتیپ مورد بررسی، ۱۶ ژنوتیپ در گروه اول، ۲ ژنوتیپ در گروه دوم، ۸ ژنوتیپ در گروه سوم، یک ژنوتیپ در گروه چهارم و ۳ ژنوتیپ در گروه پنجم قرار گرفتند. در گروه اول اکثر ژنوتیپ‌های منطقه مراغه و در گروه سوم اکثر ژنوتیپ‌های منطقه تبریز قرار گرفتند. در

در این مطالعه توانمندی نشانگر مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سنجد بوضوح نشان داده شد، بطوریکه تعداد ۱۴ ترکیب نشانگری AFLP مورد استفاده، در مجموع ۴۳۹ مکان ژنی چندشکل تکثیر نمودند. این در حالی است که مطالعه مشابه با استفاده از ۱۸ ترکیب نشانگر ملکولی SRAP روی ۱۶ ژنوتیپ سنجد از شش استان ایران، تنها ۶۹ مکان ژنی چندشکل مشاهده شد (Taghipour, 2013). نشانگر AFLP با دسترسی به نرخ بالایی از چندشکلی، امکان ارزیابی کارا و سودمندی را در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی گیاه سنجد فراهم ساخت. چنین کارایی بالا برای نشانگر AFLP در تحقیقات سایر گونه‌های گیاهی از قبیل ارزیابی تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ گیاه *Tectona grandis* L. با استفاده از ۵ ترکیب آغازگر (Vaishnav et al., 2018) و ۲۱۰ ژنوتیپ گیاه *Dactylis glomerata* L. از بین ۱۴ جمعیت با استفاده از ۶ ترکیب آغازگر (Zhang et al., 2018) نیز گزارش شده است.

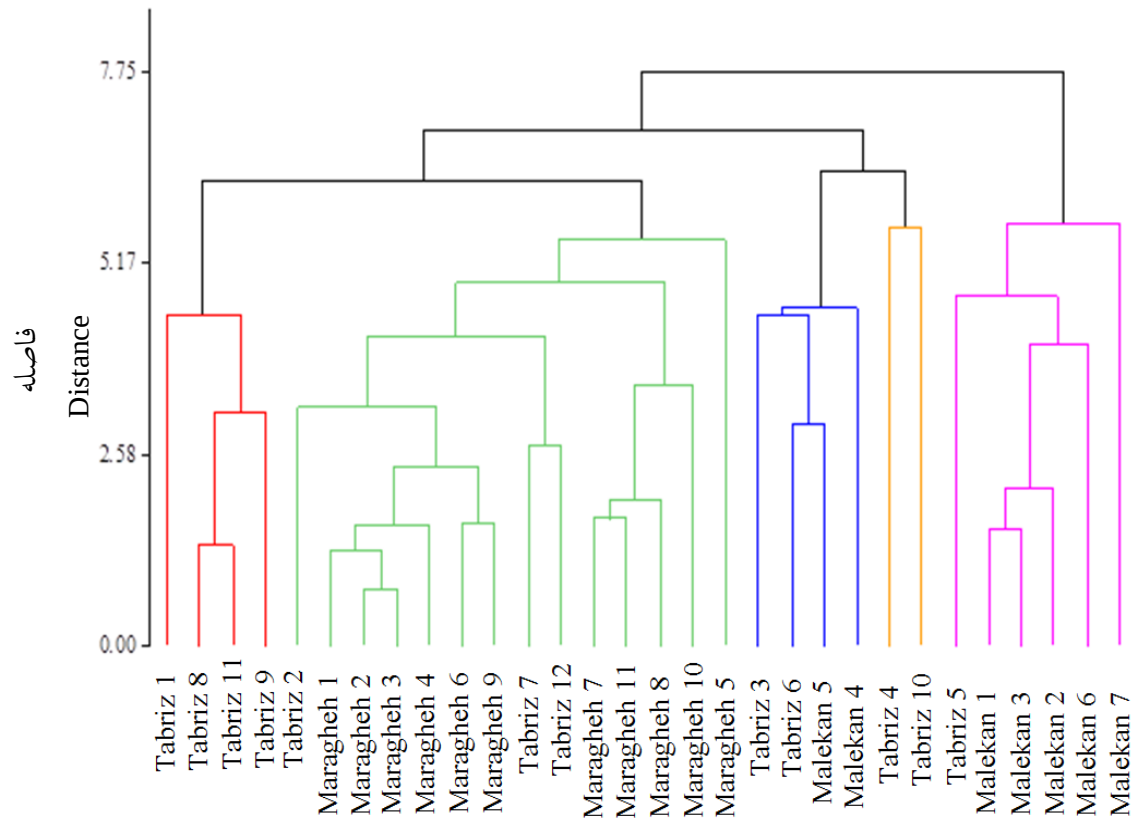
هتروزیس (برتری نتاج نسبت به والدین) در سنجد گزارشی وجود ندارد. در این تحقیق، مشابه با گروه‌بندی صفات کمی، ژنوتیپ‌های سنجد با استفاده از ویژگی‌های کیفی و الگوریتم UPGMA نیز در ۵ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). گروه اول شامل ۱۴ ژنوتیپ، گروه دوم ۴ ژنوتیپ، گروه سوم ۴ ژنوتیپ، گروه چهارم ۲ ژنوتیپ و گروه پنجم ۶ ژنوتیپ را دارا بودند. با توجه به شکل ۲، در گروه اول بیشتر ژنوتیپ‌های مراغه و در گروه پنجم بیشتر ژنوتیپ‌های ملکان قرار داشتند و گروه‌های دوم و چهارم تنها شامل ژنوتیپ‌های تبریز بودند.

انگشت‌نگاری ژرم‌پلاسم سنجد با نشانگرهای AFLP: تعداد ۱۴ ترکیب نشانگری AFLP مورد استفاده قرار گرفتند که در مجموع ۴۳۹ مکان ژنی (نوار) را تکثیر نمودند که همگی چندشکل بودند (جدول ۴). تعداد نوارهای تکثیری توسط ترکیبات آغازگری بین ۵۱ نوار در ترکیب آغازگری MGT, ETA تا ۲۲ نوار در ترکیب آغازگری ECT, MGAG متغیر بودند (شکل ۳).

جدول ۳- فاصله بین جفت گروه‌های حاصل از خوشه‌بندی ژنوتیپ‌های سنجد بر اساس صفات کمی

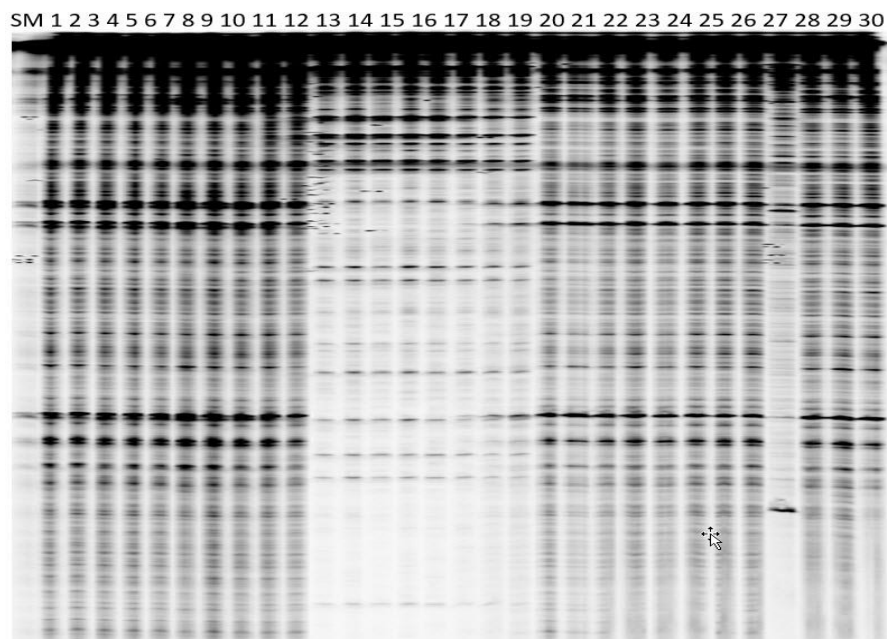
Table 3. The distance between different group pairs, resulted from clustering of Russian olive genotypes based on quantitative traits

گروه ۵	گروه ۴	گروه ۳	گروه ۲	گروه ۱	—	تعداد ژنوتیپ
Group 5	Group 4	Group 3	Group 2	Group 1		Number of Genotype
				0	گروه ۱	16
			0	4.18	Group 1	
					گروه ۲	2
			6.43	3.21	Group 2	
		0			گروه ۳	8
					Group 3	
	0	3.97	5.64	4.02	گروه ۴	1
					Group 4	
0	6.63	5.84	4.15	3.18	گروه ۵	3
					Group 5	



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سنجد براساس داده‌های صفات کیفی با استفاده از الگوریتم UPGMA

Figure 2. Dendrogram (UPGMA algorithm) of 30 Russian olive genotypes based on genetic distances calculated using qualitative traits



شکل ۳- انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های سنجد (۱ تا ۳۰) با استفاده از نشانگر ملکولی AFLP روی ژل پلی‌آکریل‌آمید

Figure 3. Fingerprinting of Russian olive genotypes (1-30) using AFLP markers on Polyacrylamide gel

جدول ۴- اطلاعات ژنتیکی حاصل از ۱۴ ترکیب نشانگر AFLP در بین ۳۰ ژنوتیپ

Table 4. The genetic information generated by 14 AFLP primer combinations among 30 genotypes of Russian olive

ردیف	ترکیب آغازگر	تعداد مکان ژنی تکثیر شده	تعداد آل موثر	شاخص نی	شاخص شانون	محتوای اطلاعات چندشکلی
Row	Primer combinations	Amplified Loci No.	Effective allele No.	Nei index	Shannon index	Polymorphic information content (PIC)
1	GT+E-TM-A	51	1.68	0.39	0.57	0.33
2	M-GAG+E-TA	26	1.57	0.36	0.54	0.73
3	M-CAG+E-TA	26	1.79	0.44	0.63	0.76
4	M-TTT+E-GA	46	1.49	0.32	0.49	0.83
5	M-GC+E-CT	32	1.52	0.33	0.50	0.76
6	M-CAG+E-GT	26	1.75	0.41	0.60	0.57
7	M-GC+E-AGG	42	1.66	0.38	0.56	0.69
8	M-CAT+E-GA	33	1.69	0.40	0.59	0.79
9	M-CAA+EAGG	26	1.69	0.40	0.59	0.66
10	M-TTT+E-AGG	26	1.54	0.34	0.52	0.75
11	E-CT+M-GAG	22	1.90	0.47	0.66	0.63
12	E-TA+M-GC	30	1.73	0.41	0.59	0.62
13	E-TA+M-GT	36	1.68	0.39	0.57	0.75
14	M-GAG+E-CT	37	1.73	0.41	0.59	0.60
میانگین	-	31.35	1.67	0.39	0.57	0.67
Mean						

کمترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای ترکیب آغازگری MGT, ETA (۰/۳۳ درصد) و بالاترین مقدار آن برای ترکیب آغازگری MTTT, EGA (۰/۸۳ درصد) محاسبه گردید. متوسط میزان PIC برای آغازگرهای AFLP مورد استفاده در تحقیق حاضر ۰/۶۷ درصد می-باشد (جدول ۴). شاخص PIC محتوای اطلاعاتی چندشکلی آغازگرها را نشان می‌دهد که در انتخاب نوع نشانگر، برای بدست آوردن چندشکلی کافی، نوع رابطه خویشاوندی و نوع مواد گیاهی مورد مطالعه اهمیت زیادی دارد. از آنجایی که ترکیب آغازگری MTTT, EGA، PIC بیشتری را در این مطالعه نشان داد، بنابراین برای بررسی چندشکلی ژنوتیپ‌های سنجد مورد مطالعه از توانایی بالاتری نسبت به سایر آغازگرها برخوردار است.

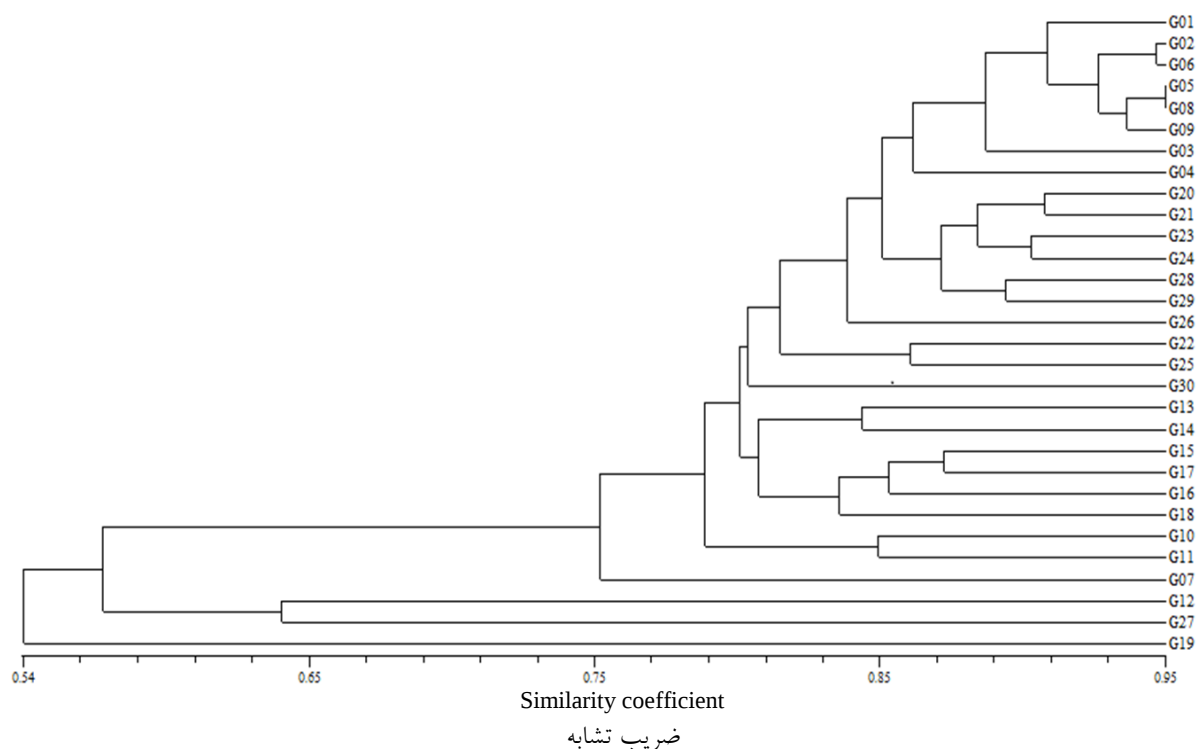
گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سنجد با استفاده از نشانگر AFLP در این مطالعه شباهت ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد محاسبه گردید. براساس

در تحقیق حاضر، بیشترین تعداد آل موثر مربوط به ترکیب آغازگری ECT, MGAG (تعداد ۱/۹۰ آل موثر) و کمترین تعداد آل موثر مربوط به ترکیب آغازگری MTTT, EGA (تعداد ۱/۴۹ آل موثر) بوده و میانگین تعداد آل‌های موثر برای تمامی آغازگرها ۱/۶۷ بدست آمد (جدول ۴). با توجه به شاخص‌های مختلف تنوع، تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مختلف سنجد وجود دارد به طوری که متوسط مقدار شاخص شانون و شاخص تنوع ژنی نی به ترتیب برابر با ۰/۵۷ و ۰/۳۹ بدست آمد. بیشترین مقدار شاخص شانون (۰/۶۶) و شاخص نی (۰/۴۷) مربوط به ترکیب آغازگری ECT, MGAG و کمترین مقدار این شاخص‌ها به ترتیب با مقادیر ۰/۴۹ و ۰/۳۲ در ترکیب آغازگری MTTT, EGA مشاهده گردید. به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، ترکیب آغازگری ECT, MGAG بالاترین سودمندی را جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های سنجد مورد مطالعه دارا می‌باشد.

معیار تشابه جاکارد، کمترین شباهت (۲۵ درصد) که بیانگر بیشترین واگرایی است بین ژنوتیپ‌های ۱۹ (منطقه ملکان) و ۲۷ (منطقه مراغه) و بیشترین شباهت (۹۵ درصد) بین ژنوتیپ‌های ۸ (منطقه تبریز) و ۹ (منطقه تبریز)، ژنوتیپ‌های ۵ (منطقه تبریز) و ۸ (منطقه تبریز)، ژنوتیپ‌های ۲ (منطقه تبریز) و ۵ (منطقه تبریز) و ژنوتیپ‌های ۲ (منطقه تبریز) و ۶ (منطقه تبریز) بدست آمد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بنابراین واضح است که نشانگرهای AFLP می‌توانند به نحو مطلوبی برای شناسایی تنوع ژنومی موجود در درخت سنجد و شناسایی افراد با فاصله ژنتیکی زیاد (گروه‌های هتروژیک) بکار روند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع درون‌گونه‌ای قابل ملاحظه‌ای در میان ژنوتیپ‌های سنجد در زیستگاه‌های شمال غرب کشور وجود دارد. تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم UPGMA و معیار تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در ۳ گروه اصلی قرار داد (شکل ۴). مغایر با گروه‌بندی بر اساس صفات مورفولوژیکی، در گروه‌بندی بر اساس داده‌های ملکولی، توده‌هایی با منشأ جغرافیایی مشابه در کنار هم قرار نگرفت. در تطابق با نتایج حاضر، مطالعه روی ۱۷ ژنوتیپ گیاه کنف با ۳۴ ترکیب آغازگر AFLP نشان داد که گروه‌بندی حاصل از نشانگر ملکولی با گروه‌بندی بر اساس صفات مورفولوژیکی همخوانی نداشت. در توضیح این مطلب تکامل همگرا، به معنی تکامل مستقل و غیرمرتبط صفات مورفولوژیکی مشابه با هم در بین ژنوتیپ‌های متفاوت یک موجود، علت این موضوع بیان شده است (Kim et al., 2010). به عبارتی ژنوتیپ‌های متفاوت سنجد که ارتباط ژنتیکی زیادی باهم ندارند، هنگامی که در شرایط اقلیمی و محیطی مشابه (مناطق جغرافیایی نزدیک بهم) قرار می‌گیرند، در پاسخ به این شرایط و بصورت مستقل صفات مورفولوژیکی مشابهی پیدا می‌کنند. لیکن در مورد گیاه سنجد یک دلیل احتمالی دیگر برای این موضوع، می‌تواند تکثیر عمدتاً غیرجنسی

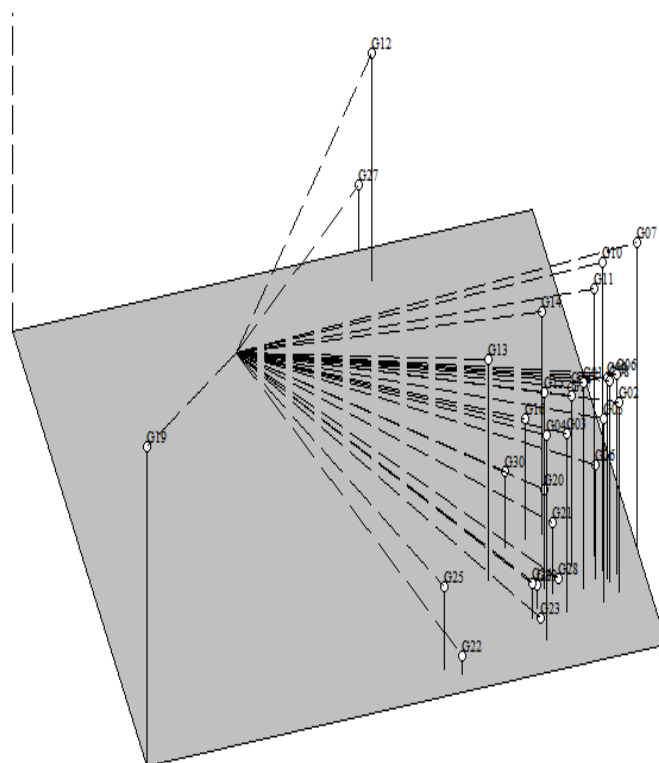
این گیاه از طریق قلمه باشد. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌های سنجد مورد مطالعه از تعداد ژنوتیپ‌های مادری نسبتاً محدودی نشأت گرفته و از طریق تکثیر غیرجنسی در مناطق جغرافیایی مختلف منطقه آذربایجان پراکنش یافته‌اند. بنابراین اکتفای صرف به پراکنش جغرافیایی و تنها توجه به تغییرات صفات مورفولوژیکی جهت انتخاب والدین برای پیش‌برد برنامه‌های به‌نژادی سنجد کافی نخواهد بود، بلکه این مهم بایستی با توجه به ظرفیت‌های ویژه هر جمعیت و به کمک نشانگرهای ملکولی از جمله AFLP کامل و تصحیح شود. علی‌رغم مطالعه حاضر و مطالعات کم و بیش زیاد دیگر در خصوص ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه سنجد در مناطق جغرافیایی مختلف ایران، لیکن جمع‌آوری کاملی از این گیاه در کشور وجود ندارد. لذا جمع‌آوری، ارزیابی ژنتیکی به کمک نشانگرهای ملکولی و در نهایت ایجاد کلکسیون یا کلکسیون‌هایی در مناطق جغرافیایی مختلف کشور از اقدامات عملی در خصوص پیش‌برد برنامه‌های اصلاحی گیاه سنجد خواهد بود.

تجزیه به مختصات اصلی جهت کاهش حجم داده‌ها و تجزیه و تحلیل بهتر نتایج صورت گرفت. با توجه به نتایج تجزیه به مختصات اصلی، دو مولفه اول ۵۹٪ و ۴ مولفه اول ۸۲٪ از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌نمایند. توجیه درصد کمی از تغییرات توسط هر مولفه در این مطالعه، می‌تواند بیانگر پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای AFLP انتخاب شده می‌باشد. در این مطالعه، گروه‌بندی لاین‌ها با استفاده از دو مولفه اول (شکل ۵) تا حدودی با نتایج تجزیه خوشه‌ای در توافق بود. تطابق بین گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نشانگرهای AFLP در گیاه *Indigofera pseudotinctoria* نیز گزارش شده است (Fan et al., 2017). با توجه به شکل ۵، ژنوتیپ‌ها در سه ناحیه از پلات پراکنده شده‌اند و ژنوتیپ‌های ۱۲، ۲۷ و ۱۹ بیشترین فاصله را با بقیه ژنوتیپ‌ها دارند.



شکل ۴- گروه بندی ژنوتیپ‌های سنجد با استفاده از نشانگرهای AFLP و الگوریتم UPGMA و معیار تشابه جاکارد.

Figure 4. Cluster analysis using UPGMA algorithm and Jaccard similarity coefficient of 30 Russian olive genotypes based on AFLP markers



شکل ۵- نمودار پراکنش سه بعدی ژنوتیپ‌های سنجد بر اساس تجزیه به محوره‌های اصلی با استفاده از نشانگر AFLP

Figure 5. Trimensional scatter plot of Russian olive genotypes based on principle co-ordinate analysis using AFLP markers

این تحقیق در واقع اولین گزارش علمی در خصوص استفاده از نشانگرهای AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی سنجد می باشد و نتایج نشان داد که این نشانگرها می توانند به نحو مطلوبی برای شناسایی تنوع در سطح ژنوم و شناسایی ژنوتیپ هایی با فاصله ژنتیکی زیاد (گروه های هتروژیک) بکار روند. بر اساس گروه بندی به کمک داده های ملکولی، توده هایی با منشا جغرافیایی مشابه در کنار هم قرار نگرفتند، لیکن گروه بندی بر اساس صفات مرفولوژیکی کمی و کیفی تا حدود زیادی با توزیع

جغرافیایی ژنوتیپ ها همخوانی نشان داد. بر این اساس ضروری است تصمیم گیری در خصوص انتخاب والدین تلاقی دارای حداکثر فاصله ژنتیکی از همدیگر صرفا با توجه به صفات مرفولوژیکی صورت نگیرد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی بیانگر پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای AFLP انتخاب شده در این مطالعه بود و در این بین ترکیب آغازگری MTTT و EGA دارای کارایی بالایی در تمایز ژنوتیپ های سنجد مورد مطالعه بود.

References

- Arohonka, T. and Rousi, A.** (1980). Karyotypes and C-bands in *Shepherdia* and *Elaeagnus*. *Annales Botanici Fennici*, **17**: 258-263.
- Asadiar, L.S., Rahmani, F. and Siami, A.** (2012). Assessment of genetic diversity in the Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) based on ISSR genetic markers. *Revista Ciencia Agronomica*, **44**: 310-316.
- Doveri, S., Sabino Gil, F., Diaz, A., Reale, S., Busconi, M., Camara Machado, A., Martin, A., Fogher, C., Donini, P. and Lee, D.** (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Science Horticulture (Amsterdam)*, **116**: 367-373.
- Elmi, F., Dehghan, G. and Beigzadeh, B.** (2016). Qualitative and quantitative changes of essential composition in the flowers of some populations of *Elaeagnus angustifolia*. *Advanced Herbal Medicine*, **2(1)**: 1-6.
- Fan, Y., Zhang, C., Wu, W., He, W., Zhang, L. and Ma, X.** (2017). Analysis of Genetic Diversity and Structure Pattern of *Indigofera pseudotinctoria* in Karst Habitats of the Wushan Mountains Using AFLP Markers. *Molecules*, **22**: 1734.
- Fufa, H.P., Baenizger, S., Beecher, B.S., Dweikat, I., Graybosch, R.A. and Eskridge, K.M.** (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, **145**: 133-146.
- Guo, Y.P., Saukel, J., Mittermayr, R., Ehrendorfer, F.** (2005). AFLP analysis demonstrates genetic divergence hybridization, and multiple polyploidizations in the evolution of *Achilla* (*Asteraceae-Anthemideae*). *New Phytologist*, **166**: 273-290.
- Kim, W.J., Kim, D.S., Kim, S.H., Kim, J.B., Goh, E.J. and Kang, S.I.** (2010). Analysis of genetic similarity detected by AFLP and PCoA among genotypes of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **13**: 243-249.
- Pan, C., Zhao, H., Zhao, X., Liu, J., Liu, L., Hou, Y. and Zhang, L.** (2011). Pollination ecology and breeding system of *Elaeagnus angustifolia*. IEEE Conferences. *The 2nd international conference on multimedia technology*, July 26-28, Hangzhou, CH.

- Sun, M., Lin, Q.** (2010). A revision of *Elaeagnus* L. (Elaeagnaceae) in mainland China. *Journal of Systematics and Evolution*, **48**: 356-390.
- Taghipour, N.** (2013). The study of genetic diversity among *Elaeagnus angustifolia* L. genotypes using morphological and molecular markers (SRAP). MSc. thesis. University of Orumiyeh, Orumiyeh, Iran (In Persian).
- Talebi-Rad, H., Onori, H. and Akrami, S.** (2015). Genetic diversity among *Elaeagnus angustifolia* L. population based on some morphological traits and random amplified polymorphic DNA markers. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, **4**: 17-24.
- Vaishnav, V., Mohammad, N., Wali, S.A., Kumar, R., Tripathi, S.B., Negi, M.S. and Ansari, S.A.** (2018). AFLP markers for analysis of genetic diversity and structure of teak (*Tectona grandis* L.) in India. *Canadian Journal of Forest Research*, **45(3)**: 297-30.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.v.d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J. and Kuiper, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407-4414.
- Vroh, B.I., Hravetg, L., Chandelier, A., Mergiai, G. and Dujardin, P.** (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*, **115**: 205-206.
- Uzun, A., Celik, B., Karadeniz, T., Yilmaz, K.U. and Altintas, G.** (2015). Assessment of fruit haracteristics and genetic variation among naturally growing wild fruit *Elaeagnus angustifolia* accessions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **39**: 286-294.
- Zhang, C., Sun, M., Zhang, X., Chen, S., Nie, G., Peng, Y. Huang, L. and Ma, X.** (2018). AFLP-based genetic diversity of wild orchardgrass germplasm collections from Central Asia and Western China, and the relation to environmental factors. *PLoS ONE*, |<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195273>.

Morphological and AFLP-Based Genetic Diversity Assessment of *Elaeagnus angustifolia* L.

Roya Zirak¹, Ali Soleimani^{2,*,#}, Mehrshad Zeinolabedini^{3,#}, Hamid Hatami Maleki⁴ and Azizolah Kheiri⁵

- 1- Former M.Sc., Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
- 1- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
- 3- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Plant Genetic and Production, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran
- 5- Assistance Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: September 2, 2018 – Accepted: December 30, 2018)

Abstract

Genetic diversity among Russian olive genotypes in three different regions of East-Azerbaijan province (includes Tabriz, Maragheh and Malekan) were assessed using morphological and molecular (AFLP) markers. Results of the quantitative and qualitative traits statistics showed a significant genetic variation among studied germplasm and categorized them in five distinguished groups. The most number of genotypes from Maragheh region were in group 1, while, the group 3 consisted of the majority of genotypes from Tabriz region. All genotypes were analyzed with 14 EcoRI-MseI primer combinations. A total of 439 informative and polymorph AFLP markers was generated and analyzed. Based on Jaccard Similarity Index, the minimum genetic similarity was observed between genotype 19 (from Malekan region) and 27 (from Maragheh). The principal coordinate analysis (PCoA) showed the suitable genomic distribution of AFLP markers among individuals. The highest (0.83 %) and lowest (0.33 %) polymorphic information content achieved by primers combination MTTT-EGA and MGT-ETA, respectively. Cluster analysis using molecular data and UPGMA algorithm, classified the studied genotypes in three distinguished groups. The genotypes at the same geographical region did not classify in the same group based on clustering by molecular data. However, this achieved to a large extent when they were classified groups using morphological traits. This result might be explained in terms of convergent evolution and some in part due to asexual propagation of Russian olive from the limited maternal genotypes and distribution across the different geographical regions.

Keywords: Genetic diversity, *Elaeagnus angustifolia*, Quantitative traits, AFLP

* Corresponding Author, E-mail: asoleimani@znu.ac.ir

These authors contributed equally to this work