

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

شهلا کیان امیری^{۱*}، محمد اسماعیل حسنی^۲ و ذبیح الله زمانی^۳
^۱، 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 نشانگر DNA (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 آغازگر 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 (۰/۹۰) بین پایه پاکوتاه کننده B.9b و B.9a بدست آمد. در تجزیه کلاستر، نمونه ها در حد تشابه ۰/۶۰ در چهار گروه مجزا جای گرفتند. گروه بندی 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 کوفتیکسی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد $I=0/89$ بدست آمد که برآزش مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه را نشان داد. به علاوه، این آزمایش نشان داد که نشانگر RAPD برای گروه بندی نمونه های سیب پاکوتاه کننده یک تکنیک موثر و مفید است.

واژه های کلیدی: سیب رقم آرایش، پایه های پاکوتاه کننده، تنوع ژنتیکی، PCR، RAPD

مقدمه

سرطانی جلوگیری می کند و خطر ابتلا به بیماری 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

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

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 AFLPs, SSRs و RAPDs اشاره کرد (Struss, Gerlach & Stosser, 1998). در (Wünsch & Hormaza, 2007; et al., 2002). 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 سال‌های اخیر استفاده از روش‌های مولکولی برای تعیین مشخصات ژنتیکی گونه‌ها 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 می‌توان 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 پایه‌های پاکوتاه کننده سیب نیز استفاده شده است (Koga-Ban et al., 2000). هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی برخی از پایه‌های پاکوتاه و نیمه پاکوتاه کننده سیب بومی ایران و مقایسه آنها با پایه‌های خارجی که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برگی ۳۶ پایه پاکوتاه کننده سیب شامل هفت نمونه از پایه‌های بومی ایران از مناطق مختلف جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). از

تولید می‌شود. 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 در سطح جهانی به خود اختصاص داده است. در کشور 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 زمین‌های مستعد برای احداث باغ، کشت سنتی و همچنین افزایش روز افزون جمعیت امکان‌پذیر نمی‌باشد. استفاده از درختان پاکوتاه و نیمه پاکوتاه امکان افزایش تعداد درخت در واحد سطح و در نتیجه افزایش عملکرد و تولید میوه بیشتر و با کیفیت بهتر را امکان‌پذیر می‌نماید. بنابراین یکی از راه‌های علمی و عملی ممکن برای افزایش تولید در واحد سطح، استفاده از پایه‌های پاکوتاه و نیمه پاکوتاه کننده می‌باشد. همچنین ارقام محلی از جمله ارقام گمی آلماسی، آرایش اصفهان و مربائی از دسته سیب‌های زینتی بوده و دارای درختان بسیار پاکوتاه می‌باشند (Ghasemi, 2001). از آنجائی که ایران نزدیک منشاء و خاستگاه سیب (ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان) قرار دارد، گمان می‌رود که از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بهره‌مند باشد (Juniper et al., 1999). لذا جمع‌آوری و شناسایی دقیق ذخایر ژنتیکی و ارزیابی آنها در تحقیقات ژنتیکی و اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است. برای طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های سیب‌های مختلف وجود دارد. در روش‌های سنتی برای تشخیص این ژنوتیپ‌ها از خصوصیات مورفولوژیکی و کیفیت میوه‌ها استفاده می‌شد و چون محیط بر تظاهر خصوصیات ظاهری اثر می‌گذارد نتیجه بدست آمده چندان با ثبات نیست (Mirmohamad Meybodi, 2003) در صورتی که در دهه‌های اخیر استفاده از روش‌های تشخیص تنوع گیاهی بر اساس تکنیک‌های مولکولی به علت استوار بودن این روش‌ها بر تنوع موجود در سطح اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها در مقایسه با داده‌های مورفولوژیکی کاربرد وسیع‌تر یافته‌اند. نشانگرهایی که بر

بارگذاری اضافه گردید و پس از اختلاط، مخلوط حاصل در چاهک های ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TBE^۱ 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 ۰/۵ μg/l رنگ آمیزی شد و پس از شستشو در آب مقطر توسط دستگاه ژل داک^۲ 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^۳ محاسبه گردید. در نهایت تجزیه خوشه ای بر اساس ماتریس تشابه انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA^۴ بدست آمد.

نتایج و بحث

برای بررسی چند شکلی DNA بین پایه های پاکوتاه سیب، ۱۰۰ آغازگر ۱۰ 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

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 ۲۹°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 ۸۰°C- قرار داده شدند. همچنین برگ های نه نمونه از پایه ها از آستان قدس رضوی، چهار نمونه پایه از باغات تبریز، هفت نمونه از موسسه تحقیقات کشاورزی (منطقه کبوتر آباد) اصفهان و پنج پایه آرایش اصفهان که از طریق کشت بافت بدست آمده بودند، در فروردین ماه سال ۱۳۸۶ جمع آوری شدند (جدول ۱). استخراج DNA از نمونه های برگ با استفاده از روش موری و تامسپون تغییر یافته (۱۹۸۰) صورت گرفت. بررسی کمی 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 بافر PCR (۱۰ برابر غلظت) و محلول MgCl₂ از شرکت سیناژن تهیه شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز با حجم ۲۵ μl شامل بافر واکنش PCR به صورت 1X، mM، ۱/۵ MgCl₂، ۲ mM، dNTPs، ۴ μM / آغازگر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز و ۱۰ ng از DNA الگو بود. رایت PCR با چرخه های دمایی بصورت یک چرخه ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C، تعداد ۳۵ چرخه به صورت ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۷°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲°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 ۵ μl بافر

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

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

ردیف	نام نمونه	محل جمع آوری	مشخصه های ویژه
۱	قره بریاق نمونه(۱)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۲	حاج نوری مرپائی a نمونه(۲)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳	حاج نوری مرپائی b نمونه(۳)	تبریز	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۴	پاجوش a آرایش اصفهان نمونه(۱۱)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۵	پاجوش c آرایش اصفهان نمونه(۱۲)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۶	پاجوش d آرایش 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)	آزمایشگاه 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.9b نمونه(۲۸)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۲۷	B.9b نمونه(۲۹)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده
۲۸	شاخه a آرایش اصفهان نمونه(۱۸)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۲۹	شاخه c آرایش اصفهان نمونه(۱۳)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۰	شاخه d آرایش اصفهان نمونه(۱۴)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۱	آرایش اصفهان نمونه(۳۵)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۲	آرایش اصفهان نمونه(۳۴)	موسسه تحقیقات کشاورزی-اصفهان	پایه پاکوتاه کننده بومی ایران
۳۳	گمی الیاسی 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)	موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج	پایه پاکوتاه کننده

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 ($r=0/89$). نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت ($0/58$) بین X و Y است و بیشترین شباهت ($0/90$) بین دوپایه B.9a و B.9b کرج می باشد (جدول ۳). بر اساس نتایج

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 (جدول ۲). اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگر ها در محدوده

بودند که شامل قره یریاق نمونه (۱)، حاج نوری مربائی نمونه a (۲)، حاج نوری مربائی نمونه b (۳)، پاجوش آرایش نمونه a (۱۱)، پاجوش آرایش نمونه c (۱۲)، پاجوش آرایش (نمونه اصلی کشت بافت) نمونه d (۱۷) و

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 (شکل ۱).

در گروه یک، ۱۱ نمونه قرار گرفتند که این نمونه ها از دو منطقه مختلف اصفهان و تبریز جمع آوری شده

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

درصد چند شکلی	تعداد قطعات چند شکل	تعداد کل قطعات تکثیر شده	توالی ۵'→۳'	آغازگر	ردیف
۰/۶۳	۷	۱۱	AGG GCG AATG	TIBMBA-13	۱
۰/۹۰	۱۹	۲۱	GAA GAC CTGG	TIBMBA-15	۲
۰/۹۲	۲۵	۲۷	CCA CGC ATCA	TIBMBA-16	۳
۰/۹۰	۱۸	۲۰	ACA GTA GCG G	TIBMBC-02	۴
۰/۷۱	۱۰	۱۴	CCA CGT GCCA	TIBMBC-04	۵
۰/۸۵	۶	۷	GAG GCG ATT G	TIBMBC-05	۶
۰/۹۱	۱۱	۱۲	TTC GGC GATG	TIBMBC-15	۷
۰/۸۶	۱۹	۲۲	AGG CCA ACAG	TIBMBC-19	۸
۰/۸۱	۱۳	۱۶	GAG CCC CGAA	TIBMBC-03	۹
۰/۸۸	۸	۹	GTT CGC TCCC	TIBMBC-17	۱۰
۸/۳۷	۱۳۶	۱۵۹	-	-	کل
۰/۸۴	۱۳/۶	۱۵/۹	-	-	میانگین

بنابراین می توان بیان کرد نمونه های مورد نظر حاصل از بدر دورگه بین رقم بومی آرایش 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 آرایش اصفهان (نمونه اصلی کشت بافت) یا نمونه (۱۷) مشتق شده است نیز در این گروه قرار گرفتند. با این وجود نمونه های حاصله تفاوت هایی را با والد مادری نشان دادند و تشکیل زیرگروه هایی را

پنج نمونه کشت بافت آرایش 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 دگرگشتی 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 آرایش اصفهان است ولی نتایج آزمایش RAPD نشان داد که این نمونه ها پاجوش آرایش نبود و تشابه بیشتری با نمونه های دورگه داشتند که به صورت مجزا از گروه اصلی رقم آرایش قرار گرفتند.

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 همانم بین دو منطقه در این
 گروه بندی تقریباً در کنار هم قرار گرفتند ولی برخی نیز
 متفاوت بودند، مثلاً 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.

در گروه مذکور داشتند. دلیل این امر می تواند تنوع
 سوماتیکی حاصل از اثرات محیطی که شامل غلظت
 بالای هورمون بنزین 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.

در گروه دوم، هشت نمونه قرار گرفتند که این نمونه
 ها از دو منطقه مختلف شهرستان کرج و مشهد جمع
 آوری شده بودند که اکثراً 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

جدول ۳- 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	0.63	0.60	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	0.63	0.60	0.63	0.63	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	0.59	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	0.59	0.60	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	0.59	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	0.60	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	0.59	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	0.60	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	0.60	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	0.59	0.81	0.59	0.69	0.59	0.59	0.69	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59		
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	0.60	0.59	0.60	0.59	0.67	0.67	0.59	0.62	0.60	0.59	0.60	0.59	0.67	0.67	0.67	0.67		
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	0.60	0.59	0.60	0.59	0.70	0.70	0.59	0.62	0.60	0.59	0.62	0.60	0.59	0.67	0.67	0.67		
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	0.60	0.59	0.60	0.59	0.70	0.70	0.59	0.62	0.60	0.59	0.62	0.60	0.59	0.67	0.67	0.67		

درختان پیوند شده روی آنها می باشند (Ghasemi, 2001). B.9 از لحاظ ظاهری و عادت باردهی شبیه پایه های بومی آرایش 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 گونه ها 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 از دیداری 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 Gygax et al. (1992) Weeden Timmerman et al. (2004) و Modgil et al. (2005) مطابقت داشت که همگی نشانگر RAPD را نشانگری کارا در شناسایی و گروه بندی ارقام سیب معرفی کردند.

در گروه 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 (۸)، M.26 مشهد نمونه (۱۵)، M.26 مشهد نمونه (۹)، M.26 مشهد نمونه (۱۰)، M.26 کرج نمونه (۳۱) آرایش نمونه C (۱۳)، آرایش نمونه d (۱۴)، آرایش نمونه a (۱۸)، B.9 کرج نمونه (۲۸)، B.9 کرج نمونه (۲۹)، آرایش اصفهان نمونه (۳۵)، گمی آلماسی تبریز نمونه (۳۶) و آرایش کرج نمونه (۳۴) می باشند. در این گروه، همانطور که در دندروگرام نیز مشخص است B.9 کرج نمونه های (۲۹ و ۲۸) به مقدار ۹۰ درصد به هم شباهت نشان دادند که احتمالاً دارای والد مشترک می باشند. همچنین با نمونه های آرایش 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 مورفولوژیکی شبیه به هم هستند اینگونه استنباط می شود که احتمالاً اشتباه در نامگذاری M.9 با M.26 در حین انتقال از یک منطقه به منطقه دیگر صورت گرفته است.

در گروه چهارم، سه نمونه قرار گرفتند که از شهرستان کرج جمع آوری شده بودند که پایه های پاکوتاه 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.

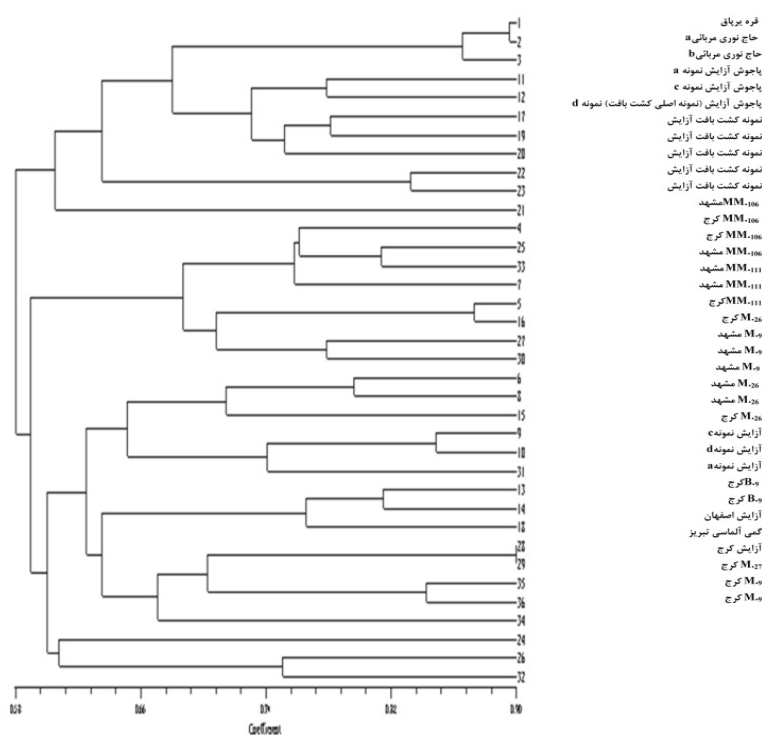
طی تحقیقات انجام شده بسیاری از محققین داخل و خارج از کشور از جمله Butenok (1975)؛ Lockard & Schneider (1981)؛ Sadeghi, Webster & Jones (1991)؛ Mostafavi et al. (1996)؛ Preston (2001)؛ Ghasemi نشان دادند که پایه های M.9 و B.9 دارای خاصیت پاکوتاه کنندگی و زود باردهی

های پاکوتاه کننده بومی ایران متعلق به قسمت های مختلف مناطق جغرافیایی بودند، مثلاً آرایش 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.

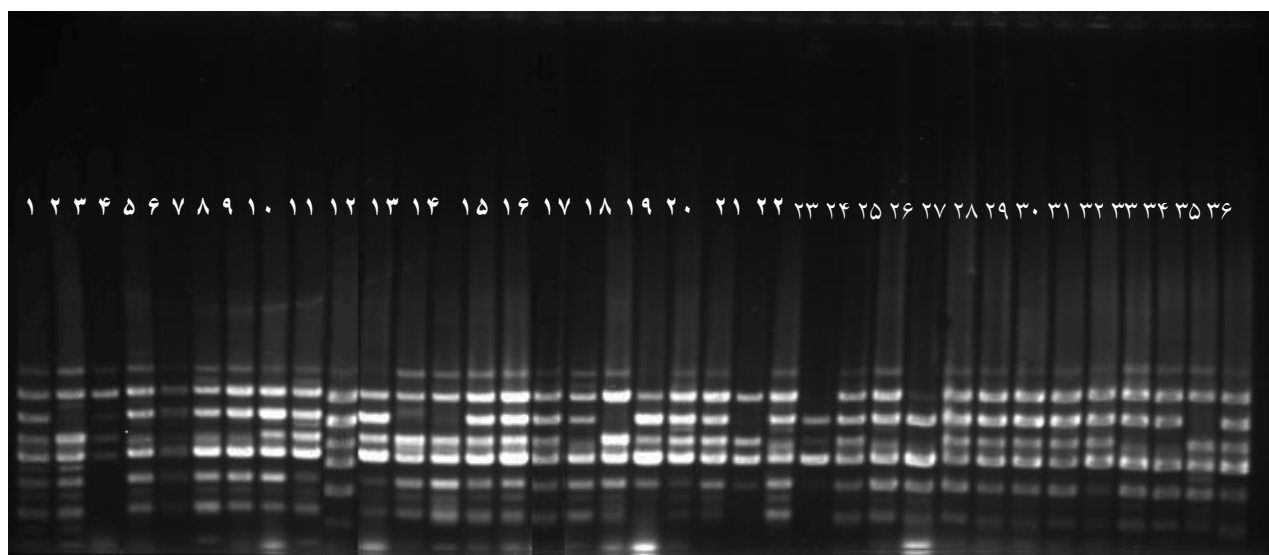
این موضوع می تواند تأیید کننده نظر اکثر دانشمندان باشد که ایران را یکی از مناطق مرکز تنوع سیب می دانند و در مجموع تکنیک RAPD با دارا بودن محاسن سادگی، ارزانی و سرعت عمل برای شناسایی و تفکیک پایه های پاکوتاه کننده سیب کارایی مطلوب و مناسب را دارد و نتایج حاصل از آن می تواند برای انتخاب ارقام، به منظور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

نشانهگر RAPD یک تکنیک موثر و مفید است که توانست پایه های پاکوتاه را از پایه های 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 (Modgil et al., و Rani et al., 1995) 2005 مطابقت داشت.

تحقیق حاضر تفاوت ژنتیکی در بین پایه های بومی پاکوتاه کننده سیب توسط نشانهگر 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 نشانهگر RAPD پایه



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



شکل ۲- الگوی بانندی 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. & Stösser, R. (1998). Sweet cherry cultivar identification using RAPD-derived DNA fingerprints. *Acta Horticulturae*, 468, 63-69.
6. Gygas, 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 MM₁₀₆. *Scientia Horticulturae*, 104, 151-160.
14. Mostafavi, M. (1996). *Investigation of suitable planting density of Golden Smoothi grafted on M9 rootstock*. First Iranian 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., Sawamura, 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., Sawamura, 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.