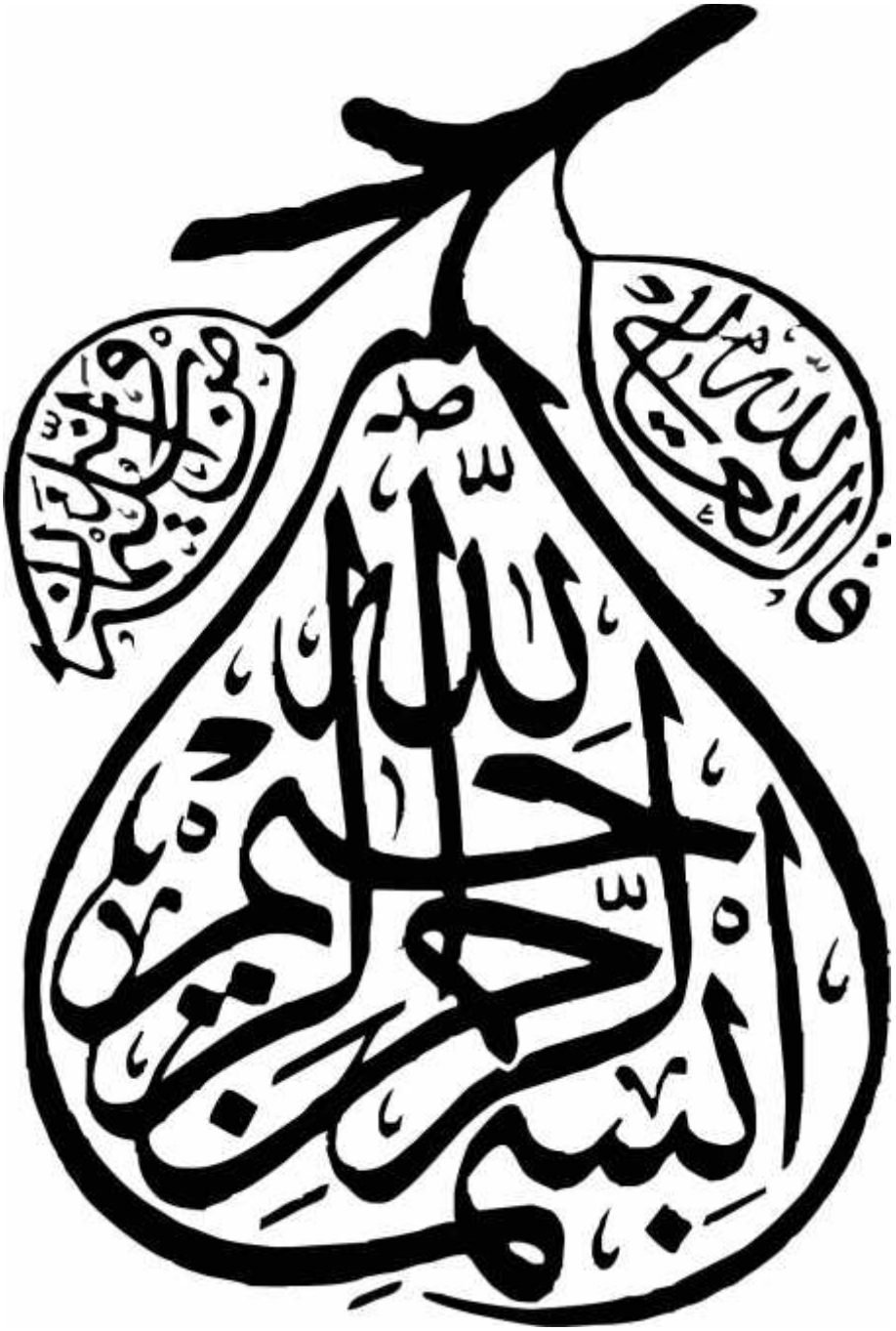
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه علوم باغبانی

(فیزیولوژی و اصلاح میوه)

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی ذغال اخته (*Cornus mas* L.) در استان آذربایجان شرقی (منطقه ارسباران) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی

از:

حمید حسن پور

استادان راهنما:

دکتر یوسف حمیداوغلی

دکتر حبیب‌الله سمیع زاده لاهیجی

آذر ۱۳۹۱

اگر در خور تقدیم باشد به رسم ادب تقدیم به:

آستان حقیقت و آنان که وصالش را می‌جویند.

و تقدیم به:

سایبان سرم پدر
باغبان دلم مادر
همراه ابدیم همسر
ستارگان نورانی آسمان زندگی
برادر و خواهر

عزیزانی که زندگی در کنار آن‌ها افتخار من است.

سپاسگزاری

من به سرچشمه خورشید نه خود بردم راه ذره‌ای بودم مهر تو مرا بالا برد

سپاس به پیشگاه حضرت دوست که هر چه داریم از اوست.

با سپاس فراوان به درگاه ایزد منان که با لطف و عنایت بیکران خود، توفیق انجام این پژوهش را به من عطا نمود. اینک، بر خود واجب می‌دانم از استادان بزرگوارم جناب آقای دکتر یوسف حمیداوغلی و دکتر حبیب الله سمیع زاده که منت گذاشته و در مقام استاد راهنما با ارائه نظرات ارزشمند خودشان، لحظه به لحظه به استوار شدن قدم‌های من در این راه کمک نمودند، بی نهایت سپاسگزارم. همچنین بر خود وظیفه می‌دانم از زحمات بی‌دریغ استادان گرانقدر گروه علوم باغبانی که همیشه مرا از راهنمایی‌های دلسوزانه خویش بهره‌مند ساخته‌اند و با رهنمودهای ارزنده خویش، مرا مورد لطف قرار دادند، تشکر و قدردانی نمایم. از پدر و مادر عزیزم که چه در مدت انجام این پژوهش و چه در سایر مراحل زندگی، همواره پشتیبان من بودند، بی‌نهایت سپاسگزاری می‌نمایم. هم‌چنین از همسر مهربانم که در طول اجرای این پژوهش همیشه در کنار من بوده، نهایت سپاس و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر ذبیح‌الله نعمتی که در طول مراحل مختلف انجام این پایان‌نامه کمک‌های ارزنده خودشان را از بنده دریغ ننمودند و بدون حتم اتمام این مهم بدون همکاری و همیاری ایشان امکان‌پذیر نبود، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم. از مسئولین آزمایشگاه علوم باغبانی و ژنومیکس که نهایت همراهی و کمک را در مدت انجام این پایان نامه با اینجانب داشتند، سپاسگزارم. هم‌چنین از کلیه دوستان و همکلاسی‌های عزیز که به نحوی در انجام پایان‌نامه بنده را یاری نمودند، بسیار سپاسگزارم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده فارسی ..... ذ
چکیده انگلیسی ..... ر
مقدمه ۲

فصل اول- کلیات و بررسی منابع

۱-۱- تاریخچه ۵
۱-۲- رده‌بندی ۵
۱-۳- مروری بر جنس Cornus ۵
۱-۴- گونه‌های خوراکی جنس Cornus ۶
۱-۵- گونه C.mas یا ذغال‌اخته ۷
۱-۶- تولید و عملکرد ۸
۱-۷- منشاء و پراکنش ۹
۱-۸- مورفولوژی ذغال‌اخته ۱۰
۱-۸-۱- گل ۱۰
۱-۸-۲- دانه‌گرده ۱۰
۱-۸-۳- برگ ۱۱
۱-۸-۴- میوه ۱۱
۱-۹- تشکیل میوه ۱۲
۱-۱۰- ترکیب غذایی میوه ۱۳
۱-۱۱- ارقام ذغال‌اخته ۱۳
۱-۱۲- نیاز آب و هوایی ۱۶
۱-۱۳- اهمیت و کاربرد ۱۷
۱-۱۴- ازدیاد ۱۹
۱-۱۴-۱- بذر ۱۹
۱-۱۴-۲- پیوند ۱۹
۱-۱۴-۳- قلمه ۲۰
۱-۱۴-۴- خوابانیدن ۲۰
۱-۱۴-۵- ریزازدیادی ۲۰
۱-۱۵- خصوصیات فیزیکوشیمیایی میوه ۲۱
۱-۱۵-۱- ویتامین ث ۲۲
۱-۱۵-۲- ترکیبات فنلی ۲۳
۱-۱۵-۳- آنتوسیانین‌ها ۲۴
۱-۱۵-۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی ۲۴
۱-۱۶- نشانگرها ۲۶
۱-۱۷- هدف از کاربرد نشانگرها ۲۶

۱-۱۸- انواع نشانگرهای ژنتیکی ۲۶
۱-۱۸-۱- نشانگرهای ریخت‌شناسی (مورفولوژیکی) ۲۶
۱-۱۸-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی ۲۸
۱-۱۸-۳- نشانگرهای پروتئینی ۲۸
۱-۱۸-۴- نشانگرهای DNA ۲۹
۱-۱۹- انواع نشانگرهای DNA ۲۹
۱-۱۹-۱- نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR ۲۹
۱-۱۹-۱-۱- RFLP ۲۹
۱-۱۹-۲- نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۳۱
۱-۱۹-۲-۱- RAPD ۳۰
۱-۱۹-۲-۲-AFLP ۳۰
۱-۱۹-۲-۳- ردیف‌های تکراری ۳۱
۱-۱۹-۲-۴- ماهواره‌ها ۳۱
۱-۱۹-۲-۵- ماهوارک‌ها ۳۲
۱-۲۰- ریزماهواره‌ها (میکروساتلایت‌ها یا SSR) ۳۲
۱-۲۱- چکونگی ایجاد میکروساتلایت‌ها ۳۳
۱-۲۲- خصوصیات نشانگرهای ISSR ۳۳
۱-۲۳- مزایای ریزماهواره‌ها ۳۶
۱-۲۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۳۶
۱-۲۵- اجزای واکنش PCR ۳۶
۱-۲۵-۱- آنزیم ۳۶
۱-۲۵-۲- مخلوط دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) ۳۶
۱-۲۵-۳- DNA الگو ۳۷
۱-۲۵-۴- آغازگرها ۳۷
۱-۲۵-۵- بافرها و کلرید منیزیوم ۳۷
۱-۲۶- الکترفورز ژل آگارز ۳۷
۱-۲۷- مروری بر تحقیقات انجام شده ۳۸
۱-۲۸- اهداف پژوهش ۴۰

فصل دوم- مواد و روشها

۲-۱- جغرافیای عمومی و اقلیم مناطق مورد آزمایش ۴۲
۲-۲- انتخاب مواد گیاهی مورد آزمایش ۴۲
۲-۳- پارامترهای مورد اندازه‌گیری ۴۶
۲-۳-۱- تعداد گل در گل آذین ۴۶
۲-۳-۲- خصوصیات فیزیکوشمیایی ۴۷
۲-۳-۲-۱- شکل میوه(L/D) ۴۷
۲-۳-۲-۲- نسبت گوشت به هسته در میوه ۴۷
۲-۳-۳- خصوصیات شیمیایی میوه ۴۷

۲-۳-۴- خصوصیات برگ ۴۷
۲-۳-۴-۱- شاخص شکل برگ ۴۷
۲-۴- محاسبات آماری داده‌های مورفولوژی ۴۸
۲-۴-۱- تجزیه واریانس ۴۸
۲-۴-۲- ضریب همبستگی فنوتیپی ۴۸
۲-۴-۳- تجزیه به عامل‌ها ۴۸
۲-۴-۴- تجزیه خوشه‌ای ۴۸
۲-۴-۵- تجزیه تابع تشخیص ۴۸
۲-۵- مواد گیاهی برای استخراج DNA ۴۹
۲-۶- روش استخراج DNA ۴۹
۲-۷- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۵۰
۲-۸- رقیق‌سازی DNA ژنومی استخراج شده ۵۱
۲-۹- شرایط واکنش PCR ۵۲
۲-۱۰- آشکارسازی DNA تکثیر شده ۵۲
۲-۱۱- تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری داده‌های مولکولی ۵۴
۲-۱۱-۱- امتیاز دهی باندها ۵۴
۲-۱۱-۲- تجزیه خوشه‌ای ۵۴
۲-۱۱-۳- ضریب همبستگی کوفنتیک ۵۴
۲-۱۱-۴- تجزیه تابع تشخیص ۵۴
۲-۱۱-۵- تجزیه به مختصات اصلی ۵۵
۲-۱۲- معیارهای تنوع ۵۵
۲-۱۲-۱- محتوی اطلاعات چند شکل ۵۵
۲-۱۳- سودمندی نشانگر ۵۶
۲-۱۴- شاخص شانون ۵۶
۲-۱۵- تنوع ژنتیکی Nei ۵۶
۲-۱۶- مطالعات بیوشیمیایی ۵۷
۲-۱۶-۱- اندازه‌گیری فنل‌کل، فلاونوئیدکل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۵۷
۲-۱۶-۱-۱- استخراج از بافت میوه ۵۷
۲-۱۶-۱-۲- تعیین فنل کل ۵۷
۲-۱۶-۱-۳- فلاونوئیدکل ۵۸
۲-۱۶-۱-۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی ۵۹
۲-۱۶-۲- آنتوسیانین کل ۶۰
۲-۱۶-۲-۱- تهیه بافر۱ (pH=۱) ۶۰
۲-۱۶-۲-۲- طرز تهیه بافر ۲ (pH=۴/۵) ۶۰
۲-۱۶-۳- ویتامین ث ۶۱

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیکی ۶۴
۳-۲- میانگین و انحراف معیار صفات اندازه‌گیری شده ۶۴
۳-۳- همبستگی بین صفات ۷۵
۳-۴- تجزیه به عامل‌ها ۷۶
۳-۵- تجزیه خوشه‌ای درختان ذغال‌اخته بر مبنای کلیه صفات اندازه‌گیری شده ۸۲
۳-۶- تجزیه تابع تشخیص ۸۵
۳-۷- تجزیه داده‌های مولکولی ۹۰
۳-۷-۱- تعداد باند مشاهده شده و درصد چندشکلی آغازگرهای ISSR ۹۰
۳-۷-۲- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) ۹۲
۳-۷-۳- تعداد و فراوانی آلل‌ها، تنوع ژنی نی و شاخص شانون ۹۳
۳-۷-۴- فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای ۹۵
۳-۷-۵- تجزیه تابع تشخیص ۹۸
۳-۷-۶- تجزیه به مختصات اصلی ۱۰۰
۳-۸- مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر مولکولی و تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر مورفولوژیکی ۱۰۳
۳-۹- مطالعات بیوشیمیایی ۱۰۴
۳-۹- نتیجه‌گیری کلی ۱۰۸
پیشنهادات ۱۱۰
منابع ۱۱۲

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی موجود در ۱۰۰ گرم میوه ذغال‌اخته ۱۴
جدول ۲-۱- برخی از اطلاعات مربوط به نمونه‌های ذغال‌اخته مورد استفاده در این پژوهش..... ۴۴
جدول ۲-۲- بافر استخراج DNA..... ۵۰
جدول ۲-۳- مقادیر مواد تشکیل دهنده بافر ۱ لیتری TAE ۱۰X (pH=۸-۸/۵)..... ۵۱
جدول ۲-۴- اجزای تشکیل دهنده بافر بارگذاری 6X ۵۱
جدول ۲-۵- مواد مورد نیاز با حجم و غلظت مربوطه جهت انجام واکنش PCR ۵۲
جدول ۲-۶- مشخصات آغازگر ISSR استفاده شده ۵۳
جدول۳-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی بررسی شده درارزیابی تعداد ۱۰۰ درخت ذغال‌اخته..... ۶۴
جدول ۳-۲- میانگین و انحراف معیار صفات اندازه‌گیری شده در درختان ذغال‌اخته استان آذربایجان شرقی (منطقه ارسباران)..... ۶۷
جدول۳-۳- همبستگی بین صفات بررسی شده در درختان ذغال‌اخته..... ۷۷
جدول۳-۴- نتایج تجزیه به عامل‌ها برای کلیه صفات مورد مطالعه در نمونه‌های ذغال‌اخته..... ۷۹
جدول۳-۵- میانگین و انحراف میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای از میانگین کل صفات..... ۸۴
جدول۳-۶- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای..... ۸۶
جدول۳-۷- نسبت توافق قرارگیری نمونه‌های ذغال‌اخته درون گروه‌ها با تابع تشخیص ۸۷
جدول۳-۸- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های ذغال‌اخته..... ۹۱
جدول۳- ۹- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه موثر(EMR)، شاخص نشانگری(MI)، در جایگاه ISSR در نمونه‌های ذغال‌اخته مورد مطالعه..... ۹۳
جدول۳-۱۰- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون در جایگاه ISSR در نمونه‌های ذغال‌اخته مورد مطالعه.. ۹۴
جدول۳-۱۱- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای..... ۹۸
جدول۳-۱۲- نسبت موفقیت نمونه‌های ذغال‌اخته درون گروه‌ها با تابع تشخیص..... ۹۹
جدول۳-۱۳- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۳۳ مولفه اول در نمونه‌های ذغال‌اخته مورد مطالعه..... ۱۰۱
جدول ۳- ۱۴ – محتوی فعالیت آنتی اکسیدانی، فنل کل ، آنتوسیانین کل، فلاونوئید کل و ویتامین ث در میوه‌های ذغال-اخته..... ۱۰۵
جدول ۳-۱۵- همبستگی بین صفات بیوشیمیایی بررسی شده در میوه ذغال‌اخته..... ۱۰۶

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۲-۱- نقشه موقعیت جغرافیایی شهرستان کلیبر و اهر(شهر هوراند) (آمارنامه سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان آذربایجان شرقی، ۱۳۸۱)..... ۴۳
شکل ۲-۲- منحنی و معادله استاندارد فنل کل بر حسب گالیک اسید..... ۵۸
شکل۲-۳- منحنی و معادله استاندارد فلاونوئید کل بر حسب کاتچین..... ۵۹
شکل ۲-۴- منحنی و معادله استاندارد ویتامین ث بر حسب اسکوربیک اسید..... ۶۲
شکل ۳-۱- تصویری از میوه، هسته،برگ و گل درختان ذغال‌اخته منطقه ارسباران..... ۶۶
شکل۳-۲- نمودار پراکنش بر اساس عامل‌های اول (عامل خصوصیات میوه) و دوم (عامل خصوصیات هسته)..... ۸۰
شکل۳-۳- نمودار پراکنش بر اساس عامل‌های اول (عامل خصوصیات میوه) و پنجم (عامل خصوصیات برگ)..... ۸۱
شکل ۳-۴- گروه‌بندی درختان ذغال‌اخته بر اساس صفات مورفولوژی به روش دورترین همسایه‌ها و معیار فاصله اقلیدوسی..... ۸۳
شکل ۳-۵- گروه‌بندی نمونه‌های ذغال‌اخته بر اساس تابع تشخیص..... ۸۸
شکل ۳-۶- الگوی باندی ISSR حاصل از تکثیر نمونه‌های C11-C24 ذغال‌اخته با استفاده از آغازگر UBC815 ..... ۹۰
شکل ۳-۷- دندورگرام ترسیم شده بر اساس روش دورترین همسایه‌ها و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۱۰۰ نوع درخت ذغال‌اخته مورد مطالعه..... ۹۶
شکل ۳-۸- گروه‌بندی نمونه‌های ذغال‌اخته بر اساس تابع تشخیص..... ۱۰۰
شکل ۳-۹- الگوی تنوع ۱۰۰ نوع ذغال‌اخته مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه اصلی..... ۱۰۲

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی ذغال‌اخته (*Cornus mas* L.) در استان آذربایجان‌شرقی (منطقه ارسباران) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی

حمید حسن پور

با وجود سطح زیر کشت گسترده ذغال‌اخته در شمال غرب ایران، توجه چندانی از حیث به‌نژادی، بهره وری باغبانی و اقتصادی به این ریز میوه نشده است. به‌منظور ارزیابی ذغال‌اخته‌های منطقه ارسباران استان آذربایجان‌شرقی، تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورفولوژی نشان داد که تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در همه صفات اندازه‌گیری شده وجود دارد. با توجه به خصوصیات میوه ازجمله وزن میوه، وزن گوشت و.. می‌توان گفت که دو نمونه C26 و C37 دارای ارزش بالاتری نسبت به بقیه نمونه‌های ذغال‌اخته مورد مطالعه هستند. بیشترین ضریب همبستگی مثبت بین وزن میوه با وزن گوشت میوه (۰/۹۹) بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای به روش Complete، نمونه‌های ذغال‌اخته مورد مطالعه را در پنج گروه مجزا قرار داد که به ترتیب ۳۵، ۱۰، ۲۲، ۸ و ۲۵ نمونه در گروه‌ها قرار گرفت. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۷۹ درصد بود. براساس مولفه‌های اصلی پس از چرخش وریماکس شش عامل را که در مجموع ۷۸/۱ درصد از تغییرات بین صفات را توجیه نمودند، استخراج شدند. با استفاده از ۲۰ آغازگر تعداد ۱۷۱ باند چندشکل به‌دست آمد که از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای UBC810، UBC829 و UBC837 با تعداد ۱۲ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای UBC827 و UBC838 با تعداد ۶ باند کمترین تعداد باند را ایجاد نمودند. PIC آغازگرها بین ۰/۳۱۱ تا ۰/۴۹ و MI آنها از ۱/۹۹ تا ۵/۸۳ متغیر بود. تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مولفه اول توانستند مجموعا ۱۰/۶ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه خوشه‌ای به روش Complete، ۱۰۰ نمونه ذغال‌اخته مورد مطالعه را در هفت گروه قرار داد که به ترتیب شامل ۶، ۸، ۲۳، ۲۱، ۸، ۲۱ و ۱۳ نمونه بودند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۹۷ درصد تائید شد. بطور کلی نتایج نشان داد که سطح بالایی از چندشکلی در میان نمونه‌های ذغال‌اخته منطقه ارسباران استان آذربایجان شرقی وجود دارد و می توان از این ذغال‌اخته‌ها برای کارهای اصلاحی و معرفی یک ژنوتیپ برتر استفاده نمود. نتایج مطالعات بیوشیمیایی روی ژنوتیپ‌های برتر انتخاب شده از لحاظ مطالعات مورفولوژیکی نشان داد که مقدار فنل کل در محدوده ۱۰۹۷/۱۹ تا ۲۶۹۵/۷۵ میلی‌گرم گالیک اسید در هر ۱۰۰ گرم بافت میوه بر اساس وزن تر بوده و محتوی فلاونوئید کل در محدوده ۳۲۱/۲۷ تا ۶۶۹ میلی‌گرم کاتچین در هر ۱۰۰ گرم بر اساس وزن تر است. همچنین مشخص گردید که محتوی آنتوسیانین کل در ژنوتیپ‌های ذغال‌اخته مورد بررسی در محدود ۱۰۶/۸۹ تا ۴۴۲/۱۱ میلی‌گرم وزن تر بر اساس سیانیدین ۳- گلوکوزاید بوده و مقدار ویتامین ث در محدوده ۱۸۳/۲۵ تا ۲۹۹/۵ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم بر اساس وزن تر است. همچنین نتایج نشان داد که بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانتی مربوط به ژنوتیپ C24 (۸۲/۳۷ ٪) می‌باشد. مطالعه بیوشیمیایی حاضر اثبات کرد که ژنوتیپ‌های C24 و C27 پتاسیل بالای برای بهبود ارزش غذایی از طریق برنامه‌های اصلاحی دارند.

کلید واژه: ذغال اخته، تجزیه به مولفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، خصوصیات بیوشیمیایی، ضریب همبستگی

Abstract

A study on genetic diversity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) accessions in East Azerbaijan (Arasbaran regions) using morphological and molecular markers.

Hamid Hassanpour

Although the Cornelian cherry is widely grown in the North-Western areas of Iran, it is not recognized as an important fruit crop as are many other fruit species. The genetic variation of 100 accessions of cornelian cherry selected from Arasbaran region of East Azerbaijan province were evaluated by morphological and molecular (ISSR) markers. Analysis of variance of morphological traits showed significant differences ($p < 0.01$) in all of traits. Based on fruit characteristics, C26 and C37 accessions have the highest value in comparison with other accessions. Fruit weight with fruit flesh weight had the highest Coefficient Correlation (0.99). Cluster analysis using Complete, placed the 100 accessions in five different clusters, which include 35, 8, 22, 8 and 25 accessions respectively. The results of the canonical discriminate function analysis using Fisher Linear method showed that the complete method could separate the accessions in 5 clusters with 79 % accuracy. To assess overall diversity patterns among the accessions, the principal components analysis was conducted. The results of the analysis revealed that the first three PC explained 52 % of the total variation. One hundred seventy one polymorphic bands were amplified using 20 primers; the maximum band number (12) was produced by UBC810, UBC829, UBC837 primers and the minimum band number (6) was produced by UBC827 and UBC837. PIC value was varied from 0.311 to 0.49 and MI index was varied from 1.99 to 5.83. Principal Component Analysis of molecular data showed that three first components could explain 10.6 % of total variation. Cluster analysis using Complete, placed 100 accessions in seven groups, include 6, 8, 23, 21, 8, 21 and 13 accessions respectively. Fisher's linear Discriminant Function Analysis confirmed validity clustering analysis with 97 %. In general; the results show that there is high level polymorphism in cornelian cherry accessions in Arasbaran region of East Azerbaijan province. So, these cornelian cherry accessions can be used for futher breeding works.The results of the biochemical studies revealed that The range of ascorbic acid content of genotypes was 183.25–299.5 mg/100 g fresh weight (FW). Genotype C24 had the highest total antioxidant capacity (82.37) and total phenolic (2695.75 mg galic acid per 100 g FW basis). The highest total anthocyanin was observed in C27 genotype (442.11 mg cyanidin-3-glucoside equivalents/100 g FW). This genotype also had the highest total flavonoid (669 mg catechin per 100 g FW basis). The present biochemical study demonstrates the potential of certain cornelian cherry genotypes, notably C24 and C27, for improvement of nutritional value through germplasm enhancement programs.

Key words: *Cornus mas*, cluster Analysis, correlation coefficient, Principal Components Analysis

مقدمه

مقدمه

ایران به دلیل گستردگی، تنوع آب و هوا، خاک و سایر مواهب طبیعی امکانات بالقوه بسیار زیادی در عرصه منابع طبیعی و ژرم پلاسم‌های گیاهی دارد که با دست‌یابی به اطاعات کافی و درک استعدادهای نهفته در آن می‌توان با برنامه-های دقیق و آگاهانه در جهت حفظ، احیاء، گسترش و بهره‌برداری عملی و بهینه از این استعدادها گام برداشت. لازم است در کنار برنامه‌ریزی جهت تامین نیازهای داخلی در اندیشه صدور بیش‌تر و بهتر محصولات کشاورزی نیز بود تا از این رهگذر مطلوب‌ترین و بهترین استفاده از منابع طبیعی به عمل آید.

ذغال اخته یکی از محصولات باغی کشور است که مانند دیگر محصولات باغبانی دارای مزیت‌های متفاوت از قبیل ارزش غذایی و دارویی است. به دلیل شرایط اقلیمی مناسب در بعضی از مناطق کشور، ذغال‌اخته عمدتا به صورت ارگانیک تولید می‌شود و لذا می‌تواند برای صادرات و سودآوری مورد توجه قرارگیرد. شاید سطوح بیش‌تری از مناطق کشورمان دارای استعداد کاشت این گیاه و تولید محصول باشد ولی کم‌تر کسی از مناطق جدید و مساعد برای کشت این محصول مطلع می‌باشد. چناچه از شواهد بر می‌آید در بعضی از نواحی کشورمان مانند ارسباران در استان‌های آذربایجان شرقی، گیلان و قزوین شرایط لازم برای تولید این محصول باارزش وجود دارد.

میوه ذغال اخته در اواخر تابستان می‌رسد. میوه نارس آن به علت داشتن اسیدیته زیاد بسیار ترش می‌باشد. این میوه معمولا به صورت تازه خوری مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی بصورت خشک، مربا، کنسرو، ترشی، آبمیوه، سس، نکتار، ژله، مارمالاد، سرکه و لواشک نیز قابل استفاده است.

جهت روشن شدن ارزش و اهمیت این محصول در کشور اولا از نظر میوه‌کاری متخصصین این رشته باید تحقیقات گسترده‌ای را در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر این محصول و روشهای مناسب کاشت و داشت و برداشت آن انجام دهند. ثانیا متخصان صنایع غذایی در مورد صنایع تبدیلی آن از جهت خشک کردن ، تولید مربا، شربت، ژله، مارمالاد و غیره تحقیقات لازم را انجام دهند. ثالثا متخصصان علوم تغذیه در مورد تاثیر ذغال اخته بر سلامتی بدن مطالعات را شروع نمایند. هم-چنین متخصصان داروساز در مورد تولید داروهای آنتی اکسیدانی، ضد التهاب و غیره از این میوه بررسی‌های لازم را بعمل آورند. در تمامی این زمینه‌ها قدم اول، شناسایی ژنوتیپ‌های موجود و انتخاب ارقام با کیفیت مطلوب در کشور می‌باشد. بنابراین انجام مطالعات پایه‌ای در زمینه شناسایی انواع ژنوتیپ‌های با ارزش زغال اخته ضروری به نظر می رسد. منطقه ارسباران (استان آذربایجان شرقی) دارای تنوع گیاهی بسیار بالایی نه تنها در ایران بلکه در جهان می‌باشد.

طبقه بندی و ارزیابی اولیه ژنوتیپ‌های زغال اخته می‌تواند بر اساس خصوصیاتی مثل الگوی رشد، رنگ، شکل میوه و خصوصیات کشاورزی آن انجام شود. در میان خصوصیات میوه، اندازه، رنگ، شکل و آبمیوه بالاترین ارزش را دارا هستنند. به عبارتی دیگر روشهای سنتی تعیین هویت بر اساس مشاهده ظاهری درخت و میوه است. با توجه به اینکه بسیاری از خصوصیات ظاهری تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، این روش، قابل اعتماد نیست و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفیدی برای شناسایی ژنوتیپ‌ها باشند. . بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی در کنار خصوصیات مورفولوژیکی برای رسیدن به نتیجه دقیق‌تر منطقی به نظر می‌رسد. نشانگرهای مولکولی چون بر پایه DNA استوار است می‌تواند ابزار بسیار مفیدی برای شناسایی ارقام و تخمین تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها باشند. استفاده از نشانگرها در سطح مولکول DNA دقیق‌ترین روش بررسی است که جزئیات بیش‌تری از ژنوم ژنوتیپ‌های ذغال اخته را ارائه می‌دهد.

انواع متفاوتی از نشانگرهای DNA از قبیل تفاوت طول قطعه‌های حاصل از تکثیر (AFLPs)، تفاوت طول قطعه‌های حاصل از هضم (RFLPs)، دی . ان .ای چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPDs)، ردیف های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها (SSRs) و بین ردیف‌های تکراری ساده (ISSR) برای تعیین تنوع ژنتیکی در گونه‌های کورنوس استفاده شده است. نشانگر ISSR از جمله نشانگرهای مبتی بر PCR هست که مزایای هر چهار نشانگر فوق را داراست و فاقد معایبی از قبیل تکرارپذیری پایین و هزینه بالا می‌باشد. نشانگر ISSR یک روش متفاوت بر پایه مایکروساتلایت‌ها می‌باشد، که به دانش قبلی از ژنوم، کلون کردن و طراحی پرایمر نیازی ندارد. با توجه به اینکه ISSR ها فراوانی و درجه پلی‌مورفیسمی بالایی در میان ژنوتیپ‌های نزدیک به هم نشان می‌دهند، می‌توانند در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ذغال اخته کارایی بالایی داشته باشند. با توجه به اینکه به‌رغم استفاده وسیع ذغال اخته در ایران، هیچ مطالعه استانداردی روی میوه آن همانگونه که به گونه‌های دیگر پرداخته شده، انجام نگرفته است. بنابراین در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ISSR تنوع ژنتیکی ۱۰۰ نوع ذغال اخته مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از این دو نشانگر انواع و جمعیت های ذغال-اخته شناسایی و گروه بندی گردید. همچنین ژنوتیپ‌های برتر با توجه به مطالعات مورفولوژیکی معرفی می‌گردد.

فصل اول
کلیات و
بررسی منابع

۱-۱- تاریخچه

درختان ذغال‌اخته از زمان نئولیث[1] به جامعه بشری معرفی شده است. یکی از قدیمی‌ترین مدرک در مورد استفاده ذغال‌اخته در صنایع غذایی، در قطعه منظوم رزمی هومر یونانی وجود دارد [Bosancic, 2009]. بعضی از محققین عقیده دارند جنگل‌های اولیه درختان ذغال‌اخته به طور طبیعی باقی مانده‌ی جنگل‌های دوره پالیوسن هستند [Klimenko, 2004]. نوشته‌های قدیمی نشان می‌دهند که احتمالا اسب تروی از چوب ذغال‌اخته ساخته شده بود [Truta et al., 2009]. ذغال‌اخته در قفقاز و آسیای مرکزی بیش از ۱۰۰۰ سال است که به‌عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود [Mamedov and Craker, 2004]. ذغال‌اخته از زمان‌های قدیم در اروپا رشد می‌کرده ولی از قرن ۱۸ و ۱۹ به بعد بیش‌تر مورد توجه واقع شد و به‌عنوان گیاه زینتی در دنیای جدید و آسیا مورد استفاده قرار گرفت [Ognjanov et al., 2009].

۱-۲- رده بندی

ذغال‌اخته متعلق به جنس *Cornus* و از تیره Cornaceae و رده Cornales جزء جداگلبرگان محسوب می‌شود. در تیره Cornaceae حدودا ۱۰ جنس و ۱۲۰ گونه وجود دارد که بطور عمده در نواحی معتدل و گرم نیمکره‌ی شمالی پراکنده هستند [زرگری، ۱۳۷۰]. تیره Cornaceae شامل ۱۵ جنس است که مهم‌ترین آنها ۳ جنس *Cornus*، *Aucuba* و *Helwingia* است [Vareed, 2005] ولی جنس *Cornus* بیش‌تر از بقیه مورد توجه است [Truta et al, 2009].

۱-۳- مروری بر جنس Cornus

جنس کورنوس عموما با Dogwoods شناخته می شود [Mert and Soylu, 2009]. در جنس *Cornus* حدودا ۵۸ گونه وجود دارد [Fan and Xiang, 2001] ولی در بعضی منابع ۶۰ گونه ذکر شده است [Wersema and Leon, 1999]. گونه های جنس *Cornus* چند ساله، اغلب خزان‌دار و به‌صورت درختچه‌ای و درختان کوچک هستند که شامل گونه‌های علفی و چوبی می‌باشند. گونه‌های موجود در این جنس به طور وحشی در ناحیه معتدل شمالی و جنوب نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری [Zhang et al., 2008] شمال آمریکا، آسیا، اروپا و جنوب آمریکا و آفریقا وجود دارند [Fan and Xiang, 2001]. برگ اکثر گونه‌های جنس *Cornus* بصورت متقابل، ساده، کامل و با رگبرگ‌های برجسته می‌باشد. گونه *C. alternifolia* تنها گونه‌ی از این جنس است که دارای برگ متناوب است. گل‌ها عموما کوچک، سفید، سبز و

[1] - neolith

سفید یا زرد بوده که در یک گل‌آذین چتری قرار می‌گیرند و زودتر از برگ‌ها در اواخر زمستان و اوایل بهار ظاهر می‌شوند. میوه موجود در این گونه‌ها سفید، آبی، قرمز یا سیاه و حاوی ۱ یا ۲ تا بذر هستند [Vareed, 2005; Grifites, 1994].

۱-۴- گونه‌های خوراکی جنس *Cornus*

گونه‌های جنس کورنوس که بطور تجاری کشت می شوند، شامل: *C. mas*، *C. officinalis*، *C. florida*، *C. kousa* و *C. nuttalli* (به دلیل خصوصیات زینتی) هستند که در بیش‌تر مناطق اروپا و آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرند [Seeram et al., 2002; Vareed, 2005; Durkovic and Burkovska, 2009]. به عقیده ثابتی [۱۳۸۵] گونه‌های *C.mas*، *C. australis* و *C. sanguine* در ایران دیده شده اند که فقط گونه *mas* خوراکی است.

نام انگلیسی ذغال‌اخته Cornelian cherry است. البته در بعضی از مطالعات Cornelian cherry را برای ۴ گونه *C.mas*، *C.officinalis* ، *C. chinensis* و *C. sessiliss* بکار می‌برند [Xiang et al., 2003]. هم‌چنین اکس کورانت[1] در تحقیقات خود گونه *C. volkensii Harms* را در کوه‌های آفریقا پیدا نمود که گفته می‌شود این گونه نیز جزء Cornelian cherry است. پنج گونه فوق از لحاظ مورفولوژیکی و توزیع جغرافیایی از هم متمایز هستند. تنها گونه جنس کورنوس که به‌عنوان گیاه دوپایه شناخته شده و همیشه سبز است، گونه *C. volkensii Harms* است. در حالیکه ۴ گونه دیگر دارای گل کامل بوده و بصورت درختچه و درختان کوچک خزان‌دار هستند. گونه *C. sessilis* که در کوه‌های کالیفرنیا می‌روید، با داشتن سه جفت فلس براکته مانند در کنار جوانه گل‌آذین بدون پایه[2] و هم‌چنین با داشتن یک جفت براکته به دور از دو تا جوانه کناری شاخه از بقیه گونه‌ها متمایز می‌گردد [Xiang et al., 2003]. گونه‌یی که گل‌آذین جانبی بیش‌تری نسبت به گل‌آذین انتهایی تولید می‌کند، گونه *C. chinensis* است.

گونه *C. eydeana* گونه جدیدی از کورنوس است که از جنوب شرقی یانان[3] چین توسط زاینگ و همکاران [Xiang et al., 2003] شناسایی شده است. این گونه جدید به لحاظ داشتن گل‌آذین چتری، به همراه دو جفت فلس براکته مانند و یک هسته در میوه، به دیگر گونه‌های Cornelian cherry شبیه است، هر چند تفاوت‌هایی نیز در این میان وجود دارد. این گونه نیز همیشه سبز بوده و دارای برگ‌های چرمی با ۳ تا ۴ رگبرگ ثانویه و گل‌های کامل است که بطور متراکم روی یک گل‌آذین با پایه بلند قرار می‌گیرند. این گونه از لحاظ مورفولوژیکی بیش‌تر شبیه گونه آفریقایی *C. volkensis Harms* است. اما از لحاظ مورفولوژیکی دانه گرده و گسترش جغرافیایی، شباهت نزدیکی به گونه‌های آسیایی و اروپایی

[1] - X- Courant
[2] - Sessile
[3] -Yunan

دارد. کشف این گونه کمک زیادی در درک سیستماتیک و مسیر تکاملی Cornelian cherry ها نموده است [Xiang et al., 2003].

هیبریدهای بین گونه‌ای نیز در جنس کورنوس وجود دارد. هیبریدهای گونه‌های جنس کورنوس در بیش‌تر مناطق ایالات متحده آمریکا، خصوصا در میشیگان متمرکز شده اند. هیبریدهای طبیعی بین *C. amomum* و *C. racemosa* یا بین *C. rugosa* و *C. stolonifera* بیش‌تر در میشیگان یافت می‌شوند. واگنر[1] هیبرید بین *C. racemosa* و *C. rugosa* می‌باشد که از میشیگان گزارش شده است [Vareed, 2005].

۱-۵- گونه *C. mas* یا ذغال‌اخته

به این گونه گاهی اوقات *C. mascula* نیز گفته می‌شود. در زبان‌های مختلف نام‌های متفاوتی بر این گونه نهاده شده است. در کشور انگلیس به آن Cornelian cherry، Cornel و European cornel، در سوئد Korsbarskornel، در فرانسه Cornullier male، در اسپانیا Cornejo macho، در ایتالیا Corniolo maschio، در آلمان Kornelkirsche، در صربستان Dren، Drijen، Drenic، Drenjina و Drenjak [Bosancic, 2009] و در ایران نیز ذغال‌اخته گفته می‌شود. به دلیل شباهتی که میوه‌های ذغال‌اخته به عقیق جگری داشته، به آن Cornelian cherry گفته شده است [Klimenko, 2004]. ذغال‌اخته یک گیاه خزان‌دار بوده که عادت رشدی آن از بوته‌ای و درختچه‌ای تا درخت کوچک (۱۲- ۵ متر) متغیر است و معمولا رشد کندی دارد. تاج درخت گرد است و معمولا شاخه‌ها از نزدیک زمین انشعاب پیدا می‌کنند. در شرایط آفتابی کامل، شاخه‌ها بصورت راست ولی در سایه بصورت عرضی پراکنده می‌شوند تا بتوانند از نور قابل دسترسی محدود بهترین استفاده را ببرند [Klimenko, 2004]. ذغال‌اخته در نونهالی رشد عمودی دارد ولی با افزایش سن گیاه رشد عرضی پیدا کرده و به شکل قوسی در می‌آید. در مناطق جنوبی نیاز سرمایی آن تامین نمی‌گردد. ولی ارقامی مثل Spring Glow در مناطق جنوبی هم گل می‌دهند. در اروپا این گونه به دلیل گل‌های زرد و درخشانش بعنوان یک گیاه زینتی کاشته می‌شود. این گونه از لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه به گونه *C. officinalis* است که در آسیای شرقی وجود دارد. هر دو گونه دارای گل‌آذینی با پایه کوتاه (تقریبا ۲ میلی‌متر) در انتهای شاخه بوده و جوانه‌ها به وسیله ۲ جفت فلس براکته مانند پوشیده می‌شوند و بلافاصله ۲ جوانه کناری در زیر گل‌آذین به وسیله یک فلس پوشیده می‌شوند. هر دو گونه دارای برگهای کاغذی[2] هستند. این گونه ذغال‌اخته دارای ۴- ۶ رگبرگ فرعی است در حالیکه گونه *C. officinalis* ۵-۷ یا ۸ رگبرگ فرعی دارد. در ذغال‌اخته 2n=18 است و اندازه متوسط کروموزم‌هایش بین ۴/۶۳-۲/۲ میکرومتر است

[1] - Wagner
[2] -Papery

[Truta et al., 2009]. ذغال‌اخته زیر سایه درختان دیگر نیز می‌تواند کشت گردد [Yilmaz et al., 2009a]. ذغال‌اخته در صربستان بعنوان یک درخت همراه در جنگلهای بلوط و ممرز رشد می‌کند. هم‌چنین این درخت در شیب تپه‌های جنگل‌های مسطح نیز رشد می‌کند [Rudkovsky, 1960; Imamaliev, 1977]. رنگ شاخه‌های سال جاری ذغال‌اخته سبز رنگ ولی شاخه‌های یکساله به بالا قهوه‌ای تیره است [Pawlowska et al., 2010]. اکثر ارقام داخل این گونه خوراکی بوده ولی رقم زینتی نیز در آن یافت می‌شود که نمونه‌اش رقم Autumn Fire مجارستانی است. اولین باردهی معمولا از سال ۶-۵ شروع می‌گردد [Pawlowska et al., 2010].

۱-۶- تولید و عملکرد

بر اساس آمارنامه سال ۱۳۸۷ وزارت جهاد کشاورزی کشور، سطح زیر کشت ذغال‌اخته در ایران ۱۰۹۴/۲۶ هکتار است که از این مقدار ۱۵۷/۲۶ هکتار در مرحله نونهالی اما ۹۳۶/۶۰ هکتار به مرحله باروری رسیده اند. درکل به میزان ۲۳۲۹/۳۶ تن ذغال‌اخته از این باغها تولید شده است. متوسط عملکرد در کشور ایران ۲۴۸۷/۰۴ کیلوگرم در هکتار می-باشد. سطح زیر کشت در استان قزوین ۷۰۵/۴ هکتار است که ۷۰/۸ هکتار آن را باغ‌های غیر بارور و ۶۳۴/۷ هکتار آن را باغ‌های بارور تشکیل می‌دهند. میزان تولید ذغال‌اخته در این استان ۱۰۶۲/۲ تن در هکتار و عملکرد آن ۱۶۷۳/۹ کیلو گرم در هکتار است. در استان قزوین تولید ذغال‌اخته در ۲ منطقه الموت (به طور عمده روستاهای هیر، ویار و سوگاه) و کوهین (به طور عمده منطقه یوز باش) در ارتفاعات و دامنه‌های البرز انجام می گیرد. بر اساس همین آمار سطح زیر کشت ذغال-اخته در استان آذربایجان شرقی ۳۸۸/۹ هکتار است که ۸۶/۹ هکتار آن را باغ‌های غیر بارور و ۳۰۲ هکتار آن را باغ‌های بارور تشکیل می‌دهند. میزان تولید ذغال‌اخته در این استان ۱۲۶۷/۱ تن در هکتار و عملکرد آن ۴۱۹۵/۷ کیلو گرم در هکتار می‌باشد. بر اساس مطالعاتی که قنبری و همکاران [۲۰۱۰] در ارسباران انجام داده‌اند مشخص شده که در شرایط وحشی، میزان تولید برای هر درخت بطور متوسط ۱/۵ کیلو گرم است، در حالیکه طبق گزارش ارسیسلی [Ercisili, 2004] ۱/۶ میلیون اصله درخت ذغال‌اخته در کشور ترکیه وجود دارد که سالانه ۱۷۰۰۰ تن میوه تولید می‌کند. در حالت وحشی مقدار عملکرد ۲/۸ تا ۴/۸ کیلوگرم به ازای هر درخت و در حالت ایداه‌آل از لحاظ نور و بارندگی تا ۱۰ کیلوگرم به ازای هر درخت و در هر هکتار به ۵۰۰-۱۰۰۰ کیلوگرم نیز می‌رسد [Kosykh, 1967; Leontiak, 1976] و در صورت کشت در باغ، عملکرد تا ۵۰۰۰ کیلوگرم در هکتار هم می‌رسد [Mamedov and Craker, 2004].

بر اساس مطالعات اگنجانو و همکاران [Ognjanov et al., 2009] در مونت نگرو[1] متوسط عملکرد برای هر درخت ۱۷/۶-۴۰/۶ کیلوگرم بود و بالاترین عملکرد با ۱۰۲ کیلوگرم در رقم Bp36 مشاهده شد. مطابق با گزارش کلیمنکو

[1] -Montenegro