مجله علوم باغباني ايران
دوره ۴۰، شماره ۲، ۱۳۸۸ (۷۱-۶۱)

بررسي تنوع ژنتيكي برخي از نمونه‌هاي خرمالو با استفاده از خصوصيات مرفولوژيكي و نشانگرهای RAPD

محمدرضا فتاحي مقدم[1]*، زهرا طالب بيدختي[2] و ذبيح اله زماني[3]
۱، ۲، ۳، دانشيار، دانشجوي سابق كارشناسي ارشد و دانشيار
پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۶/۱۰/۱۶- تاريخ تصويب: ۸۷/۳/۸)

چكيده

در اين پژوهش تنوع ژنتيكي ۲۹ نمونه و ژنوتيپ خرمالو با استفاده از نشانگرهاي مورفولوژيكي و **RAPD** مورد بررسي قرار گرفت. صفات وزن تر ميوه، قطر طولي و عرضي ميوه، سفتي گوشت ميوه، **pH**، **TA**، **TSS** عصاره ميوه، شاخص طعم ميوه، رنگ پوست و گوشت ميوه، وجود بذر در ميوه، و طول و عرض برگ بررسي شدند. همچنين تعداد ۱۰۰ آغازگر تصادفي در انجام واكنش **PCR** روي نمونه‌ها آزمايش شد. نتايج تجزيه واريانس صفات اندازه‌گيري شده نشان داد كه تمام آنها در محدوده ارقام معني‌دار هستند. نتايج تجزيه همبستگي ساده وجود همبستگي‌هاي منفي و مثبت معني‌دار بين برخي صفات را نشان داد. همچنين از تجزيه فاكتور براي تعيين تعداد عامل‌هاي اصلي استفاده شد. صفات موثر در ٤ گروه عاملي قرار گرفتند كه مجموعاً ۷٦/۷۵% از كل تغييرات را توجيه نمودند. در مورد داده‌هاي **RAPD** تعداد ۱۳ آغازگر تكثير **DNA** الگو را به خوبي انجام داده و بين نمونه‌ها چندشكلي نشان دادند. در مجموع ٦٥ نوار در كل نمونه‌ها تكثير يافتند كه ٦٤ عدد از آنها چندشكل بودند. تجزيه كلاستر نمونه‌ها بر اساس نوارهاي چندشكل با استفاده از ضريب تشابه جاكارد و به روش **UPGMA** انجام گرفت. در تجزيه خوشه‌اي، نمونه‌ها در حد تشابه ٦۰ % در ٤ گروه مجزا جاي گرفتند. گونه‌هاي وحشي خرمالو از انواع خوراكي جدا شده و در دو گروه مجزاي لوتوس و ويرجينيانا قرار گرفتند و خرمالوهاي خوراكي نيز در دو گروه معمولي و ژاپني قرار گرفتند. ضريب كوفنتيكي بين ماتريس تشابه و دندروگرام در حد **r** =۰/۹۷ بدست آمد كه برازش مناسب دندروگرام به ماتريس تشابه را نشان داد.

واژه هاي كليدي: ***Diospyros***، خرمالو، تنوع ژنتيكي، نشانگر مولكولي، **RAPD**.

مقدمه

خرمالوي خوراكي (*Diospyros kaki*) بومي شرق آسيا و كشورهاي چين، ژاپن و كره و متعلق به خانواده Ebenaceae است. جنس *Diospyros* L. داراي تقريباً ۴۰۰ گونه است كه اكثر آنها در آسيا، آفريقا و آمريكاي مركزي و جنوبي پراكنده‌اند (Holdman, 2000). عدد كروموزومي اين جنس x=15 است و *D. kaki* هگزاپلوئيد (2n=6x=90) و نانوپلوئيد (2n=9x=135) است در حالي كه *D. lotus* و *D. olifera* با 2n=30 ديپلوئيد هستند و گونه *D. virginiana* داراي دو كاريوتايپ با 2n=60, 90 است. خرمالوي معمولي با وجود هگزاپلوئيدي داراي باروري نسبي است كه احتمالا به دليل آلوپلي‌پلوئيد[1] بودن آن است (Yonemori et al., 2000). اين ميوه كه كاكي يا خرمالوي شرقي نيز ناميده مي‌شود عمدتاً براي توليد ميوه كشت و كار مي‌شود، در حالي كه ساير گونه‌ها با وجود خوراكي بودن ميوه برخي از آنها براي توليد ميوه پرورش

1. Allopolyploidy

* نويسنده مسئول: محمدرضا فتاحی مقدم تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۶۸۶۲۷
E-mail: fattahi@ut.ac.ir

نمي‌يابند (Holdman, 2000). چگونگي ورود خرمالو به ايران در جايي گزارش نشده است ولي امروزه كشت و كار خرمالو در برخي باغات كوچک و در حياط منازل رونق دارد. به طوري كه سطح زير كشت خرمالو در ايران در حدود ۹۰۰ هكتار با توليد نزديك به ۸۰۰۰ تن مي‌باشد. مناسبترين اقليم براي كاشت اين درخت آب و هواي نيمه گرمسيري است ولي با وجود اين در نواحي سرد معتدل نيز مي‌توان برخي ارقام خرمالو را كشت نمود. در ايران در كليه نقاط به غير از نواحي خيلي سرد كوهستاني مي‌توان اين درخت را كشت نمود. ضمناً در نواحي نيمه گرمسير نيز در ارتفاعات بيشتر از ۱۰۰۰ متر مي‌توان از آنها بهره‌برداري نمود (Madanloo, 1987).

ميزان توليد جهاني ميوه خرمالو (*Diospyros kaki*) در سال ۲۰۰۵ بر طبق گزارش FAO برابر با ۲.۷۳٤.۰۱٦ تن بوده است كه ميزان ۲.۵۳۰.۳۶۵ تن آن مربوط به قاره آسيا مي‌باشد. كشورهاي چين، ژاپن، كره، برزيل، جمهوري آذربايجان، ايتاليا، فلسطين اشغالي، نيوزلند، ايران، استراليا و مكزيك به ترتيب بيشترين ميزان توليد را داشته‌اند (*www.fao.org*/Faosatat). ميوه خرمالو منبعي سرشار از ويتامين‌هاي A و C، كاروتنوئيدها و فيبر خوراكي است. ميوه سالم خرمالو به صورت تازه‌خوري مصرف مي‌شود و يا اينكه پس از خشك كردن يا يخ‌زدن و يا در صنايع غذايي از قبيل تهيه مربا، كمپوت، بيسكويت، كيك،بستني، پودينگ و... مصرف مي‌شود(Miller & Crocker, 1994).

شناسايي ژرم‌پلاسم خرمالوي موجود در ايران به كمک نشانگرهاي ژنتيكي مي‌تواند قدم اوليه و بسيار مهم در راستاي بهبود پرورش خرمالو در ايران باشد. با كمک نتايج چنين تحقيقاتي مي‌توان نسبت به معرفي بهترين ارقام اقدام نمود و در ادامه با وارد نمودن ارقام جديد با صفات برتر از كشورهاي منشا اين گياه و با بررسي تطابق‌پذيري آنها با شرايط اقليمي نواحي پرورش خرمالو، نسبت به گسترش كاشت انواع جديد (ارقام غير گس) اقدام كرد.

نشانگرهاي مورفولوژيک يا صفات فنوتيپي از زمان‌هاي بسيار دور براي شناسايي و گزينش گياهان مورد استفاده قرار مي‌گرفتند. اين نوع نشانگرها اغلب داراي توارث غالب و مغلوب بوده و اثرات اپيستازي و پليوتروپي دارند، تحت تاثير شرايط محيطي و مرحله رشد موجود قرار مي‌گيرند، فراواني و تنوع كمي دارند و گاهي براي مشاهده و ثبت آنها بايد منتظر ظهور آنها ماند كه اين كار در مورد گياهان چند ساله بسيار مشكل است. به همين دلايل امروزه، با وجود مفيد بودن اين نشانگرها، استفاده از آنها بسيار محدود شده است و متخصصين به دنبال پيدا كردن نشانگرهاي دقيق‌تري هستند (Madanloo, 1987).

در مورد گياه خرمالو (*Diospyros kaki*) طبقه‌بندي-هايي بر اساس صفات مورفولوژيكي انجام گرفته است. Bellini et al. (2001)، ۳۹ ويژگي مورفولوژيكي ساقه، برگ، گل، ميوه و بذر مجموعه‌اي از درختان خرمالوي موجود در ايتاليا را بررسي كردند. آنها همچنين از نشانگر RAPD نيز روي نمونه‌ها استفاده كردند اما مقدار همبستگي نسبتاً پاييني (r = ۰/۵۷) بين نتايج حاصل از مورفولوژيكي و نشانگر RAPD بدست آمد. Badenes et al. (2003)، نيز تنوع ژنتيكي مجموعه‌اي از خرمالوهاي اسپانيا را به كمك ماركر RAPD بررسي كردند. آنها نشان دادند كه نتايج حاصل از RAPD با نتايج مورفولوژيكي تطابق نسبي دارد. Hasegawa et al. (2005)، صفات تعداد گل و ميوه در هر شاخه، وزن ميوه، قطر و طول ميوه، تعداد و اندازه بذور در ميوه، رنگ پوست، سفتي گوشت، TSS، طول و عرض برگ، سطح برگ، وزن تر و خشك برگ و ميزان كلروفيل برگ‌ها را در دو ژنوتيپ جديد غيرگس خرمالو كه تقريباً ميان‌رس بودند اندازه‌گيري كرده و معيارهاي شناسايي مورفولوژيكي اين دو ژنوتيپ را مشخص نمودند. Yang et al. (2005)، به بررسي مورفولوژيكي سلول‌هاي تانن در خرمالو پرداختند. آنها انواع مختلف خرمالو را بر اساس اندازه سلول‌هاي تانني، محل قرارگيري اين سلول‌ها، شكل و رنگ اين سلول‌ها تقسيم‌بندي كردند. از ماركرهاي مولكولي مختلف به طور گسترده در شناسايي ژنوتيپ‌هاي درختان ميوه از جمله جنس *Diospyros* استفاده شده است (Guo et al., 2006; Hasegawa et al., 2005; Hu & Luo, 2006; Kanzaki et al., 2002). Shiran et al. (2006) از ماركرهاي RAPD و SSR براي بررسي تنوع ژنتيكي تعدادي از ارقام بادام‌هاي ايران استفاده كردند. Sarkhosh et al. (2006) نيز به كمك ماركر RAPD و نشانگرهاي مورفولوژيك تنوع ژنتيكي تعدادي از ارقام انار ايران را بررسي كردند.

ماركر مولكولي RAPD يكي از ماركرهاي معمول است كه به طور موثر براي شناسايي ژنوتيپ‌ها در خرمالو و گونه‌هاي وابسته آن به كار رفته است. در تحقيق حاضر از

مارکر RAPD همراه با تعدادي خصوصيات موفولوژيكي براي بررسي تنوع ژنتيكي برخي از نمونه‌هاي خرمالو و دو گونه وابسته به آن (لوتوس و ويرجينيانا) استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گياهي

در نيمه اول آبان ماه سال ۱۳۸۴تعداد ۲۹ نمونه و ژنوتيپ خرمالو (جدول۱) شامل ۲۱ نمونه از منطقه كرج (۱۴ نمونه از پرديس كشاورزي و منابع طبيعي و ۶ نمونه از ناحيه كلاك و يک نمونه از وليان) و ۸ نمونه از منطقه ورامين (كلكسيون خرمالوي مركز تحقيقات كشاورزي ورامين) انتخاب و مورد نمونه‌برداري قرار گرفتند. در كل ۲۲ نمونه از كاكي (*Diospyros kaki*)، ۵ نمونه از لوتوس (*Diospyros lotus*) و ۲ نمونه از ويرجينيانا (*Diospyros virginiana*) مورد بررسي قرار گرفتند (جدول۱). ميوه ۲۴ نمونه از ۲۹ نمونه مذكور نيز كه در دسترس بودند، در زمان رسيدن ميوه برداشت شد. صفات كمي و كيفي نمونه‌ها (جدول۲) به شرح زير اندازه‌گيري شدند:

وزن ميوه‌ها با ترازوي دقيق و قطر طولي و عرضي ميوه‌ها با كوليس اندازه‌گيري شد. سفتي ميوه‌ها بوسيله پنترومتر[1] با پيستون ۰/۸ سانتي‌مترمربع بعد از حذف پوست در دو جهت روي خط استواي ميوه اندازه‌گيري شده و ميانگين آنها براي هر ميوه لحاظ شد. براي تهيه عصاره، بعد از آب‌گيري از ميوه ها، آب ميوه در فالكون‌هاي ۱۵ ميلي ليتري ريخته شد و پس از سانتريفيوژ به مدت ۵ دقيقه در ۱۰۰۰ دور در دقيقه، روشناور از كاغذ صافي عبور داده شد و مورد استفاده قرار گرفت. اسيديته توسط pH متر[2] بدون رقيق‌سازي در دماي محيط اندازه‌گيري شد. اندازه‌گيري مجموع اسيدهاي آلي قابل تيتراسيون بعد از رقيق‌سازي (۵ سي‌سي عصاره + ۱۵ سي‌سي آب مقطر دو بار تقطير) به روش استاندارد با سود ۰/۱ نرمال به كمك دستگاه pH متر تا رسيدن pH به ۸/۲ انجام گرفت. اسيد آلي غالب در خرمالو اسيد ماليك است (Daood et al., 1992; Glew et al., 2005) كه درصد اسيد بر حسب آن محاسبه گرديد. مجموع مواد جامد محلول عصاره توسط دستگاه رفراكتومتر[3] در دماي محيط ۲۵°C بدون رقيق‌سازي اندازه‌گيري شد. شاخص طعم ميوه از تقسيم ميزان TSS بر TA بدست آمد. رنگ پوست و گوشت ميوه بر طبق دفترچه استاندارد رنگي[4] آمريكا براي خرمالو، كه از شماره يک (زرد كم رنگ) تا هفت (قرمز) است رتبه بندي گرديد. به ميوه‌هاي بذردار شماره يک و بدون بذر شماره صفر داده شد. طول و عرض برگ‌ها نيز توسط خط‌كش با دقت ميلي‌متر اندازه‌گيري گرديد. از آنجا كه ميوه‌هاي تمام خرمالوهاي مورد بررسي در اين آزمايش از انواع گس[5] بودند و ميزان تانن محلول در آنها در هنگام برداشت بالاتر از ۵۰۰۰ppm بود از وارد كردن اين صفت در آناليزها خودداري شد. ميوه‌ها بعد از رسيدن كامل و نرم شدن گسي خود را از دست دادند.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌هاي برگي با استفاده از روش Vroh Bi et al. (1996) صورت گرفت. كميت و كيفيت DNA بدست آمده با استفاده از روش اسپكتروفتومتري در طول موج هاي ۲۶۰nm و ۲۸۰nm و الكتروفورز DNA در ژل آگارز با غلظت يک درصد انجام و سپس غلظت آنها يكسان سازي ($ng/\mu l$ ۵) شد.

آزمايش RAPD

براي انجام آزمايش RAPD تعداد ۱۰۰ آغازگر تصادفي سري TIB MOLBIOL مورد استفاده قرار گرفت. آنزيم Taq DNA polymerase و مخلوط نوكلئوتيدها (dNTPs) به اضافه بافر PCR (۱۰ برابر غلظت) و محلول $MgCl_2$ از شركت سيناژن (ايران) تهيه شد. كليه وسايل و تيوب‌هاي۰/۲ ميلي ليتري PCR قبل از استفاده بوسيله اتوكلاو استريل شدند. براي هر مخلوط واكنش، مقدار $1\mu l$ از DNA تهيه شده از هر يک از نمونه‌ها با غلظت $ng/\mu l$ ۵ به μl ۲۴ از مخلوط واكنش PCR شامل PCR buffer، TaqDNA Polymerase، dNTPs، $MgCl_2$ و آب دوبار تقطير استريل اضافه گرديد كه در نهايت حجم محلول واكنش PCR براي هر نمونه به μl ۲۵ رسيد و لوله‌هاي حاوي مخلوط واكنش در دستگاه ترموسايكلر قرار گرفتند و مطابق برنامه دستگاه، (يک دوره ۴ دقيقه در دماي ۹۴ درجه سانتيگراد، ۳۵ دوره در دماهاي ۹۲°C يک دقيقه، ۳۵°C يک دقيقه و ۷۲°C دو دقيقه و دوره نهايي در۷۲°C

1. Fruit pressure tester-FT327
2. Sartorius professional pH meter pp-20
3. ABBE Refractometer (Ceti Belgium)
4. Color Chart
5. Astringent

به مدت ۱۰ دقيقه) قرار گرفت. پس از انجام واكنش PCR به محتويات واكنش هر لوله مقدار μl ۵ بافر بارگذاري اضافه گرديد و مخلوط حاصل در چاهک‌هاي ژل آگارز ۱/۲% در بافر TBE ريخته شد. نمونه‌ها به مدت ۲/۵ ساعت با جريان ۱۰۰ ولت الكتروفورز شدند. پس از اين مرحله ژل به مدت ۳۰ دقيقه در محلول اتيديم بروماید ۵ ميكروگرم در ليتر رنگ‌آميزي شد و پس از شستشو در آب مقطر توسط دستگاه عكسبرداري از ژل نوارهاي تكثير شده DNA تحت نور UV مشاهده و عكس برداري صورت گرفت.

جدول ۱- اسامي قراردادي، منطقه جمع‌آوري نمونه‌هاي خرمالو و برخي از خصوصيات آنها

رديف	نمونه	علامت اختصاري	منطقه	خصوصيت ويژه ميوه
۱	Kaki-Round-Karaj-1	Kaki-RK1	كلاك كرج	معمولي*
۲	Kaki-Round-Karaj-2	Kaki-RK2	كلاك كرج	معمولي
۳	Kaki-Round-Karaj-3	Kaki-RK3	كلاك كرج	معمولي
۴	Kaki-Round-Karaj-4	Kaki-RK4	كلاك كرج	معمولي، ناهنجاري زياد در شكل ميوه
۵	Kaki-Round-Karaj-5	Kaki-RK5	پرديس-كرج	معمولي، كمي ناهنجاري در شكل ميوه
۶	Kaki-Round-Karaj-6	Kaki-RK6	پرديس-كرج	معمولي
۷	Kaki-Round-Karaj-7	Kaki-RK7	پرديس-كرج	معمولي، كمي ناهنجاري در شكل ميوه
۸	Kaki-Round-Karaj-8	Kaki-RK8	پرديس-كرج	معمولي
۹	Kaki-Round-Karaj-9	Kaki-RK9	پرديس-كرج	معمولي
۱۰	Kaki-Round-Karaj-10	Kaki-RK10	پرديس-كرج	اندازه كمي بزرگتر از ساير معمولي
۱۱	Kaki-Round-Karaj-11	Kaki-RK11	پرديس-كرج	معمولي
۱۲	Kaki-Round-Karaj-12	Kaki-RK12	وليان كرج	-
۱۳	Kaki-Round-Varamin-1	Kaki-RV1	ورامين	معمولي
۱۴	Kaki-Round-Varamin-2	Kaki-RV2	ورامين	معمولي
۱۵	Kaki-Flat-Varamin-1	Kaki-FV1	ورامين	شكل مربعي، كاسبرگ هاي بزرگ
۱۶	Kaki-Flat-Varamin-2	Kaki-FV2	ورامين	شكل مربعي، كاسبرگ هاي بزرگ
۱۷	Kaki-Heart-Karaj-1	Kaki-HK1	كلاك كرج	-
۱۸	Kaki-Heart-Karaj-2	Kaki-HK2	كلاك كرج	شكل قلبي بزرگ، پوست زرد و گوشت داراي لكه هاي تيره، بذردار، كاسبرگ‌هاي بزرگ
۱۹	Kaki-Heart-Karaj-3	Kaki-HK3	پرديس-كرج	شكل قلبي، اندازه نسبتا بزرگ، رنگ پوست زرد، كاسبرگ هاي بزرگ
۲۰	Kaki-Heart-Varamin-1	Kaki-HV1	ورامين	شكل قلبي، اندازه بزرگ، رنگ پوست زرد، كاسبرگ هاي بزرگ
۲۱	Kaki-Heart-Varamin-2	Kaki-HV2	ورامين	شكل قلبي، اندازه بزرگ، رنگ پوست زرد، كاسبرگ هاي بزرگ
۲۲	Kaki-Heart-Varamin-3	Kaki-HV3	ورامين	شكل قلبي، اندازه بزرگ، پوست متمايل به قرمز و گوشت زرد ، كاسبرگ هاي بزرگ
۲۳	Lotus-male-Varamin	Lotus-MV	ورامين	-
۲۴	Lotus-male-Karaj	Lotus-MK	پرديس-كرج	-
۲۵	Lotus-Karaj-1	Lotus-K1	پرديس-كرج	اندازه بسياركوچك به اندازه فندق، بذردار
۲۶	Lotus-Karaj-2	Lotus-K2	پرديس-كرج	اندازه بسياركوچك به اندازه فندق، بذردار
۲۷	Lotus-Karaj-3	Lotus-K3	پرديس-كرج	-
۲۸	Virginiana-Karaj-1	Vrgn-K1	پرديس-كرج	اندازه كوچک، بذردار
۲۹	Virginiana-Karaj-2	Vrgn-K2	پرديس-كرج	اندازه كوچك، بذردار

*: ويژگي خرمالوهاي معمولي: اندازه ميوه متوسط ۱۵۰-۱۰۰g، رنگ پوست در حالت رسيده نارنجي براق و قبل از آن نارنجي متمايل به زرد، رنگ گوشت زرد-نارنجي و بدون لكه‌هاي تيره رنگ، ميوه به شكل گرد و تقريبا پخ ، بدون بذر، كاسبرگ‌هاي نسبتا كوچك و برگشته.

جدول ۲- صفات اندازه‌گيري شده مربوط به برگ و ميوه نمونه‌هاي خرمالو مورد مطالعه

رديف	صفت	واحد	صفت	علامت اختصاري
۱	وزن تر ميوه	گرم	Fruit Fresh Weight	FFW
۲	قطر طولي ميوه	سانتيمتر	Fruit Length	FL
۳	قطر عرضي ميوه	سانتيمتر	Fruit Diameter	FD
۴	سفتي گوشت ميوه	كيلوگرم بر سانتيمتر مربع	Fruit flesh Firmness	FF
۵	اسيديته عصاره ميوه	-	Potential of H^+ ions	pH
۶	ميزان اسيدهاي آلي عصاره ميوه	درصد	Titrable Acidity of fruit extract	TA
۷	مجموع مواد جامد محلول عصاره ميوه در دماي ۲۵ درجه	درصد	Total Soluble Solid of fruit extract in 25°C	TSS
۸	شاخص طعم ميوه (نسبت TSS به TA)	نسبت	Fruit Flavor Index	FFI
۹	رنگ گوشت ميوه	رتبه دهي (۷-۱)	Fruit Flesh Color	FFC
۱۰	رنگ پوست ميوه	رتبه دهي (۷-۱)	Fruit Skin Color	FSC
۱۱	وجود بذر در ميوه	رتبه دهي (۱-۰)	Seed Presence	SP
۱۲	طول برگ	سانتي متر	Leaf Length	LL
۱۳	عرض برگ	سانتي متر	Leaf Width	LW

تجزيه داده‌ها

تجزيه واريانس براي صفات مورفولوژيكي با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. براي تجزيه همبستگي و تجزيه عامل‌ها از نرم افزار SPSS و با استفاده از تكنيک چرخش عامل‌ها (روش وريماكس[1]) استفاده شد. در هر عامل اصلي و مستقل ضرايب عاملي ۰/۶ به بالا معني‌دار در نظر گرفته شدند. آزمون نرمال بودن داده‌ها به كمک نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. همچنين تجزيه تري‌پلات با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. براي نوارهاي نشانگر RAPD، به حضور يک نوار واضح و چندشكل عدد يك و عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشكيل ماتريس اعداد صفر و يك (۶۵×۲۹)، ماتريس تشابه ژنوتيپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTsys و با استفاده از ضريب تشابه جاكارد[2] محاسبه گرديد. در نهايت بر اساس ماتريس تشابه تجزيه خوشه‌اي انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA[3] بدست آمد. ميزان انطباق نتايج صفات مورفولوژيكي و نشانگر RAPD با استفاده از گزينه MX-COMP نرم افزار NTsys انجام گرفت.

نتايج و بحث

تجزيه واريانس صفات مورفولوژيكي و مقايسه ميانگين‌ها

نتايج تجزيه واريانس نشان داد كه نمونه‌هاي مورد بررسي براي هر صفت مورد مطالعه با يكديگر تفاوت معني‌دار دارند و به همين دليل اين صفات در مراحل بعدي تجزيه و تحليل آماري استفاده گرديدند. دامنه تغييرات صفات مختلف و ضريب تغييرات صفات (C.V.)[4] در جدول ۳ آمده است. بر اساس نتايج، بزرگترين ميوه‌ها متعلق به نمونه Kaki-HK2 بود كه بيشترين ميانگين وزن تر، طول و قطر ميوه را دارا بود. همچنين اين نمونه داراي كمترين ميانگين ميزان اسيد ميوه بوده و قند بالايي نيز نداشت. اين نمونه بذردار و رنگ گوشت و پوست آن زرد روشن بوده و در گوشت ميوه نقاط قهوه‌اي زيادي ديده مي‌شد. ميوه آن داراي شكلي كشيده بود كه در اين تحقيق از آن تحت عنوان قلبي شكل نام برده شده است. شايد نداشتن شاخص طعم مطلوب مهمترين دليل عدم مصرف اين نوع از خرمالوها در ايران باشد. كوچكترين ميانگين اندازه ميوه متعلق به نمونه Lotus-K1 بود. بالاترين ميزان ميانگين TSS در نمونه Kaki-RK8 وجود داشت و ميانگين ميزان اسيدهاي قابل تيتراسيون در اين نمونه متوسط بود. بيشترين ميانگين ميزان TA در نمونه Kaki-RK2 ديده شد.

ضرايب همبستگي ساده صفات

براي محاسبه ضرايب همبستگي بين صفات، براي داده‌هاي رتبه‌اي از ضريب همبستگي اسپيرمن و براي داده‌هاي پيوسته از ضريب همبستگي پيرسون استفاده شد. ضرايب همبستگي ساده بين صفات نشان داد كه بين برخي از صفات اندازه‌گيري شده همبستگي معني‌داري وجود دارد. نتايج همبستگي صفات در ۲۴ نمونه شامل كاكي، لوتوس و ويرجينيانا، بين وزن تر ميوه و قطر طولي ميوه همبستگي بالايي (r = ۰/۹۶) نشان داد. TA با وزن تر ميوه و قطر طولي و عرضي ميوه در ۲۰ نمونه كاكي همبستگي معني‌دار منفي داشت. همچنين بين شاخص طعم و TA در بين ۲۰ نمونه كاكي همبستگي منفي و معني‌دار بوده و در اين مجموعه شاخص طعم ميوه با وزن ميوه و قطر طولي ميوه نيز همبستگي معني‌دار مثبت داشت. بنابراين مي‌توان نتيجه گرفت كه ميوه‌هاي بزرگتر، كه اكثرا متعلق به گروه ميوه‌هاي قلبي شكل بودند، ميزان اسيدهاي آلي كمتر و شاخص طعم بالاتري داشتند. در تمامي ۲۴ نمونه بين رنگ پوست و رنگ گوشت ميوه نيز همبستگي معني‌دار و مثبت وجود داشت (r=۰/۶۰)، كه نشانگر ارتباط نزديک اين دو صفت با يكديگر بود. در ۲۰ نمونه كاكي بين سفتي گوشت ميوه و رنگ گوشت و پوست ميوه همبستگي منفي معني‌دار بدست آمد يعني ميوه‌هاي پررنگ‌تر، نرم‌تر بودند.

معمولاً ميوه‌هاي خرمالو در هنگام رسيدن نرم مي‌شوند و رنگ بيشتري نيز مي‌گيرند. دليل ديگر مي‌تواند مربوط به تفاوت نمونه‌هاي قلبي شكل، كه به جز در نمونه Kaki-HV3 كه قرمز رنگ بود، در ساير موارد زرد رنگ بوده و ميوه‌هاي سفت‌تري داشتند با نمونه‌هاي گرد باشد كه همه نارنجي رنگ و داراي ميوه‌هاي نرم‌تري نسبت به نمونه‌هاي قلبي شكل بودند. وجود بذر در ميوه بر اندازه ميوه موثر است. در ۲۰ نمونه كاكي مقدار همبستگي وجود بذر در ميوه، با هر سه صفت وزن تر ميوه (r = ۰/۶۸) و طول و عرض ميوه (r = ۰/۴۸) معني‌دار و مثبت بدست

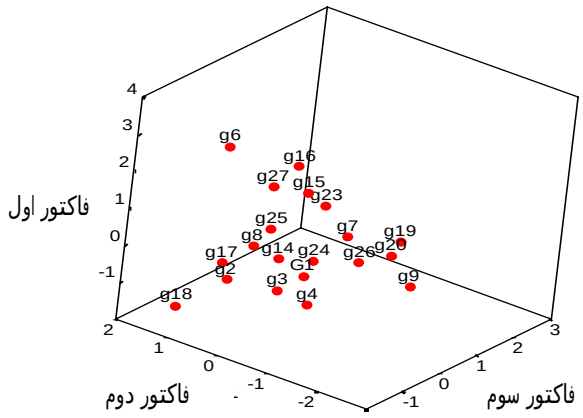
1. Varimax
2. Jaccard's similarity coefficient
3. Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Average
4. Coefficient of Variability

آمد. ميوه‌هاي كاكي گروه گرد، بدون بذر بوده و توليد ميوه در آنها از طريق پارتنوكارپي انجام مي‌گيرد، اما تعدادي از نمونه‌هاي كاكي گروه قلبي شكل داراي بذر بودند و همچنين ميانگين كل وزن ميوه بالاتري را نسبت به گروه گرد نشان دادند كه اثر مثبت وجود بذر در اندازه ميوه را نشان مي دهد. طول و عرض برگ نيز همبستگي بالايي با يكديگر نشان دادند و ژنوتيپ‌هاي لوتوس و ويرجينيانا نسبت به ژنوتيپ‌هاي كاكي برگ‌هاي باريك‌تري داشتند.

تجزيه و تحليل عاملي

يكي از روش‌هاي آماري براي تجزيه اطلاعات موجود در مجموعه‌اي از داده‌ها، روش تجزيه به عامل‌ها يا تحليل عاملي است. در اين روش سعي مي‌شود مجموعه‌اي از متغيرهاي مشاهده شده به تعداد محدودتري متغير كه به آنها عامل گفته مي شود، تبديل شود.

تجزيه عاملي براي ۱۳ صفت در ۲۰ نمونه كاكي (از ۲۲ نمونه كاكي، ميوه نمونه Kaki-RK12 و نهال Kaki-HK1 در دسترس نبود) كه تمامي اين صفات را به طور كامل داشتند، انجام شد. در اين تجزيه ۴ عامل اصلي و مستقل كه مقادير ويژه آنها بيشتر از يک بود، توانستند ۷۶/۷۵ درصد واريانس كل را توجيه نمايند. در عامل اول، صفات مربوط به اجزاء ميوه يعني وزن تر ميوه، قطر طولي ميوه، قطر عرضي ميوه و وجود بذر در ميوه به طور مثبت و ميزان اسيدهاي آلي قابل تيتراسيون در عصاره ميوه به طور منفي داراي ضريب عاملي بالاتر بودند و ۲۹/۸۴ درصد از واريانس كل را توجيه كردند. در عامل دوم، صفات مربوط به ظاهر ميوه يعني رنگ پوست و رنگ گوشت با ضرايب منفي و سفتي ميوه با ضريب مثبت مقدار ۱۷/۱۶ درصد واريانس كل را در بر گرفتند. در عامل سوم، صفات مربوط به طعم ميوه يعني TSS و شاخص طعم ميوه داراي ضريب عاملي بالاتر بودند و مجموعا ۱۵/۲۷ درصد واريانس كل را توجيه نمودند. در عامل چهارم، صفات مربوط به برگ يعني طول و عرض برگ به طور مثبت داراي ضريب عاملي بالاتر بودند و ۱۴/۴۸ درصد از واريانس كل را توجيه كردند. تجزيه تري پلات (شكل۱) براساس سه فاكتور اصلي اول، دوم و سوم حاصل از تجزيه فاكتور داده‌هاي مورفولوژيكي تفكيک ژنوتيپ‌ها را به صورت گرافيكي در سه بعد x، y و z نشان مي‌دهد.



شكل ۱- نتايج تري پلات ۲۰ نمونه خرمالو با استفاده از عامل‌هاي اصلي

نمونه‌ها به ترتيب شماره‌ها عبارتند از:
گروه قلبي: ۶- Kaki-HK2، ۱۵- Kaki-HV1، ۱۶- Kaki-HV2، ۲۳- Kaki-RK8 و ۲۷- Kaki-HK3.
و گروه گرد: ۱- Kaki-RK1، ۲- Kaki-RK2، ۳- Kaki-RK3، ۴- Kaki-RK4، ۷- Kaki-RK5، ۸- Kaki-RK6، ۹- Kaki-RK7، ۱۴- Kaki-HV3، ۱۷- Kaki-FV1، ۱۸- Kaki-FV2، ۱۹- Kaki-RV1، ۲۰- Kaki-RV2، ۲۴- Kaki-RK9، ۲۵- Kaki-RK10 و ۲۶- Kaki-RK11.

جدول ۳- دامنه تغييرات و ضرايب تنوع صفات مورد بررسي

رديف	صفت	واحد	حداقل	حداكثر	ضريب تغييرات (%)*
۱	وزن تر ميوه	گرم	۱/۰۵	۳۰۷/۶۷	۹/۳۶
۲	قطر طولي ميوه	سانتي متر	۱/۱۳	۸/۱	۵/۹۹
۳	قطر عرضي ميوه	سانتي متر	۱/۰۵	۸/۶۲	۴/۳۱
۴	سفتي گوشت ميوه	كيلوگرم	۱	۱۰/۲	۱۳/۲۲
۵	اسيديته عصاره ميوه	pH	۵/۵	۷	۲/۰۵
۶	ميزان اسيدهاي آلي عصاره ميوه	درصد	۰/۷	۲/۹۴	۱۲/۵۸
۷	مجموع مواد جامد محلول عصاره ميوه	درصد	۹/۹۵	۱۷/۴۵	۶/۵۲
۸	شاخص طعم ميوه (قند به اسيد)	نسبت	۴/۱۱	۱۷/۵۵	۹/۶
۹	رنگ گوشت ميوه	رتبه دهي	۱	۴	-
۱۰	رنگ پوست ميوه	رتبه دهي	۲	۷	-
۱۱	وجود بذر در ميوه	رتبه دهي	۰	۱	-
۱۲	طول برگ	سانتي متر	۵/۸۳	۱۶/۹	۱۰/۵۹
۱۳	عرض برگ	سانتي متر	۲/۸۳	۱۹/۸	۲۰/۸۲

* ضريب تغييرات (C.V.) بر اساس نسبت انحراف معيار به ميانگين محاسبه شده است.

در كل، داده‌هاي مورفولوژيكي توانستند گروه‌بندي مناسبي را براي خرمالوهاي نوع كاكي ارائه دهند و تفاوت‌هاي درون گونه‌اي را نشان دهند. در نظر گرفتن صفات بيشتري كه شامل عادات رشدي درخت، گل،ميوه، برگ‌ها و فنولوژي ژنوتيپ‌ها باشد و تكرار اين آزمايش در طي حداقل ۳ سال مي‌تواند اثر محيط را كاهش داده و نتايج دقيق‌تري را در پي داشته باشد.

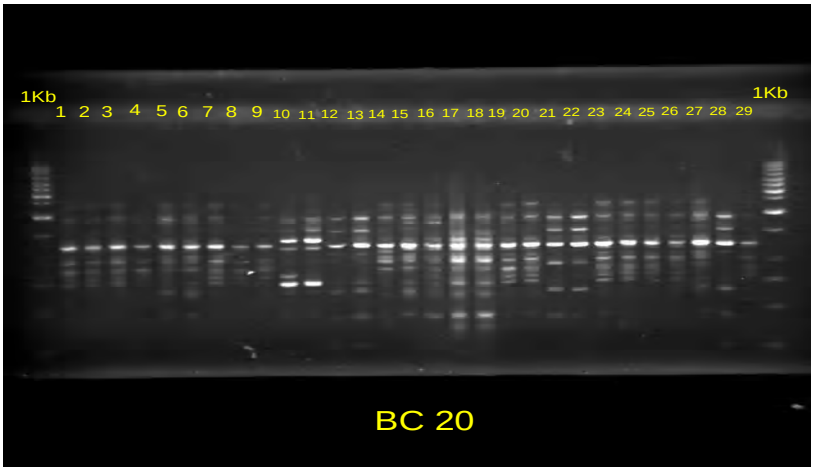
نتايج نشانگر **RAPD**

با بررسي توليد نوارهاي چند شكل روي دو ژنوتيپ Kaki-RK1 و Kaki-HK2 كه تفاوت‌هاي بارزي داشتند آغازگرهاي مطلوب داراي چندشكلي شناسايي و سپس روي كليه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. از ۱۰۰ آغازگر تعداد ۷۵ آغازگر يا هيچ گونه نواري توليد نكردند و يا اينكه محصولات تكثير شده آنها وضوح و تكرار پذيري كافي نداشتند. ۲۵ آغازگر داراي نوارهاي چندشكل بودند كه در نهايت ۱۳ آغازگر توليد نوارهاي چندشكل واضح با تكرارپذيري بالا در بين نمونه‌هاي خرمالو نمودند. همانطور كه در جدول ۴ منعكس شده است، ۱۳ آغازگر مذكور مجموعا ۶۵ قطعه نوار توليد كردند كه ۶۴ نوار آن در دو يا چند نمونه خرمالو چند شكلي ايجاد كردند كه حاكي از درصدبالاي نوارهاي چندشكل در بين نمونه‌ها و ژنوتيپ‌هاي مورد مطالعه است. تعداد نوارهاي تكثير شده با آغازگرهاي مختلف متفاوت بود، بيشترين تعداد نوارهاي تكثير شده نه عدد و مربوط به آغازگر TIBMBB-16 و كمترين آن يك عدد و مربوط به آغازگر TIBMBD-15 بود. اندازه نوارهاي تكثير شده در تمام آغازگرها در محدوده ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز (bp) تخمين زده شد و به طور ميانگين اكثر نوارها در محدوده ۲۰۰۰-۵۵۰ جفت باز بودند (شكل۲). براي گروه‌بندي نمونه‌ها و ژنوتيپ‌ها، ابتدا نوارهاي چند شكل بر اساس اعداد صفر و يک نمره‌بندي شدند. گروه‌بندي نمونه‌ها بر اساس ضرايب تشابه جاكارد و روش UPGMA و با استفاده از نرم‌افزار NTsys (Ver. 2.2) انجام گرديد. همچنين در محاسبه ضريب همبستگي كوفنتيكي كه نشان‌دهنده همبستگي بين ماتريس تشابه و دندروگرام مي‌باشد، مقدار۰/۹۷=r بدست آمد. ماتريس تشابه نشان داد كه بيشترين شباهت (۰/۹۶۹) مربوط به دو نمونه Kaki-HK1 و Kaki-HK2 و همچنين دو نمونه Kaki-HV1 و Kaki-HV2 است. معمولا در آناليزRAPD نمونه‌هاي مختلف با تشابه بالاي ۰/۸۵، يك نوع نمونه به حساب مي‌آيند. كمترين ميزان شباهت (۰/۱۰) نيز مربوط به نمونه Lotus-MK با نمونه Kaki-RK6 بود. ميانگين تشابه كل نمونه‌ها ۰/۵۲ بدست آمد. در تحقيقات Yonemori et al. (1998) روي ارتباط فيلوژني *D. Kaki* و ساير گونه‌هاي خرمالو در مناطق معتدله با استفاده از نواحي خاص DNA كلروپلاستي بوسيله آناليز RFLP مشخص شد كه *D. Kaki* اصل و نسب مشابه با *D. lotus* و *D. virginiana* در مقايسه با ساير گونه‌هاي اين جنس دارد (Yonemori et al., 1998).

در دندروگرام حاصل از ماتريس تشابه (شكل۳) در حد تشابه ۰/۶۰، نمونه‌ها در ۴ گروه اصلي جاي گرفتند كه عبارتند از: گروه معمولي با ميوه گرد، گروه ژاپني با ميوه اكثراً قلبي شكل، گروه ويرجينيانا و گروه لوتوس.

بطور كلي در گروه معمولي، ۱۴ نمونه قرار گرفتند كه تفاوت‌هايي با يكديگر دارند به طوريكه در هفت زير گروه طبقه‌بندي شدند. تمامي اين نمونه‌ها ميوه‌هاي معمولي با شكل تقريبا گرد دارند كه در بازار ايران با نام‌هاي مختلف مانند خرمالوي كن يا خرمالوي كرج به فروش مي‌رسند و مصرف آنها رايج است اما هيچگونه اطلاعات ژنتيكي از اين نمونه‌ها در دست نيست و منشا آنها مشخص نمي‌باشد. چهار نمونه Kaki-RK1، Kaki-RK2، Kaki-RK3 و Kaki-RK4 از يك منطقه (كلاك كرج) جمع‌آوري شدند و صفات ظاهري يكساني نيز داشتند كه در اين جا نيز در يك گروه قرار گرفتند. نمونه Kaki-RK9 از پرديس كشاورزي كرج نيز در كنار اين چهار نمونه و با كمي فاصله قرار دارد. دو نمونه Kaki-RV2 و Kaki-RK8 در يك گروه به طور جداگانه قرار دارند. اين دو نمونه ميانگين اندازه ميوه و شاخص طعم مشابه دارند. اين هفت نمونه در حد تشابه ۰/۸۵ با يكديگر يك گروه را تشكيل دادند.

در زير گروه سوم، سه نمونه جمع‌آوري شده از يك محدوده (پرديس كرج) يعني نمونه‌هاي Kaki-RK5، Kaki-RK7 و Kaki-RK6 قرار گرفتند. چهار نمونه ديگر گروه ميوه گرد، به صورت جداگانه و هر كدام در يك زير گروه قرار گرفتند. از ويژگي مورفولوژيكي خاص اين نمونه‌ها مي‌توان به اندازه بزرگ‌تر ميوه‌هاي نمونه Kaki-RK10 و اندازه بزرگ‌تر برگ‌هاي نمونه Kaki-RK12 نسبت به بقيه نمونه‌هاي ميوه گرد اشاره كرد. علت تفكيك اين نمونه‌ها مي‌تواند جهش‌هاي خاص در آنها باشد. به هر حال تمامي اين نمونه‌ها از نظر ظاهري ميوه‌هاي تقريبا گرد دارند و در گروه خرمالوهاي معمولي جاي مي‌گيرند.

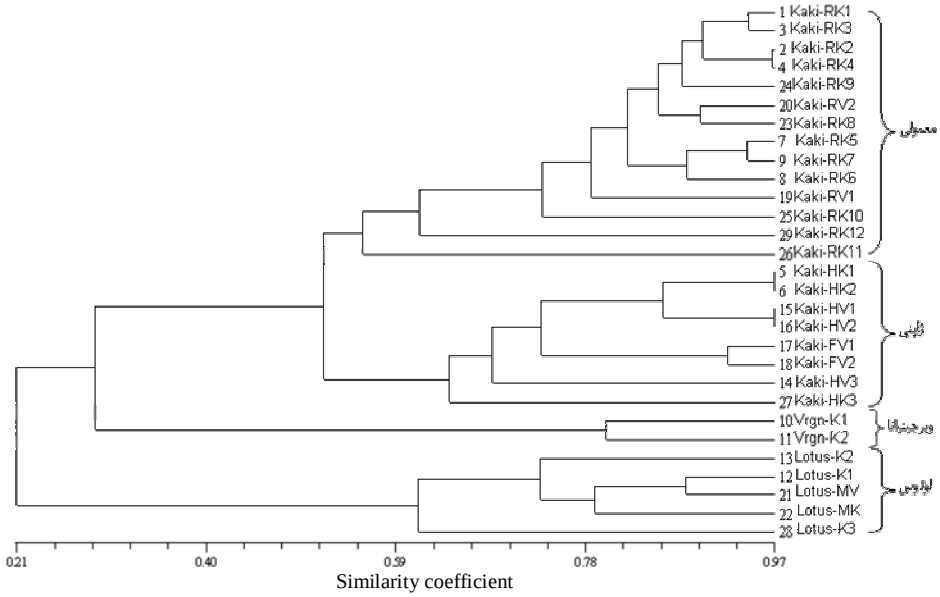


شكل ۲- الگوي نواري حاصل از تكثير DNA مربوط به ۲۹ نمونه و ژنوتيپ خرمالو (جدول ۱) با استفاده از آغازگر TIBMBC-20. دو رديف ابتدا و انتها، نشانگر اندازه مي‌باشند.

جدول ۴- اسامي و مشخصات آغازگرهاي تصادفي ۱۰ نوكلئوتيدي كه در بين نمونه‌هاي خرمالو چندشكلي نشان دادند و براي مقايسه آنها به كار رفتند.

رديف	آغازگر	توالي بازي ۵' → ۳'	درصد GC	تعداد كل نوارهاي تكثير شده	تعداد نوارهاي چندشكل	محدوده اندازه نوارهاي ايجاد شده (bp)
۱	TIBMBA-1	TTCCCCACCC	۷۰	۲	۲	۷۰۰-۱۵۰۰
۲	TIBMBA-9	GGAACTCCAC	۶۰	۷	۷	۵۰۰-۲۰۰۰
۳	TIBMBB-9	AGGCCGGTCA	۷۰	۳	۳	۷۵۰-۱۶۰۰
۴	TIBMBB-11	TGCGGGTTCC	۷۰	۳	۳	۶۰۰-۲۵۰۰
۵	TIBMBB-16	TCGGCACCGT	۷۰	۹	۹	۴۰۰-۲۱۰۰
۶	TIBMBC-8	GGTCTTCCCT	۶۰	۵	۵	۷۰۰-۲۵۰۰
۷	TIBMBC-16	CTGGTGCTCA	۶۰	۶	۶	۳۰۰-۲۰۰۰
۸	TIBMBC-20	AGCACTGGGG	۷۰	۷	۷	۵۰۰-۲۵۰۰
۹	TIBMBD-7	GAGCTGGTCC	۷۰	۶	۵	۵۰۰-۲۰۰۰
۱۰	TIBMBD-15	TGTCGTGGTC	۶۰	۱	۱	۹۰۰-۳۰۰۰
۱۱	TIBMBE-6	CAGCGGGTCA	۷۰	۶	۶	۶۰۰-۲۰۰۰
۱۲	TIBMBE-14	CTTTGCGCAC	۶۰	۶	۶	۵۰۰-۲۰۰۰
۱۳	TIBMBE-19	AGGCCAACAG	۶۰	۴	۴	۴۰۰-۱۵۰۰
كل	-	-	-	۶۵	۶۴	۳۰۰-۳۰۰۰
ميانگين	-	-	۶۵/۴	۵	۴/۹۲	۵۶۵-۲۰۹۲

در گروه ژاپني، ۸ نمونه قرار گرفتند كه هيچكدام از آنها بطورمعمول در بازار مصرف ايران يافت نمي‌شوند و ميوه‌هاي متفاوتي نسبت به خرمالوهاي رايج در ايران دارند. تعداد ۶ نمونه Kaki-HK1، Kaki-HK2، Kaki-HV1، Kaki-HV2، Kaki-HV3 و Kaki-HK3، از نظر ويژگي‌هاي مورفولوژيكي نيز اين گروه‌بندي را كاملاً تصديق مي‌كنند. دو نمونه ديگر (Kaki-FV1 و Kaki-FV2) در اين گروه از نظر مورفولوژيكي تفاوت‌هايي با ۶ عضو ديگر دارند. در اين دو نمونه اندازه ميوه‌ها كوچك‌تر بود و شكل ميوه حالت چهارگوش و پخ داشت، اما كاسبرگ‌ها كاملا مشابه ۶ نمونه ديگر بود. افزايش تعداد صفات مورفولوژيكي مورد بررسي مي‌تواند شباهت‌هاي ظاهري اين دو گروه را با يكديگر بيشتر مشخص كند. دو نمونه Kaki-HV1 و Kaki-HV2 با ميوه‌هاي كشيده و قلبي شكل داراي تشابه ۰/۹۷ با يكديگر و دو نمونه Kaki-HK1 و Kaki-HK2 (كلاك كرج) نيز با همين مشخصات داراي تشابه ۰/۹۷ با هم بودند كه بيشترين حد تشابه در تمامي نمونه‌هاي مورد بررسي بوده است. اين دو گروه با يكديگر تشابه حدود ۰/۸۵ داشتند كه باعث قرار گرفتن آنها در يک دسته گرديد. دو نمونه Kaki-FV1 و Kaki-FV2 با ميوه‌هاي پخ و تقريبا چهارگوش داراي تشابه ۰/۹۲ با يكديگر بودند، در حاليكه تشابه حدود ۰/۷۰ با چهار نمونه قلبي شكل Kaki-HV1، Kaki-HV2، Kaki-HK1 و Kaki-HK2 و تشابه حدود ۰/۶۸ با نمونه Kaki-HV3 و



شكل ۳- دندروگرام مربوط به ۲۹ نمونه خرمالو كه بر اساس داده‌هاي RAPD، محاسبه ضريب تشابه جاكارد و گروه‌بندي UPGMA بدست آمده است.

حدود ۰/۵۳ با نمونه Kaki-HK3 داشتند كه نشانگر تشابه ژنتيكي زياد اين ۲ نمونه با همديگر و همچنين تشابه نسبي ژنتيكي با ساير اعضاء گروه ميوه‌هاي قلبي شكل بود. در نتيجه مي‌توان گفت منشا اين ۲ نمونه با منشا دسته خرمالوهاي قلبي شكل مرتبط است. در كلكسيون مركز تحقيقات كشاورزي ورامين يكي از خرمالوها به نام هاشيا و ديگري به نام فويو ثبت شده‌اند كه با ويژگي‌هاي ظاهري ميوه رقم هاشيا با دارا بودن ميوه‌هاي قلبي شكل و بزرگ و ميوه رقم فويو با دارا بودن ميوه‌هاي پخ و چهار گوش مطابقت دارد. اما فويو به عنوان يک رقم غيرگس و بذردار تعريف گرديده است كه با اين نمونه‌ها مطابقت نمي‌كند. نمونه Kaki-HV3 در يک دسته مجزا قرار گرفت كه از نظر مورفولوژيكي نيز با دارا بودن رنگ پوست ميوه قرمز از بقيه اعضاء گروه كه رنگ پوست زرد داشتند متفاوت بود. اما ويژگي‌هاي ميوه مانند شكل قلبي ميوه، اندازه و شكل كاسبرگ‌ها مشابه بقيه اعضاء گروه بود. نمونه Kaki-HK3 (پرديس كشاورزي كرج) در يک دسته مجزا از بقيه اعضاء گروه قرار گرفت اما ويژگي‌هاي ظاهري ميوه تقريبا مانند ساير اعضاء اين گروه بود. اين نمونه تشابه حدود ۰/۶۵ با ساير اعضاء اين گروه داشت.

در گروه ويرجينيانا، ۲ نمونه قرار گرفتند. يكي از اين نمونه‌ها در باغ بوتانيک پرديس كشاورزي و منابع طبيعي كرج با نام ويرجينيانا نام گذاري شده است (Vrgn-K1). نمونه بعدي (Vrgn-K2) كه داراي تشابه ۰/۸۰ با Vrgn-K1 است و در يک گروه مستقل با آن در دندروگرام قرار گرفته است، نيز با احتمال زياد ويرجينيانا مي‌باشد. درخت و ميوه اين نمونه از نظر مورفولوژي نيز به ويرجينيانا شباهت دارد اما در باغ بوتانيک پرديس كشاورزي و منابع طبيعي كرج نام گذاري نشده است و به عنوان نمونه نامشخص و با ويژگي‌هاي مورفولوژي نزديك به نمونه Vrgn-K1 جمع آوري و مورد بررسي قرار گرفت.

در گروه لوتوس، ۵ ژنوتيپ قرار گرفتند. اين درختان معمولاً به صورت بذري حاصل مي‌شوند و ضمن دارا بودن تفاوت‌هاي ژنتيكي با يكديگر، به صورت درختان نر و يا درختان بارور ديده مي‌شوند. بنابراين وجود تفاوت‌هاي ژنتيكي در اين درختان منطقي است. با اين حال جداشدن آنها از ساير نمونه‌هاي مورد بررسي تفاوت آنها به عنوان گونه‌اي جدا را تاييد مي‌نمايد.

Guo & Luo (2005) به كمك آناليز SRAP خرمالوهاي با منشاء ژاپن، خرمالوهاي با منشاء چين و گونه‌هاي وابسته به خرمالو (*lotus*، *virginiana*، *glaucifolia* و *rhombifolia*) را در سه گروه مجزا قرار دادند. در تحقيق حاضر نيز دو گونه لوتوس و ويرجينيانا از

نمونه‌هاي كاكي جدا شدند و حتي خود اين دو گونه نيز كاملاً از يگديگر تفكيك شدند. Bellini et al. (2001) نيز به كمك ماركر RAPD و آناليز مورفولوژي مجموعه‌اي از خرمالوهاي موجود در ايتاليا و گونه‌هاي وابسته به خرمالو (لوتوس و ويرجينيانا) را گروه‌بندي كردند. در اين گروه‌بندي نيز اين دو مجموعه كاملاً از يكديگر تفكيك شدند.

بطور كلي در تجزيه كلاستر داده‌هاي RAPD، نمونه‌ها در حد تشابه ۶۰% در ۴ گروه مجزا جاي گرفتند. گونه‌هاي وابسته از انواع خرمالوي معمولي جدا شده و در دو گروه مجزاي لوتوس و ويرجينيانا قرار گرفتند. انواع نمونه‌هاي كاكي نيز در دو گروه داراي ميوه گرد و داراي ميوه اغلب قلبي شكل جاي گرفتند. بين ماتريس فواصل حاصل از صفات مورفولوژي با ماتريس تشابه حاصل از داده‌هاي مولكولي همبستگي r=-۰/۴۹ بدست آمد. دلايل همبستگي پايين مي‌تواند مربوط به تكنيک RAPD و يا آناليز مورفولوژي باشد. يكي از دلايل كم بودن اين همبستگي مي‌تواند كم بودن تعداد نمونه‌ها يا صفات اندازه‌گيري شده در آناليز مورفولوژي و يا به احتمال، كم بودن تعداد آغازگرهاي مورد استفاده در آناليز RAPD باشد. از دلايل ديگر، اشكالاتي است كه به داده‌هاي مورفولوژي وارد است كه معمولاً محدود بوده و متاثر از شرايط محيطي مي‌باشند. در منابع علمي در مورد خرمالو بررسي‌هايي فقط از روي صفات مورفولوژيكي انجام شده است (Wang et al., 2005; Yonemori et al., 1998)، بررسي‌هايي هم به صورت مقايسه‌اي بين صفات مورفولوژيكي و داده‌هاي مولكولي انجام گرفته است كه در برخي همبستگي معني‌داري ديده شده است (Badenes et al., 2003) و در برخي همبستگي معني‌دار نبوده است (Bellini et al., 2001). اين محققين دليل عدم تطابق را به ماهيت صفات مورفولوژيكي مربوط دانسته‌اند. صفات مورفولوژيكي به دليل تاثير محيط در آنها و يا اندازه‌گيري‌هاي اشتباه ممكن است تقسيم‌بندي اشتباهي را ارائه دهند، همچنين تعداد صفات و نمونه‌هاي مورد اندازه‌گيري نيز در نتيجه موثر خواهد بود.

با توجه به نامشخص بودن ژنوتيپ‌ها و ارقام خرمالو در ايران و نامگذاري‌هاي نامطمئن كه در بازار فروش خرمالو رايج است، توجه به ويژگي‌هاي مورفولوژيكي و داده‌هاي حاصل از آزمايشات RAPD مي‌تواند نامگذاري‌هاي دقيق و مطلوبي را موجب شود. نامگذاري علمي ژنوتيپ‌هاي خرمالو مانع از اشتباه‌هاي بعدي در شناسايي ارقام اين گياه مي‌شود، بنابراين بررسي ژنتيكي ژنوتيپ‌ها و ارقام موجود خرمالو و گونه‌هاي وابسته به آن در نواحي مختلف ايران در ايجاد كلكسيون دقيق آنها قدمي بسيار موثر خواهد بود.

نمونه‌هاي قلبي شكل با رنگ پوست زرد تا قرمز شباهت ظاهري زياد به رقم Hachiya دارند. خرمالوي Hachiya با منشا ژاپن و رقمي تجاري در كاليفرنيا است. رقمي ميان‌رس با ميوه‌هاي كشيده و بزرگ است، كيفيت بالايي دارد و گوشت آن ژله‌اي است و احتمالا بيش از يك رقم در اين نام مشترك هستند (Miller & Crocker, 1994). نمونه‌هاي مربعي شكل در كلاستر يک گروه مجزا را در ميان نمونه‌هاي قلبي شكل به خود اختصاص دادند. اين نمونه‌ها به رقم Hiratanenashi شباهت دارند و احتمالا به دليل هم منشا بودن، نزديكي ژنتيكي بالايي با گروه قلبي شكل يا رقم Hachiya دارند و به همين علت در كنار نمونه‌هاي اين گروه قرار گرفتند. رقم Hiratanenashi گسترده‌ترين رقم تجاري نوع گس در ژاپن است. ميوه‌هايي ميان‌رس، با اندازه‌اي متوسط و پوستي ضخيم با دوره نگهداري طولاني دارند. گوشت ميوه آبدار و تقريبا هميشه بدون بذر است (Yamagishi et al., 2005). لازم به ذكر است كه رقم‌هايي با اين ويژگي‌ها در مناطق شرق آسيا فراوان هستند و لذا اين نتيجه‌گيري ممكن است داراي اطمينان كافي نباشد.

قضاوت در مورد نزديكي نمونه‌هاي گرد مورد بررسي در اين آزمايش كه از نوع گس هستند به يك رقم شناخته شده خاص مشكل است. ارقام زيادي از خرمالو در كشورهاي ديگر با اين شكل ظاهري وجود دارند. به هر حال براي تعيين دقيق نوع رقم اين نمونه‌ها بررسي‌هاي مقايسه‌اي با نمونه‌هاي شناخته شده اصلي از كشورهاي مبدا نياز است.

تفاوت‌هايي كه نمونه‌هاي با ميوه گرد از نظر ژنتيكي با يكديگر نشان دادند نمايانگر وجود تنوع ژنتيكي در بين اين نوع ميوه خرمالوي رايج در كرج و تهران و مناطق اطراف است كه مي‌تواند به دليل بروز موتاسيون و سلكسيون‌هاي طبيعي ايجاد شده باشد.

بنابراين امكان جمع‌آوري ژنوتيپ‌هاي متفاوت و مقايسه بيشتر بين آنها براي انتخاب بهترين ژنوتيپ‌ها براي شرايط آب و هوايي كرج و يا ساير نقاط مناسب براي توسعه كشت و كار خرمالو وجود دارد. در اين آزمايش تكنيک RAPD براي تفكيک ژنوتيپ‌هاي خرمالو كارآيي لازم را نشان داد.

سپاسگزاري

هزينه‌هاي انجام اين پژوهش از محل اعتبارات قطب علمي علوم باغباني دانشگاه تهران، (وزارت علوم، تحقيقات و فناوري) تامين گرديده است. نويسندگان مراتب قدرداني خود از مديريت گروه علوم باغباني را اعلام مي‌دارند.

REFERENCES

1. Badenes, M., Garces, A., Romero, C., Romero, M., Clave, J., Rovira, M. & Llacer, G. (2003). Genetic diversity of introduced and local Spanish persimmon cultivars revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 579-585.
2. Bellini, E., Benelli, C., Giordani, E., Perria, R. & Paffetti, D. (2001). Genetic and morphological relationships between possible Italian and ancestral cultivars of persimmon. *Acta Horticulturae*, 601, 192-197.
3. Daood, H. G., Biacs, P. & Czinkotai, B. (1992). Chromatographic investigation of carotenoids, sugars and organic acids from *Diospyros kaki* fruits. *Food Chemistry*, 45, 151-155.
4. Faostat. 2005. available at www.fao.org
5. Glew, H. R., Faik, A. A., Millson, M., Huang, H. S., Chuang, L. T., Sanz, C. & Golding, J. B. (2005). Changes in sugars, acids and fatty acids in naturally parthenocarpic date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit during maturation and ripening. *European Food Research and Technology*, 221, 113-118.
6. Guo, D. L. & Luo, Z. R. (2005). Genetic relationship of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 1597-1603.
7. Guo, D., Zhang, H. & Luo, Z. (2006). Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Sciences*, 170, 528-533.
8. Hasegawa, K., Hamada, K. & Kitajima, A. (2005). Differences in seedness, fruit quality and leaf character of Japanese persimmon Taishu and Matsumotowase-Fuyu. *Acta Horticulturae*, 685, 119-132.
9. Holdman, Q. L. (2000). Persimmons for Louisianas children – young and old. 1-26.Retrived Sep 15, 2009, from http://j.t.holdeman.home.att.net/PFLC1_QLH.pdf.
10. Hu, D. & Luo, Z. (2006). Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros spp*. *Scientia Horticulturae*, 109, 275-283.
11. Kanzaki, S., Wakisaka, S. & Utsunomiya, N. (2002). Development of microsatellite markers in Japanese persimmon. In: Proceedins of *Plant, animal & microbe genomes conference*.
12. Madanloo, S. (1987). *Persimmon growing in Iran*. Mazandaran seed and plant center publication, Iran. (In Farsi).
13. Miller, E. P. & Crocker, T. E. (1994). *Oriental persimmons in Florida*. SP 101 Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 1-16.
14. Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. & Ebadi, A. (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111, 24-29.
15. Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayad-Tabatabaei, B. E. & Moradi, H. (2006). Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 280-292.
16. Vroh Bi, I., Harvengt, L., Chandelier, A., Mergeai, G. & Dujardin, P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*, 115, 205-206.
17. Wang, R., Yang, Y., Ruan, X. & Li, G. (2005). Native non-astringent persimmon in China. *Acta Horticulturae*, 685, 99-102.
18. Yamagishi, M., Matsumoto, S., Nakatsuka, A. & Itamura, H. (2005). Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 105, 283-290.
19. Yang, Y., Ruan, X., Wang, R. & Li, G. (2005). Morphological characteristics under optical microscope of tannin cells in persimmon fruit. *Acta Horticulturae*, 685,135-141.
20. Yonemori, K., Kanzaki, S. H., Parfitt, D. E., Utsunomiya, N., Subhadrabandhu, S. & Sugiura, A. (1998). Phylogenetic relationship of *Diospyros kaki* (Persimmon) to *Diospyros ssp*. (Ebenaceae) of Thailand and four temperate zone *Diospyros ssp*. from an analysis of RFLP variation in amplified cpDNA. *Genome*, 41, 173-182.
21. Yonemori, K., Sugiera, A. & Yamada, M. (2000). Persimmon genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 19, 191-225.