

بررسی ساختار ژنتیکی سه جمعیت بادام وحشی (*Prunus scoparia*)

زهرا نورمحمدی^{۱*}، ریحانه راستی^۱ و مسعود شیدایی^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۲

چکیده

ایران به عنوان سومین تولیدکننده بادام در جهان محسوب می‌شود و بیش از ۳۰ گونه، زیر گونه و یا اکوتیپ پرونوس در ایران وجود دارد. در این میان گونه‌های بادام وحشی، گونه اسکوپاریا پرونوس در ایران وجود دارد. در میان گونه‌های بادام وحشی، گونه اسکوپاریا به عنوان پایه برای ارقام بادام در غرب کشور استفاده می‌شود. این گونه ذخیره ژنی با خصوصیات با ارزش برای زادآوری و اصلاح ارقام بادام فراهم می‌کند. تحقیق حاضر به تنوع ژنتیکی سه جمعیت پرونوس اسکوپاریا با استفاده از نشانگرهای ISSR می‌پردازد. در این تحقیق سعی شده به بررسی واگرایی ژنتیک در مقابله تبادل ژنی این جمعیتها پرداخته شود. نشانگرهای مولکولی توانستند ۵۰ درصد پلی مورفیسم میان ۳۸ درخت بادام وحشی مورد مطالعه را نشان دهند. بالاترین تنوع ژنتیکی، اندیس شانون و درصد پلی مورفیسم مربوط به درختان جمعیت دیهوک (بیزد) بود. در تجزیه خوشه‌ای، درختان جمعیت دیهوک با فاصله از درختان دو جمعیت دیگر قرار گرفت. در حالی که تبادل ژنتیکی بین دو جمعیت رشم معلم (سمنان) و فسا (فارس) مشاهده گردید. آنالیز واریانس مولکولی تفاوت ژنتیکی معنی داری بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد. آزمون مانل ارتباط معنی داری بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی نشان نداد. این امر ممکن است به علت تبادل ژنی بین جمعیتها بادام وحشی مورد مطالعه باشد که با درختچه شبکه‌ای و آنالیز ساختار ژنتیکی نیز نشان داده شده است.

واژه‌های کلیدی: تمایز ژنتیکی، ISSR، پرونوس اسکوپاریا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۹۳۹، پست الکترونیکی: z-nouri@srbiau.ac.ir

مقدمه

گونه‌های بادام وحشی بیشتر در مناطق بیابانی به عنوان درخت پایه به کنترل فرسایش خاک کمک می‌کند. همچنین به دلیل وجود پوسته سخت و چوبی در برابر حشرات و قارچها مقاوم هستند (۲۰).

گونه‌های وحشی بادام با ژرم‌پلاسم گسترده در تولید و پرورش ارقام اصلاح شده و کمک به ایجاد صفات مناسب مانند شکوفه دهی با تأخیر در اواخر فصل، خودباروری و مقاومت به تنش خشکی و شوری حائز اهمیت هستند (۲۳).

جنس پرونوس (*Prunus*) از خانواده رزاسه (*Rosaceae*)، دارای اجداد اروپایی آسیایی است که شامل ۲۰۰ گونه با اهمیت اقتصادی هستند. این گیاه به صورت بومی در جنوب غرب آسیا رشد می‌کند. ترکیه، سوریه، ایران، تاجیکستان، ازبکستان و افغانستان زیستگاه این گیاه هستند (۲، ۳، ۱۷ و ۲۰).

تا کنون ۲۱ گونه وحشی و ۷ هیبرید در ایران شناسایی شده است (۱۴). جمعیت‌های وحشی گونه‌های بادام نمایانگر طیف وسیعی از خصوصیات مورفولوژیک آنهاست که به صورت طبیعی در مناطق مختلف ایران رشد کرده‌اند (۱۷).

توانستند با استفاده از نشانگر RAPD روابط بین ۵۵ ژنوتیپ بادام و ۷ گونه مرتبط با آن را مشخص نمایند.

در تحقیق دیگری تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های بادام وحشی و گونه‌های مرتبط با پرونوس با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ایی مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، مناسب‌ترین لوکوسهایی که قادر به جداسازی ژنوتیپهای بادام هستند، مشخص شدند (۱۴).

در مطالعه‌ای مهدی قلی و همکاران (۸)، به بررسی تنوع ژنتیکی شش جمعیت از بادام وحشی ایران با نشانگرهای ریزماهواره ایی پرداختند. در این تحقیق ارتباط بین تفاوت‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی و فاصله جغرافیایی این جمعیتها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از این مطالعه، بیانگر تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های بادام وحشی بوده است که این تنوع دال بر سازگاری ژنتیکی درختان با مناطق جغرافیایی آنها است.

در مطالعه حاضر سعی بر آن است که به سه سوال زیر پاسخ داده شود: ۱- میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی سه جمعیت بادام وحشی اسکوپاریا چگونه است؟ ۲- آیا ارتباطی بین تفاوت ژنتیکی و فاصله جغرافیایی جمعیت‌های بادام وحشی وجود دارد؟ و ۳- آیا جریان ژنی میان سه جمعیت مورد مطالعه وجود دارد؟

مواد و روشها

در این تحقیق سی و هشت درخت بادام وحشی اسکوپاریا از سه منطقه جغرافیایی ایران مورد بررسی قرار گرفتند. برگ‌های درختان از استانهای سمنان (رشم-معلمان، ۱۰ درخت)، یزد (دیپوک، ۱۸ درخت) و فارس (فسا، ۱۰ درخت) به طور تصادفی انتخاب، جمع‌آوری و در سیلیکاژل ذخیره شدند.

DNA نمونه‌های برگ با استفاده از روش (CTAB) Cetyl trimethylammonium bromide با کمی تغییر طبق

بادام وحشی اسکوپاریا (*scoparia*) یکی از گونه‌های بومی ایران است که در کنترل فرسایش خاک و بازسازی جنگلها و افزایش بازده محصولات نقش مهمی بازی می‌کند. این گونه اغلب به عنوان پایه برای تولید تجاری و مصارف خوراکی به کار می‌رود (۱۶). بیش از پنج هزار هکتار تا سال ۲۰۰۶ از بادامهای زیرکشت استانهای فارس، کرمان، بوشهر و هرمزگان روی این پایه قرار گرفته اند (۶).

بادام دارای ویژگی خودناسازگاری وگرده‌افشانی متقابل است که این باعث افزایش هتروزیگوسیتی این جنس می‌شود. بنابراین برای شناسایی گونه‌ها مطالعات مولکولی در کنار مطالعات ریخت‌شناسی از اهمیت شایانی برخوردار است. در این میان نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA در جنس پرونوس ابزاری مناسب و کاربردی به منظور مطالعه تکامل، ساختار ژنوم و بررسی تنوع ژنتیکی شناخته شده است (۷).

زین‌العابدینی و همکاران (۲۲) به مقایسه خصوصیات ژنتیکی چهار گونه وحشی پرونوس پرداختند. در این مطالعه گونه‌های بادام توسط نشانگرهای ریزماهواره ایی هسته ایی و کلروپلاستی و پروتئینی مورد بررسی قرار گرفتند. در میان این نشانگرها، نشانگر ریزماهواره ایی هسته ایی بیشترین فراوانی و بالاترین پلی‌مورفیسم را نشان دادند.

سرخه و همکاران با بررسی ۲۳ صفت مورفولوژیک، ۱۹ آغازگر AFLP (amplified fragment length polymorphism)، ۸۰ آغازگر RAPD (random amplified polymorphic DNA) و ۳۲ جفت آغازگر ریزماهواره ایی روابط فیلوژنیک میان ۲۹ رقم زراعی و ۳ گونه وحشی بادام را بررسی نمودند. نتایج این تحقیق نشان دهنده مؤثر بودن تکنیکهای مولکولی در تمایز بین ژنوتیپهای بادام بود (۱۷).

در تحقیقی که نیکومنش و همکاران (۱۰) بر روی برخی ژنوتیپهای بادام ایران و گونه‌های مرتبط با آن انجام دادند،

(۱۹)، تنوع ژنتیکی نای، شاخص اطلاعات شانون، تعداد آللهای مؤثر و درصد پلی مورفیسم می باشد (۴ و ۱۹).

گروه بندی جمعیتها با استفاده از خوشه بندی NJ (Neighbor joining) با استفاده از نرم‌افزار Darwin بعد از بوت استرپ کردن انجام گرفت. همچنین رشته بندی براساس مؤلفه های اصلی توسط نرم‌افزار DARwin انجام گرفت.

به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیتها از آزمون آنالیز واریانس مولکولی (principle coordination analysis) و اندیس فاصله ژنتیکی نای توسط نرم افزار GenAlex (۱۲) انجام گرفت. همچنین آنالیز Gst و اندازه‌گیری میزان جریان ژنی یا Nm محاسبه گردید.

آنالیز STRUCTURE درختهای بادام مورد مطالعه با کمک نرم‌افزار STRUCTURE بررسی شد. در این روش ابتدا K خوشه در نظر گرفته می‌شود که هر کدام از آن خوشه‌ها به وسیله فرکانس آللهای هر لوکوس از یکدیگر متمایز می‌شوند (۱۳). پیوستگی ژنتیکی جمعیتها، با روش خوشه بندی K-Means توسط نرم افزار GenoDive صورت گرفت.

نتایج

آنالیز تنوع ژنتیکی: تمامی نشانگرهای مورد مطالعه توانستند باندهای تکرار پذیر را ایجاد نمایند. موتیفهای تکراری دی نوکلئوتیدی با نوکلئوتیدهای لنگری در لوکوسهای ISSR مورد مطالعه توانستند آللهای اطلاع رسان بیشتری نسبت به لوکوسها با موتیفهای تکراری سه نوکلئوتیدی نشان دهند.

تعداد آللهای متفاوت در سه جمعیت بادام وحشی بین ۱/۳۳ تا ۱/۴۸ بود به طوری که بیشترین مقدار آلل مؤثر مربوط به دو جمعیت یزد-دیپوک و فارس-فسا و برابر ۱/۴۰۴ بود (جدول ۱). بیشترین و کمترین مقدار اندیس شانون به ترتیب ۰/۳۳۲ و ۰/۲۹۲ مربوط به جمعیت استان

پروتکل (۵) استخراج شدند. کمیت و کیفیت DNA به ترتیب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و بارگذاری بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد سنجیده شد.

در این تحقیق از ۱۰ پرایمر نشانگر ISSR (inter simple sequence repeat) که توسط دانشگاه بریتیش کلمبیا معرفی شده است استفاده شد. این پرایمرها شامل: (AGC)5GT, (CA)7GT, (AGC)5GG, UBC 810, (CA)7AT, (GA)9C, UBC 807, UBC 811, (GA)9A, (GT)7CA هستند.

واکنش ISSR-PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل بافر 1X، کلرید منیزیم (۱/۵ میلی مول)، مخلوط dNTP (۰/۲ میلی مول)، نشانگرها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرو مول، ۳ واحد آنزیم Taq DNA پلی مرز و ۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام گرفت. تمامی مواد PCR از شرکت بایورون آلمان تهیه شد. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسیکلر (Techne، آلمان) با برنامه دمایی: ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به دنبال آن ۳۵ سیکل در سه مرحله شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. در نهایت به منظور توسعه کامل زنجیره های تکثیر یافته، مخلوط PCR ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد گرمادهی شدند. به منظور نمایان سازی و تفکیک باندها، محصول واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و سپس با استفاده از رنگ فلئورسنت ژل رد رنگ آمیزی شدند و اندازه باندها بر روی ژل با استفاده از سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی تخمین زده شدند. به منظور بررسی تکرار پذیری نشانگرهای مورد مطالعه، هر واکنش سه بار تکرار و بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. باندهای ISSR به دست آمده به صورت دو حالت کدگذاری شدند، بدین صورت که حضور باندها با کد یک و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص می‌شود.

پارامترهای تنوع ژنتیکی در هر جمعیت مشخص شدند. این پارامترها شامل درصد چند شکلی آلی، تنوع آلی

یزد و استان سمنان تخمین زده شد. براساس نتایج به دست آمده مشخص شد، بیشترین تنوع ژنتیکی یا هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۲۲۸) مربوط به جمعیت استان یزد و کمترین مقدار آن (۰/۲۰۳) متعلق به استان سمنان بود. از

جدول ۱- پارامترهای تنوع ژنتیکی محاسبه شده در سه جمعیت بادام وحشی اسکوپاریا در استانهای فارس، یزد و سمنان.

جمعیت	درصد پلی مورفیسم	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	اندیس شانون	تعداد آلل مؤثر	تعداد آلل متفاوت
فسا(فارس)	۴۸	۰/۲۱۷	۰/۳۰۹	۱/۴۰۴	۱/۳۳۳
خطا استاندارد		۰/۰۲۵	۰/۰۳۵	۰/۰۴۷	۰/۰۷۸
دیپوک (یزد)	۵۵	۰/۲۲۸	۰/۳۳۲	۱/۴۰۴	۱/۴۸۳
خطا استاندارد		۰/۰۲۳	۰/۰۳۳	۰/۰۴۲	۰/۰۶۷
رشم-معلم(سمنان)	۴۷	۰/۲۰۳	۰/۲۹۲	۱/۳۶۹	۱/۳۵۶
خطا استاندارد		۰/۰۲۴	۰/۰۳۴	۰/۰۴۴	۰/۰۷۳
جمع	۵۰	۰/۲۱۶	۰/۳۱۱	۱/۳۹۲	۱/۳۹۱
خطا استاندارد	۲/۵۱	۰/۰۱۴	۰/۰۲۰	۰/۰۲۶	۰/۰۴۲

جمعیت‌های مورد مطالعه اختلاف معنی داری ($P=0/001$) را نشان داد.

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی و اندازه‌گیری جریان ژنی پارامترهای Gst و Nm بین جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه گردید (جدول ۲). بیشترین تمایز ژنی بین جمعیت‌های فارس و یزد با $Gst=0/94$ بود. در واقع می‌توان این طور بیان کرد که بیشترین تمایز ژنی بین جمعیت فارس و یزد ایجاد شده است. درحالی که بیشترین میزان جریان ژنی مربوط به جمعیت‌های یزد و سمنان است.

جدول ۲- میزان Gst و جریان ژنی (Nm) بین جمعیت‌های بادام استان یزد، سمنان، فارس. سطح $Gst>0.5$ نشان دهنده تمایز ژنتیکی مناسب بین جمعیت‌هاست.

جمعیت رشم-معلم	جمعیت دیپوک	جمعیت فسا
		جمعیت فارس- فسا
	---	$Gst=0/95$ $Nm=1/49$
---		جمعیت سمنان-رشم-معلم
	$Gst=0/18$ $Nm=2/18$	$Gst=0/24$ $Nm=1/54$

ژنتیکی نای به صورت جفت جفت نشان دهنده بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های فسا و دیپوک (۰/۲۱۳) بود

حضور آللهای منحصر به فرد در برخی درختان جمعیت‌های مورد مطالعه احتمالاً به علت رخداد بازآرایی ژنتیکی همچون حذف و اضافه شدگی در توالیهای مورد مطالعه باشد.

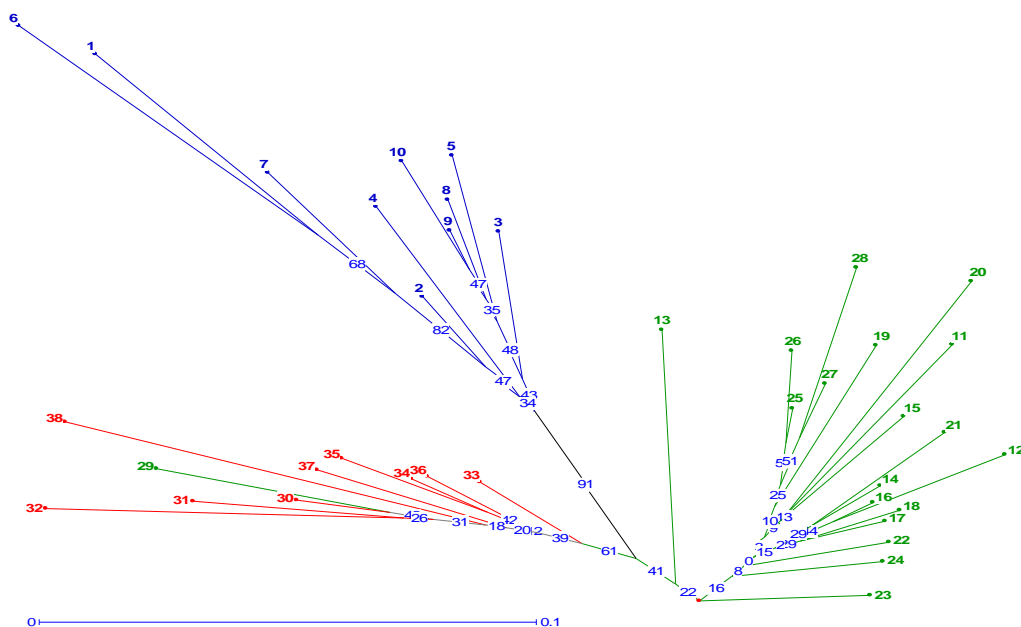
آنالیز درون و بین جمعیت‌های بادام وحشی: نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی بین جمعیت‌های مورد مطالعه تنوع کمتری نسبت به درون جمعیتها نشان داد. به طوری که ۴۰ درصد از کل تنوع ژنتیکی بین جمعیتها و ۶۰ درصد آن درون جمعیتهاست و این تفاوت ژنتیکی بین

یکی دیگر از پارامترهایی که در روابط بین جمعیتها مورد بررسی قرار گرفته است، فاصله ژنتیکی نای است. فاصله

۲۹ از جمعیت یزد در کلاستر مربوط به استان یزد قرار نگرفته و در شاخه سمنان قرار گرفته است که این نشانگر نزدیکی شماره ۲۹ از لحاظ ژنتیکی به جمعیت سمنان است. همچنین درخت شماره ۱۳ از جمعیت یزد نیز با کمی فاصله از گروه خود قرار گرفته است. در این آنالیز خوشه درختان بادام مربوط به جمعیت فارس از دو خوشه دیگر دورتر قرار گرفته است که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این جمعیت از مابقی جمعیت‌های مورد مطالعه است.

در حالی که کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های یزد و سمنان (۰/۱۳۵) بود. این نتایج تأیید کننده جریان ژنی بالا بین این دو جمعیت است.

آنالیز خوشه‌ای به روش NJ بر پایه ماتریس فاصله ژنتیکی دایس در شکل ۱ آورده شده است. نتایج نشانگر تفکیک جمعیتها در سه خوشه مجزا است. هر خوشه شامل جمعیت بادام‌های وحشی در یکی از استان‌های یزد، سمنان و فارس است. در بین تمامی خوشه‌ها، درخت بادام شماره



شکل ۱- آنالیز خوشه‌ای NJ در سه جمعیت یزد-دیپوک (کلاستر شماره ۲، درختان شماره ۱۱-۲۹)، سمنان-معلمان (کلاستر شماره ۳، درختان شماره ۳۰-۳۸) و فارس-فسا (کلاستر شماره ۱، درختان شماره ۱-۱۰). اعداد بر روی شاخه‌ها نشان دهنده تعداد بوت استریها است.

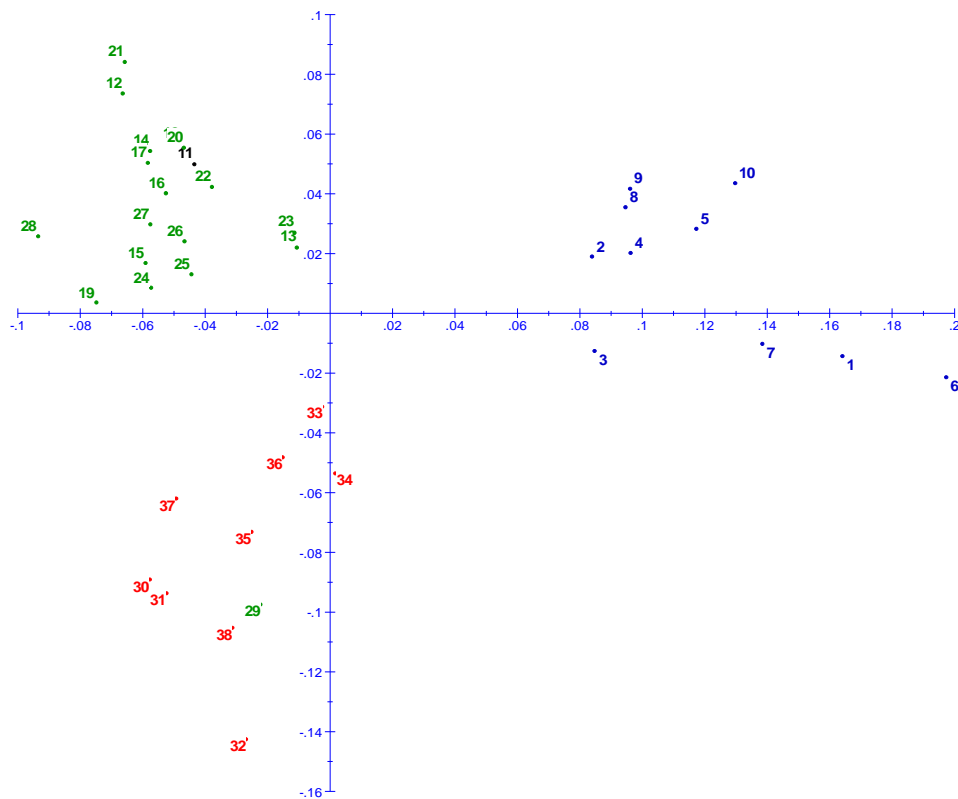
آنالیز خوشه‌ای NJ است که در آن فرد ۲۹ وضعیتی مشابه داشت.

در این تحقیق آنالیز Fst بر روی داده‌ها نشان داد که این مقدار بین دو جمعیت فارس-فسا و یزد-دیپوک برابر با ۰/۴۴۳، بین دو جمعیت فارس-فسا و سمنان-معلمان برابر با ۰/۴۲۳ و بین دو جمعیت یزد-دیپوک و سمنان-معلمان برابر با ۰/۳۳۶ بود که این نتایج نشان‌دهنده تمایز بیشتر بین جمعیت درختان بادام منطقه فارس و یزد است. به طور کلی هر چه میزان Fst کمتر باشد تبادل ژنی

با استفاده از آنالیز رسته بندی $PCoA^{10}$ (شکل ۲)، تفاوت‌های ژنتیکی میان افراد هر جمعیت به طور مشخص‌تری نمایان می‌شود. جدایی سه جمعیت براساس این رسته‌بندی، نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند. در این رسته‌بندی نیز دو جمعیت یزد و سمنان در فاصله کمتری از هم قرار گرفتند. همچنین درخت شماره ۲۹ از جمعیت یزد در کنار درختان جمعیت سمنان قرار گرفته است که نتایج حاصل از این رسته بندی تأییدی بر

بیشتری بین جمعیتها وجود دارد که بنا بر این اصل تبادل ژنی بین جمعیتهای یزد و سمنان بیشتر از نواحی دیگر است که تأیید کننده جریان ژنی بالا به دست آمده توسط آنالیز Nm می باشد.

Factorial analysis: Axes 1 / 2

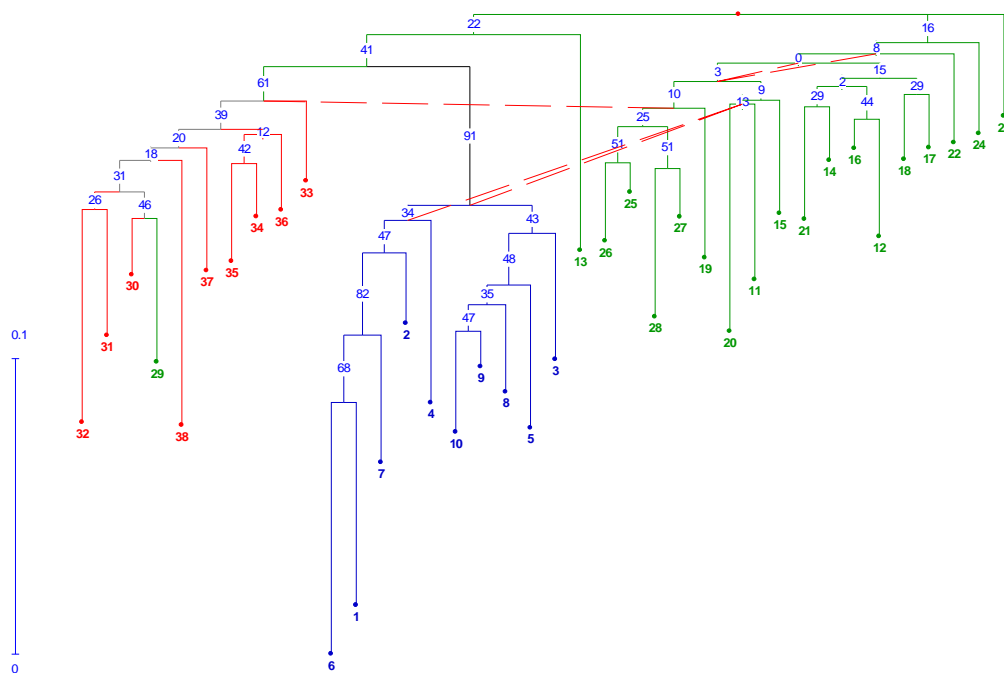


شکل ۲- رسته‌بندی PcoA براساس دو مؤلفه اول با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR. شماره نمونه‌ها براساس شکل ۱ مرتب شده است.

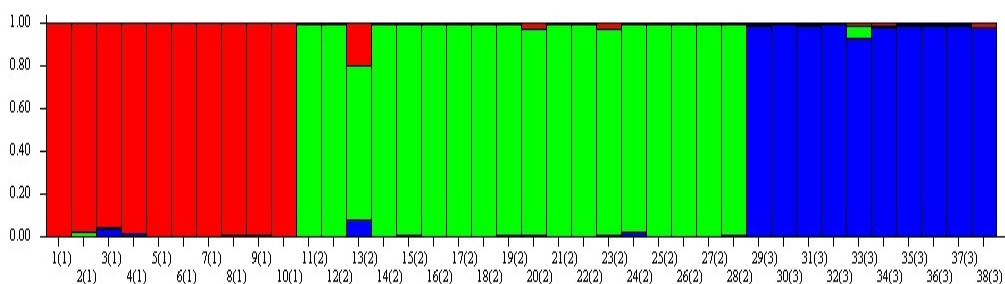
بین ماتریس فاصله ژنتیکی و جغرافیایی ارتباط معنی داری ($P < 0.01$) مشاهده نگردید. این نتیجه نشان دهنده عدم تفکیک براساس فاصله در جمعیتهای بادام وحشی مورد مطالعه است.

بر اساس آنالیز ساختار ژنتیکی و آزمون ایوانو جمعیتهای مورد مطالعه سه نوع ترکیب آلی را نشان دادند (شکل ۴). در این پلات درختانی نیز مشاهده می‌شوند که درجه بسیار پایینی از ترکیب آلی در آنها وجود دارد و در واقع موارد کمی از آللهای مشترک در جمعیتهای مختلف مشاهده می‌شود.

تبادل ژنی احتمالی بین جمعیتها در آنالیز درختچه شبکه ایی بررسی شد (شکل ۳). براساس این نتایج بین درختان جمعیتهای یزد و سمنان و همچنین درختان جمعیت یزد و فارس تبادل ژنی دیده می‌شود در حالی که بین جمعیت فارس و سمنان تبادل ژنی وجود ندارد. علی‌رغم تمایز ژنتیکی در جمعیتهای مورد مطالعه (بر اساس آنالیز F_{st}) آنالیز شبکه ایی در برگیرنده این مطلب است که جدایی ژنتیکی جمعیت به طور کامل نبوده و درجه ایی از تبادل ژنی بین درختان جمعیتها رخ داده است به طوری که آنالیز ماننل تأیید کننده این مطلب است. با استفاده از این آزمون



شکل ۳- درختچه شبکه ایی درختان بادام وحشی مورد مطالعه و تبادل ژنی بین سه جمعیت مورد مطالعه. شماره درختان براساس شکل ۱ مرتب شده است. خط‌چینها نشان‌دهنده تبادل ژنی است.



شکل ۴- پلات ساختار ژنتیکی (STRUCTURE) جمعیت‌های درختان بادام وحشی. اعداد روی هر ستون، شماره درخت‌های جمعیت‌ها براساس شکل ۱ است. اعداد داخل پراتز شماره جمعیت را نشان می‌دهد (شماره ۱ جمعیت سمنان، شماره ۲ جمعیت یزد و شماره ۳ جمعیت فارس)

براساس این خوشه‌بندی هر چه میزان BIC کمتر باشد و میزان Pseudo-F بیشتر باشد، خوشه‌بندی بهتر خواهد بود.

با وجود تبادل ژنی رایج در جمعیت‌های مورد مطالعه، آنالیز واریانس مولکولی تفاوت معنی داری ($P < 0.1$) بین جمعیت‌ها نشان داد. حضور آللهای منحصر به فرد در ترکیب

خوشه بندی K-Means یکی از دقیق ترین روشهای گروه بندی است. بر این اساس، داده های حاصله از نشانگرهای مولکولی درختان بادام وحشی را می توان در یک تا سه گروه مشخص دسته بندی کرد (جدول ۳). با توجه به آنالیز صورت گرفته بهترین خوشه بندی بر اساس معیار اطلاعات Bayesian ۳ گروه و براساس pseudo-F ۲ گروه است.

آلی جمعیتها در آنالیز ساختار ژنتیکی هم در تأیید مطالب بالا می‌باشد (شکل ۴).

جدول ۳- خوشه‌بندی K-Means سه جمعیت بادام وحشی مورد مطالعه از K=1 تا K=3. علامت * نشان دهنده عدد خوشه بندی بر اساس

pseudo-F و علامت & عدد خوشه بندی بر اساس BIC

k	SSD(T)	SSD(AC)	SSD(WC)	r-squared	pseudo-F	AIC	BIC	Rho
1	390.842	0	0	0	0	90.678	230.433	0
2*	390.842	81.178	309.664	0.208	9.437	84.063	225.224	0.364
3 ^{&}	390.842	134.042	256.8	0.343	9.134	79.313	221.748	0.402

بحث

تحقیق حاضر بیانگر تنوع بالاتر لوکوسها ISSR با موتیفهای تکراری دی نوکلئوتیدی با نوکلئوتیدهای لنگری است. مطالعات مختلف در این زمینه نشان دهنده این مطلب است که موتیفهای دی نوکلئوتیدی با نوکلئوتیدهای لنگری الگوی باندهای بهتر با پلی مورفیسم بالاتر را نشان می‌دهد (۲، ۹، ۱۵ و ۱۸).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر، مقادیر تقریباً مشابهی از پارامترهای ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه در مقایسه با مطالعه نورمحمدی و همکارانش (۱۱) را نشان داد. در مطالعه مذکور نیز سه جمعیت بادام وحشی ایران که از استانهای خراسان (بیرجند)، تهران (فیروزکوه) و فارس (فیروز آباد) جمع‌آوری شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی این مارکرها در ۳ جمعیت بادام وحشی مورد مطالعه حاکی از تنوع ژنتیکی بالای این درختان است. وجود تنوع بالا میان درختان بادام را می‌توان به گرده افشانی متقابل و خود ناسازگاری در بادام دانست. بهرحال مضاعف شدگی و حذف ژنی نیز می‌تواند نقش در افزایش تنوع ژنتیکی درختان بادام ایفاء کند.

آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه نشان از سه ترکیب آلی را در این افراد نشان داد. رویش درختان در مناطق جغرافیایی متفاوت، ترکیب خاصی از آلهها را به دلیل سازگاری با محل کسب کرده‌اند. درختانی نیز در این

مطالعه مشاهده می‌شوند که موارد کمی از آلههای مشترک در جمعیت‌های مختلف را نشان می‌دهند. این آنالیز میزان بسیار کم تبادل ژنی بین سه جمعیت بادام وحشی را نشان می‌دهد. به طور کلی آنالیز ساختار ژنتیکی درختان بادام وحشی وجود تمایز ژنتیکی بین سه جمعیت را نشان می‌دهد که آنها را در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی کرده است.

با وجود تبادل ژنی رایج در جمعیت‌های مورد مطالعه، آنالیز واریانس مولکولی تفاوت معنی داری بین جمعیتها نشان داده است که این موضوع می‌تواند به دلیل بازآراییهای ژنتیکی بالا در افراد جمعیتها به خاطر سازگاری محلی یا رانش ژنتیکی باشد. واگرایی ژنتیکی جمعیتها می‌تواند باعث تغییرات مورفولوژیکی در درختان شود. این امر باعث شده است که برخی از تاکسونومیست‌ها جمعیت‌های بادام وحشی را به عنوان اکوتیپهای مختلف در نظر بگیرند. حضور آلههای منحصر به فرد در ترکیب آلی جمعیتها در آنالیز ساختار ژنتیکی هم در تأیید مطالب بالا می‌باشد.

یکی از دلایل تبادل ژنی بین جمعیتها وجود پدیده خودناسازگاری در گونه بادام به عنوان یکی از مکانیسمهای ژنتیکی-تکاملی است که دگرلقاحی و تبادل ژن را در میان افراد مختلف جمعیتها سبب می‌شود. این نوع لقاح منجر به تنوع ژنتیکی بالا در گیاهان بادام می‌شود. وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌های مختلف پرونوس اسکوپاریا می‌تواند منجر به ایجاد هیبریداسیون بین آنها شود.

مهدی قلی و همکاران (۸) تبادل ژنتیکی بین پنج جمعیت بادام وحشی گونه اسکوپاریا شامل جمعیت‌های تهران،

علاوه بر موارد ذکر شده در تحقیق حاضر، خوشه‌بندی به روش K-means نیز براساس pseudo-F گروه‌بندی دوتایی را پیشنهاد می‌کند که به نظر می‌رسد با توجه به تفاوت ژنتیکی کمتر میان جمعیت‌های یزد و سمنان آنها را یک گروه در نظر گرفته و جمعیت استان فارس را به صورت گروهی جداگانه در نظر گرفت. البته در همین خوشه‌بندی با توجه به معیار اطلاعات Bayesian تقسیم بندی به سه گروه مجزا صورت گرفته که تأییدی بر آنالیز رسته بندی PCoA و خوشه بندی NJ است. مطالعه دیگری در زمینه خوشه‌بندی بادام به روش K-means با استفاده از نشانگرهای مولکولی گزارش نشده است بلکه از این خوشه‌بندی برای دسته‌بندی ویژگی‌های مورفولوژیک مانند پوسته و مغز بادام استفاده شده است (۱).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی آنچه به نظر می‌رسد این است که تفاوت ژنتیکی بین سه جمعیت واقع شده در نواحی مختلف جغرافیایی وجود دارد. تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌دار میان سه جمعیت مورد مطالعه بادام وحشی، نشان دهنده وقوع تغییرات ژنتیکی جمعیت‌هاست که این تفاوت‌های ژنتیکی بیان کننده وجود ساختار ژنتیکی متفاوت در هر یک از جمعیت‌های مطالعه شده است. بدیهی است این تفاوت‌های ژنتیکی به منظور سازش‌پذیری جغرافیایی روی داده‌اند. وجود پلی مورفیسم ژنتیکی در بین جمعیت‌ها می‌تواند منبع مناسبی برای ایجاد فرم‌های زراعی و اصلاح نژاد شده باشد.

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده این مطلب است که نشانگرهای ISSR در تحقیقات ژنتیکی بر روی بادام وحشی می‌توانند نشانگرهای مناسبی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تفاوت میان جمعیت‌ها باشند.

فارس، سمنان، خراسان، لرستان و قم را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ایی نشان داده اند. در مطالعه مذکور این نشانگرها نتوانستند تمایز جغرافیایی بین جمعیت‌ها را به خوبی نشان دهند. دو جمعیت فارس و سمنان به طور مشترک در مطالعه حاضر نیز بررسی شده است. اگرچه نشانگرهای ریزماهواره ایی توانایی تفکیک ژنتیکی این دو جمعیت را نداشتند، نشانگرهای ISSR نتوانستند به طور واضح این دو جمعیت را در دو گروه مجزا قرار دهند. یک دلیل ممکن برای این مطلب قدرت تفکیک بالای نشانگرهای ISSR است که به علت توالی‌های تکراری بین ژنی خنثی این نوع نشانگرهاست که به طور مرتب بازآرایی می‌شوند.

با توجه با اینکه در مطالعه حاضر بیشترین جریان ژنی و کمترین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت یزد و سمنان مشاهده شده است می‌توان فاصله جغرافیایی کمتر بین استان سمنان و یزد در مقایسه با استان فارس را موید شباهت ژنتیکی بیشتر دو جمعیت سمنان و یزد دانست.

تبادل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف بادام وحشی ایران توسط زین العابدینی و همکاران (۲۱) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ایی و کلروپلاستی نیز گزارش شده است.

همچنین نورمحمدی و همکارانش با مطالعه سه جمعیت بادام وحشی ایران (بیرجند، فیروزکوه و فیروز آباد) تمایز ژنتیکی این جمعیت‌ها را با استفاده از نشانگرهای ISSR اثبات نمودند (۲۱). در این مطالعه سه ترکیب آلی متفاوت مشخص گردیده است. این مسئله نشانگر این موضوع است که درختان بادامی که در هر منطقه رشد کرده‌اند، ترکیب آلی خاص خود را، در نتیجه سازگاری با شرایط جغرافیایی، به دست آورده‌اند (۱۱).

منابع

- 1- Antonucci, F., Costa, C., Pallottino, F., Paglia, G., Rimatori, V., De Giorgio, D., Menesatti, P.

2010. Quantitative method for shape description of almond cultivars (*Prunus amygdalus* Batsch). *Food and Bioprocess Technology* 5(2):768-785.
- 2- Blair, M.W., Panaud, O., McCouch, S.R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics* 98: 780-792.
- 3- Browicz, K., Zohary, D. 1996. The genus *Amygdalus* L. (Rosaceae): species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 229-247.
- 4- Freeland, J.R., Kirk, H., Peterson, S.D. 2011. *Molecular Ecology* (2nd ed). UK: Wiley-Blackwell. p. 449.
- 5- Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B., Mirko, P. 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta agriculturae Slovenica* 87: 427 - 433.
- 6- Madani, B., Rahemi, M., Assad, M.T., Tafazoli, E., Mardani, A.A. 2006. A study on morphological, cytogenetic and grafting take of five almond rootstocks. M.Sc. Thesis, University of Shiraz, Shiraz. p.92 [in Persian].
- 7- Martinez-Gomez, P., Sanchez-Perez, R., Rubio, M., Dicenta, F., Gradziel, T.M., Sozzi, G.O. 2005. Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. *Ciencia e Investigacion Agraria* 32(2):73-96
- 8- Mehdigholi, K., Sheidai, M., Niknam, V., Attar, F., Noormohammadi, Z. 2013. Population structure and genetic diversity in *Prunus scoparia* of Iran. *Annales Botanici Fennici* 50: 327- 336.
- 9- Nagaoka, T., Ogiwara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* 94: 597-602.
- 10- Nikoumanesha, K., Ebadia, A., Zeinalabedinib, M., Gogorcenac, Y. 2011. Morphological and molecular variability in some Iranian almond genotypes and related *Prunus* species and their potentials for rootstock breeding. *Scientia Horticulturae* 129: 108-118.
- 11- Noormohammadi, Z., Mahdaviipoor, Z., Sheidai, M., Mehdigholi, K., Hasheminejad -Ahangarani -Farahani, Y. 2013. Coalescence, STRUCTURE and reticulation analysis of genetic diversity in *Prunus scoparia* populations. *Phytologia Balcanica* 19: 339-346.
- 12- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- 13- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- 14- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K., Chaparro, J. 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematic Evolution* 298:173-192.
- 15- Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- 16- Rouhi, V., Samson, R., Lemeur, R., Van Damme, P. 2007. Phytosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* 59:117-129
- 17- Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Asadi, E., Jahanbazi, H., Moradi, H., Gradziel, T.M., Martinez-Gomez, P. 2009. Phenotypic diversity within native Iranian almond (*Prunus* spp.) species and their breeding potential. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 947-961
- 18- Tsumura, Y., Ohba, K., Strauss, S.H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical Applied Genetics* 92: 40-45.
- 19- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications. (2nd ed.), Boca Rayton, FL, USA: CRC Press, pp. 472.
- 20- Yousefzadeh, K., Houshmand, S., Madani, B., Martinez-Gomez, P. 2010. Karyotypic studies in Iranian wild almond species. *Caryologia* 63: 117-123.
- 21- Zeinalabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Gradziel, T.M., Martínez-Gómez, P. 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125: 593-601.
- 22- Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Torchi, M., Dicenta,

F, Martínez-Gómez, P. 2008. Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. *Scientia Horticulturae* 116: 80–88.

23- Zohary, D., Hopf, M. 2000. Domestication of plants in the old world, 3rd edn. Oxford University Press, NY.

Genetic structure of three wild almond populations (*Prunus scoparia*)

Noormohammadi Z.,¹ Rasti R.¹ and Sheidai M.²

Dept. of Biology, Science and Research, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Faculty of Biological Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Iran ranks the third one in the world for the production of almond and over 30 *Amygdalus* (*Prunus*) species, subspecies or ecotypes have been identified in the country. Among the wild almond species, *P. scoparia* is used as the rootstock for almond in southwest of Iran. This species provides a gene pool of valuable characteristics for breeding and improvement of the cultivated almond. The present study considers genetic diversity analysis of three *P. scoparia* populations by using ISSR markers. We tried to show genetic divergence versus admixture of these populations. ISSR loci showed 50% polymorphism among 38 wild almond trees studied. The highest values for the genetic diversity, shannon index and the percentage of polymorphism were observed in Deihook (Yazd) population. In cluster analysis, Deihook population stands much separated from the other two populations while, Rashm-Moalem (Semnan) and Fasa (Fars) populations showed a higher genetic exchange among their trees. AMOVA test showed great genetic differences among the studied populations. The Mantel test did not show an association between the genetic and geographic distances of the studied populations. This is possibly due to gene exchange among these populations which was also shown by reticulation and STRUCTURE analyses.

Key words: genetic differentiation, ISSR, *Prunus scoparia*