



دانشگاه گسترده علمی و فناوری

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و پنجم، شماره دوم، ۱۳۹۷

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2018.9335.2202

مطالعه تنوع کلروپلاستی برخی ژنوتیپ‌های سیب شمال غرب ایران در مقایسه با برخی ژنوتیپ‌های البرز مرکزی، ارقام و پایه‌های تجاری

*شاهین جهانگیرزاده خیای^۱، معصومه عاشورپور^۲ و شبناز کشاورزی^۳

^۱ پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

^۲ جهاد کشاورزی شهرستان رشت، گروه شیمی آلی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: سیب یکی از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای مناطق معتدله می‌باشد. کشت و کار این محصول از زمان‌های بسیار دور در ایران انجام می‌شد و حتی برخی منابع، ایران را یکی از زادگاه‌های این گیاه نامیده‌اند. جمع‌آوری و ارزیابی ذخایر ژرمپلاسم داخلی و خارجی، اساسی‌ترین مرحله در برنامه‌های به‌نژادی درختان میوه می‌باشد. اصلاح درختان سیب، امروزه با توجه به اهمیت تغذیه سالم و تولید پایدار میوه با کیفیت بیش‌تر سیب، بر پایه ژن‌های مقاومت می‌باشد. با توجه به این‌که اکثر ارقام سیب به‌صورت رویشی تکثیر می‌شوند، تنوع ژنتیکی کمی مورد انتظار می‌باشد؛ اما در مورد ژنوتیپ‌های بومی که حاصل انتخاب ویژگی‌های برتر می‌باشند، این تنوع مورد انتظار افزایش می‌یابد زیرا این ژنوتیپ‌ها اکثراً نتاج بذری می‌باشند. در این پژوهش سعی شده است نسبت به بررسی تنوع ژنتیکی اندامکی برخی ژنوتیپ‌های بومی سیب مربوط به مناطق کاشت عمده این محصول در شمال غرب ایران و البرز مرکزی و مقایسه آن‌ها با دو رقم تجاری رد دلشیز و فوجی و دو پایه M4 و M9، اقدام گردد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور انجام این پژوهش، نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و کاملاً توسعه‌یافته صورت گرفت و DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد. برای بررسی تنوع اندامکی، ۳۰ نمونه سیب، چهار جفت آغازگر اختصاصی برای ژنوم کلروپلاست (K_1K_2 ، CS، HK و TF) و دو آنزیم برشی (*EcoRI* و *MseI*) در روش چندشکلی شکافتن قطعات تکثیر شده (CAP) به‌کار برده شد. برنامه‌های NTSYS و POPGENE برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: از بین این چهار نشانگر به‌کار برده شده، سه نشانگر دارای قدرت تکثیر مناسب بودند که در کل، ۴/۱۳ درصد کل ژنوم کلروپلاست سیب را تکثیر نمودند. با بررسی هاپلوتایپی نمونه‌ها، در مجموع هشت هاپلوتایپ شناسایی شد که هاپلوتایپ H4 با پوشش ۲۶/۶۶ درصد از کل نمونه‌ها، بزرگ‌ترین گروه بود. تمام این گروه‌بندی‌ها به‌دلیل رخ دادن جهش‌های حذف و اضافه ایجاد شده بود. حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین‌جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین‌جمعیتی (Gstc) به‌ترتیب ۰/۴۶۷، ۰/۴۴۵۱ و ۰/۰۴۸۱ به‌دست آمد.

* مسئول مکاتبه: shjahangirzadeh@yahoo.com

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که هیچ‌گونه ساختار ژنتیکی مدونی مابین نمونه‌های مناطق مورد بررسی وجود ندارد؛ همچنین این نتایج تأیید نمودند که امکان کاربرد روش چندشکلی شکافتن قطعات تکثیرشده برای شناسایی ژنوتیپ‌های سیب و ارقام آن وجود دارد. با استفاده از این نشانگرها، تنوع ژنتیکی در DNA اندامکی بین ژنوتیپ‌های سیب مشاهده شد اما این تنوع به‌گونه‌ای نبود که قادر باشد ژنوتیپ‌های مناطق مختلف را از هم منفک نماید. به‌نظر می‌رسد شاید با افزایش تعداد آغازگرها و آنزیم‌های برشی، بتوان به این تفکیک دست یافت. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های سیب بومی ایران به‌دلیل آن‌که اکثراً در گذشته به‌صورت جنسی تکثیر شده‌اند، دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم برشی، پرایمر عمومی کلروپلاست، چندشکلی شکافتن قطعات تکثیرشده (CAP)، هاپلوتایپ، *Malus*

مقدمه

سیب اهلی یکی از مهم‌ترین محصولات میوه نقاط سرد و معتدل جهان است (۳۳). خانواده *Rosaceae* شامل جنس *Malus* (سیب) با حدود ۵۵ گونه متفاوت است که این‌ها به گروه‌های بالاتر از جنس (بخش و سری) و بین‌گونه‌ای، گروه‌بندی می‌گردند و هر گونه می‌تواند خود به گروه‌های کوچک‌تر بین‌گونه‌ای یا کالتیوارها تقسیم گردد (۲۵). بخشی از مشکلات گیاهشناسی مربوط به سیب (*Malus*) به‌علت ارتباط بشر با گیاه مذکور است، جایی که تشخیص کالتیوارها و گونه‌های وحشی نقطه‌ای تاریک و مبهم می‌گردد که این امر، بدین‌دلیل شناسایی گروه‌بندی‌های مجزا مشکل می‌گردد (۱۷) و این مشکل از طریق پی بردن به روابط مادری بین ارقام، قابل‌حل است.

اطلاعات موجود در دی.ان.ا. کلروپلاست گیاهان برای مطالعات فیلوژنی و ژنتیک جمعیتی به‌علت عدم پیروی از قوانین وراثت مندلی این ژنوم بسیار مورد علاقه است (۲۷). در بسیاری از گیاهان (۱۸) و اکثر نهان‌دانگان، مشاهده شده است که این اندامک از مادر به ارث می‌رسد با حدود یک‌سوم درجه وراثت از طریق دو والد (۱۳، ۲۶ و ۳۱). این مولکول دی.ان.ا. (cpDNA) به‌شدت حالت حفاظت‌شدگی در ساختار را از خود نشان می‌دهد (۲۲) بنابراین جفت

پرایمرهای زیادی برای تکثیر برخی نواحی این مولکول طراحی شده است (۱، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱، ۲۸ و ۳۰).

نشانگرهای سیتوپلاسمی (عمدتاً دی.ان.ا. کلروپلاستی) در بسیاری از مطالعات تکامل نژادی مورد استفاده قرار گرفته است اما استفاده مشترک از هر دو نشانگر (دی.ان.ا. کلروپلاستی و دی.ان.ا. میتوکندریایی) در مطالعات جمعیت در گیاهانی که در آن هر دو اندامک‌های دی.ان.ا. از همان پدر و مادر به ارث می‌روند، غیرمعمول است (با چند استثنا، به‌عنوان مثال مطالعه انجام شده توسط دومولین-لاپقیو^۱ و همکاران (۶)).

آغازگرهای عمومی طراحی شده از DNA کلروپلاست با اکثر مناطق به‌شدت حفاظت‌شده کدکننده ژنوم کلروپلاست مطابقت دارد، و در مجاورت نواحی غیرکدکننده بسیار متغیر قرار گرفته است (۶) و این آغازگرها برای تشخیص تنوع ژنتیکی، نحوه توارث، بررسی‌های فیلوژنی (۱۰)، رابطه جغرافیایی و راه‌های تکامل گونه‌ها بعد از عصر یخبندان (۱۱)، در شناسایی دورگه‌ها در ترکیب با نشانگر دی.ان.ا. هسته‌ای (۱۱) و برای مطالعه گونه‌های نزدیک مرتبط (۱۰) مورد استفاده قرار می‌گیرند. هضم این نواحی تکثیرشده ژنوم در بسیاری از بررسی‌های تنوع دی.ان.ا. کلروپلاست برای

1- Dumolin-Lapegue

شده توسط دیولومین - لاپیو و همکاران (۶) تکثیر و توسط دو آنزیم برشی (*Hinf* و *Taq I*) تحت هضم قرار گرفت. تمام جهش‌های شناسایی شده جزء جهش‌های حذف/ اضافه و در حدود ۳۰-۵ bp بودند. نتایج ترکیب تمام جهش‌ها سه هاپلوتایپ (H1, H2 و H3) را در گیلان‌ها و تنها یک هاپلوتایپ (H4) را در پنج آلبالوی مورد بررسی معرفی نمود. همچنین این پژوهش نشان داد که تعیین چندشکلی DNA کلروپلاستی توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) به فهم بهتر موضوع وراثت مادری ژنوم کلروپلاست در گیلان کمک می‌کند و کاملاً آلبالو را از گیلان جدا کرده و اعلام می‌کند که *P. avium* گونه مادری *P. cerasus* نیست.

کوارت و همکاران (۳) برای بررسی ارتباط بین سیب‌های وحشی اروپایی (*Malus sylvestris* (L.) Mill) و انواع اهلی شده و مطلوب آن (*M. domestica*) و انواع اهلی شده و مطلوب آن (Borkh) تنوع DNA کلروپلاستی را در ۶۳۴ اکسیشن وحشی و ۴۲۲ اکسیشن اهلی از مناطق متفاوت اروپا بررسی کردند. تنوع DNA کلروپلاستی توسط دو روش چندشکلی تفاوت تک‌نوکلئوتیدی برای ژن *matK* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) برای سایر نواحی ژنوم کلروپلاست مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی چندشکلی‌های تمام نشانگرها ۱۶ هاپلوتایپ شناسایی شد که هشت هاپلوتایپ بین گونه‌ها مشترک بودند، سه هاپلوتایپ (*Cpht1*, *Cpht10* و *Cpht14*) بیش از ۹۵ درصد اکسیشن‌های هر گونه را شامل می‌گردید و ۱۱ هاپلوتایپ فقط در سری *Malus* دو هاپلوتایپ (*Cpht2* و *Cpht3*) فقط در سری *Baccata* و یک هاپلوتایپ (*Cpht6*) در سری *Kansuenses* مشاهده گردید و هاپلوتایپ *Cpht4* فقط در *M. sylvestris*

فهمیدن و درک روابط فیلوژنی و جمعیتی در خانواده *Rosaceae* به‌کار رفته است (۲، ۳، ۱۹، ۲۰، ۲۳ و ۲۹).

موهانتی و همکاران (۱۹) از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (پی.سی.آر- آ.اف.ال.پی) برای بررسی تنوع DNA کلروپلاستی جمعیت وحشی *Prunus avium* از پنج جنگل درختان خزان‌دار اروپا و برخی ارقام آن استفاده کردند. در این مطالعه آن‌ها از پنج جفت پرایمر تخصصی کلروپلاست (*CD*, *HK*, *K1K2*)، *trpCC*, *VL* معرفی شده توسط دیولومین- لاپیو و همکاران (۶) استفاده کردند و هر قطعه تکثیرشده را توسط سه آنزیم برشی (*Hinf I*, *Taq I* و *Alu I*) مورد هضم قرار دادند. در این مطالعه ۱۰/۸ درصد کل ژنوم کلروپلاست مورد بررسی قرار گرفت که هشت جهش حذف/ اضافه که در ۱۲ هاپلوتایپ توزیع شده بود شناسایی گردید که شش هاپلوتایپ (H1, H2, H3, H4, H5 و H6) در جمعیت وحشی و هشت هاپلوتایپ (H2, H6, H7, H8, H9, H10, H11 و H12) در کالتیوارها مشاهده شدند. دو هاپلوتایپ H2 و H6 در هر دو جمعیت مشترک بودند و هاپلوتایپ H2 فراوان‌ترین هاپلوتایپ در بین جمعیت وحشی بود. نتیجه کلی حاصل از این پژوهش و بررسی امکان کار برد روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) را برای شناسایی ارقام گیلان پیشنهاد می‌کند.

پاندا و همکاران (۲۳) DNA کلروپلاستی ۹۶ رقم گیلان (*Prunus avium*) و پنج رقم آلبالو (*P. cerasus*) را جهت مشخص کردن هاپلوتایپ آن‌ها توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) بررسی کردند. در این مطالعه ۹/۶ درصد ژنوم کلروپلاست توسط شش جفت پرایمر عمومی کلروپلاست معرفی

گل‌عین و همکاران (۹) در بررسی روابط فیلوژنتیکی بکرایی (*Citrus sp.*) که یک بیوتیپ طبیعی می‌باشد از روش SSR هسته و PCR-RFLP برای کلروپلاست استفاده نمودند که دندروگرام حاصل از تجزیه SSR شباهتی حدود ۰/۸۷ و ۰/۶۵۰ بین بکرایی و راف لمون (*Citrus jambhiri Lush.*) و لیمو شیرین (*Citrus limettioides Tan.*) به ترتیب نشان داد. نتایج بررسی PCR-RFLP نیز نشان دادند که والد مادری راف لمون می‌باشد زیرا تمام باندهای مشاهده شده در بکرایی در این نمونه نیز مشاهده گردید. بنابراین آن‌ها بیان نمودند که بین بکرایی و راف لمون قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و به احتمال زیاد این لیمو والد مادری بکرایی باشد.

جهانگیرزاده و کشاورزی (۱۵) با کاربرد روش PBR ژنوم کلروپلاست برای ارزیابی ساختار جمعیتی در برخی ژنوتیپ‌های سیب بومی ایران و سه رقم تجاری گزارش نمودند که جهش‌های مشخص شده توسط ترکیب آغازگر- آنزیم برشی جهش‌های حذف- اضافه در محدوده ۲۰-۵۰ bp می‌باشند. تنوع ژنتیکی سیتوپلاسمی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gstc) به ترتیب ۰/۴۱۰، ۰/۳۲۲ و ۰/۲۱۴ به دست آمدند. دندروگرام حاصل از بررسی جمعیت‌ها، ارقام تجاری را با در شباهت ژنتیکی ۰/۸۰ از ژنوتیپ‌های بومی ایران تفکیک کرد. بیش‌ترین شباهت نیز بین دو جمعیت آذربایجان و البرز مرکزی (۰/۹۹) مشاهده شد. زین‌العابدینی و همکاران (۳۲) با بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ اکسیشن بادام توسط نشانگرهای SSR، DNA هسته‌ای و کلروپلاستی گزارش نمودند که SSRهای هسته‌ای چندشکلی بیش‌تری نسبت به SSRهای کلروپلاستی نشان می‌دهند و دلیل این امر را وجود نواحی حفاظت‌شده بیش‌تری در داخل ژنوم کلروپلاست بیان نمودند.

و Cph8 فقط در *M. domestica* مشاهده می‌گردید. در ضمن از تمام درختان مورد بررسی *M. sieversii* فقط یکی (Cpht14) از سه هاپلوتایپ اصلی مشترک با *M. domestica* (Cpht1) و *M. sylvestris* (Cpht10 و Cpht11) را نشان دادند که این نتیجه باعث تعجب می‌گردد، زمانی که این نکته مدنظر باشد که *M. sieversii* به‌عنوان جد مادری سیب‌های اهلی مطرح است که این خود باعث طرح بحث جدیدی درباره زادگاه *M. domestica* می‌گردد.

جهانگیرزاده و همکاران (۱۶) ژنوم کلروپلاستی ۲۰ نمونه لایم و لمون را برای مشخص کردن هاپلوتایپ‌های آن‌ها با کاربرد ۱۱ آغازگر cpSSR بررسی کردند این آغازگرها در مجموع ۲۱ نوار را تکثیر کردند که ۱۸ نوار چند شکل بودند. تمام جهش‌های شناسایی شده در بررسی آن‌ها جزء جهش‌های حذف- اضافه بودند. آن‌ها با توجه به نوارهای تکثیری شش هاپلوتایپ از ۵۷۶ هاپلوتایپ ممکن برای نمونه‌ها معرفی نمودند. آن‌ها در نهایت بیان کردند که اطلاعات تنوع DNA کلروپلاستی می‌تواند برای مطالعات فیلوژنتیکی در این گیاه به‌کار رود و چندشکلی‌های مشخص شده در ژنوم سیتوپلاسمی می‌تواند به درک وراثت مادری در مرکبات به‌خصوص لیموها کمک کند.

جهانگیرزاده و همکاران (۱۴) در بررسی تنوع ژنتیکی اندامک کلروپلاست در سیب‌های آذربایجان از روش PCR-RFLP با کاربرد سه آغازگر عمومی کلروپلاست و دو آنزیم برشی استفاده نمودند و توانستند هشت هاپلوتایپ را شناسایی نمایند. تمام جهش‌هایی که باعث ایجاد این هاپلوتایپ‌ها شدند جزء جهش‌های حذف و اضافه در محدوده ۲۰-۵۰ bp بودند.

در مطالعه حاضر، برای اولین بار روش چندشکلی شکافتن قطعات تکثیرشده (CAP) بر پایه تجزیه دی.ان.ا. کلوپلاست برای شناسایی روابط مادری بین برخی ژنوتیپ‌های ایرانی سیب (تنوع سیتوپلاسمی) به کار رفته است و برای روشن شدن بهتر این ارتباطها، نتایج حاصل با برخی ارقام و پایه‌ها مقایسه شده‌اند.

در مطالعه حاضر، برای اولین بار روش چندشکلی شکافتن قطعات تکثیرشده (CAP) بر پایه تجزیه دی.ان.ا. کلوپلاست برای شناسایی روابط مادری بین برخی ژنوتیپ‌های ایرانی سیب (تنوع سیتوپلاسمی) به کار رفته است و برای روشن شدن بهتر این ارتباطها، نتایج حاصل با برخی ارقام و پایه‌ها مقایسه شده‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور انجام این پژوهش، ۳۰ نمونه سیب از کلکسیون مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌ها و ارقام سیب مورد بررسی، محل نمونه‌گیری، زادگاه آن‌ها و گروه‌های هاپلوتایپی.

Table 1. Names of studied apple genotypes and varieties, location of sampling, their birthplace and groups of haplotypes.

منطقه جغرافیایی نمونه‌ها Samples Geographical area	محل جمع‌آوری Sampling Location	نام نمونه Sample Name	هاپلوتایپ haplotype	ردیف Row
شمال غربی (North West)	مؤسسه تحقیقات نهال و بذر (Seed and Plant Improvement Institute)	بومی مشکین‌شهر (Bomi Meshkin Shahr)	H1	1
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۱ (Azerbaijan1)	H2	2
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۴ (Azerbaijan4)	H3	3
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۶ (Azerbaijan6)	H3	4
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۷ (Azerbaijan7)	H3	5
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۸ (Azerbaijan8)	H2	6
شمال غربی (North West)	"	آذربایجان ۱۴ (Azerbaijan14)	H4	7
شمال غربی (North West)	"	ME 2	H3	8
شمال غربی (North West)	"	ME3	H5	9
شمال غربی (North West)	"	ME4	H2	10
شمال غربی (North West)	"	ME5	H4	11
شمال غربی (North West)	"	ME6	H4	12

ادامه جدول ۱-۱

Continue Table 1.

منطقه جغرافیایی نمونه‌ها Samples Geographical area	محل جمع‌آوری Sampling Location	نام نمونه Sample Name	هاپلوتاایپ haplotype	ردیف Row
شمال‌غربی (North West)	"	قرمز اهر (Ghermez Ahar)	H6	13
شمال‌غربی (North West)	"	محل‌ی بیگی ارومیه (Mahali Beygi Urmia)	H2	14
شمال‌غربی (North West)	"	قره یارپاق (Ghareh Yarpagh)	H4	15
شمال‌غربی (North West)	"	خان الماسی (Khan Almasi)	H4	16
شمال‌غربی (North West)	"	فلسطینی (Palestinee)	H7	17
شمال‌غربی (North West)	"	ترش مصری (Torshe Mesri)	H4	18
شمال‌غربی (North West)	دانشگاه ارومیه Urmia University	گمی آلماسی (Gami Almasi)	H8	19
طالقان (Taleqan)	مؤسسه تحقیقات نهال و بذر (Seed and Plant Improvement Institute)	T3	H4	20
طالقان (Taleqan)	"	بشقاب‌ی طالقان (Boshqabi Taleghan)	H4	21
دماوند (Damavand)	"	ترش دماوند (Torsh Damavand)	H7	22
چالوس (Chalous)	"	ترش چالوس (Torsh Chalous)	H7	23
شمیران (Shemiran)	"	ترش میگون (Torsh Meigon)	H2	24
دماوند (Damavand)	"	گلاب دماوند (Golab Damavand)	H2	25
شمیران (Shemiran)	"	شمیرانی تابستانه (Shemiranie Tabestaneh)	H8	26
رقم تجاری (Commercial cultivar)	"	رد دلیشز (Red Delicious)	H8	27
رقم تجاری (Commercial cultivar)	"	فوجی (Fuji)	H5	28
پایه تجاری (Commercial rootstock)	دانشگاه ارومیه (Urmia University)	M9	H8	29
پایه تجاری (Commercial rootstock)	دانشگاه ارومیه (Urmia University)	M4	H5	30

بهرتر نمونه‌ها به مدت نیم ساعت مخلوط شدند. نمونه‌ها سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شده و فاز بالایی به تیوپ‌های جدید منتقل شدند. بعد از این مرحله به حجم برابر، ایزوپروپانل سرد اضافه شده و تیوپ‌ها سرو ته شدند تا رشته‌های دی.ان.ا. قابل رویت شوند. برای رسوب کردن بهتر رشته‌های دی.ان.ا. مجدداً سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰g به مدت نیم ساعت انجام گرفت، روشناور حذف گردید و رسوبات دی.ان.ا. توسط الکل اتانول ۷۰ درصد شسته شده و اتانول دور ریخته شد. رسوبات دی.ان.ا. خشک گردیده و در ۲۵۰µl بافر (1X) TE (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) مجدداً حل شدند.

استخراج دی.ان.ا. دی.ان.ا. ژنومی از نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری شده بر اساس دستورالعمل معرفی شده برای نشانگر آرایه تنوع (دارت) توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DART P/L) (۱۲) استخراج گردید.

مقدار مورد نیاز (حدود ۰/۲g) از مواد گیاهی که توسط هاون چینی پودر با کاربرد نیتروژن مایع به خوبی پودر گردیده بود به تیوپ‌های ۲ml منتقل گردید و ۱ml از بافر fresh buffer به آن اضافه شد (جدول‌های ۲ و ۳). نمونه‌ها پس از قرارگیری به مدت یک ساعت در دمای ۶۵°C به مدت پنج دقیقه بر روی یخ خنک گردیدند. پس از افزودن ۱ml از ترکیب کلروفورم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) جهت شستشوی

جدول ۲- استوک بافرهای استخراج و استوک بافر هضم.

Table 2. Extraction buffers and lysis buffer stocks.

استوک بافر استخراج		استوک بافر هضم	
Extraction buffer stock		Lysis buffer stock	
Sorbitol	0.35 M	Tris HCl pH 8.0	0.2 M
TrisHCl pH 8.0	0.1 M	EDTA pH 8.0	0.05 M
EDTA pH 8.0	5 mM	NaCl	2M
		CTAB	2% (w/v)

هر دو بافر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر توسط آب مقطر رسانده شوند.

Both buffers should be volumed to 500 ml with distilled water.

جدول ۳- چگونگی تهیه بافر تازه.

Table 3. Preparation of fresh buffer.

مواد شیمیایی	مقدار مورد نیاز	مثال برای ۳۰ میلی لیتر
Chemical materials	Required amount	Example for 30 ml
Extraction Buffer	مقدار لازم براساس تعداد نمونه The necessary amount based on the number of samples	12.5 ml
Lysis Buffer	مقدار لازم براساس تعداد نمونه The necessary amount based on the number of samples	12.5 ml
سدیم دو دسیل سولفات Sodium dodecyl sulfate	٪0.5 (v/w)	0.15 g
پلی وینیل پیرولیدون Polyvinylpyrrolidone	٪2 (v/w)	0.6 g
سارکوسیل (۵ درصد) Sarcosyl (5%)	0.4 (v/v)	5 ml

ممکن است این بافر به دو فاز جدا تقسیم گردد. بنابراین بافر را قبل از مصرف و افزودن به نمونه‌ها تا ۶۵°C گرم کرده و تکان می‌دهیم.

The buffer may be divided into two separate phases; therefore it should be heated till 65 °C and shaken before being used.

این بافر را فقط برای مدت محدودی (۳-۴ روز) می‌توان نگهداری نمود و بعد از آن، کارایی خود را از دست می‌دهد.

The buffer could be stored only for a limited period (4-3 days) and then it will lose its effectiveness.

جدول ۴- شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، اندازه قطعات تکثیرشده و کیفیت تکثیر با کاربرد آغازگرهای عمومی دی.ان.ا. کلروپلاستی در *Malus spp*.

Table 4. Terms of polymerase chain reaction, the size of amplified fragments and quality of amplification using general primers of chloroplast DNA in *Malus spp*.

نام آغازگر Primers Name	شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز		اندازه تقریبی قطعه تکثیرشده در سیب (bp)	اندازه قطعه تکثیری مشابه در گیاه تنباکو** (bp)	درجه تکثیر*
	دمای اتصال Annealing Temperature	مدت زمان بسط Amplification period	Approximate size of amplified fragment in apple (bp)	size of similar amplified fragment in tobacco plants (bp)	Degree of Amplification
HK	56	2;30	1650	1831	++
K ₁ K ₂	54.5	3	2470	2585	++
CS	56.5	2	1800	1611	++
TF	58.5	2	-	1754	NA

NA: no amplification, ++: high amplification

* NA: عدم تکثیر، ++ تکثیر عالی

According to Grivet et al., 2001

** بر اساس اعلام گریوت و همکاران (۲۰۰۱)

قرار گرفت و در نهایت یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید.

هضم و برش توسط آنزیم برشی: هضم و برش قطعات تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دو آنزیم برشی محدودگر *MseI* و *EcoRI* بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده (Fermentas) صورت گرفت به این صورت که مخلوط برش حاوی پنج میکرولیتر محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، 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 سانتی‌گراد برای *EcoRI* و ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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^۱ در ژل ۳ درصد آگارز به مدت چهار ساعت در ۷۰ ولت الکتروفورز شدند و

تکثیر قطعات دی.ان.ا. کلروپلاست: دی.ان.ا. استخراج شده توسط چهار جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (HK، CS، TF) با شرایط زیر تکثیر گردید (۶ و ۱۰). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ها در حجم ۳۰ میکرولیتر از ترکیب دو میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، یک واحد آنزیم تک دی.ان.ا. پلی‌مراز (recombinant, Fermentas, Canada)، سه میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (۱۰ برابر غلظت) بدون کلرید منیزیم، ۱۰ نانوگرم از هر آغازگر (رفت و برگشت) و ۳۰ نانوگرم دی.ان.ا. ژنومی از هر نمونه تهیه شد. پس از تهیه حجم‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌ها در شرایط یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب برای هر آغازگر (جدول ۴) به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت لازم بسته به طول قطعه تکثیری (جدول ۴)

قطعات حاصل از هضم توسط آنزیم برشی *BamHI* برای رقم‌های گل‌دندلیشنز، مکین‌تاش و ردلیشنز به ترتیب $143/7 \text{ kb}$ و $143/35 \text{ kb}$ ، $143/4 \text{ kb}$ شده است (۱۳) که در این بررسی ژنوم کلروپلاست میانگین مقادیر فوق یعنی $143/48 \text{ kb}$ در نظر گرفته شد) مورد بررسی قرار گرفت. از ترکیب سه قطعه تکثیر شده و آنزیم برشی (*EcoRI* و *MseI*) شش حالت متفاوت ممکن می‌باشد که ترکیبات *CS-MseI* و *K₁K₂-MseI* برش خوردند ولی حالت یک شکلی نشان دادند و قطعه تکثیری با پرایمر *CS* هیچ‌گونه جایگاه برشی برای آنزیم *EcoRI* نداشت. جهانگیرزاده و همکاران (۱۴) و جهانگیرزاده و کشاورزی (۱۵) نیز با کاربرد همین پرایمرها و آنزیم‌های برشی نتایج مشابهی را از نظر قطعات تکثیر شده گزارش کرده‌اند.

سه ترکیب باقی‌مانده (*HK-EcoRI*, *K₁K₂-EcoRI*) و (*HK-MseI*) ایجاد حالت چندشکلی نمودند که ترکیب *HK-MseI* با دارا بودن دو جایگاه برش در هر دو جایگاه تولید حالت چندشکلی نمود ولی با وجود آن‌که ترکیب *K₁K₂-EcoRI* نیز دو جایگاه برش داشت فقط در یک جایگاه تولید حالت چندشکلی کرد و تمام این حالات چندشکلی مشاهده شده به دلیل جهش‌های حذف و اضافه در محدوده $50-20 \text{ bp}$ بودند مشابه همین نتایج توسط جهانگیرزاده و همکاران (۱۴) و جهانگیرزاده و کشاورزی (۱۵) گزارش شده است (جدول ۵). شکل ۱ تعدادی از نمونه‌هایی که قطعه تکثیری در آن‌ها توسط آنزیم برشی مورد هضم قرار گرفته را نشان می‌دهند.

عکس‌برداری زیر نور ماورابنفش صورت پذیرفت. از دو سایز مارکر 1 kb و 50 bp برای تخمین طول قطعات حاصل از هضم استفاده گردید (*Fermentas*).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده از نرم‌افزارهای *POPGENE version 1.31* و *NTSYSpc version 2.0* استفاده شد و دندروگرام توسط روش *UPGMA* و ضریب *dice* رسم گردید.

نتایج و بحث

از چهار پرایمر به‌کار برده شده عمومی کلروپلاست فقط سه پرایمر *CS*، *K₁K₂* و *HK* توانستند قطعاتی به طول‌های حدود 1800 bp ، 2470 bp و 1650 bp را تکثیر کنند و پرایمر *TF* در درخت سیب هیچ‌گونه تکثیری را انجام نداد (جدول ۴). در بررسی‌های جهانگیرزاده و همکاران (۱۴) و جهانگیرزاده و کشاورزی (۱۵) که از همین روش برای بررسی سیب‌های بومی آذربایجان ایران و البرز مرکزی استفاده نمودند آغازگرهای به‌کار برده مشابه تولید قطعات مشابهی نمودند. نتایج مشابهی توسط موهانتی و همکاران (۱۹) در مورد پرایمرها در بررسی *DNA* کلروپلاست *Prunus avium* که هم‌خانواده با *Malus* می‌باشد نیز مشاهده گردیده بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده سه پرایمری که قدرت تکثیر داشتند برای هضم با آنزیم برشی و بررسی انتخاب گردیدند.

با توجه به اندازه قطعات تکثیر شده در این مطالعه 5920 bp (حدوداً $3/72$ درصد) از ژنوم کلروپلاست (ژنوم کلروپلاست در گیاه سیب توسط جمع کردن

جدول ۵- الگوی اصلی و متغیر (bp) در جایگاه‌های چندشکلی به دست آمده توسط ترکیب‌های آغازگر- آنزیم.

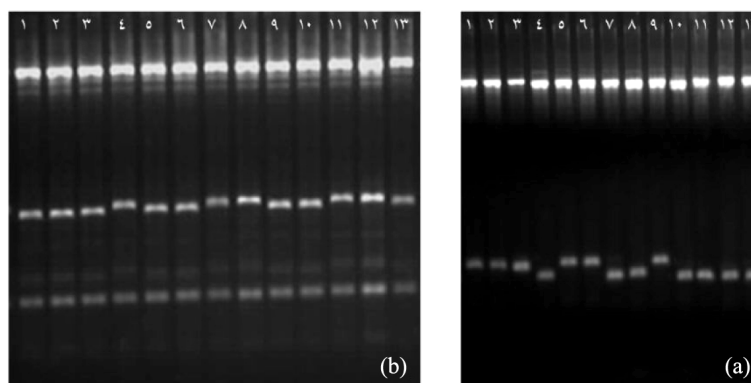
Table 5. The main and variable pattern (bp) in polymorphic sites obtained by primer-enzyme combinations.

جایگاه چندشکلی Polymorphic locus	طول جهش Length of mutation	
	الگوی اصلی* Main pattern	الگوی تغییر یافته* Modified pattern
K ₁ K ₂ -EcoRI	KE _A (610)	KE _B (650)
HK/EcoRI	HE _A (260)	HE _B (300)
HK/MseI (1)	HM1 _A (300)	HM1 _B (280)
HK/MseI (2)	HM2 _A (280)	HM2 _B (260), HM2 _C (230)

* حرف اول ابتدای نام آغازگر، حرف دوم نام آنزیم برشی و اندیس، حالت چندشکلی می‌باشد (اعداد، اندازه باند چندشکلی می‌باشند).

The first and second letters are the beginning of primers and restriction enzymes names, while the index is polymorphism (Numbers, are the size of polymorphic bands).

اندیس A به علت فراوانی بیش تر در نمونه‌های مورد بررسی، به عنوان الگوی اصلی در نظر گرفته شده است و B, C حالت‌های تغییر یافته‌اند. Index A was considered as the main pattern due to a higher frequency in the samples examined, moreover, B and C are modified patterns.



شکل ۱- الگوی برش دو ترکیب پرایمر- آنزیم برشی HK-EcoRI (الف) و K₁K₂-EcoRI (ب) که در ژل آگارز مشخص شده‌اند. چاهک‌ها بر اساس شماره به ترتیب نمونه‌های آذربایجان ۵، آذربایجان ۷، آذربایجان ۱۴، ME3، ME5، قره یارپاق، فلسطینی، ترش دماوند، بشقابی طالقان، شمیرانی تابستانه، فوجی، M4 و گمی آلماسی می‌باشند.

Figure 1. The cutting pattern of two Primer- Restriction enzyme combinations HK-EcoRI (a) and K₁K₂-EcoRI (b) were shown in agarose gel. Wells (based on the number) are Azerbaijan 5, Azerbaijan 7, Azerbaijan 14, ME3, ME5, Ghareh Yarpagh, Palestinee, Torsh Damavand, Boshghabi Taleqan, Shemirani Tabestaneh, Fuji, M4 and Ghami Almasi, respectively.

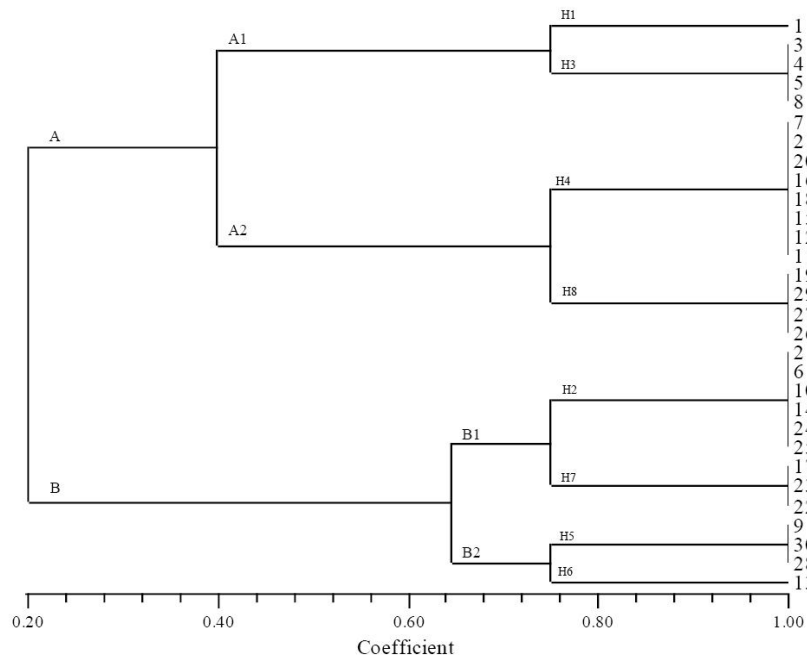
یک نمونه کوچک‌ترین هاپلوتایپ‌ها بودند. از میان این هشت هاپلوتایپ مشاهده شده فقط سه هاپلوتایپ (H1، H3 و H6) خاص جمعیت آذربایجان هستند که تمام نمونه‌ها تحت پوشش آن‌ها از منطقه آذربایجان به دست آمده‌اند و باقی پنج هاپلوتایپ

بر اساس این حالت چندشکلی نمونه‌های مورد بررسی در هشت حالت هاپلوتایپی متفاوت قرار گرفتند (جدول ۱). هاپلوتایپ H4 با پوشش هشت نمونه بزرگ‌ترین هاپلوتایپ و متداول‌ترین آن‌ها بود. دو هاپلوتایپ H1 و H6 نیز هر کدام با پوشش فقط

تشابه ۴۰ درصد تقسیم شد (A1 و A2) که مشاهده شد در گروه اخیر (A1) فقط نمونه‌های جمعیت آذربایجان حضور دارند و هیچ نمونه‌ای غیر از نمونه‌های آذربایجان مشاهده نگردید. گروه اصلی دیگر (B) که شامل هاپلوتایپ‌های H2, H5, H6 و H7 بود، برخلاف گروه اول اصلی (A) در سطح تشابه ۶۴ درصد از یکدیگر جدا شده و در دو گروه (B1 و B2) قرار گرفتند. به‌طور کلی تمام هاپلوتایپ‌ها در سطح تشابه ۷۵ درصد از یکدیگر جدا شده و به‌صورت تکی قرار گرفتند.

دارای نمونه‌هایی از دیگر مناطق، ارقام و یا پایه‌ها بودند. دو پایه پاکوتاه‌کننده M9 و گمی آلماسی (پایه پاکوتاه‌کننده بومی ایران) در هاپلوتایپ H5 قرار گرفتند که این می‌تواند به‌علت وجود والد مادری مشترک برای این پایه‌ها باشد.

در دندروگرام به‌دست آمده از داده‌ها (شکل ۲) مشخص است که کل نمونه‌ها از حد تشابه ۲۰ درصد به دو گروه اصلی (A و B) تقسیم شدند که گروه اصلی A شامل چهار هاپلوتایپ H1, H3, H4 و H8 بوده و اکثر نمونه‌های جمعیت آذربایجان در این زیرگروه قرار داشتند. خود این زیرگروه مجدداً در حد



شکل ۲- دندروگرام به‌دست آمده برای برخی ژنوتیپ‌های ایران، ارقام و پایه‌های جنس *Malus spp* توسط تجزیه UPGMA با کاربرد ضریب Dice. (شماره‌ها بر اساس جدول ۱ می‌باشد).

Figure 2. Dendrogram obtained for some Iranian genotypes, varieties and rootstocks of the genus *Malus spp* using UPGMA analysis with Dice coefficient.

آذربایجان در یک هاپلوتایپ (H4) قرار دارند که از این نتیجه می‌توان این برداشت را نمود که این نمونه‌ها به احتمال زیاد از منطقه آذربایجان که منطقه‌ای با کشت و کار زیاد سیب می‌باشد به این

از روی همین دندروگرام مشخص است که دو نمونه بشقابی طالقانی و T3 از ناحیه طالقان در منطقه البرز مرکزی که نزدیک‌ترین ناحیه مورد بررسی به منطقه آذربایجان می‌باشد در کنار شش نمونه از منطقه

بومی مشکین‌شهر و قرمز اهر به صورت اختصاصی حالت هاپلوتایپی خود را داشتند می‌توان از آن برای شناسایی آن‌ها استفاده نمود (۱۴، ۱۹ و ۲۹).

حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gstc) به ترتیب ۰/۴۶۷، ۰/۴۴۵۱ و ۰/۴۸۱ به دست آمد. در مطالعه مشابهی بر روی جنس *Malus* که نمونه‌ها از منطقه آذربایجان ایران بودند با کاربرد روش مشابه نتایج نزدیکی توسط جهانگیرزاده و همکاران گزارش شده است (Hs=۰/۴۴۵، Ht=۰/۴۶۷). (Gstc = ۰/۴۸) (۱۴).

با توجه به Gstc به دست آمده و مقایسه آن با باقی Gstc های محاسبه شده در جنس‌های *Prunus avium* (Gstc=۰/۱۹) و *Prunus spinosa* (Gstc=۰/۰۸) (۲۱) که هم‌خانواده با جنس *Malus* می‌باشند مشخص می‌گردد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت (Gstc) حساب شده کم‌تر می‌باشد و حتی نسبت به برخی گونه‌های جنگلی مانند *Querus petraea* (Gstc=۰/۹۰) (۲۴)، *Fagus sylvatica* (Gstc=۰/۸۳) (۴) و *Argania spinosa* (Gstc=۰/۶۰) (۷) بسیار کم‌تر می‌باشد. با توجه به آن‌که در تمام گونه‌های ذکر شده Gstc بسیار پایین‌تر از Gstn (تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها با کاربرد مارکرهای هسته‌ای) می‌باشد (۲۴) می‌توان بیان نمود که توارث هسته‌ای در مقایسه با توارث سیتوپلاسمی با سازماندهی کم‌تری روی می‌دهد زیرا جریان ژن‌های سیتوپلاسمی بر خلاف ژن‌های هسته‌ای توسط عامل پخش‌شدگی بذرها محدود می‌گردد.

از دلایل کم‌بود مقایسه با سایر مطالعات مشابه می‌توان به تعداد کم نمونه‌های مشترک در مطالعات، پرایمرهای متنوع برای تکثیر نواحی متفاوت ژنوم کلروپلاست و تعدد آنزیم‌های برشی که باعث ایجاد ترکیبات زیاد پرایمر- آنزیم برشی می‌شوند اشاره کرد که این مسأله در بررسی ما نیز مشاهده گردید.

ناحیه آورده شده‌اند زیرا اکثر نمونه‌های این هاپلوتایپ جزء ژنوتیپ‌های بومی منطقه آذربایجان هستند و از طرفی نیز در هاپلوتایپی قرار دارند که اکثر نمونه‌های آن زیرشاخه از جمعیت آذربایجان می‌باشند (H4). حالت مشابهی نیز در هاپلوتایپ H2 دیده شد که دو نمونه ترش میگون و گلاب دماوند نیز در کنار چهار نمونه از جمعیت آذربایجان قرار گرفتند اما درباره این هاپلوتایپ بر خلاف هاپلوتایپ H4 باید با قاطعیت کم‌تری بیان نمود که این دو ژنوتیپ از منطقه آذربایجان به این منطقه (البرز مرکزی) آورده شده‌اند که از دلایل قابل ذکر برای این مورد اولاً، در زیرگروه دوم تعداد نمونه‌هایی که از منطقه آذربایجان هستند کم‌تر بودند و دلیل دوم این‌که این دو نمونه خود از ناحیه‌ای هستند که تاریخچه کشت و کار سیب در آن طولانی و گسترده می‌باشد بر خلاف منطقه طالقان. البته در مورد هر چهار نمونه (ترش میگون، گلاب دماوند، بشقابی طالقانی و T3) باید موضوع رخداد جهش را نیز در زمان اعلام نظر مدنظر قرار داد اما احتمال وجود والد مادری یکسان را به طور کامل نمی‌شود رد کرد زیرا بحث مهاجر اقوام و یا انتخابات اولیه برای محصول بیش‌تر یا بهتر همواره وجود داشته و خود می‌تواند عامل انتقال نمونه‌ای از یک منطقه به منطقه دیگر گردد.

یکی از دلایل عدم ظهور یک ساختار ژنتیکی برای یک منطقه و جمعیت می‌تواند جریان ژن‌ها باشد (مهاجرت بذرها) که گاهی سرعت این گونه مهاجرت‌ها سریع‌تر از حد مورد انتظار می‌باشد (۱۴ و ۱۹).

یکی از کاربردهای شناسایی هاپلوتایپ‌ها امکان فراهم کردن شرایط شناسایی برخی ارقام، ژنوتیپ‌ها می‌باشد به طوری که موهانتی و همکاران (۲۰۰۱) و تورکک و همکاران (۲۰۰۶) نیز نتایج مشابهی را برای شناسایی برخی نمونه‌های مورد بررسی خود گزارش نموده‌اند که در این بررسی با توجه به این‌که دو نمونه

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج حاصل بررسی پیش رو بیان نمود که ساختار ژنتیکی مدونی در نمونه های سیب مورد بررسی مشاهده نمی گردد که دلیل آن می تواند به انتقال نمونه های برتر در طی زمان در بین مناطق مختلف باشد. از سوی دیگر با توجه به روش کار مشخص گردید که روش چندشکلی شکافتن قطعات تکثیر شده جهت شناسایی ژنوتیپ های سیب و ارقام آن به عنوان روشی مفید قابل توصیه است. از سوی دیگر با توجه به آن که در گذشته تکثیر ژنوتیپ های سیب به صورت جنسی و با استفاده از بذر بوده است تنوع ژنتیکی بالایی مشاهده گردید. به طور کلی جهت انجام کارهایی مشابه بررسی پیش رو مناسب است از روش های تکرارپذیر و با دقت بالا مانند روش استفاده شده یا cpSSR استفاده گردد تا نتایج در کارهای اصلاحی کلاسیک (دورگه گیری) به صورت دقیق تر در انتخاب والدین به کار برده گردد.

با توجه به آن که در این مطالعه نمونه های جمعیت آذربایجان کاملاً از سایر نمونه ها جدا نگردیدند می توان مطرح نمود که انتخاب ژنوتیپ های برتر در زمان های گذشته صورت پذیرفته و این ژنوتیپ های برتر به نقاط متفاوت برده شده اند.

به طور کلی شناسایی هاپلوتایپ ها با تعریف مسیرهای تکاملی و توزیع جغرافیایی و همچنین تقسیم بندی جمعیت های بزرگ به گروه های کوچک تر باعث راحت تر شدن کارهای مطالعاتی و بررسی های ژنتیکی با نشانگرهای زمان بر مانند ریزماهورها (SSR) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) می گردد. البته امروزه با پیشرفت علوم مولکولی به ویژه توالی یابی سریع قطعات مطالعات فیلوژنتیکی و مولکولی به سمت استفاده از این روش تغییر مسیر داده است. هر چند به علت مشکلاتی که در انجام توالی یابی وجود دارد (هزینه بالا و زمان بر بودن) توصیه می شود از هر دو روش واکنش زنجیره ای پلی مرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) و توالی یابی به صورت ترکیبی استفاده گردد به این فرم که در حالتی که نتایج مقداری گنگی و پیچیدگی نشان می دهند از توالی یابی استفاده گردد.

منابع

1. Arnold, M.L., Buckner, C.M. and Robinson, J.J. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proc. Nat. Acad Sci. USA. 88: 1398-1402.
2. 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. J. Am. Soc. Hort. Sci. 132 :5. 670-679.
3. 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 apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). Mol Ecol. 15: 2171-2182.
4. Demesure, B., Comps, B. and Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. Evolution. 50: 2515-2520.
5. Demesure, B., Sodzi, 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. Mol Ecol. 4: 129-131.
6. Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M. and Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. Mol. Ecol. 6: 393-397.
7. El-Mousadik, A. and Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. Mol. Eco. 5: 547-555.

8. Fofona, B., Harvengt, L., Baudoin, J.P. and Du Jardin, P. 1997. New primers for the polymerase chain reaction of cpDNA intergenic spacers in Phaseolus phylogeny. Belg. J. Bot. 129: 118-122.
9. Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadi, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Sci. Hort. 148: 147-153.
10. 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. Mol. Ecol. Not. 1: 345-349.
11. Heinze, B. 1998. PCR based chloroplast DNA assay for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. Forest Genet. 5: 33-40.
12. http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf.
13. Ishikawa, S., Kato, S., Imakawa, S., Mikami, T. and Shimamoto, Y. 1992. Organel DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. Theor. Appl. Genet. 83: 963-967.
14. 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. Afri. J. Agri. Res. 8: 1. 106-112.
15. Jahangirzadeh Khiavi, Sh. and Keshavarzi, Sh. 2016. Study of chloroplast haplotypes distribution in some apple genotypes from central Alborz region by using PBR method. Third international and sixth confrence of medical herbs and stable agriculture. December 11. Iran. Hamedan. (In Persian)
16. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Hamidoghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. 2017. Haplotype Identification of Some Lime Genotypes from Minab Region by Usage of Chloroplast Genome. First International Conference & 10th National Horticultural Science Congress of Iran (IrHC2017). September 4-7. Iran. Tehran. (In Persian)
17. Mabberley, D.J., Jarvis, C.E. and Juniper, B.E. 2001. The name of the apple. Telopea J. 9: 421-430.
18. Mariac, C., Trouslot, P., Poteaux, C., Bezancon, G. and Renno, J.F. 2000. Chloroplast DNA extraction from herbaceous and woody plants for direct restriction fragment length polymorphism analysis. Biotechniques. 28: 110-113.
19. Mohanty, A., Martín, J.P. and Aguinalalde, I. 2001. Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. . Theor. Appl. Genet. 103: 112-117.
20. Mohanty, A., Martin, J.P., Gonzalez, L.M. and Aguinalalde, I. 2003. Association between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Prunus spinosa* L. (*Rosaceae*) populations across Europe. Ann. Botany. 92: 749-755.
21. Mohanty, A., M., J.P. and Aguinalalde, I. 2000. Chloroplast DNA diversity within and among populations of the allotetraploid *Prunus spinosa* L. Theor. Appl. Genet. 100: 1304-1310.
22. Palmer, J.D. and Stein, D.B. 1986. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plant. Curr. Genet. 10: 823-833.
23. Panda, S., Pedro Martin, J. and Aguinalalde, I. 2003. Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. Genet. Resour. Crop Evol. 50: 489-495.
24. Petit, R.J., Kremer, A. and Wagner, D.B. 1993a. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. Theor. Appl. Genet. 87: 122-128.
25. Phipps, J.B., Robertson, K.R., Smith, P.G. and Rohrer, J.R. 1990. A checklist of the subfamily *Maloideae* (*Rosaceae*). Can J. Bot. 68: 10. 2209-2269.
26. Sears, B.B. 1980. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom. Plasmid. 4: 233-255.
27. Sugiura, M. 2003. History of chloroplast genomics. Photosyn Res. 76: 371-377.
28. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17: 1105-1109.

29. 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). *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 1635-1641.
30. Weising, K. and Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome.* 42: 9-19.
31. Whatley, J.M. 1982. Ultrastructure of plastid inheritance: Green algae to angiosperms. *Biol. Rev.* 57: 527-569.
32. 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. *J. Food. Agri. Envir.* 5: 3&4. 242-247.
33. Zohary, D. and Hopf, M. 2001. *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley.* Oxford University Press. 328p.

Ar