

بررسی تنوع کمیت ژنومی (C-value) و سطح پلوئیدی در تعدادی از ارقام سیب بومی به روش فلوسایتومتری

شاداب فرامرزی^{۱*} - عباس یداللهی^۲ - قاسم کریمزاده^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸

چکیده

علیرغم تنوع زیاد ارقام و گونه‌های سیب در ایران، هنوز بانک اطلاعاتی در مورد وضعیت پلوئیدی و اندازه ژنوم آنها وجود ندارد. در این تحقیق، مقدار DNA ژنومی و سطح پلوئیدی تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های سیب ایرانی با دستگاه فلوسایتومتری و به روش رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم دیدید در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. همچنین، تاثیر PVP به عنوان یک بازدارنده اکسیداسیون ترکیبات فنلی روی اندازه ژنوم این سیب‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایش شد. نتایج نشان داد که همه‌ی ارقام مطالعه شده، دیپلوئید هستند و اندازه ژنوم تخمین زده شده در آنها بین ۱/۷۳ تا ۱/۵۷ پیکوگرم در هر هسته سلولی متغیر بود. تیمار PVP روی تخمین اندازه ژنوم در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ارقام بومی، اندازه ژنوم، تنوع ژنتیکی، ژرم پلاسما

مقدمه

ذرت، نژادهای شمالی با هتروکروماتین بیشتر، دارای ژنوم بزرگتری از آنهایی که هتروکروماتین کمتری دارند، هستند (۱۴ و ۱۸). با توجه به تنوع بسیار زیادی که از نظر مورفولوژی و نیز بیوشیمیایی در گونه‌ها و ارقام یک جنس وجود دارد، می‌توان این تنوع را در اندازه ژنوم و سطوح پلوئیدی بررسی کرد. اطلاعات در مورد سطح پلوئیدی برای اصلاح کنندگان بسیار حائز اهمیت است (۲۱).

در سیب، دوره‌گیری بین ارقام و یا دیگر گونه‌ها یا جنس‌های زیرخانواده پوموئیده، یکی از روش‌های مرسوم اصلاح است (۶). بنابراین، نیاز به اطلاعات مربوط به سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم مبرم می‌باشد. در طول سال‌های گذشته، از روش‌های مختلفی برای تخمین مقدار DNA هسته (اندازه ژنوم) استفاده شده است، اما اخیراً استفاده از فلوسیتومتری (FCM) کاربرد فزاینده‌ای داشته است. فلوسیتومتری، بهترین و سریع‌ترین روش برای تخمین میزان DNA c-value و سطح پلوئیدی در سیب می‌باشد (۷، ۹، ۱۰، ۱۹ و ۲۱). محبوبیت این تکنیک در سهولت آماده‌سازی نمونه‌های مورد آزمایش و نیز بررسی تعداد زیادی ذرات (شامل سلول یا هسته) در یک زمان کوتاه است (۱۵).

سیب از نظر محتوای فنلی به عنوان یک میوه شاخص در نظر گرفته می‌شود. وجود این متابولیت‌های ثانویه در سیتوسل سلول به دلیل اکسید شدن (قهوه‌ای شدن) توسط آنزیم پلی فنل اکسیداز باعث تداخل در رنگ‌آمیزی ژنوم و تخمین دقیق میزان DNA هسته

سیب از جنس *Malus* Miller، زیرخانواده *Maloideae* و خانواده *Rosaceae* می‌باشد (۱۷). سیب کنونی، یک هیبرید پیچیده درون گونه‌ای است که با نام علمی *Malus × domestica* Borkh. معرف شده است (۱۳ و ۱۶). پایه کروموزومی در این زیرخانواده $x = 17$ است و برای آن سطوح پلوئیدی دیپلوئید ($2n=34$)، تریپلوئید ($2n=51$) و تتراپلوئید ($2n=68$) گزارش شده است (۱۶ و ۲۲). بررسی اندازه ژنوم در گیاهان، اطلاعات مفید و ارزشمندی نظیر مقدار هزینه‌ی لازم برای توالی‌یابی ژنوم و تعداد کلون‌های لازم برای ساخت کتابخانه BAC را فراهم می‌کند. همچنین بینش گسترده‌ای در مورد تکامل، سیستماتیک، بوم‌شناسی، ژنتیک جمعیت و اصلاح نباتات را به ما می‌دهد (۱۵).

طبقه‌بندی گیاهان براساس اندازه ژنوم آنها مخصوصاً در سطوح تاکسونومی پایین، بسیار اهمیت دارد (۲). اندازه ژنوم حتی در گونه‌های خیلی نزدیک نیز، می‌تواند متفاوت باشد؛ برای مثال، در

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه هرمزگان

*- نویسنده مسئول: (Email: faramarzi@ hormozgan.ac.ir)

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه تربیت مدرس

در این زمینه برای سیب‌های ایرانی باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شیمیایی استفاده شده

نمونه‌گیری از برگ تعدادی از ارقام سیب در تابستان ۱۳۹۲ به عمل آمد (جدول ۱). کیت استخراج هسته، بافر رنگ آمیزی، رنگ پروپیدیوم یدید و آنزیم RNase از شرکت پارتک آلمان خریداری شد.

می‌شود. در ارقام سیب ایرانی نیز، مقادیر بالایی فنل وجود دارد (۵)، که بی‌شک در تخمین مقدار ژنوم موثر است. استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانت نظیر PVP برای حذف ترکیبات بازدارنده‌ی رنگ‌آمیزی ژنوم بررسی شده است (۱۰).

از آنجا که یک ژرم پلاسما ارزشمند از سیب در داخل کشور وجود دارد و هیچ گونه اطلاعاتی از سطح پلوئیدی و مقدار ژنوم آنها در دست نیست، در این تحقیق به تعیین مقدار DNA ژنومی و سطح پلوئیدی تعدادی از ارقام سیب ایرانی با دستگاه فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم پرداخته شد و امید است آغازی برای شروع تحقیقات بیشتر

جدول ۱- مشخصات ارقام سیب بومی استفاده شده به همراه موقعیت جغرافیایی منشا و محل جمع آوری

Table 1- Characterization of local *Malus × domestica* Borkh. studied cultivars with geographical location of origin and collection site

رقم Cultivar	منشا Origin	محل جمع آوری Collection site	طول و عرض جغرافیایی منشا Longitude & Latitude of origin site	طول و عرض جغرافیایی محل جمع آوری Longitude & Latitude of collection site
اطلسی** Atlasi**	-	دماوند Damavand	-	E 52.4 N35.43
کهنز-۱** Kohanz-1**	شهریار Shahriar	دماوند Damavand	E50.56 N35.33	E 52.4 N34.43
کرمانشاه** Kermanshah**	کرمانشاه Kermanshah	دماوند Damavand	E47.3 N34.18	E 52.4 N35.43
شیخی** Sheikhi**	-	دماوند Damavand	-	E 52.4 N35.43
بکران* Bekran*	شاهرود Shahroud	بکران Bekran	E 55.00 N36.25	E 55.00 N36.25
بسطام* Bastam*	شاهرود Shahroud	بسطام Bastam	N54.58 N36.35	N54.58 N36.35
رامسر* Ramsar*	رامسر Ramsar	رامسر Ramsar	-	-
کهنز-۲** Kohanz-2**	شاهرود Shahroud	بسطام Bastam	N54.58 N36.35	N54.58 N36.35
گالا Gala	نیوزیلند New Zealand	دماوند Damavand	-	E 52.4 N35.43
گلاب Golab	شاهرود Shahroud	بسطام Bastam	N54.58 N36.35	N54.58 N36.35

**ارقام گوشت سفید/کرم‌رنگ، * ارقام گوشت قرمز، N: عرض جغرافیایی شمالی، E: عرض جغرافیایی شرقی
**White/creamy cultivars, * Red flesh cultivars, N: North, E: East

استخراج هسته و فلوسایتومتري

از برگ‌های جوان اما به‌خوبی گسترش یافته در دو مرحله و هر مرحله سه تکرار برای هر رقم استفاده شد. یک سانتی متر مربع از برگ سیب و یک سانتی متر مربع از برگ جعفری^۱، به عنوان استاندارد داخلی، در یک پتری دیش قرار گرفت. به منظور استخراج هسته، ۵۰۰ میلی لیتر بافر استخراج هسته به آن افزوده شد و با تیغ تیز هر دو تکه برگ، همزمان به ذرات ریز قطعه قطعه شدند. سپس با فیلتر ۵۰ میکرون و سپس ۳۰ میکرون فیلتر شدند. یک میلی لیتر بافر رنگ آمیزی، ۴ میکرولیتر پروپیدیم دید و ۴ میکرولیتر RNAase اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط (برای فعالیت آنزیم RNAase) قرار گرفت. در نهایت، شمارش هسته‌ها با دستگاه فلوسایتومتري (مدل BD FACSCanto II، آمریکا) در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. تخمین اندازه ژنوم طبق فرمول مقدار DNA 2C-value (۳) و CV زیر ۵ درصد بدست آمد.

DNA 2C – value (pg) نمونه

$$= \frac{\text{میانگین G1 نمونه}}{\text{میانگین G1 استاندارد}} \times \text{DNA 2c} \\ \text{استاندارد value} -$$

از آنجا که ۱ پیکوگرم (pg) معادل ۹۷۸ مگا جفت باز (Mbp) است، مقدار ژنوم بر حسب مگا جفت باز و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۳).

$$978 \text{ (pg)} \times \text{اندازه ژنوم مونوپلوئید} = \text{اندازه ژنوم}$$

تیمار PVP

از آنجا که PVP با ترکیبات فنلی پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کند و موجب تشکیل کمپلکس PVP-فنل شود، می‌تواند روی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و در نتیجه قهوه‌ای شدن موثر باشد. تیمار PVP به دو صورت نمونه‌های بدون PVP و ۱٪ PVP به منظور بررسی تاثیر آن در تغییر اندازه ژنوم بررسی شد. در مرحله افزودن بافر رنگ آمیزی، ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ PVP به ویال‌ها اضافه شد.

آنالیز داده‌ها

تجربه و تحلیل هیستوگرام‌های به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتري، با نرم افزار PartecFloMax صورت گرفت. میانگین‌ها به روش LSD با استفاده از نرم افزار SAS ver.9.2 مقایسه شدند. مقایسه اثر PVP روی اندازه ژنوم به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بررسی شد.

نتایج و بحث

اندازه ژنوم و تنوع DNA C-value

نتایج جدول تجزیه واریانس اندازه ژنوم نشان داد رقم، تیمار و اثر متقابل تیمار و رقم روی ژنوم در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

با توجه به تنوع بسیار زیادی که از نظر ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی در گونه‌ها و ارقام سیب وجود دارد، بررسی اندازه ژنوم آنها ضروری به نظر می‌رسد. اطلاعات در مورد سطح پلوئیدی برای اصلاح کنندگان بسیار حائز اهمیت است (۲۱). در این تحقیق، اندازه ژنوم ۹ رقم سیب ایرانی و رقم تجاری 'گالا' به وسیله نرم افزار FloMaxPartec برحسب پیکوگرم تخمین زده شد (جدول ۳). همچنین اندازه ژنوم برحسب مگا جفت باز (۱ pg = ۹۷۸ Mbp) محاسبه شد (۳).

مقدار DNA 2C-value در ارقام مطالعه شده از ۱/۵۷ پیکوگرم در رقم 'گلاب' شهرستان شاهرود تا ۱/۷۳ پیکوگرم در رقم 'گلاب کرمانشاه' متغیر بود (جدول ۳). میانگین اندازه ژنوم به دست آمده در کل ارقام مطالعه شده، ۱/۶۲ پیکوگرم بود. در تحقیقات انجام شده روی ارقام سیب خارجی، اندازه ژنوم برای گونه‌های دیپلوئید از ۱/۴۵ پیکوگرم برای *M. fusca* تا ۱/۶۸ پیکوگرم برای *M. ransitoria* به دست آمد. اندازه ژنوم برای گونه‌های تریپلوئید از ۲/۳۷ پیکوگرم برای گونه *M. sikkimensis* تا ۲/۵۷ پیکوگرم برای گونه *M. ioensis* متغیر بود (۱۹).

ارقام مطالعه شده در این تحقیق، از نظر اندازه‌ی ژنوم به گونه‌ی *M. ransitoria* (۱/۶۸ پیکوگرم) مشابه بودند. این گونه، بومی چین بوده و جز سیب‌های کرب^۲ می‌باشد که هم به عنوان درخت زینتی و هم پایه استفاده می‌شود (۱۲). گزارش شده است ارقام سیب ایرانی از گونه‌ی *M. domestica* Borkh. هستند (۱). در تحقیق دیگری اندازه ژنوم برای گونه‌های دیپلوئید از ۱/۲۴۵ پیکوگرم برای گونه‌ی *M. tschonoskii* تا ۱/۶۵۳ پیکوگرم برای گونه‌ی *M. florentina* متغیر بود (۸). گونه‌ی *M. florentina* که بومی شبه جزیره‌ی بالکان و ایتالیا می‌باشد، یک درخت زینتی است که اندازه‌ی ژنوم آن (۱/۶۵۳ پیکوگرم) به گونه‌ی *M. domestica* Borkh. نزدیک است. در به وجود آمدن سیب کنونی *M. domestica* × *M. domestica* Borkh. گونه‌های متعددی نظیر *M. Prunifolia* Borkh. (Willd.)، *M. baccata* (L.) Rehder، *M. sieboldii* (Regel) و *M. orientalis* Uglitzk & sylvestris نقش داشته‌اند (۹، ۱۱ و ۲۰).

جدول ۲- تجزیه واریانس میانگین مربعات تاثیر تیمار PVP در اندازه ژنوم ارقام سیب بومی
Table 2- ANOVA of the effect of PVP on genome size of local *Malus × domestica* Borkh. cultivars

منابع تغییرات Source of Variance	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Mean of Squares
رقم cultivar	7	0.007*
PVP	1	0.003*
رقم×PVP PVP×Cultivar	7	0.003*
خطای آزمایشی Error	22	0.01

*: نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد
*Significant at 5% probability level

جدول ۳- تخمین مقدار DNA C-value در ارقام سیب بومی مطالعه شده
Table 3- Estimation of DNA C-value in all studied of local *Malus × domestica* Borkh. cultivars

رقم Cultivar	خطای استاندارد DNA 2C-value ± Standard error ± DNA 2C-value (pg)	1C-value (pg)	اندازه ژنوم مونوپلوئید Monoploid genome size (Mbp)
اطلسی** Atlasi**	1.61±0.008 ^{bc}	0.8 ^c	787 ^{bc}
کهنز-۱** Kohanz-1**	1.59±0.022 ^{cd}	0.79 ^c	777.5 ^{cd}
کرمانشاه** Kermanshah**	1.73±0.01 ^a	0.86 ^a	846 ^a
شیخی** Sheikhi**	1.60±0.01 ^c	0.8 ^c	782 ^c
بکران* Bekran*	1.66±0.05 ^b	0.83 ^b	812 ^b
بسطام* Bastam*	1.65±0.02 ^b	0.82 ^b	807 ^b
رامسر* Ramsar*	1.60±0.009 ^c	0.8 ^c	728 ^c
کهنز-۲** Kohanz-2**	1.60±0.002 ^c	0.8 ^c	782 ^c
گلاب بسطام** Golab-e Bastam**	1.57±0.07 ^d	0.79 ^c	768 ^d
گالا Gala	1.60±0.01 ^c	0.8 ^c	782 ^c

میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هرستون دارای اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD می‌باشند (P ≤ ۵٪)
** ارقام گوشت سفید/ کرم‌رنگ، * ارقام گوشت قرمز

Means with the same letter are not significantly different (P ≤ 0.05) according by LSD test.
**White/cream cultivars, * Red flesh cultivars

102 گزارش شده است. پایه کروموزومی در این زیرخانواده $x = 17$ می‌باشد (۱۶ و ۲۱). در این تحقیق، اندازه ژنوم برحسب مگا جفت باز

در سیب سطوح پلوئیدی مختلف شامل دیپلوئید ($2n = 34$)، تریپلوئید ($2n = 51$)، تتراپلوئید ($2n = 68$) و حتی هگزاپلوئید ($2n =$

در ارقام سیب ایرانی نیز، مقادیر بالایی فنل وجود دارد که ممکن است در تخمین اندازه ژنوم تاثیر گذار باشد. استفاده از ترکیبات دارای خواص ضد اکسایشی نظیر PVP برای حذف ترکیبات بازدارنده‌ی رنگ آمیزی ژنوم بررسی شده است (۱۰). در این تحقیق، براساس نتایج مشاهده شده در جدول ۴، تاثیر تیمار PVP معنی دار نبوده است. بنظر می‌رسد ترکیبات دارای خواص ضد اکسایشی نظیر PVP نمی‌تواند بطور کامل موجب حذف ترکیبات بازدارنده‌ی رنگ آمیزی ژنوم موثر شوند (۱۰).

در حالت مونوپلوئیدی محاسبه شد و از ۷۴۸ مگا جفت باز در رقم 'گلاب' شهرستان بسطام تا ۸۴۶ مگا جفت باز در رقم 'گلاب کرمانشاه' متفاوت بود.

تاثیر PVP در تخمین ژنوم

سیب از نظر محتوای فنلی به عنوان یک میوه شاخص در نظر گرفته می‌شود. وجود این متابولیت‌های ثانویه در سیتوسل سلول باعث تداخل در رنگ آمیزی ژنوم و تخمین دقیق میزان DNA هسته می‌شود.

جدول ۴- تاثیر PVP روی تخمین مقدار DNA 2C-value به دست آمده با نرم افزار Flow Max (P ≤ 5%) در ارقام بومی سیب
Table 4- The effect of PVP on DNA 2C-value estimation by Flow Max software (P ≤ 5%) in local *Malus domestica* Borkh. cultivars

رقم Cultivar	اندازه ژنوم بدون PVP Genome size (pg) without PVP	اندازه ژنوم با ۱٪ PVP Genome size (pg) PVP (1%) with	T-Test for genome size تست برای اندازه ژنوم
اطلسی** Atlasi**	1.61 ^c	1.64 ^b	±0.03
کهنز** Kohanz**	1.60 ^{cd}	1.59 ^c	±0.01
بکران* Bekran*	1.66 ^b	1.60 ^c	±0.06
شیخی** Sheikhi**	1.60 ^{cd}	1.63 ^{bc}	±0.03
کرمانشاه** رامسر*	1.72 ^a	1.68 ^a	±0.04
گلاب بسطام** Ramsar*	1.59 ^{cd}	1.64 ^b	±0.05
Golab-e Bastam** گالا	1.57 ^d	1.60 ^c	±0.03
Gala	1.58 ^{cd}	1.59 ^c	±0.01

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD می‌باشند (P ≤ 5%).

** ارقام گوشت سفید/کرم رنگ، * ارقام گوشت قرمز

Means with the same letter are not significantly different (P ≤ 0.05) according by LSD test.

**White/creamy cultivars, * Red flesh cultivars

پیک G₁ دوم که در ناحیه‌ی ۱۰۰ قرار گرفته بود، مربوط به گیاه استاندارد جعفری با نام علمی *Petroselinum crispum* sp. و اندازه ژنوم 2C=۴/۴۵ pg است (۴). براساس هیستوگرام‌ها و مقدار ژنوم به دست آمده می‌توان گفت همه‌ی ارقام مطالعه شده دیپلوئید هستند. مطالعات ریخت‌شناسی نیز نشان داده است که بیشتر ارقام سیب ایرانی به گونه‌ی *M. domestica* Borkh. تعلق دارند (۱).

نتیجه‌گیری کلی

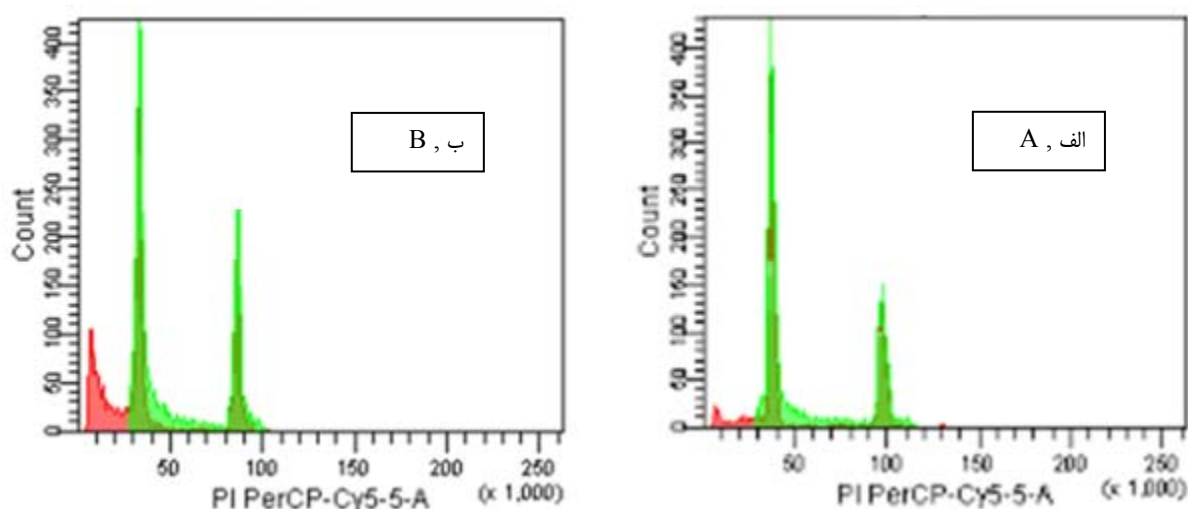
علیرغم اینکه ایران جز مراکز تنوع ژنتیکی سیب محسوب می‌شود، اما هیچگونه بانک اطلاعاتی برای اندازه ژنوم و پلوئیدی آنها

تعیین سطح پلوئیدی

در سیب، دوره‌گیری بین ارقام و یا دیگر گونه‌ها و جنس‌های زیرخانواده پوموئیده، یکی از روش‌های مرسوم اصلاح است (۶). بنابراین، نیاز به اطلاعات مربوط به سطح پلوئیدی مبرم می‌باشد. در طول سال‌های گذشته، استفاده از فلوسیتومتری (FCM) برای تعیین سطح پلوئیدی کاربرد فزاینده‌ای داشته است (۷، ۹، ۱۰، ۱۹ و ۲۱). در این تحقیق، براساس هیستوگرام‌های بدست آمده، سطح پلوئیدی هر یک از ارقام مطالعه شده مشخص شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، هر یک از ارقام مورد مطالعه دارای دو پیک مشخص بودند. پیک G₁ اول که نزدیک به ناحیه‌ی ۵۰ بود، مربوط به سیب و

طبقه‌بندی گیاهان براساس اندازه ژنوم آنها مخصوصاً در سطوح تاکسونومی پایین، دارای اهمیت بالایی است (۲). اندازه ژنوم، حتی در گونه‌های خیلی نزدیک نیز می‌تواند متفاوت باشد؛ برای مثال، در ذرت، نژادهای شمالی با هتروکروماتین بیشتر، دارای ژنوم بزرگتری از آن‌هایی که هتروکروماتین کمتری دارند، هستند (۱۴ و ۱۸). در این تحقیق دیده می‌شود در ارقام گلاب تنوع DNA 2C-value وجود دارد (جدول ۳)، در صورتی که معمولاً ارقام گلاب را کلون و با تنوع ژنتیکی اندک می‌دانند. بنابراین، این احتمال وجود دارد در میان ارقام سیب ایرانی، حتی در سطوح پلوئیدی مشابه، در اندازه ژنوم آن‌ها اختلاف وجود داشته باشد.

وجود ندارد. از آنجا که در سیب، دوره‌گیری بین ارقام و یا دیگر گونه‌ها و جنس‌های زیرخانواده پوموئیده، یکی از روش‌های مرسوم اصلاح است (۶)، مشخص بودن اندازه ژنوم و سطح پلوئیدی گونه‌ها و ارقام در انتخاب ترکیب صحیح دوره‌گیری اهمیت زیادی دارد (۲۱). در این تحقیق، مشخص شد که ارقام بومی مطالعه شده از نظر اندازه ژنوم و سطح پلوئیدی مشابه رقم تجاری 'گالا' می‌باشند. با توجه به سطح پلوئیدی و DNA 2C-value در سیب 'گالا'، به نظر می‌رسد ارقام سیب ایرانی از یک گونه و از گونه‌ی *M.domestica*Borkh. باشند. علیزاده و همکاران (۱) در بررسی‌های ریخت‌شناسی ۴۰۰ رقم سیب ایرانی نشان دادند که سیب‌های ایرانی از گونه‌ی *M.domestica*Borkh. هستند.



شکل ۱- هیستوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری در دو رقم سیب. الف - پیک سمت راست: استاندارد جعفری، پیک سمت چپ: سیب گوشت قرمز 'بکران'؛ ب- پیک سمت راست: استاندارد جعفری، پیک سمت چپ: سیب رقم 'گلاب کرمانشاه'.

Figure 1- FCM histograms in two apple varieties. A- right peak: Parsley as standard plant, left peak: 'Bekran' (Red fleshed apple) ; B- right peak: Parsley as standard plant, left peak: 'Golab-e Kermanshah'.

منابع

- 1- Alizadeh A. 2008. Identification, collection and morphological analysis Iranian apple germplasm Report of research work (in Persian).
- 2-Bennett M.D., and Smith J. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences, 274: 227-274.
- 3- Doležel J., Bartos J., Voglmayr H., and Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry. Part A: Journal of the International Society for Analytical Cytology, 51(2): 127.
- 4- Doležel J., Greilhuber J., and Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature Protocols, 2(9): 2233-2244.
- 5-Faramarzi S., Yadollahi A., Barzegar M., Sadraei K., Pacifico S., and Jemric T. 2014. Comparison of Phenolic Compounds' Content and Antioxidant Activity between Some Native Iranian Apples and Standard Cultivar 'Gala'. Journal of Agricultural Science and Technology, 16: 1601-1611.
- 6- Gonai T., Manabe T., Inoue E., Hayashi M., Yamamoto T., Hayashi T., Sakuma F., and Kasumi M. 2006. Overcoming hybrid lethality in a cross between Japanese pear and apple using gamma irradiation and confirmation of hybrid status using flow cytometry and SSR markers. Scientia horticulturae, 109: 43-47.
- 7- Gustafson P., Korban S., Wannarat W., Rayburn C.M., Tatum T.C., and Rayburn A.L. 2009. Genome size and

- nucleotypic variation in *Malus* germplasm. *Genome*, 52: 148-155.
- 8- Harris S.A., Robinson J.P., and Juniper B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 18(8): 426-430.
- 9- Höfer M., and Meister A. 2010. Genome size variation in *Malus* species. *Journal of Botany*, 2010.
- 10- Jedrzejczyk I., and Sliwinska E. 2010. Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 Rosaceae woody species containing DNA-staining inhibitors. *Journal of Botany*, 2010.
- 11- Juniper B., Watkins R., and Harris S. 1998. The origins of the apple. *Acta Horticulturae*, 484: 27-33.
- 12- Kindersley D. 2008. RHS AZ Encyclopedia of GAERden Plants UK, p. 1136.
- 13- Korban S., and Skirvin R. 1984. Nomenclature of the cultivated apple. *Hort Science*, 19: 177-180.
- 14- Laurie D., and Bennett M. 1986. Wheat× maize hybridization. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28: 313-316.
- 15- Pellicer J., and Leitch I. 2014. The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. Pascale Besse (ed.), *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media, New York.
- 16- Phipps J.B., Robertson K.R., Smith P.G., and Rohrer J.R. 1990. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany*, 68: 2209-2269.
- 17- Phipps J.B., Robertson K.R., Rohrer J.R., and Smith P.G. 1991. Origins and evolution of subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, 303-332.
- 18- Rayburn A.L., Price H.J., Smith J., and Gold J.R. 1985. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. *American Journal of Botany*, 1610-1617.
- 19- Tatum T.C., Stepanovic S., Biradar D., Rayburn A.L., and Korban S.S. 2005. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. *Genome*, 48: 924-930.
- 20- Way R., Aldwinckle H., Lamb R., Rejman A., Sansavini S., Shen T., Watkins R., Westwood M.N., and Yoshida Y. 1990. Apples (*Malus*). *Acta Horticulturae*, 290: 3-62.
- 21- Yokoya K., Roberts A., Mottley J., Lewis R., and Brandham P. 2000. Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany*, 85: 557-561.
- 22- Zhou Z. 1999. The apple genetic resources in China: the wild species and their distributions, informative characteristics and utilisation. *Genetic Research and Crop Evolution*, 46: 599-609.