

تعیین روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های به جمع‌آوری شده از مراکز پیدایش و تنوع با استفاده از نشانگرهای SSR

Determination of Genetic Relationships of Quince Cultivars and Genotypes Collected from Different Centers of Origin and Diversity Using SSR Markers

محمد تر کاشوند^۱، مهرشاد زین‌العابدینی^۲، حمید عبداللهی^۳، علی وطن‌پور ازغندی^۴
و آسا ابراهیمی^۵

- ۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- استادیار، بخش ژنومیکس، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- دانشیار، پژوهشگاه میوه‌های معتدله و سرد سیری، موسسه علوم تحقیقات باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۴- دانشیار، بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

چکیده

تر کاشوند، م.، زین‌العابدینی، م.، عبداللهی، ح.، وطن‌پور ازغندی، ع. و ابراهیمی، آ. ۱۴۰۰. تعیین روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های به جمع‌آوری شده از مراکز پیدایش و تنوع با استفاده از نشانگرهای SSR. *مجله نهال و بذر* ۳۷: ۱۴۷-۱۲۷.

مرکز پیدایش گونه به (*Cydonia oblonga* Mill.) منطقه تالش در شمال غرب ایران و قفقاز است و مراکز تنوع متعدد آن در ایران، جمهوری آذربایجان، ترکیه و اروپا وجود دارد. در این پژوهش، روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و ارقام مهم به جمع‌آوری شده و با منشأ گرفته از مرکز پیدایش این گونه در غرب استان گیلان و منطقه قفقاز در جمهوری آذربایجان و مقایسه آن با ژنوتیپ‌ها، جمعیت‌ها و ارقام چند مرکز تنوع شامل استان‌های خراسان رضوی، اصفهان، اردبیل، آذربایجان غربی، تهران و نیز ژنوتیپ‌هایی از ترکیه و اروپا با استفاده از ۱۲ و ۱۴ نشانگر SSR سیب و گلابی بررسی شد. بر اساس نتایج، ضمن انتقال پذیری موفق نشانگرهای سیب و گلابی به گونه به، تمایز گونه‌های به ژاپنی و چینی از جنس *Cydonia* صورت گرفت و ۶۳ گونه، رقم و ژنوتیپ مورد بررسی در هفت خوشه اصلی گروه‌بندی شدند. بالاترین فراوانی آللی (۰/۹۶۸) برای نشانگرهای CH03g06 و KU10 مشاهده شد. ژرم‌پلاسم اروپا در خوشه مستقل و برعکس پایه کوئینس C با ژرم‌پلاسم شمال غرب ایران و قفقاز گروه‌بندی شد که تاییدکننده منشأ این پایه از این مناطق است. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت ضمن اثبات نتایج تجزیه خوشه‌ای، تاییدکننده نتایج قبلی در رابطه با وجود دو مسیر تکاملی مستقل درخت به در شمال غرب ایران تا ترکیه و سپس اروپا و مسیر دوم در ناحیه مرکزی و شمال شرق ایران بوده است. انطباق این نتایج با نتایج ارزیابی‌های مورفولوژیک و ارگانولپتیک میوه نشان داد که هر گروه از ژرم‌پلاسم شناسایی شده دارای پتانسیل متفاوت برای استفاده در برنامه‌های به نژادی به بود.

واژه‌های کلیدی: به، نشانگر ریزماهوره، *Cydonia oblonga* Mill.، انتقال پذیری، سیب، گلابی.

مقدمه

اروپا و سپس آمریکای شمالی و جنوبی ایجاد شده است (Abdollahi, 2019). این گونه در مناطق مختلف ایران دارای تنوع ژنتیکی قابل توجهی بوده و استان‌های خراسان رضوی، گلستان، مازندران، گیلان، اردبیل، آذربایجان غربی، اصفهان، کردستان، کرمانشاه و تهران، مناطق اصلی تنوع انواع وحشی و یا ژنوتیپ‌های بذری گزینش شده و یا ارقام بومی و محلی این درخت می‌باشند (Manee, 1994; Abdollahi et al., 2013).

طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO)، در سال ۲۰۱۷، ایران با تولید بیش از ۸۲ هزار تن میوه به، پس از کشورهای ازبکستان، چین و ترکیه از نظر تولید جهانی این محصول قرار گرفت (FAO, 2021). بر اساس آخرین اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی ایران در سال ۱۳۹۸، سطح زیر کشت درخت به در کشور حدود ۱۲ هزار هکتار و میزان تولید به ۹۸ هزار تن افزایش یافت و عملکرد حدود ۱۰ تن در هکتار میوه به از سطح این باغ‌ها استحصال شد (Ahmadi et al., 2019). این آمار نشان دهنده افزایش قابل توجه سطح زیر کشت این محصول در کشور طی ده ساله اخیر بوده که با توجه به ارزش اقتصادی و بازده نسبتاً مطلوب باغ‌های درخت به در مقایسه با دیگر درختان میوه دانه‌دار، بویژه سیب و همچنین هزینه‌های برداشت درختان میوه هسته‌دار و آمار تقاضای درخت به در سطح نهالستان‌های کشور، دور از انتظار نیست.

از سوی دیگر، اگرچه در اثر توجه مطلوب‌تر

به (*Cydonia oblonga* Mill.) تنها گونه جنس *Cydonia* است که همراه با گونه‌های نزدیک مشتمل بر گونه سیب (*Malus spp.*)، گلابی (*Pyrus spp.*)، به ژاپنی (*Chaenomeles japonica f. alba* (Nakai) Ohwi) و *Pseudocydonia sinensis* (Thouin) C. K. Schneid. و ولیک (*Crataegus spp.*) در زیرخانواده اسپیرواید (*Spiraeoideae*) که قبلاً با نام زیر خانواده دانه‌دارها (*Maloideae*) نامیده می‌شد، طبقه‌بندی می‌شوند (Bell and Leitão, 2011; Abdollahi, 2021).

مرکز پیدایش (*Center of origin*) گونه به از منطقه‌ای در غرب استان گیلان شروع و به ناحیه‌ای در قفقاز در جمهوری آذربایجان ختم می‌شود (Zohary and Hopf, 2000; Khoshbakht and Hammer 2006; Abdollahi, 2019). بر اساس نظر واویلوف و همچنین بر پایه شواهد و تنوع موجود، این گونه در چهارمین مرکز تنوع گیاهی جهانی شامل غرب منطقه دریای خزر و به ویژه جنگل‌های تالش ایجاد و تکامل یافته است (Vavilov, 1949).

چندین مرکز تنوع (*Center of diversity*) نیز برای این گونه در مناطق مختلف جهان و در اطراف مرکز پیدایش این گونه طی حدود پنج تا هفت هزار سال تکامل، جابجایی و کشت و پرورش آن شامل جنوب دریای خزر، آسیای صغیر، آسیای مرکزی، روسیه و مناطق مختلف

رویشی و زایشی (Alipour *et al.*, 2014) این ژرم پلاسِم منجر به معرفی دو رقم پربازده ویدوجا و بهتا (Abdollahi, 2019; Abdollahi 2021) شد.

در ترکیه جمع آوری ژرم پلاسِم درخت به این کشور از سال ۱۹۷۲ توسط سایکز (Sykes, 1972) و بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسِم این کشور با استفاده از نشانگرهای رپید (Bayazit *et al.*, 2011) و توالی‌های ساده تکراری (Dumanoglu *et al.*, 2009) انجام شد و ضمن تعیین (Kalecik) روابط خویشاوندی این ژرم پلاسِم، نسبت به تعیین تنوع کلونی موجود در برخی ارقام این کشور نظیر رقم کالچیک اقدام شد. ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام و ژرم پلاسِم درخت به یونان (Ganopoulos *et al.*, 2011) و ژرم پلاسِم به بلغارستان (Bassil *et al.*, 2011) با استفاده از نشانگر توالی‌های ساده تکراری منجر به تمایز ژنوتیپ‌های مورد بررسی این کشورها شد.

این بررسی‌ها نشان می‌دهد که در اغلب تحقیقات انجام شده صرفاً به بررسی ژرم پلاسِم محلی یک کشور پرداخته شده است و ارتباط بین ژرم پلاسِم موجود در مرکز پیدایش این درخت و مراکز مختلف تنوع آن انجام نگرفته است. باسیل و همکاران (Bassil *et al.*, 2011) در یک بررسی جامع‌تر نسبت به تعیین رابطه خویشاوندی ۱۴۹ رقم و ژنوتیپ درخت به مرکز ملی ذخایر توارثی وزارت کشاورزی ایالات متحده آمریکا (National

باغداران در سال‌های اخیر به تغذیه باغ‌ها، کنترل بیماری‌ها و آفات و استفاده از ارقام و پایه‌های مناسب‌تر، عملکرد باغ‌های به ایران افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد، لیکن با توجه به استفاده از رقم کم‌بازده و با کیفیت به اصفهان در اغلب باغ‌های کشور، عملکرد میانگین این درخت در ایران همچنان حدود ۱۰ تن در هکتار و در سایر کشورهای تولیدکننده، خصوصاً در ترکیه حدود دو برابر است (FAO, 2021). دلیل اصلی این امر استفاده از ارقام پربازده و دارای عادت رشد و باردهی تیپ اسپور در کشور ترکیه است (Abdollahi, 2021). این تفاوت در باردهی باغ‌های درختان به، ضرورت شناسایی تنوع ژنتیکی موجود این درخت و اصلاح، گزینش و استفاده از ارقام پربازده را مشخص تر می‌کند.

ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های مختلف درخت به ایران پس از بررسی‌های اولیه در دهه ۸۰ شمسی در کلکسیون درخت به بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (Abdollahi *et al.*, 2008b) و انتقال‌پذیری (Abdollahi *et al.*, 2013) نشانگرهای توالی‌های ساده تکراری (SSR) سیب و گلابی در بررسی خرم‌دل آزاد و همکاران (Khoramdel Azad *et al.*, 2013) به این ژرم پلاسِم بررسی و تنوع ژنتیکی آنها مورد بررسی مقدماتی قرار گرفت. بررسی مقاومت به بیماری آتشک (Abdollahi *et al.*, 2008a; Mehrabipour *et al.*, 2010; Mehrabipour *et al.*, 2012) و خصوصیت

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۶۳ رقم و ژنوتیپ از مناطق مختلف ایران شامل استان‌های اصفهان، گیلان، خراسان رضوی، آذربایجان غربی، تهران، اردبیل و همچنین سه رقم بومی جمهوری آذربایجان، یک رقم بومی ترکیه، چهار پایه منشاء گرفته از ژرم پلاسما به فرانسه و انگلستان شامل پایه‌های به کوئینس A (منشاء آنژره فرانسه)، کوئینس B (منشاء فرانسه یا انگلستان)، کوئینس C (منشاء انگلستان با منشاء اولیه احتمالی از ناحیه اطراف دریای خزر و قفقاز) (Tukey, 1962)؛ کوئینس BA29 (منشاء فرانسه) (Simard et al., 2004) و کوئینس Adams (منشاء بلژیک) بود (جدول ۱).

کوئینس A و کوئینس C از دو کلکسیون در کرج و اصفهان تهیه شد که در رابطه با هر دو پایه، اصالت مواد گیاهی در کلکسیون اصفهان بیش از کلکسیون بسیار قدیمی پایه‌های رویشی به در کرج، از نظر خصوصیات رویشی و مورفولوژیک مورد تایید بود. همچنین به منظور بررسی روابط خویشاوندی به ژاپنی، دو ژنوتیپ از گونه *Chaenomeles japonica* f. *alba* (Nakai) Ohwi با گل‌های قرمز و سفید، یک ژنوتیپ به چینی از گونه *Pseudocydonia sinensis* (Thouin) C. K. Schneid. و یک گونه ولیک قرمز از گونه *Crataegus atrosanguinea* که به طور معمول برای پایه درخت به در نهالستان‌های استان اصفهان مورد

Clonal Germplasm Repository-NCGR)

متعلق به ۱۵ کشور پرداختند، لیکن در این بررسی هیچگونه رقم یا ژنوتیپی از مرکز اصلی پیدایش درخت به در شمال غرب ایران و جمهوری آذربایجان وجود نداشت. از سوی دیگر بررسی خرم‌دل آزاد و همکاران (Khoramdel Azad et al., 2013) نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی درخت به، قادر است جمعیت‌های این درخت را به خوبی از یکدیگر در مناطق مختلف ایران مشتمل بر استان‌های خراسان رضوی، اصفهان، گیلان، تهران و آذربایجان غربی متمایز کرده و در ضمن هر یک از این جمعیت‌ها نیز بر اساس خصوصیات مختلف ارگانولپتیک و بیوشیمیایی (Moradi et al., 2016; Moradi et al., 2017; Abdollahi et al., 2019b) قابل تمایز بوده و کاربردهای مختلفی در برنامه اصلاح رقم دارند.

بر این اساس و با توجه به لزوم بررسی جامع‌تر روابط خویشاوندی ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به، در این پژوهش به تعیین این روابط با استفاده از نشانگر توالی‌های ساده تکراری برای ژرم پلاسما بومی ایران و همچنین ارقامی از جمهوری آذربایجان، اروپا و ترکیه پرداخته شد. این بررسی هم از جنبه تنوع ارقام و ژنوتیپ‌ها و هم از نظر تعداد آغازگرهای مورد استفاده دارای جامعیت بیش‌تری نسبت به بررسی‌های قبلی بود.

استفاده قرار می‌گیرد، در کنار ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به، مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) و گونه‌های مرتبط مورد استفاده در این پژوهش برای ارزیابی روابط ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای توالی‌های ساده تکراری (SSR)

Table 1. Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars and genotypes and the related species used in this research for evaluation of genetic relationship by simple sequence repeats (SSR) markers

شماره No.	کد ژنوتیپ Genotype code	نام رقم Cultivar name	منشاء Origin	شماره No.	کد ژنوتیپ Genotype code	نام رقم Cultivar name	منشاء Origin
1	ARD1	---	Iran (Ardebil)	33	ET1	---	Iran (Isfahan)
2	ARD2	---	Iran (Ardebil)	34	KVD1	Viduja (Released)	Iran (Isfahan)
3	ARD3	---	Iran (Ardebil)	35	KVD2	---	Iran (Isfahan)
4	ARD4	---	Iran (Ardebil)	36	KVD3	Isfahan (Isfahan)	Iran (Isfahan)
5	ARD5	---	Iran (Ardebil)	37	KVD4	---	Iran (Isfahan)
6	ARD6	---	Iran (Ardebil)	38	PH2	Behta (Released)	Iran (Isfahan)
7	ARD7	---	Iran (Ardebil)	39	PK2	---	Iran (Isfahan)
8	Givi Kowsar	Givi Kowsar	Iran (Ardebil)	40	KM1	---	Iran (Isfahan)
9	Amroudi Kowsar	Amrodi Kowsar	Iran (Ardebil)	41	SVS1	---	Iran (Isfahan)
10	Sibi Kowsar	Sibi Kowsar	Iran (Ardebil)	42	SVS2	---	Iran (Isfahan)
11	Shirin	Shirin	Iran (Ardebil)	43	SHA1	---	Iran (Isfahan)
12	OM1	---	Iran (West Azarbaijan)	44	Torsh Isfahan	Torsh Isfahan	Iran (Isfahan)
13	UT1	---	Iran (Guilan)	45	Shams Isfahan	Shams Isfahan	Iran (Isfahan)
14	AS1	---	Iran (Guilan)	46	Chimeh Kashan	Chimeh Kashan	Iran (Isfahan)
15	AS2	---	Iran (Guilan)	47	Quince A*	Quince A*	France
16	ASM1	---	Iran (Guilan)	48	Quince C*	Quince C*	England
17	ASM2	---	Iran (Guilan)	49	Rajabli	Rajabli 1	R. Azerbaijan
18	ASM3	---	Iran (Guilan)	50	Damak	Damak	R. Azerbaijan
19	ASP1	---	Iran (Guilan)	51	Besh Oldoz	Besh Oldoz	R. Azerbaijan
20	ASP2	---	Iran (Guilan)	52	Bardak	Bardak	Turkey
21	Moghavem 1	Moghavem 1	Iran (Khorasan Razavi)	53	Torsh Azarbaijan	Torsh Azarbaijan	Iran (Ardebil)
22	Moghavem 2	Moghavem 2	Iran (Khorasan Razavi)	54	Haj Agha Kishi	Haj Agha Kishi	Iran (Ardebil)
23	Sahel Borj	Sahel Borj Moghavem	Iran (Khorasan Razavi)	55	Quince A	Quince A	France
24	Khosro	Khosro	Iran (Khorasan Razavi)	56	Quince B	Quince B	England
25	Dizbad	Dizbad	Iran (Khorasan Razavi)	57	Quince C	Quince C	England
26	Gardandar	Gardandar	Iran (Khorasan Razavi)	58	Quince PQBA29	Quince PQBA29	France
27	Isfahan Oghaf	Isfahan Oghaf	Iran (Khorasan Razavi)	59	Quince Adams	Quince Adams	Belgium
28	LA1	---	Iran (Tehran)	60	Japanese Quince	White Blooms	Japan
29	LA3	---	Iran (Tehran)	61	Japanese Quince	Red Blooms	Japan
30	NB2	---	Iran (Isfahan)	62	Chinese Quince	Chinese Quince	China
31	NB3	---	Iran (Isfahan)	63	<i>Crataegus</i>	<i>Crataegus</i>	Iran (Isfahan)
32	NB4	---	Iran (Isfahan)				

* پایه‌های ستاره‌دار از کلکسیون درخت به اصفهان تهیه و مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. از نظر گیاهشناسی، ردیف‌های ۱-۵۹ متعلق به گونه *Cydonia oblonga* Mill. و به ژاپنی از گونه *Chaenomeles japonica* f. *alba* (Nakai) Ohwi، به چینی از گونه *Pseudocydonia sinensis* (Thouin) C. K. Schneid. و ولیک از گونه *Crataegus atrosanguinea* می‌باشند.

* Asterisked rootstocks have been collected from quince collection of Isfahan. Rows 1-59 belong to *Cydonia oblonga* Mill., Japanese quinces belong to *Chaenomeles japonica* f. *alba* (Nakai) Ohwi, Chinese quince belongs to *Pseudocydonia sinensis* (Thouin) C. K. Schneid. and Hawthorn belongs to *Crataegus atrosanguinea* species.

(2002)، ۱۴ جفت آغازگر با کارآئی بالا و ۱۲ جفت آغازگر SSR گلابی (*Pyrus spp.*) که روی ژنوتیپ‌های درخت به بومی ژاپن توسط یاماموتو و همکاران (Yamamoto *et al.*, 2002a; Yamamoto *et al.*, 2002b) ارزیابی قرار گرفته بود، انتخاب شدند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ABI-Applied Biosystems مدل Gradient روی DNA ژنوتیپ‌های درخت به انجام شد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی به صورت یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای بهینه تعیین شده برای هر آغازگر و به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام شد. دمای مناسب اتصال آغازگرها ابتدا طی چند مرحله، مشتمل بر: الف) شیب‌گردیان دمایی، ب) شیب‌گردیان دمایی همراه با شیب غلظت $MgCl_2$ ، پ) شیب‌گردیان دمایی همراه با شیب غلظت DNA، ت) شیب‌گردیان دمایی همراه با شیب غلظت جفت آغازگر، ث) افت تدریجی دمای اتصال آغازگرها (Touch Down PCR) با سه درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه،

کوئینس C مورد استفاده از کلکسیون اصفهان دارای برگ‌های بزرگ و سبز براق بوده که این خصوصیت در بسیاری از ژرم‌پلاسم به جمع‌آوری شده از تالش جنوبی نیز قابل مشاهده است و بر اساس نظر توکی (Tukey, 1962)، بذرهای درخت به دریافت شده از ژنوتیپ‌های بومی منطقه اطراف دریای خزر و قفقاز توسط تایدمن (Tydeman, 1938) در ایستگاه تحقیقات ایست مالینگ انگلستان، شباهت بسیار به پایه کوئینس C داشته و همچنین پاکوتاهی از خصوصیات بارز ژرم‌پلاسم به این منطقه است.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان ارقام و ژنوتیپ‌های به انجام شد. نمونه‌های برگ‌گی طی فصل بهار از کلکسیون درخت به پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری (بخش تحقیقات باغبانی سابق مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج) برداشت شدند (جدول ۱). استخراج DNA با استفاده از ایزولاسیون کوربیو (UCSD Core Bio-USA) انجام شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ (NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer, Biorad, USA) ارزیابی شد.

انتخاب آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی

از میان جفت آغازگرهای SSR سیب (Guilford *et al.*, 1997; *Malus spp.*) Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hakonson, 1998; Hakonson, 2001; Liebhard *et al.*,

جدول ۲- اسامی و توالی نوکلئوتیدی جفت آغازگرهای SSR سیب و گلابی مورد استفاده در این پژوهش

Table 2. Name and nucleotide sequence of the apple and pear SSR primer sets used in this study

شماره	آغازگر	Sequences (5'-3')		دمای اتصال (درجه سانتیگراد)	منبع
		Reverse primers	Forward primers		
Group I: Apple species derived SSR primers گروه اول: آغازگر SSR برگرفته از گونه سیب					
No.	Primer	Reverse primers	Forward primers	Annealing temperature (°C)	Reference
1	CH01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTCCTCCAGC	54	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998
2	ch01h01	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGT	60	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998
3	CH01h10	GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA	AGGAGGGATTGTTGTGCAC	58	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998
4	CH02b10	AAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	54	Libhard <i>et al.</i> , 2002
5	CH02c02a	CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA	TAGGGCACACTTGCTGGTC	56	Libhard <i>et al.</i> , 2002
6	CH02C09	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC	AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	62	Libhard <i>et al.</i> , 2002
7	CH02d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTACTATCTCTC	50	Libhard <i>et al.</i> , 2002
8	CH02h11a	CGTGGCATGCCTATCATTG	CTGTTGAACCGCTTCCTTC	62	Libhard <i>et al.</i> , 2002
Group II: Pear species derived SSR primers گروه دوم: آغازگر SSR برگرفته از گونه گلابی					
No.	Primer	Reverse primers	Forward primers	Annealing temperature (°C)	Reference
9	CH03g06	ATCCCACAGCTTCTGTTTTTG	TCACAGAGAATACAAGGTGGA	56	Libhard <i>et al.</i> , 2002
10	CH03g07	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG	TTTTTCCAAATCGAGTTTCGTT	60	Libhard <i>et al.</i> , 2002
11	CH04a12	CAGCTGCAACTGCACTTAT	ATCCATGGTCCATAAAACCA	50	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998
12	CH04e03	TGAAGATGTTGGCTGTGC	TGCATGCTGTCTCCTCCAT	56	Libhard <i>et al.</i> , 2002
13	CH05d04	ACTTGTGAGCCGTGAGAGGT	TCCGAAGGTATGCTTCGATT	52	Guilford <i>et al.</i> , 1997
14	CH05d11	CACAACCTGATATCCGGGAC	GAGAAGGTCGTACATTCTCAA	60	Libhard <i>et al.</i> , 2002
15	NH030a	GCAACAGATAGGAGCAAAGAGGC	CCAAAGTTCAACACAGATCAAGAG	56	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
16	NH007b	TACCTTGATGGGAAGTGAAC	AATAGTAGATTGCAATTACTC	58	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
17	NB015a	TTGTGCCCTTTTCTTCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	62	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
18	NH011b	GGTTCACATAGAGAGAGAGAG	TTTGCCGTTGGACCCAGAC	58	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
19	NH029a	GAAGAAAACAGAGCAGGGCA	CCTCCCGTCTCCCACCATCTTAG	58	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
20	BGT23b	CACATTCAAAAGATTAAGAT	ACTCAGCCTTTTTTCCAC	50	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
21	GD142	GGCACCCAAGCCCTAA	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	56	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
22	GD147	TCCCGCCATTTCTCTGC	GTTTAAACCGCTGCTGCTGAAC	60	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
23	GD96	CGGCGAAAGCAATCACCT	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	60	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
24	KA14	TCATTGTAGCATTTTATTTTT	ATGGCAAGGGAGATTATTAG	55	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
25	KA16	GCCAGCGAACTCAAATCT	AACGAGAACGACGAGCG	50	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b
26	KU10	AGTATGTGACCACCCGATGTT	AGAGTCGGTTGGGAAATGATTG	54	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002a and b

تفکیک محصولات تکثیری و تجزیه داده‌ها

تفکیک محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت مقدماتی روی ژل آگاروز ۳٪ با ولتاژ ۸۰ ولت و شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد و سپس ژل حاصل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. تهیه تصویر ژل با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Gel-Doc) در طول موج ۳۱۲ نانومتر انجام شد. در صورت کارآئی مطلوب و تکثیر نوارها، برای تفکیک دقیق‌تر نتایج، از الکتروفورز عمودی، با ژل پلی‌آکریل آمید ۶٪ با بافر 1X TBE و ولتاژ ثابت ۷۵ ولت، شدت جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر و توان ۱۵-۱۰ وات در دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. آشکارسازی نوارها با روش رنگ آمیزی نترات نقره انجام شد. باندها سپس به صورت همباز امتیازدهی شده و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، هتروزیگوتی مشاهده شده (H₀) و ضریب خویشاوندی (F_{is}) محاسبه شد. فاصله ژنتیکی Nei، بر مبنای روش‌های آماری چند متغیره و به کمک نرم افزارهای Powermarker، Popgene و NTSYS-PC انجام شد. در نهایت ارقام و ژنوتیپ‌ها بر اساس شباهت‌ها (یا فواصل) ژنتیکی با دلتا K، ۱۰-۲ و با استفاده از نرم‌افزار استراکچر (Structure) گروه بندی شدند.

نتایج و بحث

استخراج DNA و کارآئی آغازگرها

از ۱۴ جفت آغازگر SSR سیب مورد استفاده تنها جفت آغازگر CH02C09 تک

(ج) افت تدریجی دمای اتصال آغازگرها با شش درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه و در نهایت (چ) افت تدریجی دمای اتصال آغازگرها با نه درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی و همانند آنچه توسط خرمدل آزاد و همکاران (Khoramdel Azad *et al.*, 2013) توصیه شده است، بهینه شدند.

دمای ابتدایی اتصال آغازگرها بر اساس دمای گزارش شده در مورد ارقام سیب (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hakonson, 1998; Hakonson, 2001; Liebhart *et al.*, 2002) محدود گردید. دمایی مورد استفاده نیز حداکثر بین ۱۰ ± درجه سانتی‌گراد دمای توصیه شده اولیه، محدود گردید. غلظت MgCl₂ بین ۲۵ الی ۱۰۰ پیکومول، محدود غلظت DNA بین ۷۵ الی ۱۵۰ نانوگرم و محدود غلظت آغازگر بین ۵ الی ۱۰ پیکومول برای هر یک از آغازگرها به ازاء هر واکنش ۲۵ میکرولیتری در نظر گرفته شد. سایر اجزاء ثابت واکنش PCR، به میزان ۰/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر غلظت (10X)، یک واحد آنزیم DNA پلی‌مراز و ۰/۵ میکرولیتر از محلول مادری dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بر اساس اجزاء واکنش پیشنهادی توسط یاماموتو و همکاران (Yamamoto *et al.*, 2004) و تایید بعدی توسط خرمدل آزاد و همکاران (Khoramdel Azad *et al.*, 2013) بود.

نشانه‌گرهای CH03g06 و KU10 برابر با ۰/۹۶۸ و کم‌ترین فراوانی آلل شایع در چهار نشانه‌گر دارای بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شد، که در این بین نشانه‌گر KA14 با فراوانی ۰/۳ کم‌ترین میزان فراوانی آلل شایع را دارا بود. تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه بر میزان فراوانی آلل شایع تأثیرگذار بوده بطوری که با کم بودن تعداد آلل‌های یک جایگاه، فراوانی بین تعداد آلل کم‌تری توزیع شده و فراوانی آلل شایع بیش‌تر بود (جدول ۳).

شکل و بقیه آغازگرها سیب و همه جفت آغازگرهای SSR گلابی مورد استفاده در ژنوتیپ‌های به مورد مطالعه چندشکل بودند (جدول ۳). در مجموع ۱۱۵ آلل با الگوی نواری واضح مورد تکثیر قرار گرفت و در این بین هشت نشانه‌گر با بیش از شش آلل، بیش‌ترین تعداد آلل را داشتند (شکل ۱). همچنین نشانه‌گر CH03g06 که از نشانه‌گرهای انتخاب شده از گونه سیب بود، با ۲ آلل کم‌ترین تعداد آلل را داشت. بالاترین فراوانی آلل شایع در

جدول ۳- مقایسه پارامترهای حاصل از نتایج تکثیر مکان‌های ژنی توالی‌های ساده تکراری توسط جفت آغازگرهای مورد استفاده روی ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به مورد بررسی

Table 3. Comparison of the parameters resulted from amplification of SSR alleles by primers used on quince cultivars and genotypes

شماره	آغازگر	تعداد آلل	محدوده اندازه آللی (bp)	Major allele frequency (MAF)	H _e	H _o	F _{is}	PIC
Group I: Apple species derived SSR Markers								
1	CH01f02	6	210-245	0.317	0.350	0.333	0.572	0.735
2	CH01h01	3	110-150	0.769	0.200	0.190	0.504	0.346
3	CH01h10	4	110-160	0.658	0.350	0.333	0.370	0.486
4	CH02b10	6	110-180	0.436	0.873	0.777	-0.152	0.612
5	CH02c02a	3	150-180	0.936	0.033	0.031	0.742	0.118
6	CH02d08	3	180-250	0.936	0.0	0.0	1.000	0.116
7	CH02h11a	4	170-230	0.865	0.050	0.047	0.808	0.233
8	CH03g06	2	130-190	0.968	0.0	0.0	1.000	0.059
9	CH03g07	3	150-240	0.952	0.0	0.0	1.000	0.090
10	CH04a12	4	180-210	0.460	0.267	0.317	0.474	0.514
11	CH04e03	6	160-230	0.460	0.800	0.825	-0.186	0.645
12	CH05d04	6	200-270	0.468	0.550	0.571	0.013	0.483
13	CH05d11	4	190-230	0.666	0.300	0.317	0.347	0.414
Group II: Pear species derived SSR Markers								
15	NH030a	5	205-250	0.864	0.033	0.033	0.863	0.232
16	NH007b	6	150-180	0.652	0.067	0.067	0.866	0.435
17	NB015a	5	170-195	0.559	0.383	0.389	0.348	0.530
18	NH011b	5	250-280	0.355	0.317	0.305	0.595	0.702
19	NH029a	5	80-180	0.898	0.133	0.135	0.296	0.186
20	BGT23b	4	250-300	0.952	0.050	0.047	0.490	0.091
21	GD142	4	110-200	0.436	0.250	0.269	0.597	0.599
22	GD147	6	110-155	0.531	0.733	0.746	-0.243	0.526
23	GD96	5	170-200	0.492	0.150	0.206	0.695	0.622
24	KA14	6	160-190	0.349	0.017	0.015	0.978	0.674
25	KA16	6	110-150	0.460	1.000	0.968	-0.645	0.500
26	KU10	3	250-310	0.968	0.033	0.031	0.493	0.0610

H_e: Expected heterozygosity

H_o: Observed heterozygosity

F_{is}: Inbreeding coefficient

PIC: Polymorphic information content

هتروزیگوسیتی مورد انتظار

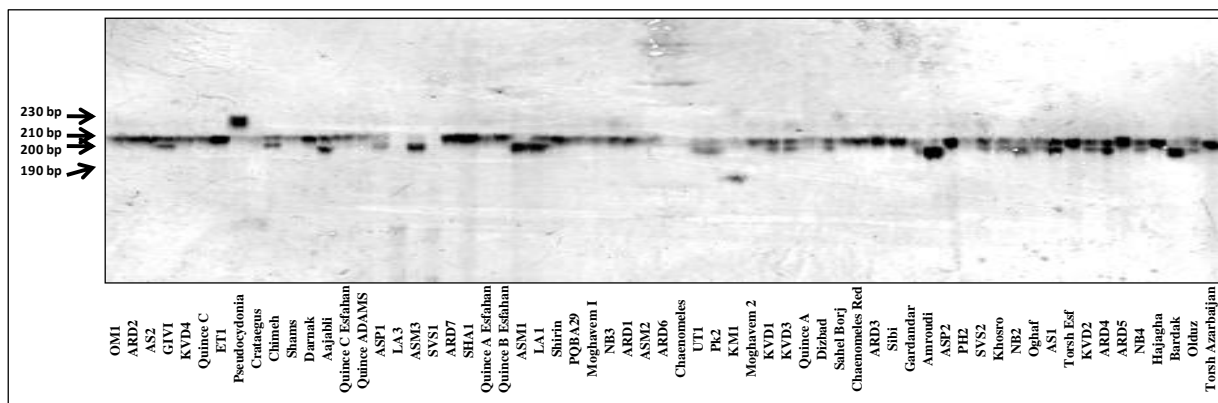
هتروزیگوسیتی مشاهده شده

ضریب خویشاوندی

محتوی اطلاعات چند شکلی

خرمدل آزاد و همکاران (Khoramdel Azad *et al.*, 2013) که به صورت مقدماتی شماری از آغازگرهای فوق را برای ژرم پلاسم به بومی ایران استفاده کردند تا حد زیادی منطبق است. همچنین نتایج نشان داد که آغازگرهای SSR دو گونه سیب (*Malus spp.*) (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002) و گلابی (*Pyrus spp.*) (Yamamoto *et al.*, 2002a; Yamamoto *et al.*, 2002b) که کارآئی بالائی روی این گونه‌ها داشتند، روی ژنوتیپ‌های درخت به مناطق مختلف جهان نیز از قدرت بالای انتقال‌پذیری و تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌های برخوردار می‌باشند (شکل ۱).

اندازه کوچک‌ترین قطعات مربوط به جایگاه نشانگر NH029a با طول ۸۰ جفت‌باز و بزرگ‌ترین قطعه مربوط به جایگاه KU10 با طول ۳۱۰ جفت‌باز بود. نشانگرهای BGT23b و GD147 به ترتیب با مقادیر ۳/۶۰ و ۳/۵۴ بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر و نشانگرهای KU10 و CH03g07 با مقدار ۱/۰۷ کم‌ترین تعداد آلل مؤثر را داشتند. حداکثر بودن مقدار این آماره در نشانگرهای CH02C09 بیانگر فراوانی یکسان آلل‌های موجود در این جایگاه و حداقل بودن این آماره در نشانگرهای KU10 و CH03g07 بیانگر فراوانی زیاد یک آلل و نادر بودن بقیه آلل‌ها در نمونه‌هاست. کارآئی آغازگرهای مورد استفاده با نتایج حاصل از



شکل ۱- تصویر الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA روی ژنوتیپ‌های درخت به با استفاده از جفت آغازگر SSR، CH05d11 با چهار آلل تکثیری در مکان SSR، به چینی (*Pseudocdonia sinensis*) در این مکان دارای آلل اختصاصی است.

Fig. 1. Gel banding pattern of DNA amplification on quince genotypes by using CH05d11, SSR primers with four alleles in SSR locus. Chinese quince (*Pseudocdonia sinensis*) has specific allele in this locus.

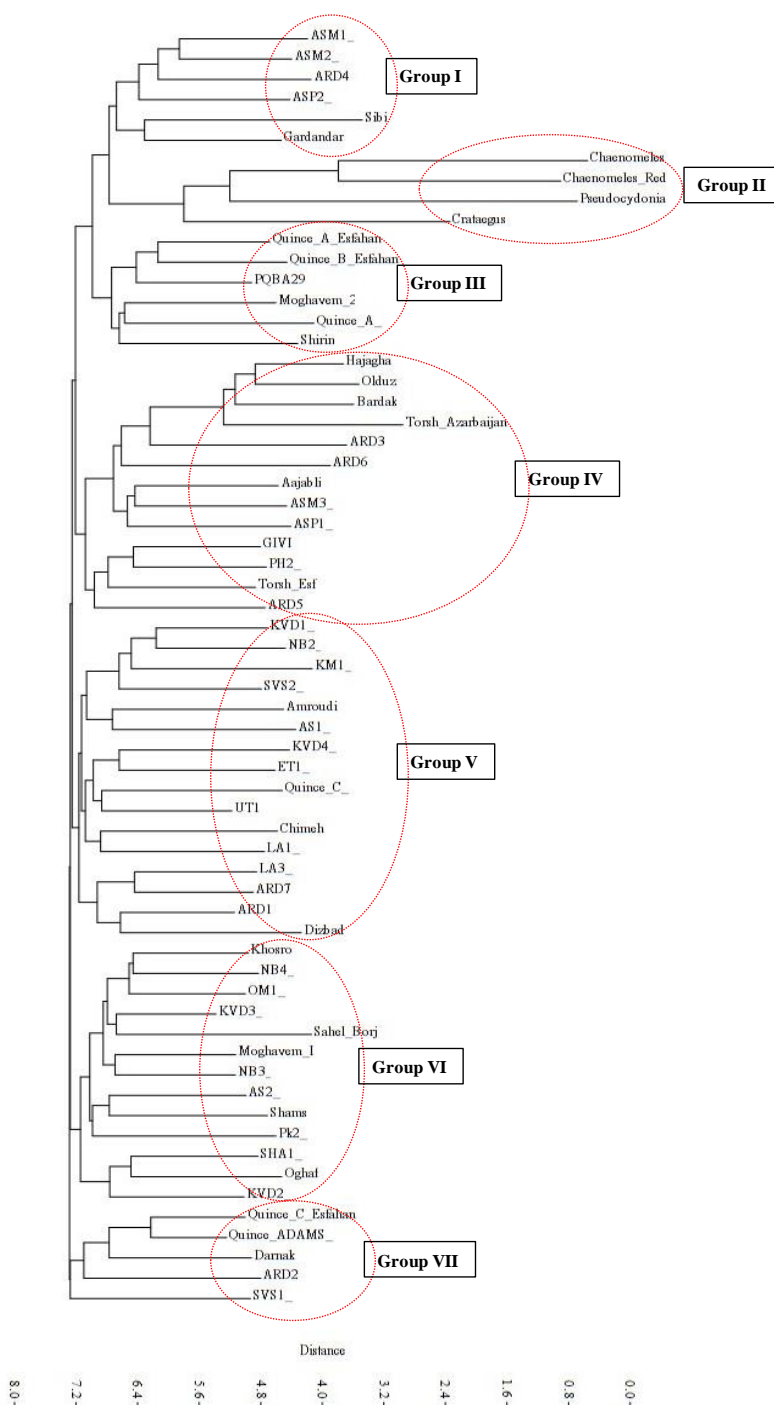
متمایزی قرار گرفتند. این نتایج نشان می‌دهد که اگرچه سایر گونه‌های مورد بررسی اعم از به ژاپنی (*Chaenomeles japonica* f. *alba*) (Nakai) Ohwi)، به چینی (*Pseudocydonia sinensis*) (Thouin) C. K. Schneid.) و ولیک (*Crataegus* spp.) از زیرخانواده اسپیرواید (*Spiraeoideae*) می‌باشند، لیکن با استفاده از نشانگرهای ژنومی از جمله نشانگر SSR مورد استفاده در این پژوهش به خوبی از گونه به معمولی قابل تمایز بودند (Bell and Leitão, 2011; Abdollahi, 2021).

این تمایز همچنین تایید کننده تمایز گیاهشناختی این گونه‌ها، خصوصاً دو گونه به ژاپنی (*Ch. japonica*) و به چینی (*P. sinensis*) است که از نظر نام عمومی نیز هر دو انواعی از درخت یا درختچه به نامگذاری شده و در مواردی در گذشته، به صورت مترادف برای به ژاپنی گونه *Cydonia japonica* (Thunb.) Pers. و برای به چینی نیز گونه *Cydonia sinensis* Thouin. در نظر گرفته شده است. از سوی دیگر در رابطه با گونه به چینی، شناسائی گونه متفاوت آن با درخت به معمولی، از روی میوه آن چنان دشوار می‌باشد که در آمار جهانی تولید میوه به نیز، با توجه به غالبیت تولید میوه به کشور چین به گونه به چینی (*P. sinensis*)، به طور معمول در گروه به معمولی یا *C. oblonga* Mill. طبقه بندی می‌شود.

بررسی مقادیر میزان اطلاعات چندشکل (PIC) نشان داد که نشانگر CH01f02 با مقدار ۰/۷۳۵ بالاترین و نشانگر CH03g06 با مقدار ۰/۰۶ کم‌ترین میزان اطلاعات چندشکلی و نشانگر GD147 با مقدار ۱/۴۳۲ و نشانگر CH03g06 با مقدار ۰/۱۴۶ کم‌ترین مقادیر شاخص شانون را داشتند و بالا بودن مقدار PIC در نشانگر CH01f02 بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد برای این جایگاه بود (جدول ۳). بررسی تنوع آللی نشانگرهای KA16 و CH04e03 به ترتیب بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را برابر ۱/۰ و ۰/۸ نشان داد. همچنین نشانگر GD147 و BGT23b بیش‌ترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب با مقادیر ۰/۷۱۸ و ۰/۷۱۰ را نشان دادند (جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهد که مکان‌های ژنی فوق علاوه بر امکان استفاده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به، برای تعیین شناسنامه ژنتیکی ارقام معرفی شده داخلی و تفکیک آنها از سایر ارقام خارجی و تجاری بومی نیز قابل استفاده می‌باشند.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و روابط ژنتیکی

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس شاخص جاکارد، ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به مورد بررسی را در هفت گروه اصلی دسته‌بندی کرد (شکل ۲). بر اساس این گروه‌بندی، گونه‌های متمایز از درخت به معمولی یا *C. oblonga* Mill. در گروه کاملاً



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به ارزیابی شده بر اساس شاخص جاکارد و ضریب همبستگی کوفنیتیک با استفاده از نشانگرهای SSR سیب و گلابی

Fig. 2. Dendrogram of cluster analysis of the evaluated quince cultivars and genotypes according to Jaccard index and cophenetic correlation coefficient and SSR markers of apples and pears

ادامه بررسی‌ها و گزینش انواع مطلوب و متحمل‌تر به خاک‌های آهکی، می‌تواند منجر به تولید و معرفی پایه‌های جدید و بسیار پاکوتاه کننده‌ای برای احداث باغ‌های گلابی و به کشور شود. این نتایج همچنین بیانگر کاربرد عملی استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان زیرساختی برای برنامه‌های به نژادی درختان میوه در رابطه با محصول به است.

گروه چهارم تجزیه خوشه‌ای در بردارنده ژنوتیپ‌های متعددی از استان اردبیل و رقم بارداک ترکیه و بش اولدوز و رجلی ۱ جمهوری آذربایجان (منطقه قفقاز)، به ترش آذربایجان و به ترش اصفهان قرار گرفتند. این نتایج نشان می‌دهد که اولاً بسیاری از ژنوتیپ‌های به استان اردبیل دارای رابطه ژنتیکی نزدیک‌تر با ژرم پلاسما درخت به مسیر دوم تکامل این درخت از مسیر قفقاز، ترکیه و سپس یونان و اروپای غربی می‌باشند. همچنین به ترش اصفهان که در مقایسه با اغلب ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به اصفهان دارای میوه کشیده‌تر و مزه دارای اسیدیته بالاتری دارد، همانند به ترش آذربایجان دارای رابطه ژنتیکی نزدیک‌تر با به‌های شمال غرب ایران است. ژنوتیپ PH2 که اخیراً با نام رقم بهتا، فرم کشیده میوه و مزه ملس مورد معرفی قرار گرفت (Abdollahi et al., 2019a)، نیز همانند بسیاری از دیگر ارقام و ژنوتیپ‌های دارای میوه گلابی شکل و یا کشیده و مزه ملس و دارای اسیدیته بالاتر میوه، دارای رابطه ژنتیکی نزدیک‌تر با

در گروه اول تجزیه خوشه‌ای سه ژنوتیپ استان گیلان، دو ژنوتیپ استان اردبیل، ژنوتیپ گردن‌دار از استان خراسان رضوی گروه‌بندی شدند. در گروه سوم نیز تقریباً کلیه پایه‌های (رقم پایه‌های) درخت به که دارای منشاء اروپای غربی شامل فرانسه و انگلستان می‌باشند طبقه‌بندی شدند (شکل ۲). همچنین پایه کوئینس C که بر اساس نظر توکی (Tukey, 1962) احتمالاً دارای منشاء قفقاز بوده و با ژنوتیپ‌های بذری ارسال شده به ایستگاه ایست مالینگ انگلستان شباهت بالایی نشان داد، در گروه هفتم همراه با پایه کوئینس Adams از کشور بلژیک، رقم دارناک از جمهوری آذربایجان (منطقه قفقاز)، ژنوتیپ ARD2 از استان اردبیل و ژنوتیپ SVS1 از استان اصفهان در یک گروه قرار گرفتند.

نکته بسیار حائز اهمیت در رابطه با این نتایج در این است که هر دو ژنوتیپ ARD2 و SVS1 در ارزیابی ساختار ژنومی و گروه‌بندی حاصل با نتایج این پژوهش (شکل ۲) در گروه ژرم پلاسما با ساختار ژنتیکی ژرم پلاسما شمال غرب طبقه‌بندی شدند. این نتایج ضمن تایید نظر توکی (Tukey, 1962)، نشان‌دهنده احتمال بسیار زیاد نزدیکی ژنتیکی پایه کوئینس C با ژرم پلاسما شمال غرب ایران، گیلان و قفقاز بوده و در ارزیابی‌های انجام شده روی خصوصیات رویشی و زایشی ژرم پلاسما بومی ایران که انواع پاکوتاه مطلوبی در ژنوتیپ‌های گیلان مشاهده شد (Alipour et al., 2014)،

ژرم پلاسما شمال غرب کشور می باشد.

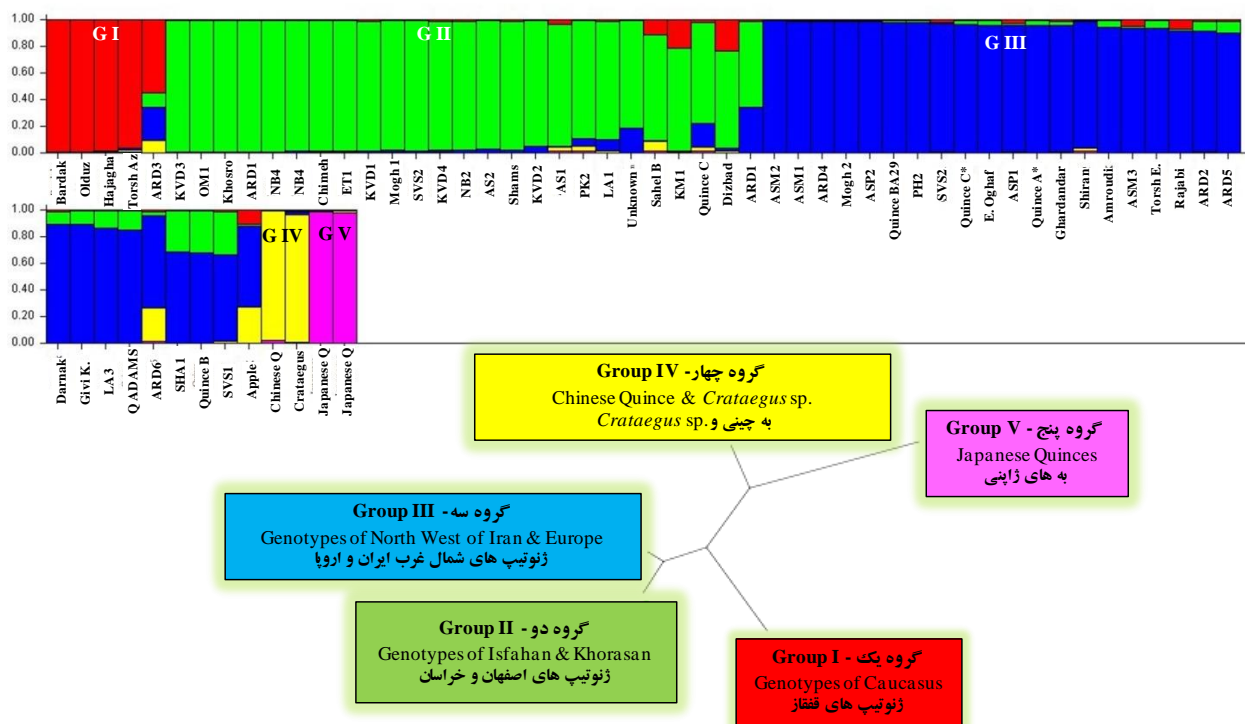
در گروه پنجم نیز اغلب ژنوتیپ های اصفهان و رقم معرفی شده ویدوجا (با کد KVD1)، ژنوتیپ های نظنز و کاشان و رقم چیمه کاشان قرار گرفتند (شکل ۲). وجود تعداد معدودی ژنوتیپ از استان اردبیل در این گروه می تواند بیانگر نیاز به تعداد بیش تر نشانگر SSR برای تفکیک کامل ژنوتیپ ها و یا انتقال برخی از ژرم پلاسما تکامل یافته در مسیر ناحیه مرکزی ایران به ناحیه شمال غرب، طی سنوات گذشته باشد. در نهایت اینکه در گروه شش، اغلب ارقام و ژنوتیپ های برگرفته از استان اصفهان و یا خراسان رضوی بودند که ارزیابی های قبلی نشان می دهد از نظر شکل میوه، ارقام و ژنوتیپ های استان خراسان رضوی شباهت بالاتری نسبت به دیگر ژرم-پلاسما کشور به ژرم پلاسما استان اصفهان داشته و اغلب دارای فرم میوه پخ و کوتاه بوده (Abdollahi et al., 2014)، میوه ها بر خلاف ژرم پلاسما شمال غرب کشور، همانند به های استان اصفهان کم آب تر، مزه شیرین و با ترشی و اسیدیته کم تر و مناسب تر برای استفاده به صورت فرآوری شده بوده و تقریباً فاقد قدرت استفاده به صورت تازه خوری می باشند.

بررسی های میدانی نشان داده که انواع به های گیلان که در زبان محلی این استان پنبه به با معنی به هائی با میوه نرم و آبدار و تا اندازه ای مزه ملس بوده و خاصیت تازه خوری

دارند، دارای رابطه ژنتیکی و خویشاوندی نزدیک تر با ژرم پلاسما استان اردبیل و ناحیه قفقاز می باشند. همچنین ارقام درخت به ترکیه نیز که اغلب دارای فرم کشیده و میوه آبدار تر نیز هستند و از نظر فرم و خاصیت فرآوری بسیار متمایز از به های مناطق مرکزی ایران هستند، به احتمال زیاد همانند آنچه در رابطه با رقم به بارداک این کشور دیده شد، در مسیر تکاملی و تنوع ژرم پلاسما غرب قفقاز تکامل یافته اند (شکل ۲).

تجزیه خوشه ای با استفاده از مدل Bayesian

ساختار ژنتیکی جمعیت بر اساس روش مبتنی بر مدل Bayesian و وجود چند رنگ در ستون مربوط به یک فرد نشان دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با جمعیت های دیگر و اختلاط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ ها بود. در این تجزیه داده ها، پنج گروه ژنومی تفکیک شد (شکل ۳) که همانند نتایج خوشه بندی، دو گروه چهارم و پنجم به صورت مستقل در بردارنده گونه های به چینی (*P. sinensis*)، ولیک قرمز (*C. atrosanguinea*) در گروه چهارم (رنگ زرد) و به های ژاپنی (*Ch. japonica*) در گروه پنجم (رنگ صورتی) و به صورت مستقل بودند. این نتایج در کنار نتایج تجزیه خوشه ای، ضمن تایید نتایج قبلی نشان می دهد که گونه به چینی از گونه به ژاپنی نیز مستقل و تفاوت ساختار ژنتیکی قابل تفکیک و متمایز کننده ای دارد (شکل ۳).



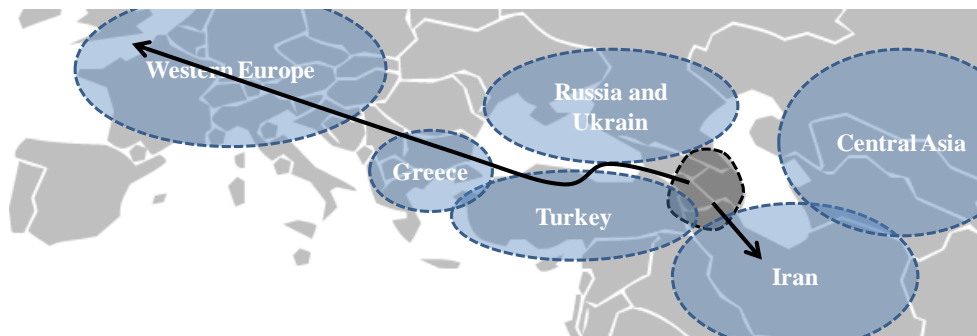
شکل ۳- ساختار ژنتیکی جمعیت ۶۳ ژنوتیپ درخت به و گونه‌های وابسته با استفاده از ۲۶ نشانگر SSR سیب و گلابی. هر ژنوتیپ با یک ستون عمودی بیانگر وابستگی هر ژنوتیپ به گروه مربوطه می‌باشد. پنج گروه با رنگ‌های مختلف متمایز و شامل قرمز: به‌های قفقاز، سبز: به‌های مناطق مرکزی و شمال شرق ایران، آبی: به‌های شمال غرب، ترکیه و اروپا، زرد: به چینی (*Pseudocydonia sinensis*) و ولیک قرمز (*Chaenomeles japonica*)، صورتی: به‌های ژاپنی (*Crataegus atrosanguinea*)

Fig. 3. Population genetic structure of 63 quince genotypes and quince related species using 26 SSR markers of apples and pears. Each genotype is represented by a vertical bar showing the estimated membership fraction with related groups. The five groups are depicted using the following color codes: red, Caucasian quinces, green, quinces of central and northeastern region of Iran; blue, quinces of northwestern, turkey and Europe, yellow, Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis*) and hawthorn (*Crataegus atrosanguinea*); and pink, Japanese quinces (*Chaenomeles japonica*)

استان تهران، اردبیل، گیلان و سایر ژرم‌پلاسم استان قفقاز و اغلب ژرم‌پلاسم اروپای غربی بود (شکل ۳). نتایج ضمن تایید نتایج تجزیه خوشه‌ای، بیانگر نزدیکی ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌هایی هستند که به نظر می‌رسد همگی در مسیر دوم تکامل

در گروه اول ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت به‌های قفقاز، اردبیل و ترکیه به صورت جمعیتی مستقل قرار گرفتند. گروه دوم در بردارنده اغلب ژنوتیپ‌ها و ارقام استان اصفهان و خراسان رضوی و گروه سوم در بردارنده اغلب ژنوتیپ‌ها و ارقام

ارقام و ژنوتیپ‌های به (Abdollahi, 2019) از سمت ترکیه، یونان و سپس اروپای غربی انتشار مرکز پیدایش در شمال غرب ایران و قفقاز، به یافته‌اند (شکل ۴).



شکل ۴- نقشه پراکنش و تکامل ژرم پلاسما درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) از مرکز پیدایش آن در ناحیه شمال غرب ایران و قفقاز در مراکز تنوع مختلف در آسیای مرکزی، ایران، ترکیه و سایر بخش‌های اروپا. مرکز پیدایش این گونه با رنگ تیره در غرب دریای خزر مشخص شده است

Fig. 4. Map of distribution and evolution of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) germplasm from center of diversity in North West Iran and the Caucasus to different centers of diversity in central Asia, Iran, Turkey and other parts of Europe. The center of origin of this species has been demonstrated in dark circle in the west of Caspian sea

نتیجه‌گیری

مستقلی از جنس *Cydonia* طبقه‌بندی شدند. همچنین در پنج گروه دیگر، ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی با منشاء استان‌های مختلف ایران شامل استان‌های اصفهان، اردبیل، خراسان رضوی، گیلان و تهران و همچنین جمهوری آذربایجان (منطقه قفقاز) و اروپای شرقی با منشاء فرانسه، انگلستان و بلژیک خوشه‌بندی شدند به صورتی که نزدیکی ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های استان اصفهان و خراسان رضوی در بیش‌تر موارد مشاهده شد. ژرم پلاسما به استان گیلان نزدیکی ژنتیکی قابل توجهی با ژرم پلاسما استان اردبیل داشته و هر دو این ژرم پلاسما در ارتباط نزدیک‌تر با ژرم پلاسما به آذربایجان، جمهوری آذربایجان و قفقاز بودند. از سوی دیگر در هر دو گروه ژرم پلاسما

نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای SSR دو گونه سیب و گلابی به خوبی دارای قابلیت انتقال‌پذیری (Transferability) به گونه درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) می‌باشند. همچنین بر اساس اطلاعات ژنومی، گونه‌های به ژاپنی (*Ch. japonica*) و به چینی (*P. sinensis*) کاملاً مستقل از درخت به معمولی بوده و نتایج این بررسی نیز تایید کننده اطلاعات گیاهشناختی مبنی بر جنس و گونه‌های متفاوت برای این نوع به است.

داده‌های SSR همچنین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در شش گروه یا خوشه اصلی گروه‌بندی کرد که گونه‌های مذکور در گروه

ایران، ترکیه و اروپای غربی به عنوان مسیر اول، و همچنین مسیر دوم شامل منطقه مرکزی و شمال شرق ایران اتفاق افتاده است. بر اساس انطباق یافته‌های این پژوهش با بررسی‌های قبلی در رابطه با خصوصیات ارگانولپتیک میوه، مسیر تکاملی اول در بردارنده انواع به با میوه کشیده‌تر و دارای بافت میوه آبدارتر، مزه ملس و اسیدیت به بالاتر در مقایسه با میوه به حاصل از ژرم پلاسما به منطقه مرکزی ایران است (شکل ۵).

شامل ژرم پلاسما گروه اول متعلق به منطقه شمال غرب و ژرم پلاسما گروه دوم متعلق به منطقه اصفهان و خراسان رضوی، جابجایی و یا اختلاط ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده مشاهده شد. بر اساس نتایج این پژوهش و بررسی مورفولوژیک و ارگانولپتیک قبلی، به نظر می‌رسد حداقل دو مسیر تکاملی در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به از منطقه قفقاز به عنوان منشاء پیدایش این گونه به سمت شمال غرب



شکل ۵- شکل میوه در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به متمایز شده در دو مسیر تکاملی مختلف شامل گروه اول (ردیف بالا): ارقام و یا ژنوتیپ‌های منشاء گرفته از مرکز پیدایش به سوی ناحیه مرکزی ایران و خراسان رضوی؛ گروه دوم (ردیف پائین): در بردارنده ارقام یا ژنوتیپ‌های منشاء گرفته از مرکز پیدایش به سوی مسیر شمال غرب ایران، ترکیه و اروپا. اغلب ارقام و ژنوتیپ‌های دارای منشاء اصفهان و یا خراسان رضوی دارای فرم غالب میوه پخ تا گرد، طعم قابض و بافت سفت تا تقریباً سفت است. بر خلاف آن در گروه دوم فرم کشیده میوه معمول‌تر و میوه فاقد طعم قابض، بافت میوه نرم و آبدار و تا حدی مزه میوه اسیدی و ملس است

Fig. 5. Fruit form in quince cultivars and genotypes in two different evolutionary routs including the first group (top row): cultivars or genotypes originated from the center of origin to the path of the central area and Khorasan Razavi of Iran; The second group (bottom row): cultivars and genotypes originated from the center of origin to the northwestern route of Iran, Turkey and Europe. Most cultivars and genotypes originated in Isfahan or Khorasan Razavi have round fruits, astringent taste and firm to almost firm in texture. In contrast, in the second group, the elongated pyriform of the fruit is more common and the fruit lacks astringency, the texture of the fruit is soft and juicy, and to some extent the taste of the fruit is acidic

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله بدین وسیله از زحمات کارکنان پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری و به ویژه کارکنان ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر و رئیس وقت این ایستگاه جناب آقای دکتر داریوش آتشکار و همچنین زحمات آقای مصطفی محمدی گرمارودی در نگهداری و ارزیابی این ژرم پلاسِم کمال تشکر و قدردانی را دارند. نگارندگان از زحمات مرحوم مهندس محمود عدلی برای جمع‌آوری و ارسال ژرم پلاسِم به استان خراسان رضوی و مهندس ایوبعلی قاسمی، برای جمع‌آوری، ارزیابی و تکثیر ارسال ژرم پلاسِم به استان اصفهان و همچنین دکتر حسین فتحی و مهندس عادل پیرایش برای جمع‌آوری به استان اردبیل نیز نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

یافته‌های این پژوهش نشان دهنده رابطه خویشاوندی پایه کوئینس C با ژرم پلاسِم به شمال و شمال غرب ایران در منطقه تالش جنوبی بوده و با توجه به وجود انواع پاکوتاه در ژرم پلاسِم این منطقه، در برنامه‌های به نژادی برای دستیابی به پایه‌های پاکوتاه تا بسیار پاکوتاه داخلی نظیر پایه کوئینس C، استفاده و توجه به ژرم پلاسِم این منطقه بسیار حائز اهمیت است. همچنین ژرم پلاسِم منطقه شمال غرب ایران و به ویژه ژرم پلاسِم درخت به استان اردبیل مسیر تازه‌ای را در رابطه با اصلاح ارقام جدید به با خاصیت تازه‌خوری مشخص می‌نماید. ژرم پلاسِم درخت به منطقه مرکزی ایران نیز از منطقه شمال غرب متمایز و بر اساس انطباق با بررسی‌های ارگانولپتیک برای مصارف فرآوری و نگهداری طولانی مدت و استفاده در متابولیت‌های ثانویه ارزش بالاتری دارا می‌باشند (شکل ۵).

References

- Abdollahi, H. 2019.** A review on history, domestication and germplasm collections of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in the world. *Genetic Resources and Crop Evolution* 66: 1041-1058.
- Abdollahi, H. 2021.** Quince. Pp. 183-246. In: Mandal, D., Wermund, U., Phavaphutanon, L., and Cronje, R. (eds.). *Temperate fruits: production, processing, and marketing*. CRC Press, New York, USA.
- Abdollahi, H., Alipour, M., Khorramdel Azad, M., Ghasemi, A., Adli, M., Atashkar, D., Akbari, M., and Nasiri, J. 2013.** Establishment and primary evaluation of quince germplasm collection from various regions of Iran. *Acta Horticulturae* 976: 199-206.
- Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Mehrabipour, S. 2008a.** Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. II. Resistance of

- genotypes to the disease. *Seed and Plant Journal* 24: 529-541 (in Persian).
- Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Adli, M. 2008b.** Collecting and collection establishment of *Cydonia oblonga* Mill. germplasm from different regions of Iran. Pp. 192. In: Proceedings of the 10th Iranian Congress of Genetics (Plant Section) (in Persian).
- Abdollahi, H., Ghasemi A., Mohammadi Garmaroudi M., Alipour, M., Khoramdel Azad, M., Atashkar, D., Tatari, M., Mirabdulbaghi, M., and Tavousi, M. 2019a.** Behta, new quince cultivar with high yield and quality and semi-resistant to fire blight. *Baztab* 5: 16-17 (in Persian).
- Abdollahi, H., Alipour, M., and Mohammadi Garamroudi, M. 2019b.** Physicochemical attributes and their relationship with organoleptic properties of fruits of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes collected from different regions of Iran. *Seed and Plant Journal* 35: 25-46 (in Persian).
- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Hoseinpour, R., and Abdshah, H. 2019.** Statistical yearbook of agriculture: Volume 3: Horticultural crops. Information Technology and Communication Center, Deputy of Planning and Economy, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 163 pp. (in Persian).
- Alipour, M., Abdollahi, H., Abdousi, V., Ghasemi, A. A., Adli, M., and Mohamadi, M. 2014.** Evaluation of vegetative and reproductive characteristics and distinctness of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from different regions of Iran. *Seed and Plant Journal* 30-1: 507-529 (in Persian).
- Bassil, N., Nyberg, A., Postman, J., and Kim, Y. K. 2015.** Improved microsatellite markers for quince (*Cydonia oblonga*) genetic analysis. *Acta Horticulturae* 1094: 57-65.
- Bassil, N. V., Postman, J. D., Hummer, K. E., Mota, J., Sugar, D., and Williams, R. 2011.** Quince (*Cydonia oblonga*) genetic relationships determined using microsatellite markers. *Acta Horticulturae* 909: 75-83.
- Bayazit, S., Imrak, B., Küden, A., and Kemal Güngör, M. 2011.** RAPD analysis of genetic relatedness among selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) accessions from different parts of Turkey. *HortScience (Prague)* 38: 134-141.
- Bell, L. R., and Leitao, M. J. 2011.** *Cydonia*. Pp. 1-16. In: Chittaranjan, K. (ed.). Wild crop relatives: Genomic and breeding resources. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Dumanoglu, H., Tuna-Gunes, N., Aygun, A., San, B., Akpınar, A. E., and Bakir, M. 2009.** Analysis of clonal variations in cultivated quince (*Cydonia oblonga* “Kalecik”) based on fruit characteristics and SSR markers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 37: 113-120.

- FAO. 2021.** Statistical yearbook: World food and agriculture 2021. Food and Agriculture Organization Publication. Rome, Italy. 368 pp.
- Ganopoulos, I., Merkouropoulos, G., Pantazis, S., Tsipouridis, C., and Tsaftaris, A. 2011.** Assessing molecular and morpho-agronomical diversity and identification of ISSR markers associated with fruit traits in quince (*Cydonia oblonga*). Genetics and Molecular Research 10: 2729-2746.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C. 1998.** Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theoretical and Applied Genetics 96: 1069-1076.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., and Forster, R. 1997.** Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 94: 249-254.
- Hokanson, S. C., Szewc-McFadden, A. K., Lamboy, W. F., and McFerson, J. R. 1998.** Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. Theoretical and Applied Genetic 97: 671-683.
- Hokanson, S. C., Lamboy, W. F., Szewc-McFadden, A. K., and McFerson, J. R. 2001.** Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. Euphytica 118: 281-294.
- Khoramdel Azad, M., Nasiri, J., and Abdollahi, H. 2013.** Genetic diversity of selected Iranian quinces using SSRs from apples and pears. Biochemical Genetics 51: 426-442.
- Khoshbakht, K., and Hammer, K. 2006.** Savadkouh (Iran)-an evolutionary center for fruit trees and shrubs. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 641-651.
- Liebhart, R., Ganfranceschi, L., and Koller, B. 2002.** Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Molecular Breeding 10: 217-241.
- Manee, A. 1994.** Pear and quince, and their growing. Iran Technical Publication Company. Tehran, Iran. 113 pp. (in Persian).
- Mehrabipour, S., Abdollahi, H., and Adli, M. 2012.** Response of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from Guilan and Khorasan provinces to fire blight disease. Seed and Plant Journal 28: 67-84 (in Persian).
- Mehrabipour, S., Abdollahi, H., Hassanzadeh, N., and Ghasemi, A. A. 2010.** The role of some quince stock (*Cydonia oblonga*) genotypes in susceptibility to fire blight disease. Applied Entomology and Phytopathology 78: 25-42 (in Persian).

- Moradi, S., Koushesh Saba, M., Mozaffari, A. A., and Abdollahi, H. 2016.** Antioxidant bioactive compounds changes in fruit of quince genotypes over cold storage. *Journal of Food Science* 81: H1833-H1839.
- Moradi, S., Koushesh Saba, M., Mozaffari, A. A., and Abdollahi, H. 2017.** Physical and biochemical changes of some Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes during cold storage. *Journal of Agricultural Science and Technology* 19: 377-388.
- Simard, M. H., Michelesi, J. C., and Masseron, A. 2004.** Pear rootstock breeding in France. *Acta Horticulturae* 658: 535-540.
- Sykes, J. T. 1972.** A description of some quince cultivars from western Turkey. *Economical Botany* 26: 21-31.
- Tukey, H. B. 1962.** Dwarfed fruit trees. Cornell University Press. Ithaca, USA. 562 pp.
- Tydemann, H. M. 1938.** The wild fruit trees of the Caucasus and Turkestan. Their potentialities as rootstocks for apples and pears. I. A first report on some wild quince from the Caucasus. *Annual Report of East Malling Research Station for 1938*. A2: 103-116.
- Vavilov, N. I. 1949.** The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13: 1-366.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Manabe, T., Kotobuki, K., Hayashi, T., Ban, Y., and Matsuta, N. 2002a.** Simple sequence repeats for genetic analysis of pear. *Euphytica* 124: 129-137.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Shoda, M., Ban, Y., Hayashi, T., and Matsuta, N. 2002b.** Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecular Ecology Notes* 2: 4-16.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Soejima, J., Sanada, T., Hayashi, T., and Ban, Y. 2004.** Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science* 54: 239-244.
- Zohary, D., and Hopf, M. 2000.** Domestication of plants in the old world. Oxford, UK. 316 pp.