

مطالعه تنوع ژنتیکی برخی گونه‌ها و زیر گونه‌های جنس ولیک (*Crataegus* spp.) در ایران با استفاده از نشانگرهای SSR

The Study of Genetic Diversity of Some Species and Sub-Species of Hawthorn (*Crataegus* spp.) in Iran using SSR Markers

محمد ترکاشوند^۱، حسن اکبری بیشه^۲، امیرعباس تقی‌زاده^۳، حمیدعبداللهی^{*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری، بخش تحقیقات نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Torkashvand M¹, Akbari Bisheh H², Taghizadeh AA³, Abdollahi H^{*3}

1- MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- PhD, Seed and Plant Section, Agriculture and Natural Research Center of Isfahan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran

3- PhD Student, Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.abdollahi@areeo.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

جنس ولیک (*Crataegus*) به دلیل سازگاری و هم‌چنین تحمل به شرایط نامساعد به عنوان پایه‌ای مناسب برای برخی درختان میوه دانه‌دار به‌ویژه درخت به قابل استفاده است، اما به دلیل پراکنش زیاد و تنوع ژنتیکی گسترده آن، طبقه‌بندی دقیقی از روابط ژنتیکی این گونه و کاربرد دقیق آن‌ها وجود ندارد. این تحقیق به منظور بررسی تنوع و رابطه ژنتیکی شماری از گونه‌های ولیک در رویشگاه‌ها و برخی از مراکز تنوع آن در ایران انجام شد. به این منظور ۳۲ ژنوتیپ این جنس از ۱۴ گونه و ۱۰ زیر گونه مختلف با ۳۲ جفت آغازگر اختصاصی SSR سب و گلایی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بیانگر تکثیر مجموعاً ۴۲۲ باند در کلیه گونه‌ها، زیر گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود و میانگین شاخص PIC برای جفت آغازگرها ۷۷ درصد برآورد شد. ارزیابی فاصله ژنتیکی بین رویشگاه‌ها با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی نی (Nei) نشان‌دهنده بیش‌ترین فاصله بین دو رویشگاه استان کرمانشاه و مازندران و کم‌ترین فاصله بین دو رویشگاه آذربایجان شرقی و گیلان بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA بیانگر شباهت اندک ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و در نتیجه خوشه‌بندی با فاصله زیاد در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود که این امر می‌تواند به دلیل تنوع گونه‌ها و سطوح پلوئیدی متعدد آن‌ها باشد. در نهایت این بررسی نشان‌دهنده پراکندگی بالا و اختلاط شدید این ژنوتیپ‌ها در ایران بوده و بیانگر لزوم ارائه یک برنامه جامع جمع‌آوری و ارزیابی ژرم پلاس به منظور کاربردهای بعدی گونه‌های این جنس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

پلوئیدی

تجزیه خوشه‌ای

رویشگاه

ژنوتیپ

نشانگر ریزماهواره

مقدمه

جنس ولیک (*Crataegus*)، گیاهی اغلب درختچه‌ای و گاهی درختی، چندساله و چوبی متعلق به خانواده گل‌سرخیان (*Rosaceae*) بوده که بر اساس گزارش‌ها و طبقه‌بندی‌های مختلف، بین ۴۵۲ تا ۴۳۲۲ گونه آن در جهان گزارش شده‌است. پراکنش گونه‌ها و ژنوتیپ‌های این جنس در کلیه مناطق معتدله نیمکره شمالی، به غیر از مناطق بسیار خشک و بسیار سرد بوده (Phipps et al. 2003) و اصلی‌ترین مراکز تنوع آن در دنیای قدیم، از ترکیه تا ایران است (Christensen 1992). از این جنس در فلور ایران، ۳۷ گونه در بردارنده ۳۳ گونه مستقل و ۵ هیبرید بین گونه‌ای گزارش شده‌است که از این تعداد چهار گونه اندمیک، پنج گونه نادر و چهار گونه در حال انقراض می‌باشند (Jalili and Jamzad 1999). از نظر طبقه‌بندی و بررسی روابط خویشاوندی، جنس ولیک به دلیل عدم وجود ناسازگاری بین گونه‌ای و ایجاد دورگ‌های بین گونه‌ای زیاد، تولید مثل آپومیکسی و سطوح متعدد پلی‌پلویدی، یکی از مشکل‌ترین جنس‌های گیاهی برای گیاه‌شناسان به حساب می‌آید، به طوری که در برخی منابع از آن به عنوان کابوس تاکسونومیک و هم‌چنین گیاهی با تنوع ژنتیکی بی پایان نام برده شده‌است (Phipps et al. 2003).

بر اساس این دشواری و تنوع گسترده موجود در جنس *Crataegus* در مناطق مختلف جهان و از جمله کشور ما، اختلاف نظر فراوانی در رابطه با شمار گونه‌ها و زیرگونه‌های موجود بر اساس فلورهای مختلف مشاهده می‌شود. (Sabeti 1996) از ۱۵ گونه مستقل و ۹ زیرگونه در جنس ولیک نامبرده است. Parsa (1948) ۱۳ گونه و Rechinger (1989) ۱۷ گونه متعلق به این جنس در کشور نامبرده‌اند. تعداد گونه‌های ذکر شده از این جنس توسط Mozafrian (1994) شامل ۲۲ گونه مستقل، ۴ گونه جدید نظیر *C. assadii* و شماری زیرگونه متعلق به گونه‌های *C. oxycantha* و *C. monogyna melanocarpa* است. اخیراً علاوه بر گونه‌های موجود، یک گونه به نام زارعی در غرب کشور توسط Donmez (2009) شناسایی و معرفی شده‌است. بر این اساس تا حدی مشخص می‌شود که بر خلاف دیگر اعضای خانواده گل‌سرخیان و به‌ویژه درختان میوه دانه‌دار که از رده‌بندی گیاه‌شناختی نسبتاً ساده تا بسیار ساده‌ای نظیر درخت به

(*Cydonia oblonga* Mill.) برخورداراند، تنوع جنس ولیک تنها در کشور ما از اختلاف نظر و گستردگی قابل توجهی برخوردار می‌باشد.

به نظر می‌رسد این تنوع ژنتیکی گسترده و پراکنش جهانی جنس ولیک در نیمکره شمالی، از توانائی‌های خاص گونه‌های مختلف آن به طور عموم در تحمل به شرایط اقلیمی مختلف و هم‌چنین وجود تحمل به تنش‌های مختلف خصوصاً تحمل به خشکی و شوری و قدرت رشد در رویشگاه‌های سنگلاخی و دارای شرایط دشوار ناشی شده و در کنار آن وجود ساختارهای ژنتیکی تسهیل کننده بروز تنوع، به ایجاد، حفظ و نگهداری تنوع ایجاد شده منجر شده‌است. بر اساس این تحمل‌ها، انواعی از ولیک از دیرباز به عنوان پایه برای تکثیر و پیوند درخت به در استان اصفهان مورد استفاده قرار گرفته است (Manee 1994). استفاده از این پایه خصوصیات متفاوتی را برای درخت به نظیر پاکوتاهی نسبی به همراه داشته و در بررسی (Mehrabipour et al. 2010) شماری از ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به، حساسیت بیش‌تری به بیماری آتشک در ارزیابی گلخانه‌ای در مقایسه با پایه‌های بذری به روی این پایه داشتند. پایه ولیک هم‌چنین ظاهراً با همه ارقام گلابی سازگار بوده، لیکن به دلیل رشد کم، موجب ایجاد حجم تاج بسیار کمی در ارقام متوسط تا کم رشد گلابی می‌شود (Abdollahi et al. 2012). با توجه به خصوصیات ذکر شده توسط Sabeti (1996) و هم‌چنین بررسی مورفولوژیک بذر توسط Arjmandi et al. (2009) و Sharifnia et al. (2009) به نظر می‌رسد گونه ولیک مورد استفاده برای تهیه بذر در ایران گونه *C. atrosanguinea* باشد. این گونه در منوگراف Christensen and Zielinski (2008) به عنوان زیر گونه آمبیگوا (*Ambigua*) از گونه *C. ambigua* ذکر شده‌است، که Sharifnia et al. (2009) نظر Christensen and Zielinski (2008) را در تحقیق خود مورد تایید قرار داده‌اند که هر دو دارای میوه‌های گرد و قرمز رنگ با قطر حدود یک سانتی‌متر می‌باشند. گونه *C. ambigua* از نظر گیاه‌شناسی بسیار به گونه *C. songarica* شبیه بوده، لیکن در بررسی به عمل آمده در منابع مختلف مشخص شده که سطح بذر در گونه *C. songarica* صاف و فاقد شیار است، در حالی که در

بدور مورد استفاده برای تولید پایه اغلب سه شیار طولی مشاهده می‌شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی در زمینه تنوع ژنتیکی جنس ولیک به میزان محدودی صورت گرفته و اطلاعات جامعی در این رابطه گزارش نشده است. در بررسی Beigomohadi and Rahmani (2011) با استفاده از نشانگر رپید (RAPD)، پنج گونه ولیک شمال غرب ایران بررسی و دو خوشه اصلی گونه‌های دارای میوه قرمز و میوه زرد مورد تفکیک قرار گرفتند. در بررسی Akbari Bisheh et al. (2014) در پی ارزیابی مورفولوژیک گونه‌های متعددی از جنس ولیک، به بررسی رابطه خویشاندی این گونه‌ها با استفاده از نشانگر ISSR پرداخته شد و بر اساس ۱۴ آغازگر مورد استفاده، گونه‌ها و زیرگونه‌های مورد بررسی در سه گروه اصلی گروه‌بندی شدند. در گروه اول این نشانگر توانست گونه‌ها و زیرگونه‌ها را برحسب مناطق جمع‌آوری آن‌ها تفکیک کند درحالی که در زیرگروه دوم تا حدودی گونه‌ها و زیرگونه‌ها مورد تفکیک قرار گرفتند.

با توجه به اینکه شناخت اولیه ژرم پلاسما به منظور ارزیابی و کاربردهای بعدی یکی از اصول بنیادی محسوب شده و از طرفی ابهام موجود در شناسایی و تنوع جنس ولیک (*Crataegus*) یکی از مشکلات جمع‌آوری و تشکیل کلکسیون آن محسوب می‌شود، در این تحقیق به بررسی تنوع و رابطه خویشاوندی شمار قابل توجهی از گونه‌ها و زیرگونه‌های کشور با استفاده از نشانگرهای SSR تکامل یافته در سیب و گلابی برای این گونه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۲ ژنوتیپ از جنس ولیک (*Crataegus*) متعلق به ۱۴ گونه و ۱۰ زیرگونه مختلف (جدول ۱) که از ۱۴ رویشگاه طبیعی این گونه از ۱۴ استان کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اصفهان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، قزوین، فارس، کردستان، کرمان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، گلستان، گیلان و مازندران جمع‌آوری شده

بود استفاده شد. نمونه‌های برگ‌ی در بهار و تابستان سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری و بر اساس خصوصیات فلور ایران توسط Khatamsaz (1992) مورد شناسایی قرار گرفتند. برای استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌ی استفاده شد. نمونه‌ها بعد از بسته‌بندی و کدگذاری، با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شد و تا زمان استخراج DNA ژنومی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۱۸ جفت آغازگر گزینش شده برای سیب و گلابی (Hokanson et al. 1998; Gianfranceschi et al. 1998; Liebhart et al. 2002; Zietkiewicz et al. 2004) و بر مبنای گزارش (Yamamoto et al. 2004) انجام شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf) مدل MasterCycler-Gradient اجزاء ثابت واکنش PCR شامل ۲۰ نانوگرم DNA، یک واحد آنزیم Taq-DNA پلی‌مراز، ۱۰ پیکومول از هریک از آغازگرهای پیش‌رو و پی‌رو، ۰/۲ میلی‌مول از هریک از dNTPs، همراه با ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۵۰ میلی‌مول KCl و ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl به‌عنوان بافر PCR بود. تفکیک باندهای حاصله ابتدا روی ژل آگاروز سه درصد با ولتاژ ۸۰ ولت و شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر انجام و ژل حاصل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. برای تفکیک دقیق‌تر باندها از تانک الکتروفورز عمودی (DNA Sequencer)، با ژل پلی‌آکریل آمید شش درصد با ولتاژ ۱۵۰۰ ولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر در دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. متعاقباً رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید روی ژل توالی‌یابی توسط نترات نقره و سپس ظهور باندها بوسیله کربنات سدیم انجام شد. با استفاده از اطلاعات آلل‌های پلی‌مورف تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر، محتوای اطلاعات چندشکل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن n تعداد آلل‌ها و p_i و p_j فراوانی‌های i و j امین آلل در جمعیت مورد مطالعه می‌باشند (Nei 1973).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

جدول ۱- گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس ولیک (*Crataegus*) جهت بررسی توسط نشانگر توالی‌های ساده تکراری.

گونه	زیرگونه	منشاء*	کد	سطح پلوئیدی**
<i>C. ambigua</i>	---	قزوین	Ambgh	2n (3x)=51
<i>C. ambigua</i>	---	گیلان	Ambgi	2n (3x)= 51
<i>C. ambigua</i>	---	خراسان شمالی	Ambo	2n (3x)= 51
<i>C. assadii</i>	---	خراسان رضوی	Assko	?
<i>C. assadii</i>	---	خراسان شمالی	Assbo	?
<i>C. atosanguinea</i>	---	کرمان	Atrke	?
<i>C. atosanguinea</i>	---	اصفهان	Atras	?
<i>C. atosanguinea</i>	---	فارس	Atrfa	?
<i>C. azarolus</i>	var. aronia	خراسان شمالی	Arobo	2n (2x) = 34
<i>C. azarolus</i>	var. aronia	خراسان رضوی	Aroma	2n (2x) = 34
<i>C. azarolus</i>	var. aronia	کهگیلویه	Aroya	2n (2x) = 34
<i>C. azarolus</i>	var. aronia	اصفهان	Aroas	2n (2x) = 34
<i>C. azarolus</i>	var. pontica	خراسان رضوی	Ponko	2n (4x)=68
<i>C. azarolus</i>	var. pontica	قزوین	Pongh	2n (4x)= 68
<i>C. curvisepala</i>	---	آذربایجان غربی	Curo	?
<i>C. kurdistanica</i>	---	گلستان	Kurgo	?
<i>C. meyeri</i>	---	آذربایجان شرقی	meyta	2n (3x, 4x)= 51/68
<i>C. meyeri</i>	---	گیلان	Meygi	2n (3x, 4x)= 51/68
<i>C. microphylla</i>	var. dolichocarpa	گیلان	midgi	2n (2x)=34
<i>C. microphylla</i>	var. microphylla	گیلان	mimgi	2n (2x)= 34
<i>C. monogyna</i>	var. lasiocarpa	خراسان شمالی	monbo	2n (2x)=34
<i>C. orientalis</i>	---	کرمانشاه	orike	2n (3x, 4x)= 51/68
<i>C. orientalis</i>	---	آذربایجان شرقی	orita	2n (3x, 4x)= 51/68
<i>C. pentagyna</i>	subsp. pentagyna	گلستان	pengo	2n (2x)= 34
<i>C. pentagyna</i>	subsp. pseudomelanocarpa	گلستان	pdogo	2n (2x)= 34
<i>C. pseudoheterophylla</i>	subsp. pseudoheterophylla	اصفهان	pseas	2n (4x)= 68
<i>C. pseudoheterophylla</i>	subsp. turcomanica	خراسان شمالی	tukbo	2n (3x)= 51
<i>C. pseudoheterophylla</i>	subsp. turkestanica	خراسان شمالی	turbo	2n (3x)= 51
<i>C. pseudoheterophylla</i>	subsp. turkestanica	خراسان رضوی	turma	2n (3x)= 51
<i>C. pseudoheterophylla</i>	subsp. turkestanica	مازندران	turmz	2n (3x)= 51
<i>C. songarica</i>	---	قزوین	songh	2n (4x)= 68
<i>C. szovitsii</i>	---	کردستان	szoko	?

**Poloidy levels: according to the Christensen (1992).

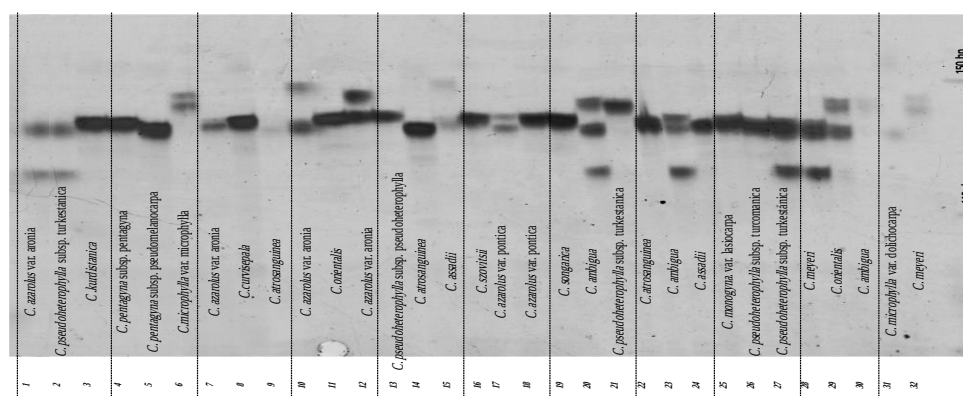
نتایج و بحث

از تعداد ۱۸ جفت آغازگر استفاده شده در این تحقیق، تمامی جفت آغازگرها توانستند باندهایی واضح و واجد چندشکلی ایجاد نمایند که در مجموع ۱۰۰ باند متفاوت توسط این آغازگرها ایجاد و نهایتاً امتیازبندی شدند. تعداد آلل‌ها برای آغازگرهای استفاده شده بین ۳ تا ۲۰ متفاوت بود، که از مجموع آلل‌های ایجاد شده، سهم هر آغازگر به طور میانگین تقریباً ۱۱ عدد محاسبه شد (جدول ۳) (شکل ۱). از آنجایی که میانگین تعداد آلل هر نشانگر توالی‌های ساده تکراری، بیانگر میزان کارایی آن مکان ژنی برای تخمین فاصله‌های ژنتیکی است (Roder et al. 1998)،

تمامی مواد مورد استفاده برای PCR، به جز DNA و آب مقطر، به صورت کیت مستر میکس از شرکت سیناژن تهیه شد. نمره‌دهی بر اساس وجود و عدم وجود باند صورت گرفت. با استفاده از نرم‌افزار GenAlex فاصله ژنتیکی رویشگاه‌های مورد استفاده در گزینش گونه‌ها و زیرگونه‌های ولیک بر اساس شاخص Nei محاسبه شد (Peakall and Smouse 2006). هم‌چنین با استفاده از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)، گروه‌بندی نمونه در فضای دو بعدی انجام شد.

بررسی تعداد آل‌های تکثیر یافته توسط جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان شاخصی از سطح پلوئیدی گونه‌های مختلف ولیک مورد بررسی در این تحقیق مورد استفاده قرار گیرد (جدول ۴). بر اساس الگوی بانندی به دست آمده، در گونه‌های *C. curvisepala*, *C. atrosanguinea*, *C. assadii*, *C. kurdistanica* و *C. szovitsii* سطوح پلوئیدی در منابع مورد گزارش قرار نگرفته و بر اساس اطلاعات حاصل به‌نظر می‌رسد در تمامی گونه‌های فوق حداقل سطح پلوئیدی قابل انتظار $2n$ برابر با $3x$ می‌تواند باشد. در گونه‌های *C. meyeri*, *C. ambigua*, *C. pentagyna* subsp. *C. orientalis*, *C. microphylla* *C. pseudoheterophylla* subsp. *pseudomelanocarpa* *C. pseudoheterophylla* subsp. *turkestanica* و *turcomanica* با منشاء خراسان‌رضوی و در نهایت *C. songarica* سطوح پلوئیدی مورد گزارش توسط Christensen (1992) مورد تایید قرار گرفت (جدول ۴). لیکن در خصوص گونه *C. azorolus* var. *pontica* که در گزارشات، سطح پلوئیدی $3x$ برای آن گزارش شده‌است، آغازگرهای مورد استفاده در همه نمونه‌ها قادر به تکثیر دو آل بودند. اگرچه چنین وضعیتی نمی‌تواند به عنوان وجود سطح پلوئیدی پائین‌تر برای این زیرگونه مورد ملاک قرار گیرد، بنابراین لازم است سطح پلوئیدی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر سیتولوژیک به‌منظور تعیین وضعیت واقعی مورد ارزیابی قرار گیرد.

بر این اساس جایگاه‌های تکثیری با آغازگرهای CH02H11A و CH01H010 از گونه سیب (*Malus domestica* Borkh)، به‌ترتیب با ۲۰ و ۱۹ باند تکثیری توانستند، بیش‌ترین نقش را در بیان تنوع بین گونه‌ها و زیرگونه‌های ولیک داشته باشند (جدول ۳). PIC تنها با در نظر گرفتن باندهای چند شکل در محاسبه، می‌تواند شاخص مناسبی برای برآورد ایجاد و شناسایی تنوع، توسط آغازگر باشد، از این‌رو دو آغازگر مذکور با داشتن بیش‌ترین مقدار شاخص تنوع PIC به‌ترتیب با ۹۲ و ۹۱ درصد توانستند تنوع قابل توجهی را در بین گونه‌ها و زیرگونه‌های ولیک شناسایی نماید. از طرفی سه آغازگر گلابی و گلابی ژاپنی شامل BGT23B، KA14 و KA16 (جدول ۳) استفاده شده در این تحقیق، کارآیی مطلوبی در تکثیر باندهای ژنوم گونه‌های مختلف ولیک نشان دادند که در یک بررسی مقدماتی بیانگر انتقال‌پذیری مطلوب آغازگرهای هر دو گونه سیب و گلابی به جنس ولیک (*Crataegus*) است. در بین گونه‌های مختلف درختان میوه دانه‌دار، دو گونه سیب و گلابی به‌ترتیب دارای بیش‌ترین مکان‌های ژنی جداسازی و شناخته شده توالی‌های ساده تکراری بوده و بر همین اساس به دلیل انتقال‌پذیری آغازگرهای توالی‌های ساده تکراری در بین گونه‌های نزدیک از نظر روابط خویشاوندی، در سایر اعضای این زیرخانواده نظیر درخت به (Khoramdel Azad et al. 2013; Yamamoto et al. 2004) و یا سایر گونه‌های علفی نظیر گندم (Röder et al. 1995) و چوبی نظیر کیوی (Weising et al. 1996) مورد استفاده قرار گرفته‌اند.



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از تکثیر لوکوس SSR در گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف جنس ولیک (*Crataegus*) در رویشگاه‌های مختلف این جنس در ایران با استفاده از جفت آغازگر CH02B10.

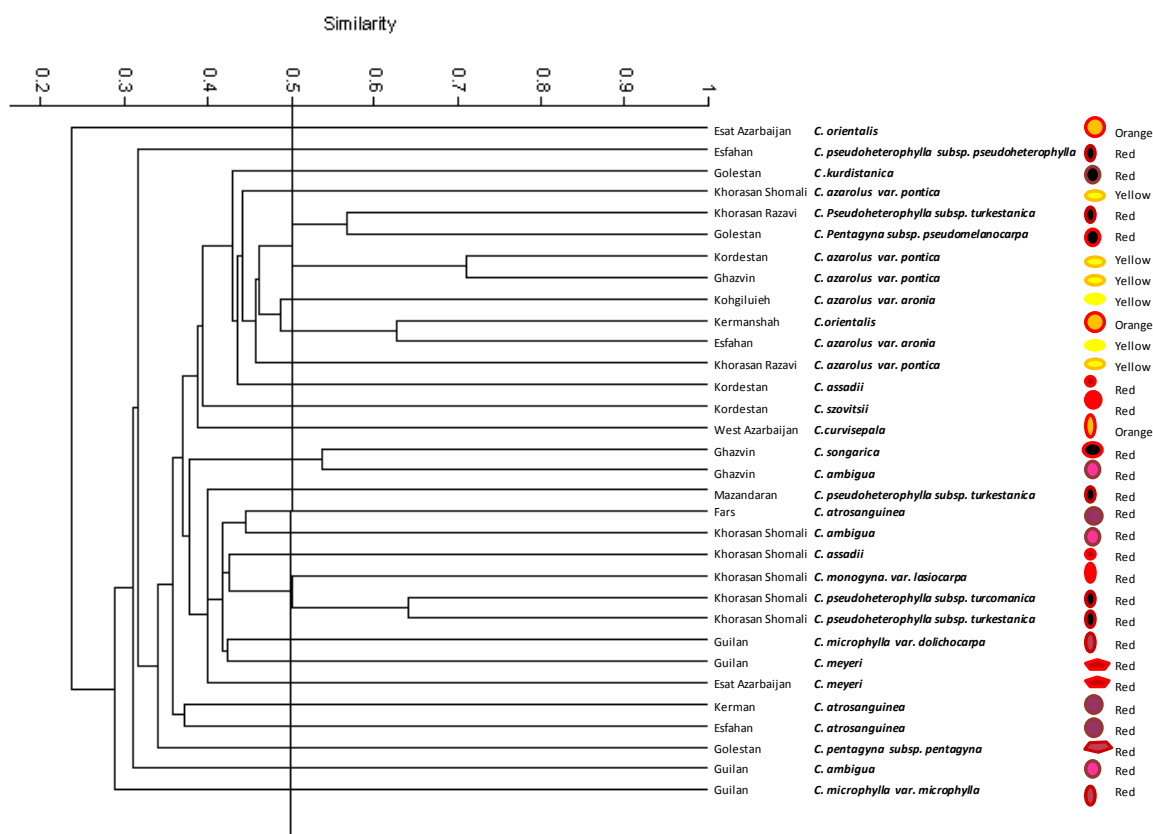
جدول ۳- مقایسه کارآیی جفت آغازگرهای توالی‌های ساده تکراری مورد استفاده برای بررسی تنوع گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس ولیک (*Crataegus spp.*)

شماره	جفت آغازگر	توالی‌ها (5'→3')		منبع	گونه	دمای اتصال
		آغازگرهای پی‌رو	آغازگرهای پیش‌رو			
۱	CH01F02	CTG GTTT GTT TTC CTC CAG C	ACC ACA TTA GAG CAG TTG AGG	Gianfranceschi et al.(1998)	سیب	۵۴ °C
۲	CH01H01	GGA GTG GGT TTG AGA AGG TT	GAA AGA CTT GCA GTG GGA GC	Gianfranceschi et al.(1998)	سیب	۶۰ °C
۳	CH01H010	AGG AGG GAT TGT TTG TGC AC	TGC AAA GAT AGG TAG ATA TAT GCC A	Gianfranceschi et al.(1998)	سیب	۵۸ °C
۴	CH02B10	CAA GTG GCT TCG GAT AGT TG	CAA GGA AAT CAT CAA AGA TTC AAG	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۴ °C
۵	CH02C02A	TAGGGCACACTTGCTGGTC	CTT CAA GTT CAG CAT CAA GACA A	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۶ °C
۶	CH06C09	AGA AGC AGC AGA GGA GGA TG	TTA TGT ACC AAC TTT GCT AAC CTC	Libhard et al.(2002)	سیب	۶۲ °C
۷	CH02D08	GCA GAC ACT CAC TCA CTA TCT CTC	TCC AAA ATG GCG TAC CTC TC	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۵ °C
۸	CH02H11A	CTG TTT GAA CCG CTT CCT TC	CGT GGC ATG CCT ATC ATT TG	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۵ °C
۹	CH03G06	TCA CAG AGA ATC ACA AGG TGG A	ATC CCA CAG CTT CTG TTT TTG	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۵ °C
۱۰	CH04E03	TGC ATG TCT GTC TCC TCC AT	TTG AAG ATG TTT GGC TGT GC	Libhard et al.(2002)	سیب	۵۵ °C
۱۱	CH05D04	TCC GAA GGT ATG CTT CGA TT	ACT TGT GAG CCG TGA GAG GT	Guilford et al. (1997)	سیب	۵۵ °C
۱۲	CH05D11	GAG AAG GTC GTA CAT TCC TCA A	CAC AAC CTG ATA TCC GGG AC	Libhard et al.(2002)	سیب	۶۰ °C
۱۳	BGT23B	ACT CAG CCT TTT TTT CCC AC	CAC ATT CAA AGA TTA AGA T	Yamamoto et al. (2004)	گل‌ابی	۵۰ °C
۱۴	GD142	GGA ACC TAC GAC AGC AAA GTT ACA	GGC ACC CAA GCC CCT AA	Hokanson et al. (1998)	سیب	۵۶ °C
۱۵	GD147	GTT TAA ACC GCT GCT GCT GAA C	TCC CGC CAT TTC TCT GC	Hokanson et al. (1998)	سیب	۶۰ °C
۱۶	GD96	GCC AGC CCT CTA TGG TTC CAG A	CGG CGG AAA GCA ATC ACCT	Hokanson et al. (1998)	سیب	۶۰ °C
۱۷	KA14	ATG GCA AGG GAG ATT ATT AG	TCA TTG TAG CAT TTT TAT TTT T	Yamamoto et al. (2004)	گل‌ابی	۵۵ °C
۱۸	KA16	AAC GAG AAC GAC GAG CG	GCC AGC GAA CTC AAA TCT	Yamamoto et al. (2004)	گل‌ابی	۵۰ °C

جدول ۴- تعداد آلل‌های تکثیر یافته هرلوکوس توسط آغازگرهای SSR در گونه‌های جنس ولیک (*Crataegus* spp.) جهت تعیین حداقل سطح پلوئیدی ممکن.

حد اقل پلوئیدی			SSR لوکوس																			پلوئیدی گزارش شده*	منشاء	زیرگونه	گونه											
KA16	KA14	GD96	GD147	GD142	BGT23B	CH05D11	CH05D04	CH04E03	CH03G06	CH02H1A	CH02D0C	CH06C09	CH02C02A	CH02B10	CH01H010	CH01H01	CH01F02																			
3x	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۱	۱	۱	۳	۱	۳	۰	2n (3x)=۵۱	Qaz	---	C. ambigua															
3x	۰	۲	۳	۲	۰	۱	۲	۲	۰	۲	۲	۱	۰	۱	۰	۰	۰	2n (3x)=۵۱	Gul	---	C. ambigua															
3x	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۳	۲	۲	۲	2n (3x)=۵۱	Khs	---	C. ambigua															
3x	۲	۲	۲	۳	۰	۱	۲	۰	۱	۳	۲	۲	۰	۲	۱	۲	۰	?	Kor	---	C. assadii															
3x	۲	۲	۲	۳	۰	۲	۲	۱	۲	۳	۱	۳	۲	۱	۳	۲	۲	?	Khs	---	C. assadii															
2x	۲	۰	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۱	۲	۲	۰	۱	۲	۱	۱	?	Ker	---	C. atrosanguinea															
3x	۲	۳	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۰	۲	۲	۱	۰	۱	۲	۲	۰	?	Esf	---	C. atrosanguinea															
3x	۲	۲	۳	۳	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	?	Far	---	C. atrosanguinea															
3x	۰	۲	۲	۳	۱	۰	۲	۰	۱	۰	۳	۱	۱	۱	۱	۰	۰	2n (2x) = ۳۴	Khs	var. aronia	C. azarolus															
3x	۲	۲	۲	۲	۰	۱	۳	۱	۳	۱	۱	۱	۰	۳	۰	۰	۰	2n (2x) = ۳۴	Khr	var. aronia	C. azarolus															
3x	۲	۰	۳	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۳	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۱	2n (2x) = ۳۴	Kbo	var. aronia	C. azarolus															
3x	۱	۲	۰	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱	۱	۳	۲	۲	۲	۲	۲	2n (2x) = ۳۴	Esf	var. aronia	C. azarolus															
3x	۲	۳	۳	۳	۰	۱	۳	۱	۳	۲	۱	۱	۲	۲	۳	۲	۳	2n (4x)=۶۸	Kor	var. pontica	C. azarolus															
3x	۲	۲	۲	۳	۱	۲	۲	۲	۳	۲	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۲	2n (4x)=۶۸	Qaz	var. pontica	C. azarolus															
3x	۰	۳	۲	۰	۱	۱	۰	۰	۲	۲	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	?	Azg	---	C. curvisepala															
3x	۱	۲	۲	۳	۱	۲	۲	۱	۳	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۳	?	Gol	---	C. kurdistanica															
3x	۲	۲	۲	۲	۰	۱	۰	۲	۰	۲	۲	۱	۱	۳	۰	۰	۰	2n (3x, 4x)=۵۱ , ۶۸	Azs	---	C. meyeri															
2x	۰	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۲	۰	۱	۲	۱	۱	۲	۲	۰	۰	2n (3x, 4x)=۵۱ , ۶۸	Gul	---	C. meyeri															
2x	۰	۱	۲	۲	۱	۰	۲	۰	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۲	۰	۰	2n (2x)=۳۴	Gul	var. dolichocarpa	C. microphylla															
2x	۰	۲	۲	۲	۰	۱	۲	۱	۲	۰	۰	۲	۰	۲	۲	۰	۰	2n (2x)=۳۴	Gul	var. microphylla	C. microphylla															
3x	۲	۳	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۴	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۱	2n (2x)=۳۴	Khs	var. lasiocarpa	C. monogyna.															
3x	۱	۰	۳	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۳	۲	۱	۱	۱	۲	2n (3x, 4x)=۵۱ , ۶۸	Kes	---	C. orientalis															
3x	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۳	۰	۰	2n (3x, 4x)=۵۱ , ۶۸	Azs	---	C. orientalis															
3x	۲	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۲	۰	۰	۳	۲	۳	2n (2x)=۳۴	Gol	subsp. Pentagyna	C. pentagyna															
2x	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۱	۰	۲	۲	۱	۰	۱	۲	۲	۲	2n (2x)=۳۴	Gol	subsp. pseudomelanocarpa	C. pentagyna															
3x	۲	۲	۲	۰	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۳	۲	۱	۲	۲	۰	2n (4x)=۶۸	Esf	subsp. pseudoheterophylla	C. pseudoheterophylla															
3x	۲	۳	۲	۲	۱	۲	۳	۲	۱	۲	۲	۳	۲	۲	۳	۲	۱	2n (3x)=۵۱	Khs	subsp. turcomanica	C. pseudoheterophylla															
4x	۱	۲	۲	۰	۲	۱	۱	۲	۴	۱	۱	۲	۲	۳	۳	۲	۱	2n (3x)=۵۱	Khs	subsp. turkestanica	C. pseudoheterophylla															
3x	۲	۲	۳	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۲	۱	۳	۳	2n (3x)=۵۱	Khr	subsp. turkestanica	C. pseudoheterophylla															
2x	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۰	۲	۲	۲	۲	۰	۱	۲	۲	۱	2n (3x)=۵۱	Maz	subsp. turkestanica	C. pseudoheterophylla															
3x	۲	۲	۲	۳	۱	۰	۲	۱	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۳	۲	2n (4x)=۶۸	Qaz	---	C. songarica															
3x	۱	۲	۰	۰	۱	۱	۲	۰	۳	۲	۰	۲	۰	۲	۱	۱	۳	?	Kor	---	C. szovitsii															

*Poloidy levels: according to the Christensen (1992).



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس ولیک (*Crataegus*) بر اساس روش UPGMA

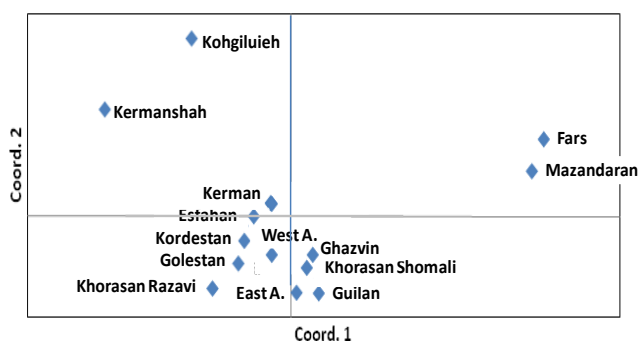
فاصله ژنتیکی زیاد بین رویشگاه‌های کرمانشاه و مازندران می‌تواند ناشی از اختلاط کم مواد ژنتیکی این دو رویشگاه به دلیل فاصله زیاد جغرافیایی آن‌ها بوده و یا به دلیل گونه‌های متعدد جنس ولیک در کشور و هم‌پوشانی محدود گونه‌های جمع‌آوری شده در رویشگاه‌های مختلف آن باشد. البته تعداد نسبتاً کم نمونه‌های بررسی شده در برابر تنوع بسیارگسترده و فراوان جنس ولیک در کشور یکی از دلایلی است که در این تحقیق فاصله ژنتیکی بین زیستگاه‌های گونه‌ها و زیرگونه‌های این جنس با دقت زیادی مشخص نشده است. بررسی‌ها نشان داده است که در گیاهان دگرگشن، سطح تنوع ژنتیکی بسیار بیشتر از گیاهان خودگشن و گیاهان دارای ازدیاد غیر جنسی می‌باشد. انتقال دانه کرده به وسیله حشرات امکان ایجاد ژنوتیپ‌های جدید و در نتیجه تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها را افزایش داده و در نتیجه منجر به فاصله ژنتیکی قابل توجه ژنوتیپ‌های حاصل از گرده‌افشانی آزاد خواهد شد (Shi et al. 2008). اگرچه به دلیل محدود بودن تحقیقات در رابطه با گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس ولیک،

اطلاعات زیادی در رابطه با میزان خودسازگاری - خودناسازگاری کرده در اعضای این جنس وجود ندارد، لیکن برخی بررسی‌ها نشان‌دهنده وجود خودناسازگاری نیمه‌کامل در گونه *C. monogyna* بوده است (Raspé and Kohn 2002). همچنین در دو گونه دیپلوئید *C. punctata* و *C. monogyna* خودناسازگاری قابل توجهی مشاهده شده است (Donovan 1981; Love and Feigen 1978). علاوه بر این، اعضای این جنس دارای سازگاری کرده بین گونه‌های مختلف بوده که این امر موجب تنوع قابل توجه و تولید دورگ‌های بین گونه‌ای نامحدودی با توجه به تعدد گونه‌ها و همپوشانی رویشگاه‌ها در کل نیمکره شمالی (Phipps et al. 2003) و از جمله فلات ایران (Sabeti 1996) خواهد شد.

تجزیه کلاستر انجام شده بر روی ژنوتیپ-رویشگاه‌ها با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد و روش UPGMA بیانگر این بود که اکثر ژنوتیپ‌های نزدیک به هم، از نظر جغرافیایی دارای شباهت‌های نسبتاً بالایی از نظر ژنوتیپی نیز بودند (شکل ۲). به طوری که اکثر ژنوتیپ‌های قرار گرفته در یک خوشه از نظر بعد مکانی به هم

اینکه تعداد مولفه‌های کم توجیه‌کننده نیمی از تغییرات کل می‌باشد، آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی کمی را تحت پوشش قرار داده و پراکنش مناسبی در قسمت‌های مختلف ژنوم ندارند. در بررسی (Khoramdel Azad et al. 2013) آغازگرهای نشانگر توالی ساده تکراری سیب و گلابی به‌طور مناسبی به‌گونه به (*Cydonia oblonga* Mill.) منتقل و قادر به تفکیک جمعیت‌های مختلف این گونه منشأ گرفته از مناطق مختلف کشور شدند. بر اساس مقایسه نتایج حاصل از استفاده از آغازگرهای نشانگر توالی ساده تکراری سیب و گلابی در دو درخت به و ولیک، به‌نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی غیرقابل مقایسه ولیک با گونه خودگشن به که دارای سطح تنوع به مراتب پائین‌تری می‌باشد سبب بروز عدم پوشش کامل ژنوم توسط آغازگرهای فوق شده‌است. اینکه سه مولفه اول در مجموع تنها ۵۷/۷۵ درصد از کل واریانس را توجیه نموده می‌تواند به سطوح متعدد پلوئیدی در گونه‌های مختلف ولیک وابسته باشد. بنابراین بر اساس مطالب فوق لزوم استفاده از آغازگرهای بیشتر که محدوده گسترده‌تری از ژنوم گونه‌ها و زیرگونه‌های این جنس را مورد پوشش قرار دهند، برای بررسی‌های تکمیلی ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به تنوع گسترده گونه‌های مختلف متعلق به زیرخانواده دانه‌داران در خانواده گلسرخیان در کشور (Gharaghani et al. 2015) برنامه‌های متعددی برای جمع‌آوری، ارزیابی و گزینش انواع برتر آن‌ها در کنار سایر درختان میوه معتدله و سردسیری، انجام گرفته است (Abdollahi et al. 2010).

Principal Coordinates (PCoA)



شکل ۳- دی پلات تجزیه جمعیت‌های گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف جنس ولیک (*Crataegus* sp.) مورد بررسی به مختصات اصلی با استفاده از ماتریس تشابه Nei.

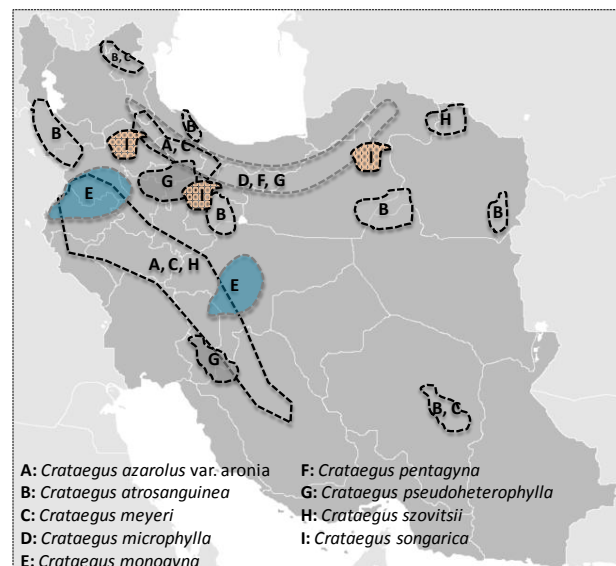
نزدیک‌تر بوده و گاهی در یک استان واقع شده بودند. از طرفی خوشه‌بندی انجام گرفته گونه‌ها و زیرگونه‌های دارای میوه زرد و نارنجی را به‌طور کامل در خوشه بالائی قرار داد. این در حالی است که گونه‌ها و زیرگونه‌های دارای میوه قرمز، قرمز تیره و قرمز ارغوانی عمدتاً در خوشه پائینی و ندرتاً در خوشه فوقانی قرار گرفتند (شکل ۲). در بررسی (Beigmohamadi and Rahmani 2011) با استفاده از نشانگر رپید (RAPDs) روی شماری از گونه‌های ولیک شمال غرب ایران، این نشانگر توانست گونه‌های مورد بررسی را در دو خوشه اصلی شامل گونه‌های دارای میوه قرمز و میوه زرد تفکیک کند که بر این اساس به نظر می‌رسد یکی از خصوصیات بارز متمایز کننده گونه‌ها رنگ میوه است که با سهولت بیش‌تری توسط نشانگرهای مولکولی مورد تمایز قرار می‌گیرد. از طرفی، تبادل سنتی ژرم‌پلاسم بین نقاط و استان‌های مختلف ایران، همچنین فعالیت حشرات و انتقال دانه گرده و نحوه تکثیر ولیک می‌تواند عامل اختلاط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف سایر نقاط و تنوع بالای ژنتیکی باشد. با چشم‌پوشی از گونه *C. orientalis* از استان آذربایجان شرقی که به تنهایی خوشه‌ای مجزا را تشکیل داد، گونه‌های *C. pseudoheterophylla* و *C. microphylla* به‌ترتیب از بیش‌ترین فاصله ژنتیکی برخوردار بودند. در این بررسی نتایج تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه کلاستر تا حد زیادی با همدیگر همخوانی داشتند، هرچند محاسبه ماتریس تشابه در دو روش مذکور متفاوت بود، اما با این حال هر دو روش بیانگر تنوع بالای ژنتیکی و پراکنش زیاد ژنوتیپ‌ها در جغرافیای ایران می‌باشند.

در این تحقیق با استفاده از فاصله ژنتیکی Nei و روش تجزیه به مختصات اصلی، موقعیت‌های جغرافیایی جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ترسیم شد (شکل ۳). در این مقایسه، سه مولفه اول در مجموع ۵۷/۷۵ درصد از کل واریانس را توجیه کردند که از این مقدار سهم دو مولفه اول به‌ترتیب ۲۶/۱۵ و ۱۸/۳۸ درصد بود. در تجزیه به مختصات اصلی، زمانی که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی مولفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به‌طور صحیح انتخاب نشده و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به‌خوبی جدا کنند (Siahsar et al. 2010). در این پژوهش به‌دلیل

متاسفانه علی‌رغم پتانسیل‌های بالقوه این گونه، بخش بسیار محدودی از این پتانسیل‌ها به‌صورت بالفعل مورد استفاده قرار گرفته است. در این رابطه می‌توان به استفاده از پایه ولیک به‌عنوان پایه به در نهالستان‌های استان اصفهان اشاره نمود که عدم شناسایی گونه مورد استفاده خود نشانه‌ای از شدت عدم توجه به گونه فوق در کشور بوده است. بدون شک، به‌منظور گذر از این مرحله و دستیابی و سپس ارزیابی منابع ژنتیکی ارزشمند این گونه در کشور، کسب اطلاعاتی مقدماتی در رابطه با شدت تنوع، زیستگاه‌ها و خصوصیات دقیق مورفولوژیک و گیاه‌شناختی گونه‌ها و زیرگونه‌ها می‌تواند در تنظیم تمرکز فعالیت‌ها در زیستگاه‌های پراهمیت‌تر و انتخاب تعداد استان‌های درگیر و گونه‌های مورد نظر از هر رویشگاه دارای اهمیت باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌های ولیک مورد مطالعه با دیگر گونه‌های نزدیک نظیر درخت به قابل مقایسه نیست. لذا این چنین جمع‌بندی می‌شود که ضمن اهمیت آغاز برنامه شناسایی و جمع‌آوری ژرم‌پلاسم ولیک کشور به‌منظور استفاده در برنامه‌های گزینش و به‌نژادی، لازم است تعداد ژنوتیپ‌های مورد نظر به‌طور قابل توجهی به‌منظور دستیابی به نمونه‌هایی با پوشش کامل گونه‌ها، زیرگونه‌ها و ژنوتیپ‌های مناطق افزایش داده شود. برای این منظور، شناخت گونه‌ها توسط مجموعه درگیر و هدفمندتر نمودن برنامه جمع‌آوری و در نهایت استفاده از یک برنامه دقیق بررسی تنوع با استفاده از تعداد مناسبی آغازگر به‌منظور پوشش نسبتاً کامل‌تری از ژنوم ژرم‌پلاسم جمع‌آوری شده ضروری است. علاوه بر لزوم برنامه جمع‌آوری و ارزیابی، بررسی سطح پلوییدی، امکان استفاده از پایه‌های در دسترس نظیر گونه‌های نزدیک برای پیوند و حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم جمع‌آوری شده ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

Abdollahi H, Atashkar D, Alizadeh A (2012) Comparison of dwarfing effects of two hawthorn and quince rootstocks on several commercial pear cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science 43:53-63. (In Farsi).



شکل ۴- پراکنش گونه‌های ذکر شده جنس ولیک (*Crataegus*) در ایران توسط ثابتی (Sabeti 1976).

این روند نه تنها سبب معرفی ارقام جدیدی از میان ژنوتیپ‌ها و دانهال‌های بذری حاصل از برنامه‌های فوق شده‌است، بلکه به‌عنوان زیربنایی برای اصلاح ارقام جدید به‌صورت هدفمندتر با استفاده از دورگ‌گیری در بین والدین دارای صفات مشخص محسوب می‌شود. در این بین گونه ولیک در بررسی‌های میدانی نشان‌دهنده که در مقایسه با دیگر درختان میوه دانه‌دار دارای صفات شاخصی در رابطه با تحمل به خشکی، شوری آب و خاک در محدوده‌های غیرقابل تحمل برای دیگر اعضای زیرخانواده دانه‌داران می‌باشد. علاوه بر اینکه ولیک به‌عنوان یک پایه معمول برای درخت به محسوب می‌شود (Mehabipour et al. 2010) سبب پاکوتاهی قابل توجه در درخت گلابی نیز خواهد شد (Abdollahi et al. 2012). با توجه به محدودیت‌های اخیر در توسعه کشت درختان میوه دانه‌دار در کشور و ورود به محدوده‌های تنش‌زای خاک برای احداث باغ‌های این گروه از درختان میوه، استفاده از پایه ولیک می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مطلوب و مستعد برای تحقیقات بیش‌تر مد نظر قرار گیرد.

Abdollahi H, Hassani D, Imani A, Bouzari N, Hajnajari H, Hossein Ava S, Damyar S, Zeinanloo AA, Nejatian MA, Tabatabaei SZ (2010) Genetic resources of the fruit trees in Iran. In: Proceedings of 11th Genetic Congress. Iran, Shahid Beheshti University, 10-15. (In Farsi).

- Akbari Bisheh H, Abedi B, Karimi MR, Abdollahi H (2014) Investigation of genetic diversity in some species of hawthorn (*Crataegus* spp.) in the North and East of Iran by morphological traits. *International Journal of Advanced Life Sciences* 7:276-281.
- Arjmandi AA, Nazeri V, Ejtehadi H, Joharchi MR (2009) Review of the genus *Crataegus* in the North East and East of Iran. *Rostaniha* 10:1-12.
- Beigmohamadi M, Rahmani F (2011) Genetic variation in hawthorn (*Crataegus* spp.) using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology* 10:7131-7135.
- Christensen K (1992) Revision of *Crataegus* sect. *Crataegus* and nothosect. *Crataeguineae* (Rosaceae-Maloideae) in the old world. *Systematic Botany Monographs* 35:1-199.
- Christensen K, Zielinski J (2008) Notes on the genus *Crataegus* (Rosaceae-Pyrneae) in southern Europe, the Crimea and western Asia. *Nordic Journal of Botany* 26:344-360.
- Donmez AA (2009) *Crataegus zarrei* (Rosaceae), a new species from Iran. *Annals of Botany Fennici* 46:439-442.
- Donovan DM (1981) Hybrid populations in some native trees raised from seed. *International Plant Propagators Society* 31:381-383.
- Gharaghani A, Solhjoo S, Oraguzie N (2015) A review of genetic resources of pome fruits in Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution* 68:22-28.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of Apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96:1069-1076.
- Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF, McFerson JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics* 97:671-683.
- Jalili A, Jamzad Z (1999) Red data book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
- Khatamsaz M (1992) Rosaceae. In: Assadi M, Khatamsaz M, Maassoumi AA (Eds.) *Flora of Iran*. No. 6. Research Institute Forests and Rangelands, Tehran, Iran, 88-142. (In Farsi).
- Khorramdel Azad M, Nasiri J, Abdollahi H (2013) Genetic diversity of selected Iranian quinces using SSRs from apples and pears. *Biochemical Genetics* 51:426-442.
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) *Molecular Breeding* 10:217-241.
- Love R, Feigen M (1978) Interspecific hybridization between native and naturalized *Crataegus* (Rosaceae) in Western Oregon. *Madroño* 25:211-217.
- Manee A (1994) Pear and quince, and their growing. Iran Technical Publication Company. Tehran, Iran. (In Farsi).
- Mehrabipour S, Abdollahi H, Hassanzadeh N, Ghasemi 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 Farsi).
- Mozafarian VA (1994) Plant taxonomy. Danesh Emrooz, Tehran. Iran. (In Farsi).
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70:3321-3323.
- Parsa A (1948) *Crataegus* L genus In: Parsa A (Ed.) *Flore de l'Iran*, Volume 2. Tehran University Press, Tehran, Iran. 550-555. (In French).
- Peakall R, Smouse, PE (2006) GENALEX 6, genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Phipps JB, O'Kennon RJ, Lance RW (2003) Hawthorns and medlars. Royal Horticultural Society, Cambridge, UK.
- Raspé O, Kohn JR (2002) S-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae). *Heredity* 88:458-465.
- Rechinger K (1989). Fifty years of botanical research In: Tan K (Ed.) *Flora Iranica* area, plant taxonomy, phytogeography and related subjects. The Davis & Hedge Festschrift, Edinburgh, UK, 301-349.
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Gamal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. *Molecular Genome and Genetic* 246:327-333.
- Sabeti H (1996) Iranian forests, trees and shrubs. Yazd University Publication, Yazd, Iran. (In Farsi).
- Sharifnia F, Seyedipour N, Salimpour F (2009) Biosystematic study of four species of *Crataegus* L. in central of Iran. *Biology Journal* 1:45-52. (In Farsi).
- Shi W, Yang CF, Chen JM, Guo YH (2008) Genetic variation among wild and cultivated populations of the Chinese medicinal plant *Coptis chinensis* (Ranunculaceae). *Plant Biology* 10:485-491.
- Siahsar BA, Allahdoo M, Shahsavand H (2010) Evaluation of genetic diversity of Triticum, Triticale and wheat lines through RAPD and ISJ markers. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 41:555-568. (In Farsi).
- Weising K, Fung RWM, Keeling DJ, Atkinson RG, Gardner RC (1996) Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis*. *Molecular Breeding* 2:117-131.
- Yamamoto T, Kimura T, Soejima J, Sanada T, Ban Y, Hayashi T (2004). Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science* 54:239-244.
- Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome* 20:178-183.