نشریه علوم باغبانی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳ (ص۵۴-۴۵)

ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی توت‌فرنگی رقم کردستان با تعدادی از ارقام تجاری با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

عباس لطفی[۱]، علی قرقانی[۲*]، عنایت‌اله تفضلی[۳]، علی نیازی[۴]، سعید عشقی[۵] و علی‌اکبر مظفری[۶]
۱، ۲، ۳، ۵. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، استاد و دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه شیراز
۴. دانشیار پژوهشکدهٔ زیست فناوری دانشگاه شیراز،
۶. استادیار گروه علوم باغبانی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان.
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱/۱۵)

چکیده

به‌منظور ارزیابی روابط ژنتیکی توت‌فرنگی رقم کردستان و همچنین تغییرات ژنتیکی و اختلاط ژنتیکی احتمالی این رقم با دیگر ارقام تجاری ۳۳ نمونه گیاهی شامل: ۲۰ نمونه از رقم کردستان از مزارع مختلف و قدیمی استان کردستان با ۷ رقم و دورگه روسی و ۶ رقم تجاری معروف دنیا با ۱۰ نشانگر ریزماهواره آنالیز شد. در هر جایگاه ریزماهواره بین ۴ تا ۸ آلل (میانگین ۵/۵ آلل) مشاهده شد و محتوای چندشکلی اطلاعات نشانگرها بین ۰/۵۹تا ۰/۸۶ متغیر بود. با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای و همچنین تجزیه و تحلیل مختصات اصلی، ارقام در هشت گروه (شامل دو گروه اصلی نمونه‌های رقم کردستان و ارقام و دورگه‌های روسی و ارقام تجاری هر کدام یک گروه) قرار گرفتند. نمونه‌های رقم کردستان قرابت بیشتری با ارقام روسی در مقایسه با ارقام آمریکایی و اروپایی داشتند که با توجه به پیشینهٔ تاریخی آن می‌تواند بیانگر این باشد که توت‌فرنگی رقم کردستان احتمالاً یک رقم روسی است که در گذشته وارد ایران شده است. در این مطالعه مواردی از اختلاط فیزیکی رقم کردستان با ارقام تجاری دیگر در مزارع و همچنین یک مورد وقوع جهش در این رقم مشاهده شد.

واژه های کلیدی: **اختلاط ژنتیکی، ارقام تجاری توت‌فرنگی، توت‌فرنگی رقم کردستان، روابط ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره.**

مقدمه

توت‌فرنگی گیاهی از خانوادهٔ رزاسه است که ۲۳ گونه دارد. توت‌فرنگی تحت کشت یک گیاه اکتاپلوئید (Fragaria × ananassa, 2n = 8X = 56) است (Davis *et al*., 2007) که در سال‌های اخیر مطالعات ژنتیکی و مولکولی زیادی بر روی آن صورت گرفته است (Gil-Ariza *et al*., 2009). شناسایی دقیق ارقام و ژنوتیپ‌ها و ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم هر گیاه اهمیت ویژه‌ای در به‌نژادی آن دارد. برای شناسایی و تشخیص ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی، در گذشته بیشتر از ویژگی‌های مورفولوژیکی مثل شکل برگ، گل و میوه استفاده می‌شد ولی با توجه به اینکه اغلب ارقام تجاری قرابت ژنتیکی بالایی دارند و از طرف دیگر خصوصیات مورفولوژیکی تا حدود زیادی متأثر از عوامل محیطی هستند، لذا شناسایی دقیق ارقام تجاری با استفاده از صفات مورفولوژیکی بسیار مشکل است (Dale, 1996). توسعهٔ انواع نشانگرهای مولکولی در چند دههٔ اخیر منجر به پیشرفت‌های چشمگیری در زمینهٔ مطالعات ژنتیکی گیاهی شده است. یکی از مهم‌ترین این نشانگرها ریزماهواره‌ها (SSRs) هستند که به تعداد فراوان و به‌صورت تصادفی در کل ژنوم پراکنده شده و تنوع آللی بسیار بالایی دارند. قابلیت بسیار بالای ریزماهواره‌ها ازجمله توارث هم‌بارز، تکرارپذیری بالا، حساسیت کمتر به کیفیت DNA و قابلیت اتوماسیون بالا، آن‌ها را به

* نویسنده مسئول: علی قرقانی تلفن: ۰۹۱۷۱۸۵۱۸۶۰ E-mail: agharghani@shirau.ac.ir

نشانگر غالب در مطالعات ژنتیکی گیاهان مختلف تبدیل کرده است (Guilford *et al*., 1998). این نشانگرها هم در گونه‌های دوگان (Sargent *et al*., 2003, 2009; Bassil *et al*., 2006a) و هم در گونه‌های هشتگان (Ashley *et al*., 2003; lewers *et al*., 2005) توت‌فرنگی توسعه پیدا کرده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که این نشانگرها به میزان زیادی در بین گونه‌های جنس توت‌فرنگی قابل انتقال هستند (Davis *et al*., 2006). پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ توالی‌یابی ژن‌ها نیز منجر به ایجاد توالی‌های زیادی شده است که این داده‌ها امکان جست‌وجو برای ریزماهواره‌های جدید در توت‌فرنگی را با سهولت بیشتر و هزینه‌های کمتر فراهم کرده است (Bassil *et al*., 2006b; Gil-Ariz *et al*., 2006; Sargent *et al*., 2006). به‌رغم مشکلاتی که به‌دلیل ماهیت هشتگان توت‌فرنگی اهلی وجود دارد ولی گزارشاتی از بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام توت‌فرنگی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره وجود دارد (Richard *et al*., 2000; Shimomura & Hirashima, 2006; Zorrilla-Fontanesi *et al*., 2011) که در بیشتر آن‌ها از تعداد محدودی رقم یا ژنوتیپ و بیشتر به منظور تأیید کارایی نشانگرهای توسعه‌یافته، استفاده شده است. Gil-Ariza و همکاران (2009) در مطالعهٔ جامعی به‌منظور بررسی اثر به‌نژادی بر تنوع ژنتیکی توت‌فرنگی اهلی از نشانگرهای ریزماهواره بهره بردند. در این بررسی از ۹۲ رقم و ژنوتیپ توت‌فرنگی اهلی حاصل از برنامه‌های به‌نژادی در نقاط مختلف جهان و ۱۰ نشانگر ریزماهواره استفاده شد. نتایج نشان داد که الگوی روابط ارقام و ژنوتیپ‌ها متأثر از هر دو زمان معرفی رقم و همچنین اصلاح برای سازگاری با شرایط اقلیمی خاص بود و از این نظر تمامی ارقام و ژنوتیپ‌ها به سه جمعیت اصلی تفکیک شدند. نتایج همچنین نشان داد که فعالیت‌های به‌نژادی تا حدودی سبب کاهش تنوع ژنتیکی در توت‌فرنگی اهلی شده است. از این نشانگرها در تهیهٔ نقشه‌های ژنومی توت‌فرنگی نیز استفاده شده است (Lerceteau-Kohler *et al*., 2003; Sargent *et al*., 2009).

توت‌فرنگی رقم کردستان یک رقم روزکوتاه اختیاری است که به‌علت عطر و طعم خاص آن حدود ۷۵درصد سطح زیر کشت توت‌فرنگی در ایران را که عمدتاً در استان کردستان واقع شده است، به خود اختصاص داده است. این رقم حدود ۷۰ سال پیش وارد ایران شده و منشأ اصلی آن به‌طور دقیق مشخص نیست. از طرف دیگر اعتقاد عمومی بر این است که ویژگی‌های کمّی و کیفی این رقم در مناطق مختلف کشت آن در استان کردستان متغیر است که این مسئله شاید متأثر از تغییرات ژنتیکی و یا اختلاط ژنتیکی احتمالی این رقم با دیگر ارقام تجاری (زوال ژنتیکی) باشد (Karami, 2010). هدف از این مطالعه این است تا با بهره‌گیری از نشانگرهای ریزماهواره، روابط ژنتیکی رقم کردستان با ارقام دارای منشأ روسی و همچنین ارقام غربی (آمریکایی و ایتالیایی) بررسی شود تا شاید منشأ ژنتیکی و مبدأ ورود آن به کشور مشخص شود. از طرف دیگر با نمونه‌برداری وسیع رقم کردستان از مزارع مختلف استان کردستان و همچنین با قراردادن تعدادی از ارقام تجاری معروف که قدمت کشت‌وکار بیشتری در کنار رقم کردستان در استان کردستان دارند، مطالعه طوری طراحی شده است تا امکان بررسی تغییرات ژنتیکی و اختلاط ژنتیکی و فیزیکی احتمالی رقم کردستان با سایر ارقام تجاری تحت کشت در این استان نیز بررسی شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به‌منظور بررسی تغییرات و اختلاط ژنتیکی (زوال ژنتیکی) احتمالی رقم کردستان با سایر ارقام تجاری، ۲۰ مزرعه با قدمت طولانی از توت‌فرنگی رقم کردستان در شهرستان‌های مختلف استان کردستان انتخاب و از آن‌ها نشا برداشت شد و به گلخانهٔ تحقیقاتی منتقل شد تا در زمان انجام آزمایش مولکولی از آن‌ها نمونه برگ برداشت شود. علاوه بر آن ۷ رقم تجاری و دورگه از کشور روسیه و ۶ رقم تجاری عمدتاً با منشأ آمریکایی و ایتالیایی که سابقهٔ ورود آن‌ها به کشور بیشتر بود و در کردستان در کنار رقم کردستان در حال کشت هستند، انتخاب و نمونهٔ برگی این ارقام نیز از کلکسیون مرکز پژوهش‌های گریزه سنندج و همچنین کلکسیون بخش علوم باغبانی دانشگاه کردستان تهیه و به‌صورت منجمد در نیتروژن مایع به آزمایشگاه انتقال داده شد (جدول۱).

جدول۱. نام و منشأ ارقام و ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده در این پژوهش و والدین برخی از آن‌ها.

شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	والدین	منشأ
۱	کردستان	سنندج	۱۸	کردستان	-	سروآباد
۲	کردستان	سنندج	۱۹	کردستان	-	مریوان
۳	کردستان	سنندج	۲۰	کردستان	-	مریوان
۴	کردستان	سنندج	۲۱	Snejhana	188-16-25 × Holiday	روسیه
۵	کردستان	سنندج	۲۲	دورگه ۹۸	Loch Vira × Mamochka	روسیه
۶	کردستان	سنندج	۲۳	Bagema	Hybrid 56 × Loch Vira	روسیه
۷	کردستان	سنندج	۲۴	دورگه ۸۵	Loch Vira × Mamochka	روسیه
۸	کردستان	دیوان‌دره	۲۵	دورگه ۷۰۰	Raneplodnaya × Bogota	روسیه
۹	کردستان	کامیاران	۲۶	Rane Plodnaya	Seyants VIR-228813 × Persicobaya	روسیه
۱۰	کردستان	کامیاران	۲۷	Karnaval	Pamitnaya × Rane plodnaya	روسیه
۱۱	کردستان	کامیارن	۲۸	Holiday	New York 844 × Reritan	آمریکا
۱۲	کردستان	کامیاران	۲۹	Selva	(Tufts × Pajaro) × Brighton	آمریکا
۱۳	کردستان	سروآباد	۳۰	Paros	Irvine × Marmolada	ایتالیا
۱۴	کردستان	سروآباد	۳۱	Queen Elisa	Missionary × USB 35	ایتالیا
۱۵	کردستان	سروآباد	۳۲	Merak	-	آمریکا
۱۶	کردستان	سروآباد	۳۳	Camarosa	Cal 85.218-605 × Dougla	آمریکا
۱۷	کردستان	سروآباد				

استخراج DNA ژنومی و آغازگرهای استفاده‌شده

برای استخراج DNA، از کیت استخراج DNA ساخت شرکت کیاژن استفاده شد (Sargent *et al*., 2004). تعیین کمّیت و کیفیت DNA به‌دست‌آمده با استفاده از روش الکتروفوروز DNA روی ژل آگارز ۰/۸درصد و همچنین روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترفتومتر Perkin-Elmer مدل EZ- 201 انجام شد و غلظت به‌دست‌آمده به ۲۰ng/µl رقیق شد. با بررسی مطالعات پیشین تعداد ۱۵ نشانگر ریزماهواره از پژوهش Zorrilla-Fontanesi و همکاران (2011) انتخاب و آغازگرهای آن‌ها از کمپانی فرمنتاز آلمان تهیه شد. پس از بررسی‌های مقدماتی تعداد ۱۰ مورد از این نشانگرها (جدول۲)، برای انجام آزمایش استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز محصول PCR

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۲۰ng/µl، ۲ میکرولیتر از غلظت ۵ میکرومولار هر آغازگر، ۳/۵ میکرولیتر از محلول کیت PCR شرکت Vivantis (شامل ۰/۲۵ میلی‌مولار dNTPs، بافر PCR ۱۰ برابر غلظت، یک واحدTaq DNA Polymerase و ۱/۷۵ میلی‌مولار $MgCl_2$) و ۱۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه Bio Rad iCycler) Thermal Cycler) انجام شد. چرخهٔ حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و به‌مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل حرارتی که ۱۰ چرخهٔ اول سیکل حرارتی به‌صورت تاچ‌داون برنامه‌ریزی شد، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشتهٔ الگو ۱۰ درجه بالاتر از دمای اتصال بهینه در نظر گرفته شد و در هر چرخه با کاهش ۱ درجه به دمای اتصال نهایی رسید. در ۳۰ سیکل بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای آغازگر متفاوت) بود و زمان آن نیز ثابت و ۳۰ ثانیه بود، در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به‌ترتیب۳۰ ثانیه و ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد بود. همچنین زمان و دمای توسعهٔ رشته نیز به‌ترتیب ۴۵ ثانیه و۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد بود. پس از انجام PCR و به دست آوردن محصول PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (۹۵درصد فرمامید، ۰/۵درصد برموفنل آبی، ۰/۵درصد زایلن سیانول و ۱۰میلی‌مولار EDTA) مخلوط شد. مخلوط حاصل ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس بلافاصله در ظرف حاوی یخ قرار گرفت، و مقدار ۴ میکرولیتر از هر نمونه در

چاهک ژل آکریل‌آمید ۶درصد واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بارگذاری شد. ژل با شدت جریان ۹۰ وات به‌مدت ۱/۵ ساعت الکتروفوروز شد و برای آشکارسازی قطعات DNA تکثیرشده در ژل، از رنگ‌آمیزی به‌روش نیترات نقره استفاده شد (Promega, 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوی باندی آلل‌ها با برنامه Quantity V.4.01 (Bio Rad Laboratories Hercules, CA USA) بررسی و ماتریس داده‌ها به‌صورت صفر (برای نبود یک آلل) و یک (برای حضور یک آلل) تشکیل شد. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد (Jacard, 1912). به‌منظور محاسبهٔ فواصل ژنتیکی، رسم دندروگرام و تجزیه و تحلیل مختصات اصلی، از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02 استفاده شد. برای آنالیز خوشه‌ای با ترکیب ضرایب تشابه جاکارد و دایس، با روش‌های خوشه‌بندی UPGMA[1] و پیوستگی کامل، چهار دندروگرام مختلف ترسیم شد. به‌منظور انتخاب بهترین دندروگرام برای تفسیر نتایج، از ضریب کوفنتیک استفاده شد. دندروگرام ترسیم‌شده براساس ضریب تشابه جاکارد و با روش خوشه‌بندی UPGMA با توجه به ضریب کوفنتیک بالاتر انتخاب شد. مقادیر شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی، احتمال همسانی و قدرت تفکیک با استفاده از نرم‌افزار اکسل و براساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Kumar, 1999).

محتوای اطلاعات چندشکلی[2]

$$PIC = 2\sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k} P_i P_j (1 - P_i P_j) \qquad (۱)$$

که در آن P_i بیانگر فراوانی آلل iام، P_j بیانگر فراوانی آلل jام و k بیانگر تعداد آلل است.

احتمال همسانی[3]

$$PI = \sum_i P_i^4 + \sum_{i=1}^{n}\sum_{j>i}^{n} (2P_i P_j)^2 \qquad (۲)$$

که در آن P_i بیانگر فراوانی آلل iام، P_j بیانگر فراوانی آلل jام و n بیانگر تعداد آلل است.

قدرت تفکیک

$$D = 1 - PI \qquad (۳)$$

نتایج و بحث

تعیین کارایی نشانگرها

آماره‌های محاسبه‌شده برای تعیین کارایی نشانگرها (شامل تعداد آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی، احتمال همسانی و قدرت تفکیک) در جدول۲ نشان‌داده شده است.

تعداد آلل

در این پژوهش درمجموع ۵۵ آلل چندشکل، در ۱۰ جایگاه ریزماهواره مشاهده شد. تعداد آلل در هر جایگاه ۴ـ ۸ عدد و میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۵/۵ بود. جایگاه ریزماهواره ChFaM106 با ۸ آلل بیشترین تعداد آلل و جایگاه‌های ChFaM174، ChFaM151 و ChFaM044 با چهار آلل، کمترین تعداد آلل را به خود اختصاص دادند.

Zorrilla-Fontanesi و همکاران (2011)، نیز در مطالعهٔ اولیه برای معرفی این جایگاه‌های ریزماهواره از ۱۴ رقم تجاری توت‌فرنگی استفاده کردند که برای جایگاه ریزماهواره ChFaM106، ۸ آلل و همچنین برای جایگاه ریزماهواره ChFaM151 نیز چهار آلل گزارش کردند. در سایر جایگاه‌ها تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در این پژوهش کمتر یا برابر تعداد آلل‌های گزارش‌شده در مطالعهٔ مذکور است. با اینکه تعداد ژنوتیپ‌های استفاده‌شده در این پژوهش بیشتر از ژنوتیپ‌های پژوهش قبلی بوده ولی بیشتر آن‌ها همگروه بوده (گروه رقم کردستان) یا والد مشترک دارند و یا متعلق به یک منطقهٔ جغرافیایی و یا یک برنامهٔ اصلاحی هستند، بنابراین تشابه ژنتیکی آن‌ها بالاست. در گیاهان دوگان وجود یک آلل در هر جایگاه در یک ژنوتیپ به‌منزلهٔ هموزیگوسیتی و دو آلل نشان‌دهندهٔ هتروزیگوسیتی است. اما در توت‌فرنگی با توجه به هشتگان‌بودن، در هر مکان از نظر تئوری تا هشت آلل هم می‌تواند وجود داشته باشد ولی با توجه به دامنهٔ ژنتیکی باریکی که

1. Un-weighted Pair Group Arithmetic Average
2. Polymorphic Information Content (PIC)
3. Probability Identity (PI)

ارقام اهلی توت‌فرنگی دارند (Richard *et al*., 2000) امکان وجود این تعداد آلل در تمامی ارقام و ژنوتیپ‌ها بسیارکم است. بنابراین، تعداد آلل‌ها در هر مکان در هر ژنوتیپ در دامنهٔ ۱ـ ۸ می‌تواند متغیر باشد که در این پژوهش نیز از ۲ـ ۷ آلل در هر مکان دیده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). در مطالعهٔ Gil-Ariza و همکاران (2009) تعداد آلل در هر ژنوتیپ از ۱ـ ۸ و تعداد کل آلل در هر جایگاه ریزماهواره نیز بین ۵ ـ ۱۶ آلل (با میانگین ۹/۵ آلل در هر مکان) متغیر بود و به‌طورکلی، این دو شاخص در مطالعهٔ آن‌ها بالاتر از این پژوهش است. البته باید متذکر شد که هیچ‌یک از مکان‌های ریزماهواره بررسی‌شده بین دو مطالعه یکسان نیست و از طرف دیگر تعداد ژنوتیپ‌های بیشتر و انتخاب آن‌ها از سراسر دنیا می‌تواند دلیل اصلی بالاتربودن این شاخص‌ها در مطالعهٔ آن‌ها باشد. در انگورهای دارای سطح پلوئیدی بالا (Bowers *et al*., 1999) و گندم‌های تتراپلوئید (Omidbakhsh, 2003) نیز نتایج تقریباً مشابهی گزارش شده است.

جدول۲. اطلاعات مکان‌های ریزماهواره استفاده‌شده در این مطالعه و مقایسهٔ شاخص‌های مربوط به کارایی نشانگرها و مقایسهٔ نتایج با گزارش Zorrilla-Fontanesi *et al*. (2001)

		مطالعهٔ حاضر								Zorrilla-Fontanesi *et al*., 2011	
محتوای اطلاعات چندشکلی	احتمال همسانی	قدرت تفکیک	تعداد آلل	دمای اتصال(°C)	دامنهٔ آلل	تعداد آلل	دمای اتصال(°C)	دامنهٔ آلل	توالی آغازگرها	نشانگر
۰/۷۷	۰/۰۷	۰/۹۳	۵	۵۸	۱۶۰-۱۷۵	۵	۵۸	۱۶۰ - ۱۸۰	**F:** AATGGCATCAACTTCTGCAC **R:** CAGCCTGCTGCTGTAGTTCT	ChFvM028
۰/۸۱	۰/۰۵	۰/۹۵	۷	۶۱	۱۹۰ -۲۳۵	۷	۶۳	۱۹۰ - ۲۴۰	**F:** GGAACCAAACGAACACCAAC **R:** GCGGAGGAGTGAGTGAAGAC	ChFvM182
۰/۸۱	۰/۰۵	۰/۹۵	۶	۵۸	۱۲۰-۱۳۰	۶	۶۰	۹۵ -۱۳۵	**F:** CAAATCTTCAACGGTCTCTCC **R:** ACGGAGGAGGAGGAAGTCAT	ChFvM212
۰/۶۶	۰/۱۳	۰/۸۷	۴	۵۹	۲۰۸-۲۲۰	۴	۶۰	۲۰۸ -۲۲۰	**F:** ACCACCACCGTTTTCTCCTC **R:** ACCACCGACTCGTCCTTCTT	ChFaM151
۰/۸۰	۰/۰۶	۰/۹۴	۶	۶۱	۱۵۳ -۳۰۰	۱۴	۶۳	۱۵۳ -۳۰۰	**F:** CACTCAGCCAGATCCAGAGC **R:** GCGCCAAGGATGGTCTTAAT	ChFaM164
۰/۵۹	۰/۱۹	۰/۸۱	۴	۵۹	۱۵۲ -۲۰۰	۵	۶۱	۱۵۲ -۲۲۰	**F:** GAGGGAGATGGCACGGAGAT **R:** CTCCGGCATTGAAATCGAGA	ChFaM174
۰/۸۶	۰/۰۳	۰/۹۷	۸	۵۹	۱۲۵ -۱۵۸	۸	۵۹	۱۲۵ -۱۵۸	**F:** ACCAACCGAGGCGAGAGAG **R:** CGTCATCTGCACCTGCTTC	ChFaM106
۰/۸۱	۰/۰۵	۰/۹۵	۵	۵۹	۱۸۵ -۲۲۰	۵	۶۱	۱۸۵ -۲۳۰	**F:** GTTAGGGAGTCCGGGAATGA **R:** TTCCAATCCCATCTGACGAC	ChFaM126
۰/۸۰	۰/۰۵	۰/۹۵	۶	۶۲	۱۹۰ -۲۶۰	۱۴	۶۲	۱۹۰ -۲۷۰	**F:** GTGAGAGTCAGCCCACCCTA **R:** GCGACGAGGATGAAGAAGAG	ChFaM098
۰/۷۰	۰/۱۱	۰/۸۹	۴	۵۶	۱۷۷ -۲۱۵	۵	۵۸	۱۷۷ – ۲۲۵	**F:** CGCTGAGTCGTTCTAATTTCA **R:** TTTTGTTGACGAGCGAGATG	ChFaM044

محتوای اطلاعات چندشکلی

PIC معمولاً در گونه‌های غیر اینبرد به کار می‌رود و نشان‌دهندهٔ میزان چندشکلی ایجادشده توسط یک آغازگر است، که از صفر تا یک می‌تواند متغیر باشد (Kumar, 1999). میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مشاهده‌شده در این پژوهش بین ۰/۵۹ـ ۰/۸۶ متغیر بود. جایگاه ChFaM106 که بیشترین تعداد آلل را داشت، PIC بیشتری نسبت به سایر جایگاه‌ها داشته و در مقابل جایگاه ChFaM044، که کمترین تعداد آلل در آن مشاهده شد، PIC کمتری نسبت به بقیه داشت. با توجه به جدول۲، می‌توان به این نتیجه رسید که بین میزان PIC نشانگر و تعداد آلل، رابطهٔ مستقیم وجود دارد و با افزایش تعداد آلل، PIC نیز افزایش می‌یابد. از آنجا که این سری از نشانگرهای ریزماهواره به‌تازگی معرفی شده‌اند (Zorrilla-Fontanesi *et al*., 2011)، شاید این اولین مطالعه باشد که از آن‌ها استفاده کرده است، بنابراین اطلاعات چندانی از آماره‌های محاسبه‌شده برای این نشانگرها وجود ندارد.

احتمال همسانی

استفاده از تعداد آلل‌ها به‌تنهایی به‌منزلهٔ آمارهٔ بررسی کارایی نشانگر سبب می‌شود که در ارزیابی ارزش نشانگر تخمین نادرست صورت گیرد، بنابراین معیارهایی همچون احتمال همسانی و قدرت تفکیک که براساس فراوانی آللی هستند بهتر می‌توانند تنوع موجود بین جایگاه‌های ریزماهواره را نشان دهند (Tessier *et al*., 1999). PI احتمالی را توضیح می‌دهد که دو رقم

مستقل، توسط یک نشانگر از یکدیگر تفکیک شوند و در جایگاه‌هایی که بیشترین تعداد آلل را دارند، مقدار PI می‌تواند حتی کمتر از ۰/۰۵ باشد، یعنی به احتمال ۵درصد آلل‌های آن جایگاه بین ارقام مجزا مشترک هستند. میزان PI مشاهده‌شده در این۱۰ جایگاه، بین ۰/۱۹-۰/۰۳ متغیر بود که جایگاه ChFaM106 کمترین و جایگاه ChFaM174 بیشترین مقدار را داشتند. همان‌طور که در جدول۲ نیز مشاهده می‌شود، میزان PI با تعداد آلل و میزان PIC رابطهٔ معکوس دارد. Ramezani و همکاران (2009) نیز در پژوهشی با هدف تعیین تنوع ژنتیکی برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های انگور ایرانی، آمریکایی و روسی بیان کردند که بین PI با تعداد آلل و میزان PIC رابطهٔ عکس وجود دارد.

قدرت تفکیک

قدرت تفکیک بیانگر احتمال شناسایی ارقام توسط یک نشانگر است. میزان قدرت تفکیک محاسبه‌شده در این ۱۰ جایگاه، بین ۰/۸۱ـ ۰/۹۷ متغیر بود. با توجه به جدول۲ مشاهده می‌شود که میزان قدرت تفکیک با تعداد آلل و میزان PIC رابطهٔ مستقیم دارد. Najafi (2000) در مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های انگور غرب و شمال غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، بین قدرت تفکیک و احتمال همسانی با محتوای اطلاعات چندشکلی و تعداد آلل روابط مشابهی با این پژوهش گزارش کرده است.

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای

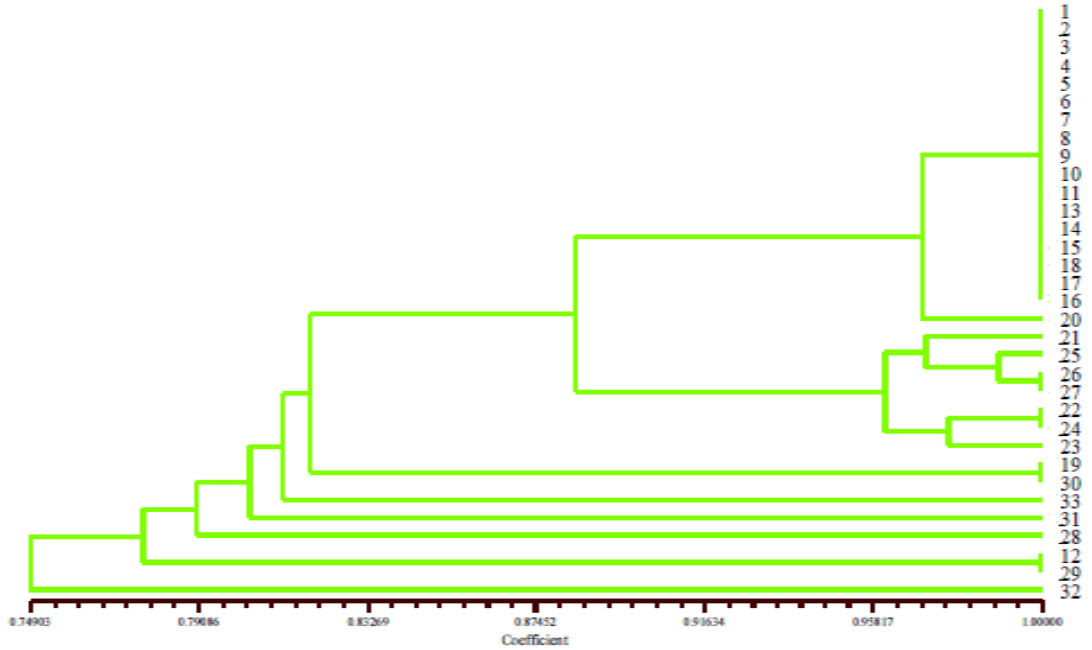
ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده در فاصلهٔ ژنتیکی ۱۰درصد (ضریب تشابه ۰/۹) به ۸ گروه به شرح زیر تقسیم شدند (شکل۱).

گروه اول: بزرگ‌ترین گروه حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای است، شامل نمونه‌های جمع‌آوری‌شده توت‌فرنگی رقم کردستان از مزارع مختلف شهرستان‌های سنندج، مریوان، کامیاران سروآباد و دیواندره است. در این گروه تمامی نمونه‌های رقم کردستان (به‌استثنای نمونهٔ شمارهٔ ۲۰)، تشابه ژنتیکی بالایی دارند (جدول۱).

از نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات ژنتیکی در رقم کردستان بسیار اندک است و هیچ‌گونه اختلاط ژنتیکی بین این رقم با ارقام دیگر نیز صورت نگرفته است و نمونه‌های برداشت‌شده از تمامی مزارع را می‌توان یک همگروه فرض کرد. با توجه به سیستم تکثیر تجاری این گیاه از طریق رویشی و با استفاده از روندک، این نتایج دور از انتظار نیست و تفاوت ناچیز نمونهٔ شمارهٔ ۲۰ (تنها در یک جایگاه ریزماهواره) شاید بر اثر پدیده جهش باشد. براساس نتایج این پژوهش تفاوت‌های مشاهده‌شده در عملکرد، اندازه و عطر و طعم میوه در رقم کردستان در مناطق مختلف استان کردستان، ژنتیکی نیست و بایستی در ارتباط با عوامل محیطی منطقه ازجمله شرایط آب و هوایی، وضعیت توپوگرافی، روش‌های مدیریت مزرعه و بیماری‌های گیاهی به‌ویژه تجمع ویروس‌ها باشد (Richard *et al*., 2000; Karami, 2010). از اهداف دیگر این مطالعه بررسی اختلاط فیزیکی احتمالی بین ارقام تجاری واردشده به منطقه با رقم کردستان بود که تشابه کامل نمونه شمارهٔ ۱۲ رقم کردستان با «Selva» و نمونهٔ شمارهٔ ۱۹ رقم کردستان با «Paros» در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (شکل۱)، نشان‌دهندهٔ اختلاط فیزیکی رقم کردستان با سایر ارقام تجاری تحت کشت در مزارع است. این اختلاط فیزیکی می‌تواند در مرحلهٔ تهیهٔ نشا و یا بازکشت یک رقم در زمینی که قبلاً رقم دیگری در آن کشت شده و بقایای روندک‌های آن خوب تمیز نشده باشد، انجام شده باشد (Karami, 2010).

گروه دوم: شامل بیشتر ارقام و دورگه‌های روسی هستند که با تشابه ژنتیکی بسیاربالا با همدیگر در یک گروه قرار گرفته‌اند. ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در این گروه خود به دو گروه کوچک‌تر تقسیم شده است که روند موجود در این تقسیمات با شجرهٔ آن‌ها مطابقت کامل دارد، به‌گونه‌ای که کمترین اختلاف ژنتیکی در دو نمونهٔ ۲۲ (دورگه ۹۸) با ۲۴ (دورگه ۸۵) که در هر دو والد مشترک هستند و همچنین دو نمونهٔ ۲۶ (Rane Plodnaya) با ۲۷ (Karnaval) مشاهده شد که اولی یکی از والدین دومی است (جدول۱). اما بیشترین اختلاف ژنتیکی در گروه روسی بین نمونهٔ ۲۱ (Snejhana) با نمونهٔ ۲۳ (Bagema) دیده شد. «Snejhana» یک رقم روسی است که از تلاقی یک دورگه روسی و رقم آمریکایی «Holiday» به دست آمده است (Qurecky, 1972). ولی براساس نتایج به‌دست‌آمده

این رقم با ارقام و دورگه‌های روسی نزدیکی ژنتیکی بیشتری دارد. نتایج این پژوهش در راستای نتایج Miroslaw و همکاران (2002) است که با بهره‌گیری از نشانگر AFLP به‌منظور شناسایی ارقام و لاین‌های پیشرفتهٔ توت‌فرنگی، تشابه ژنتیکی بالایی را بین همگروه‌ها و دورگه‌های توت‌فرنگی که والد مشترک دارند، گزارش کرده‌اند.



شکل ۱. دندروگرام تجزیهٔ خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه دایس. اعداد دندروگرام معرف نمونه‌های توت‌فرنگی استفاده‌شده در پژوهش براساس جدول ۱ است.

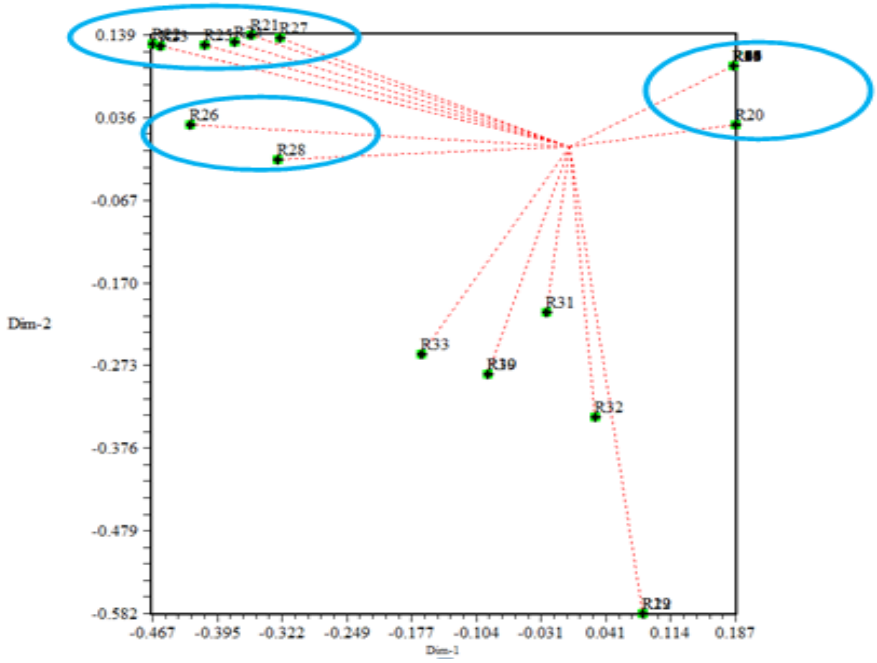
سایر گروه‌ها

سایر ارقام موجود در دندروگرام نیز هر کدام در یک گروه مستقل قرار گرفتند که «Paros» (نمونهٔ ۳۰) نسبت به سایر ارقام فاصله کمتری با گروه رقم کردستان داشت که بعد از آن به‌ترتیب ارقام «Camarosa» (نمونهٔ ۳۳)، «Queen Elisa» (نمونهٔ ۳۱)، «Holiday» (نمونهٔ ۲۸)، «Selva» (نمونهٔ ۲۹) و درنهایت «Merak» (نمونهٔ ۳۲) بیشترین فاصله را از رقم کردستان دارند. جامع‌ترین مطالعه در زمینهٔ بررسی روابط ژنتیکی ارقام توت‌فرنگی توسط Gil-Ariza و همکاران (2009) انجام شده است. در این مطالعه با وجود استفاده از ۹۲ ژنوتیپ و رقم از اقصا نقاط جهان، تنها یک رقم از روسیه وجود دارد ولی دو مورد از ارقام استفاده‌شده در پژوهش حاضر («Selva» (نمونهٔ ۲۹) و «Camarosa» (نمونهٔ ۳۳) با پژوهش Gil-Ariza و همکاران (2009) مشترک است که تشابه ژنتیکی بین این دو رقم در هر دو مطالعه تقریباً یکسان است (حدود ۷۰درصد) که می‌تواند تأییدی بر صحت نتایج پژوهش حاضر باشد. نتایج این پژوهش در راستای نتایج حاصل از مطالعه Karami (2010) با ۲۰ رقم توت‌فرنگی تجاری ازجمله رقم کردستان است که با انجام تجزیهٔ خوشه ۲۰ رقم توت‌فرنگی براساس ۲۳ صفت مورفولوژیک گیاه و میوه، نتایج تقریباً مشابهی را گزارش کرده است. در مورد تاریخچهٔ کشت‌وکار توت‌فرنگی در استان کردستان دو نظریه وجود دارد که یکی نشان‌دهندهٔ شروع کشت‌وکار توت‌فرنگی در اطراف شهر سنندج در زمان اشغال ایران توسط روس‌ها در جنگ جهانی اول (۱۳۱۳) توسط افسران روسی و با ارقامی که با خود آورده بودند است و دیگری نشان‌دهندهٔ ورود روندک‌های آن توسط شیخ عثمان نقشبندی (در سال‌های ۱۳۳۰ تا ۱۳۳۵) به قریهٔ محمودآباد واقع در شهرستان سروآباد است (Karami, 2010). نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای نشان داد، که توت‌فرنگی رقم کردستان قرابت ژنتیکی بالاتری با گروه ارقام روسی در مقایسه با ارقام غربی دارد، بنابراین، به

احتمال بسیارزیاد این رقم منشأ روسی دارد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر توت‌فرنگی رقم کردستان که امروزه در سطح وسیع در کردستان کشت می‌شود با احتمال زیاد از ارقامی است که توسط روس‌ها در جنگ جهانی اول وارد ایران (استان کردستان) شده است و اگر چنین نباشد به احتمال زیاد رقمی که توسط آقای نقشبندی در سال ۱۳۳۰ از خارج وارد ایران شده است یک رقم با منشأ روسی است.

تجزیه و تحلیل مختصات اصلی

شکل ۲ نشان‌دهندهٔ نمودار دوبعدی پراکنش ژنوتیپ‌هاست. مؤلفه‌های اول و دوم در نمودار دوبعدی درمجموع ۵۲/۲۱درصد تغییرات را توجیه می‌کنند. پراکنش افراد در نمودار مختصات اصلی، تطابق بسیار بالایی با دندروگرام تجزیهٔ خوشه‌ای دارد. مزیت اصلی تجزیه و تحلیل مختصات اصلی نسبت به تجزیه و تحلیل خوشه‌ای این است که در این روش‌ها تشخیص افراد یا جمعیت‌هایی که بین دو گروه قرار می‌گیرند ساده‌تر است (Mohammadi, 2003)، که این امر را می‌توان دربارهٔ رقم روسی و آمریکایی شمارهٔ ۳۱ و ۲۷ مشاهده کرد. در پژوهش Omidbakhsh (2003)، بر روی تنوع ژنتیکی گندم‌های دوروم ایران نیز بین نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای و نتایج تجزیه و تحلیل مختصات اصلی تطابق بالایی گزارش شده است و بیان شده که تحلیل مختصات اصلی، ارقام ایرانی و خارجی را به‌خوبی از یکدیگر تفکیک کرد.



شکل۲. نمودار تجزیه به مختصات اصلی براساس ضرایب جاکارد برای ژنوتیپ‌ها و ارقام توت‌فرنگی مطالعه‌شده (شمارهٔ ارقام و ژنوتیپ‌ها براساس جدول شمارهٔ ۱ است. گروه رقم کردستان در بالا و سمت راست شکل و گروه ارقام روسی در بالا و سمت چپ شکل قرار گرفته‌اند).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نتایج مربوط به بررسی کارایی نشانگرها نشان داد که جایگاه‌های ChFaM044، ChFaM106، ChFaM126، ChFvM182 و ChFaM098 که مقادیر PIC و قدرت تفکیک بالا دارند، نشانگرهای مناسب‌تری برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توت‌فرنگی محسوب می‌شوند. با اینکه نتایج دال بر وجود اختلاط ژنتیکی بین رقم کردستان و ارقام تجاری دیگر نیست ولی اختلاط فیزیکی مشاهده‌شده در مزارع می‌تواند مقدمه‌ای برای اختلاط ژنتیکی ارقام در آینده باشد. نتایج تجزیهٔ خوشه‌ای نشان می‌دهد، که توت‌فرنگی رقم کردستان قرابت ژنتیکی بالاتری با گروه ارقام روسی در مقایسه با ارقام غربی دارد، بنابراین به احتمال بسیارزیاد این رقم منشأ روسی دارد.

REFERENSES

1. Ashley, M.V., Wilk, J. A. m, Styan, S. M. N., Craft, K. J., Jones, K. L., Fedkheim, K. A., Lewers, K. S. & Ashman. T. L. (2003). High variability and disomic segregation of microsatellites in octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theoretical and Applied Genetic*, 107, 1201-1207.
2. Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R. & Meredith, C. P. (1999). Isolation, and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera*). *Genome*, 39, 628-633.
3. Bassil, N. V., Gunn, M., Folta, K. & Lewers, K. (2006b). Microsatellite markers for Fragaria from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes,* 6, 473–476.
4. Bassil, N. V., Njuguna, W. & Slovin, J. P. (2006a). EST-SSR markers from *Fragaria vesca* L. cv. Yellow Wonder. *Molecular Ecology Notes,* 6, 806–809.
5. Davis, T., Denoyes-Rothan B. & Lecerteau-Kohler, E. (2007). Strawberry. In: Kole, C. (Eds). Genome mapping and molecular breeding in plants: Fruits and nuts. Springer, Berlin, pp 189-206.
6. Dale, A. (1996). Key and vegetative descriptions of thirty - two common strawberry varieties grown in North America. *Advance Strawberry Research,* 15, 1–12.
7. Gil-Ariza, D., Amaya, I., Lopez-Aranda, J. M., Botella, M. A., Valpuesta, V. & Sanchez-Sevilla, J. F. (2009). Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *Journal of American Society for Horticultural Sciences,* 134, 337–347.
8. Gil-Ariza, D. J., Amaya, I., Botella, M. A., Munosoz-Blanco, J., Caballero, J. L., Lopez-Aranda, J. M., Valpuesta, V. & Sanchez-Sevilla, J. F. (2006). EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (Fragaria ·ananassa) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes,* 6, 1195–1197.
9. Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H. & Forster, R. (1997). Microsatellites in *Malus* × *domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Genetic,* 94, 249-254.
10. Hokanson, K. E., Smith, M. J., Connor, A. M., Luby, J. J. & Hancock, J. F. (2006). Relationships among subspecies of new world octoploid strawberry species, *Fragaria virginiana* and *Fragaria chiloensis*, based on simple sequence repeat marker analysis. *Canadian Journal of Botany,* 84, 1829–1841.
11. Jaccard, P. (1912). The distribution of flora in the alpine zone. *The New Phytologist,* 11, 37-50.
12. Karami, F. (2010). Investigation of morphological characteristics correlation and yield factor analysis in strawberry cultivars. Final report of research project. Kurdistan agricultural and natural resources research center press, Iran. Pp 87.(In Farsi)
13. Kumar, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances,* 17, 143-182.
14. Lerceteau-Kohler, E., Guerin, G., Laigret, F. & Denoyes-Rothan, B. (2003). Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetic,* 107, 619–628.
15. Lewers, K. S., Styan, S. M. N., Hokanson, S. C. & Bassil, N. V. (2005). Strawberry GenBank-derived and genomic simple sequence repeats (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. *American Society for Horticultural Sciences,* 130, 102–115.
16. Miroslaw, T., Dziadczk, P. & Horty Ski, A. (2002). Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. *Euphytica,* 125, 272–280.
17. Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tools and considerations. *Crop Science,* 43, 1235-1248.
18. Najafi, J. (2002). *Investigation of genetic diversity of Iran's west and northwest grapes using microsatellite markers*. MSc. Thesis. Faculty of Agriculture, University of Bualisina, Hamadan, Iran. (In Farsi)
19. Promega. (2010). Technical manual of Gene Print STR systems (Silver stain detection). http://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/geneprint%20str%20systems%20protocol.pdf?la=en.
20. Omidbakhsh, A. (2005). *Investigation of genetic diversity of durum wheat using microsatellite markers*. MSc. Thesis. Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran. (In Farsi)
21. Qurecky, D. K. (1972). Holiday strawberry. New York's *food and life science bulletin*, 24, 1-2.
22. Ramezani, A., Haddad, R. & Dorostkar, M. (2009). Genetic diversity of grapevine accessions from Iran, Russia and USA using microsatellite markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12 (2), 152-157.
23. Richard, E., Harrison, J., Glenn, J. L., Furnier, R. & Hancock, J. F. (2000). Differences in the apportionment of molecular and morphological variation in North American strawberry and the consequences for genetic resource management. *Genetic Resource and Crop Evolution,* 47, 647–657.

24. Sargent, D. J., Fernandez-Fernandez, F., Ruiz-Roja, J.J., Sutherland, B. G., Passey, A., Whitehouse, A. B. & Simpson, D.W. (2009). A genetic linkage map of cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding,* 24, 293–303.
25. Sargent, D. J., Clarke, J., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Arus, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K. M., Bassil, N. V. & Battey, N.H. (2006). An enhanced microsatellite map of diploid Fragaria. *Theoretical and Applied Genetic,* 112, 1349–1359.
26. Sargent, D. J., Hadonou, A. M. & Simpson, D.W. (2003). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. Molecular Ecology Notes, 3, 550–552.
27. Shimomura, K. & Hirashima, K. (2006). Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria · ananassa* Duch.). *Journal of Japanese Society for Horticultural Sciences,* 75, 399–402.
28. Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J. M. & Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetic,* 89, 171-177.
29. Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza, A., Torres, A. M., Botella, M. A., Valpuesta, V., Monfort, A., Sanchez-Sevilla, J. & Amaya, I. (2011). Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the *Rosoideae* subfamily. *Molecular Breeding,* 27, 137–156.