

## بررسی تنوع ژنتیکی سیب‌های بومی ایران با استفاده از نشانگر SSR

### Genetic Diversity Survey of Iranian Native Apples (*Malus domestica*) Genotypes Using SSR Markers

جواد فرخی<sup>۱</sup> و لطف‌علی ناصری<sup>\*۱</sup>

#### چکیده

تنوع ژنتیکی ۴۴ رقم سیب از مناطق مختلف ایران به کمک ۱۶ جفت نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. در کل ۴۵ آلل در بین ارقام شناسایی شد. تعداد آلل‌ها در هر مکان ژنی از ۲ تا ۵ عدد متغیر و با متوسط ۲/۸ بود. میانگین تعداد آلل موثر ۲/۲، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۵۲ و ۰/۴۵ برآورد گردید. با توجه به آزمون کای اسکور در هر مکان ژنی نتیجه‌گیری گردید که جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ پیروی نمی‌کند. محتوی اطلاعات چند شکل از ۰/۱۸ تا ۰/۷۶ متغیر بود که دلالت بر ظرفیت بالای برخی نشانگرها در تفکیک و تمایز افراد دارد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ارقام مورد مطالعه در دو گروه اصلی قرار گرفتند. بر این اساس بیش‌ترین شباهت ژنتیکی بین ارقام "سلماس ۴" و "دیررس مشهد" و کم‌ترین میزان آن بین ارقام "مشکی دماوند ۲" و "سیفه شیرین" مشاهده گردید. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در اتخاذ تدابیر اصلاحی سیب مفید واقع شود. در مطالعات تنوع ژنتیکی و اصلاح سیب، به‌علت طولانی بودن دوره نو نهالی و وجود شرایط ویژه درختان میوه، به‌نظر می‌رسد که استفاده از نشانگرها با درجه چند شکلی بالا و درعین حال متصل به صفات خوب مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آغازگر ریزماهواره، سیب، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

\* نویسنده مسوول

گزارش گردید (هوکانسون و همکاران 2001). در کار دیگری در پروژه EU (Hidras 2003-2007)، حدود ۳۵۰ رقم مختلف سیب از سراسر اروپا با حدود ۸۰ نشانگر SSR انگشت‌نگاری گردید. اطلاعات این آغازگرها و محل دقیق آنها در ژنوم سیب در سایت [www.Hirras.com](http://www.Hirras.com) موجود است (Silfverberg-Dilworth *et al.* 2006). در بررسی دیگری جهت شناسایی روابط مولکولی ۶۶ رقم سیب تجاری از ۶ آغازگر SSR استفاده شد که تولید ۵۵ آلل چندشکل با محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) ۰/۷۲ و میانگین آلل ۹/۲ در هر مکان ژنی نمودند (Gábor *et al.*, 2005). نشانگرهای SSR علاوه بر روابط ژنتیکی داخل ارقام یک گونه، در بررسی روابط گونه‌های وحشی با ارقام زراعی سیب نیز کاربرد دارند. به طوری که اخیراً با استفاده از نشانگر SSR پیشنهاد گردیده است که سیب‌های ایران ممکن است واسطه سیب‌های زراعی با گونه‌های وحشی بوده و ایران می‌تواند در اهلی سازی و انتقال سیب از آسیای شرقی به کشورهای غربی نقش اساسی داشته باشد (Gharghani *et al.* 2009). این نشانگرها را می‌توان در رده‌هایی که از نظر تاکسونی بهم شبیه‌اند نیز به کار برد. به عنوان مثال می‌توان از نشانگرهای ریز ماهواره سیب جهت شناسایی ارقام گلابی استفاده کرد (Yamamoto *et al.* 2001). در این پژوهش قرابت و خویشاوندی سیب‌های بومی ایران با یکدیگر و با برخی ارقام متداول خارجی بررسی گردید. ارقامی که قبلاً در مطالعات پیشین کم‌تر بررسی شده بود در این مطالعه به آنها پرداخته شده است. داشتن اطلاعات اولیه از جایگاه هر رقم و فاصله ژنتیکی و میزان قرابت آنان در اتخاذ تدابیر اصلاحی مفید واقع خواهد شد. مطالعات دیگری نیز در زمینه سیب‌های بومی ایران و پایه‌های سیب انجام شده است که می‌توان به مواردی مانند: ارشادی و همکاران (۲۰۰۲)، نقشین و همکاران (۲۰۰۸)، جهرمی شیرازی و همکاران (۲۰۰۹) و ناصری و همکاران (۲۰۱۱) اشاره نمود.

## مواد و روش ها

### مواد گیاهی و استخراج DNA

چهل و چهار رقم سیب با خاستگاه‌های مختلف از بانک ژن ایستگاه تحقیقات کشاورزی کهریز ارومیه انتخاب گردید (جدول ۱). استخراج DNA از برگ ارقام بر اساس دستورالعمل تغییر یافته (Dellaporta *et al.* 1983) صورت گرفت. کیفیت DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی

میزان تولید سالیانه سیب در کشور حدود ۲ میلیون و ۷۰۰ هزار تن بوده و از این نظر ایران دارای رتبه چهارم تولید می‌باشد (FAO. 2004). اکثر ارقام سیب زراعی ایران متعلق به *Malus × domestica* Borkh می‌باشند. به دلیل نزدیکی ایران به خاستگاه سیب در ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان تنوع ژنتیکی زیادی در رقم‌های سیب ایرانی مشاهده می‌شود (Juniper *et al.* 1999). تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژنی و اجرای برنامه‌های به‌نژادی است. والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند، هیبریدهایی با هتروزیس بیش‌تر تولید می‌کنند و احتمال به‌دست آوردن نتاج نوترکیب متجاوز افزایش می‌یابد. از طرف دیگر تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم به اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا از دوباره‌کاری در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها خودداری نمایند. به منظور تخمین تنوع ژنتیکی انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاح‌گران گیاهی استفاده می‌شوند که از جمله آنها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی دارای فراوانی نسبی زیادی هستند و کم‌تر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند از این رو مناسب‌ترین نوع نشانگرها در پژوهش‌های نوین محسوب می‌شوند (Hokanson *et al.* 1998). استفاده از نشانگرهای DNA شامل دو روش مبتنی بر هیبریداسیون و مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) Polymerase Chain Reaction می‌باشد. Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP) یکی از نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون بوده که برای بررسی و شناخت ارقام و پایه‌های سیب استفاده گردید (Waton *et al.* 1991 & Nybom *et al.* 1990). نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) نوعی از نشانگرهایی هستند که سطوح بالای تنوع آللی، توارث هم‌بارزی و قابلیت ماشینی شدن، آنها را به یک نشانگر ایده‌آل در بررسی‌های ژنوتیپی، تهیه نقشه و کلون ژن تبدیل نموده است (Hokanson *et al.* 1998). نشانگرهای SSR در مطالعات ژنتیکی و انگشت‌نگاری گونه‌های درختان میوه دانه‌دار مانند سیب و گلابی نسبت به سایر نشانگرها کاربرد وسیع‌تری دارند (Gianfranceschi *et al.* 1998). در بررسی ۱۴۲ رقم از ۲۳ گونه سیب از منابع ژنتیک گیاهی USDAARS با ۸ نشانگر SSR سطح بالای تنوع با متوسط ۲۶/۴ آلل در هر مکان ژنی

میلی مولار  $MgCl_2$  ۰/۴، میلی مولار dNTPs و (یک واحد آنزیم) Taq DNA polymerase ۱U] از شرکت سیناژن، ۱ میکرومولار از هر آغازگر و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو در دسگ تگه ترموس\_\_\_\_\_ایکلر® (PerkinElmer–Applied Biosystems) انجام گرفت. الگوی دمایی مورد استفاده در واکنش PCR عبارت بود از: یک چرخه  $95^{\circ}C$  به مدت ۲ دقیقه برای شروع واسرشت سازی DNA، ۳۵ چرخه شامل  $93^{\circ}C$  به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ( $50^{\circ}C$  تا  $55^{\circ}C$ ) (بسته به هر آغازگر به مدت ۶۰ ثانیه و دمای گسترش  $72^{\circ}C$  مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک چرخه  $72^{\circ}C$  به مدت ۱۰ دقیقه جهت تکمیل بسط.

به فراورده های PCR، ۱۰ میکرولیتر محلول لودینگ بافر اضافه شده و روی ژل آگاروز ۳ درصد در (45mM Tris base, 45mM boric acid, 1mM EDTA pH 8.0) TBE 0.5X (نیم برابر غلظت) به کمک دستگاه® (Biorad – Powerpack) الکتروفورز گردید.

گردید و از بین ۶۰ آغازگر SSR تعداد ۱۶ جفت آغازگر بر اساس الگوی پلی مورفیسم اولیه و هم چنین پیوستگی با برخی صفات مطلوب انتخاب شد (جدول ۲). آغازگرهای CH عمدتاً توسط (Liebhard *et al.* 2002) توسعه یافته اند. در سری (Hi) که توسط سیلفوربرگ دیپورت و همکاران (2006) منتشر شده اند هر ۴ آغازگر به کار رفته، دارای توالی تکراری کامل به صورت  $(AG/CT)_n$  بود. دو آغازگر دیگر که با نام های موسوم به ۲ و ۳ مشخص شده اند بر اساس پژوهش انجام شده توسط چنگ و همکاران (Change *et al.* 2007) انتخاب شدند. این دو آغازگر با ژن MdmYB10 پیوسته هستند. ژن مزبور عامل رنگ قرمز برگ و ایجاد رنگ قرمز در قسمت میانی میوه در ارقام گوشت قرمز است.

#### آزمایش ریز ماهواره

واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر کیت PCR [۲۰۰ میلی مولار Tris- Hcl با  $pH=8.55$ ، ۱۶۰ میلی مولار  $(NH_4)_2 SO_4$  1%، ۳

جدول ۱: شماره، نام و خاستگاه ۴۴ رقم مطالعه شده با نشانگر SSR

Table 1: The number, name and origin of 44 studied apple cultivars with SSR markers

Number	Cultivar	Origin	Number	Cultivar	Origin
1	Kochkineh	Sanandaj	23	Kokleh	Kermanshah
2	Golab Nemati Yazd	Yazd	24	Torsh Sefid	Zanjan
3	Golab Damavand-2	Damavand	25	Sheikh Ahmad	Baneh
4	Tabestaneh Rostami	Mahallat	26	Soureh Paeizeh	Kamyaran
5	Shahriar-2	Tehran	27	Ilam-4	Ilam
6	Boshghabi Taleghan	Taleghan	28	Ferdous Shahriar	Tehran
7	Chaharmahal-5	Shahr Kord	29	Damavand-1	Damavand
8	Zanjan-5	Zanjan	30	Golden Asiaei	Khareji
9	Salmas-4	Salmas	31	Hamadan-3	Hamadan
10	Zanjan-14	Zanjan	32	Meshki Ghermez	Tabriz
11	Panbehei Domazeh	Yasouj	33	Torshalma	Oroumieh
12	Phelestini Malayer	Malayer	34	Manouchehri	Arak
13	Ghermez Gilan	Rasht	35	Morouti Shemiran	Tehran
14	Tokhm Morghi Sarien	Ardabil	36	Shahroud-15	Shahroud
15	Dirras Mashhad	Mashhad	37	Boshghabi Torsh	Karaj
16	Golab Damavand-3	Damavand	38	Sifeh Shirin	Saghez
17	Paeizeh Boumi Ahar	Ahar	39	Sib Golab Ghermez	Esfahan
18	Chaharmahal-3	Shahr Kord	40	Beigi	Ghazvin
19	Sattari Jonoub	Shiraz	41	Shahroud-19	Shahroud
20	Zanjan-7	Zanjan	42	Ilam-2	Ilam
21	Golden Canadaei	Khareji	43	Talkh Arak	Arak
22	Meshki Damavand-2	Damavand	44	Soureh Drijeh	Sanandaj

جدول ۳: نام، توالی آغازگرهای به کار رفته، اندازه و دمایی اتصال در این مطالعه

Table 2: The Name, sequence of used primers, Size and Annealing temperature in this study

Primer	Reverse Seq	Forward Seq	allele size (bp)	دمایی اتصال به کار رفته
				در آزمایش Conjunction Temperature (C°)
CH02h11a	CGTGGCATGCTTATCATTTG	CTGTTGAACCGCTTCCTTC	104-132	۵۰
CH03d12	GCCCCAGAAAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCAATAAAGGG	108-154	۵۰
CH03e03	GCACAITTCGTGCTTATCTTGG	AAAACCCACAAATAGCGCC	106-216	۵۰
CH03g12z	GCCGTGAAAAAAGGTCAGTTT	CAAGGATGCCATGTAITTTG	154-200	۵۱
CH04a12	CAGCCTGCAACTGCACCTTAT	ATCCATGTTCCATAAACA	158-196	۵۰
CH05d04	ACTTGTGAGCCCGTGAGAGGT	TCCGAAGGATATGCTTCGATT	174-214	۵۱
CH05d11	CACAACCTGATATCCGGGAC	GAGAAGGTCGTACATTCCTCAA	171-211	۵۳
CH05e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAAGTTGTTACTGCTCCGAC	158-190	۵۱
HI01d06y	GGAGAGTTCCTGGGTTCCAC	AAGTGCACCCACACCCTTAC	115-166	۵۳
HI02d04	TGCTGAGTTGGCTAGAAGAAGC	GTTTAAGTTCGCCAACAATCGTCTC	224-250	۵۳
HI03a03	ACACTTCCGGATTTTCTGCTC	GTTTGTGCTGTTGGATTATGCC	160-228	۵۳
HI03e03	ACGGGTGAGACTCCCTTGTG	GTTTAACAGCGGAGATCAAGAAC	186-200	۵۰
CH03c02	TCACATAATTAACGGGATCAAGCA	GTGCAGAGTCTTTGACAAGGC	116-136	۵۰
2	AAGACTCACAAACTAGCTGTCAAAAT	TGCTCCCTCTCTAGCTAATGCAATAAT	205	۵۱
3	CACCTGACCTTCTCTCTACCTCTAC	CAACTCCCTTAATCTTCTTCTCTC	170	۵۰
MD-Exp <sup>2</sup>	CATAGAAGGTGGCATTGAGCA	TTTCTCCTCACACCCAAAACC	-	-

۱/۴ در مکان ژنی CH02h11a تا ۳/۶۸ در مکان ژنی CH03c02 متغیر و با متوسط ۲/۲ بود (جدول ۳). میانگین تعداد آلل موثر ۲/۲، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۵۲ و ۰/۴۵ برآورد گردید. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۶۵) در مکان ژنی Hio1d06y و کمترین میزان آن (۰/۲۹) به ترتیب در مکان-های ژنی Hi01d06y و CH02h11a برآورد شد (جدول ۳).

بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۸۴) در مکان CH05d04 و کمترین میزان آن در مکان ژنی موسوم به ۳ در حدود (۰/۱۳) مشاهده گردید. محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) از ۰/۱۸ تا ۰/۷۶ متغیر بود که دلالت بر ظرفیت نسبتاً بالای برخی نشانگرها در تفکیک و تمایز افراد دارد. میانگین شاخص تثبیت در این مطالعه ۰/۴۶ بود. براساس آزمون کای اسکور و با توجه به سطح احتمال کم تر از ۰/۰۵ در هر مکان ژنی، نتیجه گیری گردید که جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ پیروی نمی کند. بر اساس دندروگرام، ارقام مورد مطالعه به دو گروه کلی تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل دو زیر گروه و ۳ رقم بود و گروه دوم شامل ۴۱ رقم دیگر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی براساس ضریب مشابهت جاکارد (GSj) بین ارقام "سلماس ۴" و "دیپرس مشهد" با ارزش عددی ۰/۷۹ و کمترین میزان آن بین ارقام "مشکی دماوند ۲" و "سیفه شیرین" با ۰/۱۹ = GSj مشاهده گردید (شکل ۱).

#### بحث

در مطالعه حاضر تعداد آلل‌های شناسایی شده ( $n_a$ ) برای مکان‌های ژنی کم‌تر از موارد گزارش شده در مورد سیب‌های خارجی می‌باشد؛ لیپهارد و همکاران (2002)؛ سیلفوربرگ دیلورث و همکاران (2006). در مورد سیب‌های ایرانی نیز مقادیر ( $n_a$ ) متفاوت گزارش شده به طوری که در مطالعه ناصری و همکاران (۲۰۱۱)  $n_a$  از ۲ تا ۱۰ متغیر و با میانگین ۴/۴ می‌باشد. در مطالعه دیگری که توسط جهرمی شیرازی و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد میانگین آلل‌ها ۱۰/۴ و محتوی اطلاعات چند شکل ۰/۸ گزارش شد. مقدار  $n_a$  در مطالعه نقشین و همکاران (۲۰۰۸) که روی سیب گلاب انجام گرفته بود با مطالعه حاضر بیشتر هم‌خوانی دارد. در پژوهشی که روی ارقام سیب محلی و غیر بومی از سه ناحیه اسپانیا انجام گرفت، میانگین تعداد آلل‌ها برابر ۱۲/۳ گزارش شد (PereiraLorenzo et al. 2007).

رنگ آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید (1µg/ml) صورت گرفت. از ® DNA Lader (Gene ruler- Cynagen Cop.) با قدرت تفکیک ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت باز استفاده گردید. وضوح باند به اتیدیوم بروماید بستگی دارد این ماده شیمیایی در بین رشته DNA قرار می‌گیرد و در این صورت زیر نور UV باند مربوط به DNA قابل رویت می‌شود به عبارتی محل باند روی ژل مشخص می‌شود. مرحله آخر عکس برداری از ژل با اشعه UV و توسط دستگاه ژل داگ (Gel Logic 212 PRO, USA) صورت گرفت.

#### تجزیه داده‌ها

کد بندی به صورت ماتریس (صفر و یک) وجود یا عدم وجود باند و هم‌چنین کودومینانت انجام شد. ماتریس مشابهت بر اساس ضریب تشابه جاکارد (Jaccard 1908) با استفاده از ماتریس (صفر و یک) محاسبه گردید. جهت روشن شدن روابط خویشاوندی بین ارقام، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA صورت گرفت. جهت تعیین محل صحیح برش در دندروگرام از روش تجزیه AMOVA استفاده شد. در این روش ارقام بر اساس قرارگیری در دندروگرام به دستجاتی تقسیم می‌شوند. ژنوتیپ‌های داخل هر دسته به منزله تکرار در نظر گرفته می‌شوند. با انجام تجزیه واریانس؛ AMOVA نسبت به نقطه برش کلاستر تصمیم گیری می‌نمایند. محاسبه ماتریس مشابهت و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار NTSYS version 2/11 (Rohlf et al. 1998) انجام شد. محتوی اطلاعات چند شکل با استفاده از رابطه  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  محاسبه گردید (Anderson et al. 1992)؛ که در آن  $P_i$  عبارت از فراوانی آلل نام می‌باشد. آماره‌های مربوط به تخمین تنوع ژنتیکی و تست تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از داده‌های تهیه شده به صورت سیستم کودومینانت در نرم‌افزار POPGENE-version 1.31 (Francis et al. 1999) انجام گرفت.

#### نتایج

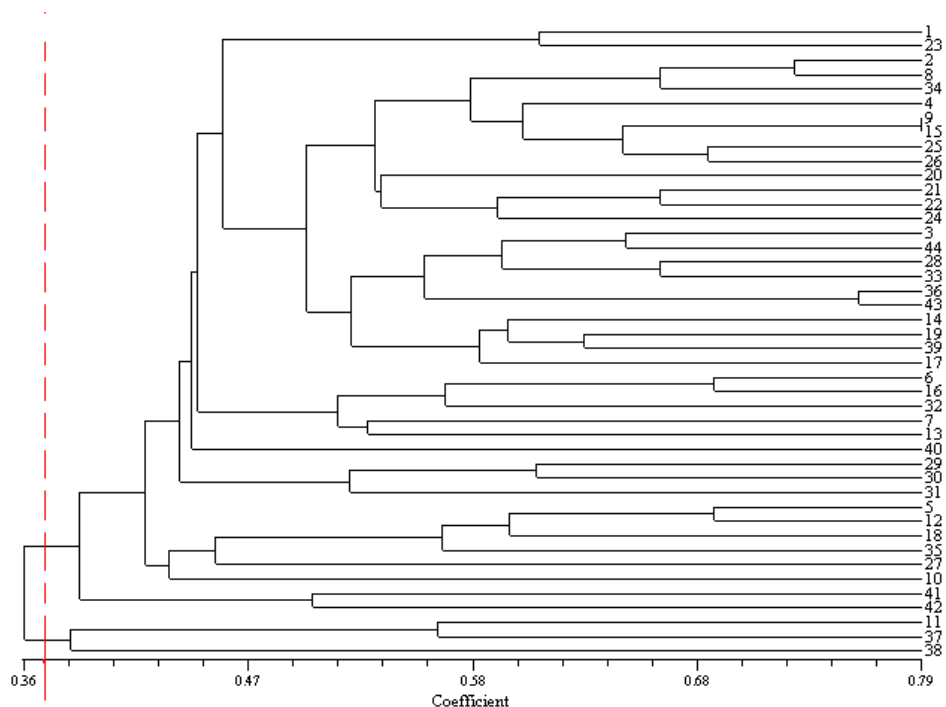
با شانزده جفت آغازگر به کار رفته در این پژوهش، ۴۵ آلل مختلف با متوسط ۲/۸۱ آلل در هر مکان ژنی مشاهده گردید. بیشترین تعداد آلل (۵ آلل در مکان ژنی) برای آغازگر CH03c02 دیده شد که اندازه آن‌ها از ۱۱۶ تا ۱۳۶ bp متغیر بود (جدول ۲). اطلاعات جدول از سایت www.Hidras.com گرفته شده است. تعداد آلل موثر ( $n_e$ ) از

جدول ۳: اسامی آغازگرها، تعداد آلل و دیگر اطلاعات مربوط به ژنوتیپ مورد مطالعه با نشانگرهای مختلف SSR

Table 3: The names of primers, number of alleles and other information about studied genotypes

Gen location	n <sub>a</sub>	n <sub>e</sub>	PIC	H <sub>obs</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H-W equilibrium	Probability
CH03g12z	3	2.59	0.63	0.77	0.62	0.38	11.15	0.10
CH02h11a	2	1.40	0.28	0.34	0.29	0.71	1.77	0.18
CH03e03	2	1.94	0.48	0.33	0.49	0.51	3.88	0.04
CH05d11	3	2.22	0.55	0.54	0.55	0.44	7.55	0.05
CH05d04	3	2.28	0.62	0.84	0.57	0.43	17.20	0.00
CH05e03	3	2.17	0.57	0.41	0.54	0.46	6.32	0.09
3	3	2.75	0.63	0.13	0.64	0.36	37.50	0.00
Md-Exp7	2	1.56	0.36	0.22	0.36	0.63	6.25	0.01
2	2	1.52	0.35	0.26	0.34	0.65	2.10	0.14
Hi03e03	2	1.74	0.41	0.30	0.43	0.57	2.33	0.12
Hi01d06y	3	2.78	0.65	0.82	0.65	0.35	14.30	0.00
CH04a12	3	1.94	0.50	0.53	0.49	0.51	3.19	0.36
CH03d12	3	1.46	0.31	0.14	0.32	0.68	26.08	0.00
Hi03ao3	3	2.72	0.18	0.59	0.64	0.68	7.78	0.05
CH03c02	5	3.68	0.76	0.57	0.74	0.27	32.78	0.00
Hi02d04	3	2.56	0.60	0.36	0.61	0.39	16.81	0.00
CH03g12z	2.81	2.20	0.49	0.45	0.52	0.46		

n<sub>a</sub> تعداد آلل ها، n<sub>e</sub> آلل موثر، PIC محتوی اطلاعات چند شکل H<sub>obs</sub> هتروزیگوسیتی مشاهده شده  
 H<sub>e</sub> هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F<sub>IS</sub> شاخص تثبیت



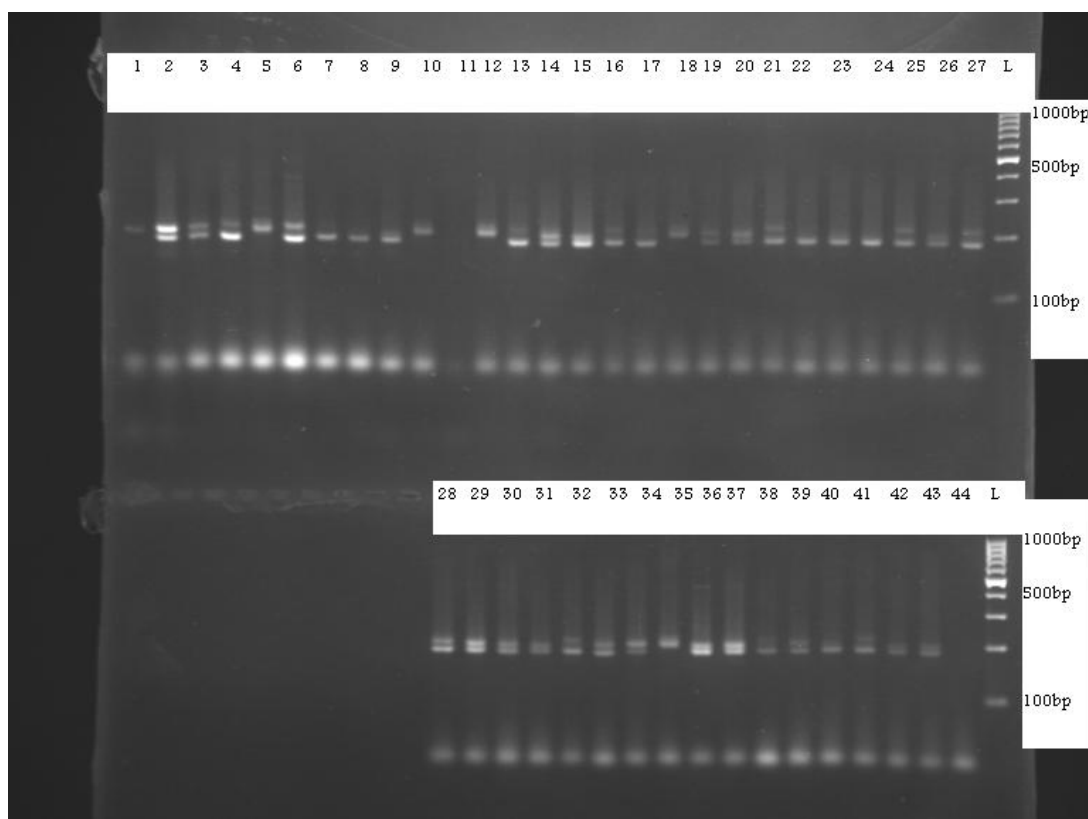
شکل ۱: نمودار خوشه‌ای ۴۴ رقم سیب مطالعه شده بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب مشابهت جاکارد

Figure 1: The dendrogram of 44 apple cultivars on the base of UPGMA (Un weighted Pair Groups Mathematical Arithmetic) and Jaccard's similarity coefficient

در مطالعه دیگر که توسط کورت و همکاران (Coart et al. 2003) روی جمعیت‌های سیب زینتی، اهلی و وحشی صورت گرفت مقادیر میانگین تعداد آلل‌ها به ترتیب ۷/۷، ۶/۴ و ۱۱/۷ گزارش گردید. اصلی‌ترین دلیل مشاهده تعداد کم تر آلل برای مکان‌های ژنی مورد مطالعه می‌تواند به دلیل استفاده از ژل آگاروز باشد. ژل آگاروز قدرت تفکیک کم‌تری نسبت به ژل‌های پلی‌آکریل آمید دارد. با این وجود آگاروز به‌عنوان یک سیستم ایمن در بسیاری از مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است؛ قرقانی و همکاران (۲۰۰۹) ناصری و همکاران (۲۰۱۱). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در مطالعه حاضر برابر ۰/۵۲، در مطالعه لارسن و همکاران (Larsen et al., 2006) ۰/۷۲ و پریرالورنزو و همکاران (2007) ۰/۸ گزارش شده است. در مطالعه قرقانی و همکاران (۲۰۰۹) بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۶) در گونه‌های وحشی دیده شد و کم‌ترین مقدار آن (۰/۷۸) در توده‌های ایرانی قدیمی مشاهده گردید. در مطالعه حاضر بیش‌ترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۸۴) در مکان CH05d04 و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۴۴ به‌دست آمد. در بررسی توسط لارسن و همکاران (2006) و پریرالورنزو و همکاران (2007)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۸۳ گزارش گردید. در مطالعه قرقانی و همکاران (۲۰۰۹) کم‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۵۶ گزارش شد که به گونه *M. orientalis* تعلق داشت و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر ۰/۶۳ بود. در این مطالعه میانگین شاخص تثبیت (F<sub>IS</sub>) ۰/۴۶ گزارش شد. مقادیر F<sub>IS</sub> در مطالعات قبلی از -۰/۰۰۲ و -۰/۰۸۸ - گزارش شده است؛ لارسن و همکاران (2006) و پریرالورنزو و همکاران (2007). میانگین شاخص تثبیت در گونه‌های وحشی، زینتی و ارقام اهلی سیب به ترتیب ۰/۱۰۵، ۰/۱۲۶ و ۰/۰۵۸ گزارش شد؛ کورت و همکاران (2003). در مطالعه قرقانی و همکاران (۲۰۰۹)، بیشترین مقدار F<sub>IS</sub> با ارزش (۰/۱۹۷) در گروه سیب‌های وحشی گزارش شد. الرگن و همکاران (Ellergren et al. 1995) گزارش کردند که اگر در تهیه آغازگرها EST-SSR از خود ارقام تحت بررسی استفاده شود، هتروزیگوسیتی آن‌ها بیشتر خواهد بود. شاید از دلایل کاهش هتروزیگوسیتی در این پژوهش این است که انگشت نگاری ارقام با آغازگرهای توسعه یافته بر اساس گونه‌های دور و ارقام خارجی (اروپایی، آسیای شرقی و آمریکایی) صورت گرفت. دلیل دیگر کاهش

هتروزیگوسیتی می‌تواند بروز تلاقی غیر تصادفی بین ارقام زراعی و گونه‌های وحشی باشد (Lowe et al. 2004). در این پژوهش میانگین محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) ۰/۴۹ بود. بالاترین PIC (۰/۷۶) متعلق به جایگاه CH03c02 با تعداد ۵ آلل بود و پایین‌ترین آن (۰/۱۸) برای نشانگر Hi03a03 با تعداد ۳ آلل مشاهده شد. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار مفید خواهند بود (Pewell et al. 1996).

در مطالعه صورت گرفته روی ارقام سیب گلاب ایرانی توسط نقشین و همکاران (۲۰۰۸)، PIC در محدوده ۰/۳۷ تا ۰/۷۷ با میانگین ۰/۶۸ گزارش گردید که بسیار نزدیک به اعداد به‌دست آمده در این مطالعه می‌باشد. ضریب تشابه جاکارد برای تمام ژنوتیپ‌ها از ۰/۱۹ تا ۰/۷۹ متغیر بود که بیان‌گر تنوع ژنتیکی گسترده در ارقام مورد مطالعه می‌باشد. مطابق دندروگرام ترسیم شده، ارقام گروه اول عبات بودند از "پنبه‌ای دو مزه"، "سیفه شیرین" و "بشقابی ترش" که میزان ضریب مشابهت آن‌ها ۰/۵۶ بود. ارقام "پنبه‌ای دو مزه" و "سیفه شیرین" به‌غرب ایران تعلق دارند. به‌نظر می‌رسد "بشقابی ترش" نیز با آن‌ها خاستگاه مشترکی داشته باشد که در طول زمان از غرب به‌مرکز ایران برده شده است. بیش‌ترین ضریب شباهت در گروه دوم علی‌رغم جدایی جغرافیایی بین "سلماس ۴" و "دیررس مشهد" دیده شد. بر اساس آزمون کای اسکور برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، میانگین سطح احتمال بررسی شده برای اکثر نشانگرها کم‌تر از ۰/۰۵ می‌باشد که نشان می‌دهد جمعیت مورد مطالعه از تعادل مزبور پیروی نمی‌کند. تکثیر غیر جنسی درختان میوه از عوامل اصلی بر هم زنده تعادل هاردی-واینبرگ و کاهش سطح هتروزیگوسیتی می‌باشد که منجر به‌عدم ظهور تمام ژنوتیپ‌ها و مکان‌های ژنی می‌شود. از سویی ازدیاد غیر جنسی این اطمینان را می‌دهد که همین مقدار هتروزیگوسیتی در فرد طی تکثیر حفظ خواهد شد. هم‌چنین انتقال ارقام از یک ناحیه به ناحیه دیگر نیز عامل دیگری در بر هم خوردن تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشد؛ /ارشادی (۲۰۰۲).



شکل ۲: انگشت نگاری SSR ایجاد شده توسط آغازگر CH03e03 برای ۴۴ رقم  
Figure 2: SSR fingerprinting of 44 apple cultivars by CH03e03 primer

هزینه بالای برداشت، اصلاح ژنتیکی سیب با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی متصل به صفات مطلوب، مفید واقع خواهد شد. انتظار می رود در آینده نیز با به کار گیری نشانگرهای ریز ماهواره بیشتر با دارا بودن پتانسیل چند شکلی زیاد، به کارگیری ژل پلی آکریل آمید و سایر تکنیکها با اطمینان بیشتری نسبت به طبقه بندی ژرم پلاسما سیب- های ایرانی اقدام نمود.

#### سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از مدیریت و پرسنل پژوهشکده فن آوری زیستی دانشگاه ارومیه و مرکز تحقیقات کشاورزی ارومیه به دلیل همکاری در انجام آزمایش و فراهم آوردن امکانات اجرایی تحقیق، ابراز می دارند.

گاهی غالب شدن یک فرهنگ و سلیقه خاص در ناحیه ای از کشور باعث تمایل افراد آن ناحیه به استفاده از انواعی از ارقام می گردد و این خود باعث جابه جا شدن نژادگان محلی و بومی آن ناحیه با ارقام جدید می شود. این فرضیه نیز دور از ذهن نیست که با در نظر گرفتن کوچکی اندازه جمعیت، فرسایش ژنتیکی نیز در این مورد تأثیرگذار باشد که به مرور زمان باعث کاهش سطح هتروزیگوسیتی و حذف تعدادی از آلل های نادر گردیده است. بنابراین شناخت منابع ژنتیکی جدید کار عمده ای برای اصلاح گران گونه های غیر جنسی است. نتایج به دست آمده سودمندی نشانگرهای SSR را در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام سیب و شناسایی ارقام مختلف نشان می دهد. ژرم پلاسما سیب ایران با توجه به جایگاه تولید آن، پتانسیل بالایی را جهت استفاده در برنامه های اصلاحی دارا می باشد. به علت طولانی بودن هر نسل و منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.



## Diversity Survey of Some Iranian Native and Exotic Apples (*Malus* × *Domestica*) Cultivars Using Ssr Markers

Farrokhi<sup>1</sup>, J. and Naseri<sup>2\*</sup>, L.

### Abstract

The genetic diversity of 44 apple genotypes from all over part of Iran was evaluated using 16 pairs of SSR primers. In Total, 45 alleles were detected. The number of alleles per locus varied from 2 to 5 with an average of 2.8. The average number of effective alleles was 2.2, the average of expected and observed heterozygosity were 0.52 and 0.45, respectively. According to Chi-square test, population was out of Hardy–Weinberg equilibrium. The Polymorphism Information Content (PIC) ranged from 0.18 to 0.76 implying the high detecting potential of some studied primers. Based on Jaccard's coefficients similarity matrix for all studied apple genotypes, the highest similarity was observed between "Salmas4" and "Dirras-e Mashhad" and the The lowest one was found between "Meshki-e Damavand 2" and "Sifeshirin". Cluster analysis by using UPGMA algorithm revealed two main groups. Considering to long juvenile period in fruit trees such as apple, it seems that the application of markers with high degree of polymorphism and linked to appropriate trait would be useful in apple genetic diversity studies and breeding activities.

**Keywords:** Apple, Cluster analysis, Genetic diversity, Microsatellite markers

### References

- Alizadeh, A. 2007. Collection and morphological evaluation of Iranian native apple germplasms. Final Report of a Research Project. Department of Horticulture, West Azerbaijan Agricultural & Natural Resources Research Center. Urmia, Iran. pp.7-16.
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D. and Sorrells, M. E. 1992. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome journal* 36: 181–186.
- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M. J. M., Wagner, I., Huylbroeck, J., Bockstaele, E. and Rolda'n-Ruiz, I. 2003. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol Eco journal* 12:845–857.
- Dellaporta, S. L. 1983. A plant minipreparation. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19- 21.
- Ellergren, H., Primmer, C. R. and Seldon, B. C. 1995. Microsatellite evolution :Directionality or BiasNature, *Theor Appl Genet journal*. 11:150-159.
- Ershadi, A. 2002. Genetic evaluation of 32 Iranian apple cultivars (*M* × *domestica*) with using SSR markers. MSc thesis, Tehran University. pp:45-47.
- FAOSTAT. 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [http:// faostat. Fao. Org/ 336. default. Asp](http://faostat.Fao.Org/336.default.Asp).
- Francis C, Yeh. and Rong cai Yang. 1999. Popgene version 1.31. A joint Project Development by University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International [http://ftp microsoft .com/Softlib/Mslfiles](http://ftp.microsoft.com/Softlib/Mslfiles) .
- Gábor, H., Kiss, E. and Heszky L. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers, *Hort Science journal* 7: 40-45.
- Gharghani, A., Zamani, Z., Talaie, A., Oraguzie, N. C., Fatahi, R., Hajnajari, H., Wiedow, C. and Gardiner S. E. 2009. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus* × *domestica*) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeats (SSR) marker analysis. *Genet Resource Crop Evol journal* 13:1-14.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. SSRs for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet journal* 96: 1069-1076.
- Hokanson, S. C., Lamboy, W. F., McFadden, A. K. and McFerson J. R. 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica journal* 118:281-294.
- Hokanson, S. C., McFadden, A. K., Lamboy, W. F. and McFerson, J. R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* borkh Core subset collection. *Theor Appl Genet journal* 97: 671-683.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44:223-27.

---

1. Former MSc student and Assistant Professor Respectively, Department of Horticulture, Urmia University, Iran

\*: Corresponding author

- Jahromi e shirazi, R., Keshavarzi, M., Naghavi, M., Damyar, S. and Zahravi, M. 2009. Genetic identification of some apple cultivars and rootstocks by SSR markers. *Agriculture biotechnology journal*. 1 (2): 17-26.
- Juniper, B. E., Watkins, R. and Harris, S. A. 1999. The origin of apple. *JOURNAL of Acta Hort journal* 484: 27-33.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M. and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet journal* 85: 901-904.
- Larsen, A. S., Asmussen, C. B., Coart, E., Olrik, D. C. and Kjaer, E. D. 2006. Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genet Genome journal* 2:86-97.
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C .D., Tarchini, R., Van DeWeg, E. and Gessler, C. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica*). *Mol Breed journal* 10:217-241
- Lowe, A., Harris, S. and Ashton, P. 2004. *Ecological genetics design, Analysis and applications*. Blackwell publishing , Oxford.
- Nagshin, F., Bahari, M., Seyyed tabatabaie, B. A. and Hajnajari, H. 2008. Genetic evaluation of some Iranian apple genotypes (sibe golab) using SSR markers. *Horticulture Science and Technology journal*. Iran 9: 69-82.
- Naseri, L., Darvishzadeh, R., Mohseniazar, M. and Alizadeh, A. 2011 Molecular characterization and similarity relationships among some Iranian native and commercial apple (*Malus × domestica*) cultivars using simple sequence repeat markers. *Juornal of Horticulture science and Biotechnology*. 86(5) : 527-533.
- Nybom, H. and Schaal, B. A. 1990. DNA 'fingerprints' applied to paternity analysis in apples (*Malus × domestica*). *Theor Appl Genet journal* 79:763-768.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A. M. and Diaz-Hernandez, M. B. 2007. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus × domestica*.) from Spain using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:405-420.
- Pewell, W., Machray, G. C. and Provan, J. 1996 Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend Plant Science journal* 1:215-222.
- Rohlf, F. J. 1998. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version2.02*. Exter Software, Setauket, New York. 223-270.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C. L., Van de Weg, W. E., Van Kaauwen, M. P. W., Walser, M., Kodde, L. P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C. E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C. and Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica*) Genome *Tree Genet journal* 2:202-224
- Watillon, B. D., Du Jardin, P., Kettmann, R. and Boxus Pand Burny, A. 1991. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Hortscience journal* 46:235-240.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Hayashi, T. and Mutsuta, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl Genet journal* 102: 865-872.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 27-34= ۲۷-۳۴).