مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۸، شماره ۲، سال ۱۳۹۱

تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های بومی آلبالو در ایران بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی

Genetic Diversity of some Iranian Sour Cherry Genotypes Based on Morphological and Molecular Markers

آسیه همایونی[۱]، ناصر بوذری[۲] و وحید عبدوسی[۳]

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم باغبانی، تهران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۲۷

چکیده

همایونی، آ.، بوذری، ن. و عبدوسی، و. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های بومی آلبالو در ایران بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸:** ۲۵۴ - ۲۳۹.

در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی نوزده ژنوتیپ آلبالوی بومی کشور از استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان، تهران، کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان، کرمان، خراسان رضوی، البرز، فارس و رقم اردی بوترمو از مجارستان به عنوان شاهد، به کمک نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول سی و چهار صفت کیفی و یازده صفت کمی مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین ژنوتیپ ها برای اکثر صفات نشان داد. تجزیه به عامل ها، صفات را در چهار گروه عاملی جای داد که مجموعا ۷۱/۸۶ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. تجزیه کلاستر براساس داده‌های مورفولوژیکی نیز ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد. گروه اول شامل سه ژنوتیپ پاکوتاه BO AH V1524 از یاسوج، BO KA V282 از کردستان و BO GA V6442 از خراسان و گروه دوم شامل ژنوتیپ BO LA V181 از استان تهران بود که بیشترین ارتفاع درخت را داشت. در آزمایش دوم از نشانگر های مولکولی RAPD استفاده شد. سیزده آغازگر مورد استفاده ۱۴۴ باند تولید کردند که ۱۱۷ باند چند شکل بودند. محدوده تشابه ژنتیکی ژنوتیپ ها بین ۰/۳۰ تا ۰/۸۱ بود. تجزیه کلاستر، ژنوتیپ‌ها را با تشابه ژنتیکی ۰/۵۴ به شش گروه تقسیم کرد، به طوری که تقریباً اکثر ژنوتیپ‌های یک استان با هم گروه‌بندی شدند. در این گروه‌بندی نیز سه ژنوتیپ پاکوتاه BO AH V1524 از یاسوج، BO GA V6442 از خراسان و BO GH V255 از اصفهان در یک زیر گروه کنار هم جای گرفتند.

واژه‌های کلیدی: آلبالو، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، نشانگر مورفولوژیکی.

نویسنده مسئول: bouzari@spii.ir **تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱**

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آلبالو (*Prunus cerasus*) از میوه‌های تازه‌خوری مناطق معتدله است. آلبالو گیاهی خزان‌پذیر متعلق به خانواده Rosaceae است و از یک دانه گرده کاهش نیافته *Prunus avium* (۲n=۱۶) تلاقی یافته با *P. fruticosa* (۲ n =۳۲) حاصل شده است. آلبالو گونه‌ای تتراپلوئید (۲n= ۳۲) است. میوه آلبالو به رنگ قرمز روشن تا تیره، شفت و معمولاً با یک دانه همراه است. گل‌ها پنج گلبرگ و پنج کاسبرگ دارند (Webster and Looney, 1996).

میوه آلبالو به علت داشتن اثر آنتی‌اکسیدانی قوی و همچنین دارا بودن ویتامین‌های C و A بسیار مورد توجه است. کشور ایران خاستگاه بسیاری از گونه‌های گیاهی است و بیوتکنولوژی مدرن فناوری نوینی است که می‌تواند با تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان، عملکرد را افزایش دهد، می‌توان از روش‌های بیوتکنولوژی برای حفظ ذخایر ژنتیکی موجود در کشور استفاده کرد. اولین گام در حفاظت از ذخایر ژنی شناخت دقیق ارقام بومی و گونه‌های وحشی موجود است. برای رسیدن به این منظور نشانگرها از نیمه دوم قرن بیستم مورد توجه قرار گرفته‌اند. نشانگر های مورفولوژیک که حاصل جهش‌های قابل رویت در مورفولوژی هستند و از نخستین نشانگرها برای تشخیص و جداسازی به شمار می‌آیند، می‌توانند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مناسب مورد استفاده قرار گیرند (Williams *et al*., 1990).

در بین نشانگرهای مولکولی نشانگر RAPD که اساس آن تکثیر قطعات DNA توسط آغازگرهای غیراختصاصی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است، به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه ژنوم، عدم نیاز به کاوشگر و مواد پرتوزا، هزینه کم و سرعت اجرای آن از جایگاه خاصی در ارزیابی تنوع ژنتیکی برخوردار است (Staub *et al*., 1996). از معایب نشانگرهای RAPD می‌توان به عدم تکرارپذیری و غالب بودن این نشانگرها و حساسیت بالا به آلودگی اشاره کرد (Naghavi *et al*., 2005). تاکنون مطالعات زیادی جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های مختلف درختان میوه با استفاده از نشانگرهای RAPD انجام شده است. جعفری و همکاران (Jaafari *et al*., 2007) تنوع ژنتیکی برخی ارقام آلبالو و آلبالو گیلاس از مناطق همدان، کرج و هشتگرد را به وسیله نشانگر RAPD و نشانگرهای مورفولوژیکی بررسی کردند و از بین ۲۳۳ باند حاصل از آغازگرها ۲۱۴ باند چند شکل گزارش کردند. نمونه‌ها در تشابه ۸۰٪ در ۱۵ گروه جای گرفتند. قارونی و همکاران (Gharouni *et al*., 2008) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آلبالو تلخه (محلب) را با نشانگرهای مورفولوژیکی و RAPD مورد بررسی قرار دادند و تنوع ژنتیکی بالایی از محلب را در مناطق شمال و غرب ایران

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش کردند. لیسک و همکاران (Lisek *et al.*, 2006) DNA موجود در نوزده رقم گیلاس را با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار دادند. مورنو و تروجیلو (Moreno and Trujillo, 2005) به وسیله نشانگر RAPD سی و هشت رقم گیلاس را مورد بررسی قرار دادند و چند شکلی بالایی را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده کردند.

خدیوی خوب و همکاران (Khadivikhob *et al.*, 2009) سی ونه ژنوتیپ گیلاس ایرانی و خارجی و ناشناخته را با نشانگر RAPD و نشانگرهای مورفولوژیکی ارزیابی کردند و بیشترین تشابه ژنتیکی را بین ارقام شماره ۱ کرج و ۲۸ کرج گزارش کردند. کای و همکاران (Cai *et al.*, 2007) در چین تنوع ژنتیکی بین هشت گونه از گیلاس‌ها و دو نسل بین گونه‌ای را با استفاده از نشانگرهای RAPD بررسی کردند و موفق شدند ۲۳ رقم گیلاس و چهار رقم آلبالو را شناسایی کنند که نتایج با طبقه‌بندی تاکسونومیکی مطابقت داشت.

ژنوتیپ‌های آلبالو در ایستگاه تحقیقاتی مشکین‌آباد و کمال‌آباد متعلق به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال ۱۳۸۶ در قالب طرح آگمنت کاشته شده‌اند. پژوهش حاضر به عنوان یک بررسی اولیه با هدف تعیین قرابت یا عدم قرابت بین تعدادی از ژنوتیپ‌های بومی آلبالو در شرایط اقلیمی یکسان انجام شد.

مواد و روش‌ها

نوزده ژنوتیپ مورد بررسی در این پژوهش از ده استان آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان، تهران، کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان، کرمان، خراسان رضوی، البرز و فارس بودند که همه برروی پایه آلبالو تلخ (محلب) پیوند زده شده و با فواصل ۵×۴ متر کاشته شده بودند. در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک نوزده ژنوتیپ مذکور که دو سال سن داشتند و آلبالوی رقم اردی‌بوترمو (رقم مجارستانی) به عنوان شاهد انجام شد و نمونه‌های برگی تازه جهت انجام آزمایش‌های مولکولی به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

برای این منظور سی و چهار صفت کیفی و یازده صفت کمی در ژنوتیپ‌های آلبالو اندازه‌گیری و ارزیابی شدند. اندازه‌گیری‌ها براساس دستورالعمل بین‌المللی UPOV و آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در آلبالو (DUS) انجام شد (Kavand *et al.*, 2007). برای انجام اندازه‌گیری‌ها از درختان سالم و عاری از آفت و بیماری استفاده شد. اندازه‌گیری‌های مربوط به درخت و برگ در اوایل تابستان و اندازه‌گیری‌های مربوط به شاخه‌های یکساله در طول فصل خواب در اسفندماه انجام شد. از هر ژنوتیپ سه درخت مورد ارزیابی قرار گرفت و از هر درخت ۹ برگ بالغ به طور تصادفی

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب و صفات برگی در آن‌ها اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها در محاسبات به کار رفت. صفاتی نظیر طول و عرض پهنک برگ، طول دمبرگ، قطر تنه، ضخامت شاخه یکساله و طول میانگره با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. مطالعه صفات کیفی با کددهی براساس دیسکریپتور انجام شد.

شاخص‌های آماری تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها و ضرایب تغییرات برای داده‌های حاصل از صفات کمی به کمک نرم‌افزار SAS انجام شد. تجزیه به عامل و تجزیه کلاستر با نرم‌افزار SPSS نسخه 16/0 انجام شد. دندروگرام حاصل از داده‌های مورفولوژی با استفاده از روش (Average linkage between groups) ترسیم شد.

برای استخراج DNA و انجام آزمایش‌های RAPD، ابتدا نمونه‌های برگی تازه از ژنوتیپ‌های آلبالو به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. استخراج DNA ژنومیک به روش Cetyl-trimathyl ammonium bromiole (CTAB)، با روش دویل و دویل با اندکی تغییر انجام شد. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ با در نظر گرفتن قطر باند،درخشندگی باند و یک تکه بودن باند ارزیابی و با ladder 1kb مقایسه شد.

از ۶۵ آغازگر ده نوکلئوتیدی RAPD که در ابتدا مورد غربال گری قرار گرفتند، ۱۳ آغازگر تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام دادند و از آن‌ها برای انجام واکنش RAPD استفاده شد. برای تهیه مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از بافر PCR به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA Polymerase به مقدار ۰/۴ میکرولیتر، ۱/۲۵ میکرولیتر آغازگر RAPD به غلظت ۰/۲ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱۱/۳۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. حجم نهایی واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که مطابق برنامه دمایی زیر تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. یک دوره شش دقیقه‌ای در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دوره در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۳۲ درجه یک دقیقه، ۷۲ درجه دو دقیقه و سی ثانیه و ۱ دوره ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پس از آن محصول PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲٪ تهیه شده با بافر TBE1X، تزریق شدند و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. برای محاسبه اندازه قطعات حاصل، اولین چاهک از سمت چپ هر ژل به مارکر 1Kb، محصول شرکت فرمنتاز اختصاص داده شد. برای رنگ‌آمیزی، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفته

www.SID.ir

و سپس در دستگاه ژل داکت تحت نور UV باندهای تکثیر یافته DNA مشاهده و عکس‌برداری شدند.

قطعات تکثیر شده در این مطالعه در محدوده بازی ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز قرار داشتند. باندهای ایجاد شده به صورت حضور هر باند عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر امتیازدهی شدند و سپس ماتریس صفر و یک حاصل با نرم افزار NTSYS نسخه ۲/۰۰، توسط ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد. دندروگرام با روش UPGMA ترسیم شد. درصد چند شکلی و Polymorphism Information Content (PIC) هر آغازگر از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

درصد چند شکلی = تعداد باند چندشکل/کل باندها × ۱۰۰

$PIC = 1- \sum(pi/pk)^2$

P_i= آلل‌های هر باند، P_k= کل آلل‌ها

نتایج و بحث

نام و منشاء ژنوتیپ‌های آلبالو مورد ارزیابی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های آلبالو مورد مطالعه و منشاء آن‌ها

Table 1. Sour cherry genotypes used in this study and their origins

کد Code	نام Name	Origin	منشاء
180	BO LA V180	Tehran	تهران
181	BO LA V181	Tehran	تهران
186	BO LA V186	Tehran	تهران
192	BO HA V192	West Azarbaijan	آذربایجان غربی
193	BO HA V193	West Azarbaijan	آذربایجان غربی
191	BO HA V191	West Azarbaijan	آذربایجان غربی
239	BO GH V239	Isfahan	اصفهان
282	BO KA V282	Kordestan	کردستان
1231	BO DO V1231	Fars	فارس
1239	BO KA V1239	Kordestan	کردستان
1312	Erdi Botermo	Hungary	مجارستان
1314	BO ZA V1314	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
1388	BO GH V1388	Isfahan	اصفهان
1390	BO GH V1390	Isfahan	اصفهان
232	BO MO V232	Kerman	کرمان
1524	BO AH V1524	Kohgiloye va Boyerahmad	یاسوج
6442	BO GA V6442	Khorasan	خراسان
260	BO TA V260	Alborz	البرز
284	BO KA V284	Kordestan	کردستان
255	BO GH V255	Isfahan	اصفهان

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در بین ژنوتیپ‌ها از نظر کلیه صفات کمی اندازه‌گیری شده مشاهده شد. همان‌طور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود ژنوتیپ BO LA V186 از استان تهران دارای بیشترین مقادیر طول برگ، عرض برگ، طول دمبرگ، قطر تنه (بالای محل پیوند) و ارتفاع اولین شاخه بعد از محل پیوند بود. در مقابل کمترین مقدار طول برگ متعلق به دو ژنوتیپ BO GH V 255 از استان اصفهان و ژنوتیپ BO LA V180 از تهران، کمترین مقدار عرض برگ متعلق به ژنوتیپ BO ZA V1314 از استان آذربایجان شرقی، کمترین طول دمبرگ متعلق به ژنوتیپ BO KA V284 از استان کردستان و کمترین مقدار قطر تنه (بالای محل پیوند) و کمترین مقدارارتفاع اولین شاخه بعد از محل پیوند هردو متعلق به ژنوتیپ BO HA V191 از استان آذربایجان غربی بود. طول دمبرگ در ژنوتیپ BO GA V6442 از استان خراسان با ۰/۷ سانتی‌متر کمترین مقدار و ژنوتیپ BO LA V186 از استان تهران با ۴/۲ سانتی‌متر بیشترین مقدار بود. طول میانگره در شاخه یک‌ساله در دو ژنوتیپ BO KA V1239 از استان کردستان و BO ZA V1314 از استان آذربایجان شرقی با ۲/۴ سانتی‌متر بیشترین مقدار و ژنوتیپ BO DO V1231 از استان فارس با ۰/۵ سانتی‌متر کمترین مقدار بود. ژنوتیپ BO LA V181 از استان تهران با ارتفاع ۲۲۰ سانتی‌متر و ژنوتیپ BO KA V282 از استان کردستان با ارتفاع ۵۷ سانتی‌متر به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را برای ارتفاع درخت داشتند. سه ژنوتیپ BO HA V193 و BO HA V191 و BO HA V192 از آذربایجان غربی به همراه ژنوتیپ BO LA V180 از استان تهران کمترین مقدار ضخامت شاخه یکساله را داشتند در حالی که ژنوتیپ BO TA V260 از استان تهران بیشترین مقدار ضخامت شاخه یکساله را دارا بود.

به منظور تعیین فاکتورهای اصلی به منظور کاهش تعداد صفت تجزیه به عامل‌ها انجام شد. صفات موثر در چهار گروه عاملی جای گرفتند (جدول ۳). میزان واریانس نسبی هر عامل که نشان‌دهنده اهمیت آن عامل در واریانس کل صفات مورد بررسی است به صورت درصد بیان شده است. در این پژوهش صفات موثر در چهار گروه عاملی جای گرفتند که مجموعا ۷۱/۸۶٪ از واریانس کل را توجیه کردند. در عامل اول صفات طول برگ و طول دمبرگ توانستند ۲۵/۸۶٪ از واریانس کل را توجیه کنند. صفت قطر تنه و عرض برگ در عامل دوم قرار گرفتند که ۲۰/۴۰٪ از واریانس کل را توجیه کردند. عامل سوم صفت نسبت طول برگ به طول دمبرگ و عامل چهارم صفت نسبت طول برگ به عرض برگ بودند.

در تجزیه خوشه‌ای، که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در فاصله ۱۰ در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول به دو

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات کمی ژنوتیپ‌های آلبالو

Table 2. Mean comparison for morphological traits of sour cherry genotypes

ژنوتیپ Genotype	قطرتنه (زیرمحل پیوند) Trank diameter (mm)	نسبت طول برگ به طول دمبرگ Leaf length to petiol ratio	قطرتنه (بالای محل پیوند) Trunk diameter (mm)	طول دمبرگ Petiol length (mm)	ارتفاع درخت Tree height (cm)	نسبت طول برگ به عرض برگ Leaf length to width ratio	ضخامت شاخه یک ساله Shoot thickness (mm)	عرض برگ Leaf width (mm)	طول برگ Leaf length (mm)	طول میانگره Length of internode (mm)	ارتفاع اولین شاخه بعد از محل پیوند Height of first branch (cm)
BO LA V181	34.22a	3.89gf	38.65bac	3.23a	169bc	2.40ba	5.33bac	5.46a	13.00a	1.13bdc	84.67a
BO WA V193	32.56ba	4.25gf	40.70a	1.43gefd	193.3ab	1.90bc	3.66ed	3.16fe	6.00efd	1.56bac	77.00ba
BO WA V192	31.61bac	4.86egdfc	41.10a	1.30gefh	170bac	1.94bc	4.00edc	3.26fed	6.33efd	1.13bdc	59.00bdac
BO LA V180	30.97bdac	3.07g	37.54bdac	1.26gefh	148.6efdc	1.90bc	3.00e	2.76fg	5.26f	1.90a	58.00bdc
BO AL V1314	29.06ebdac	4.53egf	33.34ebdacf	1.46cefd	160.6bdc	2.56a	3.8ed	2.00g	6.50cefd	2.20a	61.67bdac
BO KO V284	27.87ebdacf	4.43egf	39.19ba	1.66cebd	131.6efd	1.75c	4.30bedc	4.33bcd	7.63cbd	1.96a	50.33fbdec
Erdi Botermo	**25.98ebdcf**	**3.51gf**	**35.91ebdac**	**2.16b**	**123.6efg**	**1.91bc**	**6.36a**	**3.86fbecd**	**7.50cbd**	**1.66ba**	**42.00fdec**
BO SH V1390	25.77ebdcf	8.03a	33.76ebdacf	0.86h	136.6efdc	2.01bac	4.36bedc	2.96feg	6.83cefd	0.93dc	52.33bdec
BO AL V6442	25.77ebdcf	7.83a	32.86ebdacf	0.90gh	93hg	1.73c	4.1edc	3.83fbecd	6.83cefd	1.13bdc	66.67bac
BO DA V1524	25.05edcf	6.53bdac	31.13ebdcf	1.16gefh	62.67h	1.80bc	3.50ed	4.00becd	7.33cbd	1.03bdc	37.17fde
BO SH V1231	24.83edcf	7.24ba	34.53ebdacf	1.00gfh	145.3efdc	1.82bc	4.66bdc	3.93becd	7.16cbd	1.06bdc	41.67fdec
BO TL V260	24.59edcf	5.40ebdfc	34.24ebdacf	1.20gefh	140.6efdc	1.89bc	5.66ba	3.36fecd	6.40cefd	0.76d	57.00bdc
BO SH V239	23.72edf	6.33ebdac	28.68edgf	1.00gfh	145efdc	2.11bac	3.73ed	3.06feg	6.33efd	1.66ba	65.00bac
BO AP V1388	23.54edf	6.66bac	29.77edgcf	1.00gfh	170.6bac	2.20bac	3.20e	3.00feg	6.66cefd	2.16a	66.00bac
BO KO V1239	23.31ef	4.03gf	29.58edgf	2.00cb	114.0fg	1.80bc	4.30bedc	4.40bc	8.03cb	1.90a	47.33fdec
BO KO V282	23.18ef	4.15gf	29.80edgcf	1.70cebd	64.67h	2.02bac	4.30bedc	3.53fbecd	7.03cebd	2.20a	47.67fdec
BO LA V181	23.13ef	4.69egdf	31.63ebdcf	1.50cefd	203.30a	1.95bc	5.33bac	3.53fbecd	6.93cebd	1.73ba	25.00f
BO SH V255	21.51egf	4.46egf	25.67gf	1.23gefh	161.6bdc	1.84bc	4.36bedc	3.00feg	5.50ef	1.50bac	5.00fdec
BO KO V232	20.53gf	6.83ba	27.45egf	1.00gfh	156.6edc	2.02bac	4.66bdc	3.50fbecd	6.83cefd	1.86a	53.33bdc
BO WA V191	15.88g	4.39egf	21.65g	1.93cbd	152.3edc	1.87bc	3.66ed	4.53ba	8.50b	2.00a	26.67fe

میانگین‌ها در هر ستون با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف معنی دار در سطح آماری ۱٪ هستند (آزمون چند دامنه دانکن).

Means with similar letters in each column are not significantly different at the 1% probability level (Duncan`s multiple reng test.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ – تجزیه به عامل‌ها، مقادیر درصد واریانس و درصد تجمعی واریانس‌ها برای چهار عامل اصلی مربوط به صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های آلبالو

Table 3. Factor analysis, variance percent and cumulative percent for four principal factors related to morphological traits in sour cherry genotypes

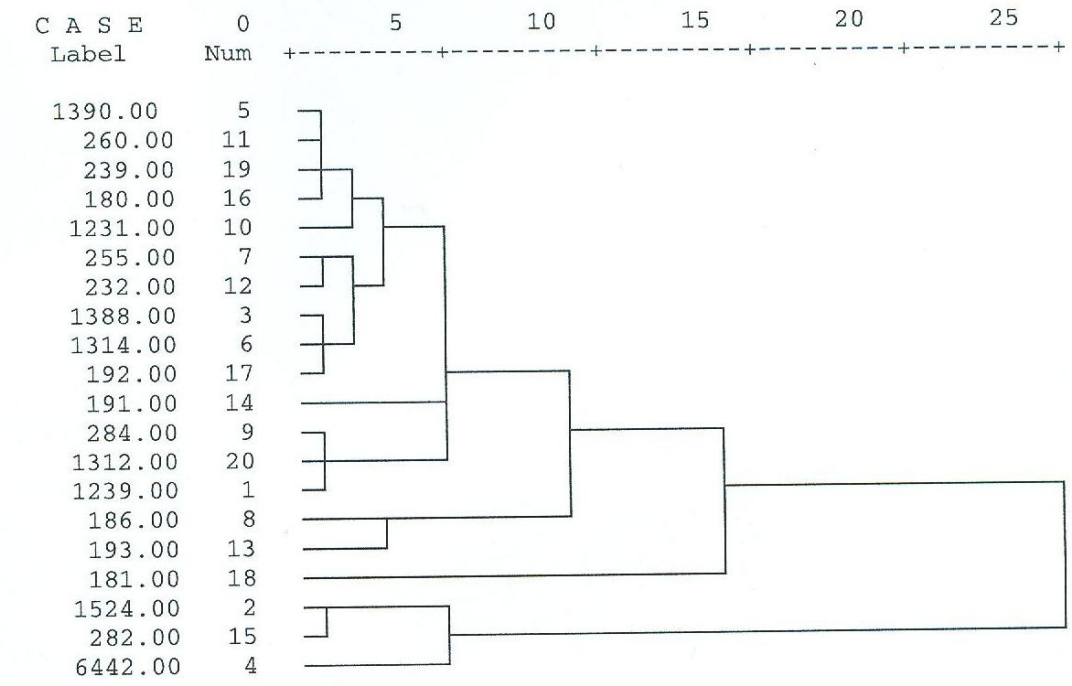
Characters	صفات	Components ضرایب عاملی 1	2	3	4
Trunk diametr	قطرتنه(بالای محل پیوند)	0.625	0.620**	0.287	0.172-
Trunk diametr	قطرتنه (زیرمحل پیوند)	0.529	0.544	0.399	0.295-
Tree height	ارتفاع درخت	0.196	0.458	0.246-	0.179
Shoot thickness	ضخامت شاخه یکساله	0.406	0.348-	0.173	0.104
Internode length	طول میانگره	0.079-	0.097	-0.769	0.192
Leaf length	طول برگ	0.754**	-0.468	0.013-	0.354
Leaf width	عرض برگ	0.531	-0.705**	0.195	-0.123
Leaf length to width ratio	طول برگ به عرض برگ	0.120	0.313	-0.412	0.726**
Petiole length	طول دمبرگ	0.851**	-0.273	-0.341	-0.061
Leaf length to petiole ratio	نسبت طول برگ به دمبرگ	-0.446	0.141	0.576**	0.521
Height of first branch	ارتفاع اولین شاخه بعد از محل پیوند	0.384	0.562	0.188	0.295
variance percent	**درصدواریانس**	25.86	20.40	14.61	10.98
Cumulative percent	**واریانس تجمعی**	25.86	46.26	60.87	71.86

**: Significant at 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمالی ۱٪

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱– گروه‌بندی ژنوتیپ‌های آلبالوی ایرانی و رقم اردی‌بوترمو بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward

Fig. 1. Dendrogram of Iranian local genotypes of sour cherry and cv. Erdi Botermo based on morphological data with Ward method

For name of genotypes see Table 1. برای نام ژنوتیپ‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

زیر گروه تقسیم شد که دو ژنوتیپ پاکوتاه BO AH V1524 از یاسوج و BO KA V 284 از کردستان در یک زیرگروه و ژنوتیپ BO GA V6442 از خراسان در زیرگروه بعدی جای گرفتند. مشخصه اصلی هر سه ژنوتیپ پاکوتاه بودن آن‌ها بود. گروه دوم تنها شامل ژنوتیپ BO LA V181 از استان تهران بود که بیشترین ارتفاع درخت مربوط به این ژنوتیپ بود. گروه سوم شامل دو ژنوتیپ BO LA V186 از تهران و BO HA V193 از آذربایجان غربی بود که ژنوتیپ BO LA V186 در صفاتی مانند قطرتنه (بالای محل پیوند)، طول و عرض برگ دارای بیشترین مقدار بود و ژنوتیپ BO HAV193 در صفت قطرتنه (زیرمحل پیوند) بیشترین مقدار را داشت. هر دو ژنوتیپ عادت رشدی افراشته داشتند و شاخه‌زایی هردو در اواخر تابستان ضعیف بود. در هر دو ژنوتیپ گوشواره به شاخه چسبیده است و تعداد نوش‌جای در هردو، دو عدد بود. گروه چهارم که بزرگ‌ترین گروه را تشکیل می‌داد، به سه زیر گروه تقسیم شد. زیر گروه اول شامل دو ژنوتیپ BO KA V1239 و BO KA V 284 از کردستان در کنار رقم

Archive of SID

www.SID.ir

اردی‌بوترمو (رقم شاهد) بود که هر سه قدرت رشدی قوی، تعداد عدسک زیاد، جوانه رویشی بزرگ، برگ‌های سبز تیره، پهنک برگ باریک، زاویه نوک تیز در انتهای برگ و طول نوک برگ بلند داشتند.

زیر گروه دوم تنها شامل ژنوتیپ BO HA V191 از آذربایجان غربی بود. این ژنوتیپ از نظر صفات قطر تنه (بالا و پایین محل پیوند)، ضخامت شاخه یکساله و ارتفاع اولین شاخه بعد از پیوند دارای کمترین مقدار در بین ژنوتیپ‌ها بود. این ژنوتیپ عادت رشدی گسترده دارد، شاخه‌زایی در آن قوی است و Bud support بزرگی دارد در حالی که اندازه جوانه کوچک است، اندازه گوشواره متوسط است و با انحراف کمی از شاخه قرار گرفته است، بریدگی برگ کم عمق و به شکل هلالی است. زیر گروه سوم از گروه چهارم شامل ده ژنوتیپ دیگر بود که ژنوتیپ‌های BO GH V1390 و BO GH V 239 از اصفهان، BO TA V260 و BO LA V180 از تهران در کنار هم جای گرفتند. ژنوتیپ BO KA V232 از کرمان در کنار BO GH V255 از اصفهان قرار گرفت. سه ژنوتیپ BO GH V 1388 از اصفهان، BO ZA V1314 از تبریز و BO HA V192 از آذربایجان غربی در کنار هم و BO DO V1231 از شیراز به صورت مجزا ژنوتیپ‌های تشکیل‌دهنده زیر گروه سوم بودند.

از ۶۵ آغازگر RAPD که در مرحله اول روی DNA دو ژنوتیپ مورد آزمایش و غربال‌گری قرار گرفت، سیزده آغازگر باندهای چندشکل تولید کردند. لیست آغازگرهای مورد استفاده و نتایج حاصل از آن‌ها در جدول ۴ آورده شده است. در مجموع ۱۴۴ باند تولید شد که ۱۱۷ باند چندشکل بود. تعداد کل باندها بین ۷ تا ۱۴ متغیر بود که بیانگر تفاوت در قدرت شناسایی چندشکلی نشانگرها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. بالاترین درصد چندشکلی مربوط به سه آغازگر MGW211، TIBMBB17 و MGWM12 بود. بیشترین PIC آغازگر که نشانه کارایی نشانگرها در شناسایی توده‌ها است، متعلق به آغازگر MGW215 به میزان ۹۱٪ بود. ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد برای بیست ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفت. الگوی باندی آغازگر MGW211 در شکل ۲ مشاهده می‌شود. ضرایب تشابه جاکارد بین ۳۰٪ تا ۸۱٪ متغیر بود. میانگین ضرایب تشابه ۵۴٪ به دست آمد که به علت تنوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. بیشترین تشابه ژنتیکی بین رقم شاهد (اردی بوترمو) و ژنوتیپ BO KA V282 از کردستان بود (۸۱٪). کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ BOMO V232 از کرمان و BO ZA V1314 از آذربایجان شرقی به دست آمد (۳۰٪).

برای تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین ضرایب تشابه ۵۴٪، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شش گروه متفاوت قرار گرفتند. گروه اول شامل دو زیرگروه بود که

www.SID.ir

جدول ۴- آغازگرهای تصادفی ده نوکلئوتیدی RAPD مورد استفاده جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آلبالوی ایرانی و رقم اردی‌بوترمو و نتایج حاصله از آن‌ها

Table 4. List of primers showing polymorphism on Iranian genotypes of sour cherry and cv. Erdi Botermo and their results

آغازگر Primer	توالی Sequence ۳´→ ۵´	تعداد قطعات چند شکل Polymorphic bands(b)	دمای اتصال Annealing temperature (ºc)	تعداد کل قطعات تکثیر شده Total of bands (a)	درصد چند شکلی Polymorphic % (b⁄a)×100	آغازگر Primer PIC	محدوده ی باند Band range (bp)
MGW211	GAAGCGCGAT	11	32	11	100.0	0.58	500-2500
MGW 215	TCACACGTGC	11	30	14	78.5	0.91	200-3000
MGW 214	CATGTGCTTG	9	30	12	75.0	0.71	280-2700
MGW213	CAGCGAACTA	11	30	13	84.0	0.82	400-2100
MGW 289	ATCAAGCTGC	5	30	7	71.4	0.67	800-2800
MGW 285	GGGCGCCTAG	12	32	14	85.7	0.90	300-2000
OPB07	GGTGACGCAG	8	30	13	61.5	0.88	700-3000
TIBMBB17	ACACCGTGCC	11	30	11	100.0	0.89	280-2500
TIBMBE04	CCCAAGCGAA	8	32	10	80.0	0.76	500-2400
TIBMBB03	TCACGTGGCT	8	32	10	80.0	0.87	300-2100
TIBMBB13	CTTCGGTGTG	8	32	11	72.0	0.68	280-2300
17	CCTGGGCCTC	5	34	7	71.4	0.82	280-2000
MGWM12	GGGACATTAG	10	32	11	90.9	0.88	400-2600
Mean	-	9	-	11.07	80.8	79.76	-
Total	-	117	-	144	-	-	-

Archive of SID

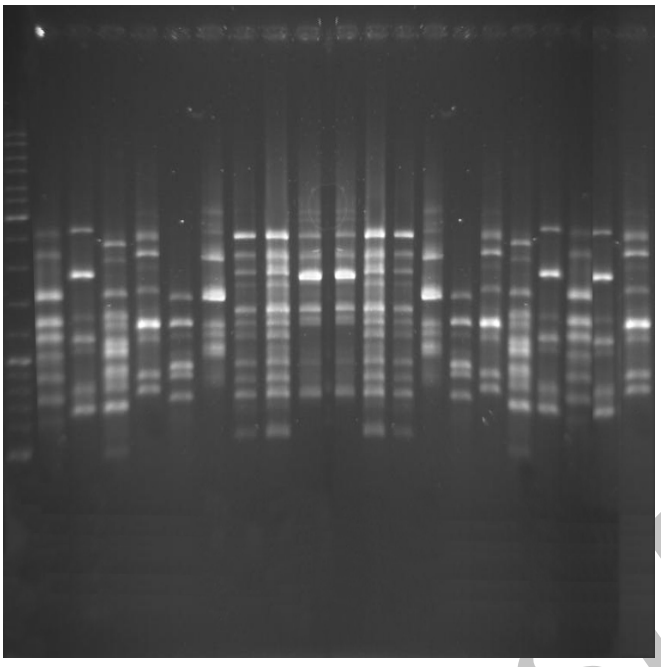
www.SID.ir

ژنوتیپ BO LA V180 از تهران در زیر گروه اول و ژنوتیپ‌های BO LA V181 و BO LA V186 از تهران به همراه ژنوتیپ BO HA V192 از آذربایجان غربی در زیرگروه بعدی قرار داشتند. گروه دوم که بزرگ‌ترین گروه را تشکیل داد شامل دو زیرگروه بود. ژنوتیپ‌های BO HA V191 از آذربایجان غربی، ژنوتیپ‌های BO KA V284 و BO KA V282 از کردستان، ژنوتیپ BOGHV1390 از اصفهان، ژنوتیپ BO DOV1231 از شیراز، ژنوتیپ BO TA V260 از استان البرز(طالقان) به همراه رقم خارجی اردی‌بوترمو که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، در زیرگروه اول جای گرفتند. زیر گروه دوم شامل سه ژنوتیپ BOAHV1524 از یاسوج، BOGAV6442 از خراسان و BO GH V255 از اصفهان (شهرضا) بود. گروه سوم تنها شامل ژنوتیپ BO HA V193 از آذربایجان غربی بود. گروه چهارم شامل دو ژنوتیپ BO GH V239 از اصفهان در کنار BO ZA V1314 از آذربایجان شرقی بود. گروه پنجم شامل ژنوتیپ BO GH V1388 از اصفهان بود. گروه ششم شامل ژنوتیپ BO MOV232 از کرمان بود.

مقایسه نتایج اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک و داده‌های حاصل از نشانگر RAPD نشان داد که رقم شاهد (اردی‌بوترمو) در هر دو دندروگرام مولکولی و مورفولوژیکی در کنار ژنوتیپ‌های BO KA V1239 و BO KA V284 از کردستان قرار گرفتند که هر سه دارای قدرت رشدی قوی بودند، در هرسه ژنوتیپ تعداد عدسک زیاد بود و جوانه رویشی بزرگ، برگ‌های سبز تیره، پهنک برگ باریک و طول نوک برگ بلند از جمله صفات مشترک آن‌ها بود. ژنوتیپ BO LA V181 از تهران که دارای بیشترین ارتفاع درخت بود و در دندروگرام مورفولوژیکی در یک گروه مجزا قرار گرفته بود، در دندروگرام مولکولی در کنار دیگر ژنوتیپ‌های استان تهران یعنی BO LA V186 و BO LA V180 قرار گرفت که نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های منشاء گرفته از یک منطقه است. ژنوتیپ BO KA V282 از کردستان که در دندروگرام مورفولوژیکی در کنار ژنوتیپ پاکوتاه BO GA V6442 و BO AH V1524 قرار گرفته بود، در دندروگرام مولکولی در کنار BO KA V284 و BO KA V1239 قرار گرفت که هردو از استان کردستان هستند، این تفاوت در مورفولوژیک گیاه می‌تواند به علت تاثیر محیط بر روی ژنوتیپ‌ها باشد. ژنوتیپ BO MO V232 از کرمان در دندروگرام مورفولوژیکی در کنار ژنوتیپ‌های استان تهران و اصفهان قرار گرفت در حالی که از نظر ژنتیکی متفاوت بود و در یک گروه جدا قرار گرفت. شباهت نسبی گروه‌بندی دو دندروگرام تا حدود زیادی به تعداد قابل ملاحظه صفات مورد اندازه‌گیری مربوط می‌شود. عدم تشابه نتایج مورفولوژیکی و

Archive of SID

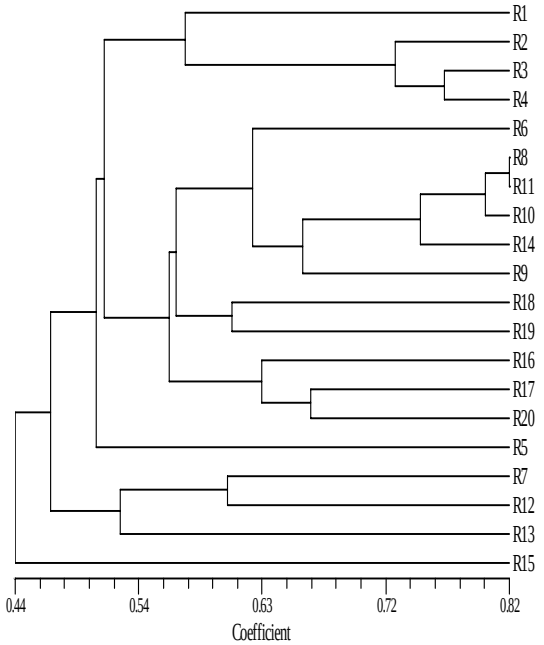
www.SID.ir



شکل ۲- الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر MGW211 برای ژنوتیپ‌های آلبالو

Fig. 2. RAPD pattern amplified by primer MGW211 for 20 sour cherry genotypes

For name of genotypes see Table 1. برای نام ژنوتیپ‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای RAPD مربوط به نوزده ژنوتیپ بومی آلبالو و رقم اردی‌بوترمو به روش UPGMA

Fig.3 . UPGMA dendrogram of Iranian local genotypes of sour cherry and cv. Erdi Botermo based on RAPD primers

For name of genotypes see Table 1. برای نام ژنوتیپ‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

www.SID.ir

مولکولی در برخی موارد را می‌توان به این موضوع نسبت داد که به علت عدم باردهی درختان مورد آزمایش صفات میوه مورد اندازه‌گیری واقع نشده بود و تنها صفات رویشی برگ، شاخه و تنه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. گنجی مقدم و همکاران (Ganj Moghadam and Khalighi, 2007) توده‌های جمع‌آوری شده محلب را بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را از نظر بسیاری صفات مورفولوژیک مشاهده کردند.

در پژوهش اخیر نیز صفات برگی از قبیل طول و عرض برگ، طول دمبرگ، شکل پایه برگ، بریدگی برگ و در بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری با هم داشتند که این موضوع با نتایج تحقیقات رودریگوس و همکاران (Rodrigues *et al.*, 2006) در مورد ژنوتیپ‌های آلبالو و گیلاس مطابقت دارد. لیسک و همکاران (Lisek et al., 2006) و کای و همکاران (Cai *et al.*, 2007)، خدیوی خوب و همکاران (Khadivikhob *et al.*,2009) و قارونی و همکاران(Gharouni *et al.*, 2008) از نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف زیر جنس Cerasus استفاده کردند و نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. رقم اردی‌بوترمو از کشور مجارستان در هر دو دندروگرام در کنار ژنوتیپ‌های استان کردستان قرار گرفت، لذا می‌توان این فرض را مطرح کرد که منشا برخی از ارقام خارجی آلبالو از ایران است و می‌توان ایران را از مهم‌ترین خاستگاه‌های آلبالو دانست چرا که ایران یکی از منابع غنی ژرم‌پلاسم گونه‌های مختلف درختان میوه به خصوص جنس *Prunus* است (Ganj Moghadam and Khalighi, 2007؛ Webster and Looney,1996). با توجه به نتایج به دست آمده تقریبا ژنوتیپ‌های هر استان در گروه‌بندی در کنار هم جای گرفتند که نشان‌دهنده چگونگی پراکنش ژنوتیپ‌های آلبالو در مناطق مختلف کشور است، همچنین این موضوع می‌تواند در نتیجه تکثیر بذری آلبالو در ایران باشد. نظر به این که در این پژوهش تعداد قابل ملاحظه‌ای صفت مورد ارزیابی قرار گرفت، می‌توان شباهت نسبی دو دندروگرام مولکولی و مورفولوژیکی را توجیه کرد چرا که بخش اعظم مورفولوژی یک گیاه در نتیجه توالی DNA آن‌ها است. نتایج هر دو دندروگرام نشان داد که تنوع ژنتیکی بیشتری بین ژنوتیپ‌های استان‌های آذربایجان غربی وجود دارد در حالی که دو ژنوتیپ منشا گرفته از استان اصفهان در یک گروه مشترک قرار گرفتند این موضوع بیانگر آن است که تنوع ژنتیکی آلبالو در نواحی شمال غرب ایران بیشتر است و نشان می‌دهد که هر چقدر به طرف مرکز تنوع پیش می‌رویم فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بیشتر می‌شود. نظر به این که یکی از اهداف اصلاح درختان میوه پاکوتاه بودن آن‌ها است، براساس نتایج این پژوهش استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

از دو ژنوتیپ پاکوتاه BO AH V1524 از یاسوج و BO GA V6442 از خراسان توصیه می‌شود. دو ژنوتیپ BO KA V1239 و BO KA V284 از کردستان از قدرت رشدی بالایی برخوردار هستند که می‌توان از آن‌ها در برنامه‌ها ی به‌نژادی استفاده کرد. بر اساس نتایج این تحقیق و وجود تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌های آلبالو و با توجه به ذخایر ژنتیکی ارزشمند موجود در کشور، لزوم حفظ و توجه به این ذخایر در برنامه‌های پژوهشی می‌تواند مفید واقع شود.

References

Cai, Y. T., Cao, D. W., and Zhao, G . F. 2007. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. Scientia Horticulturae 111: 248-254.

Ganji Moghadam, E., and Khalighi, A. 2007. Relationship between vigor of Iranian *Prunus mahaleb* L. selected dwarf rootstocks and some morphological characters. Scientia Horticulturae 111: 209-212.

Gharouni, T., Zamani, Z. A., and Bouzari, N. 2008. Genetic diversity of *Prunus mahaleb* using RAPD marker. MSc. Thesis, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. 125 pp. (in Persian).

Jafari, M., Zamani, Z., and Fatahi Moghadam, M. 2007. Genetic diversity of some sour cherry genotypes using RAPD and morphological markers. MSc. Thesis, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. 125pp. (in Persian).

Kavand, A., Bouzari, A., and Ghanavati, F. 2007. National guidelines for the conduct of tests for distinictness, uniformity and stability in sour cherry. Seed and Plant Certification and Registration Institute Press, Karaj, Iran. 39pp. (in Persian).

Khadivikhob, A., Zamani, Z., A., and Bouzari, N. 2009. Evaluation of genetic diversity in some Iranian sweet cherry cultivars using some morphological characteristics and RAPD marker. Seed and Plant 24: 195-209 (in Persian).

Lisek, A., Korbin, M., and Rozpara, E. 2006. Using simply generated RAPD markers to distinguish between sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 14: 53-54 59.

Moreno, J., and Trujillo, I. 2005. Genetic characterization and relatedness among cherry cultivars in a germplasm bank by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Agri. Cons. Science 70: 105-111.

Naghavi, M. R., Gareyazi, B., and Hosseini Salekdeh, B. 2005. Molecular Markers.

Archive of SID

www.SID.ir

University of Tehran Press, Tehran, Iran. 334pp. (in Persian).

Rodrigues, L., Morales, C., Fernandes, A. J. B., and Ortiz, J. M. 2006. Morphological characterization of sweet and sour cherry cultivars in a germplasm bank at Portugal. Genetics Resources 17: 143-182.

Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M. 1996. Genetic markers map constraction and their application in plant breeding. Horticultural Science 31(5): 729-740.

Webster, A. D., and Looney, N. E. 1996. Cherries: Crop Physiology, Production and Uses. Cambridge University Press. 513 pp.

Westman, A. L., and Kresovich, S. 1998. Biotechnology and plant genetic resources of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. Biotechnology Advances 14: 9-49.

Williams, J. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.

Archive of SID

www.SID.ir