مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۰ (۲۴۴-۲۳۷)

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های مارچوبه خوراکی (*Asparagus officinalis* L.) بومی ایران به کمک نشانگرهای RAPD

بهروز سرابی[1]، محمدرضا حسندخت[2]*، محمد اسماعیل حسنی[3] و تیمور رمک معصومی[4]
۱، ۲، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و مربی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، محقق دانشکده کشاورزی، غذا و منابع طبیعی، پارک تکنولوژی دانشگاه سیدنی، استرالیا
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۸ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۱۱)

چکیده

از نشانگر رپید (RAPD) جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۳۴ ژنوتیپ مارچوبه خوراکی وحشی بومی شهرستان طالقان به همراه مارچوبه‌های اهلی، مارچوبه خوراکی رقم مری‌واشنگتن و *Asparagus persicus* استفاده شد. تعداد ۸۰ آغازگر تصادفی در انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌ها به کار رفت که ۱۸ آغازگر تکثیر DNA را به صورت چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. این ۱۸ آغازگر در مجموع ۱۷۵ نوار در کل ژنوتیپ‌ها تکثیر کردند که از بین آنها ۱۶۰ نوار چند شکل بودند (۹۱/۴ درصد چندشکلی). تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس حضور نوار (یک) و عدم حضور نوار (صفر) با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت. بیشترین و کمترین ضریب تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۲۹ به دست آمد. در تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها در ضریب تشابه ۰/۶۸ در هفت زیرگروه مجزا جای گرفتند. ژنوتیپ‌های وحشی در چهار زیرگروه، مارچوبه‌های اهلی همراه با مارچوبه خوراکی رقم مری‌واشنگتن در دو زیر گروه قرار گرفتند. *A. persicus* به عنوان یک گونه مجزا و با اختلاف چشم‌گیری از دیگر نمونه‌های آزمایش شده در زیرگروه آخر جای گرفت. بنابر نتایج به دست‌آمده ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار بودند که نشان‌دهنده غنی‌بودن ذخایر ژنتیکی مارچوبه در ایران است. ضمن اینکه، این بررسی توانایی نشانگر RAPD برای تفکیک گونه‌های مارچوبه و مطالعه تنوع ژنتیکی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مارچوبه، *Asparagus officinalis*، نشانگر RAPD.

مقدمه

مارچوبه خوراکی (*Asparagus officinalis* L.) یک سبزی با اهمیت باغی است که در نواحی دارای اقلیم معتدله و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شود. جنس مارچوبه در سراسر دنیا رشد می‌کند و شرق مدیترانه تا کوه‌های قفقاز به عنوان مبدأ گونه‌های آن ذکر شده است (Rubatzky & Yamaguchi, 1997). جنس بزرگ *Asparagus* تعداد کروموزوم پایه ثابتی دارد (x=۱۰)، که در گونه‌های مختلف سطوح مختلف پلوییدی دیده می‌شود (Stajner et al., 2002). مارچوبه خوراکی به منظور تولید شاخه‌های خوراکی (اسپیر[1]) که از روی ریزوم رشد می‌کنند کشت می‌گردند (Rubatzky &

1. Spear

* نویسنده مسئول: محمدرضا حسندخت تلفن: ۰۹۱۲-۲۰۰۵۷۵۹ E-mail: mrhassan@ut.ac.ir

(Yamaguchi, 1997). مارچوبه گیاهی دوپایه بوده که دگرگرده‌افشانی جهت ایجاد تنوع ژنتیکی را تسهیل می‌نماید. ژرم‌پلاسم مارچوبه نسبتاً محدود است، لذا تحقیقات زیادی به منظورگزینش صحیح گونه‌های وحشی دارای ویژگی‌های زراعی از جمله مقاومت به بیماری‌ها، مقاومت به شوری (*A. maritimus*)، مقاومت به خشکی (*A. acutifolius*)، یا مقاومت به خاک‌های اسیدی (*A. tenuifolius*) جهت گسترش ژرم‌پلاسم (خزانه ژنی) مارچوبه خوراکی و استفاده در کارهای به‌نژادی انجام شده است (Stajner et al., 2002).

با توجه به اینکه صفات مورفولوژیک تحت تأثیر عوامل محیطی تغییر می‌یابند، از روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود. ضمن اینکه استفاده از نشانگرهای DNA همچون RAPD[1]، AFLP[2]، SSR[3] و ISSR[4] به منظور تعیین میزان تنوع ژنتیکی و استفاده از آن در طراحی برنامه‌های به‌نژادی امروزه بسیار مفید است (Ipek et al., 2003; Martins et al., 2003; Zahuang et al., 2004). در بین نشانگرهای DNA به نظر می‌رسد که نشانگر RAPD که اساس آن تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای تصادفی با استفاده از روش PCR می‌باشد، توانایی قابل قبولی برای بررسی تنوع ژنتیکی داشته باشد، ضمن اینکه با هزینه کمتری در مقایسه با سایر نشانگرهای DNA همراه است (Gupta & Rustgi, 2004). با این وجود، تمایل نشانگرهای RAPD به تکثیر بخش تکراری DNA ژنومی، تعداد کم مکآنهای RAPD ارزیابی شده، استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای پایین اتصال آغازگرها به DNA الگو که می‌تواند موجب تکثیر غیراختصاصی و تصادفی برخی از نقاط که در محل اتصال دارای تفاوت هستند شود، از معایب این روش هستند (Kumar, 1999).

Spada et al. (1998) نقشه ژنتیکی *A. officinalis* را توسط تلفیقی از نشانگرهای مولکولی RFLP، RAPD، AFLP با استفاده از ۲۷۴ آغازگر و ایزوآنزیم تهیه کردند. در سال ۲۰۰۶ آنالیز سطح پلوییدی و مولکولی جمعیت مارچوبه *Asparagus officinalis* L. (Morado de Huetor) که یک توده تتراپلویید بومی اسپانیا است و ارتباط آن با ارقام تجاری رایج انجام شد و یک باند یک‌شکل ویژه ($OPB20_{883}$) در این توده تتراپلویید یافت شد. نتایج این تحقیق نشان داد که رقم‌ها یا ژنوتیپ‌های تتراپلویید و دیپلویید با استفاده از نشانگر RAPD به خوبی از همدیگر جدا می‌شوند (Moreno et al., 2006). در سال ۲۰۰۱ ارزیابی تنوع سوماکلونال در مارچوبه توسط نشانگر RAPD و به طور سیتولوژیک انجام شد و ۷۷ گیاه باززایی شده از سه لاین رویانی هیچ گونه تنوع درون‌گونه‌ای را برای ۱۵۷ آغازگر RAPD نشان ندادند، هر چند که دو گیاه فنوتیپ پاکوتاهی را بروز دادند (Raimondi et al., 2001).

در منابع مختلف مراکز اصلی تنوع ژنتیکی مارچوبه خوراکی در آسیا، اروپا و آفریقا ذکر شده است (Prohens et al., 2008). با توجه به فلور رنگی ایران، انتشار جغرافیایی مارچوبه خوراکی در ایران در مناطق ساری، بهشهر، نکا، تبریز، بیجار و طالقان ذکر شده است (Ghahreman, 2002). با توجه به تحقیقات و بازدید از این مناطق و با استفاده از کلید شناسایی گیاهان، مشخص شد که گونه موجود در مناطق ساری، بهشهر و نکا *A. verticillatus*، گونه موجود در تبریز و بیجار *A. persicus* و گونه موجود در طالقان *A. officinalis* است. در منابع داخلی هیچ گزارشی که حاکی از استفاده از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنوتیپ‌های وحشی مارچوبه خوراکی باشد، یافت نشد. به دلیل اینکه بررسی تنوع ژنتیکی به منظور تعیین صفات مهم زراعی می‌تواند منجر به ایجاد ژنوتیپ‌ها و رقم‌های برتر شود، لذا در تحقیق حاضر ۳۴ ژنوتیپ وحشی مارچوبه خوراکی همراه با تک بوته‌هایی از مارچوبه‌های خوراکی اهلی، مارچوبه خوراکی رقم مری‌واشنگتن و *A. persicus* توسط نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. اهداف این تحقیق، سنجش میزان تنوع و تعیین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های وحشی مارچوبه خوراکی و همچنین بررسی ارتباط این ژنوتیپ‌ها با ارقام اهلی و کشت‌شده مارچوبه خوراکی به علاوه با *A. persicus* توسط روش رپید می‌باشد.

1. Randomly amplified polymorphic DNA
2. Amplified fragment length polymorphism
3. Simple sequence repeats
4. Inter simple sequence repeats

مواد و روش‌ها

بوته‌های مارچوبه خوراکی وحشی در کوههای شهرستان طالقان در ۱۳۰ کیلومتری شمال غربی تهران شناسایی و ۳۴ بوته وحشی که شامل ۱۴ بوته ماده و ۲۰ بوته نر بودند، جهت مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. به علاوه سه بوته از مارچوبه خوراکی اهلی کشت‌شده در باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج، یک بوته از رقم خارجی مری‌واشنگتن کشت‌شده در دانشکده کشاورزی ساری و یک بوته از *A. persicus* که به صورت وحشی در ۲۰ کیلومتری شهرستان بیجار (روستای بیانلو) می‌روید، جهت مقایسه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های مورد بررسی، جنسیت و منطقه جمع آوری

شماره ژنوتیپ‌های مورد بررسی	گونه	جنسیت	منطقه جمع آوری
۱-۱۴	*A. officinalis* (وحشی)	ماده	طالقان
۱۵-۳۴	*A. officinalis* (وحشی)	نر	طالقان
۳۵	*A. officinalis* (اهلی)	ماده	باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج
۳۶-۳۷	*A. officinalis* (اهلی)	نر	باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج
۳۸	*A. officinalis* (رقم مری واشنگتن)	نر	دانشکده کشاورزی ساری
۳۹	*A. persicus*	نر	بیجار (روستای بیانلو)

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی با استفاده از روش Sharp et al. (1988) انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین گردید و سپس نمونه‌ها به غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. تعداد ۱۵ آغازگر تصادفی اوپرون و ۶۵ آغازگر تصادفی TIB MOLBIOL سری‌های A، B، C، D و E دراین آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR با حجم ۱۵ µl، شامل ۵ µl بافر واکنش PCR (Ampliqon, Hamburg, Germany)، ۶/۵ µl آب مقطر دوبار استریل، ۰/۲ µM آغازگر و ۲۰ ng از DNA الگو بود. شرایط PCR با دو سری چرخه‌های دمایی بصورت ابتدا یک چرخه ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C برای واسرشت‌سازی DNA ژنومی، و سپس ۱- تعداد ۵ چرخه به صورت ۹۲°C به مدت یک دقیقه، ۴۲°C به مدت یک دقیقه، ۷۲°C به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات ۲- تعداد ۳۷ چرخه به صورت ۹۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۹°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه برای تکمیل بسط با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل (i-Cycler) انجام گرفت. پس از انجام واکنش PCR به محتویات هر لوله مقدار ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه گردید و ۶ میکرولیتر از مخلوط حاصله در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE[1] ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با جریان ۶۵ ولت الکتروفورز شدند. پس از این مرحله ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/l رنگ‌آمیزی و متعاقباً ۱۵ دقیقه در آب مقطر رنگ‌بری صورت گرفت و سپس توسط دستگاه ژل‌داک (Gel Document, UVP) قطعات تکثیریافته DNA تحت‌نور UV مشاهده و عکسبرداری از ژل صورت گرفت.

برای بررسی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها، در فواصل مشابه از چاهک‌ها به حضور یک نوار خاص در هر ستون عدد یک و عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس یک و صفر، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار Ntsys Ver 2.02 و استفاده از ضریب تشابه جاکارد[2] محاسبه گردید. در نهایت تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس فواصل انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA[3] به دست آمد. تجزیه PCOA[4] برای نشان دادن بهتر پراکنش ژنوتیپ‌های مارچوبه بر اساس دو مؤلفه اصلی حاصل از تجزیه به عامل داده‌های مولکولی

1. Tris boric acid EDTA
2. Jaccard's similarity coefficient
3. Unweighted paired group method using arithmatic average
4. Principle cordinate analysis

که مقادیر ویژه آنها بالاتر از یک بودند و حدود ۲۵ درصد از واریانس کل را توجیه کردند، صورت گرفت.

برای مقایسه ساختار دو جمعیت نر و ماده در کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی، از نرم‌افزار Popgene (Ver. 1.31) استفاده گردید. تنوع ژنتیکی برای همه مکآنهای آللی با کمک آنالیز نی محاسبه شد (Nei, 1987)، در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون برای هر دو جنسیت محاسبه گردید (جدول ۳).

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی دو جنسیت نر و ماده در کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی

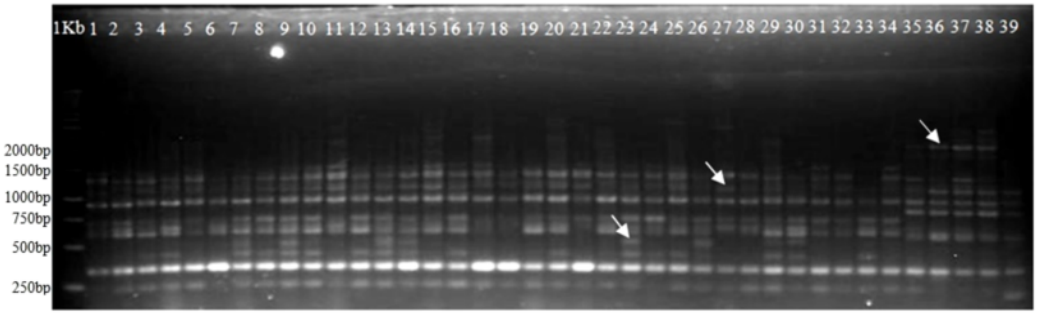
جنسیت	تعداد افراد	na	ne	h	I	$\frac{ne}{na}$
ماده	۱۵	۱/۸۵	۱/۵	۰/۲۹	۰/۴۳	۸۱
نر	۲۴	۱/۹۷	۱/۶	۰/۳۴	۰/۵۱	۸۱

na: تعداد آلل‌های مشاهده شده، ne: تعداد آلل‌های مؤثر، h: شاخص تنوع ژنتیکی نی، I: شاخص اطلاعاتی شانون.

نتایج و بحث

ارزیابی باندهای حاصله از تعداد ۱۸ آغازگر روی ۳۹ ژنوتیپ انجام شد و در مجموع ۱۷۵ قطعه DNA تولید شد که از بین آنها ۱۵ قطعه در بین تمام ژنوتیپ‌ها یک‌شکل بودند و باقی‌مانده آنها (۱۶۰ قطعه) در دو یا چند ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چندشکل (۹۱/۴ درصد) در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود (شکل ۱ و جدول ۲). بیشترین تعداد قطعه تکثیرشده ۱۳ باند، مربوط به آغازگرهای TIBM BB-13 و TIBM BA-04 و کمترین آن ۵ باند، مربوط به آغازگر TIBM BB-20 بود.

بیشترین قطعات چندشکل ۱۲ عدد و توسط آغازگر TIBM BB-12 تولید شد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین میزان تشابه (۰/۲۹) مربوط به دو ژنوتیپ‌وحشی شماره ۱ شهرستان طالقان و *A. persicus* و بیشترین میزان تشابه (۰/۷۱) بین دو ژنوتیپ وحشی شماره ۲۷ و ۱۹ شهرستان طالقان بود. با توجه به ماتریس تشابه حاصل از داده‌های RAPD، فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مارچوبه مشخص شد. میانگین میزان تشابه بین ۳۴ ژنوتیپ وحشی شهرستان طالقان ۵۵ درصد و در کل ۳۹ ژنوتیپ ۵۰ درصد بود. با قطع دندروگرام (شکل ۲) در میزان تشابه ۰/۶۸، هفت زیرگروه قابل مشاهده بود. زیر گروه A از دو ژنوتیپ مارچوبه خوراکی وحشی که جنس ماده بوده و تشابه حدود ۰/۵۷ داشتند، تشکیل شده است. این دو ژنوتیپ از یک منطقه نزدیک به هم جمع‌آوری شدند و ممکن است که فراوانی آللی در والدین و جمعیت والدینی آنها مشابه باشد. ۲۸ ژنوتیپ وحشی مارچوبه خوراکی منطقه طالقان که به صورت ۵۷/۱۴ درصد نر و ۴۲/۸۶ درصد ماده بودند، همگی در زیر گروه B قرار گرفتند. با توجه به ماتریس تشابه، در این زیر گروه بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های شماره ۱۹ با ۲۷، ۲۵ با ۲۷ و ۲۷ با ۲۸ به صورت ۰/۷۱، ۰/۷۰ و ۰/۷۰ نشان دادند، که بیان‌کننده نزدیکی زیاد ژنوتیپ‌های این گروه می‌باشد. در این زیرگروه ژنوتیپ‌های ماده شماره ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ از یک منطقه جغرافیایی نزدیک به هم جمع‌آوری شدند و احتمال دارد همه آنها نتاج یک والد اولیه باشند. در این زیرگروه ژنوتیپ‌های نر از مناطق مختلف، نزدیک هم قرار گرفتند و احتمال دارد که والد بیشتر آنها همان ژنوتیپ‌های ماده این زیرگروه باشند که بذر آنها توسط

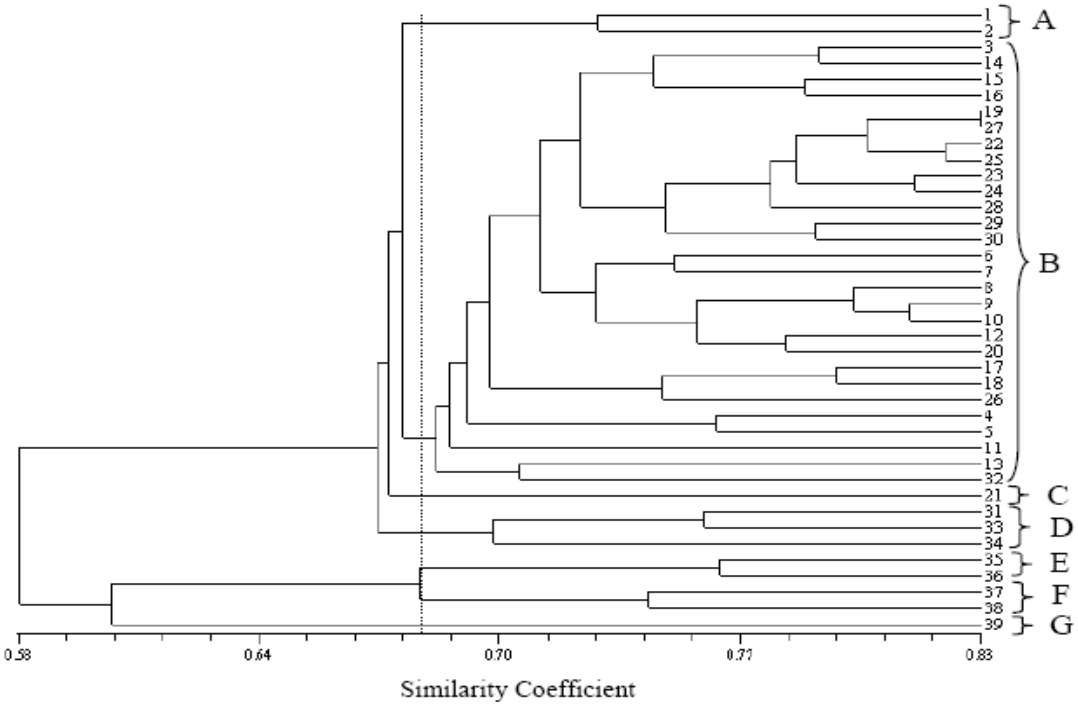


شکل ۱- الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA با روش RAPD در ۳۹ ژنوتیپ مارچوبه با استفاده از آغازگر TIBM BA-04 (شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ می‌باشد)

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی ده نوکلئوتیدی مورداستفاده، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چندشکل و درصد چندشکلی حاصل از تعیین تنوع ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ مارچوبه

شماره	آغازگر	توالی بازی $5'\rightarrow3'$	تعداد کل باندها (a)	تعداد باندهای چندشکلی (b)	درصد چند شکلی (b/a × 100)
۱	*TIBM BA-04	TCCTAGGCTC	۱۳	۱۱	۸۴/۶
۲	TIBM BA-14	TCGGGAGTGG	۱۲	۱۰	۸۳/۳
۳	TIBM BB-10	ACTTGCCTGG	۱۰	۱۰	۱۰۰
۴	TIBM BB-12	TTCGGCCGAC	۱۲	۱۲	۱۰۰
۵	TIBM BB-13	CTTCGGTGTG	۱۳	۱۱	۸۴/۶
۶	TIBM BB-15	AAGTGCCCTG	۹	۹	۱۰۰
۷	TIBM BB-20	CCAGGTGTAG	۵	۵	۱۰۰
۸	TIBM BC-17	CCGTTAGTCC	۹	۸	۸۸/۹
۹	TIBM BD-01	TCACTCGCTC	۷	۷	۱۰۰
۱۰	TIBM BD-02	CCTCCCCAAG	۱۰	۸	۸۰
۱۱	TIBM BD-06	AAGCTGGCGT	۹	۹	۱۰۰
۱۲	TIBM BD-19	GGTTCCTCTC	۱۲	۱۱	۹۱/۷
۱۳	TIBM BE-02	ACGCCTGTAG	۶	۶	۱۰۰
۱۴	TIBM BE-05	GGAACGCTAC	۷	۶	۸۵/۷
۱۵	TIBM BE-12	GGTTGTTCCC	۷	۷	۱۰۰
۱۶	TIBM BE-20	CAAAGGCGTG	۱۲	۱۱	۹۱/۷
۱۷	*OPE-11	GTGTCAGTGG	۱۱	۱۰	۹۰/۹
۱۸	OPN-03	GGTACTCCCC	۱۱	۹	۸۱/۸
کل	-	-	۱۷۵	۱۶۰	-
میانگین	-	-	۹/۷	۸/۸	۹۱/۴

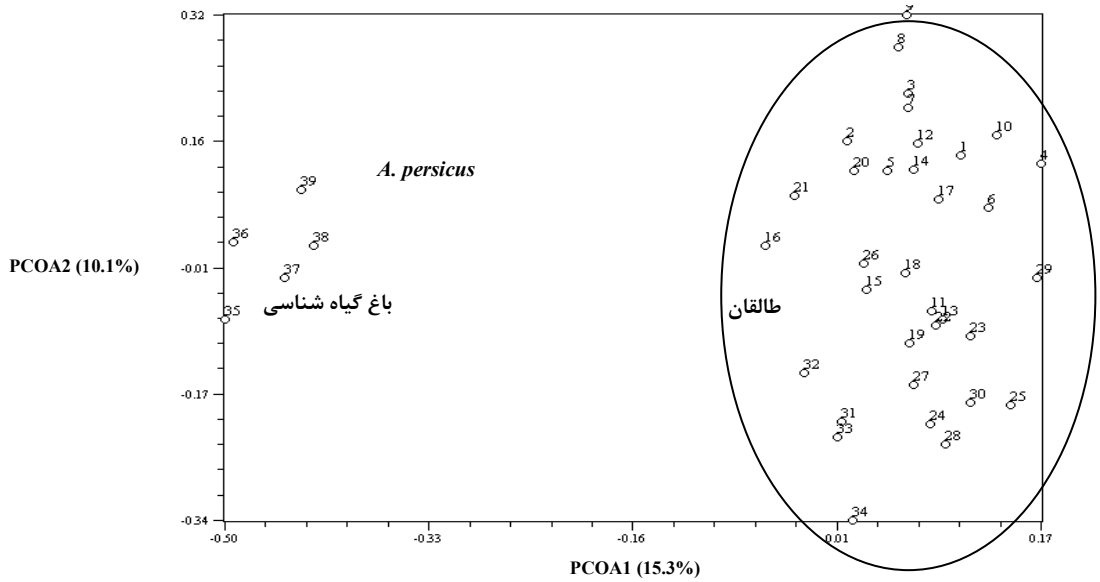
(* TIBMOLBIOL, Berlin, Germany and Operon Technologies, Alameda, California, USA)



شکل ۲- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگر RAPD در ۳۹ ژنوتیپ مارچوبه مورد بررسی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و گروه‌بندی UPGMA (نام ژنوتیپ‌ها همراه با شماره آنها در جدول ۱ آمده است.)

عوامل مختلف به دیگر نقاط منتقل شده باشد. زیرگروه C از یک ژنوتیپ وحشی مارچوبه خوراکی نر (ژنوتیپ ۲۱) تشکیل شده است. منطقه جمع‌آوری این ژنوتیپ از بقیه ژنوتیپ‌ها کاملاً جدا بود. زیرگروه D را سه ژنوتیپ وحشی مارچوبه خوراکی تشکیل می‌دهند که اعضای این گروه شباهتی حدود ۰/۵۵ با یکدیگر نشان دادند. این ژنویپ‌ها نیز از یک منطقه جغرافیایی دیگر جمع‌آوری گردیدند. زیرگروه E از دو ژنوتیپ اهلی ماده و نر باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج که تشابه حدود ۰/۶۱ داشتند، تشکیل شده است. مارچوبه خوراکی رقم مری‌واشنگتن و ژنوتیپ اهلی باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج زیرگروه F را تشکیل دادند که هر دو ژنوتیپ نر بوده و تشابه حدود ۰/۵۹ را نشان دادند. قابل ذکر است که میانگین تشابه مارچوبه خوراکی رقم مری‌واشنگتن با بقیه ژنوتیپ‌ها حدود ۰/۴۳ و با ژنوتیپ‌های اهلی باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج حدود ۰/۵۳ بود. همچنین متوسط میزان تشابه ژنوتیپ‌های اهلی باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج با ژنوتیپ‌های وحشی مارچوبه خوراکی ۰/۴۲ بود. *A. persicus* به تنهایی و به صورت مجزایی از بقیه ژنوتیپ‌ها در زیرگروه G قرار گرفت. به طور متوسط میزان تشابه این گونه با بقیه ژنوتیپ‌ها ۰/۳۸ و با ژنوتیپ‌های وحشی مارچوبه خوراکی طالقان ۰/۳۷ بود که به خوبی اختلاف این گونه را با *A. officinalis* نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر با آزمون PCOA مطابقت داشت و به خوبی ژنوتیپ‌های وحشی مارچوبه خوراکی طالقان را از سایر ژنوتیپ‌ها جدا کرد (شکل ۳). ضرایب کم به دست آمده مربوط به PCOA1 و PCOA2 (۱۵/۳ درصد و ۱۰/۱ درصد) بیانگر این است که احتمالاً نقاط مختلفی از ژنوم توسط آغازگرها مورد تکثیر قرار گرفته است.

با توجه به دندروگرام (شکل ۲) مشخص می‌شود که ژنوتیپ‌های نر و ماده در کنار هم قرار گرفته‌اند که عدم توانایی آغازگرهای RAPD استفاده شده برای تکثیر ژن‌های کدکننده جنسیت را نشان می‌دهد. در واقع به دلیل تکثیر بقیه ژنوم توسط نشانگر RAPD و تعداد کم آغازگرهای مورد استفاده، توزیع و پراکندگی ژنوتیپ‌ها مخلوط گردیده است. همچنین با توجه به کلاستر، ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۱۱ و ۲۱ به صورت مجزایی از دیگر ژنوتیپ‌های وحشی قرار گرفته‌اند که ممکن است به دلیل اختلافات در سطوح پلوییدی و یا اختلاف در منبع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها با سایر ژنوتیپ‌های وحشی باشد و احتمال دارد که بذر این ژنوتیپ‌ها توسط پرندگان و دیگر عوامل از مکآنهای دیگر به کوه‌های شهرستان طالقان منتقل شده باشند و یا اینکه در این ژنوتیپ‌ها موتاسیون و جهش‌هایی صورت گرفته باشد.



شکل ۳- پراکنش ژنوتیپ‌های مارچوبه با استفاده از تجزیه PCOA (نام ژنوتیپ‌ها همراه با شماره آنها در جدول ۱ آمده است)

به علاوه با توجه به متوسط میزان تشابه (۰/۵۳) ژنوتیپ‌های اهلی باغ گیاه‌شناسی کرج و رقم خارجی مری‌واشنگتن می‌توان نتیجه گرفت که این ژنوتیپ‌ها دارای یک مبدأ مشترک هستند. در شروع قرن بیستم تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن مارچوبه مقاوم به زنگ مارچوبه (*Puccinia asparagi*) انجام شد و رقم‌های Martha Washington و سپس Mary Washington معرفی شدند (Prohens et al., 2008). همچنین *A. persicus* با اختلاف چشم‌گیری از سایر ژنوتیپ‌ها در یک زیرگروه جدا قرار گرفت که بیان‌گر توانایی روش RAPD در تفکیک گونه‌های جنس *Asparagus* می‌باشد. چنین وضعیتی در مورد گروه‌بندی گونه‌های مهم و اقتصادی مارچوبه توسط آنالیز اندازه ژنوم و چندشکلی‌های rDNA ITS نیز گزارش شده است و طبق نتایج آن، اندازه ژنوم گونه‌های دو پایه اروپایی به طور میانگین دو برابر گونه‌های هرمافرودیت جنوب آفریقا بود. به علاوه دو زیرگروه کاملاً مجزا بر اساس جنسیت و مبدأ جغرافیایی گونه‌های مورد بررسی به دست آمد (Stajner et al., 2002).

تعداد آلل‌های مشاهده شده (na) و تعداد آلل‌های مؤثر (ne) یعنی آلل‌هایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع خوبی می‌باشند، در جمعیت نر از جمعیت ماده بیشتر بودند. با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هر یک از جنسیت‌ها از طریق محاسبه نسبت آلل‌های مؤثر به آلل‌های مشاهده شده تعیین گردید (جدول ۳). با توجه به جدول ۳ در هر دو جمعیت نر و ماده، ۸۱ درصد از کل آلل‌های مشاهده شده توزیع برابر دارند که نشان می‌دهد هر دو جنسیت دارای توزیع مشابهی می‌باشند. همچنین تعداد آلل‌های مشاهده شده در دو جنسیت بین ۱/۸۵ تا ۱/۹۷ آلل و تعداد آلل‌های مؤثر بین ۱/۵ تا ۱/۶ آلل قرار دارند. این نزدیکی اعداد به هم و دامنه کوچک تغییر آنها نشان دهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها در بین دو جنسیت است و اینکه هر دو جنسیت تقریباً در یک سطح یکنواختی از توزیع آللی قرار دارند.

بررسی تنوع در داخل دو جنسیت نر و ماده با کمک میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۳)، که نشان داد تنوع پذیری درون جمعیت نر (I=۰/۵۱ و h= ۰/۳۴) از جمعیت ماده بیشتر (I= ۰/۴۳ و h=۰/۲۹) است.

در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که روش RAPD می‌تواند به عنوان یک ابزار مؤثر در تعیین روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و ارزیابی وسعت تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مارچوبه در کشور به‌کار رود، هر چند استفاده از نشانگرهای قوی‌تر مانند AFLP و ریزماهواره‌ها به همراه اطلاعات کافی در مورد مورفولوژی و سیتوژنتیک گیاه می‌تواند اطلاعات ژنومی بیشتری در مورد ژنوتیپ‌های مارچوبه در ایران ارایه دهد.

REFERENCES

1. Ghahreman, A. (2002). *Flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands Publishing No. 2389, Code: 148. (In Farsi).
2. Gupta, P. K. & Rustgi, S. (2004). A review, molecular markers from the transcribed/expressed region of genome in higher plants. *Functional Integrative Genomic*, 4, 139-162.
3. Ipek, M., Ipek, A. & Simon, P. W. (2003). Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collection. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, 128, 246-252.
4. Kumar, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement. *Biotechnology Advances*, 17, 143-183.
5. Martins, M., Tenreiro, R. & Oliveira, R. (2003). Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reporter*, 22, 71-78.
6. Moreno, R., Espejo, J. A., Cabrera, A., Millan, T. & Gil, J. (2006). Ploidic and molecular analysis of 'Morado de Huetor' asparagus (*Asparagus officinalis* L.) population; a Spanish tetraploid landrace. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 729-736.
7. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. pp: 176-187.
8. Prohens, J., Nuez, F. & Carena, M. J. (2008). *Handbook of plant breeding*. Springer Publishing 364 pp.
9. Raimondi, J. P., Masuelli, R. W. & Camadro, E. L. (2001). Assessment of somaclonal variation in Asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. *Scientia Horticulturae*, 90, 19-29.
10. Rubatzky, V. E. & Yamaguchi, M. (1997). *World vegetables, principles, production and nutritive values*. (2nd ed.). Chapman & Hall/International Thomson Publishing, New York. 843 pp.

11. Sharp, P. J., Kreis, M., Shewry, P. R. & Gale, M. D. (1988). Location of β-amylase sequences in wheat and its relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 289-290.
12. Spada, A., Caporali, E., Marziani, G. & Portaluppi, P. (1998). A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1083-1089.
13. Stajner, N., Bohanec, B. & Javornik, B. (2002). Genetic variability of economically important Asparagus species as revealed by genome size analysis and rDNA ITS polymorphisms. *Plant Science*, 162, 931-937.
14. Zahuang, F. Y., Chen, J. F., Staub, J. E. & Qian, T. (2004). Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. *Plant Breeding*, 123, 167-172.