

## **Evaluation of Genetic Diversity of Commercial Apple Cultivars (*Malus domestica* L.) in Khorasan Razavi using RAPD Technique**

### **Mahyar Gerami**

Assistant Professor, Department of Agriculture, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran. Email: [mahyar.gerami@yahoo.com](mailto:mahyar.gerami@yahoo.com)

### **Mahmood Reza Karimi Shahri**

Assistant Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. Email: [karimishahrim13@yahoo.com](mailto:karimishahrim13@yahoo.com)

### **Parastoo Majidian**

\*Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Sari, Iran. Tel: +989111536288, Email: [parastoomajidian63@gmail.com](mailto:parastoomajidian63@gmail.com)

### **Somayeh Sharafdar Kolahi**

PhD Student, Department of Agriculture, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran. Email: [heidarisomayeh@yahoo.com](mailto:heidarisomayeh@yahoo.com)

### **Reza Nikbakht**

MSc Graduate, Department of Agriculture, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran. Email: [nikhbakhtreza@yahoo.com](mailto:nikhbakhtreza@yahoo.com)

### **Abstract**

#### **Objective**

The objective of this study was to assess the genetic diversity of some commercial apple cultivars in Khorasan Razavi province using 40 RAPD primers.

## Materials and methods

DNA was collected from fresh leaves of apple samples studied and extracted based on dellaporta method. In order to investigate polymorphism, the PCR analysis was performed for each primer and the marker indices were calculated. The genetic similarity and distance were evaluated using Jaccard coefficient by UPGMA method and PcoA analysis by NTSYS-PC ver 2.2, respectively. The genetic structure analysis was performed using STRUCTURE software ver 2.3.

## Results

The percentage of polymorphic bands was different from 37.5% for OPJ13 marker to 100% for OPA7 markers. The highest and lowest PIC parameter was related to OPA4 (0.48) and OPM6 (0.2), respectively. With respect to cluster analysis, the samples were grouped into two main clusters and five subgroups. The highest similarity was between Golab Esfahan-Golomkani, Margenduft-Low Red Roem Beauty and Alimori Khorasan Dalago, while the lowest similarity was between Golab Esfahan-Fuji Rossa and Golab Esfahan-Low Red Roem Beauty cultivars. The classification based on PcoA analysis was different with UPGMA. In addition, the obtained result of Bayesian analysis showed lack of admixture of the apple cultivars studied.

## Conclusions

According to the results of RAPD analysis, this marker can be used for recognition of polymorphic regions, assessment of genetic distance and management of apple genotypes and cultivars.

**Keywords:** apple, genetic similarity, genetic structure, molecular marker, PcoA analysis

**Citation:** Gerami M, Karimi Shahri MR, Majidian P, Sharafdar Kolahi S, Nikbakht R (2019). Evaluation of Genetic Diversity of Commercial Apple Cultivars (*Malus domestica* L.) in Khorasan Razavi using RAPD Technique. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (1), 119-134.

*Agricultural Biotechnology Journal* 11 (1), 119-134.

DOI: 10.22103/jab.2019.12697.1076

Received: November 10, 2018; Accepted: February 21, 2019

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام تجاری سیب (*Malus domestica* L.) در استان

## خراسان رضوی با استفاده از فناوری RAPD-PCR

مهیار گرامی

استادیار، گروه کشاورزی، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران. ایمیل: [mahyar.gerami@yahoo.com](mailto:mahyar.gerami@yahoo.com)

محمود رضا کریمی شهری

استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

ایمیل: [karimishahrim13@yahoo.com](mailto:karimishahrim13@yahoo.com)

پرستو مجیدیان

\* نویسنده مسئول، استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. تلفن: 09111536288. ایمیل:

[parastoomajidian63@gmail.com](mailto:parastoomajidian63@gmail.com)

سمیه حیدری شرفدار کلاهی

دانشجوی دکتری، گروه کشاورزی، موسسه آموزش عالی سنا ساری، ساری، ایران. ایمیل:

[heidarisomayeh@yahoo.com](mailto:heidarisomayeh@yahoo.com)

رضا نیکبخت

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، موسسه آموزش عالی سنا ساری، ساری، ایران. ایمیل:

[nikbaktreza@yahoo.com](mailto:nikbaktreza@yahoo.com)

تاریخ دریافت: 1397/08/19، تاریخ پذیرش: 1397/12/02

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ارقام تجاری سیب در استان خراسان رضوی با استفاده از 40 آغازگر RAPD بود.

**مواد و روش‌ها:** DNA از برگ‌های جوان درخت سیب جمع آوری و با استفاده از روش دلاپورتا استخراج شد. به منظور بررسی چندشکلی، واکنش زنجیره ای پلیمرز برای هر آغازگر انجام و شاخص های نشانگری محاسبه شدند. تشابه ژنتیکی و گروه‌بندی نمونه‌ها به ترتیب بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و تجزیه PcoA به کمک نرم افزار NTSYS-PC نسخه 2,2 انجام شد. ساختار ژنتیکی جمعیت سیب مورد مطالعه نیز با استفاده از نرم افزار STRUCTURE نسخه 2,3 ارزیابی شد.

**نتایج:** بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین باند چندشکل متعلق به آغازگر OPA7 و کمترین باند چندشکل مربوط به آغازگر OPJ13 بود. بیشترین و کمترین میزان PIC به ترتیب در آغازگرهای OPA4 (0/48) و OPM6 (0/2) دیده شد. طبق نتایج تجزیه کلاستر با روش UPGMA، ارقام مورد نظر در 2 گروه اصلی و 5 زیرگروه دسته‌بندی شدند. بیشترین تشابه بین ارقام گلاب اصفهان-گلمکانی، Low Red Roem Beauty -Margenduft و علیموری خراسان-Dalago و کمترین تشابه بین ارقام گلاب اصفهان-Fuji Rossa و گلاب اصفهان - Low Red Roem Beauty تشخیص داده شد. گروه‌بندی نمونه‌های سیب بر اساس تجزیه PcoA و روش UPGMA متفاوت بود. به علاوه، نتایج بدست آمده از آنالیز Bayesian بیانگر عدم اختلاط تبار ارقام سیب مورد مطالعه بود.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، می‌توان از نشانگر RAPD در شناسایی نواحی چندشکلی، تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژنوتیپ و ارقام سیب استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** سیب، تشابه ژنتیکی، نشانگر مولکولی، تجزیه PcoA، ساختار ژنتیکی

## مقدمه

سیب با نام علمی (*Malus domestica* Borokh) از خانواده *Rosacea* و زیرخانواده *Pomoidea* می‌باشد که در نواحی با آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت و کار می‌شود (Farokhi et al. 2014). اکثر گونه‌های زراعی سیب دیپلوئید می‌باشند این در حالی است که در برخی گونه‌ها سطوح مختلف پلوئیدی نیز دیده می‌شود (Ahmad Dar et al. 2017). سیب درخت برگریزی است که معمولاً ارتفاعش در درخت‌های کاشته شده از 1/8 تا 4/6 متر و در درخت‌های خودرو تا 12 متر می‌رسد (Velasco et al. 2010). اعتقاد بر این است که منشاء سیب از آسیای میانه می‌باشد و به دنبال آن در سایر نقاط جهان پراکنده شده است (Fazeli et al. 2016). طبق آمار سازمان خوارو بار جهانی در سال 2016، قاره آسیا با میزان تولید 58%/1 بزرگترین تولیدکننده سیب در سطح جهان می‌باشد و ایران با تولید سالانه 2 میلیون 477 هزار تن مقام چهارم را به ترتیب بعد از کشورهای چین، آمریکا و ترکیه در بین 10 کشور تولیدکننده اصلی این محصول به خود اختصاص داده است (FAOSTAT, 2017).

شناخت صحیح و دقیق از تنوع ژنتیکی هر گیاه، استفاده بهینه از آن را در تولید محصول و اصلاح ژنتیکی فراهم می‌آورد. تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از راه‌های اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژنی و اجرای برنامه‌های به‌نژادی است (Omasheva et al. 2018). والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند، هیبریدهایی با هتروزیس بیشتر تولید می‌کنند و احتمال به دست آوردن نتایج نوترکیب افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسماها (تنوع ژنتیکی در هر موجود بیولوژیکی) به اصلاحگران امکان می‌دهد تا از نمونه‌گیری مجدد از جمعیت‌ها خودداری نمایند (Govindaraj et al. 2015)

به منظور تخمین تنوع ژنتیکی، انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاحگران گیاهی استفاده می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی دارای فراوانی نسبی زیادی هستند و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، از این رو مناسب‌ترین نوع نشانگرها در پژوهش‌های نوین محسوب می‌شوند (Govindaraj et al. 2015).

سیب با دارا بودن حدود 57000 ژن، بیشترین تعداد ژن را در میان گیاهانی دارد که ژنوم آن‌ها تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته است (Urrestarazu et al. 2016). تاکنون، از نشانگرهای مولکولی مختلفی نظیر <sup>1</sup>SSR و <sup>2</sup>ISSR (Goulao and Oliveira, 2001; Naghshin et al. 2008; Gharghari et al. 2009; Jahromi and Shirazi ) <sup>3</sup>AFLP، (2009; Patzak et al. 2012; Farrokhi et al. 2011 Kenis and Keulemans 2005; Savelyeva ) <sup>4</sup>RAPD، (and Kudryavtsev 2015 Roche et al. 1997; Okcu et al. 2015; Guimarães et al. 2014; ) <sup>5</sup>RFLP (Fagoria et al. 2013)، و (Jarusch et al. 2000) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی جمعیت، و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب استفاده شده است. انتخاب نشانگر مورد نظر وابسته به هدف مطالعه، محدودیت‌های مالی، مهارت‌ها و تسهیلات در دسترس می‌باشد (Guimaraes et al. 2014). در میان نشانگرهای مولکولی، نشانگر RAPD به دلیل داشتن مزایایی از جمله عدم نیاز به دانستن توالی هدف برای طراحی و ساخت آغازگر، ارزان قیمت بودن، عدم نیاز به مواد پرتوزا و کاوشگر و هزینه پایین تهیه آن نسبت به سایر نشانگرها برتری دارد (Oraguzie et al. 2001).

با توجه به اهمیت اقتصادی تولید سیب در ایران و وجود ارقام مختلفی از سیب در استان خراسان، این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام تجاری سیب جمع آوری شده از کلکسیون مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی با استفاده از آغازگرهای RAPD انجام گرفت.

<sup>1</sup> Simple sequence repeat

<sup>2</sup> Inter simple sequence repeats

<sup>3</sup> Amplified fragment length polymorphisms

<sup>4</sup> Random amplification of polymorphic DNA

<sup>5</sup> Restriction fragment length polymorphism

## مواد و روش‌ها

12 نمونه‌ی گیاهی مورد استفاده از کلکسیون سیب موجود در ایستگاه تحقیقات کشاورزی طُرق جمع‌آوری و استخراج DNA از برگ آن‌ها انجام شد (جدول 1). جهت استخراج DNA، ابتدا برگ‌های جوان و سالم از هر ژنوتیپ با کمک ازت مایع در هاون کوبیده و سپس DNA آن‌ها به روش دلاپورتا (Dellaporta et al. 1983) استخراج شد. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز 1 درصد و دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV/Vis 2100 از شرکت UNICO آلمان استفاده شد.

## جدول 1. اسامی 12 رقم جمع‌آوری شده از کلکسیون سیب طُرق

Table 1. Names of 12 apple cultivars from Torogh Collection

شماره ردیف	کد نمونه	نام ژنوتیپ/رقم	منشاء
Number of row	Sample code	Genotype/cultivar name	Origin
1	M1	Golab-Isfahan گلاب اصفهان	Isfahan-Iran ایران - اصفهان
2	M2	Golmkani گلمکانی	Khorasan-Iran ایران - خراسان
3	M3	Torbati تربتی	Khorasan-Iran ایران - خراسان
4	M4	Kompouti کمپوتی	Khorasan-Iran ایران - خراسان
5	M5	Rouin-Esfaraen روئین اسفراین	Khorasan-Iran ایران - خراسان
6	M6	Alimoori-Khorasan علیموری خراسان	Khorasan-Iran ایران - خراسان
7	M7	Dalago	USA ایتالیا
8	M8	Margenduft	USA ایتالیا
9	M9	Golden Delicious	USA آمریکا
10	M10	Super Staymen	USA آمریکا
11	M11	Low Red Roem Beauty	USA آمریکا
12	M12	Fuji Rossa	Japan ژاپن

تعداد 40 آغازگر RAPD بر روی 12 ژنوتیپ سیب آزمایش شدند. از بین این تعداد آغازگر، تنها 12 آغازگر چندشکلی مناسبی را نشان دادند (جدول 2). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>6</sup> در حجم نهایی 30 میکرولیتر حاوی کلرید منیزیم 2 میلی مولار، آنزیم

<sup>6</sup> Polymerase chain reaction

تگ دی‌ان‌آ پلیمرز<sup>7</sup> 1 واحد (شرکت اکوژن-اسپانیا)، 1/2 میکرو مول از هر آغازگر، 0/5 میکرولیتر از dNTPs 2 میلی مولار و 15 نانوگرم از دی‌ان‌آ ژنومی هر نمونه انجام شد. چرخه دمایی PCR شامل مرحله اول به مدت 1 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد، مرحله دوم شامل 35 چرخه در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه، 57 درجه سانتیگراد به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتیگراد به مدت 2 دقیقه و مرحله سوم 72 درجه سانتیگراد به مدت 4 دقیقه بود (Fazeli et al. 2016). از سیستم الکتروفورز عمودی ژل پلی اکریل امید 6/5 درصد برای جداسازی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. بعد از اتمام الکتروفورز عمودی، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید 0/5 میکروگرم بر میلی لیتر انجام و ژل در دستگاه ترانسلومیناتور مشاهده و یادداشت برداری‌ها انجام شد.

**امتیازدهی و آنالیز داده‌ها:** باندهای حاصل به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) در فایل اکسل امتیازدهی شدند. به منظور ارزیابی چندشکلی در میان جمعیت سیب مورد مطالعه، میزان باندهای چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر برای هر آغازگر RAPD محاسبه شد (Roldan-Ruiz et al. 2000; Soengas et al. 2006). تشابه ژنتیکی بین همه جفت ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC نسخه 2,2 انجام شد (Botstein et al. 1980). گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس الگوریتم UPGMA با واحد SAHN و تجزیه PcoA با نرم‌افزار NTSYS-PC نسخه 2,2 مورد ارزیابی قرار گرفت (Basaki et al. 2014). روش تجزیه خوشه‌ای بر مبنای مدل، با روش Bayesian نرم‌افزار STRUCTURE نسخه 2,3 ارزیابی شد (Pritchard et al. 2000).

## نتایج و بحث

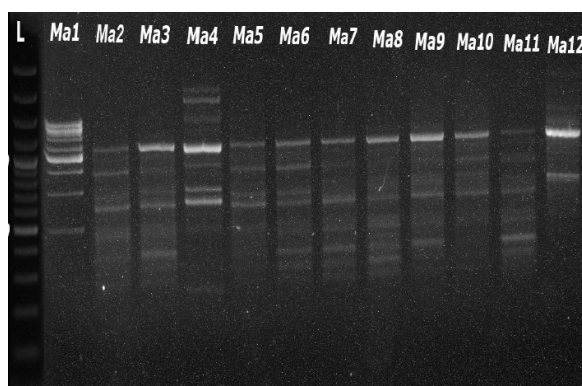
از 40 آغازگر RAPD مورد مطالعه، تنها 12 آغازگر بر روی نمونه‌های سیب تکثیر شدند. تعداد کل باندهای مشاهده شده 140 باند بود که از میان این تعداد، 96 باند چندشکلی را نشان دادند. در بین این آغازگرها، آغازگر OPA7 بیشترین تعداد باند چند شکل (14 باند) و آغازگر OPJ13 کمترین باند چند شکل (5 باند) را ایجاد کردند. الگوی باندهای DNA تکثیر شده ارقام سیب مورد مطالعه با استفاده از آغازگر OPA4 در شکل 1 آورده شده است. به علاوه، بیشترین میزان چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب متعلق به آغازگرهای OPA4 (0/48-100%) و OPJ17 (0/46-100%) در بین سایر آغازگرها بود که از آن‌ها می‌توان جهت بررسی روابط ژنتیکی دیگر گونه‌های این جنس نیز استفاده کرد (جدول 2). از نتایج به دست آمده از جدول 2 می‌توان چنین استنباط کرد که تعداد زیاد باندها نمی‌تواند برای یک آغازگر مزیتی را در بر داشته باشد، بلکه تعداد مکان چند شکلی و از آن مهم‌تر ژنوتیپ‌هایی که تفکیک می‌گردند، بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد.

<sup>7</sup> Taq DNA polymerase

جدول 2. اطلاعات مربوط به آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق.

**Table 2. Information of RAPD primers used in this study.**

شماره ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد باندهای تکثیر شده	تعداد باند های چند شکلی	درصد باند چند شکلی	محتوای اطلاعاتی چندشکلی	شاخص
Number of row	Name of primer	Primer sequence 5'-3'	Number of amplified band	Number of polymorphic band	Polymorphic band %	Polymorphic information content	Marker index
1	OPM3	GGGGGATGAG	13	11	84.61%	0.45	1.80
2	OPM4	GGCGGTTGTC	12	7	58.33%	0.25	2.35
3	OPM5	GGAACGTGT	14	9	64.28%	0.32	1.52
4	OPM6	CTGGGCAACT	13	7	53.84%	0.20	2.78
5	OPM14	AGGGTCGTTC	13	9	69.23%	0.37	1.44
6	OPA4	AATCGGGCTG	5	5	100%	0.48	2.53
7	OPA7	GAAACGGGTG	21	14	66.66%	0.40	3.38
8	OPA16	AGCCAGCGAA	11	8	63.63%	0.35	2.82
9	OPJ5	CTCCATGGGG	16	11	62.50%	0.34	3.15
10	OPJ10	AAGCCCGAGG	9	6	66.66%	0.41	1.89
11	OPJ13	CCACACTACC	8	3	37.5%	0.25	2.42
12	OPJ17	ACGCCAGTTC	5	5	100%	0.46	2.04



شکل 1. الگوی باندهای DNA تکثیر شده ارقام سیب مورد مطالعه با استفاده از نشانگر OPA4. حرف

اختصاری L، نشانگر وزنی است. Ma1-Ma12، نمونه های سیب مورد مطالعه هستند

**Figure 1. Banding pattern of amplified DNA of the apple cultivars studied using OPA4 marker. L is molecular weight marker. Ma1-Ma12 are the samples**



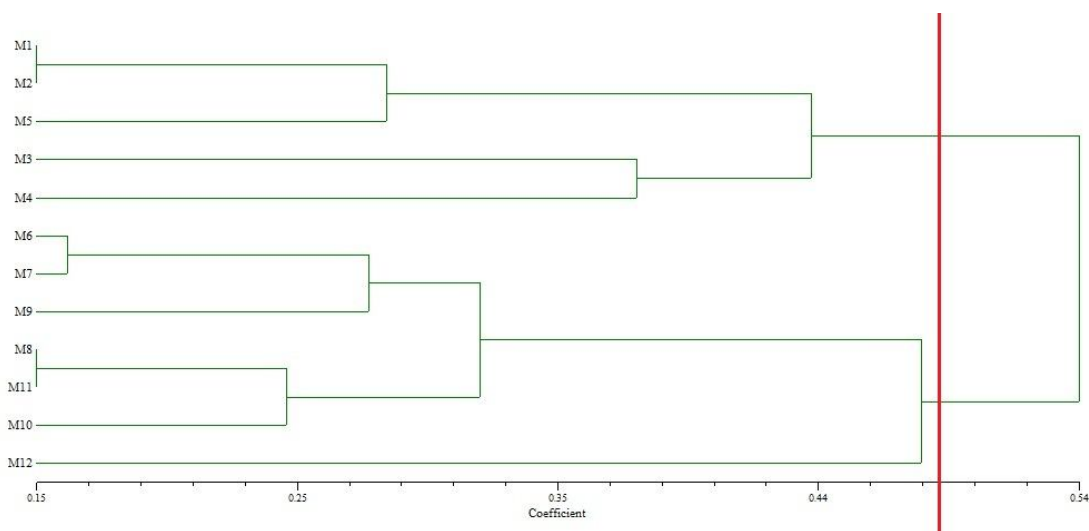
در مطالعه قبلی، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب بومی خراسان بر اساس خصوصیات مورفولوژی و پومولوژی بررسی شدند. نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در اندازه میوه و صفات رویشی در بین ژنوتیپ‌های مختلف بود (Mokhtarian and Van 2016). در مطالعه‌ای مشابه، تنوع ژنتیکی 19 پایه اصلاح شده سیب جمع‌آوری شده از انگلستان و روسیه با استفاده از 100 آغازگر RAPD بررسی شد. نتایج نشان داد که از میان 100 آغازگر تنها 10 آغازگر توانستند تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام دهند (Dar et al. 2017). به علاوه، این 10 آغازگر در مجموع 160 باند در کل نمونه‌ها تکثیر و 136 باند چند شکل را نشان دادند که نسبت به نتایج تحقیق حاضر بیشتر بود. در تحقیقی مشابه، تنوع ژنتیکی ارقام سیب در کشمیر هندوستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی شد که نتایج 219 باند چندشکل را نشان داد (Dar et al. 2017). در مطالعه‌ای دیگر، تنوع ژنتیکی 15 رقم انگور با استفاده از 7 آغازگر ISSR و 7 آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت (Karimi et al. 2011). هفت آغازگر RAPD و هفت آغازگر ISSR به ترتیب 59 و 58 نوار با وضوح بالا و تکرارپذیر را تولید کردند که همگی چندشکلی را در بین ارقام نشان دادند و نسبت به نتایج پژوهش حاضر کمتر بود. هدف از تجزیه کلاستر، گروه‌بندی افراد مورد مطالعه بر اساس تشابه یا تفاوت‌ها باشد. افرادی که در یک گروه قرار می‌گیرند از نظر ژنتیکی مشابه بوده و افرادی که در دو طرف دندروگرام گروه‌بندی قرار می‌گیرند دارای اختلاف و تفاوت بیشتری از نظر ژنتیکی خواهند بود و از طرف دیگر امکان دورگ‌گیری بین ارقام با بیشترین تفاوت ژنتیکی، امکان ایجاد هتروزیس بیشتر و یا امکان انتقال صفات نادر را خواهد داشت (Odong et al. 2011). جدول 3 تشابه ژنتیکی بین همه جفت ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد را نشان می‌دهد (جدول 3).

### جدول 3. ماتریکس تشابه محاسبه شده توسط ضریب جاکارد

**Table 3. Similarity matrix using Jaccard coefficient**

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
M1	100											
M2	85	100										
M3	58	49	100									
M4	43	49	62	100								
M5	72	71	68	68	100							
M6	43	59	41	37	74	100						
M7	39	59	45	45	68	83	100					
M8	28	39	61	54	58	64	77	100				
M9	43	45	49	45	65	71	74	72	100			
M10	28	43	47	54	54	64	75	81	75	100		
M11	26	33	59	37	45	59	71	85	56	70	100	
M12	18	43	30	35	54	51	61	53	43	49	54	100

بر اساس روش UPGMA به کمک نرم افزار NTSYS-pc ver 2.2، ارقام مورد مطالعه به 2 گروه اصلی و 5 زیرگروه تقسیم شدند (شکل 2). گروه اول شامل ارقام گلاب اصفهان، گلمکانی، تربتی، روئین اسفراین و کمپوتی بودند. گروه دوم شامل ارقام علیموری خراسان، Dalago، Margenduft، Golden Delicious، Super Staymen، Low Red Roem، Beauty و Fuji Rossa بودند. به علاوه، زیرگروه اول شامل ارقام (گلاب اصفهان، گلمکانی و روئین اسفراین)، زیر گروه دوم شامل (تربتی و کمپوتی)، زیر گروه سوم شامل (علیموری خراسان، Dalago و Golden Delicious)، زیر گروه چهارم شامل (Margenduft، Super Staymen و Low Red Roem Beauty) و زیر گروه پنجم شامل رقم (Fuji Rossa) بودند. براساس ضریب تشابه، بیشترین شباهت ژنتیکی بین ارقام گلاب اصفهان و گلمکانی با ضریب تشابه 85%، بین ارقام Margenduft و Low Red Roem Beauty با ضریب تشابه 85% و بین ارقام علیموری خراسان و Dalago با ضریب تشابه 83% بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو رقم گلاب اصفهان و Fuji Rossa با ضریب تشابه 18% و پس از آن بین دو رقم گلاب اصفهان و Low Red Roem Beauty با ضریب تشابه 26% دیده شد. با توجه به نتایج به دست آمده می توان اظهار نمود که دو رقم (گلاب اصفهان-Fuji Rossa) و (گلاب اصفهان-Low Red Roem Beauty) موجود در کلکسیون منشاء ژنتیکی یکسانی ندارند. در مقابل، ارقام (گلاب اصفهان و گلمکانی)، (Margenduft و Golden Delicious) و (علیموری خراسان و Dalago) بیشترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند که می تواند بیانگر مشابه بودن اجداد این نمونهها باشد.

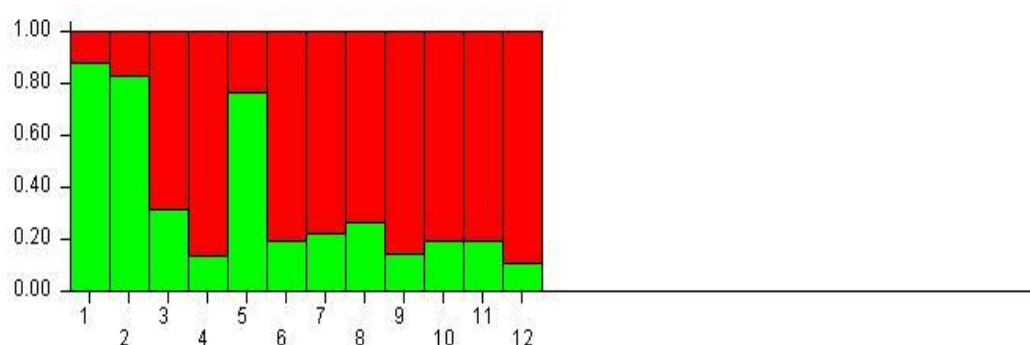


شکل 2. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای ارقام مختلف سیب بر اساس آغازگرهای RAPD

**Figure 2. Dendrogram obtained from cluster analysis of 12 apple cultivars using RAPD markers**

نتایج تجزیه خوشه‌ای بر مبنای مدل و بر اساس شاخص آماری Bayesian، به منظور پی بردن به ساختار فاصله‌ای جمعیت‌ها و با فرض اینکه مدل تبار<sup>8</sup> از نوع مخلوط<sup>9</sup> و مدل فراوانی آلی از نوع پیوسته باشد و نیز با فرض  $K=1$  تا  $K=5$  (K) نشاندهنده تعداد جمعیت است) نشان داد که در ارقام تجاری موجود 2 جمعیت ( $K=2$ ) وجود داشت که کاملاً منطبق بر نتایج بدست آمده از کلاستر بندی بر اساس روش UPGMA بود (شکل 3). عدم اختلاط مشاهده شده دو رنگ قرمز و سبز، این فرض را که تبار ارقام مورد مطالعه از نوع مخلوط می‌باشد رد کرد (شکل 3).

File name	Run #	K	Est. Ln prob. of data	Mean value of Ln likelihood	Variance of Ln likelihood
delta_run_1_f	1	1	-584.2	-560.7	46.8
delta_run_2_f	2	2	-949.7	-518.8	861.9
delta_run_3_f	3	3	-849.8	-538.1	623.5
delta_run_4_f	4	4	-586.3	-557.0	58.5
delta_run_5_f	5	5	-584.3	-556.3	56.0



شکل 3. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت ارقام تجاری سیب مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE. محور افقی بیانگر کدهای نمونه‌های مورد بررسی بر اساس جدول 1 و محور عمودی نشانگر سهم هر فرد از رنگ‌های مختلف می‌باشد

**Figure 3. Genetic structure analysis of commercial apple cultivars studied using STRUCTURE software. The horizontal and vertical lines shows the sample codes studied based on Table 1 and the proportion of each individual from different colors, respectively.**

<sup>8</sup> Ancestry model

<sup>9</sup> Admixture

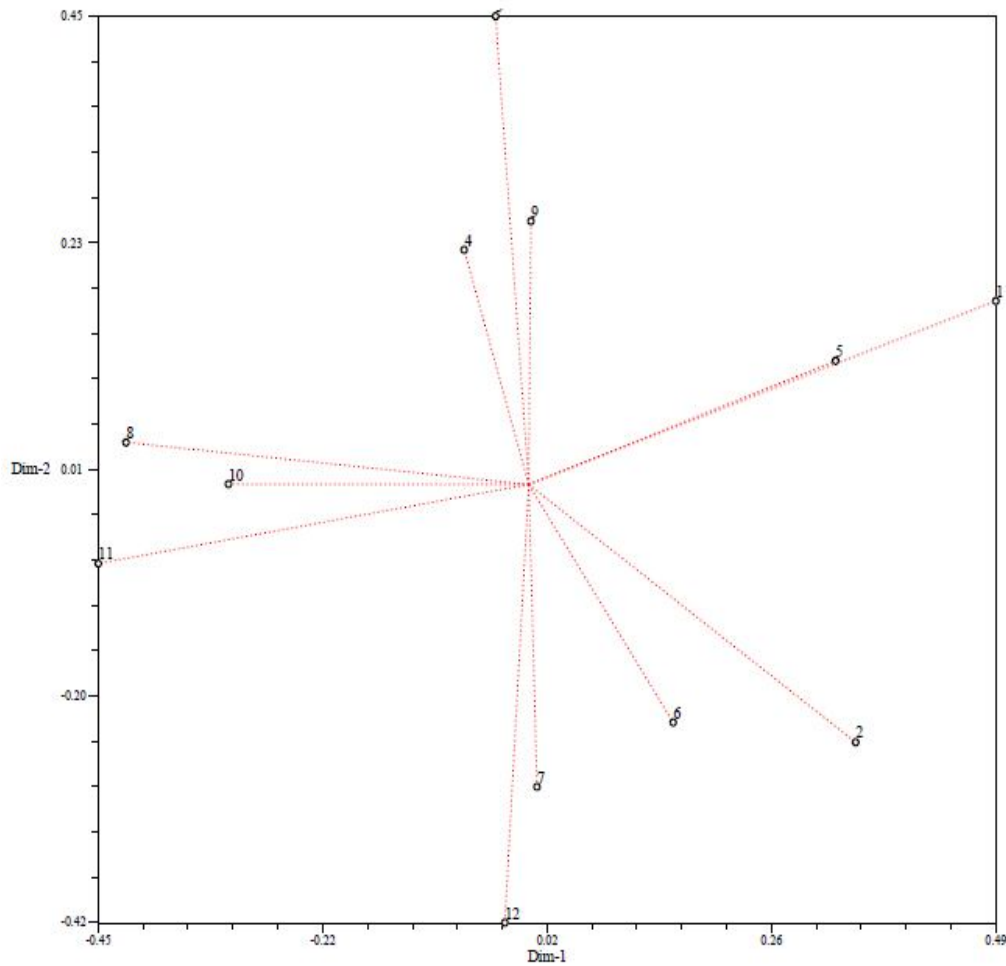
مطالعات متعددی در زمینه بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت درخت سیب انجام شده است. برای مثال، تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت ژرم پلاسماهای سیب اسپانیایی بر اساس روش گروه‌بندی Bayesian با استفاده از نشانگر ریزماهوره مورد ارزیابی قرار گرفت (Pereira-Lorenzo et al. 2017). نتایج حاکی از وجود دو جمعیت متمایز شامل ژنوتیپ‌های اسپانیایی (42%) و ژنوتیپ‌های خارجی بود که این نتایج هم راستا با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر می‌باشد. به علاوه، در مطالعه دیگر، ساختار ژنتیکی جمعیت سیب در بوسنی و هرزگوین با استفاده از نشانگر ریزماهوره مورد بررسی قرار گرفت (Gasi et al. 2013). نتایج بدست آمده نشان داد که نیمی از ارقام سیب محلی از ساریوو (52%) و شرق بوسنی (45%) خارج از ارقام با منبع بین‌المللی در حالیکه نیمی دیگر ارقام محلی با منشاء بین‌المللی بودند.

با استفاده از محاسبه مقادیر مشخصه<sup>10</sup>، بر اساس اولین محور با مقدار مشخصه، 0/97 و درصد واریانس 25/57 درصد و دومین محور با مقدار مشخصه 0/75 با درصد واریانس 19/64 درصد، از طرح اولین مختصات 2 مختصات برای ترسیم شکل PcoA استفاده شد (شکل 4). تجزیه به مختصات اصلی بر اساس 45/21 درصد اطلاعات نشانگری گروه‌بندی را انجام داد که انتظار نمی‌رود 100 درصد همخوانی در گروه‌بندی بین هر دو روش تجزیه PcoA و تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA وجود داشته باشد.

در ارتباط با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، این احتمال وجود دارد که ارقام سیب موجود در یک منطقه جغرافیایی، در اصل از مکان دیگری نشأت گرفته و تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. چنین نتایجی به این دلیل رخ می‌دهد که جابه‌جایی ژنوتیپ‌ها از منطقه‌ای به منطقه دیگر بیشتر بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی و جمع‌آوری ژنوتیپ در کلکسیون می‌باشد که این امر لزوم دقت در هنگام نام‌گذاری نمونه‌ها و همچنین استفاده از نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی به طور هم‌زمان را آشکار می‌سازد (Pereira-Lorenzo et al. 2017; Larsen et al. 2017).

به طور کلی، نشانگر RAPD به دلیل هزینه پایین، سادگی و نیاز به مقدار کم DNA نسبت به سایر نشانگرها هنوز به عنوان یکی از نشانگرهای مولکولی پر کاربرد برای تشخیص تنوع ژنتیکی، نزدیکی یا دوری ارقام و گونه‌ها در گیاهان بسیاری از جمله سیب و گونه‌های نزدیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dunemann et al. 1994). برای دقیق‌تر انجام شدن کار پیشنهاد می‌گردد که از تعداد آغازگرها و نمونه‌های بیشتری استفاده گردد و همچنین برای حصول اطمینان کامل از تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون طُرق، از نشانگرهای مولکولی دیگری با قدرت تفکیک‌پذیری بالا نظیر AFLP و SSR و همچنین نشانگرهای مورفولوژیک بهره گرفته شود و اطلاعات به دست آمده در کنار هم مورد تفسیر قرار گیرند.

<sup>10</sup> Eigenvalue



شکل 4. تجزیه به مختصات اصلی در 12 رقم تجاری سیب با استفاده از نشانگر RAPD. محورهای x و y به ترتیب مؤلفه‌های اول و دوم می‌باشند

**Figure 4. Principal coordinate analysis of 12 commercial apple cultivars using RAPD analysis. The x and y axis are the first and second coordinates, respectively**

## References

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Human Genet* 32, 314.

- Dar JA, Wani AA, Dhar MK (2017) Assessment of the genetic diversity of apple (*Malus× domestica* Borkh.) cultivars grown in the Kashmir Valley using microsatellite Markers. J King Saud Uni Sci 31, 194-201.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini preparation: version II. Plant Mol Biol Rep 1, 19-21.
- Dunemann F, Kahnau R, Schmidt H (1994) Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD 'fingerprinting' of cultivars and wild species. Plant Breed 113, 150-159.
- Fagoria GL, Ranwah BR, Saharan V (2013) Diversity analysis in custard apple using RAPD analysis. Indian J Horticult 70, 279-282.
- Farrokhi J, Darvishzadeh R, Naseri L et al. (2011) Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars and landraces using simple sequence repeat markers. Australian J Crop Sci 5, 815.
- FAOSTAT (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Gasi F, Simon S, Pojskic N et al. (2013) Evaluation of apple (*Malus× domestica*) genetic resources in Bosnia and Herzegovina using microsatellite markers. HortScience 48, 13-21.
- Goulao L, Oliveira CM (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus× domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122, 81-89.
- Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M (2015) Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. Genet Res Inter 2015, 1-14.
- Guimaraes JFR, Nietsche S, Costa MR et al. (2014) Genetic diversity in sugar apple (*Annona squamosa* L.) by using RAPD markers. Rev Ceres 60, 428-431.
- Jarausch W, Saillard C, Helliot B et al. (2000) Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. Mol Cell Probes 14, 17-24.
- Karimi MR, Dehviri V, Hajiyani M (2011) Genetics diversity of some grape genotypes by ISSR and RAPD markers. European J Horticult Sci 76, 201-207.
- Kenis K, Keulemans J (2005) Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus× domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. Mole Breed 15, 205-219.

- Larsen B, Toldam-Andersen TB, Pedersen C, Ørgaard M (2017) Unravelling genetic diversity and cultivar parentage in the Danish apple gene bank collection. *Tree Genet Genomes* 13, 14.
- Mokhtarian PL, Van Herick D (2016) Quantifying residential self-selection effects: A review of methods and findings from applications of propensity score and sample selection approaches. *J Transp Land Use* 9, 9-28.
- Odong TL, Van Heerwaarden J, Jansen J et al. (2011) Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data? *Theor Appl Genet* 123, 195-205.
- Okcu M, Kalkışım Ö, Okcu Z et al. (2015) Determination of genetic diversity among wild grown apples from eastern black sea region in Turkey using ISSR and RAPDs markers. *Erwerbs-Obstbau* 57, 171-177.
- Omasheva ME, Pozharsky AS, Smailov BB et al. (2018) Genetic diversity of apple cultivars growing in Kazakhstan. *Russian J Genet* 54, 176-187.
- Oraguzie NC, Gardiner SE, Basset HC et al. (2001) Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *J Am Soc Hortic Sci* 126, 318-328.
- Patzak J, Paprštein F, Henychová A, Sedlák J (2012) Comparison of genetic diversity structure analyses of SSR molecular marker data within apple (*Malus × domestica*) genetic resources. *Genome* 55, 647-665.
- Pereira-Lorenzo S, Urrestarazu J, Ramos-Cabrera AM et al. (2017) Analysis of the genetic diversity and structure of the Spanish apple genetic resources suggests the existence of an Iberian genepool. *Annal Appl Biol* 171, 424-440.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Roche P, Alston FH, Maliepaard C et al. (1997) RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (Sd1) in apple. *Theor Appl Genet* 94, 528-533.
- Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E et al. (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol Breed* 6, 125-134.
- Savelyeva EN, Kudryavtsev AM (2015) AFLP analysis of genetic diversity in the genus *Mallus* Mill. (Apple). *Russian J Genet* 51, 966-973.

- Soengas P, Velasco P, Padilla G et al. (2006) Genetic relationships among *Brassica napus* crops based on SSR markers. HortScience 41, 1195-1199.
- Urrestarazu J, Denancé C, Ravon E et al. (2016) Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. BMC Plant Biol 16, 130.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J et al. (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nature Genet 42, 833–839.