نشریه علمی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۷ شماره ۲، صفحه ۱۵۸-۱۴۹، (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfpr.2019.120121
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0883.1398.27.149.76.2.1576.82

بررسی تنوع ژنتیکی انارشیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.) با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

ایرج امیری [۱]، حمید سودایی‌زاده [۲*]، اصغر مصلح آرانی [۳]، جواد طایی سمیرمی [۴] و محمدعلی حکیم‌زاده [۳]

۱- دانشجوی دکتری بیابان‌زدایی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران. پست الکترونیک: hsodaie@yazd.ac.ir

۳- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۴- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۴

چکیده

انارشیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.) ویژگی‌هایی مهمی مانند مقاومت مناسب به دمای زیاد و خشکی، تثبیت شن‌های روان، خاصیت دارویی و نیز چوب محکم و بادوام دارد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ از این گونه در استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان با استفاده از نشانگر SSR بررسی شد. پس از استخراج DNA، تکثیر با استفاده از چهار آغازگر ریزماهواره به‌روش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز قطعات تکثیرشده در ژل آگارز، درمجموع ۲۹ مکان ژنی شناسایی شد. آغازگر In831 بیشترین تعداد مکان (۱۵) را تولید کرد. ماتریس تشابه داده‌های اثر انگشت جدایه‌ها در SSR با محاسبه ضریب جاکارد ترسیم و بررسی شد. دندروگرام‌ها نیز با روش میانگین‌های حسابی بی‌وزن (UPGMA) ترسیم شدند. براساس نتایج، ژنوتیپ‌ها به هشت گروه تقسیم شدند که بیانگر تنوع ژنتیکی زیاد ژنوتیپ‌ها در این پژوهش بود. در این بررسی، میانگین هتروزیگوتی مشاهده‌شده و موردانتظار به‌ترتیب ۰/۴ و ۰/۲۹ برآورد شد. همچنین، تعداد آلل مؤثر از ۱/۲ در مکان ژنی In831 تا ۱/۸۱ در مکان ژنی Tau16 با میانگین ۱/۵۱ متغیر بود. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگرهای SSR در شناخت اندازه تنوع ژنتیکی در جامعه گیاهی انارشیطان، کارایی زیادی دارند. تنوع ژنتیکی زیاد بیانگر منبع غنی ژرم‌پلاسم در این گیاه است که از آن می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر، تنوع ژنتیکی، ژنوتیپ، ژرم‌پلاسم.

مقدمه

حفظ پوشش گیاهی برای حفاظت خاک، تثبیت شن‌های روان و نیز تأمین فرآورده‌های چوبی ضروری است. باتوجه‌به موقعیت مناطق بیابانی کشور، بررسی همه‌جانبه گونه‌های بومی هر منطقه، اهمیت به‌سزایی دارد. بررسی تنوع ژنتیکی یکی از پژوهش‌های مهم در حفاظت از منابع ژنتیکی و استفاده از آن در برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شود. انارشیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.) یک گونه درختچه‌ای زینتی و دارویی از خانواده Bignoniaceae است که در مناطق گرمسیری مانند ایران، هند و پاکستان

پراکنش دارد (Aghdaei *et al.*, 2012). این گونه گیاهی اغلب در مناطق جنوبی ایران در استان‌هایی مانند هرمزگان، بوشهر و فارس یافت می‌شود (Rezanejad, 2015). این گیاه، نقشی اساسی در حفاظت محیط‌زیست در مناطق خشک ایفا می‌کند، بنابراین به‌عنوان یک گونه درختی در سیستم اگروفارستری (جنگل- زراعی) پذیرفته شده است (Tewari & Singh, 2009). انارشیطان به‌دلیل گل‌های زیبا و طبیعت نیمه‌خزانی که دارد، می‌تواند برای زیبایی مناظر نیز استفاده شود. ریشه‌های این گیاه بر روی سطح رویی خاک سبب به‌هم چسبیدن خاک و تثبیت شن‌های روان می‌شوند و نیز در حاصلخیزی خاک تأثیر به‌سزایی دارند (Zolfaghari *et al.*, 2018).

وجود اطلاعات دقیق درمورد ماهیت و تنوع ژنتیکی موجود در منابع ژرم‌پلاسمی گیاهان بسیار ارزشمند است. این اطلاعات در برنامه‌ریزی برای پرورش گیاهان و مدیریت بهینه منابع ژنتیکی، اهمیت بسیاری دارد. روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم، نژادها و جمعیت‌ها وجود دارد. این روش‌ها بر تحلیل داده‌های شجره‌نامه‌ای، ریخت‌شناسی، زراعی، بیوشیمیایی و در پژوهش‌های اخیر، بر داده‌های مولکولی تکیه دارند (Mohammadi & Prasanna, 2003). بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف انارشیطان در مناطق مختلف هند با استفاده از نشانگر AFLF (Amplified fragment length polymorphism) بیانگر سطح قابل ملاحظه‌ای از تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مناطق مختلف بود که می‌تواند به‌دلیل طبیعت متفاوت آن‌ها باشد (Bhau *et al.*, 2007).. همچنین، در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مناطق شمالی هند با استفاده از نشانگرهای RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)، ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) و rDNA به تنوع ژنتیکی زیاد درون جمعیت مورد مطالعه اشاره شد (Chhajer *et al.*, 2018). برای مطالعه درختان جنگلی مانند بلوط ایرانی و شاه‌بلوط اروپایی نیز از نشانگر SSR استفاده شد (Zolfaghari *et al.*, 2009; Alipoor *et al.*, 2015). نتایج به‌دست‌آمده در این زمینه بیانگر کارایی زیاد این نشانگر در شناخت اندازه تنوع ژنتیکی و جداسازی جوامع گیاهی مورد مطالعه بود.

ریزماهواره‌ها یا توالی تکراری ساده (SSR: simple sequence repeat) در واقع تکرارهای پیاپی از واحدهای مونو، دی، تری و تترانوکلئوتیدی مانند (TC)n، (TAT)n، (GATA)n، (A)n هستند که از فراوانی و چندشکلی زیادی در ژنوم یوکاریوت‌ها برخوردارند و شناسایی و تشخیص آن‌ها به‌وسیله طراحی آغازگرهای احاطه‌کننده این نواحی انجام می‌شود (de Vienne, 2003; Ravi *et al.*, 2003). نشانگر مولکولی SSR با ارزش تنوع‌پذیری زیاد به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی یکی از بهترین نشانگرها است و می‌تواند تفاوت آللی را در هر جایگاه مشخص کند (Muchugi *et al.*, 2008). باتوجه‌به کارایی قابل ملاحظه نشانگر SSR، در پژوهش پیش‌رو تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انارشیطان جمع‌آوری‌شده از استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان با استفاده از این نشانگر بررسی شد. اطلاعات این پژوهش می‌تواند برای حفاظت ژنتیکی و مدیریت بهتر این گونه استفاده شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۳۰ ژنوتیپ از انارشیطان از مناطق جنوبی کشور شامل استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان تهیه و بررسی شد (جدول ۱).

برای استخراج DNA از کیت تجاری شرکت توپازژن البرز استفاده شد. کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم‌بروماید، DNA در زیر نور ماوراء بنفش (UV) در دستگاه ژل‌داکیومنت (Gel Document) مدل IMAGO (B&L System) مشاهده شد. با بررسی پژوهش‌های پیشین و براساس آغازگرهای معرفی‌شده توسط Chhajer و Kalai (۲۰۱۶)، چهار جفت آغازگر از نواحی توالی‌های کوتاه تکراری، به‌عنوان آغازگری‌های رفت‌وبرگشت در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های انارشیطان استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱- مناطق جمع‌آوری ژنوتیپ‌های انارشیطان

شماره	منطقه	شماره	منطقه
۱	بستک هرمزگان ۱	۱۶	گلپرکی دلفارد جیرفت ۲
۲	دشت‌کوچ جیرفت ۲*	۱۷	مغدان بوشهر ۳
۳	مردهک جیرفت ۱	۱۸	اسفندقه جیرفت ۳
۴	بستک هرمزگان ۲	۱۹	عنبرآباد ۱
۵	گلپرکی دلفارد جیرفت ۱	۲۰	اسفندقه جیرفت ۱
۶	دشت‌کوچ سفلی جیرفت ۱	۲۱	شهنیای بوشهر ۱
۷	دشت‌کوچ سفلی جیرفت ۳	۲۲	گلپرکی دلفارد جیرفت ۳
۸	عنبرآباد ۲	۲۳	شهنیای بوشهر ۳
۹	دشت‌کوچ سفلی جیرفت ۲	۲۴	مغدان بوشهر ۲
۱۰	بستک هرمزگان ۳	۲۵	مردهک عنبرآباد ۲
۱۱	شهنیای بوشهر ۲	۲۶	مردهک عنبرآباد ۳
۱۲	روضه‌ارم منوجان ۱	۲۷	دشت‌کوچ جیرفت ۱*
۱۳	دشت‌کوچ جیرفت ۳*	۲۸	مغدان بوشهر ۲
۱۴	مغدان بوشهر ۱	۲۹	بستک هرمزگان ۳
۱۵	اسفندقه جیرفت ۲	۳۰	روضه‌ارم منوجان ۲

* نمونه‌هایی که بذر تولید کردند.

اعداد نشان دهنده تکرار در مناطق نمونه‌برداری است.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه ۳۰ ژنوتیپ از انارشیطان جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف در کشور

نام آغازگر	توالی آغازگر ′3→′5	دمای اتصال (°C)
In831	F: GGGAATTTCTCGATACGT R: TAGACCAACCATCAGGCT	۴۸
Achi8	F: TGTAGGCAATGATCCGAATAAG R: GGGACCCCTTTAGAAGTCG	۵۰
Tau15	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCTCAACA	۴۸
Tau16	F: GCTTGTAGCAACGTTAGGTTT R: TGTGCATTGTGACTACCAGCTA	۴۹

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تکثیر قطعات DNA در یک محلول واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر بافر Master MIX (کیت PCR Master Mix, 2X آماده‌مصرف از شرکت سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر آغازگر و DNA

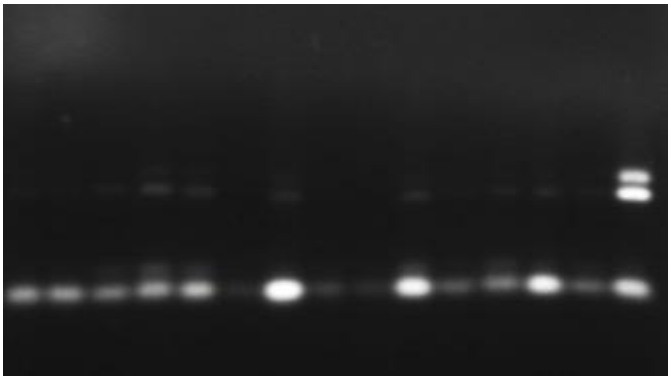
رقیق‌شده با غلظت ng/ul ۲۰ انجام شد. به‌منظور بررسی تکرارپذیری باندها، هر واکنش PCR دو مرتبه تکرار شد. برای تکثیر قطعات DNA از دستگاه حرارتی مدل Thermoscience Gradient (ساخت کشور آلمان) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با واسرشت‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای °C ۹۵ به‌مدت پنج دقیقه و با ۴۰ چرخه با دمای °C ۹۵ به‌مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت‌سازی، اتصال آغازگرها به رشته الگو به‌مدت ۴۵ ثانیه در دمای اتصال آغازگرها (جدول ۲)، گسترش رشته جدید به‌مدت دو دقیقه در دمای °C ۷۲ و گسترش نهایی در دمای °C ۷۲ به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز دو درصد و بافر TBE 1X با ولتاژ ۷۰ ولت و زمان ۱۱۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور برآورد جرم مولکولی قطعات DNA تکثیرشده از نشانگر bp ۱۰۰ استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. پس از شستشوی ژل در آب مقطر به‌مدت ۱۵ دقیقه، از آن عکس‌برداری شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

قطعات SSR قابل‌رؤیت روی ژل آگارز براساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) باند رتبه‌بندی شدند. سپس تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای داده‌های مربوط به انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc version 2.10 انجام شد. برای محاسبه تشابه بین هریک از زوج‌های ژنوتیپی از ضریب تشابه جاکارد در آزمون منتل (Jaccard, 1908) استفاده شد. برای انتخاب بهترین خوشه‌بندی، آزمون کوفنتیک به‌کار برده شد. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA محاسبه شد. همچنین، ارتباط ژنوتیپ‌ها با استفاده از دندروگرام نشان داده شد. برای ارزیابی چندریختی به‌دست‌آمده، نوارها برپایه اندازه با حروف الفبای انگلیسی امتیازدهی شدند. درنهایت، شاخص‌های تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل‌های مؤثر، تعداد آلل‌های مشاهده‌شده، شاخص تنوع ژنتیکی نی، هتروزیگوتی موردانتظار و هتروزیگوتی مشاهده‌شده توسط نرم‌افزار POPGENE (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شدند.

نتایج

یافته‌های فرآیند استخراج DNA بیانگر کیفیت قابل قبول مولکول‌های به‌دست‌آمده برای استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی بود. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز نشان داد که مولکول‌های اسیدهای نوکلئیک به‌دست‌آمده فاقد هرگونه شکستگی و اسمیر بودند، بنابراین از آن‌ها می‌توان در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده کرد. در این پژوهش، هر چهار جفت آغازگر (جدول ۲) به‌خوبی قادر به سنتز ناحیه ژنی از توالی ژنی انارشیطان بودند. مهم‌ترین عامل در تعیین کارایی یک آغازگر، تعیین دمای ذوب آن است. بهترین دمای ذوب، ۴۸ و ۵۰ درجه سانتیگراد تعیین شد که در همه نمونه‌های گیاهی برای تکثیر نواحی تکراری ژنی در طول ژنوم استفاده شد. چهار آغازگر استفاده‌شده قادر به ایجاد الگوی باندی با وضوح و تکرارپذیری زیاد بودند و بین ارقام، چندشکلی نشان دادند. در بررسی روابط ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ انارشیطان با استفاده از این آغازگرها، درمجموع ۲۹ مکان ژنی شناسایی شد که ۲۵ مکان، چندشکلی نشان دادند. در بین این چهار جفت آغازگر، آغازگر In831 بیشترین (۱۵ مکان) و آغازگر Tau15 کمترین (دو مکان) تعداد مکان را تولید کردند. از آغازگرهای Tau16 و Achi8 نیز به‌ترتیب چهار و نه مکان ژنی ردیابی شد (شکل ۱).



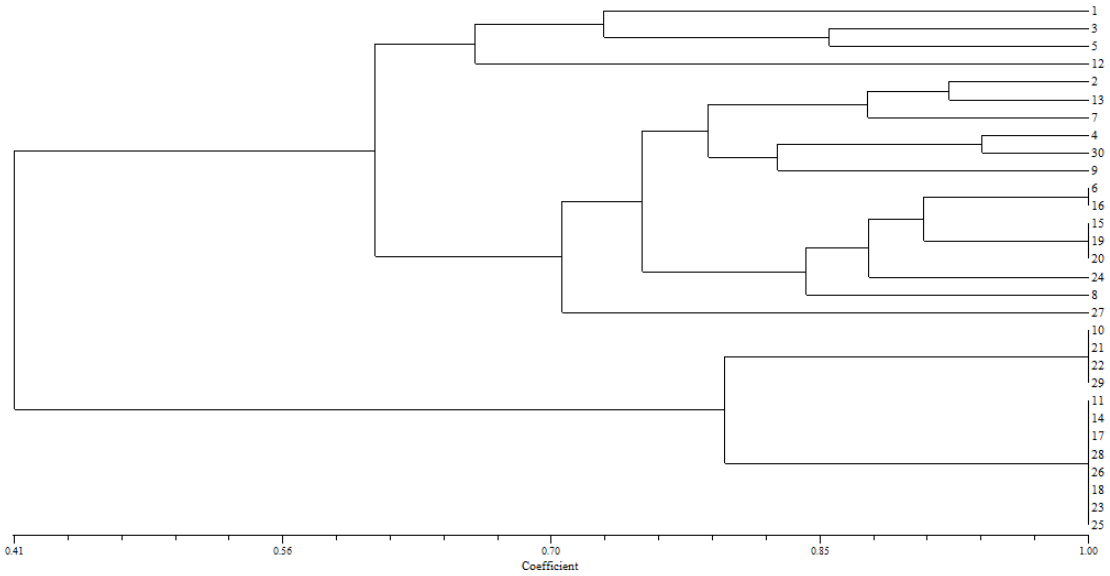
شکل ۱- الگوی باندی آغازگر Tau16 روی برخی از نمونه‌های گیاه انارشیطان

بهترین ضریب تشابه براساس آزمون منتل، ضریب تشابه جاکارد و فاصله ژنتیکی مورد بررسی از ۰/۵۹ تا ۰/۸۶ متغیر بود. در نمودار تجمیعی براساس آزمون کوفنتیک بهترین روش خوشه‌بندی روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد بود (شکل ۲). خط برش در دندروگرام شکل ۵ از محل فاصله ژنتیکی ۰/۷۳ باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در حداقل نه گروه شد. دو گروه F و B به‌ترتیب با نه و هشت ژنوتیپ، بیشترین تعداد ژنوتیپ را داشتند. مقدار تنوع و گروه‌های ژنوتیپی در فاصله ژنتیکی ۰/۸۶ بسیار بیشتر بود. نکته قابل توجه اینکه در میان ژنوتیپ‌ها تنها سه نمونه بذرده بودند. در دندروگرام رسم‌شده توسط تکثیر جفت آغازگر Achi8، دو نمونه بذرده با شماره‌های ۲ و ۱۳ در فاصله ژنتیکی ۰/۹۵ در یک گروه مستقل و نمونه ۲۷ در فاصله ژنتیکی ۰/۸ در یک گروه مجزا قرار گرفت (شکل ۲). ارتباط ژنتیکی و بذرده بودن نمونه‌های شماره ۲ و ۱۳ توسط آغازگرهای دیگر اثبات نشد. با این‌حال، نمونه شماره ۲۷ در ناحیه تکثیری دو جفت آغازگر In831 و Tau16 به‌ترتیب در فواصل ژنتیکی ۰/۱۹ و ۰/۶۳ در دورترین فاصله با نمونه‌های دیگر در خوشه مستقل خارجی (Out group) قرار گرفت (شکل‌های ۳ و ۴). در دندروگرام تجمیعی حاصل از چهار جفت آغازگر مطالعه‌شده، نمونه بذرده شماره ۲۷ به‌همراه نمونه غیربذرده ۲۴ در فاصله ژنتیکی ۰/۵۹ در گروه خارجی جای گرفتند (شکل ۵).

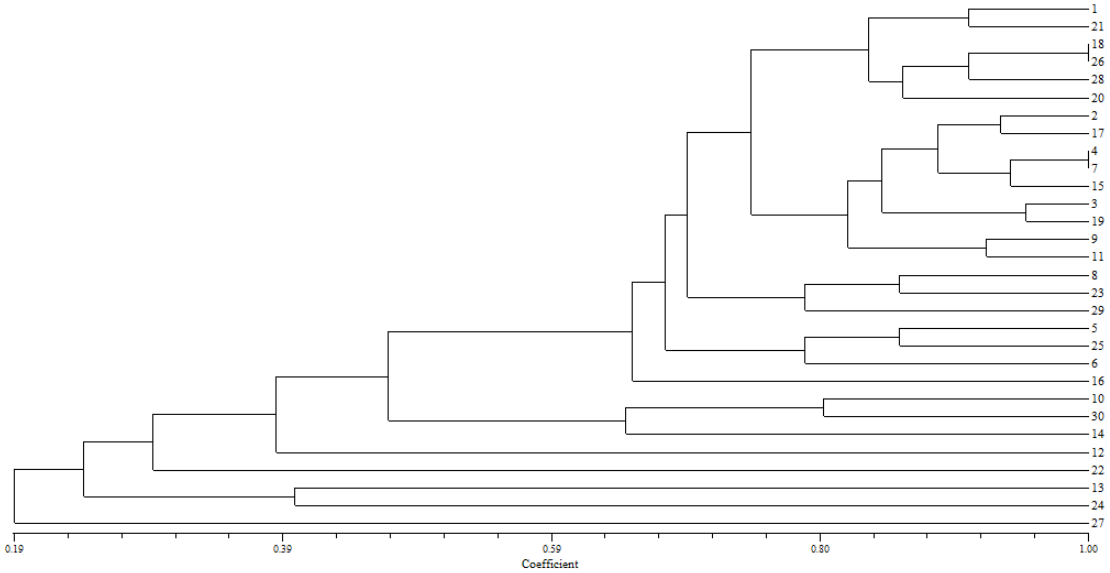
تعداد آلل مؤثر (N_e) از ۱/۲ در مکان ژنی In831 تا ۱/۸۱ در مکان ژنی Tau16 با میانگین ۱/۵۱ متغیر بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده‌شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۰/۴ و ۰/۲۹ برآورد شد (جدول ۳).

جدول ۳- اسامی آغازگرها، تعداد آلل و اطلاعات دیگر مربوط به ژنوتیپ موردمطالعه در مکان‌های ریزماهواره موردبررسی

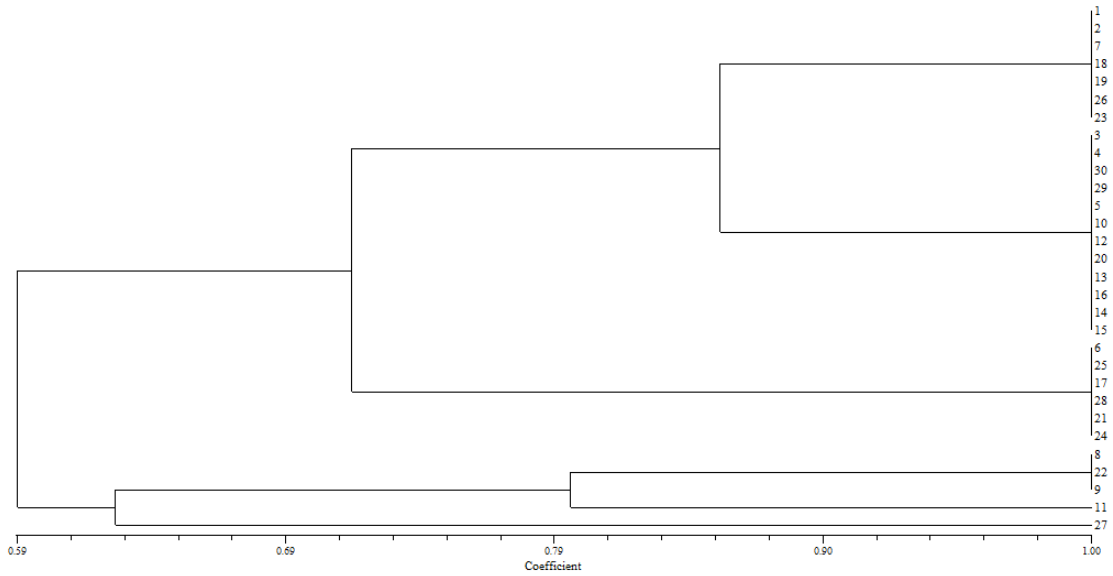
آغازگر	شمار آلل‌های مشاهده‌شده (Na)	شمار آلل‌های مؤثر (Ne)	هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (HO)	هتروزیگوسیتی موردانتظار (He)	شاخص نی (Nei)
In831	۲	۱/۲	۰/۱۲۲	۰/۱۵۴	۰/۱۵
Achi8	۳	۱/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۳۹	۰/۱۲
Tau15	۲	۱/۸	۰/۶۶۶	۰/۴۵۲	۰/۴۴
Tau16	۲	۱/۸۱	۰/۵۸۳	۰/۴۵	۰/۴۴



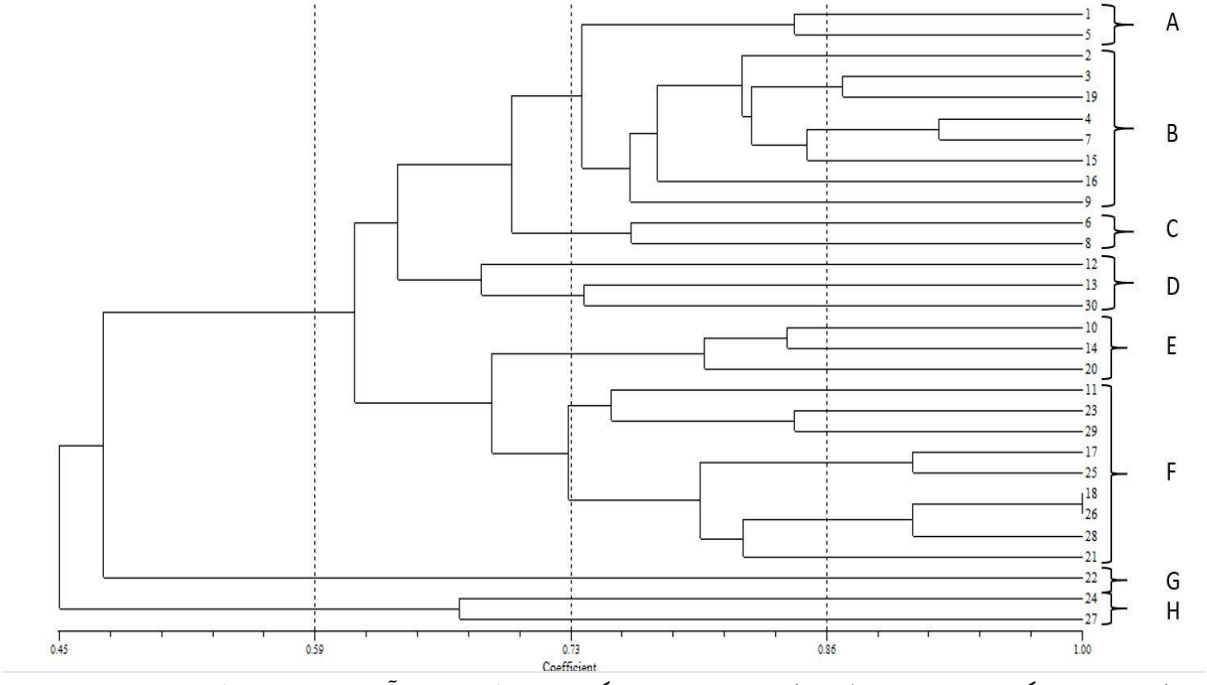
شکل ۲- دندروگرام به‌دست آمده از تکثیر جفت آغازگر Achi8. ارتباط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های گیاه انارشیطان به‌دست‌آمده از برخی مناطق استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان. تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه شد و دندروگرام به‌روش UPGMA ترسیم شد.



شکل ۳- دندروگرام به‌دست آمده از تکثیر جفت آغازگر Ln831. ارتباط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های گیاه انارشیطان به‌دست‌آمده از برخی مناطق استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان. تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه شد و دندروگرام به‌روش UPGMA ترسیم شد.



شکل ۴- دندروگرام به‌دست آمده از تکثیر جفت آغازگر Tau16. ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های گیاه انارشیطان به‌دست‌آمده از برخی مناطق استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان. تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه شد و دندروگرام به‌روش UPGMA ترسیم شده است.



شکل ۵- دندروگرام تجمیعی ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های گیاه انارشیطان به‌دست‌آمده از برخی مناطق استان‌های بوشهر، کرمان و هرمزگان براساس چهار جفت آغازگر از نشانگر SSR. تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه شد و دندروگرام به‌روش UPGMA ترسیم شد. اطلاعات شماره‌ها در جدول ۱ آمده است.

بحث

در پژوهش پیش‌رو، آغازگرهای استفاده‌شده قادر به ایجاد الگوی باندی با وضوح و تکرارپذیری زیاد بودند و بین ارقام، چندشکلی نشان دادند. بهترین ضریب تشابه براساس آزمون منتل، ضریب تشابه جاکارد و فاصله ژنتیکی مورد بررسی از ۰/۵۹ تا ۰/۸۶ متغیر بود. زیاد یا کم بودن دامنه فاصله ژنتیکی یادشده نشان‌دهنده تنوع زیاد یا کم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. در این بررسی، دامنه ژنتیکی زیاد بود، بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های مختلف انارشیطان از مناطق نمونه‌برداری‌شده، تنوع ژنتیکی زیادی داشتند. این تغییرات ژنتیکی در نشانگر SSR با آغازگر In831 بیشترین تنوع را نشان داد. در این پژوهش تنها سه نمونه، بذرده بودند. در دندروگرام رسم‌شده توسط تکثیر جفت آغازگر Achi8، دو نمونه بذرده شماره‌های ۲ و ۱۳ در فاصله ژنتیکی ۰/۹۵ در یک گروه مستقل و نمونه شماره ۲۷ در فاصله ژنتیکی ۰/۷ در گروه دیگر قرار گرفت. این ارتباط ژنتیکی و بذرده بودن برای نمونه‌های مذکور توسط آغازگرهای دیگر اثبات نشد. ارزیابی مولکولی سطح هتروزیگوتی، اهمیت زیادی در برنامه‌های به‌نژادی دارد. بیشتر بودن مقدار هتروزیگوتی مشاهده‌شده (۰/۴) نسبت به هتروزیگوتی مورد انتظار (۰/۲۹) می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه انارشیطان در این مناطق باشد.

سیستم نشانگر SSR با موفقیت درمورد گونه‌های مختلف درختی مانند بلوط ایرانی (Zolfaghari *et al.*, 2009)، شاه‌بلوط (Alipoor *et al.*, 2015)، گردوی جنگلی (Taheri *et al.*, 2016)، *Tapiscia sinensis* (Zhou *et al.*, 2016)، ارقام بادام ایرانی و خارجی (Mousavi *et al.*, 2015) و سیب‌های بومی ایران استفاده شده است (Farrokhi & Naseri, 2012). به‌رغم اهمیت انارشیطان در مناطق خشک و بیابانی، پژوهش‌های اندکی درمورد تنوع ژنتیکی آن در سطح مولکولی انجام شده است (Bhau *et al.*, 2007; Chhajer *et al.*, 2017; Chhajer *et al.*, 2018). در پژوهش Chhajer و Kalia (۲۰۱۶) همگنی انارشیطان رویش‌یافته در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR، SCoT و SSR نشان داده شد.

زیاد بودن چندشکلی به‌دست‌آمده در پژوهش پیش‌رو را می‌توان به کارایی زیاد روش SSR نسبت داد. از آنجایی‌که در روش SSR-PCR، آغازگرها مکمل نواحی اطراف ریزماهواره‌ای هستند که در یوکاریوت‌ها با فراوانی زیاد در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، استفاده از این روش می‌تواند سطح قابل ملاحظه‌ای از چندشکلی را نشان دهد. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی موجود در بین ژنوتیپ‌های انارشیطان برای انجام برنامه‌های اصلاحی به‌منظور افزایش مقاومت به خشکی و شوری، کیفیت و سازگاری این گیاه بسیار مناسب است. همچنین، به‌نظر می‌رسد روش SSR-PCR به‌همراه روش‌های چندمتغیره آماری تجزیه خوشه‌ای، ظرفیت قابل توجهی برای بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی گیاهان دارند.

مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی باتوجه‌به قابلیت و دقت آن‌ها بسیار مفید است. استفاده از سیستم‌های نشانگر چندگانه برای آنالیز تنوع و هومولوژی گیاهان نیز پیشنهاد شده است که مناطق متفاوتی از ژنوم مورد هدف قرار می‌گیرند (Chhajer & Kalia, 2017). به‌غیراز ارزیابی مناطق مختلف ژنومی، توزیع نشانگرها در سراسر ژنوم و پوشش اهداف DNA هر نشانگر خاص مورد آزمایش، اطلاعات تازه‌ای را ارائه می‌دهند (Chhajer & Kalia, 2016)، بنابراین پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آینده از نشانگرهای دیگر نیز به‌صورت ترکیبی استفاده شود تا نتایج به‌صورت جامع‌تری تحلیل شود.

منابع مورد استفاده

- Aghdaei, M., Salehi, H. and Sarmast, M.K., 2012. Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. micropropagation. Advances in Horticultural Science, 26(1): 21-24.
- Alipoor, Sh., Taheri Abkenar, K., Asadi Abkenar, A. and Potki, P., 2015. Genetic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in different populations of Guilan province using SSR markers. Iranian Journal of Forest, 7(3): 363-375 (In Persian).

- Bhau, B.S., Negi, M.S., Jindal, S.K., Singh, M. and Lakshmikumaran, M., 2007. Assessing genetic diversity of *Tecomella undulata* (Sm.) – An endangered tree species using amplified fragment length polymorphisms-based molecular markers. Current Science, 93(1): 67-72.
- Chhajer, S. and Kalia, R.K., 2016. Evaluation of genetic homogeneity of in vitro-raised plants of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem. using molecular markers. Tree Genetics and Genomes, 12(5): 100.
- Chhajer, S. and Kalia, R.K., 2017. Seasonal and micro-environmental factors controlling clonal propagation of mature trees of marwar teak [*Tecomella undulata* (Sm.) Seem]. Acta Physiologiae Plantarum, 39: 60.
- Chhajer, S., Jukanti, A.K., Bhatt, R.K. and Kalia, R.K., 2018. Genetic diversity studies in endangered desert teak [*Tecomella undulata* (Sm) Seem] using arbitrary (RAPD), semi-arbitrary (ISSR) and sequence based (nuclear rDNA) markers. Trees, 32(4): 1083-1101.
- de Vienne, D., 2003. Molecular Markers on Plant Genetics and Biotechnology. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 235p.
- Farrokhi, J. and Naseri, L., 2012. Diversity survey of some Iranian native and exotic apples (*Malus*× *domestica*) cultivars using SSR markers. Agricultural Biotechnology, 2(2): 27-34 (In Persian).
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223-270 (In French).
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants—Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
- Mousavi, S.A., Fattahi Moghaddam, M.R., Zamani, Z., Tatari, M., Imani, A. and Martinez-Gomez, P., 2015. Genetic diversity and relationship of Iranian and exotic almond cultivars using microsatellite (SSR) markers. Seed and Plant Improvement Journal, 31(1): 25-53 (In Persian).
- Muchugi, A., Kadu, C., Kindt, R., Kipruto, H., Lemurt, S., Olale, K., Nyadoi, P., Dawson, I. and Jamnadass, R., 2008. Molecular Markers for Tropical Trees: A Practical Guide to Principles and Procedures. World Agroforestry Centre Inc., Gigiri, Nairobi, 89p.
- Ravi, M., Geethanjali, S., Sameeyafarheen, F. and Maheswaran, M., 2003. Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. Euphytica, 133(2): 243-252.
- Rezanejad, F., 2015. Flower biology in *Tecomella undulate* (Roxb.) Seem. (Bignoniaceae). Journal of Plant Researches, 27(4): 647-660 (In Persian).
- Taheri, A., Seyedi, N. and Abdollahi Mandulakani, B., 2016. SSR-based assessment of genetic diversity in Iranian walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Forest and Wood Product, 69(2): 277-286.
- Tewari, V.P. and Singh, B., 2009. Site index model for *Tecomella undulata* (Sm.) Seem. (Bignoniaceae) plantations in a hot arid region of India. Journal of Arid Environments, 73(4-5): 590-593.
- Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., 1997. POPGENE, version 1.21: software Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. CIFOR and University of Alberta, Edmonton, Alberta.
- Zhou, X.J., Ren, X.L. and Liu, W.Z., 2016. Genetic diversity of SSR markers in wild populations of *Tapiscia sinensis*, an endangered tree species. Biochemical Systematics and Ecology, 69: 1-5.
- Zolfaghari, R., Akbarinia, M., Mardi, M. and Ghanati, F., 2009. Genetic diversity in Persian oak (*Quercus branti* Lindl) from Kohkiluye and Boyerahmad using SSR. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16(2): 172-181 (In Persian).
- Zolfaghari, Z., Moradi, M., Basiri, R. and Ghasemi, A., 2018. Evaluation of *Tecomella undulata* R. stands structure in Bushehr province. Journal of Environmental Science and Technology, 19(4): 49-65 (In Persian).

Survey on genetic diversity among *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. genotypes using SSR markers

I. Amiri [1], H. Sodaiezade [2*], A. Mosleh Arani [3], J. Taie Semiromi [4] and M.A. Hakimzade [3]

1- Ph.D. Student of Combating Desertification, Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran
2*- Corresponding author, Associate Prof., Faculty of Natural Resources and Desert Studies, University of Yazd, Yazd, Iran
E-mail: hsodaie@yazd.ac.ir
3- Associate Prof., Faculty of Natural Resources and Desert Studies, University of Yazd, Yazd, Iran
4- Associate Prof., Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran

Received: 04.10.2018 Accepted: 13.04.2019

Abstract

Tecomella undulata (Roxb.) Seem. is an important evergreen plant species from different points of view. This species has important characteristics including resistance to high drought and temperature, sand fixation, medicinal properties, and durable wood. The objective of this study was to investigate the genetic diversity among 30 genotypes of the species collected from Bushehr, Kerman and Hormozgan provinces using molecular data obtained from SSR primers. DNA samples were extracted and used in PCR tests by applying microsatellite primers. After agarose gel electrophoresis of DNA Fragments, a totally 29 alleles were distinguished. In831 primer generated most locus. Results of cluster analysis using the UPGMA algorithm based on the Jaccard similarity coefficient categorized the genotypes into eight groups, indicating a high level of genetic diversity among the genotypes. Furthermore, observed and expected heterozygosity were estimated to be 0.4 and 0.29, respectively. Furthermore, the effective number of alleles ranged between 1.2 in the In831 gene to 1.81 in the Tau16 gene with average values of 1.51. These results showed that SSR markers are highly effective in determining the amount of genetic diversity in the population of *T. undulata*. The observed high diversity among the genotypes of the species showed a rich source of germplasm which can be used in breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, genotype, germplasm, primer.