مجله علوم باغبانی ایران

دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۵۲-۴۳)

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از پایه های پاکوتاه کننده سیب با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

شهلا کیان امیری[1*] ، محمد اسماعیل حسنی[2] و ذبیح الله زمانی [3]

۳،۲،۱، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۹ – تاریخ تصویب:۹۰/۲/۲۵)

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۹ پایه اصلاح شده سیب در انگلستان و روسیه که از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده همراه با ۱۲ ژنوتیپ و پنج نمونه حاصل از کشت بافت به کمک نشانگرDNA (RAPD) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۰۰ آغازگر تصادفی در انجام واکنش PCR روی نمونه ها ارزیابی شد که ۱۰ آغازگر تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام داده و بین نمونه ها چند شکلی قابل ملاحظه ای نشان دادند. این ۱۰ آغاز گر در مجموع ۱۶۰ باند در کل نمونه ها تکثیر کردند که ۱۳۶ باند چند شکل بودند. تجزیه کلاستر نمونه ها بر اساس باندهای چند شکل با استفاده از ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA انجام گرفت. بیشترین تشابه ژنتیکی (۹۰٪) بین پایه پاکوتاه کننده B.9a وB.9b بدست آمد. در تجزیه کلاستر، نمونه ها در حد تشابه ۰/۶۰ در چهار گروه مجزا جای گرفتند. گروه‌بندی پایه های پاکوتاه کننده سیب در اغلب موارد با مناطق جمع آوری آنها مطابقت خوبی نشان داد که نشان دهنده زمینه ژنتیکی نزدیک و یا داشتن والد مشترک می باشد. ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد r=۰/۸۹ بدست آمد که برازش مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه را نشان داد. به علاوه، این آزمایش نشان داد که نشانگر RAPD برای گروه بندی نمونه های سیب پایه پاکوتاه کننده یک تکنیک موثر و مفید است.

واژهای کلیدی: سیب رقم آزایش، پایه های پاکوتاه کننده، تنوع ژنتیکی، RAPD، PCR

مقدمه

سیب از مهمترین میوه های مناطق معتدله با نام علمی *Malus domestica*، خانواده Rosaceae، زیر خانواده Pomoideae از گروه میوه های دانه دار می باشد. میوه سیب معطر و ارزش غذایی بالایی دارد و به دلیل داشتن مواد آنتی اکسیدان از رشد سلول های سرطانی جلوگیری می کند و خطر ابتلا به بیمای قلبی را کاهش می دهد (Janick & Moore, 1999). این میوه ارزش و محبوبیت خاصی در بین مردم دارد و دارای بیشترین مصرف تازه خوری در بین تمام میوه ها است و در کشورهای اروپای غربی، اروپای شرقی، آمریکا، کانادا، ژاپن، چین، استرالیا و بسیاری کشورهای دیگر کشت و

* نویسنده مسئول: شهلا کیان امیری تلفن:۰۲۶-۳۲۲۴۸۷۲۱ E-mail: kianamiry@yahoo.com

تولید می شود. طبق آمار سازمان خواربار جهانی (FAO) در سال ۲۰۰۶، سیب با تولید ۶۳۸۰۴۵۳۴ تن، جزء ۱۰ محصول مهم اقتصادی با مقام چهارم در جهان بوده و ایران با ۲۶۶۱۹۰۱ تن صادرات سیب درختی، مقام هفدهم را از نظر صادرات درسطح جهانی به خود اختصاص داده است. درکشور ما علیرغم تنوع شرایط آب و هوایی، افزایش تولید محصولات باغی از طریق توسعه سطح زیر کشت به دلیل محدود بودن منابع آب و خاک، کمبود زمین های مستعد برای احداث باغ، کشت سنتی و همچنین افزایش روز افزون جمعیت امکان پذیر نمی باشد. استفاده از درختان پاکوتاه و نیمه پا کوتاه امکان افزایش تعداد درخت در واحد سطح و در نتیجه افزایش عملکرد وتولید میوه بیشتر و با کیفیت بهتر را امکان پذیر می نماید. بنابراین یکی از راههای علمی وعملی ممکن برای افزایش تولید در واحد سطح، استفاده از پایه های پاکوتاه و نیمه پا کوتاه کننده می باشد. همچنین ارقام محلی از جمله ارقام گمی آلماسی، آزایش اصفهان و مربائی از دسته سیب‌های زینتی بوده و دارای درختان بسیار پا کوتاه می‌باشند (Ghasemi, 2001). از آنجائی که ایران نزدیک منشاء و خاستگاه سیب (ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان) قرار دارد، گمان می رود که از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای بهره مند باشد (Juniper et al., 1999). لذا جمع آوری و شناسایی دقیق ذخایر ژنتیکی و ارزیابی آنها در تحقیقات ژنتیکی و اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است. برای طبقه بندی ژنوتیپ های سیب روش های مختلفی وجود دارد. در روش های سنتی برای تشخیص این ژنوتیپ ها از خصوصیات مورفولوژیکی و کیفیت میوه ها استفاده می شد و چون محیط بر تظاهر خصوصیات ظاهری اثر می گذارد نتیجه بدست آمده چندان با ثبات نیست (Mirmohamad Meybodi, 2003) در صورتی که در دهه های اخیر استفاده از روش های تشخیص تنوع گیاهی بر اساس تکنیک های مولکولی به علت استوار بودن این روش ها بر تنوع موجود در سطح اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها درمقایسه با داده های مورفولوژیکی کاربرد وسیعتر یافته اند. نشانگرهایی که بر پایه DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات انگشت نگاری مورد استفاده قرار می‌گیرند گسترش بسیار یافته-اند که از معروف ترین آنها می‌توان به SSRs، AFLPs و RAPDs اشاره کرد (Struss, Gerlach & Stosser, 1998 ; et al., 2002 ; Wünsch & Hormaza, 2007). در بین این نشانگرها، نشانگر RAPD احتیاج به تجهیزات آزمایشگاهی سادتری دارد (Williams et al. 1990) که باعث شده همچنان یک روش مورد استقبال برای شناخت و مطالعه تنوع ژنتیکی باشد. تکنیک RAPD دارای مشکلات تکرارپذیری و حساسیت به شرایط آزمایش است که می‌توان آن را با تکرار آنالیزها حل کرد (Weeden et al., 1992). به همین جهت در سال های اخیر استفاده از روش های مولکولی برای تعیین مشخصات ژنتیکی گونه ها و ارقام سیب توجه بیشتری را جلب کرده است (Yamamoto et al. 2001 & 2002 و Wünsch & Hormanz, 2007).

نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی درختان میوه مختلف به کار گرفته شده است که از جمله می توان به زیتون (Besnard et al., 2001) ، توت فرنگی و انگور فرنگی (Korbin et al., 2004)، انار (Sarkhosh et al., 2006)، هلو (Zhongping, 2007)، انگور (This et al., 1997) و ... اشاره کرد. از نشانگر RAPD به طور وسیع برای شناسایی ارقام و تعیین تنوع ژنتیکی در سیب استفاده شده است (Gygax .Bartish &Weeden, 2000 ; et al, 2004 Modgil et al., 2005). همچنین از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی پایه های پا کوتاه کننده سیب نیز استفاده شده است (Koga-Ban et al., 2000). هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی برخی ازپایه های پا کوتاه و نیمه پاکوتاه کننده سیب بومی ایران و مقایسه آنها با پایه های خارجی که از مناطق مختلف جمع آوری شده، می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برگی ۳۶ پایه پاکوتاه کننده سیب شامل هفت نمونه از پایه های بومی ایران از مناطق مختلف جمع آوری و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۱). از

بین آنها ۱۱ نمونه از موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج در اوایل اسفند ماه ۱۳۸۵ تهیه شد و شاخه ها در گلخانه در دمای $29^{\circ}C$ قرار داده شدند و پس از ۱۰ روز که جوانه ها شروع به فعال شدن کردند برگ های جوان جدا و پس از انجماد در نیتروژن مایع در یخچال $-80^{\circ}C$ قرار داده شدند. همچنین برگ های نه نمونه از پایه ها از آستان قدس رضوی، چهار نمونه پایه از باغات تبریز، هفت نمونه ازموسسه تحقیقات کشاورزی (منطقه کبوتر آباد) اصفهان و پنج پایه آزایش اصفهان که از طریق کشت بافت بدست آمده بودند، درفروردین ماه سال ۱۳۸۶ جمع آوری شدند (جدول۱). استخراج DNA از نمونه های برگی با استفاده از روش موری و تامسپون تغییر یافته (۱۹۸۰) صورت گرفت. بررسی کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و همچنین الکتروفورز DNA در ژل آگارز با غلظت ۰/۸٪ مشخص گردید و به کمک آنها غلظت یکسان از نمونه های DNA (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد. برای انجام آزمایش RAPD تعداد ۱۰۰ آغازگر تصادفی سری MOLBIOL TIB (BA, BB, BC, BD, BE) مورد بررسی اولیه قرار گرفت که از میان آنها تعداد ۱۰ آغازگر که چند شکلی بیشتر و تکرار پذیری بالاتری داشتند انتخاب و استفاده شدند. آنزیم *Taq* DNA Polymerase و مخلوط نوکلئوتید (dNTPs) به اضافه بافرPCR (۱۰ برابر غلظت) و محلول $MgCl_2$ از شرکت سیناژن تهیه شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با حجم µl ۲۵ شامل بافر واکنش PCR به صورت 1X، mM ۱۷/۵ $MgCl_2$، ۲ mM /. dNTPs، ۴ µM /. آغازگر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ng ۱۰ از DNA الگو بود. رایط PCR با چرخه های دمایی بصورت یک چرخه ۴ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$، تعداد ۳۵ چرخه به صورت $94^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، $37^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه ترمال سایکر Bio-Rad مدل I- cycler قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR به محتویات واکنش هر لوله مقدار µl ۵ بافر بارگذاری اضافه گردید و پس از اختلاط، مخلوط حاصل در چاهک های ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TBE[1] ریخته شد. نمونه ها به مدت ۱/۵ ساعت با جریان ۸۰ ولت الکتروفورز شدند.

پس از این مرحله ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵µg/l رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو در آب مقطر توسط دستگاه ژل داک[2] قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV مشاهده و عکس برداری از ژل صورت گرفت.

به حضور یک باند چند شکل عدد یک و عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس رتبه های یک و صفر، ماتریس تشابه ژنوتیپ ها با استفاده از نرم افزار NTsys (Ver 2.02) و با استفاده از ضریب تشابه دایس[3] محاسبه گردید. در نهایت تجزیه خوشه ای بر اساس ماتریس تشابه انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA[4] بدست آمد.

نتایج و بحث

برای بررسی چند شکلی DNA بین پایه های پاکوتاه سیب، ۱۰۰ آغازگر۱۰ نوکلئوتیدی سری TIB MOLBIOL (BA, BB, BC, BD, BE) روی ۴ ژنوتیپ با خصوصیات کاملاً متفاوت (آزایش اصفهان، $M_{.9}$ ، $M_{.27}$، $MM_{.111}$) مورد آزمایش قرار گرفتند. با بررسی تعداد باند های چند شکل آغازگرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند. از ۱۰۰ آغازگر مورد استفاده تعداد ۳۲ عدد از آنها هیچ گونه باندی تولید نکرده و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرار پذیری کافی نداشتند. ۷۵ آغازگر دارای باند های چند شکل بودند که پس از درجه بندی آنها ۳۵ عدد از آنها درجه یک را به خود اختصاص دادند

1.Tris Boric Acid EDTA
2.Gel document, UVP
3.Dice
4.Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Average

که در نهایت ۱۰ آغازگر تولید باند های چند شکل واضح با تکرار پذیری بالا، در بین نمونه های پایه های پاکوتاه سیب نمودند. ۱۰ آغازگر مذکور مجموعاً ۱۶۰ قطعه تولید کردند که ۱۳۶ قطعه چند شکل بود.

جدول ۱- اسامی پایه های پا کوتاه کننده سیب مورد بررسی در این آزمایش و محل جمع آوری آنها

ردیف	نام نمونه	محل جمع آوری	مشخصه های ویژه
۱	قره یرپاق نمونه(۱)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۲	حاج نوری مربائیa نمونه(۲)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳	حاج نوری مربائیb نمونه(۳)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۴	پاجوشa آزایش اصفهان نمونه(۱۱)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۵	پا جوشc آزایش اصفهان نمونه(۱۲)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۶	پاجوشd آزایش اصفهان (نمونه اصلی کشت بافت) نمونه(۱۷)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۷	نمونه کشت بافت پا جوش اصفهان نمونه(۱۹)	آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۸	نمونه کشت بافت پا جوش اصفهان نمونه(۲۰)	آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۹	نمونه کشت بافت پا جوش اصفهان نمونه(۲۱)	ازمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۱۰	نمونه کشت بافت پا جوش اصفهان نمونه(۲۲)	آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۱۱	نمونه کشت بافت پا جوش اصفهان نمونه(۲۳)	آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۱۲	M $M_{.106}$ نمونه(۴)	آستان قدس رضوی	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۳	M $M_{.106}$ نمونه(۷)	آستان قدس رضوی	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۴	M $M_{.106}$ نمونه(۲۵)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۵	M $M_{.106}$ نمونه(۳۳)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۶	$MM_{.111}$ نمونه(۲۷)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۷	$MM_{.111}$ نمونه(۵)	آستان قدس رضوی	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۸	$MM_{.111}$ نمونه(۱۶)	آستان قدس رضوی	پایه نیمه پاکوتاه کننده
۱۹	$M_{.26}$ نمونه(۳۰)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۲۰	$M_{.26}$ نمونه(۳۱)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۲۱	$M_{.26}$ نمونه(۹)	آستان قدس رضوی	پایه پاکوتاه کننده
۲۲	$M_{.26}$ نمونه(۱۰)	آستان قدس رضوی	پایه پاکوتاه کننده
۲۳	$M_{.26}$ نمونه (۶)	آستان قدس رضوی	پایه پاکوتاه کننده
۲۴	$M_{.26}$ نمونه (۸)	آستان قدس رضوی	پایه پاکوتاه کننده
۲۵	$M_{.26}$ نمونه (۱۵)	آستان قدس رضوی	پایه پاکوتاه کننده
۲۶	$B_{.9}$ نمونه(۲۸)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
27	$B_{.9}$ نمونه(۲۹)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۲۸	شاخهa آزایش اصفهان نمونه(۱۸)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۲۹	شاخه c آزایش اصفهان نمونه(۱۳)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۰	شاخهd آزایش اصفهان نمونه(۱۴)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۱	آزایش اصفهان نمونه(۳۵)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۲	آزایش اصفهان نمونه(۳۴)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۳	گمی آلماسی نمونه(۳۶)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۴	$M_{.9}$ نمونه(۲۶)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۳۵	$M_{.9}$ نمونه(۳۲)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۳۶	$M_{.27}$نمونه(۲۴)		پایه پاکوتاه کننده

به عبارت دیگر ۸۵٪ باند ها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چند شکل در بین نمونه های مورد مطالعه است. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود، بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۲۷ عدد و مربوط به TIB BA16 و کمترین آن ۷ عدد و مربوط به آغازگر TIB BC05 بود (جدول۲). اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگر ها در محدوده ۳۵۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد. در محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیکی که نشان دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه و دندروگرام می باشد، مقدار همبستگی بالایی به دست آمد (r =۰/۸۹). نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۵۸) بین x و y است و بیشترین شباهت (۰/۹۰) بین دوپایه $B_{.9a}$و $B_{.9b}$ کرج می باشد (جدول۳). بر اساس نتایج

نشانگر RAPD و ماتریس تشابه ژنوتیپ ها و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی به صورت آنالیز خوشه ای، ۳۶ نمونه پایه پا کوتاه کننده سیب مورد بررسی در حد تشابه ۰/۶۰ به ۴ گروه تقسیم شدند(شکل۱).

در گروه یک، ۱۱ نمونه قرار گرفتند که این نمونه ها از دو منطقه مختلف اصفهان و تبریز جمع آوری شده بودند که شامل قره یرپاق نمونه (۱)، حاج نوری مربائی نمونه a (۲)، حاج نوری مربائی نمونه b (۳)، پاجوش آزایش نمونه a (۱۱)، پاجوش آزایش نمونه c (۱۲)، پاجوش آزایش (نمونه اصلی کشت بافت) نمونه d (۱۷)و

جدول ۲- نام، توالی و نتایج مربوط به آغازگرهای RAPD مورد استفاده

ردیف	آغازگر	توالی ۵ً→۳ً	تعداد کل قطعات تکثیر شده	تعدادقطعات چند شکل	درصد چند شکلی
۱	TIBMBA-13	AGG GCG AATG	۱۱	۷	۰/۶۳
۲	TIBMBA-15	GAA GAC CTGG	۲۱	۱۹	۰/۹۰
۳	TIBMBA-16	CCA CGC ATCA	۲۷	۲۵	۰/۹۲
4	TIBMBC-02	ACA GTA GCG G	۲۰	۱۸	۰/۹۰
۵	TIBMBC-04	CCA CGT GCCA	۱۴	۱۰	۰/۷۱
۶	TIBMBC-05	GAG GCG ATT G	۷	۶	۰/۸۵
۷	TIBMBE 15	TTC GGC GATG	۱۲	۱۱	۰/۹۱
۸	TIBMBE 19	AGG CCA ACAG	۲۲	۱۹	۰/۸۶
۹	TIBMBD-03	GAG CCC CGAA	۱۶	۱۳	۰/۸۱
۱۰	TIBMBD-17	GTT CGC TCCC	۹	۸	۰/۸۸
کل	-	-	۱۵۹	۱۳۶	۸/۳۷
میانگین	-	-	۱۵/۹	۱۳/۶	**۰/۸۴**

پنج نمونه کشت بافت آزایش نمونه های (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳) بودند. علیرغم اینکه این پایه ها بومی ایران هستند ولیکن در گروه های ارقام بومی و ارقام خارجی قرار نگرفتند. با توجه به دگرگشنی و خود ناسازگاری در سیب می توان بیان کرد آنها دو رگه بین ارقام بومی و ارقام خارجی هستند که یکی از دلایل مجزا بودنشان از دو گروه می باشد. لازم به ذکر است که در ابتدا اینگونه تصور می شد که نمونه های مربوط به کشت بافت از پاجوش رقم آزایش اصفهان است ولی نتایج آزمایش RAPD نشان داد که این نمونه ها پاجوش آزایش نبود و تشابه بیشتری با نمونه های دورگه داشتند که به صورت مجزا از گروه اصلی رقم آزایش قرار گرفتند. بنابراین می توان بیان کرد نمونه های مورد نظر حاصل از بذر دورگه بین رقم بومی آزایش با یک رقم خارجی می باشند.

پایه های شماره (۱) و (۲) که از شهر تبریز جمع آوری شدند، بیشترین سطح تشابه ۹۰ درصد برخوردار بودند. این دو درخت از یک باغ، که از نظر مکانی در کنار هم واقع شده بودند انتخاب شده بودند. با توجه به سطح تشابه بالای بین این دو نمونه احتمال دارد که این دو رقم از یک گیاه واحد و یا اینکه از یک والد مشترک حاصل شده باشند. همچنین نمونه های حاصل از کشت بافت که از پاجوش آزایش اصفهان (نمونه اصلی کشت بافت) یا نمونه (۱۷) مشتق شده است نیزدر این گروه قرار گرفتند. با این وجود نمونه های حاصله تفاوت هایی را با والد مادری نشان دادند و تشکیل زیرگروه هایی را

در گروه مذکور داشتند. دلیل این امر می تواند تنوع سوماتیکی حاصل از اثرات محیطی که شامل غلظت بالای هورمون بنزیل آدنین، زیاد بودن تعداد وا کشت، بالا رفتن درجه حرارت در محیط کشت، تکرار پذیری کم نشانگر RAPD و کوتاه بودن آغازگر های مورد استفاده که موجب تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی برخی از نقاط می شود، باشد.

درگروه دوم، هشت نمونه قرار گرفتند که این نمونه ها از دو منطقه مختلف شهرستان کرج و مشهد جمع آوری شده بودند که اکثرا پایه های پا بلند کننده شامل نمونه های $MM._{106}$ مشهد نمونه (۴)، $MM._{106}$ کرج نمونه (۲۵)، $MM._{106}$ کرج نمونه (۳۳)، $MM._{106}$ مشهد نمونه (۷)، $MM._{111}$ مشهد نمونه (۵)، $MM._{111}$ مشهد نمونه (۱۶)، $MM._{111}$ کرج نمونه (۲۷) و $M._{26}$ کرج نمونه (۳۰) می باشند. در این دسته بیشترین شباهت مربوط به ارقام (۵) و (۱۶) به مقدار ۸۸ درصد بود که احتمالاً دارای والد مشترک و یا هر دو از یک پایه بودند. ژنوتیپ های همنام بین دو منطقه در این گروه بندی تقریباً در کنار هم قرار گرفتند ولی برخی نیز متفاوت بودند، مثلا نمونه ۳۰ ($M._{26}$ کرج) که دلیل این امر را می توان مرتبط با خطای نامگذاری نمونه ها دانست زیرا تقسیم بندی آنها بر اساس خصوصیات ظاهری بوده است.

جدول۳- ضرایب تشابه حاصل از داده های نشانگرهای RAPD بین ۳۶ پایه پاکوتاه کننده سیب

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1	1.00																																			
2	0.90	1.00																																		
3	0.87	0.87	1.00																																	
4	0.58	0.58	0.58	1.00																																
5	0.58	0.58	0.58	0.69	1.00																															
6	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	1.00																														
7	0.58	0.58	0.58	0.76	0.69	0.59	1.00																													
8	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.80	0.59	1.00																												
9	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.65	0.59	0.65	1.00																											
10	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.65	0.59	0.65	0.85	1.00																										
11	0.68	0.68	0.68	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00																									
12	0.68	0.68	0.68	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.78	1.00																								
13	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	1.00																							
14	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.82	1.00																						
15	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.71	0.59	0.71	0.65	0.65	0.58	0.58	0.62	0.62	1.00																					
16	0.58	0.58	0.58	0.69	0.88	0.59	0.69	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	1.00																				
17	0.68	0.68	0.68	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.73	0.73	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00																			
18	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.77	0.77	0.62	0.59	0.58	1.00																		
19	0.68	0.68	0.68	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.73	0.73	0.58	0.58	0.58	0.58	0.78	0.58	1.00																	
20	0.68	0.68	0.68	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.73	0.73	0.58	0.58	0.58	0.58	0.75	0.58	0.75	1.00																
21	0.60	0.60	0.60	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.60	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.58	0.60	0.60	1.00															
22	0.63	0.63	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.63	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.63	0.58	0.63	0.63	0.60	1.00														
23	0.63	0.63	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.63	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.63	0.58	0.63	0.63	0.60	0.83	1.00													
24	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.60	0.59	0.60	0.60	0.60	0.58	0.58	0.60	0.60	0.60	0.59	0.58	0.60	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00												
25	0.58	0.58	0.58	0.76	0.69	0.59	0.76	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.69	0.58	0.59	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	1.00											
26	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.60	0.59	0.60	0.60	0.60	0.58	0.58	0.60	0.60	0.60	0.59	0.58	0.60	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	1.00										
27	0.58	0.58	0.58	0.69	0.71	0.59	0.69	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.71	0.58	0.59	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.59	0.69	0.59	1.00									
28	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.63	0.63	0.62	0.59	0.58	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	1.00								
29	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.63	0.63	0.62	0.59	0.58	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	0.90	1.00							
30	0.58	0.58	0.58	0.69	0.71	0.59	0.69	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.71	0.58	0.59	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.59	0.69	0.59	0.78	0.59	0.59	1.00						
31	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.65	0.59	0.65	0.74	0.74	0.58	0.58	0.62	0.62	0.65	0.59	0.58	0.62	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	0.62	0.62	0.59	1.00					
32	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.60	0.59	0.60	0.60	0.60	0.58	0.58	0.60	0.60	0.60	0.59	0.58	0.60	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.75	0.59	0.60	0.60	0.59	0.60	1.00				
33	0.58	0.58	0.58	0.76	0.69	0.59	0.76	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.69	0.58	0.59	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.59	0.81	0.59	0.69	0.59	0.59	0.69	0.59	0.59	1.00			
34	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.63	0.63	0.62	0.59	0.58	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	0.67	0.67	0.59	0.62	0.60	0.59	1.00		
35	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.63	0.63	0.62	0.59	0.58	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	0.70	0.70	0.59	0.62	0.60	0.59	0.67	1.00	
36	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59	0.62	0.59	0.62	0.62	0.62	0.58	0.58	0.63	0.63	0.62	0.59	0.58	0.63	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.59	0.60	0.59	0.70	0.70	0.59	0.62	0.60	0.59	0.67	0.84	1.00

درگروه سوم، که بیشترین تعداد ارقام بومی و خارجی را در خود جای داده است، ۱۴ نمونه قرار دارند که این نمونه ها از چهار منطقه مختلف شهرستان کرج، اصفهان، تبریز و مشهد جمع آوری شده بودند. این پایه ها دارای خاصیت پاکوتاه کنندگی و القاء زودباردهی در درختان پیوندی می باشند که شامل نمونه های M.26 مشهد نمونه (۶)، M.26 مشهد نمونه (8)، M.26 مشهد نمونه (۱۵)، M.26 مشهد نمونه (۹)، M.26 مشهد نمونه (۱۰)، M.26 کرج نمونه (۳۱) آزایش نمونهc (۱۳)، آزایش نمونهd (۱۴)، آزایش نمونهa (۱۸)، B.9 کرج نمونه (۲۸)، B.9 کرج نمونه (۲۹)، آزایش اصفهان نمونه (۳۵)، گمی آلماسی تبریز نمونه (۳۶) و آزایش کرج نمونه (۳۴) می باشند. در این گروه، همانطور که در دندروگرام نیز مشخص است B.9 کرج نمونه های(۲۹ و۲۸) به مقدار ۹۰ درصد به هم شباهت نشان دادند که احتمالاً دارای والد مشترک می باشند. همچنین با نمونه های آزایش اصفهان نمونه (۳۵) و گمی آلماسی تبریز نمونه (۳۶) در حدود ۷۰ درصد به هم شباهت دارند که نشان دهنده نزدیکی و قرابت ژنتیکی پایه B.9 با پایه های بومی ایران است. با توجه به اینکه پایه های M.9 و M.26 از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی شبیه به هم هستند اینگونه استنباط می شود که احتمالا اشتباه در نامگذاری M.9 با M.26 در حین انتقال از یک منطقه به منطقه دیگر صورت گرفته است.

درگروه چهارم، سه نمونه قرار گرفتند که از شهرستان کرج جمع آوری شده بودند که پایه های پا کوتاه کننده بودند. این پایه ها شامل نمونه های M.27 کرج نمونه (۲۴)، M.9 کرج نمونه (۲۶) و M.9 کرج نمونه (۳۲) بودند.

طی تحقیقات انجام شده بسیاری از محققین داخل و خارج از کشور از جمله Butenok (1975)؛ Lockard & Schneider (1981)؛ (1985) Sadeghi؛ Webster & Jones(1991)؛ (1979) Preston؛ Mostafavi et al. (1996) و (2001 Ghasemi) نشان دادند که پایه های M.9 و B.9 دارای خاصیت پاکوتاه کنندگی و زود باردهی درختان پیوند شده روی آنها می باشند (Ghasemi, 2001). B.9 از لحاظ ظاهری و عادت باردهی شبیه پایه های بومی آزایش اصفهان و گمی آلماسی است. در این تحقیق B.9، در گروه چهار در بین پایه های بومی ایران قرار گرفت که نشان دهنده قرابت ژنتیکی با پایه های بومی ایران می باشد.

قرار گرفتن ارقام بومی با ارقام خارجی در یک گروه دلیلی بر شباهت ژنتیکی این ارقام با ارقام بومی ایرانی می باشد. ارقام جمع آوری شده از یک منطقه از نظر تشابه به هم نزدیکتر بودند که این نشاندهنده قرابت ژنتیکی گیاهان یک منطقه بود و همچنین بیانگر این مطلب است که این ارقام می توانند دارای والدین مشترک باشند.

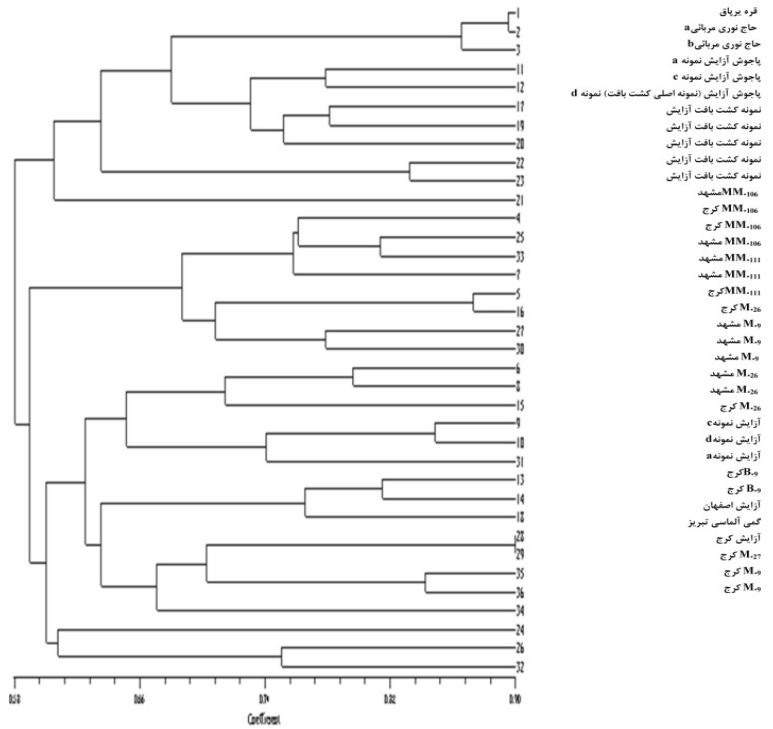
توانایی نشانگر RAPD در تفکیک گونه‌ها و ارقام و بررسی تنوع ژنتیکی روی بسیاری گیاهان، از جمله درختان میوه اثبات گردیده است. به عنوان مثال Modgil et al. (2005) توانستند تعداد ۱۰ گیاه ریز ازدیادی شده از جوانه محوری کلون سیب (*Malus pumila* Mill.) پایه MM.106 را با کاربرد ۱۱ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی به خوبی از یکدیگر تفکیک نمایند و همچنین Koga-Ban et al. (2000) به منظور شناسایی دانهال های آپومیکسی و شکل های هیبرید توانستند از ۳۲۹ دانهال حاصل از تلاقی *M. transitoria* و M.27، توسط صفات مورفولوژیکی قابل مشاهده، تعداد ۴۰ RAPD دانهال هیبریدی، با نشانگر ۵۸ دانهال هیبرید و با آنالیز صفات مورفولوژیکی و RAPD، ۳۸ دانهال را شناسایی نمودند.

در این پژوهش نتایج حاصل از گروه بندی ارقام سیب توسط نشانگر RAPD با نتایج به دست آمده در گروه بندی ارقام سیب توسط Timmerman & Weeden (1992)، Gygax et al. (2004)، et al. و Modgil et al. (2005) مطابقت داشت که همگی نشانگر RAPD را نشانگری کارا در شناسایی و گروه‌بندی ارقام سیب معرفی کردند.

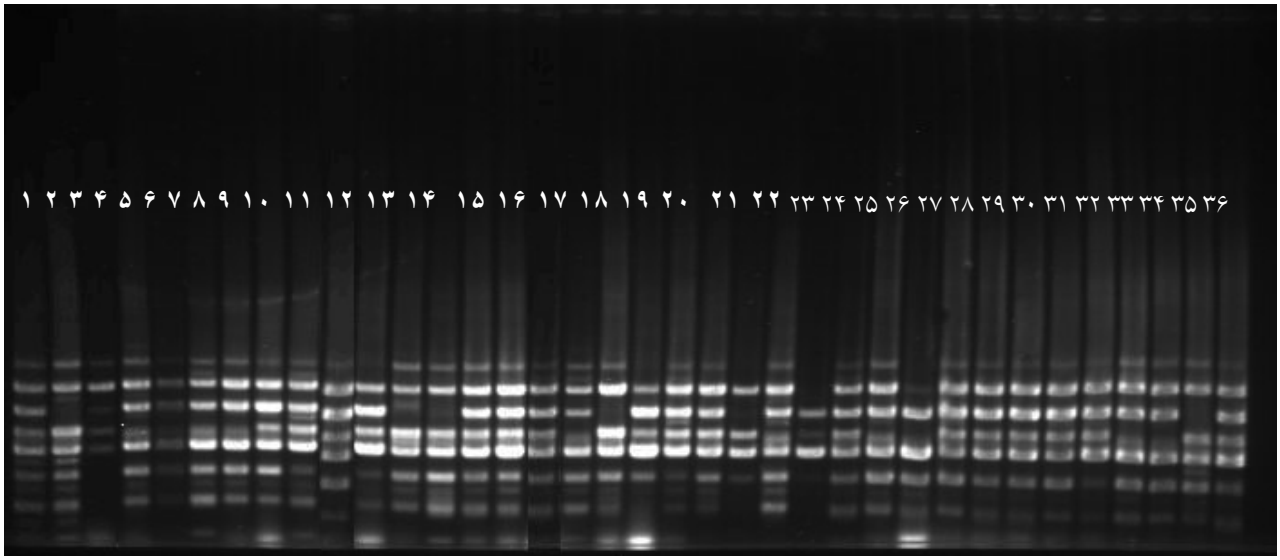
نشانگرRAPD یک تکنیک موثر و مفید است که توانست پایه های پا کوتاه را از پایه های پا بلند متمایز کند که با نتایج Rusholme et al. (2000) مطابقت داشت. همچنین تنوع سوماتیکی حاصل از اثرات محیطی در کشت بافت و تنوع ژنتیکی پایه های حاصل از بذر را نشان داد که با نتایج سایر محققین (Rani et al., 1995 و Modgil (et al., 2005 مطابقت داشت.

تحقیق حاضر تفاوت ژنتیکی در بین پایه های بومی پاکوتاه کننده سیب توسط نشانگر RAPD مشخص نمود. پایه هایی بومی که از یک منطقه جمع آوری شدند از نظر تشابه به هم نزدیکتر بودند که این نشان دهنده قرابت ژنتیکی بیشتر گیاهان یک منطقه می باشد و با توجه به دندروگرام حاصل از داده های نشانگرRAPD پایه های پاکوتاه کننده بومی ایران متعلق به قسمت های مختلف مناطق جغرافیایی بودند، مثلاً آزایش اصفهان نمونه d (۱۴) و گمی آلماسی نمونه(۳۶) که متعلق به تبریز هستند تقریباً در کنار هم قرار گرفتند. پایه های بومی ایران در چند گروه مجزا قرار گرفتند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای گیاه سیب در ایران است.

این موضوع می تواند تائید کننده نظر اکثر دانشمندان باشد که ایران را یکی از مناطق مرکز تنوع سیب می دانند و در مجموع تکنیکRAPD با دارا بودن محاسن سادگی، ارزانی و سرعت عمل برای شناسایی و تفکیک پایه های پاکوتاه کننده سیب کارایی مطلوب و مناسب را دارد و نتایج حاصل از آن می‌تواند برای انتخاب ارقام، به منظور برنامه اصلاحی به کار برده شود.



شکل ۱- دندروگرام مربوط به داده های حاصل از نشانگر های RAPD مربوط به ۳۶ پایه پاکوتاه کننده سیب که بر اساس ضریب تشابه دایس و گروه‌بندی UPGMA حاصل شده است.



شکل۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA پایه های پاکوتاه کننده سیب با استفاده از آغازگر TIBMBD-17.

REFERENCES

1. Bartish, L. V. & Weeden, N. F. (2000). The use of interspecific crosses in *Malus* to MAP the genes of characters important for apple rootstock breeding. *Acta Horticulturae*, 484, 53-56.
2. Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B. & Berville, A. (2001). Cultivars identification in olive based on RAPD markers. *Journal of American Society for Horticulture Science*, 126, 668-675.
3. Butenok, L. N. (1975). The effect of clonal rootstocks on apple tree growth. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 45, 75-86.
4. Ghasemi, A. A. (2001). Study of physiological characteristics and dwarfing effect of two Iranian apple genotype 'Azayesh and Gami almasi' on commercial apple cultivars. Annual project report. (In Farsi)
5. Gerlach, K. H. & Stoؤsser, R. (1998). Sweet cherry cultivar identification using RAPD-derived DNA fingerprints. *Acta Horticulturae*, 468, 63-69.
6. Gygax, M., Gianfranceschi, L., Liebhard, R., Kellerhals, M., Gessler, C. & Patocchi, A. (2004). Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from Malus baccata jackii. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1702-1709.
7. Janick, J. & Moore, J. N. (1999). *Fruit Breeding* (vol. I). Tree and tropical fruit. John Wiley & Sons publishing. New York.
8. Juniper, B. E., Watkins, R. & Harris, S. A. (1999). the origin of apple. *Acta Horticulturae*, 484, 27-33.
9. Koga-Ban, Y., Kudo, T., Lshigama, M., Suzuki, M. & Kon, T. (2000). RAPD analysis of hybrid seedlings from a wild apomictic apple parental line. *Acta Horticulturae*, 484, 263-269.
10. Korbin, M., Anita, K. & dward, Z. E. (2004). Fruit plant germplasm characteristion using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cellular and molecular biology*, 785 – 794.
11. Lockard, R.G. & Schneider, G.W. (1981). Stock and scion growth relationships and the dwarfing mechanism in apple. *Horticultural Reviews*, 3, 315-375.
12. Mirmohamad Meybodi, A. M. (2003). *Plant breeding in horticulture*. Publication of Isfahan University of Technology. (In Farsi)
13. Modgil, M., Mahaja, K., Chakrabarti, S. K., Sharma, D. R. & Sobti, R. C. (2005). Molecular analysis of genetic stability in micropagated apple rootstock MM.$_{106}$. *Scientia Horticulturae*, 104, 151-160.
14. Mostafavi, M. (1996). *Investigation of suitable planting density of Golden Smoothi grafted on M9 rootstock*. First Irananian horticulture congress. (In Farsi)
15. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8, 4321- 4325.
16. Preston, A. P. (1995). Apple rootstock studies: some rootstock and interstock comparisons. *Horticulture* Research, 14, 47-53.

17. Rani. V., Parida, A. & Raina, S. N. (1995) .Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Report*, 14, 459–462.
18. Rusholme, R. L., Gardiner, S. E., Bassett, C. M., Tustin, D. S., Ward, S. M. & Dildier, A. (2000). Identifying genetic markers for an apple rootstock dwarfing gene. *Acta Horticulturae*, 133,100-106.
19. Sadeghi, B. (1985). *Investigation of Malling rootstock success in Iran*. Seed and plant improvement institute. (In Farsi)
20. Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. & Ebadi, A. (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111, 24–29.
21. Struss, D., Boritzki, M., Karle, R. & Iezzoni, A. F. (2002). Microsatellite markers differentiate eight Giessen cherry rootstocks. *HortScience*, 37, 191-193.
22. Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M. & Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP. *Journal of American Society for Horticulture Science*, 128, 904-909.
23. Tavaud, M., Zanetto, A., Santi, F. & Dirlewanger, E. (2001). Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry varieties using molecular markers. *Acta Horticulturae*, 546, 263-269.
24. This. P., Cuisset, C. & Boursiquot, J. M. (1997). Development of Stable RAPD Markers for the Identification of Grapevine Rootstocks and the Analysis of Genetic Relationships. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 492-501.
25. Webster, A. D. & Loonyey, N. E. (1996). *Cherries, crop physiology and uses*. CAB International University Press, Cambridge.
26. Weeden, N. F., Timmerman, G. M., Hemmat, M., Kneen, B. E. & Lodhi, B. A. (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers. Application of RAPD technology to plant breeding. *American Crop Science*, 87, 12-17.
27. Williams, J. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18, 7213-7218.
28. Wünsch, A. & Hormaza, J. I. (2007). Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89, 59-63.
29. Yamamoto, T., Kimuru, T., Sawamuru,Y., Manabe, T., Kotobuki, K., Hayashi, T., Ban, Y. & mustuta, N. (2001). Simple sequence repeats for genetic analysis in apple Euphytica, 124, 129-137.
30. Yamamoto, T., Kimuru, T., Sawamuru, Y., Manabe, T., Kotobuki, K., Bun, Y. & Hayashi, T. (2002). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic. Euphytica, 124, 129-137.
31. Zhongping, C. (2007). Genetic characterization of different demes in *Prunus ersica* revealed by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 242-247.