مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در ارقام سیب بومی ایران (*Malus × domestica* .Borkh)

جواد فرخی[1و2]، رضا درویش زاده[3]، حمید حاتمی ملکی[*4]، لطفعلی ناصری[1]، فرهاد اصغری[1]

[1]گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[2]جهاد دانشگاهی واحد استان اردبیل

[3]گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[4]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰٤/۲٤، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۲

چکیده

در این مطالعه، انگشت‌نگاری ژنتیکی ٤٤ رقم سیب بومی ایران با استفاده از ١٦ جفت آغازگر ریز-ماهواره (SSR) انجام گرفته و سپس ارتباط این نشانگرها با ١٦صفت مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف بررسی شد. بر اساس داده‌های نشانگری، در مجموع ٤٥ آلل توسط ١٦ جفت آغاز ریزماهواره شناسایی شد. تعداد آل‌ها در هر مکان ریزماهواره بین ٢ الی ٥ عدد متغیر بود و متوسط تعداد آلل ٢/٨ به دست آمد. در این مطالعه میانگین تعداد آلل مؤثر ٢/٢ بود محتوای اطلاعات چندشکل از ٠/١٨(Hi03ao3) الی ٠/٧٦(CH03c02) نوسان داشت و میانگین آن ٠/٤٩ بود. برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های نشانگری (متغیرهای مستقل) و صفات مورد مطالعه (متغیرهای وابسته) انجام گرفت. نتایج تجزیه ارتباط نشان داد که برای سه صفت زاویه شاخه، شاخص کلروفیل و مساحت مقطع عرضی تنه هیچ نشانگر پیوسته‌ای وجود ندارد. با توجه به نتایج تجزیه ارتباط، سیزده صفت شامل وزن میوه، حجم میوه، طول میوه، قطر میوه، سفتی میوه، تعداد روز برای رسیدن، اسید آلی، میزان مواد جامد محلول، ویتامین ث، pH، اندازه برگ، طول میانگره‌ها و ارتفاع درخت دارای نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با آن‌ها بودند. بیش‌ترین تعداد الل (٦ عدد) برای صفت تعداد روز برای رسیدن و کمترین تعداد الل (١ عدد) برای صفات pH، وزن میوه، سفتی میوه و ارتفاع درخت مشاهده گردید. با توجه به پیوستگی برخی از آلل‌های ریزماهواره با برخی از صفات، می‌توان از این نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی سیب به طور موثری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *سیب، انگشت‌نگاری ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، تجزیه ارتباط.*

*نویسنده مسئول: حمید حاتمی ملکی تلفن: ۰۹۱٤۸۹٦٤٥۱۰ Email: hatamimaleki@maragheh.ac.ir

مقدمه

جنس سیب (*Malus*) از خانوادهٔ *Rosaceae* و زیرخانوادهٔ *Pomoideae*، آلوپلی‌پلوئیدی از دو خانوادهٔ *Spiroidea* (x=۹) و *Prunoideae* (x=۸) است که منجر به ایجاد پایه هاپلوئیدی (x=۱۷) در این زیر خانواده گردیده است (Lespinase *et al*., 1999). اکثر گونه‌های زراعی سیب (*Malus*× *domestica*. Borkh) دیپلوئید می‌باشند و این در حالی است که در داخل برخی از گونه‌ها سطوح مختلف پلوئیدی نیز دیده می‌شود (Way *et al*., 1989). سیب نه تنها به خاطر ارزش اقتصادی آن، همچنین به دلیل اندازه کوچک نسبی ژنومی‌اش (75Mb/hapliod) به صورت یک گونه مدل برای تحقیقات کاربردی ژنومی در اکثر نهاندانگان چوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Way *et al*., 1989). کشور ایران با تولید سالیانه حدود ۲ میلیون و ٤٣١ هزار ونهصد ونود تن سیب دارای رتبه پنجم تولید در جهان است (FAOSTAT, 2011). . علی‌رغم اهمیت این محصول در ایران کارهای اصلاحی زیادی در مورد افزایش مقاومت به بیماری‌ها، آفات و کیفیت محصول در ارقام بومی صورت نگرفته و بیشتر از ارقام شناخته‌شده خارجی (وارداتی) استفاده می‌شود. با توجه به ژرم پلاسم غنی سیب موجود در کشور، می‌بایستی مطالعه پس زمینه ژنتیکی صفات مورفولوژیک ارقام بومی را جدی‌تر دنبال نمود تا گام عمده‌ای در زمینه اصلاح سیب برداشته شود. یکی از ابزارهای شناخت ژنتیکی هر محصولی استفاده از نشانگرهای مولکولی است (Goldstein *et al*., 1995). نشانگرهای مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی سیب به کار رفته‌اند ولی هیچ یک از آن‌ها کارایی نشانگرهای SSR را نداشته‌اند. به طوری که اکثر کارهای تحقیقاتی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی سیب‌های بومی ایران با استفاده از نشانگر SSR انجام گرفته است (Naghshin *et al*., 2008; Gharghari *et al*., 2009; Jahromi-Shirazhi *et al*., 2009). شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات و گزینش به کمک نشانگر، ابزاری مناسب برای گزینش صفات با وراثت‌پذیری پایین و با قابلیت ظهور در مراحل انتهایی رشد و توسعه گیاه می‌باشند (Davies *et al*., 2006; Ender *et al*., 2008). مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورفولوژیک در سیب بر اساس تجزیه‌های مبتنی بر پیوستگی (Linkage-based analysis) و با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام گرفته است (Liebhard *et al*., 2002; Silfverberg-Dilworth *et al*., 2006). اولین گروه پیوستگی با استفاده نشانگرهای SSR به همراه نشانگرهای آیزوزایم و RFLP در یک جمعیت مشتمل بر ۱۵۲ دانهال حاصل از تلاقی ارقام Fiesta × Prima ایجاد شد که منجر به ارائه ۱۷ گروه پیوستگی ژنی گردید (Maliepaard *et al*., 1999). سالها پیش نقشه کامل ژنوم سیب با ۱۲۹نشانگر ریز ماهواره و تعداد زیادی از نشانگرهای غالب مثل AFLP و همچنین RAPD ایجاد گردیه است (Liebhard

(*et al*., 2002). با این وجود تهیه نقشه ژنتیکی به این روش محدودیت‌های خاص خود را دارد از جمله آن اینکه امکان مکانی‌یابی دقیق ژن‌ها و QTL ها مقدور نبوده، شناسایی نواحی کروموزومی مشکل‌تر بوده و احتمال بروز کراسینگ اور نیز در جمعیت در حال تفرق زیاد است. همچنین نیازمند تهیه جمعیت در حال تفرق است که نیازمند زمان بیشتری است (Abdollahi *et al*., 2010). بنابراین می‌توان با انجام یک آنالیز ارتباط از داده‌های فنوتیپی چند-ساله استفاده نمود. کارایی این آنالیز در مکان‌یابی و کنترل صفات مندلی در چندین محصول زراعی به اثبات رسیده است. برای مثال در بررسی ۵۵ لاین گندم با ۵۵ نشانگر ریزماهواره، ۳۸ نشانگر SAMPL و ٥٤ نشانگر AFLP ملاحظه شد که حداقل با یکی از ١٤ صفت زراعی مورد مطالعه مرتبط بوده و می‌تواند به عنوان نشانگر کارآمدی برای برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر این صفات معرفی شود (Roy *et al*., 2006). همچنین تجزیه ارتباط بر روی ٦٨ ژنوتیپ بادام‌زمینی ایرانی با ۱۳ جفت آغازگر SSR نشان داد که همه مکان‌ها بجز pPGPseq-2C11 روی صفات مورد مطالعه موثر بودند (Abdollahi *et al*., 2010). در مورد استفاده از تجزیه ارتباط برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در ارقام بومی و خارجی سیب گزارش‌های محدودی وجود دارد. در این پژوهش، پس از ثبت ژنوتیپی (با استفاده از نشانگرهای SSR) و ثبت فنوتیپی (در سه سال زراعی) ٤٤ رقم سیب شناخته‌شده ایرانی، نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیک با استفاده از تجزیه ارتباط شناسایی گردیدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ثبت فنوتیپی افراد: در این مطالعه، تعداد ٤٤ ژنوتیپ سیب با خاستگاه‌های مختلف از بانک ژن ایستگاه تحقیقات کشاورزی کهریز واقع در استان آذربایجان غربی انتخاب گردیدند (جدول ۱). درختان کاشته شده ده ساله بوده و در قالب طرح آماری آگمنت (هر بلوک ۱۷ ژنوتیپ با سه ژنوتیپ شاهد) کاشته شده بودند. فاصله کاشت ۵ در ۵ متر بود و انجام هرس و سایر مراقبت‌های زراعی بر اساس آنچه که برای تمام باغات سیب معمولی متداول است، اعمال شد. انتخاب ارقام از بلوک‌های مختلف صورت گرفت. تعداد ١٦ صفت مورفولوژیکی مختلف بر روی میوه، برگ و نیز خود درخت در محل باغ مورد بررسی قرار گرفت. صفات گیاهی و وسیله و روش اندازه گیری آن ها عبارت بودند از: وزن میوه (گرم) توسط ترازوی دیجیتالی، حجم میوه (سانتیمتر مکعب) توسط غوطه ورسازی در استوانه مدرج، طول و قطر میوه توسط کولیس دیجیتالی، سفتی میوه به وسیله حذف پوست میوه توسط سفتی سنج مگنس-تیلور مجهز به پروب ۸ میلی متری برای میوه های کوچک و ۱۱میلی متری برای اقسام بزرگ تر، تعداد روز برای رسیدن براساس تعداد روزهای لازم بعد از تمام گل تا اولین برداشت،

مـواد جامـد محلـول توسـط رفرکتـومتر دسـتی، ویتامین ث میوه (میلی گرم در صد میلـی لیتـر) و اسیدآلی میوه (گرم در ١٠٠ میلـی لیتـر) هـر دو توسـط روش توضـیح داده شـده (Rangana, 1977) ، pH میوه به وسیله pH متر، انـدازه بـرگ توسط دستگاه LAI متر، طول میانگره‌هـا، ارتفـاع درخت و مساحت مقطع عرضی تنه هر سه توسط متر نواری، زاویه شاخه با امتیاز دهی به صورت: [بسـته =١ ، نیمـه بـاز=٢ و بـاز=٣] و شـاخص کلروفیل(میلی گرم در صد گـرم) توسـط SPAD مدل (Japan, 502). اندازه‌گیری صفات بر اساس دیسکریپتور مخصوص برای این محصول و زیـر نظر معیارهای پذیرفته‌شده سازمان تحقیقات جهاد کشاورزی بود. در این مطالعـه، بـه دلیـل مبـارزه شیمیایی با آفات و بیماری‌های درختـان موجـود درکلکسیون، به بررسی آن‌ها پرداخته نشد.

جدول ١- اسامی ٤٤ رقم سیب مورد مطالعه بر اساس دیسکریپتور.

Table 1- The Names of 44 studied apple cultivars based on descriptor.

رقم	Cultivar	رقم	Cultivar	رقم	Cultivar	رقم	Cultivar
1	Kochkine	12	Israeili-e Malayer	23	Kokle	34	Manoochehri
2	Golab-e Nemat Yazd	13	Meshki-e damanande 2	24	Torsh-e Sefid	35	Morooti-e Shemiran
3	Golab-e Damavande 2	14	Tokhme Morgi Sarein	25	Sheikh Ahmad	36	Shahrood-e 21
4	Tabestan-e Rostam	15	Dirras-e Mashhad	26	Sore paeize	37	Boshgabi-e Torsh
5	Shahriar-e 2	16	Golab-e damavand e3	27	Ilame 4	38	Sifehshirin
6	Boshgabi-e Talegan	17	Paeiz-e Boomi Ahar	28	Ferdose Shahriar	39	Sibgolab-e Germez
7	Chaharmahal-e 5	18	Chaharmahal-e 3	29	Damavand-e 1	40	Beigi
8	Zanjan-e 12	19	Sattari	30	Golden Asiaie	41	Shahrood-e 19
9	Salmas 4	20	Zanjan-e2	31	Hamadan-e 3	42	Illam 2
10	Zanjan-e14	21	Golden-e Canadaei	32	Meshki-e Germez	43	Talkh-e arak
11	Panbeiy- e domazeh	22	Germez-e Gillan	33	Torsh Alma	44	Sor-e derige

استخراج DNA ژنـومی: اسـتخراج DNA از بـرگ بـا اسـتفاده از روش (Dellaporta *et al.*, 1983) انجـام شـد. کیفیـت DNA ژنـومی اسـتخراجی بـه وسـیله الکتروفـورز ژل آگـارز ١ درصد تعیین گردیـد. از بـین ٦٠ جفـت آغـازگر SSR تعداد ١٦ جفت بر اساس الگوی چندشکلی اولیه انتخاب گردیدنـد (جـدول ٢). آغازگرهـای سـری CH عمـدتاً توسـط (Liebhard *et al.*, 2002) توسعه یافته‌اند. هر ٤ آغـازگر بکـار رفتـه سری Hi دارای توالی تکراری کامـل بـه صـورت (AG/CT)n می‌باشند که توسـط (Silfverberg - Dilworth *et al.*, 2006) طراحی شده‌اند (جدول ٣). ثبت ژنوتیپی افـراد بـا نشـانگر ریـز مـاهواره: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مـراز (PCR) در حجـم ٢٥ میکرولیتر شـامل ١٢/٥ میکرولیتـر کیـت PCR از شـرکت سـیناژن [٢٠٠ میلـی‌مـولار Tris-Hcl بـا pH=8.55، ١٦٠ میلی‌مـولار SO4 2(NH4) یـک درصـد، ٣ میلـی‌مـولار $MgCl_2$، ٠/٤ میلـی‌مـولار

dNTPs و (یـــک واحـــد)U ۱ Taq DNA] polymerase، ۱ میکرومولار از هر آغـازگر و ۵۰ نـانوگرم از DNA الگـو در دسـتگاه ترموسـایکلر ®(PerkinElmer–Applied Biosystems) انجام گرفت. الگوی دمـایی مـورد اسـتفاده در واکـنش PCR عبارت بود از: یک چرخه ۹۵°C به مدت ۲ دقیقـه بـرای واسرشـت سـازی اولیـه DNA، ۳۵ چرخه شامل: به ترتیب ۹۳°C به مـدت ٤٥ ثانیـه دمای واسرشت سازی، ۵۰°C تا ۵۵ دمای اتصال (بسته به هر جفت آغازگر) به مـدت ٦٠ ثانیـه و ۷۲°C دمای گسترش به مدت ٤٥ ثانیه و بالأخره در انتها جهت تکمیل مرحله گسترش یک چرخه ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید.

جدول ۲- توالی معکوس و پیشرو آغازگرهای بکار رفته در این مطالعه.

Table 2 - Reverse and Forward Sequences of used primers for this study.

آغازگر Primer	توالی معکوس Reverse Sequence	توالی پیشرو Forward Sequence
CH03g12z	GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT	CAAGGATGCGCATGTATTTG
CH02h11a	CGTGGCATGCTTATCATTTG	CTGTTTGAACCGCTTCCTTC
CH03e03	GCACATTCTGCCTTATCTTGG	AAAACCCACAAATAGCGCC
CH05d11	CACAACCTGATATCCGGGAC	GAGAAGGTCGTACATTCCTCAA
CH05d04	ACTTGTGAGCCGTGAGAGGT	TCCGAAGGTATGCTTCGATT
CH05e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAGTTGTTGTACTGCTCCGAC
3	CACCTGACCTTCTCTCTACCTCTAC	CAACTCCCCTTATTCTTCTTCTCTC
Md-Exp7	CATAGAAGGTGGCATGAGCA	TTTCTCCTCACACCCAAACC
2	AAGACTCACAAACTAGCTGTCAAAT	TGCTCCTCTCTAGCTATTGCATAAT
Hi03e03	ACGGGTGAGACTCCTTGTTG	GTTTAACAGCGGGAGATCAAGAAC
Hi01d06y	GGAGAGTTCCTGGGTTCCAC	AAGTGCACCCACACCCTTAC
CH04a12	CAGCCTGCAACTGCACTTAT	ATCCATGGTCCCATAAACCA
CH03d12	GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCATAAAGGG
Hi03ao3	ACACTTCCGGATTTCTGCTC	GTTTGTTGCTGTTGGATTATGCC
CH03c02	TCACTATTTACGGGATCAAGCA	GTGCAGAGTCTTTGACAAGGC
Hi02d04	TGCTGAGTTGGCTAGAAGAGC	GTTTAAGTTCGCCAACATCGTCTC

فراورده‌های PCR پس از اضـافه نمـودن ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری بـه آن‌هـا، توسـط ژل آگارز ۳ درصد از همدیگر تفکیـک شـدند. بـرای اطمینان از انـدازه آللـی هرمکـان ژنـی و درسـتی تکثیر آن ها از نشانگر وزن مولکولی ۱kb در هـر ژل اسـتفاده شـد. انـدازه قطعـات نشـانگر وزن مولکولی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ bp متغیـر بـود. رنـگ امیزی و عکـس‌بـرداری از ژل‌هـا بـه ترتیـب بـا اسـتفاده از مـاده اتیـدیوم بروماید (1µg/ml) و دسـتگاه ژل داک (Gel Logic 212 PRO, USA) صورت گرفت.

جدول ۳- دامنه اندازه آللی، تعدادآلل ،تعدادآلل‌های موثر و محتوای اطلاعاتی حاصل از چندشکلی ارقام تحت بررسی.

Table 3- Size range of alleles, number of alleles, number of effective alleles and polymorphic information content (PIC) values of studied cultivars.

آغازگر Primer	دامنه اندازه آللی Size range of alleles (bp)	تعداد آلل‌ها No. of alleles	تعداد آلل‌های موثر No. of effective alleles	محتوای اطلاعات حاصل از چند شکلی (PIC)
CH03g12z	154-200	3	2.59	0.63
CH02h11a	104-132	2	1.4	0.28
CH03e03	106-216	2	1.94	0.48
CH05d11	171-211	3	2.22	0.55
CH05d04	174-214	3	2.28	0.62
CH05e03	158-190	3	2.17	0.57
3	170	3	2.75	0.63
Md-Exp7	-	2	1.56	0.36
2	205	2	1.52	0.35
Hi03e03	160-228	2	1.74	0.41
Hi01d06y	115-166	3	2.78	0.65
CH04a12	158-196	3	1.94	0.50
CH03d12	108-154	3	1.46	0.31
Hi03ao3	160-228	3	2.72	0.18
CH03c02	116-136	5	3.68	0.76
Hi02d04	224-250	3	2.56	0.60
میانگین (Average)		2.81	2.20	0.49

تجزیه داده‌ها

امتیازدهی الگوی باندها، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار انجام شد. شاخص PIC با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum P_i^2$ محاسبه گردید. در این فرمول Pi فراوانی آلliام در یک مکان مشخص است. تعداد آلل موثر برای هر جایگاه ریزماهواره‌ای به کمک نرم‌افزار Popgene نسخه ۱/۳۱ (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه شد. برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام با در نظر گرفتن نشانگرها به عنوان متغیر مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ (Levesque, 2007) انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که همه مکان‌های ریزماهواره مورد استفاده دارای الگوی نواری چندشکل می‌باشند. چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره در ارقام

تحت بررسی با بررسی‌های(Guilford *et al.*,1997; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) مطابقت داشت. در مجموع، ٤٥ آلل توسط آغازگرهای ریزماهواره‌ای تولید شد (جدول ۲). متوسط تعداد آلل، ۲/۸ در هر مکان ژنی به دست آمد (جدول ۲). این ارزش عددی مشابه با متوسط تعداد آلل‌های SSR به دست آمده در مورد گیاهان خود گرده‌افشان و یک ساله مانند گوجه‌فرنگی ۱/۵ تا ۳/۱ آلل در هر مکان ژنی (Broun and Tanksly, 1996)، گندم ۳/۸ آلل (Devos *et al.*, 1996) سورگوم ۲/۳ آلل (Brown *et al.*, 1996) خیار ۲/٦ تا ۲/۹ (Katzir *et al.*, 1996) و هندوانه ۲ آلل در هر مکان ژنی (Jarret *et al.*, 1996) است. در این تحقیق، بیش‌ترین تعداد آلل (۵) در مکان ژنی CH03c02 مشاهده شد که اندازه آن‌ها بین ۱۱٦ الی ۱۳٦ جفت باز متغیر بود (جدول۲). از طرفی تعداد آلل‌های ایجاد شده خیلی کمتر از موارد گزارش شده با استفاده از این آغازگرها در مطالعات قبلی بود (Liebhard *et al.*, 2002; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). فقط تعداد آلل مربوط به مکان ژنی CH03c02، با مطالعات قبلی در توافق بود. علیرغم اینکه سیب گیاهی دگرگرده-افشان است و انتظار می‌رود که تعداد آلل‌های بالایی را در هر مکان ژنی نشان دهد (Gianfrancesch *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998)، نتایج نشان داد که تعداد آلل به دست آمده در مقایسه با مقادیر محاسبه شده در تحقیقات قبلی پایین است. نتایج نشان داد که میانگین تعداد آلل موثر ۲/۲ است که از ۱/٤ در مکان ژنی CH02h11a الی ۳/٦۸ در مکان ژنی CH03c02 متغیر است (جدول۲). شاخص PIC نشان‌دهنده تعداد زیاد آلل و چندشکلی بالا است (Powell, 1996). در تحقیق حاضر کمترین مقدار محتوی اطلاعات چندشکل (PIC) در مکان ژنی Hi03ao3 (۰/۱۸) و بیشترین مقدار آن در مکان ریزماهواره‌ای CH03c02 (۰/۷٦) مشاهده گردید. میانگین PIC، ۰/٤۹ می‌باشد که دلالت بر ظرفیت نسبتاً متوسط آغازگرهای مورد استفاده در توجیه چندشکلی موجود در ژرم پلاسم سیب دارد (جدول۲). در مطالعه‌ای که روی ارقام سیب گلاب ایرانی انجام گردید، مقدار شاخص PIC در محدوده ۰/۳۷ تا ۰/۷۷ و با میانگین ۰/٦۸ گزارش گردید (Naghshin *et al.*, 2008). همچنین در تحقیقی دیگر که بر روی ۲٤ ژنوتیپ سیب بومی ایران و ۵ پایه بومی و خارجی سیب انجام گرفت، متوسط شاخص PIC، ۰/۸ به دست آمد (Jahrommi- Shirazhi *et al.*, 2009).

نتایج تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره و ارزش فنوتیپی آن با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به گام برای شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات در سیب در جدول ٤ درج شده است. نتایج تجزیه واریانس رگرسیون نشان داد که اکثر مکان‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه با ۲ یا ۳ صفت مورفولوژیک در ارتباط می‌باشند (جدول ٤). در این مطالعه، صفات زاویه شاخه، شاخص کلروفیل و قطر تنه رابطه معنی‌دار با هیچ یک از

نشانگرهای SSR نداشتند. در مجموع ٤٥ آلل از ١٦ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده ارتباط معنی-دار با تغییرات ١٣ صفت داشتند. صفت تعداد روز تا رسیدن میوه با ٦ آلل و صفات ارتفاع درخت، وزن میوه، سفتی میوه و pH هریک با ١ آلل به ترتیب بیش‌ترین و کمترین تعداد آلل مرتبط را داشتند(جدول ٤). مکان ژنی ٣ با صفات حجم میوه، وسعت پهنای برگ (اندازه برگ) و تعداد روز برای رسیدن پیوستگی زیادی (بالای ٠/٨٠) نشان داد (جدول٤). احتمال می‌رود که این مکان با عوامل ژنی دخیل در تولید میوه درشت، قرمز خوش‌رنگ و دیررس در ارتباط باشد. نشانگرهایی که بیش‌ترین و حتی کمترین درصد تغییرات را در این تحقیق توجیه می‌نمودند، در گروه‌های پیوستگی ٣، ٢، ٦ و ١٢ حاصل از نقشه ژنتیکی سیب قرار دارند (Silfverberg - Dilworth *et al.*, 2006; Liebhard *et al.*, 2002). در این تحقیق، صفت ارتفاع درخت با آلل دوم مکان ژنی CH03d12 پیوستگی دارد (جدول ٤) که این مکان ریزماهواره‌ای روی گروه پیوستگی ١١ در ژنوم سیب قرار دارد (Liebhard *et al.*, 2002). این مکان ژنی ٢٣درصد تغییرات مربوط به صفت ارتفاع درخت را کنترل می‌نماید (جدول ٤).

تحقیقات قبلی نشان داده که مکان‌های ریزماهواره‌ای CH03d11 و CH02a010 مسئول رشد ستونی درخت بوده که به ترتیب در روی کروموزوم‌های ١٠ و ١٥ قرار دارند (Sheng and Bao, 2005). تمامی این نشانگرها بجز نشانگر CH03e03 دارای توالی تکراری کاملی هستند. سری نشانگرهای Hi در سیب، به خاطر استفاده بیشتر از تکرارهای دو نوکلئوتیدی (GT, AG) درجه چندشکلی بالایی دارند (Silfverberg - Dilworth *et al.*, 2006). در این بین فقط جفت آغازگر Hi03e03 دارای ٢ آلل است. در این تحقیق نیز همانند گزارشات قبلی (Selvaraj *et al.*, 2009) گروه بندی خاصی بین مکان‌های ژنی توجیه کننده صفات روی کروموزوم‌ها وجود ندارد بطوریکه یک کروموزوم می‌تواند حامل نشانگرهای مرتبط با برخی صفات بوده و این در حالی است که همان کروموزوم ممکن است با صفات دیگر پیوسته نباشد. در داخل یک مکان ژنی منفرد نیز سطوح آللی تاثیرهای مختلفی بر روی صفات دارد. برای مثال آلل سوم مکان ژنی CH03g12z که کمترین ارتباط را با سفتی میوه دارد درحالی‌که آلل اول همان مکان ژنی بیش‌ترین پیوستگی را با صفت حجم میوه نشان می‌دهد. مکان‌های مشترک برای برخی صفات شاید به دلیل پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد.

جدول ٤- نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام بین صفات مورفولوژیک و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با ارقام مورد مطالعه.

Table 4- Results of stepwise regression between morphological and molecular data to define informative markers with studied genotypes.

صفات گیاهی	مکان ژنی Locus	R^2 تصحیح شده Adgusted R^2	سطح معنی دار P-value
وزن میوه (g) Fruit weight	CH05e031	0.42	0.001
حجم میوه(cm^3) Fruit volume	CH03g12z-1, 3-1, Md-Exp7-2, CH05e03-1	0.84	0
طول میوه Fruit length (mm)	Hi03a03-1, CH05e03-1	0.35	0.008
قطرمیوه Fruit diameter (mm)	CH04a12-3, Hi02d04-2	0.34	0.009
سفتی میوه Fruit firmness	CH03g12z-3	0.18	0.032
تعداد روز تارسیدگی Days to ripening	Hi02d04-2, 3-1, Md-Exp7-2, CH04a12-3, CH04a12-2, Hi02d04-3	0.73	0
اسید آلی(g/100ml) Organic Acid	2-1, Hi03a03-1, 3-1	0.57	0
مواد جامد محلول TSS (Brix)	CH03e03-2, CH03d12-3, CH05e03-2, Hi03a03-2	0.71	0
ویتامین ث Vitamin C (mg/100ml)	Hi01d06y-1, Hi02d04-1, CH05e03-2	0.56	0
پ هاش pH	Hi01d06y-1	0.19	0.026
اندازه برگ Leaf size	CH04a12-1, CH05d04-2, 3-1, CH03g12z-1, Md-Exp7-2	0.82	0
طول میان گره‌ها Internodes length (mm)	Hi03a03-3, CH03e03-1, CH05e03-2, CH05d04-1, Hi03a03-2	0.9	0
ارتفاع درخت(mm) Tree height	CH03d12-2	0.23	0.015

نتیجه گیری کلی

تهیه نقشه ژنتیکی و شناسایی QTL ها در درختان چوبی چندساله براحتی محصولات زراعی عمدتا یکساله یا دو ساله صورت نمی گیرد. بنابراین می‌توان با استفاده از تجزیه ارتباط از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده نمود. با توجه به اینکه مکان های ریزماهواره ای مورد مطالعه بر روی صفات مورد مطالعه موثر بودند، بنابراین احتمال دارد تا بتوان از این مکان های ژنی در برنامه های اصلاحی برای شناسایی والدین برای تهیه جمعیت های نقشه یابی و نیز تولید هیبرید استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا مراتب تشکر و قدردانی خویش را از کارکنان محترم سازمان تحقیقات کشاورزی کهریز واقع در ارومیه و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه

ارومیه به دلیل فراهم آوردن مواد گیاهی و امکانات لازم، به عمل آورند.

منابع

Abdollahi Mandolkani B, Alami A, Esfahani A (2010). Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Iranian Journal of Crop Sciences 12: 510-519 (In Farsi).

Broun P, Tanksley SD (1996). Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. Molecular Genetics and Genomics 250: 39-49.

Brown AHD (1996). The core collection at the crossroads. In: Hodgkin T, Brown AHD, Hintum TJL, Morales EAV, (eds.) Core Collections of Plant Genetic Resources. (pp: 3-19). John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Dellaporta SL (1983). Aplant minipreparation. Plant molecular Biology Report 1: 19-21.

Devos KM, Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Gale MD (1996). Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 90: 247-252.

FAOSTAT (2011). Agricultural Statistical Database, available online at: http:// faostat.fao.org

Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie NC, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner SE (2009). Genetic identity and relationships of Iranian apple(*Malus*× *domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeats (SSR) marker analysis. Genetic Resource and Crop Evolution 1-14.

Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998). Simple Sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theoretical and Applied Genetic 96: 1069- 1076.

Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics 139: 463-471.

Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R (1997). Microsatellites in *Malus* domestica (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 94: 249-254.

Hokanson SC, McFadden AK, Lamboy WF, McFerson JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus*× *domestica* borkh core subset collection. Theoretical and Applied Genetics 97: 671-683.

Jahromi Shirazi R, Kheshavarzi M, Nhaghavi MR (2009). Identification of some cultivar and stocks of apple using SSR. Journal of Biotechnology 1(2): 17-27.

Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, Aradhya MK (1996). Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum, Nakai]. Genome 40: 433-441.

Katzir N, Danine-Poleg Y, Tzur G, Karchi Z, Lavi U, Cregan PB (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. Theoretical and Applied Genetics 93: 1282-1290.

Lespinase Y, Bounenir L, Djublic M, Cherveau E (1999). Haploidy in apple and pear. Acta Horticulture 484: 49-54.

Levesque R (2007). SPSS Programming and Data Management: A Guide for SPSS and SAS Users, Fourth Edition,SPSS Inc. Chicago

Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder CD, Tarchini R, Van DeWeg E, Gessler C (2002). Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus*× *domestica* Borkh.). Molecular Breeding10: 217-241.

Maliepaard C, Alston FH, Van Arkel G, Brown LM, Chevrea E, Dunemann F, Evans KM, Gardiner S, Guilford P, van Heusden AW, Janse J, Larens F, Lynn JR, Manganaris AG,

den Nijs APM, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmnidt H, Tartarini S, Verhaegh J,Vrielink-van Ginkel JM, King GJ (1998). Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mil.) using multi-allelic markers. Theoretical and Applied Genetics 97: 60-73.

Naghshin F, Bahari M, Sheid Tabatabaie B, Najjari KH (2008). Evaluation of genetic diversity among Iranian apple cultivars and landraces using sequence repeat markers. Journal of Horticultural 9: 69-82.

Powell W, Machray GC, Provan J (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in plant Science 1: 215-222.

Rangana S (1977). Manual for analysis of fruit and vegetable products, Tata McGraw Hill Co. Pvt. Ltd., New Dehli. pp.5.

Roy, JKR, Bandopadhyay S, Rustgi HS, Balyan PK, Gupta (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science 5: 683-689.

Selvaraj MG, Narayana AM, Schubert JL, Ayers, MR, Burow MD (2009). Identification of QTLs for pod and kernel traits in cultivated peanut by bulked segregant analysis. Electronic Journal of Biotechnology 2: 1-10.

Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg WE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, SoglioV, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Simioniuc D, Uptmoor R, Friedt W, Ordon F (2006). Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. Plant Breeding 121: 429-435.

Way RD, Aldwinckle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S, Shen T, Watkins R, Westwood MN, Yoshida Y (1989). Apples (*Malus*). Acta Horticulture 290: 49-54.

Yeh, FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xian JM (1999). POPGENE version 3.1. http://www.ualberta.ca/-fyeh/fyeh.

Identification of microsatellite markers linked to morphological and biochemical traits in Iranian native apple (*Malus* × *domestica* .Borkh) cultivars

Farrokhi J.[1,2], Darvishzadeh R.[3], Hatami Maleki H.[*4], Naseri L.[1], Asghari F.[1]

[1]Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Ardabil branch
[3]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran
[4]Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran

Abstract

In this study, genetic fingerprinting of 44 Iranian native apple cultivars were done using 16 simple sequence repeat pairs of primers and then the association of these markers with 16 morphological and biochemical traits were inspected. Based on marker data, 45 alleles were identified using 16 SSR pairs of primers. The number of allele per SSR locus was varied between 2 to 5 with mean of 2.8. Here in, the mean of number of effective allele was 2.2. Polymorphism information content ranged from 0.18 to 0.76 with mean of 0.49. To identify positive markers associated with studied traits, step wise regression was done among marker data as independent variables and studied traits as dependent variables. Results revealed that there is not any linked marker for traits including chlorophyll index, angle of branch and trunk cross sectional area. Considering to association analysis, thirteen traits include fruit volume, fruit diameter, fruit weight, fruit length, fruit firmness, days to ripening, organic acid content, total soluble solids, vitamin C, pH, leaf size, internodes length and tree height had linked SSR markers. The maximum number of allele (6 alleles) was seen for days to ripening and minimum number of allele (1 allele) was seen for traits including PH, fruit weight, fruit firmness and tree height. Regarding linkage between some SSR alleles with some traits, this is possible to use these markers in apple breeding programs effectively.

Keywords: *Apple, Genetic fingerprinting, microsatellite marker, Association analysis*

[*] Corresponding Author: Hatami Maleki H. Tel: 09148964510 Email: hatamimaleki@maragheh.ac.ir