

مقایسه تنوع DNA کلروپلاستی برخی ژنوتیپ‌های سیب ایرانی، ارقام تجاری و برخی پایه‌های متداول

شاهین جهانگیرزاده خیای^{۱*}، ذبیح اله زمانی^۲، محمدرضا فتاحی^۳ و معصومه عاشورپور^۴

۱- استادیار پژوهشی، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

۴- کارشناس ارشد، سازمان جهاد کشاورزی گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰)

چکیده

DNA کلروپلاستی ۶۴ نمونه سیب (*Malus spp.*) (۵۴ ژنوتیپ بومی ایران، پنج رقم تجاری و پنج پایه) برای مشخص کردن هاپلوتایپ‌های آنها با کاربرد روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز-تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) بررسی شد. تقریباً ۴۳۲۰ bp از ژنوم کلروپلاست با کاربرد دو جفت آغازگر عمومی کلروپلاست و دو آنزیم برشی محدودگر (*MseI* و *EcoRI*) بررسی گردید. تمام جهش‌های شناسایی شده، حذف-اضافه در محدوده ۴۰-۱۰۰ bp بودند. ترکیب تمام جهش‌ها، شش هاپلوتایپ (H1, H2, H3, H4, H5, H6) را در نمونه‌های مورد بررسی معرفی نمود. مشخص شد که پایه سیب بومی رقم گمی آلماسی هاپلوتایپ اختصاصی خود را دارا بوده و از تمامی نمونه‌های مورد بررسی منطقه خود (آذربایجان) متفاوت است. اطلاعات تنوع DNA کلروپلاستی می‌تواند برای مطالعات فیلوژنتیکی در این گیاه به کار رود و چند شکلی‌های مشخص شده در ژنوم سیتوپلاسمی با روش PCR-RFLP می‌تواند به درک وراثت مادری سیب کمک کند.

واژگان کلیدی: آغازگر عمومی کلروپلاست، آنزیم برشی محدودگر، سیب، هاپلوتایپ، PCR-RFLP

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: sh.jahangirzadeh@areeo.ac.ir

مقدمه

سیب از جمله میوه‌هایی می‌باشد که بشر از اوایل آغاز کشاورزی اقدام به کاشت آن نموده است و با این قدمت تاریخی در قرن اخیر به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی شناخته می‌شود (Manie, 2001). به دلیل بهبود شرایط زندگی، بشر گام‌های بلندی در جهت اصلاح این محصول برداشته که منجر به معرفی ارقام زیادی با تنوع بالا به بازار مصرف گشته است (Bagheri *et al.*, 1996). اهلی کردن برای مصارف کشاورزی باعث ایجاد تغییرات شگرف تکاملی در گونه‌های این محصول شده است (Manie, 2001; Bagheri *et al.*, 1996) که این فرایند تکاملی باعث گم شدن والدین اولیه در ارقام جدید می‌شود.

در ابتدا نحوه طبقه‌بندی و گروه‌بندی ارقام بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک بود. ولی با توسعه روش‌های مبتنی بر ویژگی‌های DNA و با اطلاع از ویژگی‌های DNA کلروپلاستی (حفاظت شدگی بالا، وراثت تک‌والدی و ...) (Demesure *et al.*, 1995; Dumolin-Grivet *et al.*, 2001; Lapegue *et al.*, 1997) و توالی‌یابی کامل ژنوم کلروپلاستی که به علت حفاظت شدگی بالای آن آغازگرهای عمومی زیادی برای تکثیر قطعات این ژنوم معرفی شدند (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Grivet *et al.*, 2001)؛ بسیاری از مطالعات فیلوژنی به سوی استفاده از این مولکول ارزشمند تغییر مسیر داد.

از DNA کلروپلاستی به روش‌های متفاوتی می‌توان برای بررسی تنوع گیاهان استفاده نمود مانند روش تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Ishikawa *et al.*, 1992) یا با کاربرد ریزماهواره‌ای کلروپلاستی (Chloroplast Simple Sequence Repeat, CpSSR) (Zeinalabedini *et al.*, 2007; Heuertz *et al.*, 2004) و روش تفاوت تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (Fujii *et al.*, 2002). از روش

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) برای بررسی تنوع DNA کلروپلاستی بسیاری از گیاهان استفاده شده است (Cros *et al.*, 1998; Widmer and Mohanty *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 1999; Kucuk *et al.*, Salehi Shanjani, 2004; *et al.*, 2003; Coart *et al.*, 2006; Turkec *et al.*, 2006; 2006; Bouhadida *et al.*, 2007; Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013).

جهانگیرزاده خیایوی و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) در بررسی هاپلوتایپی ۲۶ نمونه سیب بومی ایران از منطقه آذربایجان و دو رقم تجاری و دو رقم پایه پاکوتاه کننده از روش CAPs با کاربرد ۳ جفت آغازگر عمومی کلروپلاست حدود ۴/۱۳٪ از ژنوم کلروپلاست را مورد پژوهش قرار دادند. در بررسی آنها نمونه‌ها در هشت هاپلوتایپ قرار گرفتند که تمام این هاپلو تایپ‌ها نتیجه جهش‌های حذف و اضافه بودند.

تورکچ و همکاران (Turkec *et al.*, 2006) با استفاده از نشانگرهای cpSCAR ارقام گیلاس را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که آنالیز DNA کلروپلاست روش خوبی برای طبقه بندی ارقام گیلاس می‌باشد و با مقایسه نتایج خود با دیگران گزارش نمودند که از روش cpSCAR می‌توان برای مطالعات فیلوژنتیکی استفاده نمود.

برای بررسی ارتباط بین سیب‌های وحشی اروپایی (*Malus sylvestris* (L.) Mill) و انواع اهلی شده و مطلوب آن (*M. domestica* Borkh) تنوع DNA کلروپلاستی توسط دو روش SNP و PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت که با بررسی چند شکلی‌های تمام نشانگرها ۱۶ هاپلوتایپ شناسایی شد (Coart *et al.*, 2006).

زین‌العابدینی و همکاران (Zeinalabedini *et al.*, 2007) با بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ اکسیشن بادام توسط نشانگرهای SSR، DNA هسته‌ای و کلروپلاستی گزارش نمودند SSR های هسته‌ای پلی‌مورفسم بیشتری نسبت به

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برای انجام این تحقیق ۶۴ ژنوتیپ و رقم شامل ۵۴ ژنوتیپ بومی ایران، پنج رقم تجاری سیب و ۵ نوع از پایه‌های پاکوتاه کننده رویشی متداول سیب از کلکسیون موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر (واقع در کمال آباد کرج) و کلکسیون سیب دانشگاه ارومیه تهیه گردید (جدول ۱). برگ‌های بالغ و کامل شده به عنوان نمونه جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

استخراج DNA: DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جمع آوری شده بر اساس دستور العمل معرفی شده برای نشانگر آرایه تنوع (DART P/L) توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd (<http://www.diversityarrays.com>) استخراج گردید.

تکثیر قطعات DNA کلروپلاست: DNA کلروپلاست توسط سه جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (B_1B_2 , K_1K_2 , TF) (Grivet et al., 2001) با شرایط زیر تکثیر گردید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ها در حجم ۳۰ میکرولیتر از ترکیب سه میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، یک واحد آنزیم تک DNA پلی‌مراز، دو میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (۱۰ برابر غلظت) بدون کلرید منیزیم و ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌ها در شرایط یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب برای هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه قرار گرفته و در نهایت یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید.

SSRهای کلروپلاستی نشان می‌دهند و دلیل این امر را وجود نواحی حفاظت شده بیشتری در داخل ژنوم کلروپلاست بیان نمودند.

ایشی‌کاوا و همکاران (Ishikawa et al., 1992) با استفاده از تفاوت های طول قطعات ناشی از هضم DNA میتوکندریایی و کلروپلاستی به بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم سیب و ۳ پایه آن پرداختند و بر این اساس ژنوتیپ های مورد مطالعه به ۳ گروه طبقه بندی شدند.

پاندا و همکاران (Panda et al., 2003) به بررسی ۹۶ رقم گیلاس (*Prunus avium* L.) و ۵ رقم آلبالو (*Prunus cerasus* L.) جهت مشخص کردن هاپلوتیپ های آنها توسط روش PCR-RFLP پرداختند و در این مطالعه ۹/۶ درصد ژنوم کلروپلاست بررسی شد و مشخص گردید که تمامی جهش یافته‌ها از تغییراتی در حدود ۳۰-۵۰ pb برخوردار بودند. ارقام مورد مطالعه در نهایت به سه هاپلوتیپ (H1، H2 و H3) در مورد گیلاس و یک هاپلوتیپ (H4) در مورد آلبالو طبقه بندی شدند. نتایج این تحقیقات نشان داد که پلی‌مورفیسم DNA کلروپلاستی در درک وراثت مادری در گیلاس و آلبالو نقش موثری ایفا می‌نماید و بدین طریق گیلاس کاملاً از آلبالو جدا می‌گردد. در این مطالعه مشخص شد که گیلاس والد مادری آلبالو نمی‌باشد.

کاتایاما و یوماتسو (Katayama and Uematsu, 2005) به منظور آگاهی از جنبه های تکاملی ساختار cpDNA در خانواده Rosaceae نقشه فیزیکی cpDNA هلو را طراحی کردند و ۱۷ مورد تغییرات جهشی در اکسیژن‌های بررسی شده مشاهده نمودند.

در مطالعه حاضر تنوع سیتوپلاسمی و ارتباطات بین برخی ژنوتیپ های سیب بومی ایران، ارقام تجاری و برخی پایه های پاکوتاه کننده متداول این گیاه بررسی شده است تا از این راه کمکی برای حفاظت و مدیریت ژرم پلاسما بسیار غنی سیب موجود در کشور ایران باشد.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌ها، ارقام و پایه‌های مورد بررسی، محل جمع آوری آنها و هاپلوتایپ شناسایی شده

Table 1. Name of studied genotypes, cultivars and rootstocks, their place of collection and determined haplotype

ردیف No	نام نمونه Sample Name	هاپلوتایپ Haplotype	محل جمع آوری Place of collection	ردیف No	نام نمونه Sample Name	هاپلوتایپ Haplotype	محل جمع آوری Place of collection
1	Boomi meshkin shahr	H4	Seed and plant improvement Institute	33	Shafi Abadi Chalous	H5	Seed and plant improvement Institute
2	Azarbayjan 1	H3	'	34	Shahrood 10	H6	'
3	Azarbayjan 5	H4	'	35	Shahrood 21	H6	'
4	Azarbayjan 6	H2	'	36	Golab Nemati	H3	'
5	Azarbayjan 7	H2	'	37	Golab Damavand	H1	'
6	Azarbayjan 8	H1	'	38	Golab Paize	H2	'
7	Azarbayjan 14	H4	'	39	Torbati	H4	'
8	ME 2	H2	'	40	Ferdos	H4	'
9	ME3	H1	'	41	Aroos Mashhad	H2	'
10	ME 4	H3	'	42	Aroos Ghermez	H3	'
11	ME 5	H2	'	43	Ghermez Jangali	H1	'
12	ME 6	H2	'	44	Ghermez 1	H2	'
13	Ghermez Ahar	H3	'	45	Shemirani Khati	H6	'
14	Mahali Beyghi Urmia	H1	'	46	Shemirani Dirras	H3	'
15	Ghara Yarbagh	H2	'	47	Shemirani Tabestane	H6	'
16	Khan Almasi	H2	'	48	Tabestane Zodras Oghlid	H3	'
17	Shahe Kord 8	H4	'	49	Tarhe Golabi Arak	H6	'
18	T3	H2	'	50	SBA	H3	'
19	T4	H2	'	51	HGH	H6	'
20	Boshghabi Taleghan	H2	'	52	Golden Asiai	H6	'
21	Malayer 1	H2	'	53	Golden Asiai 1	H4	'
22	Malayer 3	H1	'	54	Golden Delicious	H1	'
23	Malayer 5	H2	'	55	Red Delicious	H4	'
24	Malayer 8	H2	'	56	Gala	H5	'
25	Malayer	H1	'	57	Fuji	H5	'
26	Palestini	H3	'	58	Granny Smith	H5	'
27	Torsh Mesri	H4	'	59	Gami Almasi	H6	'
28	Torsh Damavand	H5	'	60	M7	H3	'
29	Torsh Kermanshah	H5	'	61	M9	H6	'
30	Torsh Chalous	H5	'	62	M26	H5	'
31	Torshak Chalous	H5	'	63	M4	H3	'
32	Torsh Meigon	H5	'	64	MM109	H4	'

جدول ۲- شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز، توالی آغازگرها، اندازه قطعات تکثیر شده و کیفیت تکثیر

Table 2. PCR conditions, primers sequence, size of amplified fragment and quality of amplification

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Sequence 5'-3'	دمای اتصال آغازگرها Annealing temperature (°C)	طول قطعه تکثیر شده Size of amplified fragment (bp)	درجه تکثیر* Degree of amplification
B1B2	F: TGCCTTGGTATCGTGTTCATAC R: CYTGTCTTYTTGTAGTTGGAT	55	1740	++
K1K2	F: GGGTTGCCCGGGACTCGAAC R: CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA	54.5	2580	++
TF	F: CATTACAAATGCGATGCTCT R: ATTTGAACGGTGACACGAG	57.5	-	NA

* No Amplification; ++ Perfect Amplification

* NA: عدم تکثیر، ++ تکثیر عالی

در رابطه با اندازه قطعه تکثیر شده توسط پرایمر K1K2 نیز جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh *et al.*, 2013) نتایج مشابهی را گزارش نموده‌اند. از چهار ترکیب آغازگر-آنزیم برشی بکار برده شده، ترکیبات دارای آنزیم برشی *MseI* حالت چند شکلی نشان ندادند (ترکیب *MseI*-B1B2 دارای جایگاه برش نبود ولی ترکیب *MseI*-K1K2 قطعات یکسانی تولید نمود). اما ترکیبات *EcoRI*-B1B2 و *EcoRI*-K1K2 چند شکلی‌های مناسب را ایجاد نمودند که ترکیب *B1B2-EcoRI* به علت رخ داد دو جهش حذف/اضافه تولید سه حالت چند شکلی و ترکیب *K1K2-EcoRI* به علت رخ داد یک جهش حذف/اضافه تولید دو حالت چند شکلی نمودند که دامنه این جهش‌ها ۴۰-۱۰ bp بود (جدول ۳). جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز برای نشانگر K1K2 نتایج مشابهی را از نظر جایگاه برش، حالات چندشکلی و یک شکلی، و اندازه قطعات برای سیب‌های بومی منطقه آذربایجان و ارقام و پایه‌های پاکوتاه کننده گزارش نموده‌اند. جهش‌های حذف و اضافه در ترکیبات *B1B2-EcoRI* و *K1K2-EcoRI* در شکل ۱ و حالات یک شکلی ترکیبات *MseI*-B1B2 و *MseI*-K1K2 در شکل ۲ برای تعدادی از نمونه‌ها نشان داده شده است. ترکیب تمام حالات جهش‌های شناسایی شده با یکدیگر تولید شش هاپلوتایپ متفاوت نمود (جدول ۴). شناسایی هاپلوتایپ‌ها به این صورت انجام گرفت که به قطعه بزرگتر حاصل از برش توسط آنزیم‌های برشی عنوان الگوی اصلی داده شد، حرف اول کدها از پرایمر، حرف دوم نام آنزیم برشی و حرف سوم که بصورت اندیس آمده است به قطعه حاصل از برش توسط آنزیم‌های برشی تعلق دارد. بعد از این کد گذاری نمونه‌هایی که با یکدیگر دارای کدهای مشابه بودند در یک هاپلوتایپ قرار گرفتند. از آنجایی که تمام قطعات تکثیر شده در واکنش PCR یکنواخت و هم اندازه بودند لذا با بررسی تنها یک قطعه حاصل در ترکیب *K1K2-EcoRI* یا دو حالت ترکیب *B1B2-EcoRI* می‌توان تمام حالت‌های هاپلوتایپی را مشخص نمود.

برای آگاهی از نتیجه تکثیر DNA حجم پنج میکرولیتر از محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، سه میکرولیتر بافر بارگذاری و دو میکرولیتر ماده ژل رد (Gel red Nucleic acid, Biotium, cat: 41003-3-1-10ml) در ژل ۱٪ آگارز به مدت دوساعت و نیم در ۷۰ ولت الکتروفورز و عکس‌برداری زیر نور ماورا بنفش صورت پذیرفت از سایز مارکر (Lader) ۱kb برای تخمین طول قطعات حاصل از تکثیر استفاده گردید.

هضم و برش توسط آنزیم برشی: هضم و برش قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دو آنزیم برشی محدودگر *MseI* و *EcoRI* بر اساس روش پیشنهادی شرکت تولید کننده (Fermentas, Germany) صورت گرفت به این صورت که مخلوط برش حاوی پنج میکرولیتر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، دو میکرولیتر بافر هضم (۱۰ برابر غلظت)، ۱۰ واحد آنزیم برشی در حجم نهایی ۳۱ میکرولیتر بود و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای *EcoRI* و ۶۵ درجه سانتی گراد برای *MseI* انجام پذیرفت (برای تنظیم حجم از آب مقطر بدون DNase استفاده گردید). سپس حجم ۱۰ میکرولیتر از محلول واکنش هضم، سه میکرولیتر بافر بارگذاری و دو میکرولیتر ماده ژل رد در ژل ۳٪ آگارز به مدت چهار ساعت در با ولتاژ ۷۰، الکتروفورز شدند. عکس‌برداری زیر نور ماورا بنفش صورت پذیرفت (از دو سایز مارکر ۱kb و ۵۰bp برای تخمین طول قطعات حاصل از هضم استفاده گردید).

نتایج و بحث

دو آغازگر B1B2 و K1K2 هر کدام به ترتیب قطعاتی به طول تقریبی ۲۵۸۰bp و ۱۷۴۰bp را تکثیر کردند ولی آغازگر TF تکثیری انجام نداد. جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز در ارتباط با آغازگر TF در بررسی روی سیب‌های بومی منطقه آذربایجان نتیجه مشابهی گزارش نموده‌اند که این عدم تکثیر در نمونه‌ها می‌تواند به دلیل رخ دادن جهش نقطه‌ای در محل اتصال آغازگر باشد زیرا این آغازگرها از روی گیاه تنباکو (Grivet *et al.*, 2001) طراحی شده‌اند.

جدول ۳- الگوی اصلی و متغیر (bp) در جایگاه های چند شکلی به دست آمده توسط ترکیب آغازگر- آنزیم برشی

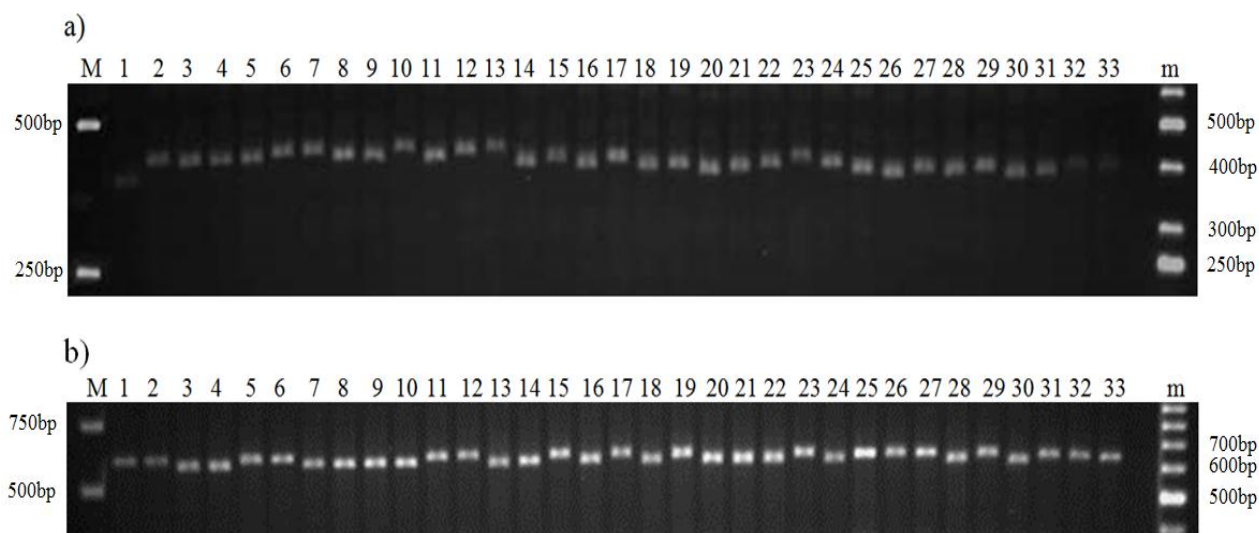
Table 3. Major patterns and variants (bp) of fragments revealed in each polymorphic site detected with different primer pair-restriction enzyme combinations

جایگاه چند شکلی Polymorphic Site	طول جهش Length of mutation	
	الگوی اصلی Major Pattern	الگوی تغییر یافته Variant
B1B2- <i>EcoRI</i>	BE _A (410bp)	BE _C (390bp) و BE _B (400bp)
K1K2- <i>EcoRI</i>	KE _A (650bp)	KE _B (610bp)

جدول ۴- فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده

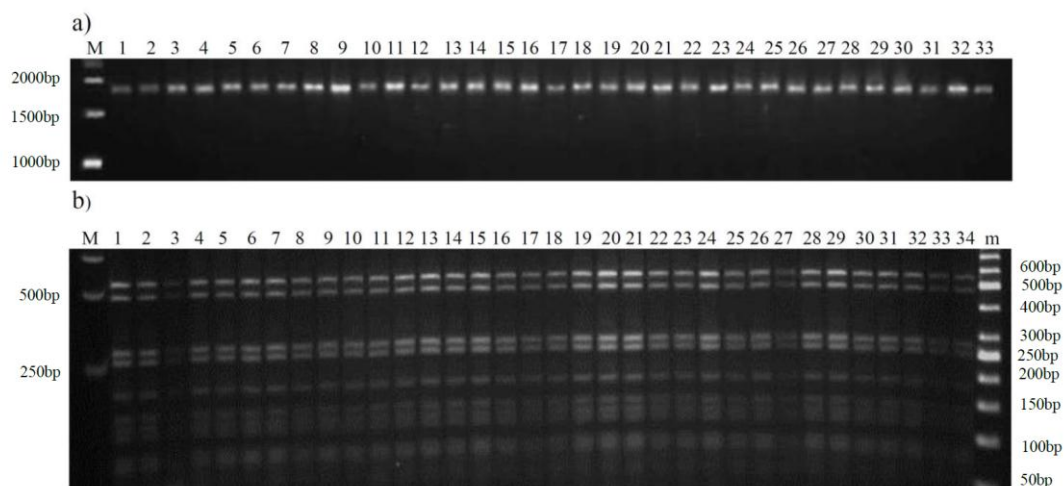
Table 4. Frequency of determined haplotype

هاپلوتایپ‌ها Haplotypes	تعداد Number	فراوانی Frequency
(BE _a KE _a) H1	8	0.125
(BE _a KE _b) H2	16	0.250
(BE _b KE _a) H3	11	0.172
(BE _b KE _b) H4	10	0.156
(BE _c KE _a) H5	10	0.156
(BE _c KE _b) H6	9	0.141
Total	64	1.000



شکل ۱- الگوهای برش در ترکیبات B₁B₂- *EcoRI* (a) و K₁K₂- *EcoRI* (b)

Figure 1. Restriction patterns in combinations of B₁B₂- *EcoRI* (a) and K₁K₂- *EcoRI* (b)



شکل ۲- الگوهای برش ترکیبات (a) B_1B_2-MseI و (b) K_1K_2-MseI

Figure 2. Restriction patterns in combinations of B_1B_2-MseI (a) and K_1K_2-MseI (b)

فراوانی (۱/۵٪) فقط شامل گمی آلماسی (پایه پاکوتاه کننده بومی ایران) می‌باشند.

ژنوتیپ‌هایی که با نام ترش شناسایی می‌گردند و دارای گستردگی زیادی در سطح کشور ایران هستند در یک هاپلوتایپ (H5) قرار گرفتند (ترش مصری از منطقه شمال غرب به صورت استثنا در هاپلوتایپ دیگری (H4) قرار گرفته است). در بررسی جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز نمونه‌های ترش منطقه البرز مرکزی (ترش دماوند و ترش چالوس؛ نمونه‌های با کد ۲۸ و ۳۰ در بررسی حاضر) در یک هاپلوتایپ قرار گرفتند. در بررسی آنها (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز ترش مصری از باقی نمونه‌ها مجزا قرار گرفت. از این نتیجه نکته‌ای که محتمل است داشتن جد مادری یکسان برای این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. اما برای بیان مطلق این نکته نیاز به بررسی‌های بیشتر با نشانگرهای دقیق‌تر مانند SSR احساس می‌گردد. پایه‌های مالینگ و مالینگ مرتون مورد بررسی نیز خود به چهار گروه تقسیم شدند که پایه MM109 در هاپلوتایپ H3، پایه‌های M7 و M4 در هاپلوتایپ H9، پایه M9 در هاپلوتایپ H5 و پایه M26 در هاپلوتایپ H6 قرار گرفتند که جدا شدن M9 و M26 از یکدیگر با نتایج اعلام شده توسط ایشیکاوا و همکاران (Ishikawa *et al.*, 1992) همخوانی دارد. در این بررسی

در بررسی جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز به این نحوه عمل شده است. DNA کلروپلاستی بطور کلی به علت حفاظت شدگی بالایی که دارد (Curtis and Clegg, 1984; Palmer, 1987) دارای توانایی کمی برای تشخیص تفاوت‌های درون گونه‌ای می‌باشد. DNA کلروپلاستی برای اولین بار برای تشخیص روابط ۶۴ ژنوتیپ سیب در ایران و مقایسه آنها با ارقام تجاری و پایه‌های متداول پاکوتاه کننده توسط روش PCR-RFLP مورد آزمون قرار گرفت. در این بررسی حدود ۴۳۲۰bp از ژنوم کلروپلاست مورد مطالعه قرار گرفت که شش هاپلوتایپ متفاوت شناسایی شد. تمام تنوع‌های مطالعه شده در اثر جهش‌های کوچک حذف/ اضافه (۱۰-۴۰bp) بودند که این نوع جهش‌ها حدود ۵۰٪ تنوع DNA کلروپلاستی را سبب می‌گردند (Gielly and Taberlet, 1994). جهانگیرزاده خیای و همکاران (Jahangirzadeh Khiavi *et al.*, 2013) نیز دامنه جهش‌های شناسایی شده در سیب‌های بومی منطقه آذربایجان را در همین محدوده (۲۰-۵۰bp) گزارش نموده‌اند.

با توجه به اطلاعات حاصل مشخص گردید که ژنوتیپ‌های ناحیه شمال غرب ایران خود به پنج گروه هاپلوتایپی تعلق دارند (H1, H2, H3, H4, H6) که هاپلوتایپ H4 با حداکثر فراوانی (۱۱٪) و H6 با حداقل

یکدیگر نزدیک بودند، نیز در یک حالت هاپلوتایپی (H4) قرار گرفتند که این حالت نشان از آن می‌باشد که این دو نمونه احتمالاً دارای جد مادری اولیه یکسان اند.

تعداد زیاد هاپلوتایپ‌هایی که در دو منطقه البرز مرکزی و دامنه زاگرس دیده شد با نتایج حاصل از مطالعات کاتو و همکاران (Kato et al. 1993) که در ۱۴ ژنوتیپ سیب ۱۱ هاپلوتایپ را شناسایی نمود، هماهنگی نشان می‌دهد و به این دلیل به تعداد بالای هاپلوتایپ‌های این دو منطقه نمی‌توان با دیده تردید نگریست.

به طور کلی، نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که مطالعه گوناگونی DNA کلروپلاستی با شکستن جامعه‌های بزرگ به جمعیت‌های کوچک و مهیا کردن شرایط برای بررسی نمونه‌ها توسط نشانگرهای دقیق‌تر مانند ریزماهواره‌ها در حجم کاری کمتر بسیار مناسب می‌باشد. بطوری که فقط کافی است که نمونه‌های داخل یک گروه هاپلوتایپی با یکدیگر مقایسه و بررسی شوند. در این ارتباط روش PCR-RFLP برای مشخص نمودن تفاوت‌های هاپلوتایپی بین نمونه‌ها یک روش بسیار مناسب می‌باشد که به راحتی هاپلوتایپ‌ها را مشخص می‌نماید. البته برای افزایش دقت تعیین هاپلوتایپ‌ها کاربرد آنزیم‌های برشی بیشتر یا تکثیر قطعات متفاوت و بررسی آنها نیز تاثیر زیادی دارند که باید مدنظر قرار گیرد.

دو رقم تجاری فوجی و گلدن دلشیز از یکدیگر جدا شدند که با نتایج ایشیکاوا و همکاران (Ishikawa et al., 1992) که این دو رقم را در یک گروه اعلام کردند تضاد دارد. گلدن دلشیز در مطالعه حاضر در گروه هاپلوتایپی H2 و فوجی در H6 قرار گرفتند که تنها تفاوت ما بین آنها رخداد حداقل یک جهش در قطعه تکثیر شده توسط آغازگر B₁B₂ می‌باشد. همچنین جدا شدن فوجی از رقم رد دلشیز تاییدی بر والد پدری بودن رد دلشیز می‌باشد، زیرا رقم فوجی حاصل تلاقی Delicious × Rollosjanet بوده که در مطالعات ایشیکاوا و همکاران (Ishikawa et al., 1992) نیز مشخص گردیده است. ژنوتیپ‌های منطقه البرز مرکزی (دماوند، چالوس، شهریار، شاهرود و طالقان) در شش هاپلوتایپ دیده شدند که هاپلوتایپ H5 حداکثر تعداد نمونه را تحت پوشش قرار داد (۹/۳۷٪) که اکثر این نمونه‌ها از نواحی شمیرانات بودند. هاپلوتایپ‌های H2 و H3 نیز حداقل پوشش را با فراوانی ۳/۱۲٪ (هر کدام دو نمونه) داشتند. ژنوتیپ‌های منطقه مرکز- جنوب (دامنه زاگرس) نیز هر شش حالت هاپلوتایپی را نشان دادند که در این منطقه هاپلوتایپ H1 حداکثر فراوانی (۶/۲۵٪) و هاپلوتایپ‌های H5 و H6 هر کدام با یک نمونه حداقل فراوانی را داشتند. دو نمونه SBA از اصفهان و تابستان زودرس اقلید (دو منطقه‌ای که کشت و کار سیب در آنها محدود است) انتخاب شده بودند و از نظر بعد مسافتی به

References

- Bagheri, A., Kochaki, A. and Zand, A. (1996). *Plant Breeding in Sustainable Agriculture*. Mashhad University Jihad publications. Mashhad, IR (In Persian).
- Bouhadida, M., Martín, J.P., Eremin, G., Pinochet, J., Moreno, M.Á. and Gogorcena, Y. (2007). Chloroplast DNA diversity in *Prunus* and its implication on genetic relationships. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **132**(5): 670-679.
- Coart, E., Van Glabeke, S., De loose, M., Larsen, A.S. and Roldan-ruiz, I. (2006). Chloroplast diversity in the genus *Malus*: New insights into the relationship between the European wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology*, **15**: 2171-2182.
- Cros, J., Combes, M.C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., Charrier, A. and Lashermes, P. (1998). Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**(1): 109-117.
- Curtis, S.E. and Clegg, M.T. (1984). Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **1**: 291-301.
- Demesure, B., Sodji, N. and Petit, R.J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**: 129-131.

- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M.H. and Petit, R.J.** (1997). An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, **6**: 393-397.
- Fujii, N., Tomaru, N., Okuyama, K., Koike, T., Mikami, T., and Ueda, K.** (2002). Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus scretata* (Fagaceae) in Japan. *Plant Systematics Evolution*, **232(1-2)**: 21-33.
- Gielly, L. and Taberlet, P.** (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies. Non-coding vs. *Rbcl* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **11**: 769-777.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendraminà, G.G. and Petit, R.J.** (2001). Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, **1**: 345-349.
- Heuertz, M., Fineschi, S., Anzidei, M., Pastorelli, R., Salvini, D., Paule, L., Frascaria-Lacoste, N., Hardy, O.J., Vekemans, X. and Vendramin, G.G.** (2004). Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology*, **13**: 3437-3452.
- Ishikawa, S., Kato, S., Imakawa, S., Mikami, T. and Shimamoto, Y.** (1992). Organel DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**: 963-967.
- Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Zamani, Z., Mardi, M. and Fatahi Moghdam, M.** (2013). Evaluation of Chloroplast relationship between some apple genotype from Azerbaijan of Iran and their comparison with other local genotypes, cultivars and rootstocks. *African Journal of Agricultural Research*, **8(1)**: 106-112.
- Katayama, H. and Uematsu, C.** (2005). Structural analysis of chloroplast DNA in *Prunus* (Rosaceae): Evolution, genetic diversity and unequal mutations. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**:1430-1439.
- Kato, S., Ishikawa, S., Imakawa, S., Komori, S., Mikami, T. and Shimamoto, Y.** (1993). Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Malus* species. *Plant Breeding*, **111**: 162- 165.
- Kucuk, O., Gulbitti-Onarici, S. and Sumer, S.** (2006). RFLP of analyses of an intergenic spacer region of chloroplast DNA in some wild wheat species. *African Journal of Biotechnology*, **5(22)**: 2058-2061.
- Manie, A.** (2001). *Apple and its Culture*. Technical Publications Companies in Iran. Tehran, IR (In Persian).
- Matsumoto, S., Wakita, H. and Soejima, J.** (1997). Chloroplast DNA probes as an aid in the molecular classification of *Malus* species. *Scientia Horticulturae*, **70**: 81-86.
- Mohanty, A., Martín, J.P. and Aguinagalde, I.** (2001). Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 112-117.
- Palmer, J.D.** (1987). Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *American Society of Naturalists*, **130**: S6-S29.
- Panda, S., Pedro Martín, J. and Aguinagle, I.** (2003). Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50**: 489-495.
- Salehi Shanjani, P.** (2004). Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus orrientalis*Lipsky in Iran. *Journal of Iran Biology*, **17(2)**: 117-126 (In Persian).
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J.** (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**: 1105-1109.
- Turkec, A., Sayar, M. and Heinze, B.** (2006). Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 1635-1641.
- Widmer, A. and Baltisberger, M.** (1999). Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): Haplotype relationships and population structure. *Molecular Ecology*, **8**: 1405-1415.
- Zeinalabedini, M., Mahjourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Toorchi, M., Dicenta, F. and Martinez-Gomez, P.** (2007). Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **5(3&4)**: 242-247.

Comparison of Chloroplast DNA Diversity in Some Iranian Apple Genotypes, Commercial Cultivars and Rootstocks

Shahin Jahangirzadeh Khiavi^{1,*}, Zabihollah Zamani², Mohamadreza Fatahi²
and Masoumeh Ashourpour³

- 1- Assistant Professor, Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran
- 2- Professor, Department of Horticulture science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Horticulture science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
- 4- M.S of Organization of Agriculture - Guilan branch, Rasht, Iran

(Received: July 5, 2017 – Accepted: March 11, 2018)

Abstract

The chloroplastic DNA of 64 accessions of apple (*Malus* spp.) (54 Iranian genotypes, five commercial cultivars and five rootstocks) were analyzed to reveal their haplotypes by using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method. Approximately 4320 bp of the chloroplast genome was analyzed, by using two chloroplast universal primer pairs and two restriction enzymes (*EcoRI* and *MseI*). All the mutations detected were insertion-deletions been in the range between 10-40 bp. The combination of all the mutations resulted to six haplotypes (H1, H2, H3, H4, H5 and H6) in the studied apple accessions. It was defined that the Iranian apple rootstock 'Gami-Almasi' had a specific haplotype form all the other studied accessions. It was approved that cpDNA diversity data can be considered for phylogenetic studies in this plant and the polymorphism determined in cytoplasmic genome by PCR-RFLP method can help to understand the maternal inheritance in apple.

Keywords: Chloroplast universal primer, Restriction enzyme, *Malus Spp*, Haplotype, PCR-RFLP

* Corresponding Author, E-mail: sh.jahangirzadeh@ areeo.ac.ir