

بررسی تنوع ژنتیکی نمونه های آلودی وحشی و تجاری با استفاده از مارکر ملکولی SSR

مرضیه اتحادپور^{۱*}، محمدرضا فتاحی مقدم^۲ و ذبیح اله زمانی^۳
^{۱،۲،۳}، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
 دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۳ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۲)

چکیده

امروزه آلودی یکی از درختان میوه مهم در بسیاری از کشورهای جهان می باشد. آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرم پلاسماهای موجود امکان انتخاب والدین در بهبود برنامه های اصلاحی را فراهم می کند. جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی و مشخص نمودن روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ های آلودی ایران (رامسر، کرج و مشهد) و ژنوتیپ های تجاری موجود در مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران و همچنین نمونه میروبالان از هشت نشانگر ریزماهوره استفاده شد. این نشانگرها تعداد ۶۸ آلل در مجموع هشت جایگاه ریزماهوره در ژنوتیپ های مورد بررسی تولید کردند. مکان های ریزماهوره UDA-005 و UDP98410 با ۱۲ آلل بیشترین و مکان ریزماهوره CPSCT026 با چهار آلل کمترین تعداد آلل را در بین نشانگرها تولید کردند. میانگین تعداد آلل های مؤثر (ne) ۴/۱ با حداکثر ۶/۶ آلل در مکان ریزماهوره UDA-005 و حداقل ۲/۷ در ASSR71 بود. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در بین مکان ها ۰/۷۳ بود که از ۰/۵۸ در ASSR71 تا ۰/۸۶ در مکان ریزماهوره UDA-005 متفاوت بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده ۰/۴۹ بود که از ۰/۳۴ در UDP98410 تا ۰/۷۱ در مکان ASSR72 متغیر بود. میانگین شاخص جریان ژنی (Nm) در بین همه مکان ها ۱/۲۲ بود که نشان می دهد مبادله مواد ژنتیکی (بذر، گرده و غیره) بین محل های جغرافیایی مورد نظر انجام شده است. محتوای اطلاعات چندشکلی در بین ژنوتیپ های مورد بررسی از ۰/۵۲ تا ۰/۸۰ با میانگین ۰/۶۹ ارزیابی شد که هتروزیگوتی بالا را در بین ژنوتیپ های آلودی نشان داد. گروه بندی نمونه ها از روش تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه SMC انجام شد و دندروگرام با استفاده از روش Unweighted Paired Group Method of Arithmetic Means رسم گردید. گروه بندی ژنوتیپ ها با مناطق جغرافیایی مطابقت نداشت به طوری که آلودی مناطق متفاوت در گروه های ژنتیکی مجاور هم قرار گرفتند ولی تفاوت مشخصی بین ژنوتیپ های هگزاپلوئید و دیپلوئید مشاهده شد به گونه ای که ژنوتیپ های هگزاپلوئید در فاصله ۰/۶۶ از بقیه ژنوتیپ ها جدا شدند و در یک گروه قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۵۰۶) و بیشترین آن (۰/۹۲) و متوسط تشابه بین کل ژنوتیپ ها ۰/۷۷ بود که با متوسط تشابه گزارشات قبلی در ژنوتیپ های مشابه با استفاده از دیگر نشانگرها (۰/۷۱) مطابقت نشان داد.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، آلودی، پایه، میروبالان

مقدمه

Prunus cerasifera Ehrh) و آلودی آمریکایی (*P.*

americana) دیپلوئید هستند (۲n=2x=16) در مقابل

Prunus spinosa L. تتراپلوئید (۲n=4x=32) و انواع

اروپایی (*P. domestica*) هگزاپلوئید (۲n=6x=48)

آلو و گوجه از نظر رده بندی از جنس *Prunus* زیر

جنس *Prunophora* و از خانواده Rosaceae می باشند.

آلودی ژاپنی (*Prunus saliciana* Lindl.)، آلودی میروبالان

بکار رفته است. (Shimada et al., 1999; Qiao et al., 2006; Liu et al., 2007; Lisek et al., 2007; Tamarzizt ey al., 2009). نشانگر AFLP یکی دیگر از نشانگرهای ملکولی می‌باشد که جهت تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آلو بکار گرفته شده است. (Aradhya et al., 2004; Ayanoglu et al., 2007; Ilgin et al., 2009)

نشانگرهای ریزماهواره به عنوان نسل دوم نشانگرهای DNA به علت تنوع بالا، فراوانی، تکرارپذیری، توارث مندلی و طبیعت هم بارزشان به عنوان نشانگرهای رایج استفاده می‌شوند. ریزماهواره‌ها، توالی‌های ساده تکراری یا توالی‌های بسیار متغیر آرایه‌هایی از موتیف‌های کوتاه ۶-۱ نوکلئوتیدی هستند. از کاربردهای نشانگرهای ریزماهواره می‌توان به تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، تجزیه شجره و تعیین خویشاوندی و مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی اشاره کرد (Li et al., 2000).

در هسته داران، بیشترین توالی‌های موجود SSR در هلو و بعضی از آنها در گیلاس شناسایی شده‌اند (Hormaza 2002 & Wunsch). اغلب ریزماهواره‌های شناخته شده در یک گونه در گونه‌های دیگر نیز بکار رفته است که قابلیت انتقال پذیری آنها را نشان می‌دهد (Wunsch, 2009).

در تحقیقات متعددی بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌های پرونوس با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) انجام شده است (Bianchi et al., 2004; Rohrer et al., 2004; Ahmad et al., 2004; Mnejja et al., 2004; Hayashi et al., 2009; Bouhadida et al., 2009). ژنتیک آلوها بدلیل برنامه‌های محدود اصلاحی و خود ناسازگاری که باعث ایجاد مشکل در بدست آوردن جمعیت خودگرده افشان می‌شود، نسبت به دیگر محصولات کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های وحشی و ژنوتیپ‌های تجاری آلو، با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این تحقیق شامل ۳۴ ژنوتیپ آلو موجود در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه

هستند. در بین هسته دارها، آلوها بیشترین تنوع را از نظر تاگزونومی دارند و به محدوده وسیعی از آب و هوا و شرایط خاکی سازگاری دارند. بعضی از آنها برای میوه هایشان (بعنوان مثال آلوهای دیپلوئید ژاپنی و آلوهای اروپایی) مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما بیشتر آنها بعنوان پایه برای تقریباً تمام گونه‌های هسته دار بجز گیلاس به کار می‌روند. گونه‌ها و ارقام آلو دارای خصوصیات میوه کاملاً متفاوتند که از آن جمله می‌توان به اندازه، شکل، رنگ، بافت، طعم و کیفیت نام برد. قدرت رشد و نحوه رشد آن نیز متنوع است و از درختچه‌های کوچک تا درختان بزرگ، گسترده تا عمودی، برگ‌های ضخیم تا نازک و زود گل‌ده تا دیر گل‌ده هستند (Ilgin et al., 2009).

آگاهی از تنوع ژنتیکی و روابط گونه‌های مورد کشت هسته داران جهت شناسایی خزانه ژنی، جمع آوری ژرم پلاسما و ایجاد راهکارهای موثر نگهداری و مدیریت دارای اهمیت می‌باشد. روش‌های سنتی شناسایی ژنوتیپ‌ها بر پایه مشاهدات فنوتیپی می‌باشد، اما بدلیل دوره نونهالی طولانی درختان میوه، روش کندی می‌باشد و همچنین تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. طبقه بندی سنتی تاگزونومی راهنمای مناسبی برای تعیین روابط گونه‌ها تامین نمی‌کند، اما ارزیابی ملکولی بینش بهتری نسبت به ساختار ژنتیکی و تفاوت درون و بین گونه‌ها ایجاد می‌کند که برای ژنتیک‌دانان، اصلاحگران گیاهی و مدیران بانک‌های ژن مفید می‌باشد (Mallikarjuna et al., 2004). استفاده از روش‌های جدید در شناسایی میوه‌ها، فرآیند شناسایی هر ژنوتیپ

را در هر مرحله رشدی و مستقل از فاکتورهای محیطی که ممکن است فنوتیپ را تحت تاثیر قرار دهند، تسریع می‌بخشند. لذا برای بررسی بهتر تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف آلو و کاربرد آنها در برنامه‌های اصلاحی استفاده از روش‌های پیشرفته مولکولی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات قبلی برای نشان دادن تنوع ژنتیکی واریته‌های آلو با استفاده از پارامترهای فیزیولوژی، خصوصیات میوه و نشانگرهای ملکولی انجام شده است. از جمله می‌توان به نشانگرهای RAPD اشاره کرد که جهت تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آلو

نادر ۴ بود که از منطقه کلات نادر (مشهد) جمع آوری شده بودند. ژنوتیپ‌های برجی نیشابور ۱، برجی نیشابور ۲ و آلوی وحشی از منطقه نیشابور جمع آوری شده بودند و به عنوان جمعیت چهارم در نظر گرفته شدند. جمعیت پنجم شامل ژنوتیپ‌های تجاری بود که ژنوتیپ-های شایرو، شابرون و سانتاروزا بودند. سایر ژنوتیپ‌ها به دلیل معلوم نبودن هویت جغرافیایی و یا بدلیل هگزابلوتید بودن که نرم افزار Pop Gene قادر به تجزیه آنها نبود در منطقه بندی ژنوتیپ‌ها در نظر گرفته نشدند و فقط محاسباتی که توسط نرم افزار NTSYS قابل انجام بود، روی آنها صورت پذیرفت.

تهران در کرج که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است به همراه ۵ رقم تجاری و نمونه میروبالان بودند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های جواهرده ۱، جواهرده ۲، جواهرده ۳، جواهرده ۴، 4M-63، 4M-25، 4M-91، 4M-47 و 86-4mm-15 از منطقه جواهرده (رامسر) جمع آوری شده بودند و به عنوان جمعیت یک در نظر گرفته شدند. همچنین ژنوتیپ‌های ولیان ۱، ولیان ۲، ولیان ۳a، ولیان ۳b، ولیان ۴، ولیان ۵ و ولیان ۶ از منطقه ولیان کرج جمع آوری شده بودند و به عنوان جمعیت دو در نظر گرفته شدند. جمعیت سوم شامل ژنوتیپ‌های آلوچه کلات نادر ۲ و آلوچه کلات

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های آلوی مورد بررسی و منطقه جمع آوری

شماره	ژنوتیپ	منطقه	شماره	ژنوتیپ	منطقه	شماره	ژنوتیپ	منطقه	شماره	ژنوتیپ	منطقه
۱	جواهرده ۱	رامسر	۱۱	4M-47	رامسر	۲۱	برجی نیشابور ۲	نیشابور	۳۱	86-n-4	نامشخص
۲	جواهرده ۲	رامسر	۱۲	86-4mm-15	رامسر	۲۲	آلوی وحشی	نیشابور	۳۲	18-3	نامشخص
۳	جواهرده ۳	رامسر	۱۳	ولیان ۱	کرج	۲۳	آلوی شیرین هسته جدا (چناران)	مشهد	۳۳	86-b3-4	نامشخص
۴	جواهرده ۴	رامسر	۱۴	ولیان ۲	کرج	۲۴	اسجیل (چناران)	مشهد	۳۴	درگزی	نامشخص
۵	4M-63	رامسر	۱۵	ولیان ۳a	کرج	۲۵	آلوچه کلات نادر ۲	مشهد	۳۵	سانتاروزا*	
۶	4M-25	رامسر	۱۶	ولیان ۳b	کرج	۲۶	آلوچه کلات نادر ۴	مشهد	۳۶	شابرون*	
۷	4M-91	رامسر	۱۷	ولیان ۴	کرج	۲۷	بی نام ۱	نامشخص	۳۷	مجار*	
۸	4M-69	رامسر	۱۸	ولیان ۵	کرج	۲۸	۸۶-۵۱-۳	نامشخص	۳۸	شایرو*	
۹	4M-44	رامسر	۱۹	ولیان ۶	کرج	۲۹	بی نام ۲	نامشخص	۳۹	قطره طلا*	
۱۰	4M-12	رامسر	۲۰	برجی نیشابور ۱	نیشابور	۳۰	n-1	نامشخص	۴۰	میروبالان*	

*ژنوتیپ‌های موجود در مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

آغازگرهای مورد استفاده

این آغازگرها به صورت خشک فریز شده^۱ تهیه شده بودند که با آب مقطر دو بار تقطیر استریل به غلظت ۱۰۰ μM (۱۰۰ pmol/μl) رقیق شده و در فریز نگهداری شدند. پرایمرها به هنگام استفاده به مقدار ۱۰ برابر رقیق

شده (۱۰ μM) و سپس برای هر واکنش ۱۷ میکرولیتری مقدار ۱/۵ میکرولیتر از آنها استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه های برگ و با استفاده از روش Murray & Thompson (1980) با اندکی تغییرات بود که شامل افزودن PVP (۲۰ گرم در لیتر) به بافر استخراج و افزایش زمان قرار دادن نمونه‌ها در آب گرم

1. Freeze- dried

شد. ژل با شدت جریان ۹۰ وات به مدت ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت الکتروفورز شد و جهت آشکارسازی قطعات DNA تکثیر شده در ژل، از رنگ آمیزی به روش نترات نقره استفاده گردید.

تجزیه داده‌ها

رتبه دهی باندها به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. در هر ژنوتیپ وجود یک باند به منزله هموزیگوسیتی و مشاهده دو باند به منزله هتروزیگوسیتی در آن مکان محسوب می‌شود. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها بر اساس ضریب تشابه SMC^۱ به روش UPGMA^۲ انجام شد و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 انجام گرفت.

نرم افزار (1.32) Pop Gene (Yeh et al., 1997) برای محاسبه هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، تعداد آلل‌های قابل مشاهده (na)، تعداد آلل مؤثر ($ne = 1/\sum(p_i)^2$) که در آن p فراوانی آلل i^{th} است و شاخص جریان ژنی ($Nm = 0.25(1-F_{ST})/F_{ST}$) (Slatkin & Barton, 1989) استفاده شد. هتروزیگوتی قابل مشاهده (Ho) در هر مکان ژنی از نسبت تعداد ژنوتیپ‌هایی که دو باند نشان دادند به کل ژنوتیپ‌ها به دست آمد. به دلیل اینکه نرم افزار Pop Gene نمی‌تواند بیش از دو آلل در یک مکان را تجزیه کند لذا دو ژنوتیپ مجار و آلوی شیرین هسته جدا (چناران) به دلیل دارا بودن تعداد آلل بیشتر در تجزیه حذف شدند و معیارهای محاسبه شده با استفاده از نرم افزار Pop Gene برای آنها بکار نرفت ولی برای تعیین تشابه ژنتیکی آنها با سایر ژنوتیپ‌ها از نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 استفاده شد. همچنین برای محاسبه فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از ضریب ژنتیکی نی (Nei, 1972) نرم افزار Pop Gene (1.32) بکار رفت.

$$I_{xy} = \frac{I_{xy}}{\sqrt{I_{xx}I_{yy}}} \quad D_{xy} = -\ln(I_{xy})$$

D_{xy} = فاصله ژنتیکی نی

I_{xy} = تشابه جمعیت x و y

J_x = متوسط هموزیگوتی جمعیت x

۶۵ درجه از ۳۰ دقیقه به یک ساعت بود. تعیین کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از روش الکتروفورز DNA روی ژل آگاروز با غلظت ۰/۸ درصد و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer، مدل EZ-201 صورت گرفت و غلظت DNA بدست آمده به ۱۵ ng/μl رقیق شد.

انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز و الکتروفورز محصول PCR

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ۸ جفت آغازگر SSR اختصاصی استفاده شد که مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است. آغازگرهای مورد نظر توسط شرکت سیناژن ساخته شده بودند. واکنش PCR در حجم ۱۷ میکرولیتر، شامل ۳ میکرولیتر از غلظت ۱۵ نانوگرم در میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر از غلظت ۵ میکرومولار هر آغازگر، ۷/۵ میکرولیتر از محلول کیت PCR، ۳/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. کیت PCR از شرکت سیناژن تهیه شد که شامل Taq DNA Polymerase، PCR buffer، dNTPs و $MgCl_2$ بود. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه ریزی شده بود، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه با کاهش ۱ درجه به دمای اتصال نهایی رسید. در ۲۵ سیکل بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز ثابت و ۴۵ ثانیه بود، در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۱ دقیقه در ۹۴ درجه بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۱ دقیقه و ۷۲ درجه بود.

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (۹۵٪ فرمامید، ۰/۵٪ برموفنل آبی، ۰/۵٪ زایلین سیانول و ۱۰ میلی مولار EDTA) مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه گرم کردن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و بلافاصله قرار دادن در ظرف حاوی یخ، مقدار هشت میکرولیتر از هر نمونه در چاهک ژل اکریل امید ۶٪ واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بار گذاری

1. Simple Matching Coefficient

2. unweighted paired group method of arithmetic means

$$J_y = \text{متوسط هموزیگوتی جمعیت } y$$

$$J_{xy} = \text{متوسط هموزیگوتی بین جمعیت } x \text{ و جمعیت } y$$

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در این مطالعه

منبع	دمای بهینه اتصال (درجه سانتی گراد)	طول (bp)	موتیف	توالی (3'→5')	جایگاه ریز ماهواره
Testolin et al., 2004	۵۷	۱۷۲	(AC)14(TC)21	F: CATCACACACAAACACAAATGC R: GCATTGTGCTCTTCATGGAC	UDA-005 (BV10240)
Mnejja et al., 2004	۵۵	۲۰۰	(GT)8(AT)4... (GA)7CA(GA)4	F: CCAGCACAGAGAAAACGATG R: GAGCTCCTACTCTGAGTCTGTAAAA	CPSCT044 (AY426228)
Mnejja et al., 2005	۶۰	۱۷۲	(CT)10	F: GACCTCATCAGCATCACCAA R: TTCCCTAACGTCCCTGACAC	CPDCT025 (AY862462)
Mnejja et al., 2004	۵۸	۱۹۵	(CT)16	F: TCTCACACGCTTTCGTCAAC R: AAAAAGCCAAAAGGGGTTGT	CPSCT026 (AY426211)
Xie et al., 2006	۶۳	۱۶۸	(GA)15	F: AACTTTGTCTGCCTCTCATCTTA R: AGCAGCCCATTTCTTCTCTTG	ASSR71 (DQ102369)
Xie et al., 2006	۵۹	۲۰۶	(TC)19	F: AGTGGGATTGGTAGGGAGGAAG R: CTACGGAGCCAGTTGAGAAAAG	ASSR72 (BU043090)
Xu et al., 2004	۵۷	۱۴۶	(AG)23	F: AATTTACCTATCAGCCTCAA R: TTTATGGCAGTTTACAGACCG	UDP98410
Dirlewanger et al., 2002	۵۷	۱۵۹	(GA)27	F: AATTCCTCAAAGGATGTGTATGAG R: CAGGTGAATGAGCCAAAGC	BPPCT 001

هتروزیگوسیتی بین جمعیت (شاخص تنوع ژنی) و Fit به عنوان شاخصی از وضعیت هتروزیگوسیتی کل جمعیت نیز انجام شد (Wright, 1978).

نتایج و بحث

در این تحقیق هشت نشانگر ریز ماهواره که دارای تکثیر و چند شکلی مناسب بودند مورد استفاده قرار گرفتند. تمام نشانگرهای بکار رفته تک مکانه بودند و یک یا دو باند در ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تا ۶ باند در ژنوتیپ‌های مجار و قطره طلا تولید کردند (شکل ۱ و ۲) که دال بر هگزاپلوئید بودن این ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

میانگین تعداد آلل‌های مؤثر (ne) ۴/۱ با حداکثر ۶/۶ آلل در مکان ریز ماهواره UDA-005 و حداقل ۲/۷ آلل در مکان ریز ماهواره ASSR71 بود. تفاوت بین تعداد آلل میانگین و تعداد مؤثر در هر مکان ژنی وجود آلل‌های نادر را نشان می‌دهد که فقط در یک یا چند ژنوتیپ

محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)^۱ با استفاده از نرم افزار Power Marker V3.25 (<http://www.powermarker.net>) مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Botstein et al., 1980).

$$PIC = 1 - \sum (p_i)^2 - \sum \sum 2 (p_i)^2 (p_j)^2$$

= p_i فراوانی آلل
۱ - p_i = p_j

جهت تعیین میزان تمایز جمعیت‌ها از یکدیگر و همچنین وضعیت هتروزیگوسیتی آنها، شاخص‌های آماری رایج شامل Fst شاخصی از وضعیت

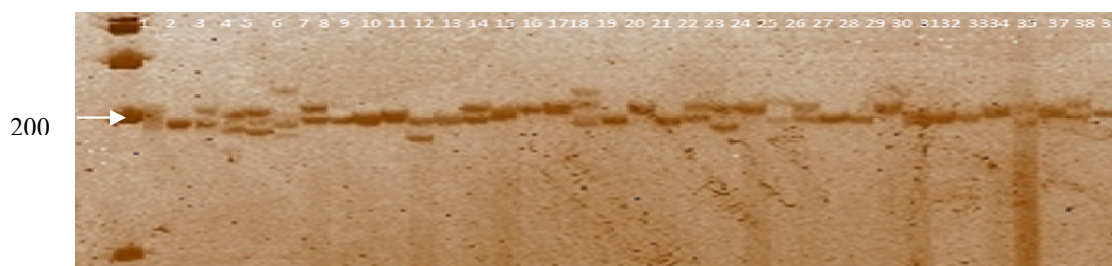
3. Polymorphic Information Content
4. Wrights F-Statistics

که نشان دهنده تثبیت آلل (allele fixation) در مکان‌های مورد مطالعه بود. Amirbakhtiar et al. (2006) نیز هتروزیگوتی قابل انتظار بیشتری از هتروزیگوتی مشاهده شده در بادام گزارش کردند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نشان دهنده میزان چند شکلی یک نشانگر می‌باشد که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چه این عدد بزرگتر باشد، بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد و میزان چند شکلی بالا و همچنین توزیع مناسب آلل‌های آن مکان در جمعیت تحت مطالعه است. میزان اطلاعات چند شکلی یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها می‌باشد (Pewell et al., 1996). در نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه، بیشترین مقدار PIC در مکان ریزماهواره UDA-005 (۰/۸) و کمترین آن در مکان‌های ریزماهواره ASSR71 و CPSCT026 به میزان ۰/۵۲ مشاهده شد (جدول ۳).

وجود دارند (Ali panah et al., 2006). آلل‌های نادر به آلل‌هایی اطلاق می‌شود که دارای فراوانی بسیار کم بوده (کمتر از ۵ درصد) و به عبارت دیگر مختص به یک یا چند رقم باشد (Joyce & Tavaré, 1995). هتروزیگوتی مورد انتظار در بین مکان‌های SSR مورد بررسی از ۰/۵۸ در مکان ریزماهواره ASSR71 تا ۰/۸۶ در مکان ریزماهواره UDA-005 با میانگین ۰/۷۳ متفاوت بود. هتروزیگوتی مشاهده شده نیز بین ۰/۳۴ در مکان ریزماهواره UDP98410 تا ۰/۷۱ در مکان ریزماهواره ASSR72 با میانگین ۰/۴۹ متغیر بود. مقدار بالای هتروزیگوتی با طبیعت دگرگشن و خودناسازگار آلو که سبب افزایش ماهیت هتروزیگوتی آن می‌شود مطابقت دارد. Hayashi et al. (2009) هتروزیگوتی مورد انتظار و هتروزیگوتی مشاهده شده را در ۲۲ ژنوتیپ آلوئی ژاپنی به ترتیب حدود ۰/۷۲ و ۰/۶۷ بدست آوردند. در همه مکان‌های SSR مورد بررسی هتروزیگوتی قابل انتظار بیشتر از هتروزیگوتی قابل مشاهده بود



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA آلو با استفاده از آغازگر CPSCT044. نمونه‌ها از چپ به راست: جواهرده ۱، 86-n-4، ولیان ۵، اسجیل (چناران)، 86-4mm-15، مجار، آلوئی وحشی، 4M-47، n-1، کلات نادر ۴، 4M-44، برجی نیشابور ۱، ولیان 3a، ولیان ۲، 4M-69، جواهر ده ۳، قطره طلا، آلوئی شیرین هسته جدا (چناران)، 4M-12، شایرو، بی نام ۱، آلوچه کلات نادر ۲، ولیان 3b، 3-51-86، شایرون، بی نام ۲، جواهر ده ۲، 4M-91، ولیان ۶، سانتاروزا، برجی نیشابور ۲، ولیان ۴، 86-b3-4، 18-3، 4M-25، 4M-63، ولیان ۱، جواهر ده ۴، میروبالان، درگری



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA آلو با استفاده از آغازگر CPDCT025. نمونه‌ها از چپ به راست: جواهرده ۱، 86-n-4، ولیان ۵، اسجیل (چناران)، 86-4mm-15، مجار، آلوئی وحشی، 4M-47، n-1، کلات نادر ۴، 4M-44، برجی نیشابور ۱، ولیان 3a، ولیان ۲، 4M-69، جواهر ده ۳، قطره طلا، آلوئی شیرین هسته جدا (چناران)، 4M-12، شایرو، بی نام ۱، آلوچه کلات نادر ۲، ولیان 3b، 3-51-86، شایرون، بی نام ۲، جواهر ده ۲، 4M-91، ولیان ۶، سانتاروزا، برجی نیشابور ۲، ولیان ۴، 86-b3-4، 18-3، 4M-25، 4M-63، ولیان ۱، جواهر ده ۴، میروبالان، درگری

جدول ۳- مقادیر محاسبه شده به تفکیک هر جایگاه ریزماهورهای در آلو

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)	هتروزیگوتی مورد انتظار (He)	تعداد آلل موثر (ne)	تعداد آلل	جایگاه ریزماهوره
۰/۸۰	۰/۶۳	۰/۸۶	۶/۶	۱۲	UDA-005
۰/۷۱	۰/۴۲	۰/۷۵	۳/۸	۸	CPSCT044
۰/۷۸	۰/۴۷	۰/۸۲	۵/۲	۹	CPDCT025
۰/۵۷	۰/۴۲	۰/۶۴	۲/۷	۴	CPSCT026
۰/۵۲	۰/۴۵	۰/۵۸	۲/۳	۵	ASSR71
۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۷۸	۴/۳	۸	ASSR72
۰/۷۶	۰/۳۴	۰/۸۱	۵	۱۲	UDP98410
۰/۶	۰/۴۵	۰/۶۲	۳	۱۰	BPPCT 001
۰/۶۹	۰/۴۹	۰/۷۳	۴/۱	۸	میانگین

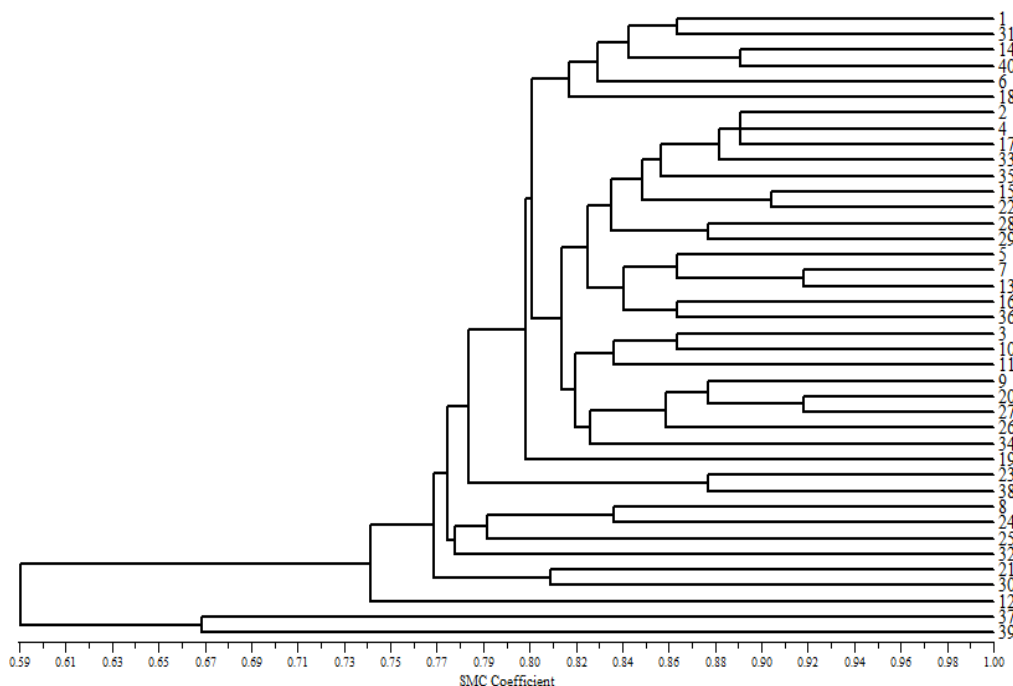
تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی

ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS بر اساس ضریب تشابه SMC بدست آمد. براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ قطره طلا و ژنوتیپ‌های ۲۷-۴M (۰/۵۰۶)، جواهرده (۰/۵۰۶) و ۱۸-۳ (۰/۵۰۶) و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های نیشابور برجی و بی نام (۰/۹۲)، ولیان ۱ و ۹۱-۴M (۰/۹۲) مشاهده شد. متوسط تشابه بین کل ژنوتیپ‌ها ۰/۷۷ بود. Aran (2009) متوسط تشابه روی ژنوتیپ‌های مشابه را با استفاده از نشانگر RAPD ۰/۷۱ بدست آوردند. Ayanoglu et al. (2009) مقدار تشابه ۲۰ توده آلوئی میروبالان را در نواحی مدیرانه‌ای ترکیه به کمک نشانگرهای AFLP ۰/۹۸۵ - ۰/۸۲۹ بدست آوردند. همچنین Qiao et al. (2006) مقدار تشابه ۵۶ ژنوتیپ آلو (۵۴ ژنوتیپ آلوئی ژاپنی و دو ژنوتیپ آلوئی اروپایی) را با استفاده از ترکیب سه نشانگر RAPD، ISSR و SSR ۰/۷۳ - ۰/۶۷ بدست آوردند.

تجزیه خوشه‌ای

مقایسه نتایج روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضرایب تشابه متفاوت بر اساس ضریب

کوفنتیک نشان داد که گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه SMC بیشتر با اطلاعات موجود مطابقت دارد. میزان ضریب همبستگی بین ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر در این حالت ۹۰ درصد بدست آمد. بر اساس دندروگرام بدست آمده (شکل ۳) از ماتریس تشابه، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در فاصله ۰/۷۹ به هشت گروه تقسیم شدند که در یک گروه ژنوتیپ قطره طلا و در گروه دیگر ژنوتیپ مجار قرار گرفت. این دو ژنوتیپ در فاصله ۰/۵۹ از سایر ژنوتیپ‌ها و در فاصله ۰/۶۶ از هم جدا شدند. گروه سوم شامل ژنوتیپ ۱۵-4mm-86 (۱۲) بود. گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های برجی نیشابور ۲ (۲۱) و n-1 (۳۰)، گروه پنجم شامل ژنوتیپ 3-18 (۳۲) که دارای تیپ رشد حدواسط، بدون خار و دارای پاچوش بود و گروه ششم شامل ژنوتیپ‌های آلوچه کلات نادر ۲ (۲۵)، اسجیل (چناران) (۲۴) و 4M-69 (۸) بود. گروه هفتم شامل ژنوتیپ‌های شایرو (۳۸) و آلوئی شیرین هسته جدا (چناران) (۲۳) و بالاخره گروه هشتم شامل ژنوتیپ‌های زیادی می باشد که تشابه ژنتیکی آنها تقریباً بین ۰/۸ تا ۰/۹۲ می باشد که نشان دهنده این است که این ژنوتیپ‌ها از تنوع کمتری برخوردار هستند.



شکل ۳- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۴۰ ژنوتیپ آلو با استفاده از داده‌های SSR و محاسبه ضریب تشابه SMC و روش UPGMA (اسامی کامل ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آمده است).

تجزیه منطقه‌ای نمونه‌ها

کلات نادر و تجاری و بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۳۶) بین جمعیت‌های جواهرده و ولیان کرج بدست آمد. بیشترین تشابه ژنوتیپ‌های تجاری با جمعیت ولیان کرج (۰/۶۸۳) بدست آمد (جدول ۴).

ماتریس تشابه ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از ۵ ناحیه با استفاده از نرم‌افزار PopGen32 بر اساس ضریب تشابه Nie بدست آمد. بر اساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۳۴۳) بین جمعیت‌های

جدول ۴- بررسی میزان تشابه (قسمت بالا) و فاصله (قسمت پایین) ژنتیکی با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۲)

جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵
۱	-	۰/۸۳۶	۰/۵۸۶	۰/۷۶۷	۰/۵۸۹
۲	۰/۱۷۹	-	۰/۵۴۷	۰/۷۱۷	۰/۶۸۳
۳	۰/۵۳۵	۰/۶۰۳	-	۰/۵۲۷	۰/۳۴۳
۴	۰/۲۶۵	۰/۳۲	۰/۶۴	-	۰/۵۴
۵	۰/۵۲۹	۰/۳۸	۰/۶۶	۰/۶	-

(Nm) در بین همه مکان‌ها ۱ بود که از ۰/۶۷ در -UDA 005 تا ۳/۷ در CPSCT026 تغییر کرد (جدول ۵) که نشان می‌دهد مبادله مواد ژنتیکی (بذر، گرده و غیره) بین جمعیت‌های مورد نظر انجام شده است.

میانگین Fit مقدار ۰/۲۶ بود که نسبت به میانگین Fst (۰/۲) بالاتر بود و نشان می‌دهد که تنوع درون جمعیت‌ها نسبت به تنوع بین جمعیت‌ها بالاتر بوده و جمعیت‌ها از هم منفک نیستند. شاخص جریان ژنی

همچنین در جمعیت های طبیعی، خودناسازگاری اثر معنی داری روی جریان ژنی و تنوع ژنتیکی دارد.

جدول ۵- مقادیر محاسبه شده به تفکیک هر جایگاه ریزماهوره ای در آلو

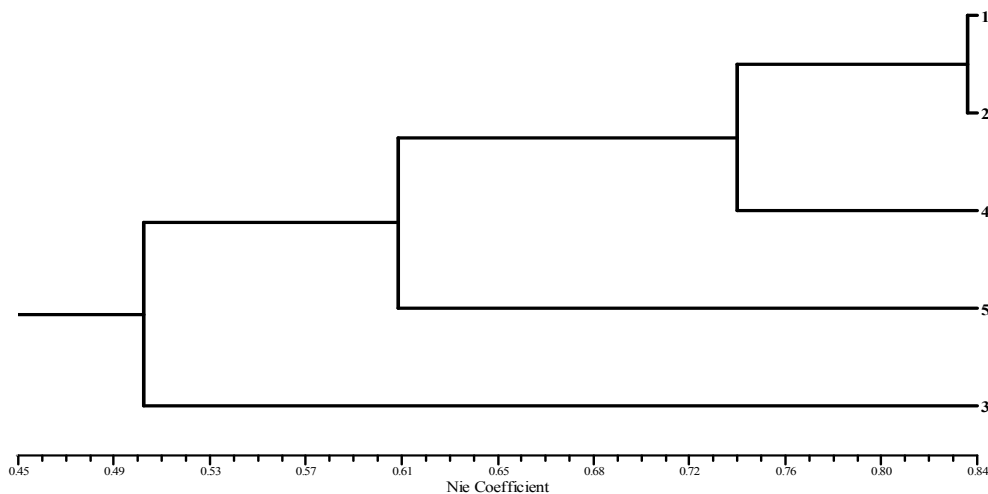
جایگاه ریزماهوره	F_{st}	F_{is}	F_{it}	N_m
UDA-005	-۰/۲۳	-۰/۰۹	-۰/۱۶	-۰/۸۵
CPSCT044	-۰/۳۱	۰/۰۷	۰/۳۶	-۰/۵۴
CPDCT025	-۰/۳۱	-۰/۰۷	۰/۲۶	-۰/۵۵
CPSCT026	-۰/۱۴	۰/۳۴	-۰/۴۲	۱/۵۰
ASSR71	-۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۳	۱/۴۱
ASSR72	۰/۱	-۰/۲۷	-۰/۱۵	۲/۴۸
UDP98410	-۰/۱۲	۰/۳۷	-۰/۴۵	۱/۹۵
BPPCT 001	-۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۳۵	-۰/۸۷
میانگین	۰/۲	۰/۰۸	-۰/۲۶	۱

*Nm: شاخص جریان ژنی

*Fst: نسبت تنوع بین جمعیت ها به تنوع کل

*Fit: نسبت تنوع درون جمعیت ها به تنوع کل

*Fis: نسبت اختلاف تنوع درون و بین جمعیت ها به تنوع درون جمعیت ها



شکل ۴- دندروگرام مربوط به گروه بندی ۵ جمعیت آلو با استفاده از داده های SSR و محاسبه ضریب تشابه Nie و روش گروه بندی UPGMA (شماره جمعیت ها و ژنوتیپ های آنها در مواد و روش ها آمده است).

تجزیه کلاستر منطقه ای

روش تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه نی استفاده گردیده و دندروگرام حاصل از روش تجزیه خوشه ای UPGMA رسم گردید (شکل ۵). میزان ضریب

برای گروه بندی ژنوتیپ های جمع آوری شده از ۵ ناحیه و با توجه به همباز بودن نشانگر ریزماهوره از

نتیجه‌گیری کلی

حفاظت از منابع ژنتیکی هر گونه و داشتن مشخصات ارقام محلی نیاز به اطلاع از تنوع ژنتیکی و ارتباط بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها دارد. ارزیابی دقیق میزان و الگوی تنوع ژنتیکی همچنین در برنامه‌های اصلاحی گیاهان موثر است. این تحقیق برای تعیین ارتباط و بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های آلوی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و همچنین تعدادی از ژنوتیپ‌های تجاری با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR انجام گرفت. تفاوت ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها توسط نشانگرهای SSR نشان داد که در بعضی موارد ژنوتیپ‌هایی که از یک منطقه جمع‌آوری شدند در تجزیه کلاستر در کنار هم قرار گرفتند ولی در بیشتر موارد گروه بندی مستقل از منشاء جغرافیایی ژنوتیپ‌ها بود که با نتایج Tamarzizt et al. (2009) و Aran (2009) روی ژنوتیپ‌های آلو مطابقت دارد. در گروه بندی حاصل، تفاوت مشخصی بین ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید و دیپلوئید مشاهده شد به گونه‌ای که ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید در فاصله ۰/۶۶ از بقیه ژنوتیپ‌ها جدا شدند و در یک گروه قرار گرفتند. بطور کلی فاصله ژنتیکی مشاهده شده بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای SSR نسبتاً پایین بود که با نتایج Aran (2009) در بررسی ژنوتیپ‌های آلو با استفاده از نشانگرهای RAPD مطابقت دارد. از جمع‌بندی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های SSR چنین استنباط می‌شود که از میان نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده در این تحقیق نشانگرهای UDA-005، CPDCT025 و UDP98410 با توجه به هتروزیگوتی بالا، تعداد آلل‌های ردیابی شده و محتوای اطلاعات چند شکل بالا جهت مطالعه و بررسی ژنوتیپ‌های آلو موجود در کشور مناسب هستند.

همبستگی بین ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر در این آزمایش ۸۶ درصد بدست آمد.

بر اساس گروه‌بندی بدست آمده، جمعیت‌ها در فاصله تشابه ۰/۵ از هم جدا شدند و جمعیت کلات نادر از بقیه جمعیت‌ها جدا شد. جمعیت ژنوتیپ‌های تجاری نیز در فاصله تشابه ۰/۶۱ از سایر جمعیت‌ها جدا شد. گروه دیگر در فاصله ۰/۷۴ به دو شاخه تقسیم شد و جمعیت برجی نیشابور از دو جمعیت دیگر جدا شد. جمعیت جواهرده و ولیان کرج نیز در فاصله ۰/۸۳۶ از هم جدا شدند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد تنوع گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با مناطق جغرافیایی مطابقت ندارد به طوریکه آلوهای مناطق متفاوت در گروه‌های ژنتیکی مجاور هم قرار گرفتند که با یافته‌های Tamarzizt et al. (2009) مبنی بر اینکه در بیشتر موارد گروه بندی ژنوتیپ‌های آلو مستقل از منشاء جغرافیایی ژنوتیپ‌ها بود، مطابقت دارد. عدم گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مربوط به یک منطقه جغرافیایی خاص اختصاصاً دلیل بر عدم توانایی نشانگرها در گروه‌بندی نیست بلکه می‌تواند نشان‌دهنده تبادل ژرمپلاسمی نواحی مختلف به صورت‌های مختلف باشد. همچنین نزدیکی ژنتیکی می‌تواند ناشی از داشتن اجداد مشترک باشد. با این وجود استفاده از تعداد بیشتری نشانگر با پوشش ژنومی مناسب‌تر می‌تواند منعکس کننده تنوع ژنتیک کامل ژنوتیپ‌ها بوده و آنها را بر اساس تشابهات ژنتیک گروه‌بندی نماید.

مقایسه دسته‌بندی مفروض با نشانگرهای SSR با گروه‌بندی بدست آمده از مطالعه RAPD روی ژنوتیپ‌های مشابه (Aran, 2009)، نشان از همبستگی مطلوب نتایج حاصل از دو نشانگر است که این امر بیانگر آن است که دسته‌بندی‌های صورت گرفته چندان دور از واقعیت نیستند.

REFERENCES

- Ahmad, R., Potter, D. & Southwick, S.M. (2004). Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 164-169.
- Ali panah, L., Hojat, H., Ghareyazi, B., Gholami, M., Mohamadi, A. & Najafi, J. (2006). Study of genetic diversity on *Vitis* of Fars and Khorasan provinces using microsatellite markers. *Iranian Journal of Agriculture Sciences*, 37, 517-522. (In Farsi).
- Amirbakhtiar, N., Shiran, B., Moradi, H. & Sayad-Tabatabaei, B.E. (2006). Molecular characterization of almond cultivars using microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 726, 51-56.

4. Aradhya, M.K., Weeks, C. & Simon, C.J. (2004). Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 103, 131-144.
5. Aran, M. (2009). Molecular and morphological characterization of plum seedling for rootstock selection. M.Sc. thesis. College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran. (In Farsi).
6. Ayanoglu, H., Bayazit, S., Inan, G., Bakir, M., Akpinar, A.E., Kazan, K. & Ergul, A. (2007). AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. *Scientia Horticulturae*, 114, 263-267.
7. Bianchi, V.J., Sansavini, S. & Fachinello, J.C. (2004). Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp rootstocks. *Scientia Agricola*, 61, 303-306.
8. Bouhadida, M., Casas, A.M., Gonzalo, M.J., Arus, P., Moreno, M.A. & Gogorcena, Y. (2009). Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 120, 237-245.
9. Gerald, S. D., Woeste, K., Mallikarjuna, K., Aradhya, K., Koehmstedt, A. & Simon, C. (2005). Characterization of microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 130, 348- 354.
10. Hayashi, K., Shimazu, K., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Nishitani, C. & Yamamoto, T. (2009). Genetic diversity of mume, apricot and Japanese plum cultivars assessed by SSR markers. *Acta Horticulturae*, 814, 629-634.
11. Ilgin, M., Kafkas, S. & Ercisli, S. (2009). Molecular characterization of plum cultivars by AFLP markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23, 1189-1193.
12. Joyce, P. & Tavare, S. (1995). The distribution of rare alleles. *Journal of Mathematical Biology*, 33, 602-618.
13. Li, C.D., Rossmagle, B.G. & Scoles, G.J. (2000). The development of oat microsatellites markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 1259-1268.
14. Lisek, A., Korbin, M., Rozpara, E. & Zurawicz, E. 2007. Plum cultivar DNA polymorphism generated with RAPD and ISSR markers. *Acta Horticulturae*, 734, 281-285.
15. Liu, W., Li, S., Zhang, A. & Liu, D. 2007. Genetic diversity revealed by RAPD markers in plum collection of China. *Acta Horticulturae*, 734, 287-294.
16. Mallikarjuna, K., Aradhya-Weeks, C., Charles, J. & Simon, B. (2004). Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 103, 131-144.
17. Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W. & Arus, P. (2005). Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Note*, 5, 531-535.
18. Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M.L. & Arus, P. (2003). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus saliciana* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes*, 4, 163-166.
19. Murray, H.G. & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Researc.*, 8, 4321-4325.
20. Nei, M. (1972). Genetic distance between population. *American Naturalist*, 106, 283-292.
21. Powell, W., Machray, G.C. & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1, 215-222.
22. Qiao, Y.S., Fang, J.G., Cong, Y., Zhou, J. & Zhang, Z. (2006). Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. *Acta Horticulturae*, 763, 177-184.
23. Rohrer, J., Ahmad, R.R., Southwick, S.M. & Potter, D. (2004). Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus* sect. *Prunocerasus*, Rosaceae). *Plant System Evolution*, 244, 69-75.
24. Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M. & Yoshida, M. (1999). Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Euphytica*, 109, 143-147.
25. Slatkin, M. & Barton, N.H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43, 1349-1368.
26. Tamarzizt Hend, B., Ghada, B., Mustapha Sana, B., Mohamed, M., Mokhtar, T. & Salhi-Hannachi, A. (2009). Genetic relatedness among Tunisian plum cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis and evaluation of phenotypic characters. *Scientia Horticulturae*, 124, 440-446.
27. Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Huang, W.G. & Cipria, G. (2004). Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes*, 4, 459-461.
28. Wright, S. (1978). Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

29. Wünsch, A. (2009). Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 120, 348–352.
30. Wunsch, A. & Hormaza, J.I. (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125, 59–67.
31. Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T. (1997). PopGene 1.21. (URL <http://www.ualberta.ca/~fyeh>).