

انتقال پذیری نشانگرهای مولکولی SSR سیب، به ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.)

Transferability of Apple Derived SSR Markers to Genotypes of
Quince (*Cydonia oblonga* Mill.)

مهسا خرم‌دل آزاد^۱، حمید عبداللهی^۲، ایوب‌علی قاسمی^۳ و شهاب حاج‌منصور^۴

- ۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
- ۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
- ۳- مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان
- ۴- مربی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۰

چکیده

خرم‌دل آزاد، م.، عبداللهی، ح.، قاسمی، ا.، و حاج‌منصور، ش. ۱۳۸۹. انتقال‌پذیری نشانگرهای مولکولی SSR سیب، به ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۶: ۴۶۷-۴۵۱.

بیش از ۵۰ ژنوتیپ و رقم به در کلکسیون ملی کشور جمع‌آوری شده است که اطلاعات مورفولوژیک و ژنتیکی کمی از آن‌ها در اختیار است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این ژرم‌پلاسم در مرحله اول اقدام به ارزیابی انتقال‌پذیری توالی‌های تکراری ساده مربوط به گونه سیب، به شماری از ژنوتیپ‌های به کشور شد. برای این منظور DNA سیزده ژنوتیپ به استان اصفهان همراه با رقم تجارتمی «اصفهان» با روش‌های CTAB تغییر یافته، SDS تغییر یافته و ادغام دو روش CTAB و SDS استخراج و بهترین کیفیت DNA از روش اخیر حاصل شد. DNA این مواد با استفاده از هشت جفت آغازگر SSR سیب شامل CH05d04، CH02b10، CH02d08، CH03g06، CH02h11a، CH04e03، CH04a12 و NZ02b01 تکثیر شد. هفت جفت از آغازگرهای مورد استفاده قادر به تکثیر ۳۳ مکان ژنی توالی‌های تکراری ساده ژرم‌پلاسم به مورد ارزیابی بودند، که از این تعداد شش جفت آغازگر تنوع ژنتیکی نشان دادند. جفت آغازگر CH03g06 قادر به تکثیر بیشترین آلل بود و بالاترین شاخص اطلاعاتی پلی‌مورفیسم را نشان داد، در حالی که جفت آغازگر NZ02b01 هیچ قطعه‌ای را تکثیر نکرد. براساس الگوی بانندی تولیدی، ژنوتیپ‌های به استان اصفهان در هشت کلاستر به ترتیب دربردارنده ۱، ۲، ۳، ۲، ۱ و ۱ ژنوتیپ طبقه‌بندی شدند و به نظر می‌رسد دو ژنوتیپ SHA1 و SVS2 یکسان باشند.

واژه‌های کلیدی: به، *Cydonia oblonga*، نشانگر SSR، انتقال‌پذیری، سیب، پلی‌مورفیسم.

مقدمه

در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، وجود الگوی تظاهر همباز، تکرارپذیر بودن نتایج و در نهایت قابل انتقال بودن آن در سطح جنس و یا دیگر گونه‌های نزدیک اشاره کرد (Naghavi et al., 2005). این محاسن سبب شده تا این نشانگر در رسیدن به اهداف مهمی نظیر تهیه نقشه ژنتیکی در درختان میوه همچون هلو و سیب (Dirlewanger et al., 2004) و گلابی (Yamamoto et al., 2004) و یا در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ارقام سیب (Gianfranceschi et al., 1998؛ Liebhart et al., 2002؛ Hokanson et al., 2001) گلابی (Yamamoto et al., 2001) و همچنین در برنامه های به نژادی و در رابطه با بررسی مقاومت درختان سیب به بیماری لکه سیاه (*Venturia inaequalis*) (Gygax et al., 2004) استفاده شود. از جمله معایب این مارکر پیچیدگی، هزینه بر و وقت گیر بودن فرآیند شناسایی توالی‌های تکراری ساده و تعیین ردیف بازی آن‌ها که مقدمه کار با این نشانگر است را می‌توان نام برد (Naghavi et al., 2005).

ارقام مهم شناخته شده تجارتي به در سطح جهان شامل ارقام اورنج (Orange)، وان دمان (Van Deman)، پاپای (Pineapple)، لیمون (Limon) و اسمیرنا (Smyrna) هستند. در ایران ارقام مهم به شامل به گورتون، به اصفهان، به نیشابور و به ترش آذربایجان هستند

درخت به با نام علمی *Cydonia oblonga* Mill. و تعداد کروموزوم پایه ۱۷، متعلق به تیره وردسانان (Rosaceae)، زیرتیره سیب (Pomoideae) است. میوه به برای مصارف خوراکی، درمانی، آرایشی و بهداشتی داشته و از برخی ژنوتیپ‌های آن به عنوان پایه برای گلابی استفاده می‌شود. این گونه بومی نواحی شمال ایران و ترکمنستان است (Sabeti, 1996). درخت به در ایران به صورت وحشی در جنگل‌های شمال کشور از آستارا تا کتول گرگان پراکنش داشته و به صورت باغی به طور عمده در استان‌هایی نظیر اصفهان، خراسان، قزوین، تهران و اردبیل کاشته می‌شود. اولین برنامه احداث کلکسیون جامع به کشور توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi et al., 2008) اجرا شد و تاکنون در این کلکسیون بیش از ۵۰ رقم و ژنوتیپ از مناطق مختلف کشور از جمله استان‌های اصفهان، خراسان، اردبیل، گیلان و تهران جمع‌آوری شده است.

نشانگر مولکولی SSR شامل توالی‌های تکراری ساده با واحدهای ۱ تا ۵ نوکلئوتیدی است که به دلیل مزایای ویژه نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از جمله محاسن آن می‌توان به کاربرد ساده و تفسیر نتایج آسان، میزان بالای پلی‌مورفیسم حتی در سطح ارقام و ژنوتیپ‌های یک گونه، فراوانی و تنوع زیاد آلل‌های SSR

(Manee, 1994) که از نظر شکل ظاهری میوه در برخی موارد تفاوت‌های قابل توجهی با ارقام شناخته شده جهانی دارند. با توجه به قدمت کم کلکسیون به ملی کشور تاکنون ارزیابی‌های کاملی روی ویژگی‌های رویشی و زیستی ژنوتیپ‌ها و ارقام این مجموعه انجام نشده است و امکان وجود ژنوتیپ‌های یکسان و با نام متفاوت هست. از طرفی بررسی منابع نشان دهنده این است که تحقیقات محدودی در زمینه جداسازی، شناسایی و تعیین ردیف بازی توالی‌های تکراری ساده گونه به انجام شده است. به منظور رفع کمبود اطلاعات موجود در این زمینه می‌توان اقدام به جداسازی و توالی‌یابی این مکان‌های ژنی کرد و یا نسبت به بررسی انتقال‌پذیری آغازگرهای توالی‌های تکراری ساده به دست آمده از گونه‌های نزدیک شامل سیب و گلابی روی این گونه پرداخت. با توجه به کم‌هزینه‌تر بودن، سادگی و سرعت روش اخیر و همین‌طور تعدد مکان‌های توالی‌های تکراری ساده شناخته شده در دو گونه نزدیک سیب و گلابی، در این تحقیق انتقال‌پذیری شماری از آغازگرهای سیب که با احتمال بیشتری قادر به بیان تنوع ژنتیکی روی ژنوتیپ‌های به کشور هستند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

برای استخراج DNA ژنومی از سر برگ‌های تازه و جوان ۱۳ ژنوتیپ به استان اصفهان همراه با رقم تجارتمی به «اصفهان» با کد

KVD3 استفاده شد. نمونه‌ها در فصل بهار سال ۱۳۸۶ از کلکسیون ملی به بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج برداشت شدند و بلافاصله پس از برداشت در ظروف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی از این ارقام با دو روش CTAB تغییر یافته (Yamamoto *et al.*, 2001) و SDS تغییر یافته (Dellaporta *et al.*, 1983) در سه تکرار انجام شد. به دلیل بالا بودن آلودگی‌های فنلی و پروتئینی در هر دو روش مذکور، روش سوم با ادغام دو روش CTAB و SDS تهیه و تنظیم شد. ارزیابی غلظت و میزان خلوص DNA استخراج شده در هر سه روش، توسط الکتروفورز افقی و مشاهده بر روی ژل آگاروز ۰/۸٪ و نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک، به صورت ارزیابی میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی و سپس غلظت DNA با فرمول زیر محاسبه شد که در آن C ضریب ثابت که برای DNA معادل ۵۰، D.F. ضریب رقیق سازی محلول DNA و λ_{260} مقدار جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر است:

$$\text{DNA}_{(\text{mg}/\mu\text{l})} = C \times \text{D.F.} \times \lambda_{260 \text{ nm}}$$

از میان ۱۷۰ جفت آغازگر شناسایی شده برای درختان سیب (Liebhard *et al.*, 1998؛ Gianfranceschi *et al.*, 2002) و ۸ جفت (Hokanson *et al.*, 2001) هشت جفت

Liebhard *et al.*, 2002
Hokanson *et al.*, 2001) انتخاب شدند. محدوده گرادیان دمایی حداکثر بین ± 10 درجه سانتی‌گراد دمای توصیه شده، محدوده گرادیان غلظت $MgCl_2$ بین ۲۵ الی ۱۰۰ پیکومول، محدوده غلظت DNA بین ۷۵ الی ۱۵۰ نانوگرم و محدوده غلظت آغازگر بین ۵ الی ۱۰ پیکومول برای هر یک از آغازگرها به ازاء هر واکنش ۲۵ میکرولیتری در نظر گرفته شد. سایر اجزاء ثابت واکنش PCR، به میزان ۰/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر غلظت (10X)، یک واحد آنزیم DNA پلی‌مراز و ۰/۵ میکرولیتر از محلول مادری dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بر اساس اجزاء واکنش پیشنهادی توسط یاماموتو و همکاران (Yamamoto *et al.*, 2004) بود.

تفکیک باندهای حاصله ابتدا روی ژل آگاروز ۳٪ با ولتاژ ۸۰ ولت و شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر حرکت داده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. تهیه عکس با استفاده از دستگاه ژل-داک (Gel-Doc) در طول موج ۳۱۲ نانومتر انجام شد. برای تفکیک دقیق‌تر باندها از تانک الکتروفورز عمودی (DNA Sequencer)، با ژل پلی‌آکریل آمید ۶٪ با ولتاژ ۱۵۰۰ ولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر در دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. متعاقباً رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با نیترات نقره و سپس ظهور باندها به وسیله کرنات سدیم انجام شد که

آن‌ها که توانسته بودند در ارقام گلابی و ۲۰ ژنوتیپ از به‌های بومی ژاپن نیز قطعات اختصاصی و با میزان هتروزیگوسیتی بالا تکثیر و در بررسی تنوع مواد بومی این کشور به کار روند (Yamamoto *et al.*, 2004) انتخاب شدند. جفت آغازگرهای انتخابی شامل CH02d08، CH02b10، CH05d04، CH03g06، CH02h11a، CH04e03، CH04a12 و NZ02b01 بودند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مدل MasterCycler-Gradient روی DNA ژنوتیپ‌های به انجام شد. دمای بهینه اتصال هر جفت آغازگر ابتدا طی هفت مرحله، شامل کاربرد: الف) شیب گرادیان دمایی، ب) شیب گرادیان دمایی همراه با شیب غلظت $MgCl_2$ ، پ) شیب گرادیان دمایی همراه با شیب غلظت DNA، ت) شیب گرادیان دمایی همراه با شیب غلظت جفت آغازگر، ث) آفت تدریجی دمای اتصال آغازگرها (Touch Down PCR) با ۳ درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه، ج) آفت تدریجی دمای اتصال آغازگرها با ۶ درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه و در نهایت چ) آفت تدریجی دمای اتصال آغازگرها با ۹ درجه سانتی‌گراد بالای دمای بهینه به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی، بهینه شدند. دمای ابتدایی اتصال آغازگرها بر اساس دمای گزارش شده در مورد ارقام سیب (Gianfranceschi *et al.*, 1998)

نیز بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود، که برای انجام واکنش‌های PCR، پنج بار رقیق شدند.

دمای اتصال بهینه (جدول ۳) چهار جفت آغازگر CH03g06، CH02d08، CH05d04 و CH04e03 پس از طی چهار مرحله اول (گرادیان دمایی، گرادیان دمایی با شیب غلظت $MgCl_2$ ، گرادیان دمایی همراه با شیب غلظت DNA، گرادیان دمایی همراه با شیب غلظت جفت آغازگر) تعیین و یک یا دو باند اختصاصی کاملاً مجزا و پلی‌مورف در ژنوتیپ‌های به مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳، جدول ۴). دمای اتصال بهینه سه جفت آغازگر CH02b10، CH02h11a و CH04a12 پس از طی چهار مرحله ابتدایی و دو مرحله اُفت تدریجی دمای اتصال آغازگرها به ترتیب با ۳ و ۶ درجه سانتی‌گراد بالای دمای اتصال توصیه شده (Liebhard *et al.*, 2002) تعیین و یک یا دو باند اختصاصی کاملاً مجزا و پلی‌مورف در ژنوتیپ‌های به مورد ارزیابی ملاحظه شد (شکل‌های ۴ و ۵). جفت آغازگر NZ02b01 پس از انجام کلیه هفت مرحله تعیین دمای بهینه اتصال آغازگرها قادر به تکثیر هیچ بانندی در این گروه از ژنوتیپ‌های به نشدند. دمای بهینه اتصال آغازگرها در جدول ۴ نمایش داده شده است.

از بین هشت جفت آغازگر مورد آزمایش هفت جفت پرایمر توانستند ۳۳ آلل در ژرم‌پلاسما به مورد ارزیابی تکثیر کنند و از بین

امکان تفکیک باندها به دقت ۱ تا ۲ نوکلئوتید را فراهم آورد. با استفاده از اطلاعات آلل‌های پلی‌مورف تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر، محتوای اطلاعات پلی‌مورفیسم (Polymorphism Information Content) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن P فراوانی آلل i ام است (Nei, 1973):

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

نتایج و بحث

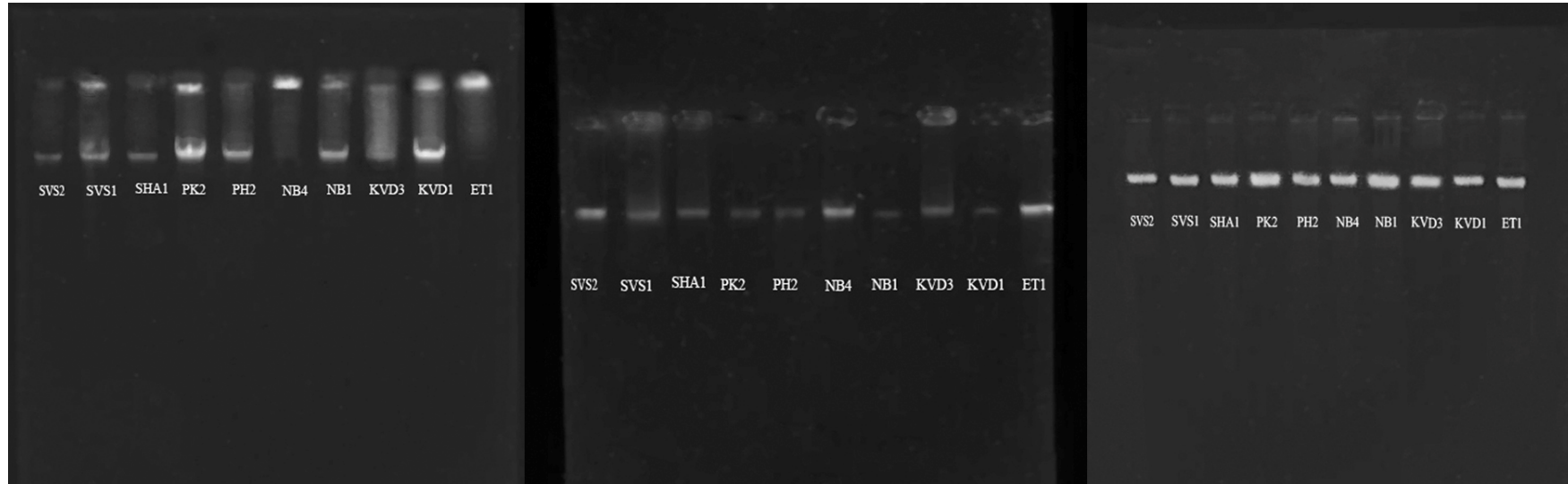
اسامی ژنوتیپ‌ها و ارقام به مورد استفاده برای استخراج DNA در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. استخراج DNA ژنوتیپ‌های به (جدول ۲) که با روش CTAB تغییر یافته انجام شد با آلودگی پروتئینی و ناخالصی‌های فنلی همراه بود. از طرفی غلظت مناسبی از DNA در اکثر استخراج‌ها به این روش حاصل شد که به دلیل وجود آلودگی‌های متعدد برای استفاده در واکنش‌های PCR مناسب تشخیص داده نشد (شکل ۱). همچنین DNA استخراج شده با روش SDS تقریباً فاقد هرگونه آلودگی بودند، اما غلظت DNA در نمونه‌های به دست آمده بسیار پائین بود، در نتیجه با ادغام مراحل از هر دو روش، در ترکیب دو روش CTAB و SDS، DNA خالص و مناسب استفاده در واکنش‌های PCR به دست آمد (شکل ۱). ارزیابی شاخص خلوص DNA استخراجی با استفاده از روش تلفیقی از چهارده ژنوتیپ به اصفهان بین ۱/۷ تا ۱/۸ و غلظت DNA حاصله

جدول ۱- ژنوتیپ‌ها و ارقام به‌مورد استفاده برای استخراج DNA
Table 1. Quince genotypes and cultivars used for DNA extraction

شماره No.	ژنوتیپ Genotypes	منشاء Origin	پایه Rootstock	تاریخ پیوند جوانه Budding date
1	ET1	Isfahan-Isfahan	Quince seedling	2006-07
2	KM1	Isfahan-Kelishd	Quince seedling	2006-07
3	KVD1	Isfahan-Kashan	Quince seedling	2006-07
4	KVD2	Isfahan-Kashan	Quince seedling	2006-07
5	KVD3	Isfahan-Kashan	Quince seedling	2006-07
6	KVD4	Isfahan-Kashan	Quince seedling	2006-07
7	NB1	Isfahan-Natanz	Quince seedling	2006-07
8	NB3	Isfahan-Natanz	Quince seedling	2006-07
9	NB4	Isfahan-Natanz	Quince seedling	2006-07
10	PH2	Isfahan-Falavarjan	Quince seedling	2006-07
11	PK2	Isfahan-Falavarjan	Quince seedling	2006-07
12	SHA1	Isfahan-Shahreza	Quince seedling	2006-07
13	SVS1	Isfahan-Semirom	Quince seedling	2006-07
14	SVS2	Isfahan-Semirom	Quince seedling	2006-07

جدول ۲- روش‌های استخراج DNA
Table 2. DNA extraction protocols

اجزاء کلیدی Key elements	روش مبتنی بر CTAB CTAB-based protocol	روش مبتنی بر SDS SDS-based protocol	روش تلفیقی Combined protocol
Phenol elimination	---	PVP 1%	PVP 1% & ammonium acetate washing
Protein elimination	β -mercaptoethanol (5 μ l) & Chloroform-isoamylalcohol 1 time	β -mercaptoethanol (10 μ l) & Chloroform-isoamylalcohol 1 time	β -mercaptoethanol (20 μ l) & Chloroform-isoamylalcohol 2 time
Prevention of DNA degradation	EDTA	EDTA & proteinase K in 65°C	EDTA & proteinase K in 55°C
DNA wash	2 times with 70% ethanol	1 times with 70% ethanol	1 times with pure ethanol



شکل ۱- مقایسه کیفی DNA استخراجی شماری از ژنوتیپ‌های به، استخراج شده به سه روش CTAB تغییر یافته (چپ)، SDS تغییر یافته (وسط) و تلفیق روش‌های CTAB تغییر یافته و SDS تغییر یافته (راست)

Fig. 1. Comparing the quality of extracted genomic DNA from some quince genotypes, using three protocols, modified CTAB (left), modified SDS (middle) and combined modified CTAB and modified SDS protocols (right)

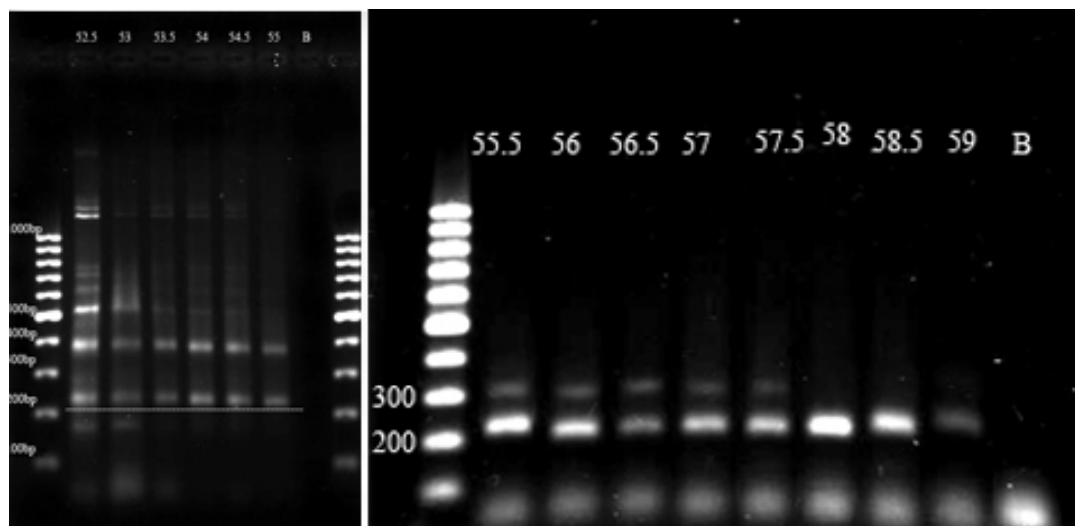
جدول ۳- اسامی و توالی بازی جفت آغازگرهای سیب مورد استفاده

Table 3. Name and sequence of apple primer sets used

شماره No.	نام جفت آغازگر Primer set names	توالی‌ها (3' - 5')		دمای توصیه شده اتصال آغازگر Recommended annealing temp.
		آغازگرهای پیش‌رو Forward primers	آغازگرهای پی‌رو Reveres primers	
1	CH05d04	act tgt gag ccg tga gag gt	tcc gaa ggt atg ctt cga tt	55°C
2	NZ02b01	ccg tga tga caa agt gca tga	atg agt ttg atg ccc ttg ga	55°C
3	CH04a12	cag cct gca act gca ctt at	atc cat ggt ccc ata aac ca	55°C
4	CH04e03	ttg aag atg ttt ggc tgt gc	tgc atg tct gtc tcc tcc at	55°C
5	CH02h11a	cgt ggc atg cct atc att tg	ctg ttt gaa ccg ctt cct tc	55°C
6	CH03g06	atc cca cag ctt ctg ttt ttg	tca cag aga atc aca agg tgg a	55°C
7	CH02b10	caa gga aat cat caa aga ttc aag	caa gtg gct tcg gat agt tg	55°C
8	CH02d08	tcc aaa atg gcg tac ctc tc	gca gac act cac tea cta tet ctc	55°C

علی‌رغم تعداد تکثیر هشت آلل در سیب، در ژرم‌پلاسم به مورد نظر توانایی کمتری در تکثیر آلل‌های جایگاه‌های ژنی توالی‌های تکراری ساده داشته و به ترتیب ۶، ۲ و ۵ آلل با شاخص اطلاعات پلی‌مورفیسم قابل توجه تکثیر کردند (جدول ۴). نکته جالب توجه در بین آغازگرهای سیب مورد استفاده این بود که جفت آغازگر CH03g06 علی‌رغم گزارش لیب‌هارد و همکاران (۲۰۰۲) مبنی بر حداقل تعداد آلل تکثیر شده (شش آلل) و شاخص اطلاعاتی پلی‌مورفیسم کم در سیب قادر به تکثیر بیشترین جایگاه ژنی توالی‌های تکراری ساده در ژنوتیپ‌های به اصفهان (هفت آلل) بوده و بالاترین شاخص اطلاعاتی پلی‌مورفیسم (۰/۸۳) را نشان داد. امکان انتقال‌پذیری این جفت آغازگرها روی ژنوتیپ‌های به با نتایج یاماموتو و همکاران (۲۰۰۴) که از این آغازگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های به کشور ژاپن استفاده کردند انطباق

این هفت جفت آغازگر، شش جفت تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های به مورد ارزیابی را به خوبی نشان دادند. نتایج لیب‌هارد و همکاران (۲۰۰۲) بیانگر این است که جفت آغازگر CH04e03 با یازده آلل تکثیر شده، جفت آغازگرهای CH04a12، CH02h11a و CH02b10 هر یک با هشت آلل تکثیر شده و سایر آغازگرها با شش تا هفت آلل تکثیر شده قادر به بیان تنوع ژنتیکی در بین ارقام سیب هستند. یاماموتو و همکاران (Yamamoto *et al.*, 2002) از آغازگرهای فوق با موفقیت به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گلابی استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد، جفت آغازگر CH04e03 به طور قابل قبولی قادر به نشان دادن پلی‌مورفیسم بین این ژنوتیپ‌ها بود در حالی که تعداد باند کمتری نسبت به سایر آغازگرها در ژنوم به‌ها تولید کرده بود (جدول ۴). سه جفت آغازگر CH04a12، CH02h11a و CH02b10



شکل ۲- دو مرحله تعیین دمای بهینه اتصال جفت آغازگر CH02d08 روی ژنوم به. مرحله اول محدوده دمایی ۵۲/۵ الی ۵۵ درجه سانتی گراد (چپ)؛ مرحله دوم محدوده دمایی ۵۵/۵ الی ۵۹ درجه سانتی گراد (راست)

Fig. 2. Two step optimization of annealing temperature for CH02d08 primers on quince genome. First step temperature range from 52.5 to 55°C (left); second step temperature range from 55.5 to 59°C (right)



شکل ۳- پلی مورفیسم ژنوتیپ‌های به مورد ارزیابی حاصل شده از تکثیر DNA توسط جفت آغازگر CH02d08

Fig. 3. Polymorphism of quince genotypes, obtained from DNA amplification by CH02d08 primers

جدول ۴- مقایسه نتایج تکثیر مکان‌های ژنی توالی‌های تکراری ساده توسط جفت آغازگرهای استفاده شده در ژنوتیپ‌های به استان اصفهان و سیب

(Liebhard *et al.*, 2002)

Table 4. Comparison of results obtained from SSR allele amplification by primers used in quince genotypes of Isfahan province and apple (Liebhard *et al.*, 2002)

شماره No.	اسامی آغازگرها Primers name	سیب Apple				درخت به (اصفهان) Quince (Isfahan)			
		دمای اتصال Annealing temp. (°C)	اندازه قطعات Fragment size (bp)	تعداد آلل‌ها No. of alleles	PIC*	دمای اتصال مناسب Annealing temp. (°C)	اندازه قطعات Fragment size (bp)	تعداد آلل‌ها No. of alleles	PIC*
1	CH05d04	55	174-214	7	0.82	53.0	185-195	5	0.75
2	NZ02b01	55	238	7	0.75	56.0	0	0	0.00
3	CH04a12	55	158-196	8	0.86	56.5	186-198	6	0.80
4	CH04e03	55	179-222	11	0.88	57.0	193-200	4	0.77
5	CH02h11a	55	104-132	8	0.83	57.5	120-123	2	0.50
6	CH03g06	55	139-171	6	0.78	54.0	137-152	7	0.83
7	CH02b10	55	121-159	8	0.86	58.0	172-200	5	0.73
8	CH02d08	55	210-254	7	0.82	58.0	149-160	4	0.70

* محتوای اطلاعات پلی مورفیسم

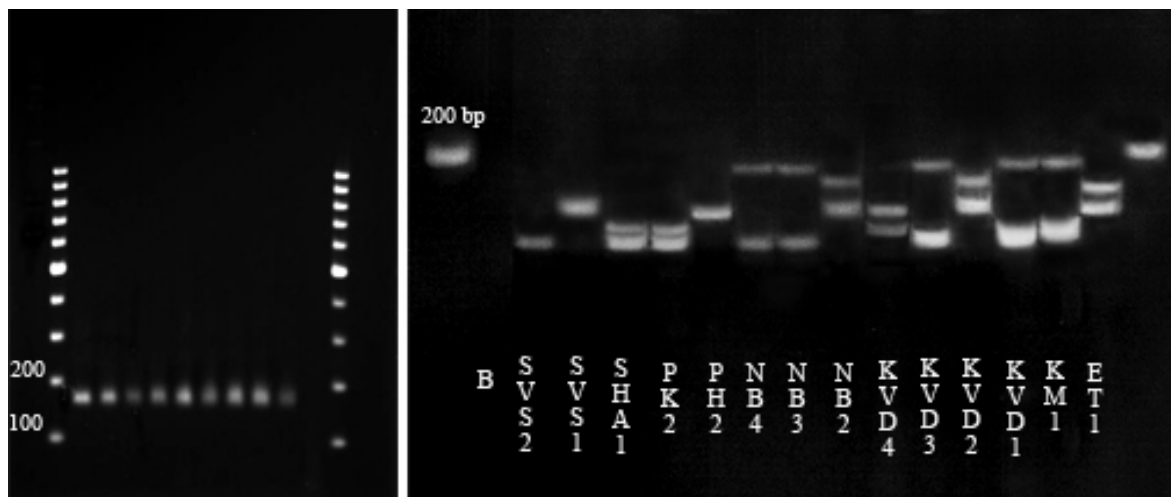
* Polymorphism Information Content

دارد.

داده‌های به دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزارهای POPGEN و NTSYS آنالیز شده و براساس الگوی بانندی به دست آمده از آغازگرهای مذکور، ژنوتیپ‌های به اصفهان در هشت کلاستر، به ترتیب دربردارنده ۱، ۲، ۱، ۳، ۲، ۲، ۱ و ۱ ژنوتیپ طبقه‌بندی شدند (شکل ۶). مقایسه این گروه‌بندی با گروه‌بندی انجام شده بر اساس صفات مورفولوژیکی توسط عبداللهی و همکاران (۲۰۰۸) نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه این دو تقسیم‌بندی است. تطابق‌های موردی این دو تقسیم‌بندی در همگروهی ژنوتیپ‌های KVD1 و KVD2 براساس روش مورفولوژیک و روش مورد استفاده در این تحقیق مشاهده شد. همچنین دو ژنوتیپ NB3 و NB4 در هر دو روش در یک خوشه طبقه‌بندی شدند. با توجه به نزدیکی بسیار زیاد مکان‌های نمونه‌گیری و جمع‌آوری ژرم‌پلاسم از شهرستان‌های استان اصفهان (جدول ۱) و به دلیل این که ژرم‌پلاسم مورد نظر بومی محل جمع‌آوری آن نبوده و توسط تولیدکنندگان محلی از منطقه‌ای به منطقه دیگر انتقال یافته است هیچ گروه‌بندی مشخصی بر اساس تقسیم‌بندی جغرافیایی، بر روی مواد مورد ارزیابی مقدور نشد (شکل‌های ۶ و ۷).

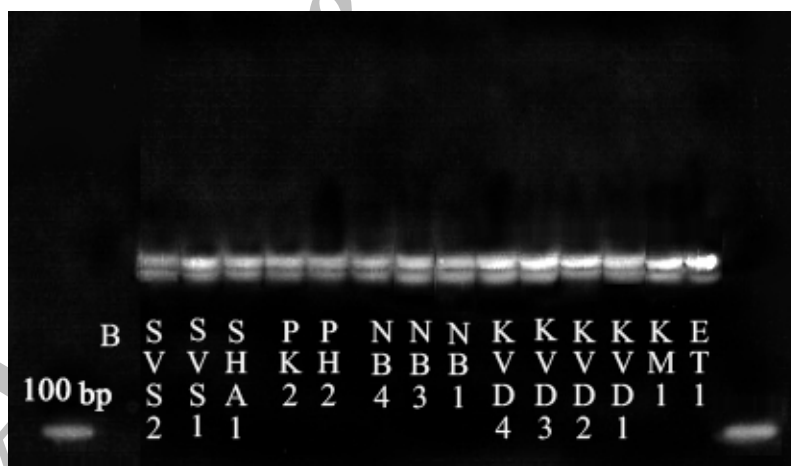
نتایج این تحقیق نشان داد که قسمت قابل توجهی از جفت آغازگرهای سیب به طور موفقیت‌آمیزی قادر به تکثیر نواحی کاملاً یا نیمه حفاظت شده توالی‌های تکراری ساده در ژنوتیپ‌های بومی به کشور بوده و این نواحی

بر اساس تحقیقات ویسینگ و همکاران (Weising *et al.*, 1996) و همچنین رودر و همکاران (Roder *et al.*, 1995) انتقال‌پذیری بین جنسی توالی‌های تکراری ساده همانند انتقال‌پذیری بین گونه‌ای، در همه موارد امکان‌پذیر نیست. بر اساس گزارش لیب‌هارد و همکاران (۲۰۰۲) تمامی SSRهایی که روی سیب شناسایی شده‌اند، در دیگر گونه‌های درختان میوه دانه‌دار مثل گلابی، به و شیرخشت قادر به تولید باند اختصاصی هستند. از طرفی میزان انتقال‌پذیری توالی‌های تکراری ساده سیب به ارقام گلابی ۱۰۰٪ گزارش شده است (Yamamoto *et al.*, 2002). نتایج به دست آمده از ارقام به اصفهان با نتایج مذکور اندکی تفاوت نشان می‌دهند. به این صورت که جفت آغازگر NZ02b01، که قبلاً انتقال‌پذیری آن توسط یاماموتو و همکاران (۲۰۰۲) روی به‌های بومی ژاپن نشان داده شده بود، در ژنوتیپ‌های به اصفهان قادر به تکثیر توالی‌های تکراری ساده نبود. از نتایج چنین استنباط می‌شود که ظاهراً جایگاهی برای اتصال این آغازگرها روی ژنوم هیچ یک از این به‌ها وجود نداشته است. بر این اساس تا زمانی که جفت آغازگرها SSR اختصاصی برای ارقام به طراحی نشده، می‌توان با ضریب اطمینان بالایی از SSRهای به دست آمده از درختان سیب یا جنس‌های دیگر دانه‌دارها برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام به بومی کشور استفاده کرد.



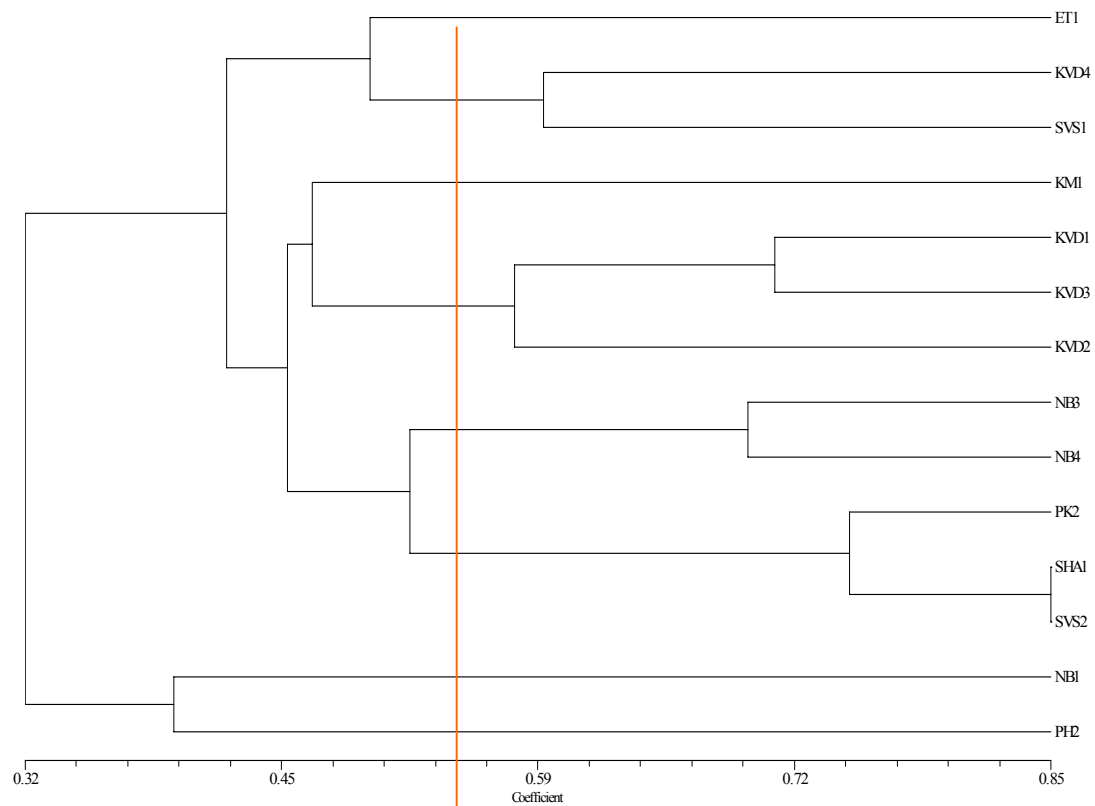
شکل ۴- تعیین شرایط بهینه اتصال جفت آغازگر CH04a12 روی DNA ژنوتیپ های به پس از طی مرحله ابتدایی شیب تغییرات دمایی و سپس استفاده از شیب اُفت تدریجی دمای اتصال آغازگرها با ۶ درجه سانتی گراد بالای دمای بهینه (چپ)؛ پلی مورفیسم ژنوتیپ های به مورد ارزیابی حاصل شده از تکثیر DNA توسط جفت آغازگر CH04a12 (راست)

Fig. 4. Optimization of PCR condition for CH04a12 primers annealing on DNA of quince after first step gradient temperature range and successive using of touch down PCR (left); and polymorphism of quince genotypes, obtained from DNA amplification by CH04a12 primers (right)



شکل ۵- پلی مورفیسم ژنوتیپ های به مورد ارزیابی حاصل شده از تکثیر DNA توسط جفت آغازگر CH02h11a

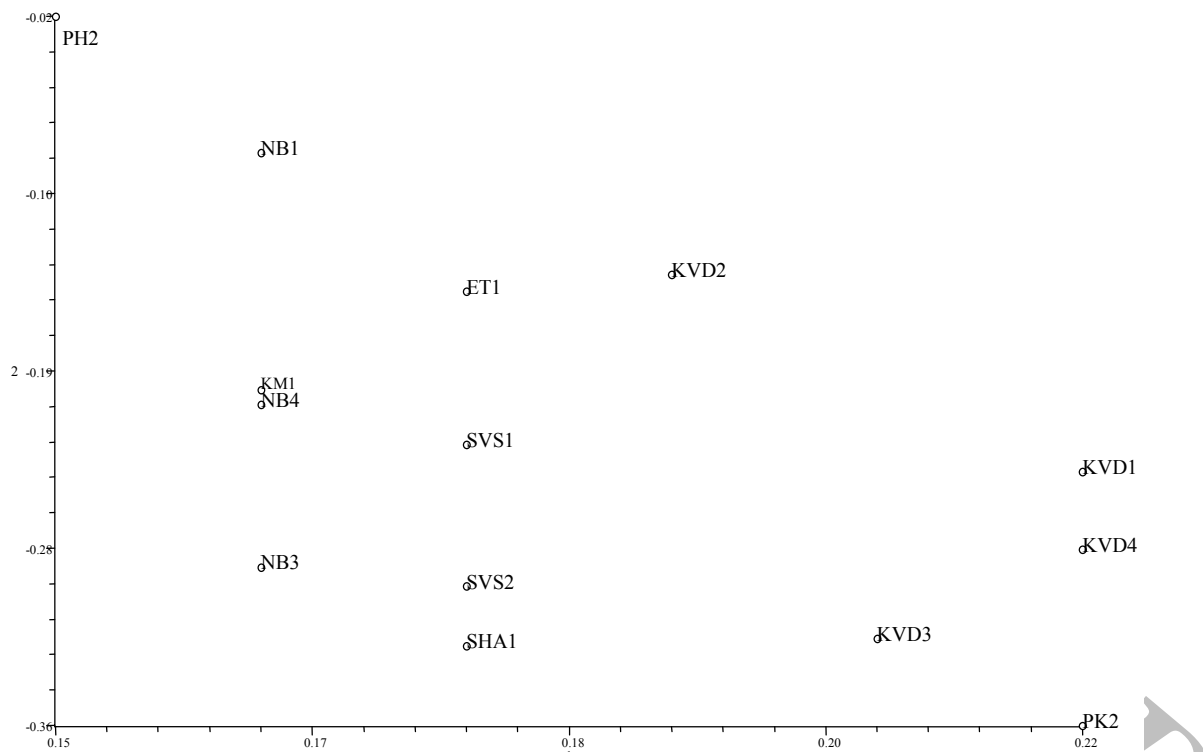
Fig. 5. Polymorphism of quince genotypes obtained from DNA amplification by CH02h11a primers



شکل ۶- تجزیه خوشه‌ای ۱۴ ژنوتیپ به استان اصفهان بر اساس اطلاعات الگوهای بانندی تکثیر شده توسط هشت جفت آغازگر مربوط به

توالی‌های تکراری ساده سیب با استفاده از ضریب تشابه نی (Nei, 1973) و روش UPGMA

Fig. 6. Clustering of 14 quince genotypes of Isfahan based on banding profile obtained from eight pair SSR primers of apple, analyzed by Nei (1973) and using UPGMA method



شکل ۷- نمودار پراکنش ۱۴ ژنوتیپ به استان اصفهان بر اساس اطلاعات الگوهای بانندی تکثیر شده توسط هشت جفت آغازگر مربوط به توالی های تکراری ساده سیب

Fig. 7. Scatter plot of 14 quince genotypes of Isfahan based on banding profile obtained from eight pair SSR primers of apple

شبهات در صفات ظاهری نشان داده و تفکیک و تمایز ارقام آن صرفاً بر اساس صفات مورفولوژیک مشکل تر از دو درخت دیگر است. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت‌های اندک موجود در شکل ظاهری میوه یا برگ ژنوتیپ‌های به جمع‌آوری شده نتیجه تفاوت‌های ژنتیکی این مواد است و با تاثیر عوامل محیطی و یا تغییرات دیگر ارتباطی ندارد. همچنین بر اساس این تحقیق تنها دو ژنوتیپ SHA1 و SVS2 از به‌های موجود در کلکسیون ملی به که دارای منشاء اصفهان هستند تکراری بودند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری کارشناسان آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به خصوص آقای مهندس مهیار طاووسی و همچنین آقای مهندس داریوش آتشکار تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Adli, M. 2008. Collecting and collection establishment of *Cydonia oblonga* Mill. germplasm from different regions of Iran. Proceedings of the 10th Iranian Congress of Genetics (Plant Section), 21-23 May, Tehran, Iran (in Persian).
- Dellaporta, S. L, Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga, F., Cosson, P., Howad, W., and Arus, P. 2004. Comparative mapping and marker assisted selection in

قادر به بیان تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌ها هستند. نکته مهم تفاوت قابل ملاحظه در دمای بهینه اتصال آغازگرها در سیب و به بوده که احتمالاً این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در شرایط PCR و همچنین وجود سطوح مختلف آلودگی‌های فنلی یا قندی آن و یا تفاوت جزئی در توالی‌های محل اتصال جفت آغازگرها در سیب و به باشد. لازم به ذکر است انتقال پذیری آغازگرهای توالی‌های تکراری ساده سیب به ژنوتیپ‌های به بومی ژاپن قبلاً توسط یاماموتو و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده شده بود، لیکن با توجه به تفاوت شکل ظاهری ارقام به این نواحی و همچنین وجود گونه‌های نزدیک و زینتی نظیر به ژاپنی که سبب ایجاد دورگ‌های طبیعی یا مصنوعی در این مناطق شده است انتقال‌پذیری کامل نتایج گزارش شده در مورد ژنوتیپ‌های به ژاپن به ژنوتیپ‌های ایران مورد تردید قرار داشت.

در بین سه گونه مهم و اقتصادی مربوط به زیر خانواده دانه‌دارها، ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به بیش از دو درخت سیب و گلابی

Rosaceae fruit crops. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 9891- 9896.

- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C. 1998.** Simple sequence repeats for the genetic analysis of Apple. Theoretical and Applied Genetics 96: 1069-1076.
- Gygax, M., Gianfranceschi, L., Liebhard, R., Kellerhals, M., Gessler, C., and Patocchi, A. 2004.** Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from *Malus baccata* Jackii. Theoretical and Applied Genetics 109: 1702-1709.
- Hokanson, S. C., Lamboy, W. F., Szewc-McFadden, A. K., and McFerson, J. R. 2001.** Microsatellite (SSR) variation in a collection of Malus (apple) species and hybrids. Euphytica 118: 281-294.
- Liebhard, R., Ganfranceschi, L., and Koller, B. 2002.** Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) Molecular Breeding 10: 217-241.
- Manee, A. 1994.** Pear and Quince, and their Growing. Iran Technical Publication Company. 113 pp. (in Persian).
- Naghavi, M., Gharayazi, B., and Hosseini, Gh. 2005.** Molecular Markers. Tehran University Press. 350 pp. (in Persian).
- Röder, M. S., Plaschke, J., König, S. U., Borner, A., and Sorrells, M. E. 1995.** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. Molecular Genome and Genetic 246: 327-333.
- Sabeti, H. 1996.** Iranian Forests, Trees and Shrubs. Publications of Agricultural and Natural Resources Organization, Tehran, Iran. 810 pp. (in Persian).
- Weising, K., Fung, R. W. M., Keeling, D. J., Atkinson, R. G., and Gardner, R. C. 1996.** Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis*. Molecular Breeding 2: 117-131.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Hayashi, T., Ban, Y., and Matsuta, N. 2001.** SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theoretical and Applied Genetics 102: 865-870.

Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Manabe, T., Kotobuki, K., Hayashi, T., Ban, Y., and Matsuta, N. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis of pear. *Euphytica* 124: 129-137.

Yamamoto, T., Kimura, T., Soejima, J., Sanada, T., Hayashi, T., and Ban, Y. 2004. Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science* 54: 239-244.

Archive of SID