

ارزیابی تنوع ژنتیکی گواوا (*Psidium guajava*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD

محمد ضابط*، حامد ناصری و زهره علیزاده

ایران، دانشگاه بیرجند، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و درک روابط موجود در بین گونه‌ها و توده‌های گیاهی گام مؤثری در راستای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ گواوا (*Psidium guajava*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD آزمایشگاه به‌نژادی مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند مورد بررسی قرار گرفت. ۹ تا از ۳۶ آغازگر RAPD و ۶ تا از ۷ آغازگر ISSR آغازگر چندشکلی نشان دادند. در کل آغازگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۸۰ و ۳۵ نوار تکثیر نمودند و در مجموع، ۵۴ نوار از ۸۰ نوار تکثیر شده توسط آغازگرهای RAPD (۶۷/۵ درصد) و ۲۵ نوار از ۳۵ نوار تکثیر شده توسط آغازگرهای ISSR (۷۱/۴۲ درصد) دارای چندشکلی بودند. کمترین و بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در نشانگر RAPD به ترتیب در آغازگر OPAB09 (۰/۱۳) و OPAB17 (۰/۴۰) و در نشانگر ISSR به ترتیب در آغازگر ISSR3 (۰/۱۹) و آغازگر ISSR5 (۰/۳۷) مشاهده شد. بر اساس نشانگر RAPD ژنوتیپ‌های M4 با M5 (۰/۸۳) بالاترین و ژنوتیپ‌های CH5 با R4 (۰/۱۹) کمترین تشابه را داشتند. بر اساس نشانگر ISSR ژنوتیپ‌های R2 با R3 (۰/۸۶) بالاترین و ژنوتیپ‌های M1 با CH4 (۰/۱۲) کمترین تشابه را داشتند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD و ISSR ژنوتیپ‌ها را به ترتیب در پنج و سه دسته گروه‌بندی کرد. به طورکل نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی کافی در بین ژنوتیپ‌های گواوا وجود دارد و نشانگرهای RAPD و ISSR در شناسایی نواحی چند شکل و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ذخایر ژنتیکی درختان گواوا نشانگرهای سودمندی هستند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، شاخص مولکولی، ماتریس تشابه، هتروزیگوسیتی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mzabet@birjand.ac.ir

مقدمه

تجاری است که در مناطق استوایی و نیمه استوایی به طور وسیع مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (۳۱، ۱۶، ۱۵، ۱۲).

تنوع ژنتیکی نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی دارد (۲۷). کاهش تنوع ژنتیکی در ارقام مانع از افزایش عملکرد می‌شود و بنابراین لازم است سازگاری ارقام بهبود و گستره ژنتیکی آنها افزایش یابد (۲۴). تنوع مبنای همه انتخاب‌ها در به‌نژادی است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی دامنه انتخاب

گواوا (*Psidium guajava*) یا آمروود متعلق به خانواده میرتاسه (*Myrtaceae*) و جنس پسیدیوم (*Psidium*) دارای فرمول ژنومی $2n=2x=22$ می‌باشد. نوعی درخت گرمسیری که بومی آمریکای جنوبی و مرکزی است. میوه آن شبیه زیتون و آن را خام یا پخته می‌خورند و برگ، پوست تنه و میوه آن استفاده دارویی دارد. در مناطق جنوب ایران به آن زیتون محلی می‌گویند. یکی از مهم‌ترین محصولات

نشان دادند. میانگین چندشکلی در دو نشانگر RAPD و ISSR، ۷۷ و ۸۱/۶ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای یک الگوی کمابیش مشابه را نشان داد (۲۳). به طور کل تجزیه‌های مولکولی میزان بالایی از تنوع در ژنوتیپ‌های گوآوای مورد مطالعه را نشان می‌دهد که می‌تواند در برنامه بهبود گوآوا استفاده شود. در تعیین تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم *Psidium guajava* و ۲ گونه دیگر از بین ۲۹ آغازگر RAPD مورد استفاده ۱۰ مورد یک‌شکل و ۱۹ مورد چندشکل بودند. تعداد آللهای تشخیص داده شده بین ۲ تا ۱۱ با میانگین ۶ و محتوای اطلاعات چندشکلی بین ۰/۴۹-۰/۸۹ نشان داد که نشانگر RAPD کاملاً اطلاع دهنده بود (۳۳). در بررسی روابط ژنتیکی *Psidium guajava* با استفاده از آغازگرهای SSR در چین میانگین اطلاعات چندشکلی نشانگرها ۰/۶۰، تنوع ژنتیکی نی برابر با ۰/۲۹ و شاخص شانون ۰/۴۴ و دامنه تغییرات ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۷-۰/۹۹ بدست آمد (۳۶). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنی بین ۰/۳۷۷-۰/۶۶۸۱ با میانگین ۰/۲۷۶۶ متغیر بود. تجزیه PCA و تجزیه خوشه‌ای تنوع فنوتیپی و ژنتیکی قابل توجهی در بین ارقام موجود نشان داد. حداکثر تنوع در صفات برگ مانند طول برگ، عرض برگ، طول دمبرگ و دمبرگ مشاهده شد (۲۰).

منابع ژنتیکی تأمین کننده ژن‌های مطلوب هستند که در صورت بهره‌برداری صحیح از آنها می‌توان ارقام جدید و مطلوب را تولید نمود (۴). جهت بررسی و میزان تنوع ژنتیکی در گیاهان، روش‌های بسیار زیادی وجود دارد. در بین انواع روش‌ها، استفاده از روش‌های مبتنی بر دی‌ان‌ای دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین روش‌ها برای تعیین و شناسایی تنوع ژنتیکی می‌باشد و همراه با روش‌های آماری چند متغیره آماری، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی و تنوع ژنتیکی گیاهان دارند (۲۶). تاکنون به دلیل عدم شناخت ذخایر ژنتیکی، برنامه اصلاحی قابل توجهی بر روی گیاهان بومی ایران انجام نشده است (۱). در ایران گوآوا در هرمزگان و سیستان و بلوچستان کشت و به دلیل بازارپسندی و قیمت خوبی که

وسیع‌تر می‌شود. تعیین مشخصات و گروه‌بندی ذخایر ژنتیکی این امکان را می‌دهد تا در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها، از دوباره‌کاری خودداری کنند. در صورت نبود تنوع ژنتیکی امکان بدست آوردن هتروزیس وجود ندارد (۵). تخمین تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آن‌ها معمولاً بر اساس ارزیابی صفات زراعی و مورفولوژی و یا نشانگرهای مولکولی مبتنی بر تکنیک‌های DNA انجام می‌شود (۲۹، ۳۵). نشانگرهای مولکولی DNA دارای توارث‌پذیری، چندشکلی، سهولت در ارزیابی و اندازه‌گیری می‌باشند و لذا کاربرد و اهمیت چشم‌گیری برای بررسی تنوع ژنتیکی، تشخیص محل ژن‌ها و ترسیم نقشه‌های ژنی پیدا کرده‌اند (۶).

مطالعات مولکولی نشان داده است که نشانگر RAPD به‌خوبی می‌تواند تغییر در سطح ژنوم با تغییر در فنوتیپ گیاه را مطابقت بدهد (۷، ۳۲) و نشانگر ISSR نیز در شناسایی نواحی چندشکل و مدیریت ذخایر ژنتیکی نشانگر سودمندی است (۳۰، ۲۱). در بررسی تنوع مولکولی ۴۱ ژنوتیپ گوآوا از هند شامل تعداد ۹۳ قطعه با ۸ آغازگر تصادفی RAPD تکثیر شد. براساس تجزیه خوشه‌ای کلیه افراد به دو دسته اصلی تقسیم شدند. این مطالعه نشان داد که پایه ژنتیکی این گوآواها از تنوع کم تا متوسط برخوردار است و ارقام تریپلوئید گوآوا از نظر ژنتیکی یکسان نیستند و منشاء مستقلی دارند (۲۸). از نشانگرهای RAPD و DAMD برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط بین ۲۲ نمونه گوآوا استفاده شد. حداکثر فاصله ژنتیکی بین گوآوای بنفش و الله‌آباد صفدا مشاهده شد و تجزیه خوشه‌ای بیشتر ارقام و نمونه‌های نشأت گرفته از دشت‌های هندوگنگتی را در یک گروه قرار داد. در این بررسی DAMD نشانگر خوبی برای خوشه بندی ارقام تشخیص داده شد (۳). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی یازده گونه پسیدیوم با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و SPAR (RAPD و ISSR) مورد بررسی قرار گرفت. سه آغازگر RAPD و چهار آغازگر ISSR صد درصد چندشکلی

مواد و روشها

در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ گوآوا با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شد. در اوایل بهار ۱۳۹۴ نمونه‌های برگی جوان از ۱۵ مکان مربوط به دو استان هرمزگان (میناب و رودان) و سیستان و بلوچستان (چابهار) جمع‌آوری (جدول ۱) و پس از گذاشتن بر روی یخ خشک به آزمایشگاه به‌نژادی مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل شد.

در کشورهای حاشیه خلیج فارس دارد، صادر و از نظر ارزآوری حائز اهمیت است. ارزیابی تنوع ژنتیکی پیش‌نیاز توسعه ژنوتیپ‌ها از طریق برنامه‌های به‌نژادی است. شناسایی به کمک نشانگرهای مولکولی در گوآوا تا کنون در ایران انجام نشده و با توجه به کاربرد آسان و سریع نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR هدف از این پژوهش گروه‌بندی، تعیین همبستگی بین ژنوتیپ‌های مختلف و شناسایی بهترین والدین جهت تلاقی در برنامه‌های به‌نژادی آینده می‌باشد.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد بررسی گوآوا

شماره نمونه	مکان جمع‌آوری	مختصات جغرافیایی	شماره نمونه	مکان جمع‌آوری	مختصات جغرافیایی	شماره نمونه	مکان جمع‌آوری	مختصات جغرافیایی	شماره نمونه	مکان جمع‌آوری	مختصات جغرافیایی	خصوصیت
M1	میناب	27° 11' 53" N 54° 22' 7" E	CH1	چابهار	25° 17' 31" N 60° 38' 35" E	R1	رودان	27° 26' 7" N 57° 11' 3" E	گلادی شکل، گوشت صورتی			
M2	میناب	27° 11' 53" N 54° 22' 7" E	CH2	چابهار	25° 17' 31" N 60° 38' 35" E	R2	رودان	27° 26' 7" N 57° 11' 3" E	گرد، متوسط، گس			
M3	میناب	27° 11' 53" N 54° 22' 7" E	CH3	چابهار	25° 17' 31" N 60° 38' 35" E	R3	رودان	27° 26' 7" N 57° 11' 3" E	کوچک، گلابی شکل			
M4	میناب	27° 11' 53" N 54° 22' 7" E	CH4	چابهار	25° 17' 31" N 60° 38' 35" E	R4	رودان	27° 26' 7" N 57° 11' 3" E	کوچک، گرد، گس			
M5	میناب	27° 11' 53" N 54° 22' 7" E	CH5	چابهار	25° 17' 31" N 60° 38' 35" E	R5	رودان	27° 26' 7" N 57° 11' 3" E	متوسط، گلابی شکل			

*مختصات جغرافیایی برگرفته از سایت <https://geohack.toolforge.org>

آغازگرها به صورت خشک فریز شده از شرکت دنایزست آسیا خریداری شدند. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و مطابق با چرخه حرارتی زیر اجرا شد (جدول ۳).

استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد (۸). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد در بافر 0.5XTBE تعیین شد. از ۳۶ آغازگر RAPD و ۷ آغازگر ISSR استفاده گردید (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD و ISSR

RAPD				ISSR			
نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	OPAB03	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPA02	5'-(AG)8T-3'	ISSR1	5'-(AG)8T-3'
OPB17	5'-AGGGAACGAG-3'	OPAB04	5'-GGCACGCGTT-3'	OPA03	5'-(GA)8T-3'	ISSR2	5'-(GA)8T-3'
OPB18	5'-CCACAGCAGT-3'	OPAB08	5'-GTTACGGACC-3'	OPA05	5'-(CT)8RG-3'	ISSR3	5'-(CT)8RG-3'
OPB20	5'-GGACCCTTAC-3'	OPAB09	5'-GGGCGACTAC-3'	OPA06	5'-(AG)8RC-3'	ISSR4	5'-(AG)8RC-3'
OPC5	5'-GATGACCGCC-3'	OPAB17	5'-TCGCATCCAG-3'	OPA08	5'-(AG)8YT-3'	ISSR5	5'-(AG)8YT-3'
OPC18	5'-TGAGTGGGTG-3'	OPAB18	5'-CTGGCGTGTC-3'	OP09	5'-(TC)9C-3'	ISSR6	5'-(TC)9C-3'
OPC19	5'-GTTGCCAGCC-3'	OPAB19	5'-ACACCGATGG-3'	OPA10	5'-(CT)8T-3'	ISSR7	5'-(CT)8T-3'
OPD18	5'-GAGAGCCAAC-3'	OPAB20	5'-CTTCTGGAC-3'	OPA11			
OPG6	5'-GTGCCATAACC-3'	OPAC04	5'-ACGGGACCTG-3'	OPA12			
OPG19	5'-GTCAGGGCAA-3'	OPAC06	5'-CCAGAACGGA-3'	OPA18			
OPJ1	5'-CCCGGCATAA-3'	OPAC07	5'-GTGGCCGATG-3'	OPA20			
OPJ4	5'-CCGAACACGG-3'	OPAC20	5'-ACGGAAGTGG-3'	OPAB02			

جدول ۳- اجزای PCR و برنامه دمایی اجراء شده در نشانگر RAPD و ISSR

ISSR		RAPD		اجزای PCR				
تعداد چرخه	زمان (min/s)	تعداد چرخه	زمان (min/s)	دما (C°)	نام مراحل	مقدار در ۱۵ میکرولیتر	غلظت نهایی	مواد
۱	۴ دقیقه	۱	۴ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی اولیه	۵/۵μl	آب دو تقطیر
۴۰	۴۵ ثانیه	۴۵	۱ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی	۷/۵μl	۱X	مستر میکس
۴۰	۴۵ ثانیه	۵ - دمای ذوب	۴۵	۳۵	اتصال	۱μl	۱/۵μm	آغازگر
۴۰	۵۵ ثانیه	۷۲	۲ دقیقه	۷۲	بسط (گسترش)	۱μl	۳۰ ng/μl	دی‌ان‌ای الگو
۱	شش دقیقه	۱	۶ دقیقه	۷۲	بسط نهایی			

نمونه‌ها (UPGMA) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) استفاده شد که از میان این روش‌ها روش UPGMA به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی انتخاب شد. برای بررسی کارایی الگوریتم در تجزیه خوشه‌ای ضریب همبستگی کوفتیک (r) تعیین گردید. همبستگی بین عناصر ماتریس کوفتیک با عناصر ماتریس فاصله اولیه معیاری از برازش تجزیه خوشه‌ای است. در صورتی که r بالاتر از ۰/۹ برازش خیلی خوب، بین ۰/۸-۰/۹ برازش خوب و کمتر از ۰/۸ نشان دهنده برازش ضعیف است (۱۹). از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) به منظور کاهش داده‌های به دست آمده و یافتن ترکیباتی از چند متغیر جهت ایجاد شاخص‌های مستقل (اندازه‌گیری جنبه‌های متفاوتی از داده‌ها) و تجزیه و تحلیل بهتر داده‌ها استفاده شد (۱۰). تجزیه خوشه‌ای، ضریب کوفتیک و تجزیه به مختصات اصلی توسط نرم افزار NTSYSPC22 و محاسبه پارامترها و شاخص‌های ژنتیکی با نرم‌افزار POPGEN31 و Excel انجام شد. در نهایت برای مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها تجزیه واریانس مولکولی (۹) با استفاده از نرم‌افزار GENALEX 6.0 انجام شد.

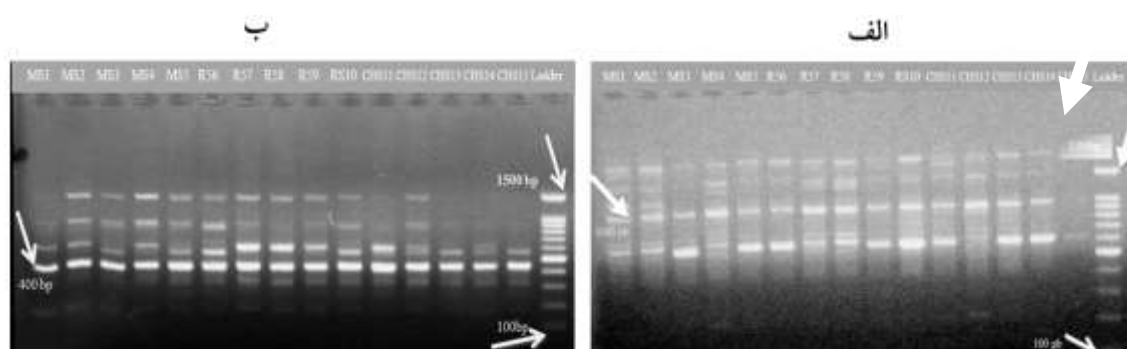
نتایج

شاخص‌ها و پارامترهای ژنتیکی: از ۳۶ آغازگر RAPD نه و از هفت آغازگر ISSR شش تا چندشکلی نشان دادند (شکل ۱). از مجموع نه آغازگر RAPD ۸۰ نوار تکثیر شد که ۲۶ نوار (۳۲/۵ درصد) یک‌شکل و ۵۴ نوار (۶۷/۵ درصد) چندشکل بودند (شکل ۱ الف). درصد چندشکلی از تقسیم

محصول حاصل از PCR در ژل آغازگر ۱/۲ درصد و در بافر 0.5TBE الکتروفورز و پس از آن رنگ‌آمیزی ژل به‌منظور قابل رؤیت شدن انجام گرفت. قطعات تکثیر یافته DNA توسط ژل‌داک زیر نور فرابنفش مشاهده و عکس‌برداری شد. اطلاعات حاصل از نوارهای بدست آمده به‌صورت ماتریس صفر (عدم حضور نوار) و یک (حضور نوار) نمره دهی شد. باتوجه به اطلاعات جغرافیایی، ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از میناب و رودان از استان هرمزگان در یک جمعیت و ژنوتیپ‌های چابهار از استان سیستان و بلوچستان در جمعیت دیگر تقسیم‌بندی و تجزیه داده‌ها صورت گرفت. پس از تجزیه، شاخص‌های مولکولی درصد چندشکلی، محتوای چندشکلی، نسبت چندشکلی یا EMR، شاخص نشانگر یا MI و قدرت تفکیک و پارامترهای ژنتیکی جمعیت مانند تعداد آلل‌ها (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنی نی (H)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها (Dst)، هتروزیگوسیتی کل (Ht=Hs+Dst) و تخمین جریان ژنی (Nm) نیز محاسبه گردید. با استفاده از Hs و Ht بدست آمده شاخص Fst با توجه به فرمول $Fst = 1 - Hs/Ht$ محاسبه شد. در گام بعدی از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها استفاده شد (۱۴). قبل از انجام تجزیه خوشه‌ای ماتریس تشابه محاسبه شد. در این تحقیق چهار ضریب تشابه نی و لی یا دایس، جاکارد، تطابق ساده و UNI محاسبه شد (۳۴، ۲۵، ۱۳). در تجزیه خوشه‌ای از الگوریتم‌های مختلفی مانند لینکاژ منفرد، لینکاژ کامل و میانگین تشابه میان زوج

(۲۸/۶) یک‌شکل و ۲۵ نوار (۷۱/۴) چندشکل بودند (شکل ۱ ب). به طور میانگین تعداد ۵/۸ نوار به ازای هر آغازگر بدست آمد که تعداد ۴/۲ نوار از آن‌ها چندشکل بودند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR1 (۸۳/۳) درصد) و کمترین آن مربوط به آغازگر ISSR4 (۶۰ درصد) بود (جدول ۴).

تعداد نوارهای چندشکل بر کل نوارها بدست آمد. به طور میانگین تعداد ۸/۹ نوار به ازای هر آغازگر بدست آمد که تعداد شش نوار از آن‌ها چندشکل بودند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر OPG6 (۹۱/۶ درصد) و کمترین آن متعلق به آغازگر OPAB08 (۲۵ درصد) بود (جدول ۴). از مجموع شش آغازگر ISSR ۳۵ نوار تکثیر شد که ۱۰ نوار



شکل ۱- الگوی نواری DNA گواوا با استفاده از آغازگر (RAPD) OPAB17 و آغازگر (ISSR) ISSR3

جدول ۴- شاخص‌های مولکولی محاسبه شده برای نشانگرهای RAPD و ISSR در ژنوتیپ‌های گواوا

آغازگر	تعداد نوارهای تشکیل شده	تعداد نوارهای تشکیل شده	درصد چندشکلی	شاخص محتوای چندشکلی	نسبت چندشکلی	شاخص نشانگر	قدرت تفکیک	آغازگر	تعداد نوارهای تشکیل شده	تعداد نوارهای تشکیل شده	درصد چندشکلی	شاخص محتوای چندشکلی	نسبت چندشکلی	شاخص نشانگر	قدرت تفکیک
ISSR								RAPD							
OPA 18	۸	۵	۶۲/۵	۰/۲۷	۳/۱۲	۰/۸۴	۱۱/۲۰	ISSR1	۶	۵	۸۳/۳۳	۰/۳۲	۴/۱۷	۱/۳۳	۶/۵۳
OPAB04	۹	۴	۴۴/۴	۰/۱۹	۱/۸	۰/۳۴	۱۴/۴۰	ISSR2	۷	۵	۷۱/۴۱	۰/۲۷	۳/۵۷	۰/۹۷	۱۰/۴۰
OPAB08	۸	۲	۲۵	۰/۱۳	۰/۵	۰/۰۷	۱۴/۱۳	ISSR3	۶	۴	۶۷	۰/۱۹	۲/۶۸	۰/۵۱	۹/۶۰
OPAB09	۷	۵	۷۱/۴	۰/۲۴	۳/۵۷	۰/۸۷	۸/۵۳	ISSR4	۵	۳	۶۰	۰/۲۴	۱/۸	۰/۴۳	۵/۸۷
OPAB17	۸	۷	۸۷/۵	۰/۴۰	۶/۱۳	۲/۴۵	۸/۸۰	ISSR5	۵	۴	۸۰	۰/۳۷	۳/۲	۱/۱۸	۶/۸
OPC5	۷	۴	۵۷/۱	۰/۲۰	۲/۲۹	۰/۴۶	۹/۸۷	ISSR6	۶	۴	۶۷	۰/۲۵	۲/۶۸	۰/۶۷	۹/۸۷
OPD18	۱۱	۸	۷۲/۷	۰/۲۷	۵/۱۸	۱/۰۵	۱۵/۰۷	میانگین	۵/۸	۴/۲	۷۱/۴۶	۰/۲۷	۳/۰۲	۰/۸۵	۸/۱۷
OPG6	۱۲	۱۱	۹۱/۶	۰/۳۶	۱۰	۳/۶	۱۳/۴۷								
OPG19	۱۰	۸	۸۰	۰/۳۲	۶/۴	۲/۰۵	۱۴/۹۴								
میانگین	۸/۹	۶	۶۵/۸	۰/۲۶	۳۳/۴	۱/۳۰	۱۲/۲۷								

محتوای چندشکلی و قدرت تفکیک یا $IB=1-RP=\sum IB$ که $IB=1-2 \times (0.5-Pi)$ مقدار شاخص PIC نشانگر ISSR (۰/۲۷) نسبت به نشانگر RAPD (۰/۲۶) اندکی بیشتر بود (جدول ۴). میانگین هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها (Dst) و شاخص Fst برای

شاخص محتوای چندشکلی (PIC) هر آغازگر با فرمول $PIC=1-\sum Pi^2$ محاسبه شد که Pi فراوانی نشانگر i ام می‌باشد، نسبت چندشکلی یا EMR از ضرب درصد چندشکلی در تعداد نوارهای چندشکل، شاخص نشانگر یا MI از ضرب شاخص نسبت چندشکلی در محتوای چندشکلی، شاخص نشانگر یا MI از ضرب شاخص نسبت چندشکلی در

مربوط به آغازگر OPAB08 و بیشترین مربوط به آغازگر OPG6 و در نشانگر ISSR کمترین تعداد آلل مربوط به آغازگر ISSR4 و بیشترین مربوط به آغازگرهای ISSR1 و ISSR2 بود. میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون در نشانگر RAPD ۲/۳ و ۳/۴ و در نشانگر ISSR ۱/۵ و ۲/۱ بود. بالابودن شاخص نی و شانون در نشانگرهای فوق نشان دهنده کارایی بالای آغازگرهای به‌کار رفته در تمایز ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۶).

نشانگر RAPD ۰/۳۷۲، ۰/۳۴۵، ۰/۰۲۷ و ۰/۰۶۹ و برای نشانگر ISSR ۰/۳۷۶، ۰/۳۳۱، ۰/۰۴۴ و ۰/۰۵۴ به ترتیب بدست آمد (جدول ۵). بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر OPG19 (۰/۴۳۷) و کمترین مربوط به آغازگر OPAB8 (۰/۳۱۵) بود. بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر ISSR5 (۰/۴۴۸) و کمترین مربوط به آغازگر ISSR4 (۰/۲۵۶) بود. میانگین تعداد آلل‌ها و آلل‌های مؤثر برای آغازگرهای RAPD ۱۲ و ۹/۴ و برای آغازگرهای ISSR ۸/۳ و ۶/۴ بدست آمد. در نشانگر RAPD کمترین تعداد آلل

جدول ۵- پارامترهای محاسبه شده برای نشانگرهای RAPD و ISSR در ژنوتیپ‌های گاوآ

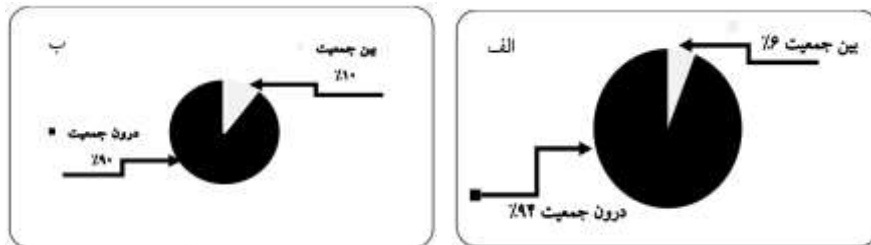
آغازگر	هتروزیگوسیتی کل	هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها	جریان ژنی	هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها	Fst	آغازگر	هتروزیگوسیتی کل	هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها	جریان ژنی	هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها	Fst
ISSR						RAPD					
OPA18	۰/۳۸۷	۰/۳۳۷	۱۱۱/۸۲	۰/۰۶۰	۰/۱۵۵	ISSR1	۰/۳۴۴	۰/۳۴۴	۱۱۱/۸۲	۰/۰۶۰	۰/۱۵۵
OPAB04	۰/۳۹۳	۰/۳۷۵	۱۷۲/۷۶	۰/۰۱۸	۰/۰۳۶	ISSR2	۰/۴۱۵	۰/۴۱۵	۱۷۲/۷۶	۰/۰۱۸	۰/۰۳۶
OPAB08	۰/۳۱۵	۰/۳۱۴	۷۸/۸۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	ISSR3	۰/۳۴۹	۰/۳۴۹	۷۸/۸۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳
OPAB09	۰/۳۴۹	۰/۳۳۱	۱۰۵/۴۸	۰/۰۱۸	۰/۰۵۲	ISSR4	۰/۲۵۶	۰/۲۵۶	۱۰۵/۴۸	۰/۰۱۸	۰/۰۵۲
OPAB17	۰/۳۹۱	۰/۳۸۲	۱۳۰/۶۵	۰/۰۰۹	۰/۰۲۳	ISSR5	۰/۴۴۸	۰/۴۴۸	۱۳۰/۶۵	۰/۰۰۹	۰/۰۲۳
OPC5	۰/۳۴۷	۰/۳۳۵	۵۳/۹۴	۰/۰۱۲	۰/۰۳۵	ISSR6	۰/۴۴۲	۰/۴۴۲	۵۳/۹۴	۰/۰۱۲	۰/۰۳۵
OPD18	۰/۳۶۶	۰/۳۱۰	۱۸۵/۶۴	۰/۰۵۶	۰/۱۵۳	میانگین	۰/۳۷۶	۰/۳۷۶	۱۸۵/۶۴	۰/۰۵۶	۰/۱۵۳
OPG6	۰/۳۶۰	۰/۳۴۳	۳۷۰/۲۱	۰/۰۱۷	۰/۰۲۷				۳۷۰/۲۱	۰/۰۱۷	۰/۰۲۷
OPG19	۰/۴۳۷	۰/۳۸۸	۲۳۱/۶۸	۰/۰۴۹	۰/۱۱۲				۲۳۱/۶۸	۰/۰۴۹	۰/۱۱۲
میانگین	۰/۳۷۲	۰/۳۴۵	۱۴۱/۵۶	۰/۰۲۷	۰/۰۶۹				۱۴۱/۵۶	۰/۰۲۷	۰/۰۶۹

جدول ۶- پارامترهای ژنتیکی برای نشانگرهای RAPD و ISSR در ژنوتیپ‌های گاوآ

آغازگر	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل‌های مؤثر	شاخص تنوع ژنی نی	شاخص تنوع ژنی نی	تعداد آلل‌های شاخص مؤثر	تعداد آلل‌ها	نشانگر	شاخص اطلاعاتی شانون	شاخص تنوع ژنی نی	تعداد آلل‌های مؤثر	تعداد آلل‌ها
ISSR						RAPD					
OPA18	۱۰	۸/۲۴	۱/۹۱	۲/۸۷	۷/۸۴	۱۰	ISSR1	۲/۸۷	۱/۹۱	۸/۲۴	۱۰
OPAB04	۸	۶/۷۰	۱/۶۸	۲/۳۲	۶/۷۰	۱۰	ISSR2	۲/۳۲	۱/۵۶	۶/۷۰	۸
OPAB08	۴	۳	۱/۳۶	۰/۹۷	۶/۴۲	۸	ISSR3	۰/۹۷	۰/۶۲	۳	۴
OPAB09	۱۰	۷/۹۶	۱/۱۵	۲/۶۳	۴/۳۳	۶	ISSR4	۲/۶۳	۱/۷۲	۷/۹۶	۱۰
OPAB17	۱۴	۱۰/۲۴	۱/۵۴	۳/۵۶	۶/۵۹	۸	ISSR5	۳/۵۶	۲/۴۲	۱۰/۲۴	۱۴
OPC5	۸	۶/۲۹	۱/۴۲	۲/۰۵	۶/۷۱	۸	ISSR6	۲/۰۵	۱/۳۶	۶/۲۹	۸
OPD18	۱۶	۱۱/۶۲	۱/۵۱	۴/۵۷	۶/۴۳	۸/۳۳	میانگین	۴/۵۷	۳/۱۱	۱۱/۶۲	۱۶
OPG6	۲۲	۱۷/۳۴		۵/۷۹				۵/۷۹	۴/۰۲	۱۷/۳۴	۲۲
OPG19	۱۶	۱۳/۵۴		۵/۶۱				۵/۶۱	۳/۶۷	۱۳/۵۴	۱۶
میانگین	۱۲	۹/۴۴		۳/۳۷				۳/۳۷	۲/۲۶	۹/۴۴	۱۲

الف) و ۱۰ درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و ۹۰ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بر اساس نشانگر ISSR بود (شکل ۲ ب).

تجزیه واریانس مولکولی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که از کل تغییرات موجود در ژنوتیپ‌ها، ۶ درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و ۹۴ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بر اساس نشانگر RAPD (شکل ۲



شکل ۲- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگرهای الف- RAPD و ب- ISSR در ژنوتیپ‌های گاوآوا

با M5 (۰/۱۷)، M1 با M3 (۰/۱۹) و M2 و CH4 (۰/۲۲) دارای تشابه پایینی بودند.

جدول ۷- ضرایب همبستگی کوفتیک

الگوریتم	کامل		منفرد		میانگین تشابه میان زوج نمونه‌ها	
	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD
ضریب تشابه تطابق ساده	۰/۷۱ ^{***}	۰/۶۹ ^{***}	۰/۶۸ ^{***}	۰/۶۶ ^{***}	۰/۷۶ ^{***}	۰/۷۶ ^{***}
جاکارد	۰/۸۶ ^{***}	۰/۸۴ ^{***}	۰/۸۰ ^{***}	۰/۸۶ ^{***}	۰/۸۶ ^{***}	۰/۸۹ ^{***}
دایس	۰/۸۴ ^{***}	۰/۸۱ ^{***}	۰/۷۷ ^{***}	۰/۷۲ ^{***}	۰/۸۳ ^{***}	۰/۸۷ ^{***}
UV1	۰/۶۷ ^{***}	۰/۶۰ ^{***}	۰/۶۵ ^{***}	۰/۶۰ ^{***}	۰/۷۴ ^{***}	۰/۷۱ ^{***}

تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD ژنوتیپ‌ها را در پنج خوشه گروه‌بندی نمود (شکل ۳ الف). در خوشه اول دو ژنوتیپ M1 و M2، در خوشه دوم CH3، CH2، در خوشه سوم CH1، R5، R4، R3، R2، R1، M5، M4، M3 و در خوشه پنجم CH5 قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR ژنوتیپ‌ها را در سه گروه خوشه‌بندی نمود (شکل ۳ ب). خوشه اول شامل ژنوتیپ‌های M1 و M2، خوشه دوم شامل M3، M4، M5، R1، R2، R3، R4، R5، CH2، CH3، CH4، CH5 و در خوشه سوم CH1 قرار گرفت.

ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای: در این بررسی باتوجه به ضرایب بدست آمده از نشانگر RAPD و ISSR ضریب تشابه J (جاکارد) به عنوان بهترین ضریب و الگوریتم UPGMA (میانگین تشابه میان زوج نمونه‌ها) به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی (۰/۸۹ و ۰/۸۶) به ترتیب در RAPD و ISSR به عنوان بهترین الگوی خوشه بندی انتخاب شدند که نشان‌دهنده برازش مناسب نمودار درختی با ماتریس تشابه می‌باشد (جدول ۷).

ماتریس تشابه بر اساس نشانگر RAPD نشان داد (جدول ۸) که ژنوتیپ M5 با M4 دارای بالاترین ضریب تشابه (۰/۸۳) بودند و ژنوتیپ‌های R2 با R3 و R5 با M4 (۰/۷۰)، M1 با M2 (۰/۶۹) و R3 با R1 (۰/۶۸) دارای تشابه بالایی بودند. کمترین ضریب تشابه بین CH5 با R4 (۰/۱۹) بود و ژنوتیپ‌های CH4 با R4 (۰/۲۱) و CH4 با CH2 (۰/۲۲) دارای تشابه پایینی بودند. ماتریس تشابه بر اساس نشانگر ISSR نشان داد (جدول ۹) که ژنوتیپ‌های R2 با R3 (۰/۸۶) دارای بالاترین ضریب تشابه بودند و ژنوتیپ‌های M3 با R3 (۰/۷۸)، R4 با R3 (۰/۷۴)، R2 با R3 (۰/۷۱) و M4 با R5 (۰/۷۰) دارای تشابه بالایی بودند. ژنوتیپ M1 با CH4 (۰/۱۲) کمترین تشابه را نشان داد و ژنوتیپ‌های M1

جدول ۸- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های گاوآوا بر اساس نشانگر RAPD

ژنوتیپ	M1	M2	M3	M4	M5	R1	R2	R3	R4	R15	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5
M1	۱														
M2	۰/۶۹	۱													
M3	۰/۲۷	۰/۳۷	۱												
M4	۰/۳۷	۰/۵۰	۰/۵۴	۱											
M5	۰/۲۵	۰/۴۵	۰/۵۳	۰/۸۳	۱										
R1	۰/۳۳	۰/۳۵	۰/۶۱	۰/۵۵	۰/۵۳	۱									
R2	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۶۰	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۵۷	۱								
R3	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۶۸	۰/۷۰	۱							
R4	۰/۴۶	۰/۳۹	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۴۰	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۵۴	۱						
R5	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۴۸	۰/۷۰	۰/۶۵	۰/۴۷	۰/۵۰	۰/۴۶	۰/۴۵	۱					
CH1	۰/۴۰	۰/۴۳	۰/۶۷	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۸	۱				
CH2	۰/۳۵	۰/۴۱	۰/۴۴	۰/۵۱	۰/۴۲	۰/۵۱	۰/۴۶	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۴۷	۰/۳۹	۱			
CH3	۰/۳۱	۰/۴۴	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۳۴	۰/۳۰	۰/۳۲	۰/۳۹	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۵۷	۱		
CH4	۰/۴۸	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۳۰	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۲۱	۰/۲۳	۰/۲۷	۰/۲۲	۰/۲۴	۱	
CH5	۰/۲۸	۰/۳۵	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۳۵	۰/۳۰	۰/۱۹	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۴۲	۱

جدول ۹- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های گاوآوا بر اساس نشانگر ISSR

ژنوتیپ	M1	M2	M3	M4	M5	R1	R2	R3	R4	R15	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5
M1	۱														
M2	۰/۵۵	۱													
M3	۰/۱۹	۰/۴۰	۱												
M4	۰/۲۱	۰/۴۴	۰/۵۵	۱											
M5	۰/۱۷	۰/۳۳	۰/۵۲	۰/۶۷	۱										
R1	۰/۲۴	۰/۴۱	۰/۶۰	۰/۵۸	۰/۵۵	۱									
R2	۰/۳۹	۰/۴۸	۰/۷۱	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/۶۰	۱								
R3	۰/۳۳	۰/۴۸	۰/۷۸	۰/۶۱	۰/۶۰	۰/۵۹	۰/۸۶	۱							
R4	۰/۲۴	۰/۳۹	۰/۶۱	۰/۶۰	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۷۴	۱							
R5	۰/۳۲	۰/۴۰	۰/۵۷	۰/۷۰	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۳	۰/۶۲	۰/۶۸	۱					
CH1	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۳۳	۰/۳۷	۰/۲۷	۰/۴۰	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۵۰	۰/۵۲	۱				
CH2	۰/۲۴	۰/۵۰	۰/۵۲	۰/۶۷	۰/۴۷	۰/۵۶	۰/۶۰	۰/۵۹	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۴۷	۱			
CH3	۰/۲۹	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۵۸	۰/۵۲	۰/۴۷	۰/۶۷	۱		
CH4	۰/۱۲	۰/۲۲	۰/۵۰	۰/۴۸	۰/۴۴	۰/۵۳	۰/۴۳	۰/۵۰	۰/۵۵	۰/۳۶	۰/۳۰	۰/۴۴	۰/۴۴	۱	
CH5	۰/۲۷	۰/۳۰	۰/۵۹	۰/۳۳	۰/۳۷	۰/۵۲	۰/۴۲	۰/۵۰	۰/۵۵	۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۵۳	۰/۵۰	۱

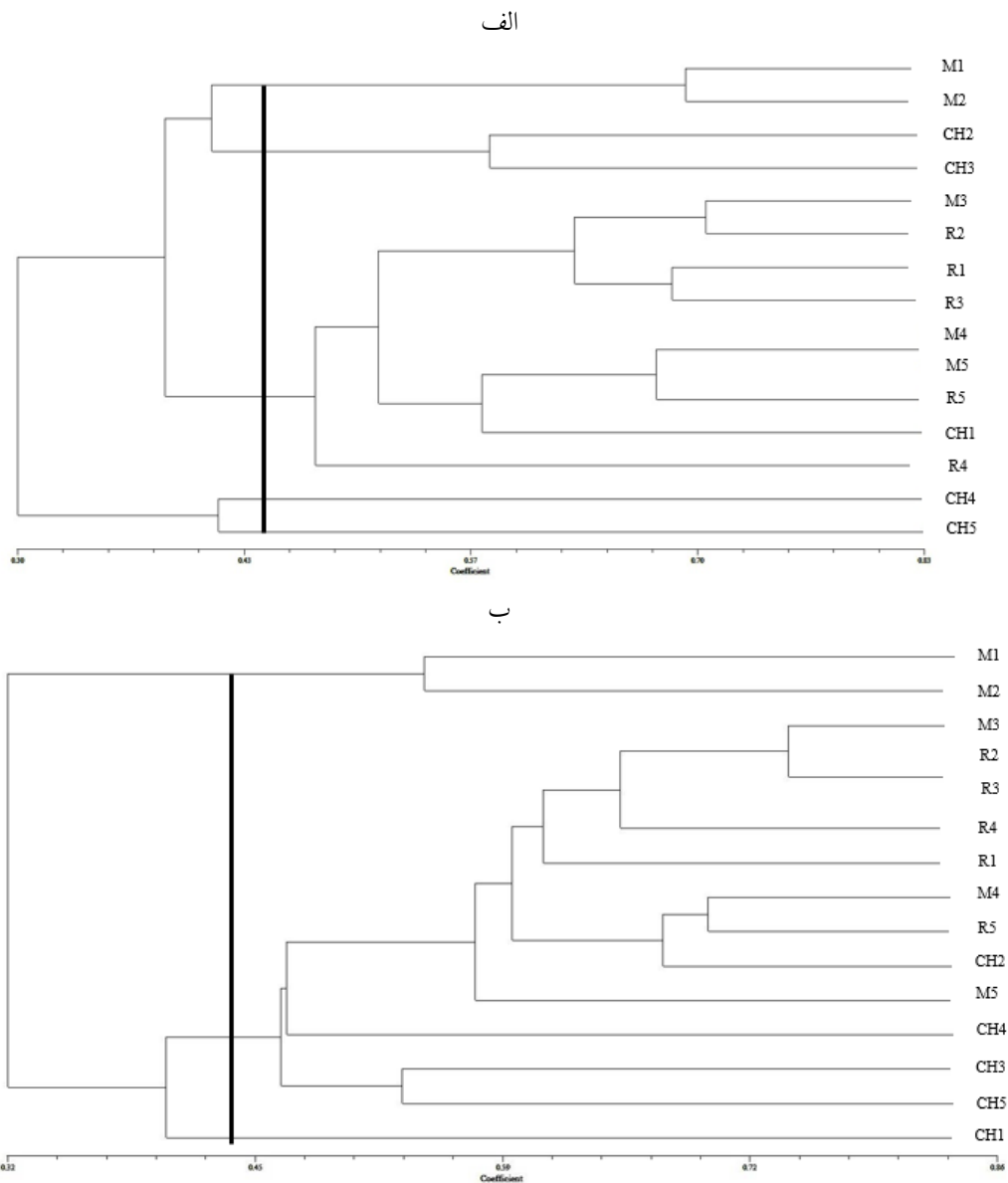
بحث

مناطق تکرار شونده در ژنوم این گیاه دانست. احمد و همکاران (۲) با استفاده از ۴ آغازگر RAPD درصد چندشکلی کل را ۳۳/۲ درصد گزارش نمودند. کیداها و همکاران (۱۷) در بررسی تنوع ژنتیکی گاوآوا با استفاده از نشانگر ISSR سطح چندشکلی نشانگر ISSR را بین ۵۱ تا ۸۵ درصد گزارش دادند که با میزان بالای درصد چندشکلی در مطالعه کنونی مطابقت دارد. PIC معیاری به عنوان قدرت

در این مطالعه درصد چندشکلی RAPD (۶۷/۵ درصد) بیشتر از ISSR (۷۱/۴۲ درصد) بود. میزان بالای چندشکلی بدست آمده از نشانگرهای ISSR و RAPD بیانگر قدرت بالای این نشانگرها در بررسی تنوع مولکولی و همچنین بیانگر تنوع زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. بالا بودن میزان چندشکلی در نشانگر ISSR می‌تواند به دلیل فراوانی

به دلیل وجود شرایط دقیق و دمای اتصال بالای آغازگرهای ISSR در مقایسه با RAPD باشد که باعث می‌شود تا دو فردی که از لحاظ وجود یک قطعه با هم متفاوتند به خوبی از یکدیگر تفکیک شوند، در حالی که در نشانگر RAPD امکان اتصال آغازگرها به یکدیگر وجود دارد. مقدار PIC بالا برای آغازگرهای ISSR5 و OPAB17 نشان دهنده‌ی کارایی بالای آن‌ها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده بوده و می‌توان آن‌ها را برای مطالعه‌های بعدی توصیه نمود.

تشخیص نشانگر، نه تنها به تعداد نشانگرهای چند شکل در هر جفت آغازگر، بلکه به فراوانی هر نشانگر نیز بستگی دارد. مقدار PIC بالا برای آغازگر نشان دهنده‌ی کارایی بالای آن‌ها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده می‌باشد که می‌توان آن‌ها را جهت مطالعات مشابه پیشنهاد نمود (۱۱). این شاخص نشان دهنده چندشکلی در یک جایگاه نشانگری بوده و در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارند و همچنین پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید نوار بیشتر مشخص می‌کند. این خصوصیت در نشانگر ISSR می‌تواند



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گاوآبا با استفاده از نشانگرهای الف- RAPD و ب- ISSR

(۸۹ درصد) گزارش نمودند. در مطالعه‌ای دیگر حداکثر فاصله بین گوآوای بنفش و الله آباد صفدا (۴۳ درصد) و حداقل فاصله بین دو ژنوتیپ به‌نژادی HPSI-20 و HPSI-26 (۵/۴ درصد) بود (۳).

تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تطابقی بین فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و منشاء جغرافیایی آن‌ها وجود نداشت. به عنوان مثال بر اساس نشانگر RAPD ژنوتیپ‌هایی از جمعیت میناب با رودان و چابهار در یک خوشه (مثلاً سه ژنوتیپ از میناب با ۵ ژنوتیپ از رودان و یک ژنوتیپ از چابهار {M3, M4, M5, R1, R2, R3, R4, R5, CH1} در خوشه سوم قرار گرفتند) و حتی یک زیرخوشه (مثلاً M3 با R2 در یک زیرخوشه و M4 با R5 در یک زیرخوشه) قرار گرفتند. حتی ژنوتیپ‌های چابهار در دو خوشه متفاوت قرار گرفتند. البته در بعضی زیرخوشه‌ها ژنوتیپ‌هایی از یک جمعیت در کنار یکدیگر قرار گرفتند که این حالت عمومیت نداشت. در مطالعه پراکاش و همکاران (۲۸) ۴۱ ژنوتیپ گوآوا در دو گروه عمده A و B قرار گرفتند. در بررسی آن‌ها بیشتر ژنوتیپ‌های جنوب هند در یک گروه و ژنوتیپ‌های شمال هند در گروه دیگر از هم متمایز شدند که نشان دهنده انطباق تنوع مولکولی بیشتر ژنوتیپ‌ها بر تنوع جغرافیایی آن‌ها بود. تجزیه خوشه‌ای ۳۳ ژنوتیپ گوآوا از سه منطقه در غرب بنگلادش آن‌ها را در دو گروه عمده و زیر گروه‌های مجزا گروه بندی نمود. در این مطالعه فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها کاملاً با تفاوت‌های مورفولوژی آن‌ها مطابقت داشت (۲). در مطالعه کیداها و همکاران (۱۸) نمودار درختی بدست آمده توده‌های مورد استفاده را در سه گروه عمده با زیر گروه‌هایی قرار داد. در این تحقیق نشانگرهای استفاده شده به طور موفقیت‌آمیزی تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و پراکندگی ارقام را به خوبی نشان دادند.

در این تحقیق نشانگرهای استفاده شده، به طور موفقیت‌آمیزی تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و پراکندگی

میانگین F_{st} محاسبه شده برای نشانگر RAPD (۰/۰۶۹) و ISSR (۰/۰۵۴) بود که نشان می‌دهد تنوع متوسطی بین جمعیت‌ها وجود داشت. روش‌های زیادی جهت محاسبه تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها وجود دارد که یکی از آن‌ها محاسبه شاخص F_{st} (همبستگی ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت) می‌باشد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه باشند، مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملاً متفاوت باشند این مقدار برابر با یک می‌شود. به طور معمول مقدار F_{st} در اکثر موارد کمتر از یک است، زیرا چندشکلی ناشی از جهش به طور مؤثری میزان F_{st} را کاهش می‌دهد. پایین بودن میزان F_{st} نشان از تمایز پایین جمعیت‌هاست که این مطلب می‌تواند به دلیل مهاجرت، شباهت‌های اقلیمی و جغرافیایی و غیره باشد (۲۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین جمعیت‌های مختلف از تنوع درون جمعیت‌ها کمتر است که علت آن وجود افراد با تنوع ژنتیکی بالا در هر جمعیت بود و نتایج حاصل از نشانگر ISSR نتایج RAPD را تأیید نمود. مطالعات کوماری و همکاران (۲۰) نشان داد که تنوع در درون و بین گونه‌های گوآوا وجود دارد و *P.guajava* نسبت به گونه‌های دیگر شباهت بیشتری با *P.guianensis* داشت. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد، که تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه‌ای در جمعیت‌های این گونه وجود دارد و علی‌رغم شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد جمعیت‌ها از یکدیگر، سطح تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه پایین و هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها بسیار مشابه با یکدیگر است. این مسئله می‌تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌ها باشد (۱۷). پراکاش و همکاران (۲۶) در بررسی تنوع ژنتیکی گوآوا کمترین شباهت ژنتیکی بین رقم میرچاپور و گونه کوادرانگولاریس (*P. quadrangularis*) (۴۶ درصد) و بیشترین تشابه را بین ژنوتیپ‌های انتخابی SWY-1 و GR-1 Navalur

از نشانگرهای RAPD و ISSR نشان داد که این نشانگرها در شناسایی نواحی چند شکلی و مدیریت ذخایر ژنتیکی می‌توانند مفید باشند. بررسی ژنوتیپ‌های گاوآبا این نشانگرها نشان داد که چنانچه در آینده به نژادگر و یا محققین دیگر نیاز به هیبریداسیون بین ژنوتیپ‌ها داشته باشند با صرف اینکه دو ژنوتیپ از دو مکان جغرافیایی متفاوت برداشت شود نمی‌توان اقدام به هیبریداسیون نمود و انتظار قدرت هیبریدی را داشت.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان انتظار داشت که از تلاقی بین دو ژنوتیپ از یک منطقه (مثلاً چابهار) هیبریداسیون مشاهده شود ولی از تلاقی دو نمونه متفاوت از دو مکان جغرافیایی (مثلاً تلاقی ژنوتیپ‌های بین رودان با چابهار) انتظار هیبریداسیون را نداشت. پیشنهاد می‌گردد که در آینده محققان با نشانگرهای مولکولی بیشتری نتایج این مطالعه را قطعیت بخشیده تا هر زمان که نیازی به ذخایر ژنتیکی خاصی احساس شد، وقت زیادی برای شناسایی ژنوتیپ‌های کارآمد تلف نگردد. از این مطالعه استنباط می‌شود که گاهی ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه مختلف کاملاً مشابه بوده و بنابراین جستجو و ااکاوی در مورد یک صفت خاص مثلاً مقاومت و یا حساسیت به یک بیماری در دو گونه به ظاهر متفاوت (یکی از چابهار و یکی از رودان) کاری بیهوده خواهد بود. بنابراین به نظر می‌رسد، این نشانگرهای مولکولی ابزاری مفید در بررسی فاصله ژنتیکی و تفاوت بین نمونه‌های مختلف گاوآبا و کاهش هزینه‌ها در بررسی‌های آینده باشد. به طور کل با توجه به نتایج این تحقیق انتظار می‌رود که بر اساس نشانگر RAPD چنانچه بین ژنوتیپ شماره ۵ چابهار (CH5) با ژنوتیپ شماره ۴ رودان (R4) و بر اساس نشانگر ISSR بین ژنوتیپ شماره ۱ میناب (M1) با ژنوتیپ شماره ۴ چابهار (CH4) تلاقی صورت گیرد انتظار بهترین نوع هیبریداسیون را

ژنوتیپ‌ها را به خوبی نشان دادند. اطلاعات حاصل از پارامترهای ژنتیکی، ماتریس تشابه، تجزیه واریانس مولکولی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دو سیستم نشانگری RAPD و ISSR نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشت و به‌نژادگران می‌تواند به طور موثر از این تنوع ژنتیکی در برنامه‌های آتی به‌نژادی استفاده نمایند. به طور کل بین تنوع مولکولی موجود در ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده و موقعیت جغرافیایی در بیشتر موارد تطابقی وجود نداشت و فقط در بعضی موارد آن‌هم در زیرخوشه‌ها این تطابق دیده شد. به عنوان مثال ژنوتیپ‌های رودان، میناب و چابهار در بعضی از مواقع در یک خوشه و حتی زیر خوشه قرار گرفتند. با توجه به فاصله نسبتاً زیاد بین چابهار با رودان و میناب (به ترتیب ۴۱۸ و ۴۱۱ کیلومتر) این امر نشان از عدم تبعیت فاصله ژنتیکی از فاصله جغرافیایی دارد. چنانچه این تبعیت وجود داشت، انتظار می‌رود که ژنوتیپ‌های رودان در یک خوشه، میناب در خوشه دیگر و چابهار در خوشه سوم قرار گیرد. حتی با وجود فاصله نزدیک بین رودان با میناب (۳۴ کیلومتر) انتظار می‌رفت که ژنوتیپ‌های رودان و میناب در یک خوشه قرار گیرند که این امر محقق نشد. کسب اطلاعات در مورد شباهت‌های ژنتیکی برای جلوگیری از تبدیل شدن خزانه‌های ژنتیکی خوب به ذخایر ژنتیکی یکنواخت ضروری است. از آنجایی که استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR روش‌های ساده‌ای هستند و نیاز به توالی ژنوم گیاه مورد نظر ندارند و در مطالعه کنونی نیز کارایی خود را نشان دادند، لذا استفاده از آنها در برنامه‌های به‌نژادی و بهبود روش‌های به‌نژادی مفید می‌باشد. با توجه به اطلاعاتی که درباره روابط ژنتیکی نزدیک در اختیار به‌نژادگر قرار می‌گیرد، برای انجام برنامه‌های به‌نژادی هدف‌دار مانند تولید ارقام متمایز، ژنوتیپ‌های با تنوع ژنتیکی پایه‌ای بالا و بهبود بهره‌وری ارقام موجود، استفاده از تکنیک انگشت‌نگاری DNA پیشنهاد می‌شود. به‌طور کلی، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گاوآبا با استفاده

مورفو- فیزیولوژیکی و کمی را نیز مد نظر داشت.

خواهیم داشت و در کنار این موضوع حتماً بایستی صفات

منابع

1. Abolghasemi, S., Naderi, R., and Fattahi Moghadam, M. R. 2020. Evaluation of genetic diversity in Iranian violet (*Viola spp*) populations using morphological and RAPD molecular markers. *J Genet Resour*, 6(2): 157-171.
2. Ahmed, B., Mannan, A., and Hossain, S. 2011. Molecular characterization of guava (*Psidium guajava L.*) germplasm by RAPD analysis. *International Journal of Natural Sciences* 3 (1): 62-67.
3. Bajpai, A., Chandra, R., Rajan, S., and Srivastava, N. 2008. RAPD and minisatellite markers for genetic diversity and relationship in guava varieties. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 68(4): 441-445.
4. Clegg, M. T. 1997. Plant genetic diversity and the struggle to measure selection. *Journal of Heredity*, 88: 1-7.
5. Condón, F., Rasmusson, D.C., Schiefelbein, E., Velasquez, G., and Smith, K.P. 2008. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Science* (48) 1027-1036.
6. Del Rio, A., Bamberg, j., Huaman, Z., Salas, A., and Vega, S. E. 1997. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 2. In situ vs ex situ. *Theoretical and Applied Genetics* 95 (2): 199-204.
7. Domínguez, Á. J. L., Aguilar, S. G., Nieto, A. D., Legaria, S. J. P., and Pineda, P. J. 2008. Utility of RAPD DNA markers in the selection of grafts of the Mexican Guava cultivar 'Media China' without symptoms of deficiency for iron and zinc. *International Symposium on Guava and other Myrtaceae* (849): 203-210.
8. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19(1): 11-15.
9. Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-791.
10. Farshadfar, E. 2010. *New Topics in Biometrics Genetics*. Islamic Azad University of Kermanshah Press. First Edition. p, 848.
11. Garcia, A. A. F., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M. M., Geraldi, I. O., Souza Jr, C. L., and Souza, A. P. D. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* 27 (4): 579-588.
12. Hays J. D. 1970. Stratigraphy and evolutionary trends of Radiolaria in North Pacific deep-sea sediments. *Geological Society of America Memoirs* 126 (1): 185-218.
13. Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44 223-270.
14. Johnson, R., and Wichern, D. W. 1992. *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 3rd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
15. Joseph, B., and Priya, M. 2011. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava L.*). *International Journal of pharma and bio sciences* 2 (1): 53-69.
16. Kamath, V., Rahul, N., Kumar, C. A., and Lakshmi, S. M. 2008. *Psidium guajava L.*: A review. *International Journal of Green Pharmacy* 2 (1): 17-21.
17. Khodadost, A., Yousefzadeh, H., Amirchakhmaghi, N., Abdollahi, H., and Hosseinzadeh Colagar, A. 2016. Genetic diversity of malus orientalis in hyrcanian forest using ISSR-PCR markers. *Journal of Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology)*, 29(4): 359-369.
18. Kidaha, L. M., Alakonya, A. E., and Nyende, A. B. 2014. Molecular characterization of guava landraces in Kenya (Western and South Coast). *Global Journal of Biology, Agriculture Health Sciences* 4 (15): 81-86.
19. Kimber, G., and Feldman, M. 1987. Wild wheat, an introduction. Special Report 353, College of Agriculture, University of Missouri, Columbia. p. 146.
20. Kumari, S., Arumugam, N., Singh, R., Srivastav, M., Banoth, S., Mithra, A. C., Arun, M. B., Goswami, A.K., and Khan, Y. J. 2018. Diversity analysis of guava (*Psidium guajava*) germplasm collection. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 88 (3): 489-497.
21. Liu, X., and Yang, G. 2012. Assessment of clonal fidelity of micro-propagated guava (*Psidium guajava*) plants by ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science* (6): 291-295.
22. Lynch, M., and Milligan, B. 1994. Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. *Molecular Ecology* 3 (2): 91-99.
23. Mani, A., Mishra, R., and Thomas, G. 2011. Elucidation of Diversity among *Psidium* Species using Morphological and SPAR methods. *Journal of Phytology* 3 (8): 53-61.
24. Nazarzadeh, Z., Onori, H., and Akrami, S. 2020. Genetic diversity of bread wheat (*Triticum aestivum L.*) genotypes using RAPD and ISSR molecular markers. *J Genet Resour*, 6(1): 69-76.
25. Nei, M., and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (10): 5269 – 5273.
26. Pandey, S., Kumar, S., Mishra, U., Rai, A., Sing, M. H. & Rai, M. 2008. Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by quantitative traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturæ*, 118: 80-86.
27. Pearce, S., Knox, M., Ellis, T. H. N., Flavell, A. J., and Kumar, A. 2000. Pea *Ty1-copia* group retrotransposons: transpositional activity and use as

- markers to study genetic diversity in *Pisum*. *Molecular and General Genetics* 263 (6): 898-907.
28. Prakash, D., Narayanaswamy, P., and Sondur, S. N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77 (3): 287-293.
29. Rahmanpour, S., Abdollahi Mandolkani, B., and Ghadimzadeh, M. 2014. Evaluation of genetic variation of native and hybrid Melon ecotypes using ISSR markers. *Journal of Genetics* 9 (1): 76-67.
30. Rai, M., Phulwaria, K., Gupta, M., Shekhawat, A. K., and Jaiswal, U. 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111 (2): 259-264.
31. Rodríguez, N., Valdés, J., Rodríguez, J. A., Velásquez, J. B., and Rivero, D. 2010. Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.) in Cuba. *Biocología Aplicada* 27 (3): 238-240.
32. Rueda, A., Palacio, D. J., Muñoz, J. E., Muñoz, J. E., Saavedra, R., and Bravo, E. 2006. Caracterización molecular Del banco de germoplasma de guaya ba *Psidium* pp Del Centro de Investigación de Corpoica, Palmira. *Fitotecnia Colombiana* 6 (2): 26-32.
33. Shiva, B., Nagaraja, A., Rakesh, S., and Manish, S. 2017. Genetic diversity of Guava genotypes evaluated using RAPD molecular marker. *International Journal of Genetics* 9 (5): 271-274.
34. Sneath, P. H., and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco. p. 573.
35. Zahid NY, Abbasi NA, Hafiz IA, Ahmad Z (2009). Genetic diversity of Indigenus Fennel (*Foeniculum Vulgare* M.) germplasm in Pakistan assessed by RAPD markers. *Pak. J. Bot* 41: 1759-1767.
36. Zehua, M., Shunzhi, L., Ziwei, L., Shejin, X., Weirong, H. 2019. Analysis of genetic diversity of 45 Guava germplasm evaluated using SSR markers. *International Journal of Fruit Science*, DOI: 10.1080/15538362.2019.1640168.

Evaluation of genetic diversity of Guava (*Psidium guajava*) by RAPD and ISSR markers

Zabet M., Naseri H., and Alizadeh Z³

Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, I.R. of Iran

Abstract

Understanding the genetic diversity and the relationships between species and plant ecotypes is an important step to preserving genetic resources. In this study, the genetic diversity of 15 Guava (*Psidium guajava*) genotypes was investigated using Rapid and ISSR markers in the molecular breeding laboratory of the Faculty of Agriculture, University of Birjand. Nine out of 36 RAPD primers and six out of seven ISSR primers showed polymorphism. In total, RAPD and ISSR primers amplified 80 and 35 bands, respectively, of which 54 out of 80 (67.5%) and 25 out of 35 (71.42%) bands were amplified by RAPD and ISSR primers, respectively, and were polymorphic, respectively. The lowest and highest polymorphic information content was observed in the RAPD marker in OPAB09 primer (0.13) and OPAB17 primer (0.40), and in ISSR primer in ISSR3 primer (0.19) and ISSR5 primer (0.37), respectively. According to the RAPD marker, genotypes M5 with M4 (0.83) had the highest and genotypes CH5 with R4 (0.19) had the least similarity, respectively. According to the ISSR marker, genotypes R2 with R3 (0.86) had the highest similarity, and M1 with CH4 (0.12) had the least similarity, respectively. The Cluster analysis classified genotypes according to RAPD marker into five groups and according to ISSR marker into three groups, respectively. In total, the results showed that there is sufficient genetic diversity among Guava genotypes, and RAPD and ISSR are useful markers in identifying polymorphic regions, estimating genetic distance, and managing genetic resources of Guava.

Keywords: Cluster analysis, Heterozygosity, Molecular Index, Similarity matrix.