نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ص. ۸۶-۷۸
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 26, No. 1, Spring 2012, P. 78-86
ISSN: 2008 - 4730

بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ های بادام زراعی و وحشی با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

صغری کیانی[1*] - بهروز شیران[2]

تاریخ دریافت:۹۰/۵/۱
تاریخ پذیرش:۹۰/۱۱/۱۸

چکیده

در این بررسی تنوع ژنتیکی ۳۶ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی، آمریکایی و اروپایی به همراه ۳ گونه وحشی بادام با استفاده از ۶۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی مورد مطالعه قرار گرفت. ۴۷ آغازگر که الگوهای باندی قوی و تکرارپذیر داشتند، برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شدند. از مجموع ۹۶۸ باند تولید شده، ۹۱۸ باند (۹۴/۸۳ درصد)، چند شکل بودند. با توجه به دندروگرام حاصل و ماتریس تشابه به خوبی آشکار گردید که میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ های تحت مطالعه، پایین و تنوع بین آنها نسبتا زیاد بود. بیشترین شباهت بین دو رقم ایرانی سفید و منقا (۰/۸۹) و کمترین آن بین رقم سنگی ۲۸ و گونه وحشی *A. scoparia* (۰/۲۹) مشاهده شد. به منظور ترسیم دیاگرام خوشه‌ای، از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. در ابتدا دو گونه وحشی *A. scoparia* و *A. orientalis* ، دو ژنوتیپ سنگی۲۸ و سنگی۱۳ و رقم آمریکایی تامسون که بیشترین فاصله را از گروها داشتند از سایر ارقام و ژنوتیپها جدا شده و سپس ارقام، ژنوتیپها و گونه های باقی مانده در فاصله ژنتیکی ۰/۵۰ به دو گروه تفکیک شدند. نتایج حاصل از این مطالعه، گروهبندی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس منشاء جغرافیایی یا دودمان نشان می‌دهد و نشانگر RAPD به خوبی قادر به تفکیک ارقام، ژنوتیپ‌ها و گونه‌های بادام از یکدیگر بوده و تکنیک مناسبی جهت مطالعه ژرم پلاسم بادام می‌باشد.

واژه های کلیدی: بادام، نشانگرRAPD ، تنوع ژنتیکی

مقدمه

بادام با نام علمی (*prunus amygdalus (communis*) متعلق به خانواده *Rosaceae* و زیر خانواده *pronuidea* است. این گیاه عموماً دگرگشن بوده و از نظر ژنتیکی ناخالص می‌باشد. در ایران حدود ۲۷ گونه بادام شناسایی شده است که غالباً در نواحی نیمه خشک و استپی می‌روید (۲). عمده ترین واریته هایی که در ایران مورد کشت قرار می‌گیرند مامایی، شکوفه و آذر هستند که به علت خود ناسازگاری، واریته‌های گرده افشان از قبیل ربیع، سهند و ژنوتیپهای خودرو (سنگی) جهت تولید بادام در باغات میوه کشت می‌شوند. درخت بادام به عنوان یکی از مقاوم ترین درختان به خشکی و گرما در میان میوه جات مناطق معتدله شناخته می‌شود. با توجه به اینکه کشور ما یکی از کشورهای دارای آب و هوای خشک بوده و کمبود آب در کشاورزی و باغبانی مطرح می‌باشد، توسعه کشت و کار ارقام بادام در مناطق مناسب ضروری می‌باشد. بادام از جمله گونه‌های درختان میوه ای تجاری است که دارای تنوع بسیار بالایی می‌باشد، این امر به علت طبیعت خودناسازگاری آن می‌باشد. یکی از دلایل مهم شناسایی ژنوتیپ صحیح ارقام بادام، بهبود کارایی برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (۵). توسعه نشانگرهای مولکولی که مبتنی بر چند شکلی DNA هستند، تحقیق در زمینه تنوع گروههای تاکسونومی، فیلوژنی، اکولوژی، ژنتیکی و اصلاح گیاهی را آسان نموده است. در چند سال اخیر انواعی از تکنیک ها جهت آشکارسازی چند شکلی‌های توالی DNA توسعه پیدا کرده و نشانگرهای مولکولی از این تکنیک حاصل شده اند. با ابداع واکنشهای زنجیره ای پلی مراز و تکنیکهای مبتنی بر PCR[3] از قبیل چند شکلی قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی (RAPD[4]) به طور چشمگیری استفاده از انگشت نگاری DNA به عنوان ابزاری در اصلاح درختان میوه افزایش یافته است (۱۷). مزیت عمده تکنیک RAPD – PCR عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ساختار DNA ی ژنومی، سادگی روش و مقدار کم DNA ی مورد نیاز جهت بررسی گونه ها می‌باشد. ارزش استفاده از RAPD در مدیریت ژرم پلاسم بادام به دلیل هزینه بالای کاشت و

۱- مربی گروه علوم کشاورزی دانشگاه پیام نور
(*- نویسنده مسئول: (Email:So_kiani@pnu.ac.ir)
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

3 - Poly merase Chain Reaction
4- Randomly Amplified Polymorphic DNA

نگه داری این گیاه و وجود درجه بالایی از چند شکلی به دلیل خود ناسازگاری این گیاه از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. اصول این روش بر این اساس استوار است که یک آغازگر اختیاری ده نوکلئوتیدی می‌تواند توالی DNA ی ژنومی را در PCR در محل‌هایی که همولوژی کافی داشته باشد توسط آنزیم Taq DNA Polymerase در دوره‌های حرارتی شامل سه مرحله واسرشت سازی، اتصال و بسط آغازگر تکثیر نماید.

وزوائی (۱۶) با استفاده از۷ آغازگر RAPD ، ۱۲ رقم زراعی و گونه وحشی بادام را از یکدیگر تفکیک نمود و با مقایسه الگوهای نواری PCR در بین بادام‌های زراعی و گونه‌های وحشی بادام دریافت که تنوع نوارها در بادام‌های وحشی کمتر از تنوع نوارها در بادامهای زراعی می‌باشد.

میرعلی و نابلسی (۱۲) با استفاده از تکنیک RAPD روابط ژنتیکی بین ۱۹ رقم بادام زمینی را مورد بررسی قرار دادند. گروه بندی حاصل بر اساس نشانگر RAPD تا حدودی با منشای جغرافیایی ارقام بادام مورد بررسی مطابقت داشت.

زو و همکارن (۱۸)، روابط ژنتیکی ۳۶ رقم زراعی بادام و ۸ ژنوتیپ از گونه‌های وابسته دیگر به جنس *Prunus* را با استفاده از ۲۲ جفت آغازگر EST-SSR و ۷ جفت آغازگر ژنومی SSR مورد مطالعه قرار دادند. مارتینز وهمکاران (۱۱) با استفاده از نشانگرهایRAPD وISSR تنوع ژنتیکی ارقام بادام رایج در کشور پرتقال و ارتباط این ارقام با ارقام مهم خارجی را مورد بررسی قرار دادند.

قضاوی و همکاران (۷) با استفاده از تکنیک RAPD روابط ژنتیکی بین ارقام، ژنوتیپها و گونه های وحشی بادام را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ۵ تا از آغازگرهای مورد استفاده چند شکلی و تکرار پذیری مطلوبی داشته و به خوبی توانستند گونه های وحشی را از ژنوتیپ های شیرین متمایز کنند.

شارما و همکاران (۱۴) با استفاده از ۱۵ آغازگر RAPD ۱۳ ژنوتیپ بادام را مورد بررسی قراردادند. این نشانگر به خوبی توانست ژنوتیپ های مورد مطالعه را بر اساس منشا جغرافیایی گروهبندی کند.

فتحی و همکاران (۶) با مطالعه روی ۵۶ رقم وژنوتیپ بادام ایرانی با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای ریزماهواره‌ای توانستند آنها را به ۵ گروه اصلی تقسیم بندی کنند.

کدخدایی (۱۰) در مطالعه ای بر روی ۵۳ رقم و ژنوتیپ بادام با استفاده از تعدادی از خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای ریزماهواره توانست آنها را به دو گروه اصلی تقسیم نماید ولی میزان شباهت بدست آمده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره درمقایسه با خصوصیات مورفولوژیکی بسیارکمتر بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۳۹ رقم، ژنوتیپ و گونهٔ بادام شامل ۲۴ رقم اروپایی و آمریکائی، ۱۲ رقم و ژنوتیپ ایرانی و سه گونهٔ وحشی این گیاه مورد استفاده قرار گرفتند. مشخصات این مجموعه در جدول ۱ آمده است. برگهای جوان این گیاهان در اوایل تابستان از مرکز تحقیقات، بادامستان امامیه (باغ بادام واقع در استان چهارمحال و بختیاری، شهرستان شهرکرد که شامل کلکسیونی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام می باشد) و منابع طبیعی شهرستان شهرکرد تهیه و جهت حفظ شادابی و طراوت بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و سپس تا زمان استخراج DNA درون ازت مایع نگه داری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB به دو صورت انجام شد به طوری که در حالت اول از محلول شستشو و در حالت دوم از PVP جهت استخراج DNA استفاده شد. کیفیت نمونه های DNA با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TAE x ۱ تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران (۱۷) با تغییر جزیی در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر x۱۰، ۲۰۰ میکرومولار از dNTPs، ۱۵ نانوگرم آغازگر، ۰/۷ واحد تگ پلی مراز و ۵۰ نانوگرم از DNA ی الگو بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف) که برای ۴۵ چرخه برنامه ریزی شده بود، به شرح زیر صورت گرفت: ۳ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی گراد جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۴۵ چرخه هرکدام شامل ۱ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۳۵ درجه سانتی گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد با ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط نهایی انجام پذیرفت. فراورده‌های تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE x۰/۵ از یکدیگر تفکیک شدند. هر واکنش خاصی دوبار تکرار گردید و نوارهای مناسب و تکراری جهت تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفتند. ژنوتیپها برای حضور (۱) یا عدم حضور (صفر) امتیاز بندی شده و بعد از یکنواخت سازی، داده ها به کمک نرم افزار آماری NTsys 2.02 مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند و دندروگرام با استفاده از ضریب جاکارد و روش UPGMA رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که روش CTAB مبنی بر استفاده از PVP، روش مناسب‌تری جهت استخراج DNAی گیاه بادام می‌باشد. علت این امر، حذف متابولیت‌های ثانویه موجود در برگ‌های بادام توسط PVP می‌باشد. در گیاهان دیگری نظیر *Alium sativa*، *Mentha arvensis*، *Artemisia annua* و *Ocimum kilmandscharicum* نیز استفاده از PVP سبب بهبود کیفیت DNA شده است. ۴۷ آغازگر مورد استفاده برای ۳۶ رقم و ۳ گونهٔ

وحشی بادام جمعاً ۹۶۸ باند تولید کردند که از این تعداد باند ۹۱۸ باند (۹۴/۸۳درصد) چند شکل بودند (جدول ۲).

تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر از ۸ (آغازگر OPM_{40}) تا ۳۵ باند (آغازگرهای OPM_{37}, OPM_{50}) متغیر بود و به طور متوسط ۲۰/۶ باند به ازای هر آغازگر تولید شد.

جدول ۱- ارقام مورد مطالعه و مشخصات آنها (ایمانی، ۱۳۷۹ و Jules ،۱۹۹۶)

ردیف	اسم رقم	منشاء	طعم	زمان گلدهی	خودسازگاری	نوع پوسته	دودمان
۱	منقاء نجف آباد	ایران	شیرین	زودگل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۲	سفید	ایران	شیرین	زودگل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۳	مامائی	ایران	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۴	ربیع	ایران	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۵	شکوفه	ایران	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نیمه سخت	Ai & Nonpreil
۶	آذر	ایران	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نیمه سخت	Ai & Cirstomorto
۷	سنگی۳۱	ایران	شیرین	زودگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۸	سنگی۱۳	ایران	تلخ	زودگل	خودناسازگار	نیمه سخت	نامشخص
۹	سنگی ۱۴	ایران	تلخ	زودگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۰	سنگی۲۶	ایران	تلخ	زودگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۱	سنگی۲۸	ایران	تلخ	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۲	سنگی۱۲	ایران	تلخ	زود گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۳	Facioello	ایتالیا	شیرین	خیلی زود گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۴	Bari	ایتالیا	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۵	Fileppo Ceo	ایتالیا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۶	Tuono	ایتالیا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۷	Mooncago	اسپانیا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۸	Genco	ایتالیا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۱۹	Princesse	فرانسه	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	نیمه سخت	نامشخص
۲۰	Ferragnes	فرانسه	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	Ai & Cirstomorto
۲۱	Primorskyi	روسیه	شیرین	خیلی دیر گل	خودناسازگار	نرم	Princesse2077 & Nickitskyi
۲۲	IXL	آمریکا	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۲۳	Ne Plus Ultra	آمریکا	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۲۴	Kapareil	آمریکا	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	کاغذی	Nonpareil & Eureka
۲۵	Thompson	آمریکا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نرم	Texas & Nonpreil
۲۶	Texas	آمریکا	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نیمه سخت	Seedling of Loguedoc
۲۷	Nonpreil	آمریکا	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	کاغذی	نامشخص
۲۸	Tardy nonpreil	آمریکا	شیرین	خیلی دیر گل	خودناسازگار	نرم	Mutant of Nonpreil
۲۹	شاهرودی ۱۷	نامشخص	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	نیمه سخت	نامشخص
۳۰	شاهرودی ۲۱	نامشخص	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	نیمه سخت	نامشخص
۳۱	شاهرودی ۱۸	نامشخص	شیرین	متوسط گل	خودناسازگار	کاغذی	نامشخص
۳۲	شاهرودی ۱۲	نامشخص	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۳۳	شاهرودی ۱۵	نامشخص	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	کاغذی	نامشخص
۳۴	شاهرودی ۱۳	نامشخص	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۳۵	شاهرودی ۶	نامشخص	شیرین	دیرگل	خودناسازگار	نیمه سخت	نامشخص
۳۶	شاهرودی ۱۶	نامشخص	شیرین	خیلی دیر گل	خودناسازگار	نرم	نامشخص
۳۷	*A.communis*	ایران	تلخ	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۳۸	*A.orientalsi*	ایران	تلخ	متوسط گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص
۳۹	*A.scoparia*	ایران	تلخ	خیلی دیر گل	خودناسازگار	سخت	نامشخص

اندازهٔ باندهای حاصل بین ۱۹۲ تا ۳۱۶۰ جفت باز متغیر بود. تمامی ۴۷ پرایمر مورد استفاده در این تحقیق چند شکلی بالایی نشان دادند. تعداد ۱۸ باند (۱/۸۶ درصد) فقط در گونه *A.communis*، ۱۷باند (۱/۷۶ درصد) فقط در گونهٔ *A. orieentalis* و ۳۷ باند (۳/۸۲ درصد) نیز تنها در گونهٔ *A. scoparia* مشاهده گردید. در مجموع هر یک از ۷۲ باند (۷/۴۴ درصد) از ۹۶۸ باند تولید شده می‌تواند به عنوان یک باند اختصاصی هر یک از این ۳ گونه در نظر گرفته شود. وجود باندهای مشترک بین دو رقم سفید و منقا نزدیکی این دو رقم را تأیید می‌کند. نزدیکی این دو رقم با انجام مطالعات مورفولوژیکی نیز نشان داده شده است (۳).

رقم Tardy nonpareil رقمی است که در اثر جهش در رقم Nonpareil بوجود آمده است (۹). وجود باندهای مشترک بین این دو رقم نیز نزدیکی این ارقام را تأیید می‌کند. در بررسی‌های انجام شده با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR [1] نیز مشابهت این دو رقم تأیید شده است (۱۱).

شکل۱ گروه بندی انجام شده بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی کوفنتیکی بدست آمده در این حالت ۰/۹۴ می‌باشد که نشان دهندهٔ یک برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی می‌باشد. با توجه به دندروگرام حاصل و ماتریس تشابه به خوبی مشخص می‌باشد که فاصلهٔ ژنتیکی بین مجموعهٔ ارقام مورد مطالعه از ۰/۱۱ (بین دو رقم سفید و منقا) تا ۰/۷۲ (بین گونهٔ وحشی *A. scoparia* و ژنوتیپ ایرانی سنگی ۲۸)، متفاوت بوده و میانگین آن معادل ۰/۵۲ می‌باشد. ابتدا گونهٔ وحشی *A. scoparia* که متعلق به بخش اسپارتیوایدس [2] بادام می‌باشد در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۶۵ از سایر ارقام و ژنوتیپ‌های تحت مطالعه که متعلق به بخش یوآمیگدالوس [3] می‌باشند جدا می‌شود. بخش یوآمیگدالوس شامل گونه های اجدادی بادام زراعی فعلی می باشد و بخش اسپارتیوایدس مخلوطی از تعداد گونه هایی است که مورفولوژی مشابهی نشان داده و به شرایط خشکی سازگاری دارند (۱). این امر نشان دهندهٔ توانایی نشانگر RAPD در تفکیک بخشهای مختلف بادام از یکدیگر می‌باشد. سپس *A . orientalis* که جد بادام‌های باغی نمی باشد ولی با بادام‌های باغی در یک بخش قرار داشته و قابلیت تلاقی با آنها را دارد در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۶۱ از سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها جدا می‌شود. پس از جدایی دو گونهٔ وحشی *A. scoparia* و *A. orientalis* دو ژنوتیپ ایرانی سنگی ۲۸ و سنگی ۱۳ در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۵۸ از سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها جدا شدند. در بررسی الگوی نواری ایجاد شده در این دو ژنوتیپ توسط آغازگرهای مختلف تفاوت قابل توجهی با الگوی نواری ایجاد شده توسط همین آغازگرها در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی دیگر مشاهده می‌شود که همین امر باعث تفکیک این دو ژنوتیپ از سایر ارقام و ژنوتیپهای ایرانی شده است. آنگاه رقم آمریکایی Thompson نیز در فاصلهٔ ژنتیکی۰/۵۴ از سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها جدا می‌شود. این رقم نیز در مقایسه با سایر ارقام آمریکایی الگوی نواری متفاوتی توسط آغازگرهای مختلف ایجاد کرد. پس از جدایی دو گونه*A. orientalis* و *A. scoparia*، ژنوتیپ‌های سنگی ۲۸ و ۱۳ و رقم آمریکائی Thompson ، گونهٔ وحشی *A. communis* از سایر ارقام و ژنوتیپ ها، در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۵۱ جدا می‌شود. گونهٔ وحشی *A.communis* نسبت به دو گونه *A. scoparia* و *A. orientalis* شباهت ژنتیکی بیشتری با ارقام بادام‌های باغی دارد و در فاصلهٔ ژنتیکی کمتری از ارقام بادام‌های باغی تفکیک می‌شود. این امر با در نظر گرفتن این حقیقت که این گونه جد بادام‌های باغی می‌باشد و دارای دو نوع تودهٔ طبیعی شناخته شده است که یک توده آن در دامنه کوههای کپ داق در آسیای مرکزی و در نواحی بین ایران، ترکمنستان و تاجیکستان پراکنده و توده بعدی آن در دامنه کوههای تیان شان بین مغولستان و ازبکستان قرار دارد و بادام‌های باغی از این گونهٔ وحشی منشأ گرفته‌اند (۴ و ۱۵)، قابل توجیه می‌باشد.

ارقام و ژنوتیپ‌های باقی مانده در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۵۰ به دو گروه اصلی تفکیک می‌شوند. گروه اصلی اول عمدتاً ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و آمریکایی را شامل می‌شود ضمن این که سه رقم Tuono، Filippo Ceo، Bari (از ایتالیا)، رقم Moncago(از اسپانیا) و رقم Primorski (از روسیه) را نیز شامل می‌شود. گروه اصلی دوم شامل ارقام اروپایی مورد مطالعه می‌باشد.

گروه اصلی اول در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۴۵ به دو زیر گروه تقسیم می‌شود. زیر گروه اول عمدتاً ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی را شامل می‌شود. در زیر گروه ارقام ایرانی ابتدا ژنوتیپ تلخ سنگی ۱۴ در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۴۲ از سایر ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی جدا می‌شود. آنگاه ارقام و ژنوتیپ‌های باقی مانده در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۳۹ به دو گروه کوچک تر تقسیم می‌شوند.

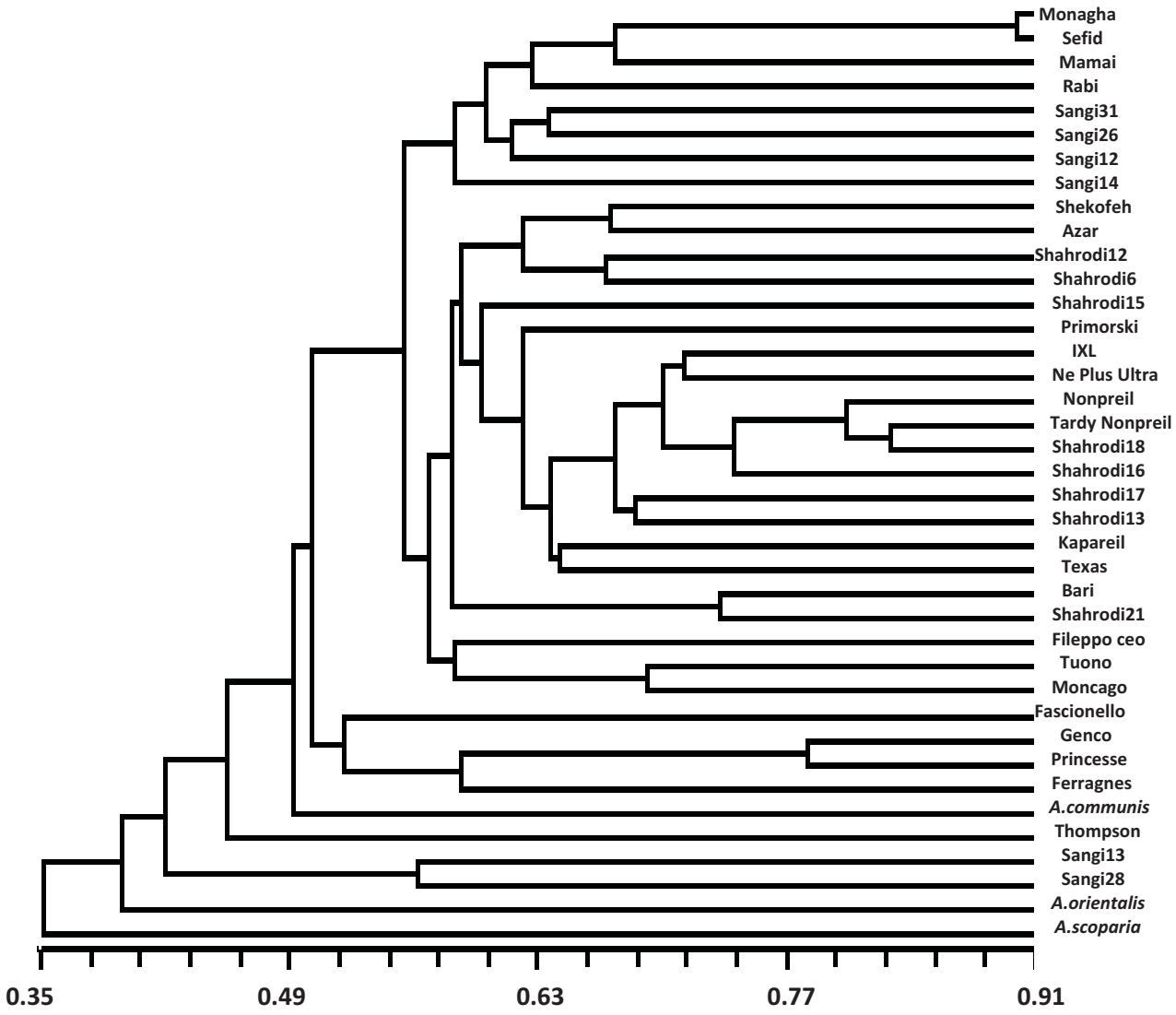
گروه اول شامل ارقام محلی منقا و سفید (از اصفهان و نجف‌آباد)، مامایی و ربیع (از توده‌های محلی چهارمحال و بختیاری) می‌باشد که تمام این ارقام از ارقام بادام‌های شیرین می‌باشند و گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های تلخ ایرانی می‌باشد. ضمن اینکه ژنوتیپ سنگی ۳۱ که یکی از ژنوتیپ‌های شیرین می باشد نیز در این گروه قرار گرفته است. در زیر گروه ارقام ایرانی دو رقم سفید و منقا به میزان ۸۹ درصد شباهت ژنتیکی نشان می‌دهند.

این احتمال وجود دارد که این دو رقم در واقع یک رقم ولی با دو نام متفاوت باشند که در دو منطقه متفاوت از ایران (سفید در اصفهان و منقا در نجف آباد) کشت می‌شوند، بررسی‌های موفولوژیکی انجام شده بر روی این دو رقم نیز این موضوع را تأیید می‌کند (۳).

1 - Inter Simple Sequence Repeat
8- Spartioides
3- Euamygdalus

جدول ۲-آغازگرهای مورد استفاده،توالی آغازگرها و تعداد باندهای تکثیر شده

ردیف	نام آغازگر	توالی آغاز گر (´3 - ´5)	مجموع قطعات تکثیر شده	باندهای چندشکل	درصد چندشکلی
۱	OPM1	TTCGAGCCAG	۱۴	۹	۶۴/۲۸
۲	OPM4	CCGCATCTAC	۱۶	۱۳	۸۱/۲۵
۳	OPM5	GATGACCGCC	۲۳	۲۳	۱۰۰/۰۰
۴	OPM6	GAACGGACTC	۲۲	۲۱	۹۵/۴۵
۵	OPM7	GTCCCGACGA	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵
۶	OPM8	TGGACCGGTG	۱۱	۹	۸۱/۸۲
۷	OPM12	TGTCATCCCC	۱۳	۱۱	۸۴/۶۲
۸	OPM13	AAGCCTCGTC	۱۴	۱۴	۱۰۰/۰۰
۹	OPM14	TGCGTGCTTG	۲۲	۲۰	۹۰/۹۱
۱۰	OPM15	GACGGATCAG	۱۵	۱۵	۱۰۰/۰۰
۱۱	OPM16	CACACTCCAG	۱۳	۱۳	۱۰۰/۰۰
۱۲	OPM18	TGAGTGGGTG	۱۸	۱۸	۱۰۰/۰۰
۱۳	OPM19	GTTGCCAGCC	۱۱	۹	۸۱/۸۲
۱۴	OPM22	TCGGACGTGA	۲۲	۲۱	۹۵/۴۵
۱۵	OPM23	AGACGTCCAC	۲۰	۱۹	۹۵/۰۰
۱۶	OPM24	GGAAGTCGCC	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
۱۷	OPM25	AGTCGTCCCC	۲۳	۲۱	۹۱/۳۰
۱۸	OPM27	CTGCATCGTG	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
۱۹	OPM28	GAAGCACCCC	۲۱	۱۹	۹۰/۴۸
۲۰	OPM32	GGACCCAACC	۲۶	۲۵	۹۶/۱۵
۲۱	OPM33	GTCGCCGTCA	۲۵	۲۵	۱۰۰/۰۰
۲۲	OPM35	TGAGCGGACA	۱۲	۱۱	۹۱/۶۷
۲۳	OPM36	ACCTGAACGG	۱۹	۱۸	۹۴/۷۴
۲۴	OPM37	TTGGCACGGG	۳۵	۳۵	۱۰۰/۰۰
۲۵	OPM38	GTGTGCCCCA	۲۱	۲۱	۱۰۰/۰۰
۲۶	OPM40	GTGCTACACC	۸	۷	۸۷/۵۰
۲۷	OPM41	AGCGCCATTG	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳
۲۸	OPM42	CACCGTATCC	۲۹	۲۹	۱۰۰/۰۰
۳۹	OPM43	GGGGTGACGA	۳۰	۳۰	۱۰۰/۰۰
۳۰	OPM44	CTTCCCCAAG	۱۰	۹	۹۰/۰۰
۳۱	OPM45	CATCCGTGCT	۲۷	۲۶	۹۶/۳۰
۳۲	OPM46	AGGGCGTAAG	۲۴	۲۳	۹۵/۸۳
۳۳	OPM48	GAGAGCCAAC	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
۳۴	OPM49	CTGGGGACTT	۲۷	۲۶	۹۶/۳۰
۳۵	OPM50	ACCCGGTCAC	۳۵	۳۴	۹۷/۱۴
۳۶	OPM51	CTTCCGCAGT	۲۸	۲۷	۹۶/۴۳
۳۷	OPM52	ACGCGCATGT	۲۷	۲۵	۹۲/۵۹
۳۸	OPM53	GACGCCACAC	۲۶	۲۶	۱۰۰/۰۰
۳۹	OPM54	ACCAGGTTGG	۳۰	۲۹	۹۶/۶۷
۴۰	OPM55	AATGGCGCAG	۳۲	۳۲	۱۰۰/۰۰
۴۱	OPM56	TCTCAGCTGG	۲۲	۲۰	۹۰/۹۱
۴۲	OPM57	CACTCTCCTC	۲۴	۲۳	۹۵/۸۳
۴۳	OPM58	GAATCGGCCA	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵
۴۴	OPM59	CTGACCAGCC	۲۳	۲۲	۹۵/۶۵
۴۵	OPM60	GGGAGACATC	۲۳	۲۲	۹۵/۶۵
۴۶	OPG1	CAGGCCCTTC	۱۹	۱۹	۱۰۰/۰۰
۴۷	OPG2	TGCCGAGCTG	۲۳	۲۱	۹۱/۳۰
			۹۶۸	۹۱۸	۹۴/۸۳



شکل ۱- گروه بندی نمونه های مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم افزار NTSYS

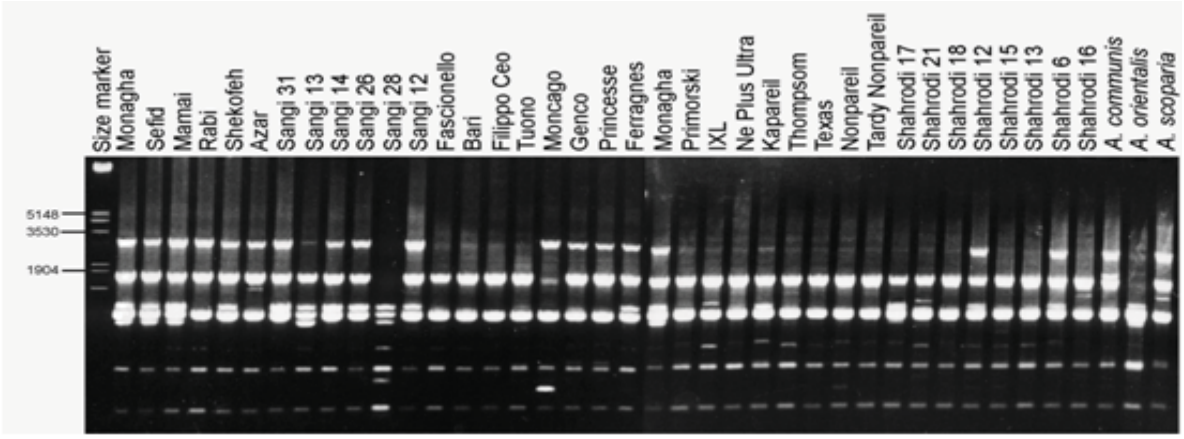
زیر گروه دوم در برگیرندۀ ارقام آمریکایی می‌باشد. ضمن این که ارقام شاهرودی، دو رقم ایرانی شکوفه و آذر، رقم روسی Primorski سه رقم ایتالیایی (Bari، Tuono، Filippoceo) و رقم اسپانیایی Moncago نیز در این زیر گروه قرارگرفته اند. حضور ارقام ایرانی شکوفه (والد آمریکایی × والد فرانسوی) و آذر (والد ایتالیایی × والد فرانسوی) و رقم روسی Primorski (والد روسی × والد فرانسوی) در زیر گروه مربوط به ارقام آمریکایی با توجه به والدین آنها و در نظر گرفتن این حقیقت که صنعت بادام کالیفرنیا بر پایه ارقام منتقل شده از منطقه لانگوداگ (جنوب فرانسه) به کالیفرنیا بنا شده است توجیه می‌شود (۳). حضور رقم ایتالیایی Bari نیز در این زیر گروه، ارتباط ژنتیکی نزدیک این رقم با سایر ارقام موجود در این زیر گروه را نشان می‌دهد. همان طور که ذکر شد، دو رقم ایتالیایی Tuonoو Fillipo Ceo و رقم اسپانیایی Moncago نیز در زیر گروه مربوط به ارقام آمریکایی جای گرفته اند، با در نظر گرفتن این نکته که صحت و دقت تخمین تنوع ژنتیکی بر مبنای داده‌های مولکولی به عوامل متعددی مانند تعداد نشانگرهای مورد استفاده، توزیع آنها در ژنوم و دقت در امتیازبندی نوارها بستگی دارد (۱۳)، در این مورد نیز این امکان وجود دارد که در صورت استفاده از تعداد آغازگرهای بیشتر بدلیل پوشش بهتر و بیشتر ژنوم، این ارقام نیز در گروه مربوط به ارقام اروپایی جای گیرند. یک احتمال دیگر نیز برای حضور ارقام اروپایی

مذکور در این زیرگروه قابل تصور است، به این صورت که ممکن است این ارقام دارای اجدادی از بادام‌های آمریکایی باشندکه این امر، حضور آنها را در گروه مربوط به ارقام آمریکایی را موجب گردیده است.

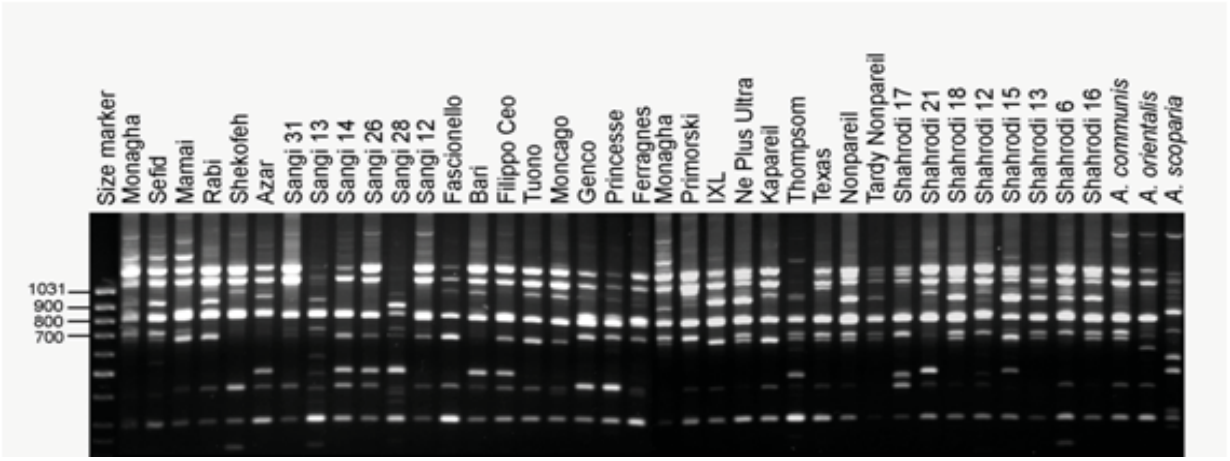
درزیر گروه ارقام آمریکایی تقسیم بندی جالبی دیده می‌شود. دو رقم ایرانی شکوفه و آذرکه دارای یک والد مشترک فرانسوی Ai بوده و به میزان ۶۷ درصد شباهت ژنتیکی نشان می‌دهند در یک گروه کوچک قرار گرفته و از ارقام آمریکایی جدا می‌شوند. در این زیر گروه رقم روسی Primorski در فاصلهٔ ژنتیکی ۳۷/۵ درصد از ارقام امریکایی تفکیک می‌شود. آنگاه ارقام آمریکایی خود گروه کوچکی را تشکیل می‌دهند. در این زیر گروه سه رقم اروپایی Moncago ، Filippo Geo و Tuno گروه کوچکی را تشکیل داده و در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۳۳ از ارقام آمریکایی جدا می‌شوند. در زیر گروه ارقام آمریکایی دو رقم Tardy Nonpareil , Nonpareil به میزان ۸۲ درصد شباهت ژنتیکی نشان می‌دهند. Tardy nonpareil رقمی است که در اثر ایجاد جهش در رقم Nonpareil ایجاد شده است (۹). در بررسی الگوی باندی این دو رقم توسط آغازگرهای مختلف الگوی باندی بسیار مشابهی بدست آمده است. با در نظر گرفتن ماتریس تشابه مشخص می‌شود که احتمالا دو رقم شاهرودی ۱۸ و ۱۶ به ترتیب همان ارقام Tardy nonpareil (به ۸۲ درصد شباهت) و Nonpareil (با ۷۲ درصد شباهت) می‌باشند که در سال ۱۳۵۵ از کشور فرانسه به ایران آورده شده بودند. رقم شاهرودی ۲۱ و رقم ایتالیاییBari نیز در زیر گروه ارقام آمریکایی گروه کوچکی تشکیل داده و به میزان ۷۳ درصد شباهت ژنتیکی نشان می‌دهند. این احتمال وجود دارد که رقم شاهرودی۲۱ همان رقم ایتالیایی Bari باشد. دو رقم آذر و Ferragnes والدین یکسان دارند (Ai×cristomorto) ولی تنها به میزان ۵۴ درصد شباهت ژنتیکی نشان می‌دهند و در دو گروه متفاوت جای گرفته اند که علت این امر را باید در توزیع ژنوم والدین آنها جستجو نمود.

با مقایسه پاره ای از صفات مورفولوژیکی ارقام مورد مطالعه و گروه بندی حاصل با استفاده از داده‌های RAPD نتیجه جالب توجهی حاصل می‌شود. تعدادی از ارقام که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی بسیار متفاوت بودند در یک گروه قرار گرفتند دلیل این امر می‌تواند از ماهیت ژنتیکی نشانگرهای RAPD به کار برده شده در این مطالعه ناشی شده باشد. این احتمال وجود دارد که نشانگرهای RAPD ی که جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام بادام استفاده شده اند مربوط به نواحی از ژنوم باشند که ترجمه نشده و در کنترل صفات مورفولوژیکی نقشی ندارند. از طرفی پاره ای از صفات وراثت خارج از هسته‌ای دارند، که ژن‌های کنترل کنندهٔ آنها در اندامک‌های سیتوپلاسمی قرار می‌گیرد (۸). با توجه به این که در تجزیه و تحلیل RAPD فقط از ژنوم هسته‌ای گیاه استفاده شد، این احتمال وجود دارد که تعدادی از صفات متنوع در بادام وراثت خارج از هسته‌ای داشته باشند. به عبارت کلی صفات مورفولوژیکی، تحت تأثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرند که این عوامل در سطح DNA بی‌تأثیر هستند. مجموعه این عوامل سبب می‌شود که ارقامی که بر اساس داده‌های موجود در سطح DNA، مشابه هستند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت یا متشابه باشند. باید توجه داشت که قطعات تکثیر یافته مشابه الزاماً از نظر توالی نوکلئوتیدی یکسان نیستند و نوارهایی با اندازه یکسان ممکن است متعلق به قسمت‌های مختلف ژنوم و دارای توالی متفاوت باشند. بنابراین داده‌های RAPD ممکن است هیچ همسویی با گروه بندی افراد بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و گیاهشناسی نداشته باشد، این امر با توجه به تأثیر پذیری این صفات از عوامل محیطی دور از انتظار نیست. چنین نتیجه‌ای در بادام توسط مارتینز – گومز و همکاران (۱۱) نیز گزارش شده است. لذا در برنامه‌های اصلاحی اگر گزینش افراد فقط بر اساس صفات مورفولوژیکی و گیاه‌شناسی باشد، ممکن است نتیجه مطلوب را نداشته باشد.

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه، گروه بندی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس منشای جغرافیایی یا دودمان نشان می‌دهد. لذا نشانگر RAPD، ابزار مناسبی جهت شناسایی ارقام بادام بوده و توصیه می‌شود به منظور افزایش کارآیی برنامه‌های اصلاحی جهت بررسی دقیق تنوع ژنتیکی، شناسایی مولکولی ارقام و تعیین روابط خویشاوندی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغاز گر OPM 4



شکل۳- الکتروفورز ژل آگارز قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغاز گر OPM 54

منابع

۱- ایمانی ع. ۱۳۷۹. اصلاح بادام (ترجمه). چاپ اول. نشرآموزش کشاورزی کرج.

۲- ثابتی ح.۱۳۸۲. جنگل ها، درختان و درختچه های ایران. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه یزد.

۳- مرادی ح.، موسوی س.ا. و عابدی ر. ۱۳۸۱. ارزیابی خصوصیات کمی و کیفی ارقام بادام (مرحله دوم)، گزارش پژوهشی طرح تحقیقاتی، مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهار محال و بختیاری.

4- Denisov V.P. 1988. Almond genetic resources in the USSR and their use in production and breeding. Acta Horticulturae, 224: 299-306.

5- Dicentra F., and Garcia J.E. 1993. Inheritance of self- compatibility in almond. In. Almond Cong, Agrigento (Abstract).

6- Fathi A., Ghareyazi, B., Haghnazari, A., Ghaffari, M.R., Pirseyedi, S.M., Kadkhodaei S., Naghavi M.R., and Mardi M. 2008. Assessment of the genetic diversity of Almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphologocal traits. Iranian Journal of Biotechnology, 6:98-106.

7- Ghazawi A.L.A., Rawashdeh I.M., and Tawaha A.R.A. 2009. Genetic relatedness among wild and cultivated almond genotypes using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences, 2: 89-96.

8- Hughes M.A. 1996. Plant molecular genetics. Addison wesley, England. 236: 15.

9- Jules J., James N.M. 1996.Fruit Breeding:Nuts. Volum III.United States of America.

10- Kadkhodaei S., Shahnazari M., Khayyam Nekouei M., Ghasemi M., Etminani H., Imani A., and Arabkariya B.A. 2011. A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among Almonds (*Prunus dulcis*). Australian Journal of Crop Science, 5(1) : 82-91.

11- Martins M., Tenreiro R., and Oliveira M. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond Cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports, 22: 71-78.
12- Mir Ali N., and Nabulsi I. 1980. Genetic diversity of Almonds (*Prunus dulcis*)using RAPD technique. Scientia Horticulturae, 1872: 1-11, 2002.
13- Schut J.W., Qi X., and Stam P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological trait in barly. TAG Theoretical and Applied Genettics, 95: 1161-1168.
14- Sharma G., and Sharma N. 2010. Molecular characterization of diversity and relationship among almond *[Prunus dulcis* Miller (D. A. Webb)] cultivars and indigenous selections. Indian Journal of Biotechnology, 9: 378-383.
15- Vavilov N.I. 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. In: IX International Horticultural Congress report and proceedings, london. 271-286.
16- Vezvaei A. 1997. Identification of Wild Species and Cultivated Almond by RAPD Markers. Ph.D. Thesis Faculty of Agriculture and Natural Resource Science, University of Adelaid. Australia.121.
17- Williams J.G.K., Kubelik A.E., Livak K.J., Rafaiski J.A., and Tingey S.C. 1990. DNA polymorphisms amplified by Arbitray Primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Resource, 18:6531-6536.
18- Xu Y., Ma R.C., Xie H., Liu J.T., and Cao M.Q. 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. Genome, 47: 1091-1104.