

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های بادام و تعیین فاصله بین ۱۶ منطقه جمع‌آوری نمونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

اله داد سلیم پور^{۱*}، علی عبادی^۲، محمدرضا فتاحی مقدم^۳ و مهدی حدادی‌نژاد^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۶ - تاریخ تصویب: ۸۸/۹/۹)

چکیده

بادام یکی از محصولات مهم خشکباری در جهان است و ایران یکی از مناطق مهم انتشار این گیاه محسوب می‌شود. در این تحقیق از نشانگرهای مولکولی RAPD جهت تعیین تنوع و سطوح خویشاوندی بین ۵۶ ژنوتیپ جمع‌آوری شده بادام استفاده شد. تعداد ۱۶ آغازگر تصادفی در واکنش PCR در مجموع ۱۷۱ باند DNA ایجاد کردند که ۱۶۸ باند چند شکل بود. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس حضور و عدم حضور باند و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام شد. با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌ها در حد تشابه ۴۴٪ به دو زیرگروه عمده تقسیم شدند. بر اساس ماتریس تشابه بیشترین تشابه (۷۲٪) بین نمونه‌های AV228 و AV164 مشاهده شد که هر دو از ژنوتیپ‌های ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران بودند. کمترین تشابه (۲۹٪) بین ژنوتیپ AV123 از ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی و ژنوتیپ D8 از آذرشهر مشاهده شد. در آنالیز منطقه‌ای، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی کل (Ht) مربوط به آغازگرهای BA17، BA6 و BD10 به میزان ۳۹٪ بود و کمترین آن مربوط به آغازگر BA14 به میزان ۲۷٪ بود. نتایج ماتریس تشابه بیشترین تشابه ژنتیکی را بین مناطق GS (جزیره اسلامی) و S (سرج) به میزان ۹۵٪ نشان داد که هر دو منطقه از آذربایجان شرقی بودند. نتایج تجزیه کلاستر مناطق نشان داد در بین نمونه‌های مناطق مختلف نیز این دو نمونه کمترین فاصله (۵٪) را داشتند. همچنین دو نمونه AV (از ایستگاه تحقیقات) و MAH (از منطقه مهارلو) بیشترین فاصله (۶۰٪) را داشتند. نتایج حاکی از وجود تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌ها بود که نشان‌دهنده زمینه ژنتیکی متفاوت آنها می‌باشد. بنابراین نشانگرهای RAPD به خوبی قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های بادام بوده و با توجه به تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها می‌توان از آنها جهت برنامه‌های اصلاحی به عنوان والد استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بادام، تنوع ژنتیکی، RAPD، اصلاح.

amygdalus یاد می‌شود. از خانواده گلسرخیان
(Rosaceae)، زیر خانواده Prunoidae، جنس *Prunus* و
زیرجنس *Amygdalus* می‌باشد؛ (Rasulzadegan, 1991)

مقدمه

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* L. می‌باشد که در
منابع از آن با نام *Prunus communis* یا *Prunus*

محققین برای بررسی شش رقم بادام از نشانگرهای ملکولی RAPD و صفات مورفولوژیک استفاده نمودند و توانستند تنوع ژنتیکی ارقام را مشخص سازند و همچنین مقایسه آنها بین نشانگرهای ملکولی و مورفولوژیک نشان داد که تفاوت زیادی در گروه‌بندی ارقام وجود دارد که به احتمال زیاد مربوط به ماهیت چند ژنی صفات مورد بررسی می‌باشد. Kadkhodai & Tabaei ahgdaei (2004) با استفاده از نه آغازگر تصادفی RAPD، تنوع ژنتیکی را در ۱۵ رقم مهم بادام در ایران بررسی کردند. نتایج این تحقیق تنوع بالایی را در ارقام مورد مطالعه نشان داد و نشانگر بکاررفته به خوبی توانست ارقام را از یکدیگر تفکیک نماید. MirAli & Nablusi (2002) با استفاده از نشانگر RAPD روابط ژنتیکی بین ۱۹ رقم بادام را مورد بررسی قرار دادند. گروه‌بندی حاصله بر اساس نشانگر RAPD تا حدودی با منشأ جغرافیائی ارقام مطابقت داشت. در رابطه با آنالیز منطقه‌ای ژنوتیپ‌ها و ارقام در گیاهان آزمایش‌های متعددی صورت گرفته است. Ruter et al. (1990) تنوع ژنتیکی داخل و بین کلکسیون‌های مختلف ژرم‌پلاسمی پکان حاصل از رویشگاه‌های اختصاصی را توسط نشانگرهای آیزوزایمی با توده‌های طبیعی آن مورد مقایسه قرار دادند. بیشترین تنوع ژنتیکی را در درون توده‌های طبیعی و کمترین تنوع را در کلکسیون‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های اختصاصی گزارش کردند. Pejmanmehr (2006) تنوع ژنتیکی میان شش توده زیره پاری را با نشانگرهای RAPD بررسی کرد. نتایج نشان داد که توده‌های سیرچ و درین در استان کرمان بیشترین شباهت و توده‌های الموت قزوین و سقفی اصفهان کمترین شباهت ژنتیکی را داشتند. Shim & Jorgensen (2000) به مقایسه و بررسی تنوع در ساختار ژنتیکی درون و بین پنج نمونه وحشی هویج و پنج نمونه از ارقام اهلی شده آن توسط نشانگرهای AFLP پرداختند. آنها نتیجه گرفتند که ارقام وحشی از میزان هتروزیگوسیتی بالاتری نسبت به ارقام اهلی برخوردارند. Mohanty et al. (2002) ژنوم کلروپلاستی ۲۵ جمعیت از گونه *Prunus spinosa* را در اروپا بوسیله PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که تنوع در جمعیت‌های جنوب اروپا بیشتر از شمال

(Webster & Looney, 1996) بادام دارای بیش از ۳۰ گونه می‌باشد که ۲۷ گونه آن در ایران شناسائی شده است. بر اساس تقسیم‌بندی اسپاچ^۱ گونه‌های بادام در پنج گروه قرار می‌گیرند. تعداد کروموزوم‌های پایه در بادام برابر با هشت است. اکثر گونه‌های آن دیپلوئید می‌باشند. این گیاه عمدتاً دگرگشن و از نظر ژنتیکی ناخالص می‌باشد. امروزه با پیشرفت علم و تکنولوژی استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی و تفکیک دقیق ژنوتیپ‌ها و ارقام امکان‌پذیر شده است. در گذشته شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی ارقام بر پایه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و ویژگی‌ها و رفتارهای زراعی آنها بوده است (Anonymous, 1976; Schmidt et al., 1985). این ویژگی‌ها از این جهت که تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند و برای حصول نتایج دقیق احتیاج به یک جمعیت شامل تعداد زیادی گیاهان بالغ است، محدودیت‌هایی را ایجاد می‌کنند. امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA که برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات انگشتنگاری^۲ مورد استفاده قرار می‌گیرند، گسترش بسیار یافته‌اند. از معروف‌ترین نشانگرهای ملکولی می‌توان به SSR و AFLP (Wunsh, 2003; Struss et al., 2003; Hormaza & اشاره کرد. در بین این نشانگرها RAPD احتیاج به تجهیزات آزمایشگاهی ساده تری دارد و روش نسبتاً مطلوبی برای شناخت و مطالعه تنوع ژنتیکی می‌باشد. البته تکنیک RAPD دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم تکرارپذیری و حساسیت به شرایط آزمایشی می‌باشد که می‌توان با تکرار آزمایش‌ها از صحت نتایج اطمینان بیشتری پیدا کرد (Williams et al., 1990). نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی درختان میوه مختلف مثل سیب (Oraguzie et al., 2001)، انار (Sarkhosh et al., 2001) و هلو (Cheng, 2007) به کار برده شده است. Rayan et al. (2001) گزارش کردند که از نشانگرهای مولکولی DNA می‌توان در برنامه‌های اصلاحی بادام برای بررسی تنوع ژنتیکی، شناسایی صفات باغی، تهیه نقشه‌های پیوستگی و شناسایی ارقام خودسازگار استفاده کرد. این

1. Spach
2. Fingerprinting

ژنوتیپ‌های موجود در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران و همچنین تعدادی از گونه‌های وحشی مانند *P. scoparia* و ژنوتیپ‌های بین گونه‌ای مانند قنس و ارژن انتخاب شدند. از ژنوتیپ‌های انتخابی تعداد ۳۰-۵۰ عدد بذر و همچنین پیوندک تهیه شد (جدول ۱). پس از کاشت آنها در گلخانه در نهایت حدود ۴۰۰۰ گیاه سالم به ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی منتقل شدند. از هر خانواده به طور جداگانه ۳۰ گیاه با فاصله بین خطوط ۳ متر و روی خطوط ۵۰ سانتی‌متر کشت گردیدند. در طی دوره رشد عملیات داشت به طور کامل صورت گرفت. جهت مطالعه روابط ژنتیکی با توجه به تعداد زیاد افراد و خانواده‌ها، ۵۶ خانواده که نسبت به بقیه از قدرت رشد و استقرار بهتری برخوردار بودند،

اروپا می‌باشد. در این تحقیق در نظر است به بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های بومی بادام، جهت ارزیابی پتانسیل‌های آنها و انتخاب والدین مناسب برای دورگ‌گیری در برنامه‌های اصلاحی پایه‌های بادام پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه ابتدا ۱۵۰ خانواده بادام از نظر قدرت رشد، تحمل به شرایط خشکی و شرایط غرقابی از استان‌های آذربایجان شرقی (مناطقى مانند اشان، تیل، کافی‌الملک، جزیره اسلامی و ...) و همچنین در استان فارس (مناطقى مانند استهبان، نیریز، مهارلو) و برخی از

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در آزمایش مولکولی RAPD

شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	علامت اختصاری	منطقه جمع‌آوری	شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	علامت اختصاری	منطقه جمع‌آوری
۱	جزیره اسلامی ۱۰	GS10	مراغه	۲۹	سرج ۲	S2	مراغه
۲	دریان ۲	D2	"	۳۰	کوشک ۲	KOSH2	مراغه
۳	اشان ۸	ESH8	آذرشهر	۳۱	سرج ۵	S5	مراغه
۴	جزیره اسلامی ۱۳	GS13	مراغه	۳۲	تلخ مهارلو	MAH	مهارلو
۵	اشان ۵	ESH5	آذرشهر	۳۳	تلخ استهبان	ES	استهبان
۶	جزیره اسلامی ۱۲	GS12	مراغه	۳۴	کافی‌الملک ۱	KAFI1	آذر شهر
۷	جزیره اسلامی ۶	GS6	"	۳۵	باغ بهرام	BAH	نی ریز
۸	سرج ۶	S6	"	۳۶	علی بیگلو ۴	BIG4	آذر شهر
۹	جزیره اسلامی ۳	GS3	"	۳۷	اشان ۲	ESH2	"
۱۰	جزیره اسلامی ۹	GS9	"	۳۸	دریان ۴	D4	"
۱۱	جزیره اسلامی ۵	GS5	"	۳۹	سرج ۴	S4	مراغه
۱۲	جزیره اسلامی ۲	GS2	"	۴۰	تیل ۱	TIL1	آذرشهر
۱۳	اسکو ۶	OS6	آذرشهر	۴۱	اسکو ۱	OS1	"
۱۴	جزیره اسلامی ۱۶	GS16	مراغه	۴۲	اشان ۳	ESH3	آذرشهر
۱۵	رحیمی ۱	R1	آذرشهر	۴۳	A.V5	AV5	ایستگاه تحقیقات گروه
۱۶	سرج ۱	S1	مراغه	۴۴	A.V157	AV157	ایستگاه تحقیقات گروه
۱۷	دریان ۸	D8	آذرشهر	۴۵	A.V124	AV124	ایستگاه تحقیقات گروه
۱۸	سرج ۱۰	S10	مراغه	۴۶	A.V164	AV164	ایستگاه تحقیقات گروه
۱۹	دریان ۹	D9	آذرشهر	۴۷	A.V80	AV80	ایستگاه تحقیقات گروه
۲۰	اسکو ۱۰	OS10	"	۴۸	A.V228	AV228	ایستگاه تحقیقات گروه
۲۱	دریان ۶	D6	"	۴۹	A.V123	AV123	ایستگاه تحقیقات گروه
۲۲	A.V22	AV22	ایستگاه تحقیقات گروه	۵۰	دریان ۷	D7	آذرشهر
۲۳	تلخ نی ریز ۲	NE2	نی ریز	۵۱	علی بیگلو ۳	BIG3	آذرشهر
۲۴	A.V137	AV137	ایستگاه تحقیقات گروه	۵۲	جزیره اسلامی ۸	GS8	آذر شهر
۲۵	تلخ نی ریز ۳	NE3	نی ریز	۵۳	اسکو ۷	OS7	آذرشهر
۲۶	تلخ نی ریز ۱	NE1	نی ریز	۵۴	کوشک ۱	KOSH1	مراغه
۲۷	A.V89	AV89	ایستگاه تحقیقات گروه	۵۵	اشان ۴	ESH4	آذرشهر
۲۸	سنگی شیرین	SAN	مهارلو	۵۶	تلخ استهبان ۲	ES2	استهبان

کمپلکس^۱ مواد واکنش و یک میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر و یک میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ ng/μL و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. تمام اجزاء PCR به جز DNA با هم مخلوط گردید و سپس در لوله‌های حاوی DNA نمونه‌ها تقسیم شده و مخلوط واکنش در هر لوله به خوبی با DNA مخلوط گردید. واکنش PCR با چرخه دمائی به صورت یک چرخه ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C، تعداد ۵ چرخه به صورت ۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۳۹°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و تعداد ۲۵ چرخه به صورت ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۷°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Icyler Bio-Rad (USA) انجام گردید. پس از PCR، محصول آن به دمای ۴°C درجه سانتی گراد منتقل شد و تا زمان اضافه کردن بافر بارگذاری و الکتروفورز در این دما باقی ماند.

الکتروفورز فرآورده‌های PCR

جهت تفکیک فرآورده‌های حاصل از تکثیر، از ژل آگارز ۱٪/۱/۲، در بافر 1X TBE استفاده شد. چون تعداد نمونه‌ها ۵۶ عدد بود و در یک سینی الکتروفورز قرار نمی‌گرفتند، ابتدا ۳۶ نمونه در یک سینی به همراه DNA Ladder (SM0323) محصول شرکت فرمنتاز^۲ الکتروفورز شد و ۲۰ نمونه باقی مانده به همراه ۲ نمونه شاهد (شماره ۶ یا جزیره اسلامی ۱۲ و شماره ۳۴ یا کافی‌الملک ۱) و DNA Ladder به کار برده شدند. الکتروفورز نهائی همه نمونه‌های مربوط به یک آغازگر در ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ۲ ساعت، در تانک الکتروفورز انجام شد. در پایان پس از رنگ آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه با اتیدیوم بروماید و حذف رنگ اضافه با آبشویی به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت، سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مدل Bio Rad از ژل عکسبرداری شد و از تصاویر به دست آمده جهت تعیین میزان چند شکلی استفاده شد.

انتخاب و از هر خانواده یک فرد که آن هم از بقیه افراد آن خانواده از لحاظ قدرت رشد برتر بود، به عنوان نماینده جهت مطالعات ملکولی انتخاب شد. جهت انجام آزمایش‌های ملکولی فقط از ژنوتیپ‌های اهلی استفاده شد و گونه‌های وحشی به دلیل رشد کم در بین نمونه‌های انتخابی قرار نگرفتند.

به این منظور در اوایل بهار سال ۱۳۸۷ از برگ‌های تازه و جوان نمونه برداری و نمونه‌های جمع‌آوری شده در شرایط جعبه حاوی یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از انجماد با ازت مایع، پودر شده و سپس در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد ۵۶ نمونه DNA از ژنوتیپ‌های برتر انتخابی استخراج شده و با آغازگرهای تصادفی RAPD بررسی شدند (جدول ۲).

استخراج DNA

از ۵۶ نمونه برگ، استخراج DNA با استفاده از روش Murray & Thompson (1980) با تغییرات جزئی صورت گرفت. کیفیت نمونه‌های DNA با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBE، 1X تعیین شد. همچنین کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری در دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Perkin Elmer انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

۱۰۰ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی از سری A تا E، TIB MOLBIOL شرکت سیناژن روی DNA دو ژنوتیپ (جزیره اسلامی ۱۰ و تلخ استهبان ۱) که تفاوت‌های ظاهری بارزی داشتند بررسی گردید که از بین آنها ۱۶ آغازگر که چند شکلی بیشتری ایجاد کردند انتخاب شدند. سپس آغازگرهای انتخاب شده برای تمام ارقام و ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس روش Williams et al. (1990) با تغییر جزئی انجام شد. جهت استفاده از مواد واکنش از کمپلکس آماده خریداری شده از شرکت سیناژن استفاده شد که شامل تمام اجزای واکنش به استثنای DNA و آغازگر بود. حجم نهائی مخلوط واکنش ۱۵ میکرولیتر بود که ۷/۵ میکرولیتر از

1. dNTPs = 0.4mM, Tris-HCl pH 8.5 = 150mM, MgCl₂=3 mM, (NH₄)₂SO₄=40mM, Taq DNA polymerase=0.05 units/μL

2. Fermentas

محاسبات آماری

ژنوتیپ D8 (دریان ۸) بوده است که اولی از کلکسیون ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران و نمونه دوم از آذرشهر جمع‌آوری شده بود. بیشترین شباهت (۰/۷۲) بین دو ژنوتیپ AV164 و AV228 بود که هر دو از ایستگاه تحقیقات گروه باغبانی انتخاب شده بودند.

حداقل تشابه حاصل از تجزیه خوشه‌ای به دست آمده بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از استانهای شمال‌غربی، جنوبی و دو کلکسیون تحقیقاتی و تجاری کشور ۴۳٪ بود. به طوریکه ژنوتیپ‌ها در این فاصله به دو دسته عمده تقسیم شدند. نکته جالب اینکه دو ژنوتیپ ESH8 و GS10 با تشابه ۵۵٪ همراه با یکدیگر یک گروه را تشکیل داده و ۵۴ ژنوتیپ دیگر که شامل نمایندگان تمام مناطق مورد بررسی بودند در دسته مقابل قرار گرفتند. این وضعیت می‌تواند ناشی از وجود تفاوت‌های ژنتیکی عمده بین این دو ژنوتیپ با سایرین باشد. این دو ژنوتیپ از لحاظ صفات مورفولوژیکی چون عادت رشد و قدرت رشد از یکدیگر متمایز بودند.

گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای در فاصله ۰/۴۴ تشابه، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به دو زیر گروه عمده تقسیم نمود که در یک زیرگروه آن، ژنوتیپ‌هایی از استان‌های آذربایجان شرقی (D7, D4, S4, SH3, KOSH1, TIL1, OS1, GS8, OS7, ESH2, ESH3, BIG3), فارس (ES2) و کلکسیون تحقیقاتی گروه علوم باغبانی (AV) قرار داشت. ژنوتیپ ES2 از استهبان فارس در حد تشابه ۴۷٪ از سایر ژنوتیپ‌های این زیر گروه جدا شده و به تنهایی در دسته‌ای جداگانه قرار گرفت. برخورداری از منشأ ژنتیکی یکسان و والدین مشترک در ژنوتیپ‌های موجود در این زیرگروه می‌تواند توجیهی برای وجود تشابه میان آنها باشد و همچنین تفاوت‌های اختصاصی مثل رشد در طول و عرض جغرافیایی متفاوت با یکدیگر و اثر شرایط محیطی متفاوت بر آنها را می‌توان دلیل تفکیک و جدایی آنها دانست. چرا که استهبان فارس در عرض ۲۹ درجه و با ارتفاع ۱۸۲۰ متر از سطح دریا قرار دارد و استان آذربایجان شرقی که منشأ دیگر ژنوتیپ‌ها به حساب می‌آید در عرض‌های ۳۷ درجه شمالی و ۴۵ درجه شرقی با متوسط ارتفاع ۱۴۰۰ متر از سطح دریا قرار

پس از انجام آزمایش RAPD، برای بررسی چند شکلی بین نمونه‌ها تنها نتایج آغازگرهایی مورد ارزیابی قرار گرفتند که از چند شکلی بالایی برخوردار بودند. به حضور یک باند خاص عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس یک و صفر (۵۶×۱۶۸)، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (ver. 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد^۱ محاسبه گردید. در این تحقیق آزمون پلات با استفاده از داده‌های مولکولی و با استفاده از نرم افزار NTSYS (Ver. 2.02) انجام شد.

تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA^۲ به دست آمد. در آنالیز منطقه‌ای نمونه‌ها، تعداد آلل‌های مشاهده شده (na)، تعداد آلل‌های موثر (ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (h)، شاخص شانون برای هر آغازگر (I)، احتمال همسانی (PI)، هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون مناطق (Hs) و شاخص تنوع بین مناطق (Gst) برای هر آغازگر و همچنین میانگین آنها با استفاده از برنامه PopGene.Ver32 به دست آمد و فاصله جمعیت‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی Nei (1978) محاسبه شد.

نتایج و بحث

در مجموع واکنش‌های RAPD انجام شده بر روی ۵۶ نمونه بادام با استفاده از ۱۶ آغازگر تصادفی ۱۷۱ باند DNA تکثیر کردند که از بین آنها تعداد ۳ باند در بین تمام ژنوتیپ‌ها یک شکل بوده و باقیمانده آنها یعنی ۱۶۸ قطعه چند شکلی نشان دادند. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه چند شکل تکثیر شده (۱۴ قطعه) با استفاده از آغازگر TIBM BA5 و کمترین آن (۷ قطعه) با آغازگر TIBM BD6 به دست آمد. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز قرار داشتند (شکل ۱ و ۲). نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۲۹) بین AV123 و

1. Jaccard Similarity Coefficient
2. Unweighted Pair – Group Method using an Arithmetic Average

هر قدر که در زیرگروه قبلی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های استان‌ها و کلکسیون تحقیقاتی وجود داشت، در این زیرگروه اختلاط شدیدی دیده می‌شود، به طوری که امکان دسته‌بندی بر اساس منطقه جغرافیای مقدور نمی‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای در مورد ژنوتیپ‌های حاصل از مقایسه دو کلکسیون تحقیقاتی و تجاری کشور نشان می‌دهد کلکسیون تحقیقاتی از تنوع بیشتری نسبت به کلکسیون تجاری برخوردار می‌باشد که علت آن را می‌توان به کارگیری روش‌های علمی و صحیح نمونه‌گیری و مقدور بودن امکان تبادل ژرم‌پلاسم با دیگر مناطق تنوع دنیا دانست. Ruter et al. (1990) نیز به وجود تفاوت در میزان تنوع ژنتیکی بین کلکسیون‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های اختصاصی و توده‌های طبیعی اشاره نموده‌اند.

به طور کلی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد تنوع موجود در بادام‌های مناطق شمال‌غرب و جنوب ایران (ابتدا و انتهای رشته کوه زاگرس) را می‌توان به دو قسمت تقسیم نمود. در قسمت اول تقسیم‌بندی مولکولی با تقسیم‌بندی جغرافیایی همخوانی دارد و عوامل ژنتیکی و محیطی پایه اصلی تنوع را ایجاد نموده است. در این قسمت‌ها ژنوتیپ‌هایی که بر اساس زمینه ژنتیکی یا تأثیرپذیری از شرایط محیطی خاص دچار تنوع شده‌اند، قابل تشخیص‌اند. این ژنوتیپ‌ها با سطح تنوع (تشابه یا فاصله) نزدیک به یکدیگر در شمال و جنوب کشور و در مناطق بادام کاری قابل مشاهده‌اند. این تنوع در کلکسیون تحقیقاتی بادام گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران به خوبی جمع‌آوری شده و مورد استفاده قرار گرفته است (کروشه ۱، شکل ۳).

در قسمت دوم که با وجود در بر گرفتن بخش عمده‌ای از ژنوتیپ‌های بادام شمال‌غرب و جنوب کشور، تطابقی بین گروه‌بندی مولکولی و منطقه جغرافیایی دیده نمی‌شود، علاوه بر عوامل ژنتیکی و محیطی، عامل انتخاب و ورود ژنوتیپ از سایر نقاط کشور و حتی دیگر کشورها دخالت دارد به طوری که به احتمال زیاد ارقامی از شمال‌غرب کشور وارد محدوده بادام کاری جنوب گردیده باشد و یا بالعکس شده است. در این مناطق علی‌رغم منشأ متفاوت نمونه‌های جمع‌آوری شده، شباهت‌هایی

گرفته است. وجود تنوع بالا بین ژنوتیپ‌ها را می‌توان به دلیل تنوع شرایط آب و هوایی ایران و وجود منابع غنی ژنتیکی بادام در آن دانست. هفت ژنوتیپ مربوط به کلکسیون تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران نیز در این زیر گروه قرار گرفتند که پنج تای آنها به هم نزدیک‌ترند و در یک دسته قرار گرفته‌اند و در بین آنها دو ژنوتیپ AV164 و AV228 بیشترین تشابه بین دو ژنوتیپ (از بین کل ژنوتیپ‌های مورد بررسی) را به میزان ۷۲٪ نشان دادند و دو ژنوتیپ دیگر آنها نیز با ژنوتیپی از دریاان آذربایجان شرقی (D7) و در حد تشابه ۶۷٪ یک دسته مجزا، اما نزدیک به دیگر ژنوتیپ‌های کلکسیون تحقیقاتی ایجاد نمودند. نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً این عده از ژنوتیپ‌های کلکسیون تحقیقاتی از آذربایجان شرقی منشأ گرفته‌اند و دسته‌بندی موجود بین آنها احتمالاً به دلیل تلاقی آنها با یکدیگر و ایجاد ژنوتیپ‌های جدیدتر نسبت به ژنوتیپ‌های والدین می‌باشد.

به طور کلی در این زیر گروه دسته‌بندی مولکولی ژنوتیپ‌ها با دسته‌بندی منطقه‌ای آنها تطابق داشت. در زیر گروه دوم وضعیتی مشابه زیر گروه اول حاکم بود با این تفاوت که علاوه بر دیگر ژنوتیپ‌های استان‌های شمال‌غربی، جنوبی و کلکسیون تحقیقاتی، یک ژنوتیپ از کلکسیون تجاری بهرام واقع در استان فارس نیز به این زیر گروه اضافه شده بود. از بین هشت ژنوتیپ استان فارس چهار ژنوتیپ (ES, NE2, SAN, NE1) با وجود درجه تشابه‌های متفاوت، در یک دسته در کنار هم قرار گرفته‌اند و کمی بیش از ۵۰٪ تشابه نشان می‌دهند و دیگر ژنوتیپ‌های آن در دسته‌های دیگر مربوط به شمال‌غرب کشور قرار گرفتند به طوری که ژنوتیپ تجاری حاصل از کلکسیون تجاری بهرام با ژنوتیپی از سرچ (S5) مقدار تشابهی به میزان ۵۳٪ داشت. از علل اختلاط ژنوتیپ‌های استان‌های فارس و آذربایجان شرقی می‌توان به جابجایی‌های متعدد حاصل از انتخاب و انتقال ژنوتیپ‌ها توسط باغداران و ... اشاره نمود. حضور ژنوتیپ BAH از یک کلکسیون تجاری که عمدتاً ملاک انتخاب در آنها صفات برتر میوه می‌باشد و بروز تشابه با ژنوتیپی از آذربایجان شرقی نیز نمونه بارزی از این موضوع می‌باشد.

چون بعضی از ژنوتیپ‌های این آزمایش از کلکسیون‌هایی مانند ایستگاه تحقیقات گروه باغبانی دانشگاه تهران انتخاب شده بودند که آنها نیز حاصل انتخاب‌های قبلی از دیگر مناطق بوده اند. لذا احتمال اینکه این ژنوتیپ‌ها دارای منشأ یکسان باشند وجود داشته و احتمالاً به همین دلیل از لحاظ ژنتیکی شباهت بیشتری با هم نشان دادند. همچون ژنوتیپ‌های AV164 و AV228 از کلکسیون ایستگاه گروه و ESH و D و R از آذربایجان شرقی که شباهت زیادی با هم دارند.

نتایج نشان داد نشانگرهای RAPD ژنوتیپ‌ها را از هم به خوبی تفکیک نمود و در خوشه‌بندی صورت گرفته، ژنوتیپ‌های بادام به خوبی تفکیک شدند. توانایی نشانگرهای RAPD در تفکیک گونه‌ها، ارقام و بررسی تنوع ژنتیکی روی بسیاری گیاهان از جمله درختان میوه اثبات گردیده است. Bellini et al. (1997) توانستند تعداد ۲۰ ژنوتیپ آلوی ژاپنی (*P. salicina*) و ۷ ژنوتیپ آلوی اروپایی (*P. domestica*) را با کاربرد فقط ۴ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی به خوبی از یکدیگر تفکیک نمایند. ضمن اینکه یک ژنوتیپ زردآلو (*P. armeniaca*) و یک ژنوتیپ هلو (*P. persica*) نیز در این آزمایش از

بین آنها وجود دارد که احتمالاً بدلیل اختلاط و جابجایی ژنوتیپ‌ها بین استانها می‌باشد (کروشه ۲، شکل ۳). در محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیکی که نشان‌دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه داده‌های RAPD و دندروگرام می‌باشد، مقدار $r = 0.91$ به دست آمد که نشان‌دهنده همبستگی مناسب ماتریس تشابه و دندروگرام می‌باشد. در کل وجود شباهت‌های ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های برخاسته از یک منطقه با توجه به روش تکثیر بذری بادام در ایران منطقی به نظر می‌رسد. ضمن اینکه هر چه محل جمع‌آوری دو نمونه به یکدیگر نزدیک‌تر بوده است تفاوت آنها نیز کمتر بوده است که نمونه آنها ژنوتیپ‌های AV164 و AV228 یا ESH2 و ESH4 و یا D6 و R1 می‌باشد. باید توجه داشت که ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده به مناطق مختلف تعلق دارند ولی با این وجود، چنین ارتباطی بین ژنوتیپ‌ها دیده می‌شود. به طور کلی ژنوتیپ‌هایی که از یک منطقه جمع‌آوری شدند از نظر تشابه به هم نزدیک‌تر بودند که این قرابت ژنتیکی گیاهان یک منطقه را می‌رساند و نشان‌دهنده این مطلب است که از نظر والد به یکدیگر نزدیک‌تر هستند و یا اینکه دارای والد مشترک می‌باشند.

جدول ۲- نام، توالی و نتایج مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

ردیف	نام آغازگر	توالی		تعداد کل قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی
		۳'	۵'			
۱	TIBMBA-05	TGCGTTCCAC		۱۴	۱۴	۱۰۰
۲	TIBMBA-06	GGACGACCGT		۱۱	۱۱	۱۰۰
۳	TIBMBA-14	TCGGGAGTGG		۱۳	۱۲	۹۲
۴	TIBMBA-17	TGTACCCCTG		۱۱	۱۱	۱۰۰
۵	TIBMBA-05	GGGCCGAACA		۱۴	۱۲	۷۸
۶	TIBMBA-08	TCGTGGAAGG		۱۱	۱۱	۱۰۰
۷	TIBMBA-09	AGGCCGGTCA		۱۱	۱۱	۱۰۰
۸	TIBMBA-12	TTCGGCCGAC		۸	۸	۱۰۰
۹	TIBMBA-16	TCGGCACCGT		۱۰	۱۰	۱۰۰
۱۰	TIBMBA-05	GAGGCGATTG		۱۴	۱۴	۱۰۰
۱۱	TIBMBA-04	TCGGGTGTTG		۸	۸	۱۰۰
۱۲	TIBMBA-06	AAGCTGGCGT		۷	۷	۱۰۰
۱۳	TIBMBA-09	CCACGGTCAG		۱۲	۱۲	۱۰۰
۱۴	TIBMBA-10	GACGCTATGG		۸	۸	۱۰۰
۱۵	TIBMBA-18	CCAAGCCGTC		۱۲	۱۲	۱۰۰
۱۶	TIBMBA-20	CAAAGGCGTG		۷	۷	۱۰۰
	کل	-	-	۱۷۱	۱۶۸	-

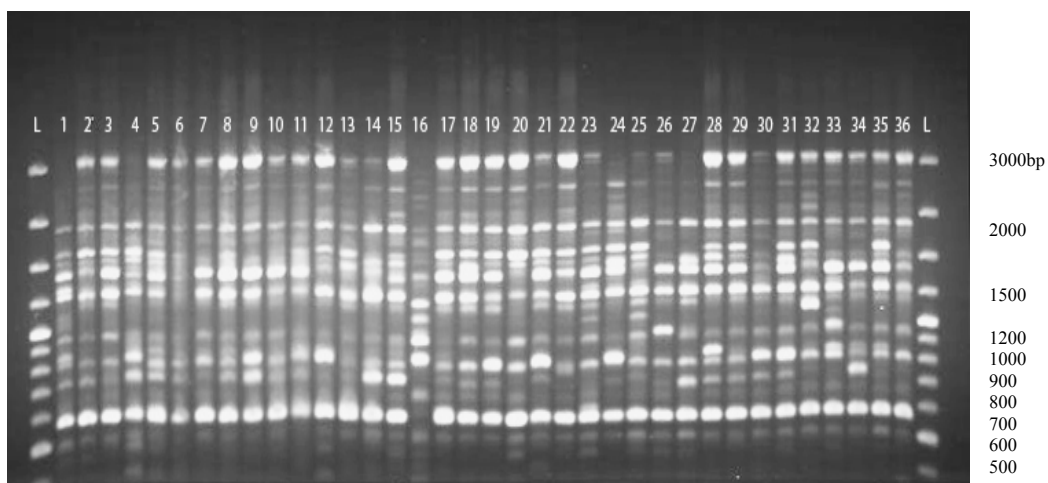
تجزیه به مختصات اصلی PCO^۱

این تجزیه به منظور کاهش داده‌های به دست آمده و تجزیه و تحلیل بهتر آنها صورت می‌گیرد. هدف از این تجزیه، یافتن ترکیباتی از چند متغیر جهت ایجاد شاخص‌های مستقل می‌باشد. عدم همبستگی بین این شاخص‌ها یک ویژگی مفید است، زیرا عدم همبستگی به این معنی است که شاخص‌ها جنبه‌های متفاوتی از داده‌ها را اندازه‌گیری می‌نمایند (Farshadfar, 2002).

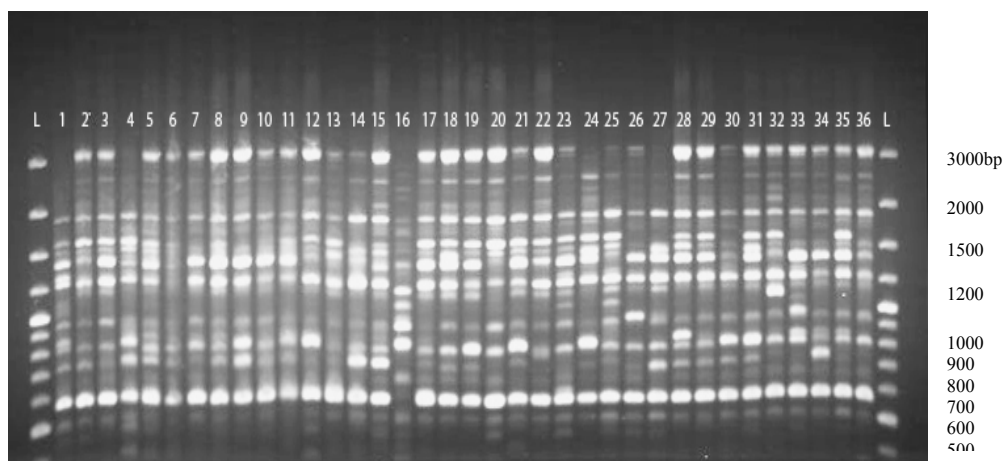
نتایج تجزیه به عامل‌ها در این تحقیق داده‌های مولکولی را به پنج عامل تبدیل کرد. این نتایج نشان داد که در مجموع پنج عامل اول ۵۹/۷ درصد از واریانس را به خود اختصاص داده است و با توجه به اینکه کروموزم پایه در بادام هشت می‌باشد می‌توان گفت که حجم کافی از ژنوم را پوشش داده است (جدول ۳).

گونه‌های آلو تفکیک گردیدند. Vezvaei (1997) با استفاده از ۷ آغازگر RAPD، ۱۲ رقم و چند گونه وحشی بادام را از یکدیگر تفکیک نمود. در آزمایش حاضر نیز نشانگرهای RAPD با دارا بودن محاسن سادگی، ارزانی و سرعت عمل برای شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های بادام کارآیی مطلوب و مناسب را داشت و نتایج حاصل از آن می‌تواند برای انتخاب ژنوتیپ‌ها، به منظور برنامه اصلاحی به کار برده شود، به طوری که با پیدا نمودن ژنوتیپ‌های دارای پتانسیل بالا در گروه‌های دور از هم و تلاقی کنترل شده آنها، امیدوار بود ژنوتیپ‌های جدیدتر که پتانسیل بالاتری برای صفات مورد نظر دارند، تولید شوند.

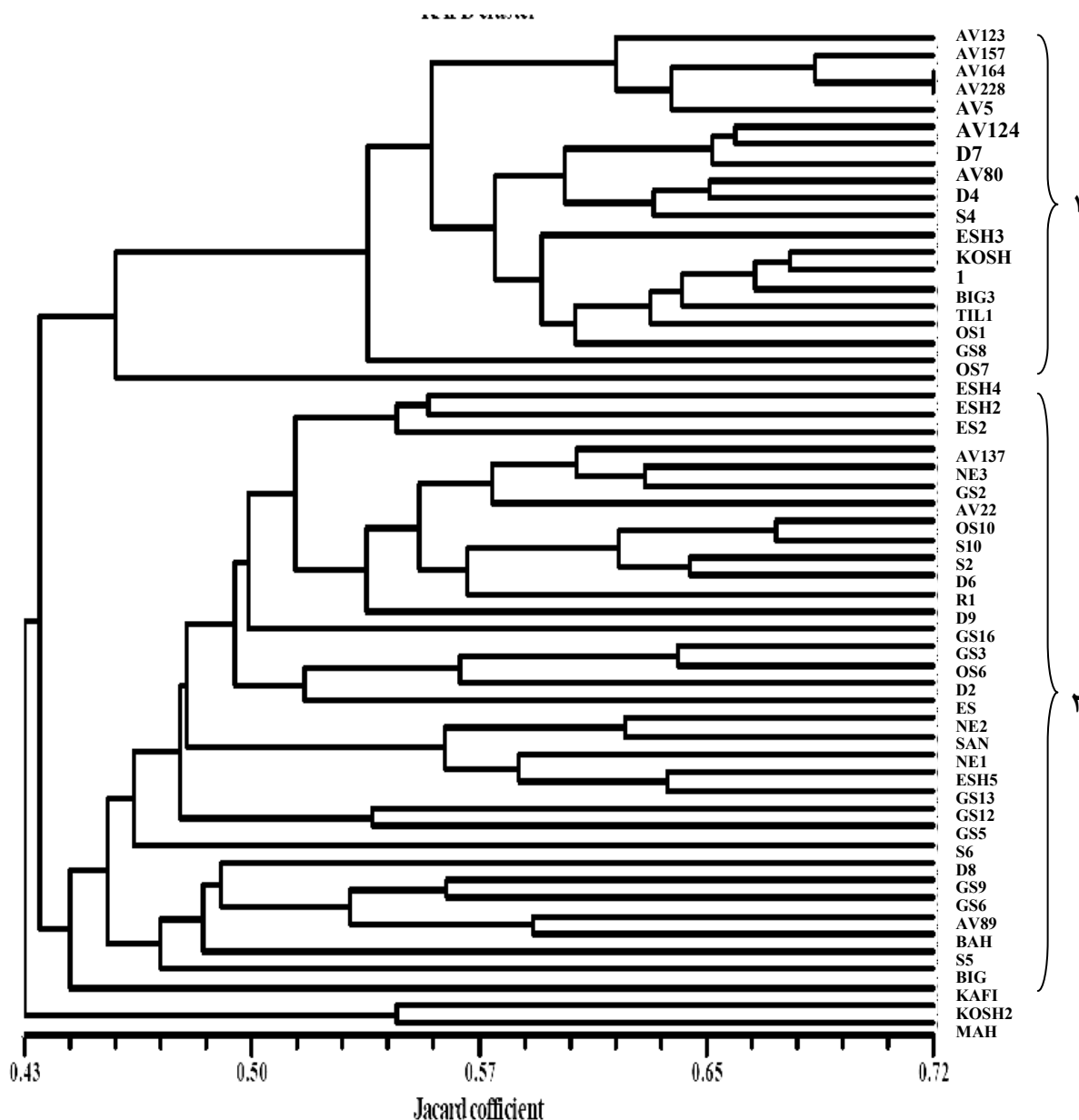
1. Principale Coordination analysis



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA بادام با استفاده از نشانگر RAPD حاصل از آغازگر TIBM BB-09



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA بادام با استفاده از نشانگر RAPD حاصل از آغازگر TIBM BB-18



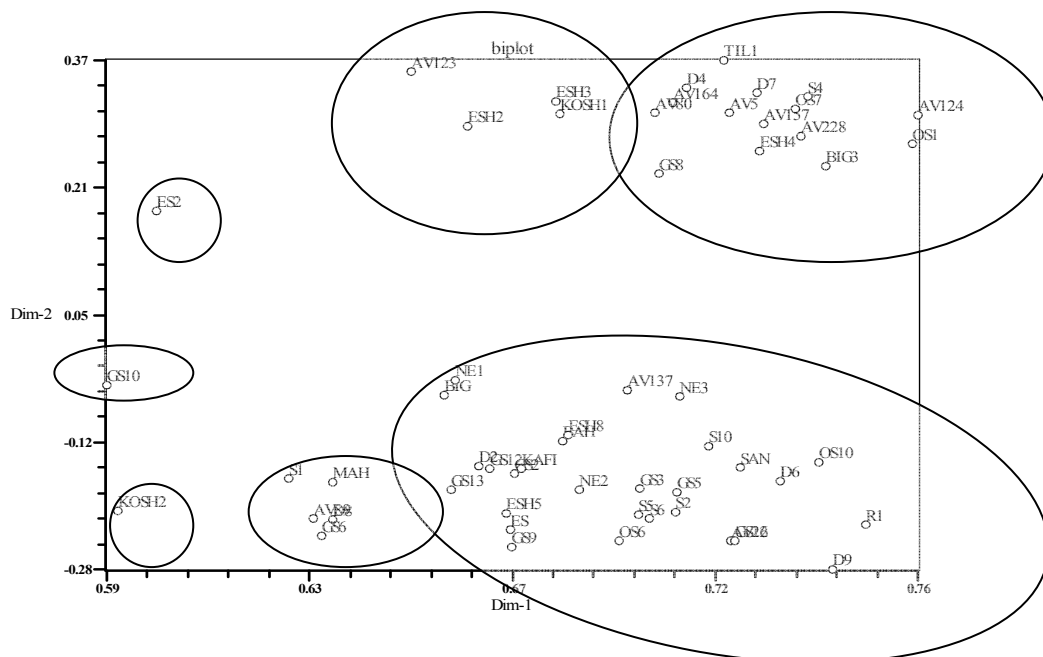
شکل ۳- دندروگرام حاصل از ۵۶ ژنوتیپ بادام بر اساس ماتریس تشابه که با استفاده از نشانگرهای RAPD به دست آمده است. AV (علی وزوایی)، MAH (مه‌ارلو)، R (رحیمی)، SAN (سنگی مه‌ارلو)، KAFI (کافی‌الملک)، BIG (علی بیگلر)، TIL (تیل)، ES (استهبان)، NE (نیریز)، KOSH (کوشک)، BAH (باغ بهرام)، OS (اسکو)، D (دریان)، GS (جزیره اسلامی)، ESH (اشان)، S (سرج).

آزمون تجزیه پلات

این آزمون قادر است فواصل بین ژنوتیپ‌ها را به صورت دو و یا سه بعدی نشان دهد. نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است. تجزیه دوبعدی توانست با توجه به اینکه عامل اول و دوم ۵۳٪ واریانس را در بر داشتند، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را تفکیک نماید که در نتیجه سه ژنوتیپ ES2، GS10 و KOSH2 به طور جداگانه قرار گرفتند.

جدول ۳- نتایج مربوط به تجزیه عامل داده‌های ملکولی

RAPD در ۵۶ نمونه بادام				
عامل‌ها	مقادیر ویژه	درصد توجیه تغییرات	درصد تجمعی توجیه تغییرات	
۱	۲۶/۸	۴۷/۸	۴۷/۸	
۲	۲/۹	۵/۲	۵۳/۱	
۳	۱/۴	۲/۵	۵۵/۶	
۴	۱/۲	۲/۲	۵۷/۸	
۵	۱	۱/۹	۵۹/۷	



شکل ۴- الگوی دوبعدی پراکنش ۵۶ ژنوتیپ بادام بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم حاصل از تجزیه PCO داده‌های ملکولی

آغازگرهای مورد استفاده مربوط به آغازگر BD9 و برابر با ۶۳٪ می‌باشد و کمترین آن مربوط به آغازگر BB12 و برابر با ۴۷٪ می‌باشد (جدول ۴). برای درک روابط ژنتیکی بین مناطق از فاصله ژنتیکی Nei (1978) استفاده شد. با توجه به نتایج (جدول ۵) بیشترین شباهت از لحاظ ژنتیکی بین مناطق جزیره اسلامی و سرچ به میزان (۹۵٪) مشاهده شد.

در مجموع متوسط G_{st} در کل آغازگرها معادل ۵۶٪ به دست آمد که نشان می‌دهد ۱۶ منطقه مورد مطالعه دارای فاصله ژنتیکی بالایی بودند.

به طور کلی مقادیر G_{st} بالای ۲۵٪ نشان‌دهنده تفاوت زیاد بین مناطق یا جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. این مسئله نشان می‌دهد که به دلیل خودناسازگاری بادام و گرده‌افشانی بین ژنوتیپ‌ها، نزدیکی بیشتری بین بادام‌های یک منطقه ایجاد شده است و این مسئله در باغات بذری به خوبی مشهود است در حالی که در بین مناطق بخصوص مناطق دور از هم این امکان وجود نداشته و تنوع بیشتری بین مناطق دیده می‌شود. بر همین اساس می‌توان از ژنوتیپ‌های مناطق مختلف که دارای صفات مطلوبی هستند و از نظر ژنتیکی از هم دور هستند برای دورگیری استفاده کرد.

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه دوبعدی، پراکنش ژنوتیپ‌ها با نتایج دندروگرام تقریباً همخوانی داشته است.

آنالیز منطقه‌ای نمونه‌ها

از بین ۱۵۰ خانواده‌ای که جمع‌آوری شده بود، ژنوتیپ‌های ۱۶ منطقه (جدول ۵) که از لحاظ کشت بادام در شرایط دیم اهمیت داشتند و از نظر جغرافیایی متفاوت بودند، انتخاب شدند. لذا نمونه‌های مربوط به آنها مورد آنالیز منطقه‌ای قرار گرفت و شاخص شانون (I)، تنوع ژنی (H)، تنوع درون جمعیت (Hs) و هتروزیگوسیتی کل (Ht) و نسبت هتروزیگوسیتی بین مناطق به کل (G_{st}) محاسبه گردید. شاخص شانون که معیاری برای اندازه‌گیری باندهای چند شکل است برای آغازگر BA5 بیشتر از سایر آغازگرها و به میزان ۳۸٪ بود. کمترین شاخص شانون مربوط به آغازگر BA14 و به میزان ۱۴٪ بود. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی کل (Ht) مربوط به آغازگرهای BA6, BA17, BD10 به میزان ۳۹٪ بود و کمترین آن مربوط به آغازگر BA14 به میزان ۲۷٪ بود. میزان هتروزیگوسیتی درون مناطق به دلیل پایین بودن تعداد نمونه‌ها در بعضی مناطق قابل ملاحظه نبود. بیشترین میزان G_{st} به دست آمده در

جدول ۴- مقادیر محاسبه شده میزان هتروزیگوسیتی به تفکیک هر آغازگر RAPD و متوسط آنها برای ۱۶ منطقه مورد بررسی

شاخص‌های محاسبه شده ^۱							
Gst	Hs	Ht	I	h	ne	na	نشانگر
۰/۶۱	۰/۱۴	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۲۵	۱/۴۳	۱/۷۹	BA5
۰/۵۷	۰/۱۵	۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۲۳	۱/۴۰	۱/۷۴	BA6
۰/۵۸	۰/۱۰	۰/۲۷	۰/۱۴	۰/۰۹	۱/۱۷	۱/۲۶	BA14
۰/۵۴	۰/۱۱	۰/۲۹	۰/۱۸	۰/۱۲	۱/۲۱	۱/۳۶	BB5
۰/۵۶	۰/۱۵	۰/۳۶	۰/۲۴	۰/۱۷	۱/۳۰	۱/۴۱	BB9
۰/۵۸	۰/۱۴	۰/۳۹	۰/۲۲	۰/۱۴	۱/۲۵	۱/۴۱	BA17
۰/۴۷	۰/۱۲	۰/۲۸	۰/۱۸	۰/۱۲	۱/۲۰	۱/۳۶	BB12
۰/۵۴	۰/۱۲	۰/۳۰	۰/۱۵	۰/۱۰	۱/۱۹	۱/۲۸	BB16
۰/۵۷	۰/۱۳	۰/۳۲	۰/۲۰	۰/۱۳	۱/۲۲	۱/۳۸	BC5
۰/۵۴	۰/۱۳	۰/۳۰	۰/۲۰	۰/۱۳	۱/۲۲	۱/۳۷	BD4
۰/۵۷	۰/۱۵	۰/۳۷	۰/۲۵	۰/۱۶	۱/۲۷	۱/۴۷	BD6
۰/۵۶	۰/۱۴	۰/۳۵	۰/۲۰	۰/۱۳	۱/۲۲	۱/۳۹	BB8
۰/۶۳	۰/۱۱	۰/۳۲	۰/۲۱	۰/۱۴	۱/۲۴	۱/۳۸	BD9
۰/۶۰	۰/۱۵	۰/۳۹	۰/۲۳	۰/۱۵	۱/۲۷	۱/۳۹	BD10
۰/۵۷	۰/۱۴	۰/۳۵	۰/۲۳	۰/۱۵	۱/۲۷	۱/۴۰	BE18
۰/۴۸	۰/۱۳	۰/۲۹	۰/۲۲	۰/۱۵	۱/۲۶	۱/۴۱	BE20
۰/۵۶	۰/۱۲	۰/۳۳	۰/۲۲	۰/۱۵	۱/۲۷	۱/۴۱	متوسط

۱- na: تعداد آللهای مشاهده شده در جایگاه، ne: تعداد آللهای موثر در جایگاه، h: شاخص تنوع ژنتیکی نی، I: شاخص شانون برای هر جایگاه، Ht: هتروزیگوسیتی کل، Hs: هتروزیگوسیتی درون مناطق، Gst: هتروزیگوسیتی بین مناطق.

تجزیه خوشه‌ای مناطق

به طوریکه این ژنوتیپ‌ها که تشابه بالایی نیز با ژنوتیپ‌های استان مذکور دارند، پایه و اساس تنوع کلکسیون تحقیقاتی بوده و عوامل دیگر در جایگاه بعدی اهمیت قرار دارند. بیشترین فاصله بین نمونه‌های AV (از کلکسیون تحقیقاتی) و MAH از منطقه مهارلو استان فارس و به میزان ۶۰٪ به دست آمد (شکل ۵). در بین نمونه‌های حاصل از مناطق استان فارس، منطقه مهارلو از سایرین جدا شده و همچنین با نمونه SAN (از منطقه مهارلو) نزدیک یکدیگر قرار گرفتند. به این ترتیب آنچه که از نتایج تجزیه خوشه‌ای مناطق به دست آمد نشان می‌دهد دسته‌بندی مولکولی مناطقی که از حداکثر تشابه (مانند مناطق اشان، جزیره اسلامی، سرج، اسکو و دریان همگی از استان آذربایجان شرقی) در بین یکدیگر برخوردارند با منشأ جغرافیایی آنها تطابق دارد. یک استثنا هم در مورد دو نمونه از یک منطقه می‌باشد که مربوط به SAN (سنگی شیرین) و MAH (تلخ مهارلو)، هر دو از منطقه مهارلو استان فارس می‌باشد که با وجود تعلق به یک منطقه جغرافیایی فاصله ژنتیکی آنها بر اساس فاصله ژنتیکی نی (جدول ۵) ۶۸٪ می‌باشد و با

برای گروه‌بندی مناطق از روش تجزیه خوشه‌ای حاصل از ماتریس فواصل بین مناطق بر اساس روش WPGMA^۱ استفاده شد (شکل ۵). نتایج نشان داد کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های منطقه جزیره اسلامی (GS) و سرج (S) از آذربایجان شرقی و به میزان ۵٪ بود. مناطق دریان، اسکو و اشان نیز به همراه نمونه‌های کلکسیون تحقیقاتی گروه علوم باغبانی تشابه نزدیکی به آنها نشان داده و همگی در یک دسته قرار گرفته‌اند (شکل ۵). با توجه به نزدیکی مناطق جغرافیایی مذکور و امکان جابجایی کرده و مواد گیاهی وجود چنین تشابهی دور از انتظار نمی‌باشد. لازم به ذکر است که بروز چنین تشابهی در ژنوتیپ‌های کلکسیون تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران که حاوی ژنوتیپ‌های مختلفی از جمله ژنوتیپ‌های دورگ‌گیری شده با ارقام خارجی نیز می‌باشد حاکی از غالب بودن نمونه‌های جمع‌آوری شده از آذربایجان شرقی می‌باشد.

1. Weighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average

دندروگرام مناطق میانگین‌های یک منطقه با منطقه دیگر مقایسه شده است در حالی که در دندروگرام ژنوتیپ‌ها، هر ژنوتیپ به طور مستقل با ژنوتیپ دیگر مقایسه شده و قرابت آنها با یکدیگر مشخص شده است. به طور کلی در اینجا نیز همانند تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها نتایج داده‌های مولکولی تا حدودی با منشأ جغرافیایی نمونه‌ها تطابق داشته و در مورد سایر نمونه‌ها اختلاط دیده می‌شود که به نظر می‌رسد به علت اثر انتخاب باشد.

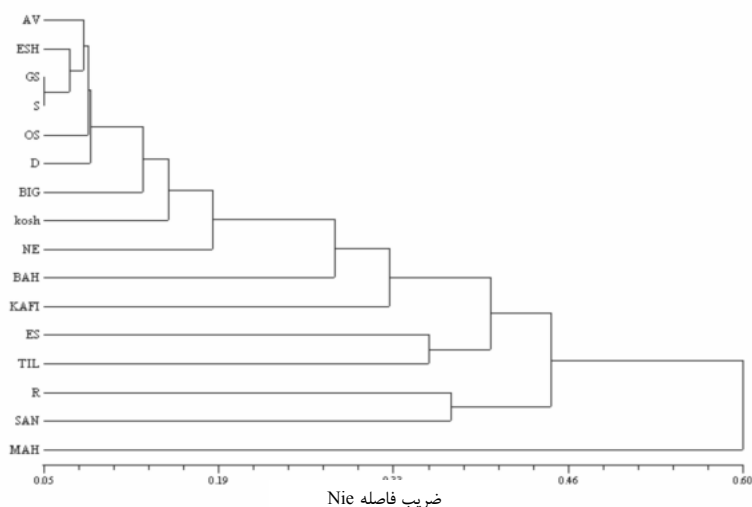
توجه نوع ژنوتیپ و همانطور که از نامگذاری آنها نیز مشخص است به دو دسته مغز شیرین و مغز تلخ تعلق دارند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که صفات و ارزش‌های انتخاب می‌توانند به قدری دقیق عمل نمایند که نمونه‌های مختلف موجود در یک منطقه را به خوبی از همدیگر تفکیک نمایند. بنابراین شاید بتوان علت وجود نمونه‌های مناطق مختلف در بین یکدیگر را که در مورد نمونه‌های مناطق استان فارس و آذربایجان شرقی مشاهده می‌شود، به اثر انتخاب مربوط دانست. در

جدول ۵- بررسی میزان تشابه^۱ و فاصله ژنتیکی^۲ مناطق با استفاده از فاصله ژنتیکی Nei (1978)

تیل	سنگی	سرج	رحیمی	اسکو	نی ریز	مه‌ارلو	کوشک	کافی‌الملک	جزیره اسلامی	اشان	استهبان	دریان	بیگلو	باغ بهرام	علی وزوایی	جمعیت
۰/۸۲	۰/۷۲	۰/۹۱	۰/۶۹	۰/۹۱	۰/۸۸	۰/۶۶	۰/۸۹	۰/۷۳	۰/۹۲	۰/۹۳	۰/۸۲	۰/۹۲	۰/۸۷	۰/۷۷	-	علی وزوایی
۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۷۹	۰/۶۱	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۵۸	۰/۷۸	۰/۷۱	۰/۸۰	۰/۷۷	۰/۶۷	۰/۷۸	۰/۷۶	-	۰/۲۶	باغ بهرام
۰/۸۰	۰/۶۹	۰/۸۷	۰/۶۵	۰/۸۹	۰/۸۰	۰/۶۱	۰/۸۶	۰/۷۸	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۷۳	۰/۸۸	-	۰/۲۸	۰/۱۴	بیگلو
۰/۸۳	۰/۷۶	۰/۹۱	۰/۷۷	۰/۹۱	۰/۸۶	۰/۶۵	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۹۲	۰/۹۰	۰/۸۰	-	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۰۸	دریان
۰/۷۰	۰/۶۲	۰/۸۰	۰/۶۰	۰/۷۸	۰/۷۴	۰/۶۳	۰/۷۶	۰/۶۱	۰/۸۲	۰/۸۲	-	۰/۲۲	۰/۴۰	۰/۲۰	۰/۲۰	استهبان
۰/۸۱	۰/۷۲	۰/۹۲	۰/۷۰	۰/۹۲	۰/۸۵	۰/۶۸	۰/۸۶	۰/۷۳	۰/۹۴	-	۰/۲۰	۰/۱۰	۰/۲۶	۰/۰۷	۰/۰۷	اشان
۰/۷۵	۰/۷۳	۰/۹۵	۰/۷۴	۰/۹۱	۰/۸۷	۰/۶۹	۰/۸۸	۰/۷۵	-	۰/۰۶	۰/۲۰	۰/۰۹	۰/۲۳	۰/۰۹	۰/۰۹	جزیره اسلامی
۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۸۰	۰/۶۳	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۵۵	۰/۷۴	-	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۴۹	۰/۲۸	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۳۲	کافی‌الملک
۰/۷۸	۰/۶۸	۰/۸۸	۰/۶۴	۰/۸۵	۰/۸۳	۰/۶۳	-	۰/۳۰	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۲۷	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۲	کوشک
۰/۵۸	۰/۵۱	۰/۶۸	۰/۵۲	۰/۶۵	۰/۶۱	-	۰/۴۶	۰/۶۰	۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۹	۰/۴۲	۰/۴۲	مه‌ارلو
۰/۷۲	۰/۷۵	۰/۸۸	۰/۶۷	۰/۸۶	-	۰/۴۹	۰/۱۹	۰/۳۲	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۳۰	۰/۱۶	۰/۲۲	۰/۱۳	۰/۱۳	نی ریز
۰/۸۰	۰/۷۳	۰/۹۲	۰/۷۴	-	۰/۱۵	۰/۴۲	۰/۱۶	۰/۳۱	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۲۵	۰/۰۹	۰/۲۳	۰/۰۹	۰/۰۹	اسکو
۰/۶۴	۰/۶۹	۰/۷۴	-	۰/۳۰	۰/۴۱	۰/۶۶	۰/۴۴	۰/۴۷	۰/۳۰	۰/۳۵	۰/۵۲	۰/۲۶	۰/۴۳	۰/۳۸	۰/۳۸	رحیمی
۰/۷۷	۰/۷۵	-	۰/۳۰	۰/۰۸	۰/۱۲	۰/۳۹	۰/۱۳	۰/۲۳	۰/۰۵	۰/۰۸	۰/۲۲	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۱۰	سرج
۰/۶۵	-	۰/۲۹	۰/۳۷	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۶۸	۰/۳۹	۰/۴۳	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۴۸	۰/۲۸	۰/۳۷	۰/۳۳	۰/۳۳	سنگی
-	۰/۴۳	۰/۲۶	۰/۴۵	۰/۲۲	۰/۳۳	۰/۵۴	۰/۲۵	۰/۴۲	۰/۲۹	۰/۲۲	۰/۳۵	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۴۱	۰/۲۰	تیل

۱- اعداد بالا سمت راست میزان تشابه بین ۱۶ منطقه مورد بررسی

۲- اعداد پایین سمت چپ میزان فاصله بین ۱۶ منطقه مورد بررسی



شکل ۵- دندروگرام مربوط به ۱۶ جمعیت بادام مورد بررسی در مناطق مختلف با استفاده از فاصله ژنتیکی نی و بر اساس روش WPGMA. AV (علی وزوایی)، MAH (مه‌ارلو)، R (رحیمی)، SAN (سنگی مه‌ارلو)، KAFI (کافی‌الملک)، BIG (علی بیگ لو)، TIL (تیل)، ES (استهبان)، NE (نی‌ریز)، KOSH (کوشک)، BAH (باغ بهرام)، OS (اسکو)، D (دریان)، GS (جزیره اسلامی)، ESH (اشان)، S (سرج).

بودند بیشترین شباهت (۹۵٪) را دارند که احتمالاً با هم همپوشانی گرده‌افشانی داشته‌اند. نمونه MAH از استان فارس تفاوت زیادی (۶۰٪) با سایر مناطق نشان داد. بنابراین طبق نتایج به دست آمده تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها در بین اکثر مناطق وجود دارد که حاصل از ذخیره ژنتیکی قوی، شرایط آب و هوایی مختلف و اثر انتخاب می‌باشد. بنابراین می‌توان از نمونه‌های مناطق دور از هم به عنوان والد جهت تلاقی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد.

سپاسگزاری

از اساتید و کارکنان گروه و ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند سپاسگزاری نموده و همچنین از دبیرخانه قطب‌های علمی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به خاطر تأمین بخشی از هزینه‌های طرح قدردانی می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده در مجموع این تحقیق توانایی نشانگرهای RAPD را در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف بادام نشان داد. برخی محاسن این نشانگر مثل راحتی و سرعت عمل نسبی و هزینه کمتر نسبت به دیگر نشانگرها، استفاده از آن را در انجام مطالعات ژنتیکی به خصوص ارزیابی تنوع ژنتیکی توجیه می‌نماید (Williams et al., 1990). در رابطه با ۵۶ ژنوتیپ مورد بررسی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در اکثر موارد هر چه محل جمع‌آوری دو ژنوتیپ به هم نزدیک‌تر بوده شباهت ژنتیکی بیشتری با هم داشتند. به عنوان نمونه می‌توان به ژنوتیپ‌های ایستگاه تحقیقات گروه باغبانی اشاره کرد. در مجموع حداکثر شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۷۲٪ و حداقل آن ۲۹٪ بوده است که نشان می‌دهد تنوع زیادی در بین آنها وجود دارد. در مورد آنالیز منطقه‌ای نتایج نشان داد که مناطق جزیره اسلامی و سرخ که هر دو از آذربایجان

REFERENCES

1. Anonymous. (1976). *Guidelines for the conduct of test for distinctness, homogeneity and stability of the cherry*. upov, TG/35/3.
2. Bellini, E., Giordani, E., Nencetti, V. & Paffetti, D. (1997). Genetic relationships in Japanese plum cultivars by molecular markers. *Acta Horticulturae*, 479, 53-56.
3. Cheng, Z. P. (2007). Genetic characterization of different demes in *Prunus persica* revealed by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 242-247.
4. Farshadfar, A. (2002). *Principles and methods of multivariate statistic*. Tagh Bostan.
5. Kadkhodai, S. & Tabaei-ahgdaei, S. R. (2004). Evaluation of genetic diversity in some native almond cultivars using RAPD markers. In: *Proceedings of 3rd National Congress on Biotechnology*. Mash-had University, mash-had, pp. 853, 441-449.
6. Mir, Ali, M. & Nabulsi, I. (2002). Genetic diversity of almond using RAPD technique. *Scientia Horticulturae*, 1872, 1-11.
7. Mohanty, A., Martin, J. P. & Aguinagalde, I. (2002). Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* using chloroplast DNA markers. *American Journal of Botany*, 89, 1223-1228.
8. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Resource*, 8, 4321-4325.
9. Nei, M. (1978). Analysis of gene diversity in subdivided population. *Scientia Horticulturae*, 70, 3321-3323.
10. Oraguzie, N. C., Gardiner, S. E., Heather, H. C. M., Stefanati, M., Ball, V. G. & Vinect, M. (2001). Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 126, 318-328.
11. Pejmanmehr, M. (2006). *An evaluation of germination and genetic diversity in some populations of black Cummin (Bunium persicum) using RAPD markers*. M. Sc. Thesis. Faculty of Horticulture University of Tehran.
12. Rasulzadegan, Y. (1991). *Pomology in temperate zone* (1st ed.). Isfahan Industrial University.
13. Rayan, F. J., Ledbetter, C. A., Ramming, D. W., Palmquist, D. E. B & Peterson, S. J. (2001). Challenges in developing molecular markers for almond (*Prunus dulcis*) and grape (*Vitis* spp). *Acta Horticulturae*, 546, 629-638.

14. Ruter, B., Hamrick, J. L. & Wood, B. W. (1990). Genetic diversity within provenance and cultivar germplasm collections versus natural population of pecan (*Carya illinoensis*). *The American Genetic Association*, 90, 521-528.
15. Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, M. R. & Ebadi, A. (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111, 24-29.
16. Schmidt, H., Vittup-Christensen, J., Watkins, R. & Smith, R. A. (1985). *Cherry Descriptor List*. IBPGR. Rome, Italy.
17. Shim, S. I. & Jorgensen, R. B. (2000). Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 227-233.
18. Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M. & Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 128, 904-909.
19. Vezvaei, A. (1997). *Identification of wild species and cultivated almond by RAPD marker*. Ph. D. Thesis. Faculty of Agriculture and Natural Resource Science, University of Adelaide. Australia. 121.
20. Webster, A. D. & Looney, N. E. (1996). *Cherries (Crop Physiology and Uses)*. CAB International University Press, Cambridge.
21. Williams, J. G. K., Kubelik, A. E., Livak, K. J., Rafaiski, J. A. & Tingey, S. C. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6536.
22. Wunsh, A. & Hormaza, J. I. (2002). Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Campus de Aula Dei*, 17, 115-123.