



شناسایی نشانگرهای DNA مرتبط با ویژگی‌های فیتوشیمیایی میوه سماق (*Rhus coriaria* L.)

رسول محمدی آلاگوز^۱، رضا درویش زاده^{۲*}، احمد علیجانپور^۳، حمید حاتمی ملکی^۴، راحله ابراهیمی^۵
^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۲استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۳دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۴استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
^۵دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۸

چکیده

سماق (*Rhus coriaria* L.) که در ایران و خاورمیانه به عنوان یکی از ادویه‌های غذایی مهم شناخته می‌شود دارای اجزاء دارویی نظیر اسیدهای آلی، اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و ترپنوئیدها می‌باشد. این گیاه از گونه‌های مهم جنگلی است که پراکنش مناسبی در شمال غرب ایران دارد. در این بررسی، نمونه‌های برگ و میوه مربوط به ۱۵ ژنوتیپ سماق از هریک از ۵ ناحیه واقع در شمال غرب کشور به منظور انگشت‌نگاری با نشانگر ISSR و نیز اندازه‌گیری ترکیبات مالیک اسید، پروتوکتوکوئیک اسید و کوماریک اسید از طریق تکنیک LC-MS/MS مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج آماره‌های توصیفی بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما سماق مورد مطالعه از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی می‌باشد. در مورد مالیک اسید و کوماریک اسید تنوع بین جمعیتی بیشتر از تنوع درون جمعیتی بود. مطالعه ساختار جمعیت مربوط به ۷۵ ژنوتیپ سماق با استفاده از داده‌های ۱۸ آغازگر ISSR شامل ۱۳۲ نشانگر ISSR و در نرم‌افزار Structure آن‌ها را در دو زیرجمعیت مختلف قرار داد. نتایج تجزیه ارتباطی نشان داد که نشانگرهای UBC867، UBC801 و UBC864 به ترتیب دارای ارتباط معنی‌دار با نواحی ژنومی کنترل‌کننده مالیک اسید، کوماریک اسید و پروتوکتوکوئیک اسید هستند. نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق در صورت تایید می‌توانند در برنامه به‌نژادی بواسطه گزینش به کمک نشانگر در سماق بکار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: سماق، تنوع ژنتیکی، LC-MS/MS، تجزیه ارتباطی.

مقدمه

که در گیاه سماق در این زمینه گزارشی وجود ندارد. در مطالعه ای که توسط Cavalcanti *et al.* (2012) با استفاده از ۷۱ ژنوتیپ F_1^3 بادام زمینی حاصل از تلاقی CCP1001×CP96 انجام شد، مشخص گردید که ۱۱ QTL^۴ در کنترل صفت عملکرد و صفات مورفولوژیک موثر در آن نقش دارند و ضریب تبیین مکان های ژنی شناسایی شده بین ۳/۷۹ الی ۱۲/۹۸ درصد متغیر می باشد. همچنین، Lal *et al.* (2017) با استفاده از تجزیه ارتباطی از طریق نشانگرهای ریزماهواره و روش مدل خطی مخلوط (MLM^۵) بیان نمودند که ۵ جایگاه ریزماهواره ای (SSR^۶) با شش متغیر مربوط به میوه انبه دارای ارتباط معنی دار بوده و می توانند در برنامه های به نژادی بواسطه نشانگر (MAB^۷) بکار روند. با توجه به اهمیت دارویی گیاه سماق، مطالعه ژنتیکی و شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده مواد موثره دارویی آن می تواند گامی موثر در به نژادی گیاه مزبور باشد. امروزه با وجود نشانگرهای مولکولی DNA^۸، امکان شناسایی مکان های ژنی کنترل کننده صفات و گزینش به کمک نشانگر، برای به نژادی صفات با وراثت پذیری پایین و صفات با قابلیت ظهور در مراحل انتهایی رشد و توسعه گیاه میسر شده

سماق (*Rhus coriaria* L.) از خانواده Anacardiaceae بوده و در مناطق نیمه گرمسیری و معتدل بویژه در آسیای شرقی، آفریقا و آمریکای شمالی رشد می کند. سماق درختچه ای دیرزیست، تک پایه و با ارتفاعی حدود ۱ تا ۴ متر است که طعم گس اسیدی میوه آن بیشتر به دلیل وجود ترکیبات مختلف تانن و اسیدهای آلی می باشد (Rawashdeh *et al.*, 2009). آنتوسیانین ها و چربی های ثابت به عنوان مواد اصلی تشکیل دهنده میوه سماق شناخته شده اند (Guvenc and Koyuncu, 1994). آنتوسیانین های Delphinidin, Myrtillin و Chrysanthemین به عنوان آنتوسیانین های میوه سماق و اسید اولئیک، لینولئیک و پالمیتیک به عنوان بیشترین اسیدهای چرب و اسید مالیک، سیتریک، فوماریک و تارتاریک به عنوان مهم ترین اسیدهای آلی در میوه سماق شناخته شده اند (Mavlyanov *et al.*, 1997; Dogan & Akgul, 2005). امروزه از میوه سماق برای انعقاد خون، ضداسهال، درمان چرک گوش، درمان تراخم گرم چشم، و ممانعت از بروز آبله در چشم و موارد دیگر استفاده می گردد (Ahmadian-Attari *et al.*, 2008). شناسایی مکان های ژنی کنترل کننده صفات در گیاهان مختلفی از خانواده Anacardiaceae شامل بادام هندی (Cavalcanti *et al.*, 2012) و انبه (Lal *et al.*, 2017) انجام شده است این در حالی است

³ First filial generation

⁴ Quantitative trait loci

⁵ Mixed linear model

⁶ Simple sequence repeat

⁷ Marker aided breeding

⁸ Deoxyribonucleic acid

خرداد ماه ۱۳۹۴ از مناطق تحت بررسی و با انتخاب ۱۵ پایه در هر منطقه آماده شد. نمونه برداری طبق الگوی خاص و با رعایت قوانین نمونه برداری و آماری با فاصله حدود ۵ درخت (۱۵ متر) انجام شد. سپس جهت استخراج DNA و تعیین تنوع ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی ISSR، برگ‌های جمع‌آوری شده از هر پایه در داخل کاغذ آلومینیوم و در داخل فلاسک حاوی ازت مایع قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل و تا مرحله استخراج DNA در دمای -۸۰°C نگهداری شدند. نمونه میوه از درختانی که نمونه‌های برگ‌ها از آنها انتخاب شده بود، برداشت (جدول ۱) و در شرایط سایه خشک شدند. پریکارپ میوه از دانه آن جدا و بوسیله آسیاب خانگی خرد شد. به $۰/۵$ گرم از پریکارپ‌های خرد شده مقدار ۱۰ میلی لیتر متانول (HPLC grade) ۸۰ درصد حجمی به حجمی، اضافه شد. نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک شرکت ELMA (آلمان) به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای اتاق عصاره‌گیری شدند. بعد از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شده و سپس با فیلتر سرنگی $۰/۲۲$ میکرونی (ساخت شرکت پال آمریکا) فیلتر شده و برای تجزیه در فریزر -۲۰°C نگهداری شدند. نمونه‌های متانولی پریکارپ (Pericarp) میوه سماق در دستگاه LC-MS/MS^{12} با سیستم اتاکنک جداسازی پیوسته (Waters, Milford,)

است. بدین منظور می‌توان با ارزیابی تنوع فنوتیپی و مولکولی جمعیت ژنتیکی علاوه بر اطلاع از غنای آلی، از طریق روش‌های تجزیه ارتباطی^۹ و یا تجزیه مبتنی بر پیوستگی^{۱۰} نشانگرهای مولکولی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات را شناسایی کرد (Najafzadeh et al., 2016; Heydari et al., 2014). از طرفی با توجه به اینکه برخلاف درختان میوه و گیاهان زراعی، جمعیت‌های مربوط به درختان جنگلی، فاقد ساختار ژنتیکی ساده‌ای هستند بنابراین استفاده از روش تجزیه ارتباطی در درختان جنگلی به منظور شناسایی ارتباط نشانگر صفت بسیار مفید است (Awais Khan et al., 2012). این تحقیق با هدف شناسایی نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای (ISSR^{۱۱}) مرتبط با صفات فیتوشیمیایی میوه در جمعیت‌های سماق جمع‌آوری شده از مناطق شمال غرب ایران انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۵ جمعیت طبیعی سماق از شمال غرب کشور شامل ۲ منطقه از آذربایجان شرقی (آقبراز در هوراند و وینق در ارسباران) و ۳ منطقه از آذربایجان غربی (دره خان، دره نیژ و کچله هر سه در ارومیه) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). نمونه‌های برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان درختچه‌های سماق با ظاهر سالم در اواخر

¹² Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

⁹ Association analysis

¹⁰ Linkage-based analysis

¹¹ Inter simple sequence repeat

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق جمع‌آوری نمونه‌های برگ و میوه سماق.

Table 1- Geographical situation of the collection areas of Sumac leaf and fruit.

منطقه	جمعیت	ارتفاع از سطح دریا (متر) طول جغرافیایی عرض جغرافیایی		
Area	Population	Latitude	Longitude	Altitude
1	آذربایجان غربی (کچله)	37° 12'	44° 52'	1727
	West Azerbaijan (Kechaleh)			
2	آذربایجان غربی (دره خان)	37° 18'	45° 60'	1533
	West Azerbaijan (Darreh-Khan)			
3	آذربایجان غربی (دره نیژ)	37° 16'	45° 80'	1623
	West Azerbaijan (Darreh-Nejh)			
4	آذربایجان شرقی (هوراند- آقبراز)	38° 59'	47° 23'	1190
	East Azarbaijan (Agboraz)			
5	آذربایجان شرقی (ارسباران- وینق)	39° 02'	46° 50'	860
	East Azarbaijan (Vinag)			

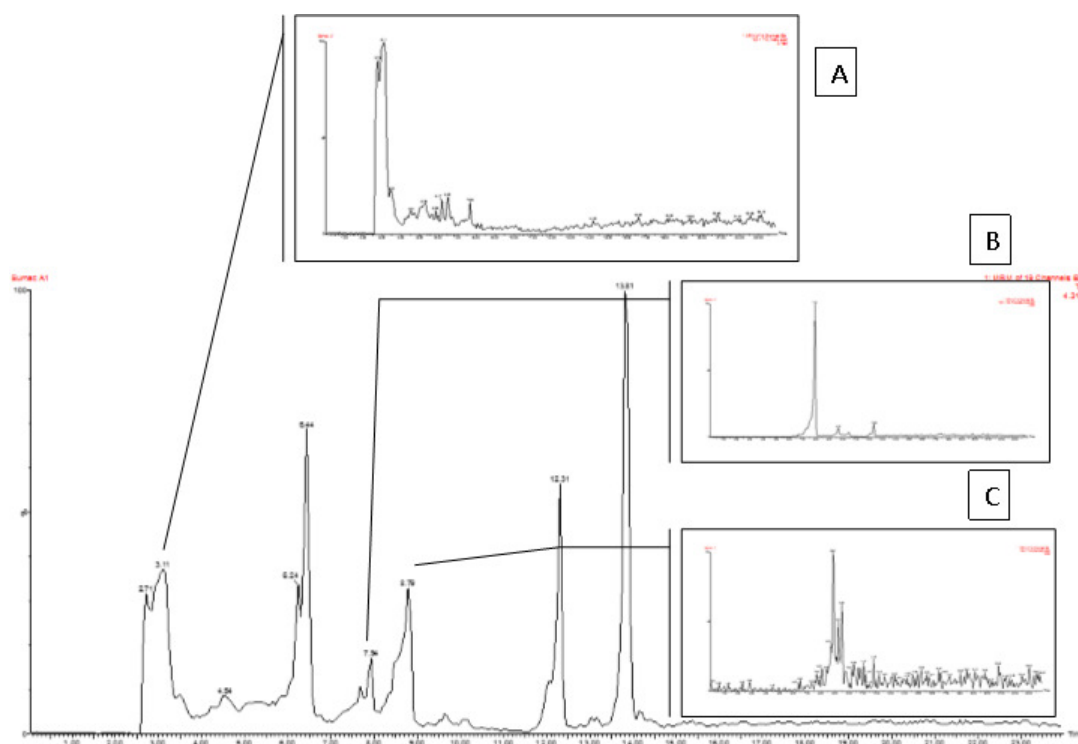
C, D با حلال‌های متفاوت وجود دارد و دستگاہ قابلیت برداشت نسبت‌های مختلف از مخازن را دارا بود. شناسایی سه ترکیب مهم مالیک اسید، پروتوکاتکوئیک اسید و کوماریک اسید در سطح الکترواسپری منفی انجام گرفت (شکل ۱). مساحت زیر منحنی برای هر ترکیب در هر یک از نمونه‌های سماق به صورت AUC اندازه‌گیری شد. بدین صورت که برای محاسبه مقدار کمی ترکیبات شناسایی شده، سطح هر نوار جذبی (مساحت زیر منحنی یا Area Under a Curve) برای ترکیب مورد نظر محاسبه می‌گردد زیرا سطح هر نوار جذبی متناسب با مقدار نسبی

در این سیستم چون ستون‌ها نسبتاً طویل و اندازه ذرات کوچک است بنابراین بایستی برای جریان حلال در طول ستون فشاری اعمال شود که برای ایجاد فشار از موتور پمپ استفاده می‌شود. مهم است که مقدار فشار ثابت و بدون نوسان باشد.

پمپ فشاری حدود 4500 psi ایجاد می‌کند. حلال توسط پمپ با دمش ثابت بر روی فاز ثابت حرکت داده می‌شود. بسته به هدف، برداشت از مخازن و میزان دمش متفاوت است. در این بررسی از روش گرادینانت یا چهار جزئی استفاده گردید که در آن چهار نوع مخزن A, B,

صورت دستی (حاصلزرب قاعده × نصف ارتفاع) بدست می‌آید.

ترکیبات می‌باشد که بوسیله انتگراتور یا سطح سنج به طریقه اتوماتیک توسط نرم افزار یا به



شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به یکی از نمونه‌های میوه سماق در سطح الکترواسپری منفی. (A) کروماتوگرام مربوط به شناسایی مالئیک اسید با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی MAS. (B) کروماتوگرام شناسایی پروتوکاتکوئیک اسید. (C) کروماتوگرام شناسایی کوماریک اسید.

Figure 1- Chromatogram for one of sumac fruit sample in the negative electrospray level. (A) Chromatogram related to identification of Malic acid using MAS database. (B) Chromatogram related to identification of Protocatechoic acid. (C) Chromatogram related to identification of Coumaric acid.

کیفیت DNA به وسیله الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ تعیین شد و در زیر نور فرابنفش در دستگاه Gel Documentation عکس برداری انجام شد. جهت انگشت نگاری افراد، از ۱۸ آغازگر ISSR (جدول ۲) استفاده شد.

نمونه‌های برگ‌ها با استفاده از ازت مایع در ظروف چینی ضدعفونی شده کوبیده شده و سپس استخراج DNA ژنومی از برگ‌های پودر شده طبق دستورالعمل و با استفاده از کیت استخراج DNA (dBIOZOL genomic DNA extraction Regent, Japan) انجام شد. کمیت و

جدول ۲- آغازگرهای بین ریزماهورهای انتخاب شده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه سماق.

Table 2- Selected ISSR primers for evaluation of Sumac genetic diversity.

شماره	کد آغازگر	موتیف	توالی گسترده آغازگر از ۵' به ۳'	دمای اتصال آغازگر
Number	Primer code	تکراری	5' to 3' sequence of primer	(درجه سانتی گراد)
		Repeated motif		Annealing temperature (°C)
1	UBC809	(AG)8G	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'	46
2	UBC810	(GA)8T	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3'	38
3	UBC811	(GA)8C	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AC-3'	49
4	UBC816	(GA)8T	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AT-3'	50
5	UBC823	(TC)8C	5'-TCT CTC TCT CTC TCT CC-3'	48
6	UBC826	(AC)8C	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CC-3'	50
7	UBC834	(GA)8YT	5'-GA GAG AGA GAG AGA GYT-3'	50
8	UBC835	(AG)8YC	5'-GA GAG AGA GAG AGA GYC-3'	52
9	UBC841	(GA)8CTC	5'-AG AGA GAG AGA GAG AYC-3'	52
10	UBC842	(GA)8CTG	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYG -3'	50
11	UBC854	(TC)8RG	5'-TCT CTC TCT CTC TCT CRG -3'	44
12	UBC856	(AC)8YA	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYA -3'	44
13	UBC857	(AC)8YG	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYG -3'	40
14	UBC864	(ATG)6	5'- ATG ATG ATG ATG ATG ATG -3'	42
15	UBC866	(CTC)6	5'-CTC CTC CTC CTC CTC CTC -3'	53
16	UBC867	(GGC)8	5'-GGC GGC GGC GGC GGC GGC -3'	39
17	UBC890	VHV (GT)7	5'-VHV GTG TGT GTG TGT GT -3'	52
18	B (01)	-	5'-GAGTCTCAGG-3'	27

اولیه در دمای ۹۴°C (۴ دقیقه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴°C (۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگرها [بسته به نوع آغازگر استفاده شده، دمای اتصال بین ۲۷ الی ۵۳ درجه سانتی گراد متفاوت بود (جدول ۲)] (به مدت ۴۵ ثانیه) و مرحله بسط در دمای ۷۲°C (۲ دقیقه) و یک مرحله برای بسط نهایی در دمای ۷۲°C (۱۰ دقیقه) بودند. پس از تکثیر، فراورده های PCR روی ژل آگارز ۱/۸ درصد و در ولتاژ ۸۰ ولت تفکیک گردید.

آماره های توصیفی برای صفات فیتوشیمیایی مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 23 محاسبه شد. قطعات حاصل از نشانگرها بصورت (۱) حضور و (۰) عدم حضور

آغازگرهای مورد استفاده، با توجه به داشتن الگوی نواریندی واضح، از میان ۶۰ آغازگر ISSR انتخاب شدند. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystem (ساخت آمریکا) برای آغازگرهای مورد بررسی در حجم ۲۳ میکرولیتری شامل DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، آب دو بار تقطیر شده (DDW)، ۰/۹ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲۸ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase یک واحد و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار بود. مراحل PCR به ترتیب شامل واسرشت سازی

یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت توسط لگاریتم Likelihood برای هر K ; $\ln P(D) = L(K)$ (Rosenberg) تعیین می‌شود (et al., 2002). از آنجایی که توزیع $\ln P(D)$ عدد دقیق و واضحی از K واقعی را نشان نمی‌دهد، ΔK مبنی بر برآورد ثانویه تغییر در Likelihood جهت برآورد دقیق مقدار واقعی K استفاده می‌شود (Evanno *et al.*, 2005). به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه از تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به مدل $Q+K$ در نرم افزار TASSEL 3.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آماره‌های توصیفی (جدول ۳) نشان داد که از میان سه ترکیب فیتوشیمیایی مورد مطالعه در میوه سماق شامل مالیک اسید، پروتوکاتکوئیک اسید و کوماریک اسید، بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به مالیک اسید و پروتوکاتکوئیک اسید می‌باشد. یافته‌ها نشان داد که بر خلاف پروتوکاتکوئیک اسید در مورد مالیک اسید و کوماریک اسید تفاوت در بین جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌ها است که این تفاوت احتمال دارد ناشی از اختلاف شرایط

امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. سپس به منظور بررسی تمایز و تفکیک جمعیت‌های سماق با استفاده از نشانگرهای ISSR، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم افزار GenALEx (6.41 انجام گرفت. تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian در نرم افزار Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) انجام گرفت. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. مقادیر اولیه K (زیرجمعیت فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰ تکرار Burn-in (دوره گرم کردن) و ۱۰۰۰۰ تکرار MCMC^{۱۳} استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم افزار Structure 2.3.4 برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر

¹³ Markov chain Monte Carlo

آنزیم ها) دارد، در نوع و شدت واکنش های شیمیایی موثر است. مقادیر ضریب تغییرات (جدول ۳) بیانگر وجود تنوع فیتوشیمیایی در ژرم پلاسما مورد بررسی است که این امر در توافق با گزارشات قبلی (Rawashdeh *et al.*, 2009) مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی در سماق و با استفاده از داده های نشانگرهای AFLP (تفاوت طول قطعه های حاصل از تکثیر) می باشد. همچنین، توزیع فراوانی ترکیبات فیتوشیمیایی (شکل ۲) نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی و سیستم چندژنی در کنترل متغیرهای مورد مطالعه است.

رویشی و توپوگرافی نمونه ها باشد. در اکثر موارد بر نقش رویشگاه به عنوان عامل تاثیرگذار در تجمع متابولیت های ثانویه تاکید شده است (Hemati *et al.*, 2003; Srivastava & Shym,) (2002; Hemmati *et al.*, 2006). مکان رشد گیاه می تواند از طریق تغییرات دمایی و رطوبتی بر فرایند تشکیل مواد موثره تاثیرگذار باشد. مکانیسم تاثیرات محیط بر تجمع متابولیت های ثانویه به درستی روشن نیست. با این وجود روشن است که محیط از طریق تاثیراتی که در فرایند تولید متابولیت و عوامل مرتبط به فرآیند تولید (مثل

جدول ۳- مقادیر آماره های توصیفی برای صفات فیتوشیمیایی در جمعیت های سماق مورد مطالعه (مقادیر بصورت مساحت زیر منحنی (AUC) محاسبه شده اند و واحد ندارند).

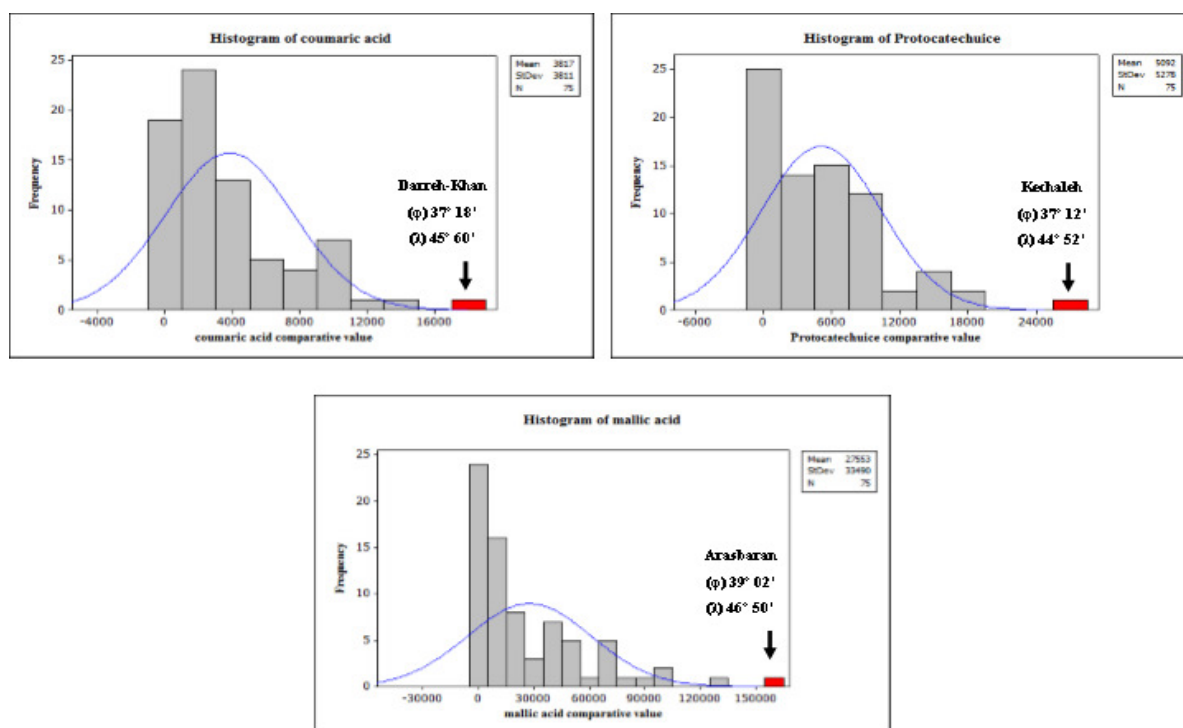
Table 3- The values of descriptive statistics of phytochemical characteristics in studied sumac populations.

میانگین مربعات (MS)		ضریب تغییرات (CV)	حداکثر (Maximum)	حداقل (Minimum)	میانگین (Mean)	صفت (Characters)
درون جمعیت (Within population)	بین جمعیت (Between population)					
753339551	7544230237	80	160383	43	26843.1	مالئیک اسید (Maleic acid)
28726697.12	18979471.63	95	26676	0	5027.33	پروتوکاتکوئیک اسید (Protocatechoic acid)
12114302.42	59275941.99	98	18294	104	3767.1	کوماریک اسید (Cumaric acid)

CV: Coefficient of variation, MS: Mean-square

ISSR نشان داد که ۷۱ درصد از تنوع برآورد شده مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها و ۲۹ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها می باشد (جدول ۴). تاریخ پیچیده اصلاحی بسیاری از گیاهان مهم و جریان ژنی محدود شده در بیشتر گیاهان وحشی، ساختارهای پیچیده‌ای در ژرم پلاسم به وجود می آورد که باید در مطالعات تجزیه ارتباطی در نظر گرفته شود (Zhu et al., 2008).

وجود چنین جمعیت‌های متنوعی از سماق در کشور بیانگر امکان گزینش در جمعیت‌های مذکور و نیز کارا بودن شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات با استفاده از تکنیک تجزیه ارتباطی در این جمعیت‌ها است. در ارزیابی تنوع ژنتیکی با ۱۸ آغازگر ISSR، ۱۳۲ مکان ژنی تکثیر شدند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس داده‌های نشانگر



شکل ۲- توزیع فراوانی ترکیبات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های سماق مورد مطالعه. در شکل بیشترین میزان تولید هر ترکیب و همچنین عرض و طول موقعیت جغرافیایی برداشت نمونه آن مشخص شده است. (φ): عرض جغرافیایی. (λ): طول جغرافیایی.

Figure 2- Frequency distribution of studied phytochemical characteristics in Sumac populations.

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۵ جمعیت سماق با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 4- Analysis of molecular variance of 5 Sumac populations using ISSR markers.

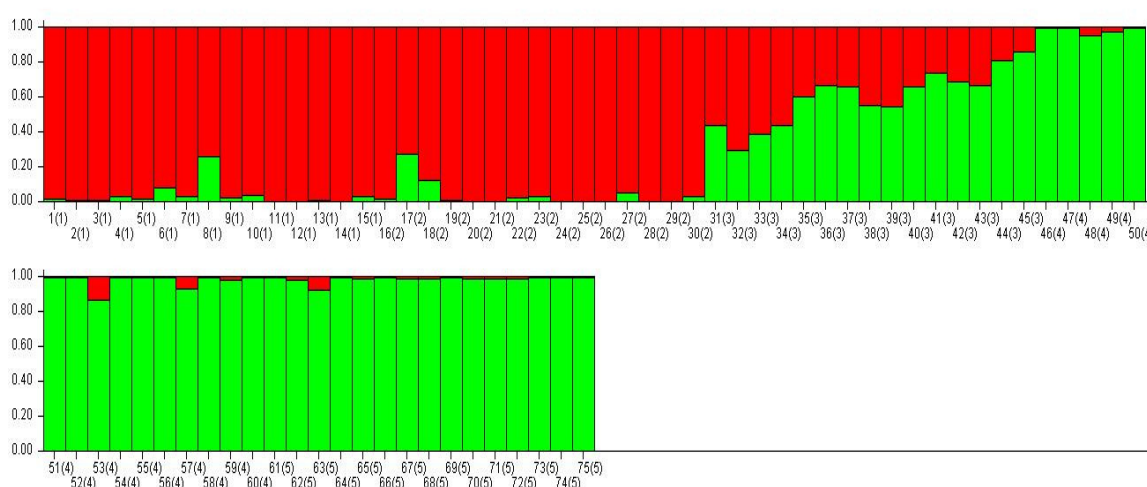
منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	واریانس برآوردی Estimated Variance	% Est. var.	آماره Stat	P(rand >= data)
بین جمعیتی Between population	4	594.533	148.633	8.495	29	PhiPT=0.286	0.010
درون جمعیتی Within population	70	1485.067	21.215	21.215	71		
کل Total	74	2079.6		29.71	100		

ژرم پلاسم سماق است تا بتوان درصد خطاهای مثبت را کاهش داد. ساختار یک جمعیت، حاصل انتخاب و در سطوح بالاتر اختلاط در آن جمعیت می باشد و منجر به افزایش عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای غیر پیوسته می شود (Cardon & Palmer, 2003; Rostok *et al.*, 2006). بنابراین در نظر گرفتن ساختار جمعیت در مطالعات تجزیه ارتباطی به منظور شناسایی واریانت های کمیاب در مکان هایی که بین جمعیت ها متغیر هستند، ولی بطور شایعی درون زیر جمعیت ها تثبیت شده اند، از اهمیت خاصی برخوردار می باشد (Flint-Garcia *et al.*, 2005). نتایج تجزیه ارتباطی برای صفات فیتوشیمیایی در ژنوتیپ های سماق در جدول ۵ ارائه شده است. در این تحقیق، از طریق روش MLM در مجموع تعداد ۳ نشانگر ISSR با هر یک از صفات مورد مطالعه پیوسته بودند (جدول ۵). ضریب تبیین (درصد واریانس فنوتیپی توجیه شده توسط هر نشانگر)

تجزیه مؤثر ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته بندی دقیق افراد به زیر جمعیت های مناسب با استفاده از داده های ۱۸ آغازگر ISSR شامل ۱۳۲ نشانگر ISSR در نرم افزار Structure انجام گرفت و ۲ زیر جمعیت احتمالی (K= ۲) در ژنوتیپ های مورد مطالعه شناسایی شد و K= ۲ به عنوان مقدار K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر گروه (ماتریس Q) تعیین شد. بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۳) در مجموع ۸۴ درصد ژنوتیپ های مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۱۶ درصد ژنوتیپ ها دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می باشند. با احتمال ۴۱ درصد، ۳۱ فرد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) و ۳۲ فرد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) می باشند. وجود ساختار در ژنوتیپ های مورد مطالعه بیانگر اهمیت استفاده از ماتریس ساختار جمعیتی در مطالعات مرتبط با تجزیه ارتباطی در

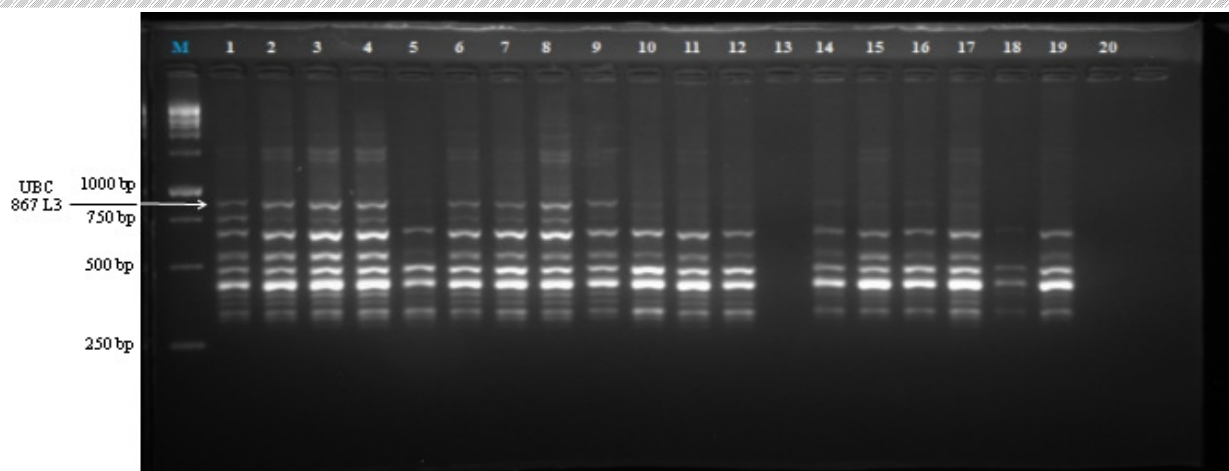
بادام هندی و با استفاده از ۸۵ خانواده تمام خواهری حاصل از تلاقی CCP1001×CP96 نشان داد که تعداد ۳، ۴ و ۴ QTLs در کنترل صفات وزن مغز، گل های نر و گل های همافرودیت نقش دارند.

نشانه های پیوسته با مالیک اسید، پروتوکاتکوئیک و کوماریک اسید به ترتیب ۰.۱۳٪، ۰.۹٪ و ۰.۱٪ می باشند (جدول ۵). بیشترین میزان ضریب تبیین مربوط به ارتباط سومین جایگاه ژنی نشانهگر UBC867 با عملکرد مالئیک اسید می باشد (شکل ۴). اگرچه در مورد مکان یابی ژنی در سماق گزارشی وجود ندارد ولی نتایج تحقیقات مکان یابی ژنی در گیاهان هم خانواده آن نظیر



شکل ۳- تجزیه ساختار جمعیتی مربوط به ۷۵ ژنوتیپ سماق (از ۵ ناحیه مختلف) به دو زیرجمعیت با استفاده از داده های حاصل از ۱۳۲ مکان ژنی تکثیر یافته توسط ۱۸ آغازگر ISSR. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می دهند.

Figure 3- Population structure analysis of 75 Sumac genotypes (from 5 different regions) into 2 sub-populations using data of 132 amplified loci by 18 ISSR primers. Digits on horizontal and vertical axis show individual number and individual affiliation coefficient to each cluster, respectively.



شکل ۴- الگوی بانندی ۳۰ نمونه سماق با آغازگر UBC867. شکل نمایانگر بانندی با اندازه تقریبی ۹۰۰ جفت باز است که ارتباط معنی داری با تولید مالئیک اسید دارد.

Figure 4- Banding profile of 30 Sumac genotypes using UBC867 ISSR primer. The position of band with 900 bp weight with significant association by malic acid production has been presented.

مشخص) با قابلیت اطمینان بیشتری از این نشانگرها در گزینش به کمک نشانگر (Marker-Assisted Selection) استفاده نمود (Osipova et al., 2003).

با توجه به غالب بودن نشانگر ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر، می توان با تبدیل نشانگرهای شناسایی شده به نشانگرهای هم بارز نظیر SCAR (ناحیه تکثیر شونده با ردیف

جدول ۵- نشانگرهای پیوسته شناسایی شده برای صفات فیتوشیمیایی از طریق تجزیه ارتباطی در جمعیت های سماق مورد مطالعه.

Table 3- Identified linked markers with phytochemical characteristics via association mapping in Sumac populations.

سطح احتمال محاسبه شده برای نشانگر Calculated probability level of marker	R ² (ضریب تبیین)	F نشانگر (F محاسبه شده برای نشانگر)	مکان نشانگری مرتبط Associated marker locus	ترکیب شیمیایی (Components)
0.002	0.13	9.92	UBC 867	مالیک اسید (Maleic acid)
0.007	0.1	7.5	UBC 864	پروتوکاتکوئیک اسید (Protocatechoic acid)
0.009	0.09	7.07	UBC 801	کوماریک اسید (Cumaric acid)

R²: Coefficient of determination

این پژوهش تجزیه ارتباط با تعداد نشانگر کم (تعداد ۱۳۲ نشانگر تولید شده با استفاده از ۱۸ آغازگر (ISSR) انجام گرفت که نوعی محدودیت برای تحقیق به حساب می آید. البته آغازگرهای زیادی تست شدند که با توجه به داشتن الگوی نواریندی واضح، ۱۸ آغازگر برای ادامه تحقیق انتخاب شدند. بنابراین لازم است در مطالعات تکمیلی با تغییر سیستم نشانگر این مشکل برطرف شود. در این مورد نشانگرهای مبتنی بر توالی یابی از قبیل SNP (چند شکلی تک نوکلئوتیدی) می توانند گزینه مناسبی باشند. هرچند که در مطالعات قبلی (Abdurakhmonov and Abdurakhmonov, 2008) نشان داده شده است که در گیاهان دگرگرده افشان سطح بالایی از نامتعادلی پیوستگی ژنی وجود دارد که این مسئله نیاز به تعداد زیاد نشانگر را کاهش می دهد.

از آنجائیکه محتوای مالیک اسید، پروتوکاتکوئیک و کوماریک اسید از مهمترین ترکیبات برای تعیین میزان خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و در کل خواص دارویی میوه سماق است با شناسایی نشانگرهای مرتبط با این ترکیبات می توان در جهت بهبود میزان تولید این ترکیب گام برداشت. به طوریکه با شناسایی مکان های مرتبط با میزان تولید کوماریک اسید که به عنوان شروع کننده مسیر تولید ترکیبات فنلی است می توان میزان تولید این ترکیبات را افزایش داد. البته باید این مطلب را در نظر داشت که تولید این ترکیبات تا حد زیادی تحت تاثیر عوامل محیطی مانند ارتفاع از سطح دریا و جهت عمومی دامنه رشدی و غیره قرار دارد که می توان در مطالعات بعدی این عوامل را نیز لحاظ کرد و یک ارتباط کانونی (تجزیه همبستگی کانونیک) را بوجود آورد. در

منابع

- Abdurakhmonov IY, Abdurakhmonov AA (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *International Journal of Plant Genomics* 574927.
- Ahmadian-Attari M, Amin G, Fazeli M, Jamalifar H (2008). A Review on antimicrobial activities of sumac fruit (*Rhus coriaria* L.). *Journal of Medicinal Plants* 1: 1-11
- Awais Khan K, Schuyler SK (2012). Association mapping in forest trees and fruit crops. *Experimental Botany* 63: 4045-4060.
- Cardon, LR, Palmer LJ (2003). Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet* 361: 598-604.
- Cavalcanti JJV, Costa dos Santos FH, Pereira da Silva F, Pinheiro CR (2012). QTL detection of yield-related traits of cashew. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 60-66.
- Heydari R, Sabouri A, Sabouri H, Fallahi HA, Dadras AR (2014). Identification of AFLP markers related to tolerance to flooding stress in barley. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 41-60.

- Dogan M, Akgul A (2005). Characteristics and fatty acid compositions of *Rhus coriaria* cultivars from southeast Turkey. *Chemistry of Natural Compounds* 41: 724- 725.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES (2005). Maize association population: A high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant Journal* 44: 1054-1064
- Hemati KH, Omidbeigi R. and Bashir Sadr Z (2003). Effect of climate and harvest time on the qualitative and quantitative characteristics of flavonoids of citrus varieties. Ph.D. Thesis, Tarbiat Modarres University.
- Hemati KH, Sharifani M, Kalati H. and Badiee P (2006). Flavenid content of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) in Iran. *ISHS Acta Hort.* 765: XXVII International Horticultural Congress -International Symposium on Plants as Food and Medicine: The Utilization and Development of Horticultural Plants for Human Health.
- Guvenc A, Koyuncu M. A (1994). Study on the main active compounds of leaves and fruits of *Rhus coriaria* L. *Turkish Journal of Medical Science* 20: 11-13.
- Lal S, Singh AK, Singh SK, Srivastav M, Singh BP, Sharma N, Singh NK (2017). Association analysis for pomological traits in mango (*Mangifera indica* L.) by genic-SSR markers. *Trees* 31: 1391-1409.
- Mavlyanov SM, Islambekov Sh Yu, Karimdzhanov AK, Ismailov AI (1997). Anthocyanins and organic acids of the fruits of some species of sumac. *Chemistry of Natural Compounds* 33:209-209.
- Najafzadeh R, Darvishzadeh R, Musa-Khalifani Kh, Abrinbana M (2016). Identification of retrotransposon-based (IRAP) loci associated with resistance to *Sclerotinia* stem rot disease (*Sclerotinia* spp.) in sunflower. *Journal of Agricultural Biotechnology* 8: 97-118.
- Osipova ES, Koveza OV, Troitskij AV, Dolgikh Yu I, Shamina ZB, Gostimskij SA (2003). Analysis of specific RAPD and ISSR fragments in maize (*Zea mays* L.) somaclones and development of SCAR markers on their basis. *Russian Journal of Genetics* 39: 1412-1419.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rawashdeh IM, Ghzawi AL, Rawasgdeh NQ, Kheirallah K, Al-Tawaha AR, Salama B (2009). Genetic variation among sumac (*Rhus coriaria* L.) samples collected from three locations in Jordan as revealed by AFLP markers. *Advances in Environmental Biology* 3: 107-112.
- Rostok N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR (2006). Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 18656-18661.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E, Attene G, Papa R, Negri V (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 1281-1291.
- Srivastava AW, and Shym S (2002). *Citrus: Climate and soil*. International Book Distributing Company, Lucknow, Uttar Pradesh, India, p. 559.
- Zhu CM, Gore E, Buckler S, Yu J (2008). Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1: 5-20.

Identification of DNA markers related to phytochemical characteristics in Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits

Mohammadi R.¹, Darvishzadeh R.^{2*}, Alijanpour A.³, Hatami H.⁴, Ebrahimi R.⁵

¹MSc., Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

²Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

³Associate Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

⁵M.Sc., Plant Breeding, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

Abstract

Sumac (*Rhus coriaria* L.), recognized in Iran and other areas of the Middle East as a very popular flavoring spice, contains a wide range of medicinally active components including organic acids, phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, hydrolyzable tannins and terpenoids. This plant species has suitable divergence in North West of Iran. In present research, samples of leaf and fruit of 15 sumac genotypes from each of 5 regions in north west Iran were conducted to fingerprinting using ISSR markers and also measuring Malic acid, Cumaric acid and Protocatechuic acid using LC-MS/MS. Inter population genetic diversity was higher than intra population variation for malic acid and Cumaric acid. Study of population structure of 75 sumac genotypes using 18 ISSR primers data including 132 ISSR markers and Structure software have divided them into two sub-populations. Results of association analysis revealed that markers including UBC867, UBC801 and UBC864 have significant association with genomic regions controlling Malic acid, Cumaric acid and Protocatechuic acid, respectively. Markers which identified in present study could be applied in sumac breeding programs.

Key words: Association mapping, genetic diversity, LC-MS/MS, Sumac.

* Corresponding Author: Darvishzadeh R.

Tel: 09149734458

Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir