Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Detection of fire blight resistant genes in apple trees (Malus domestica) planted in Isfahan province using SCAR and SSR markers

Marzieh Rabbani

*Corresponding Author, MSc Graduated, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Shiraz, Shiraz, Iran. Email: marziehrabbani421@yahoo.com

Mohammad Mojtaba Kamelmanesh

Assistant professor, Department of plant pathology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad university of Shiraz, Shiraz, Iran. Email: mmkamelmanesh@gmail.com

Abstract

Objective

Plant diseases can be a limiting factor in planting in an area. One of the new methods of producing disease resistant plants is the use of molecular markers. Molecular markers are able to detect and analyze important genes of resistance. Therefore, due to the severity of fire blight, the apple tree germplasm evaluation is necessary, so this research was carried out with the aim of determining resistance genes in some apple genotypes in Isfahan province using SCAR and SSR markers.

Materials and methods

Fresh and young leaves of 70 samples of apple trees in Isfahan were collected in early April and DNA was extracted by CTAB method. Then polymerase chain reaction was performed and DNA fragment was detected and DNAs lengths were measured.

Results

Results indicated that in all populations, none of the primers have a rare band or a typical band replication in 25 or less than 25% population, and 50 or less than 50% population. Semirom- Hana population had the greatest genetic diversity (Nei diversity index, Shannon, effective and different number of alleles) which shows greater genetic diversity

www.SID.ir

in this population rather than other populations.Molecular analysis indicated that diversity among populations is not statistically significant and 92% of the diversity is related to diversity within the populations. The longest distance was between Semirom-Hana and Semirom-Padena populations, and in this disease, the distance between the farthest and closest populations is too low and this result was confirmed by analysis of molecular variance.

Conclusion

The six primers, which were used in this study, have been well produced and display the distinctions in population. Moreover, results indicate that inter-population diversity was very low but by the cross of the farthest and closest populations, then the cross of progeny can pyramidize the target genes and produce a stronger and more diverse recombination.

Keywords: DNA extraction, fire blight, molecule markers, PCR, resistant gene.

Citation: Rabbani M, Kamelmanesh M M (2020) Detection of fire blight resistant genes in apple trees (Malus domestica) planted in Isfahan province using SCAR and SSR markers. Agricultural Biotechnology Journal 12(2), 21-42.

Agricultural Biotechnology Journal 12(2), 21-42.

DOI: 10.22103/jab.2020.11235.1024

Received: March 10, 2020; Accepted: April 30, 2020.

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

ردیابی ژن های مقاوم به بیماری آتشک درختان سیب (Malus domestica) استان اصفهان با استفاده از نشانگرهای SCAR و SSR

مرضیه ربانی

*نویسنده مسئول، فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، شیراز، ایران.

ایمیل: marziehrabbani421@yahoo.com

محمدمجتبی کامل منش

استادیار گروه مهندسی گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران. ایمیل: Kamelmanesh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۱

چکیده

هدف: بیماری‌های گیاهی می‌توانند عامل محدود کننده کاشت یک گیاه در یک منطقه باشند. یکی از شیوه‌های جدید در تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌ها، استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد. نشانگرهای مولکولی قادر به کشف و آنالیز ژن‌های مهم مقاومت هستند. لذا با توجه به شدت خسارت و تنوع ژنتیکی بیماری آتشک که از بیماری‌های خطرناک درختان میوه‌ی دانه‌دار است، ارزیـابی ژرم‌پلاسـم درخت سیب ضروری می‌باشد. از این رو پژوهشی با هدف ردیابی ژن‌های مقاومت به بیماری با استفاده از ۶ نشانگر SCAR و SSR در برخی ژنوتیپ‌های سیب استان اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها: از برگ‌های جوان۷۰ نمونه سیب استان اصفهان، در اوایل اردیبهشت‌ماه نمونه‌برداری و DNA به روش CTAB استخراج گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر قطعات ژنومی۶ جفت آغازگر انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد در جمعیت‌ها، آغازگرها باند نادر و معمولی تکثیر شده در ۲۵ یا کمتر از ۲۵ درصد جمعیت و ۵۰ یا کمتر از ۵۰ درصد جمعیت تکثیر نکردند. جمعیت سمیرم- حنا بیشترین مقدار شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی، شانون، تعداد آلل موثر و متفاوت را داشت که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بیشتر در این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها است. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد تنوع بین جمعیتی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد و ۹۲٪ تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های سمیرم-حنا و سمیرم- پادنا بود و فاصله بین دورترین و نزدیکترین جمعیت‌ها کم بود که این نتیجه به وسیله تجزیه واریانس مولکولی نیز تایید گشت.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: ۶ آغازگر به خوبی تکثیر شده و تمایز بین جمعیت ها را نشان دادند لذا نشانگرها به درستی انتخاب شده اند. همچنین نتایج حاکی از تنوع بین جمعیتی بسیار کم بود اما با تلاقی دورترین و نزدیکترین جمعیت و سپس تلاقی نتاج بدست آمده، می‌توان جهت هرمی شدن ژن‌های مورد نظر و تولید نوترکیبی قوی‌تر و متنوع‌تر بهره جست.

کلمات کلیدی: آتشک سیب، مقاومت، نشانگر مولکولی، استخراج DNA، PCR

مقدمه

سیب مهمترین میوه معتدله و یک محصول چند ساله است که در طولانی مدت با محرک‌های محیطی و جهش پاتوژن‌ها مواجه شده است (Dolati Baneh and Majdi, 2009). آتشک (Ervinia amylovora)، یکی از بیماری‌های مهم و خطرناک درختان میوه‌ی دانه‌دار و مهمترین بیماری باکتریایی سیب در جهان و نیز ایران است. این بیماری حتی اگر در برخی مناطق، انتشار کمی هم داشته باشد، خسارات سنگینی را به درختان تحمیل می‌کند. این بیماری علاوه بر خسارت مستقیم مانند کاهش کمیت و کیفیت میوه‌ها، بصورت غیر مستقیم مثل ریزش زود هنگام برگ‌های آلوده و کاهش جوانه‌هایی که در سال بعد تولید می‌شود و حتی خشک شدن و مرگ کل درخت هم خسارت وارد می‌کند. بیماری آتشک علاوه بر سیب به گلابی، به و سایر میوه‌های دانه‌دار نیز حمله کرده و خسارت می‌زند. با توجه به خسارات وارد شده به باغات سیب توسط این بیماری، لازم است برنامه پایشی دقیقی برای مهار بیماری در مناطق انتشار آن به اجرا درآید (Dolati Baneh and Majdi, 2009). کنترل این بیماری توسط جلوگیری از آلودگی، ریشه کنی، عوامل آنتی‌بیوتیکی و تنظیم کننده‌های رشد و عوامل بیوکنترل بوده و البته واریته‌های مقاوم کلید اساسی و از کم هزینه‌ترین راه‌ها در مدیریت این بیماری می‌باشند (McManus et al. 2002). روش‌های مولکولی یکی از راهکارهای تولید ارقام با مقاومت پایدار به بیماری‌ها می‌باشند (Agrios 2010). در واقع نشانگرهای مولکولی DNA یک ابزار مفید برای ردیابی ژن‌های مقاومت و کمک به انتخاب ژنوتیپ‌هایی با ژن‌های مشخص در جمعیت‌های در حال تفرق هستند. یکی از این نشانگرها SSR می‌باشد. این نشانگر یک روش مبتنی بر PCR، سریع، قابل اعتماد و کم‌هزینه برای ارزیابی روابط خویشاوندی گیاهان است و دارای ویژگی‌هایی از قبیل چندمکانی بودن، چندشکلی نسبتاً بالا و عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر است و در موجودات مختلف، از جمله گاو، گوسفند، بز و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al., 2010; Ghasemi et al., 2010; Askari et al., 2011; Zamani et al., 2011; Zamani et al., 2015; Bahador et al., 2016; Mohammadabadi et al., 2017). از دیگر نشانگرهای مورد استفاده نشانگر SCAR می‌باشد. این نشانگر به دلیل افزایش اختصاصی بودن عموماً یک باند فوق العاده تکرار پذیر را ایجاد می کند. مزیت نشانگرهای SCAR این است که به علت افزایش شرایط سختی در آن‌ها تنها یک جایگاه ژنی توسط آن‌ها شناسایی می‌شود. از طرف دیگر به دلیل طویل‌تر بودن آغازگرها، تکرارپذیری آن‌ها نیز نسبت به نشانگرهای RAPD بیشتر

www.SID.ir

Archive of SID

است. همچنین نحوه توارث پذیری نشانگرهای SCAR به صورت همبارز است و برای آشکار کردن قطعه‌ها از دورگ‌گیری استفاده می‌شود(Naghavi et al. 2005). با کمک آغازگرهای مربوط به نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت می‌توان ژن هدف را تکثیر کرده و حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ مورد بررسی را تعیین نمود (Kumar and Gupta 2008).

در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی در مطالعات بر روی سیب کاربرد زیادی داشته‌اند. از این نشانگرها تاکنون در مطالعات شجره‌ای، تعیین قرابت ژنتیکی و ترسیم نقشه ژنتیکی (Kenis and Keulemans 2004; Haley and Knott 1992; Conner et al. 1998)، تهیه ژن‌های مقاوم به آفات و بیماری ها (Durel et al .2003; Patocchi et al. 2005; Calenge et al. 2004; Evans and James 2003) جداسازی و تعیین توالی آنالوگ‌های ژن‌های مقاوم به بیماری‌ها (Calenge et al. 2005) و شناسایی ارقام سیب (Hokanson et al. 1997; Gianfranceschi et al. 1998; Liebhard et al. 2003) استفاده شده است.در پژوهشی Omidvar et al. (2006) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتری Ervinia amylovora را بررسی کردند. همچنین Maleki Balajoo et al. (2011) واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های کلکسیون سیب بومی ایران به E. amylovora را مورد مطالعه قرار دادند. به منظور مشخص نمودن مکان‌های ژنی صفات کمی (QTLs) مرتبط با بیماری باکتریایی آتشک در هلو و سیب، تحقیقات گوناگونی صورت گرفته است. در تحقیقی یک QTL اصلی روی گروه‌های ۷ متصل به رقم سیب فیستا در موقعیت ژنتیکی مشابه در دو پیش زمینه ژنتیکی متفاوت مشخص شده است که شامل Fiesta(F) × Discovery(D) و Prima(P) × Fiesta(F) می‌باشند. اگر چه در طرفین این نشانگرهای QTL، نشانگرهای AFLP و RAPD قرار داشتند ولی به عنوان نشانگر انتخابی (MAS) مناسب نبودند. ثبات در پیش زمینه های ژنتیکی گوناگون، کارایی و قابلیت استفاده از MAS بستگی به مقاومت و نوع نشانگرها دارد. دو نشانگر RAPD برای QTL طبقه بندی شدند که به یک نشانگر SCAR و یک نشانگر SSR ویژه برای این منطقه تبدیل شدند (Khan et al. 2006 and 2007). در مطالعه دیگری که توسط Przybylkowicz et al. (2009)، برای ردیابی ژن‌های مقاومت به بیماری آتشک انجام شد، نشانگر CH-F7-FB1 برای این منطقه نشان داده شد. همچنین Fahrentrapp et al. (2012) در مطالعه برای شناسایی ژن منتخب مقاوم به بیماری آتشک نزدیکترین نشانگر SSR برای این QTL را معرفی کردند. QTL بر روی LG7 فیستا را می‌توان بعنوان یک QTL پایدار در نظر گرفت زیرا در پیش‌زمینه‌های ژنتیکی متفاوت مشخص گردیده و پس از تلقیح با ۲۰ سویه متفاوت باکتری Erwinia amylovora مشاهده می‌گردد (Khan et al. 2006 and 2007).

چهار مورد از QTL کوچک اثر نیز مشخص شده است که یک مورد روی لینکاژ گروه ۳ از فیستا و یک مورد روی لینکاژ گروه ۳ از پریما با استفاده از تلاقی F × D و P × F (به ترتیب) مشخص گردیده است. همچنین یک مورد برای هرکدام از لینکاژ گروه ۱۲ و لینکاژ گروه ۱۳ دیسکاوری در یک تلاقی F × D حاصل شده است. در هر دو مجموعه از والدین، موقعیت حداکثر احتمال QTL روی F7 نزدیک به نشانگر RAPD، GE80-19-0550 بوده است. نزدیک‌ترین نشانگر توالی تکراری ساده

www.SID.ir

Archive of SID

(SSR) به GE80-19-0550، CH04e05 می باشد که 25 cM از نشانگر RAPD در تلاقی P × F و 31cM از نشانگر RAPD در تلاقی F × D است (Khan et al. 2006 and 2007). علی‌رغم تحقیقات گسترده صورت گرفته در زمینه شناسایی ژن‌های مقاومت توسط محققین مختلف، هنوز تلاش چندانی مبنی بر ردیابی ژن‌های مقاومت به بیماری آتشک در پایه‌های سیب به منظور اصلاح پایه‌ها و تولید گیاهان مقاوم به این بیماری صورت نگرفته است. از این‌رو هدف از انجام این تحقیق، یافتن ارقام و جمعیت هایی بود که با توجه به تجمع ژن‌های مقاومت بتوان برای اصلاحات ژنی و تلاقی‌های موفقیت‌آمیز به منظور ایجاد مقاومت پایدار و معرفی و تولید پایه‌های جدید مقاوم به این بیماری از آن‌ها بهره جست.

مواد و روش‌ها

تعداد۷۰ نمونه از ۱۲رقم کشت شده (مالینگ پاکوتاه، مالینگ رد، مالینگ گلدن، رد دلیشز، گلدن دلیشز، گلدن فرانسوی، سیب ۴، سیب سلطانی، سیب زرد مرداد، سیب گلاب، سیب سبز، سیب پائیز) در باغات ۶ بخش شهرستان سمیرم شامل بخش‌های مرکزی (Se)، حاجی‌آباد (Se-ha)، حنا (Se-h)، مهرگرد (Se-me)، بیده (Se-bi) و پادنا (Se-pa) و شهرستان‌های دهاقان (De)، شهرضا (Sh)، اصفهان (Es) و خمینی‌شهر (Kh) استان اصفهان برای انجام آزمایش انتخاب شدند. مناطقی که از آن‌ها نمونه برداری به عمل آمد به دلیل داشتن بیشترین سطح زیر کشت سیب در استان اصفهان برای انجام تحقیقات انتخاب شدند. استان اصفهان با مساحتی حدود ۱۰۷۰۴۴ کیلومتر مربع، بین ۳۰ درجه و ۴۳ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۲۷ دقیقه عرض جغرافیایی خط استوا و ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۵۵ درجه و ۳۱ دقیقه طول شرقی از نصف‌النهار گرینویچ قرار دارد. این استان دارای آب و هوای نیمه خشک بوده و میزان بارندگی در این استان از میانگین جهانی بسیار پایین تر است (سایت هواشناسی استان اصفهان).

در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت برگ‌های تازه و جوان این ارقام به منظور شناسایی ژن‌های مقاوم به بیماری آتشک سیب جمع‌آوری و به آزمایشگاه علمی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شیراز منتقل شدند. نمونه‌های برگی با استفاده از ازت مایع پودر و DNA موجود در آن‌ها به روش CTAB تغییر یافته (Murray and Thompson 1980) استخراج گردیده و در آخر، DNAهای آماده شده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.پس از آن تکثیر قطعات ژنومی توسط ۶ جفت آغازگر تهیه شده از شرکت Metabion کشور آلمان (جدول ۱) شامل CHO3E03 (Fahrentrapp et al. 2012)، CHO3G12 (Przybylkowicz et al. 2009)، AE10، GE-8019، CH-F7-Fb1 وCH-SD1 (Khan et al. 2007) و با استفاده از ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، مواد PCR شامل dNTP mix، Tag DNA polymerase، $Mgcl_2$ و PCR buffer که از شرکت سیناژن تهیه گردیدند و آب دوبار تقطیر استریل در دستگاه ترمال سایکلر[1] (PCR)(مدل Auto- Q Server، شرکت

[1]. polymerase chain reaction (Termal cyclre)

www.SID.ir

Archive of SID

Quanta Biotech کشور انگلستان) انجام شد. جهت تنظیم دمای مناسب برای هر آغازگر، واکنش PCR با دماهای مختلفی انجام شد. برنامه نهایی و مناسب برای هر آغازگر در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 1.The Primer sequences used in this research

آغازگر Primer	نوع نشانگر Marker type	اندازه قطعات (bp) Amplicon size	توالی آغازگر Primer sequence
AE10	SCAR	375	F: CTGAAGCGCACGTTCTCC R: CTGAAGCGCATCATTTCTGATAG
GE-8019	SCAR	397	F: TTGAGACCGATTTTCGTGTG R: TCTCTCCCAGAGCTTCATTGT
CH-F7-Fb1	SSR	174-210	F: AGCCAGATCACATGTTTTCATC R: ACAACGGCCACCAGTTTATC
CH-Sd1	SSR	242	F: TGCGTATCCAACTCATTCTCC R: GCCATAAAGGAGGTCGAATTTAC
CH03e03	SSR	186	F: AAAACCCACAAATAGCGCC R: GCACATTCTGCCTTATCTTGG
CH03g12z	SSR	220	F: CAAGGATGCGCATGTATTTG R: GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT
			R: GGAAAGAAAGACCAAAATAAACG

الکتروفورز ژل آگارز: جهت بررسی واکنش زنجیره‌های پلیمراز و اطمینان از تکثیر قطعه DNA مدنظر، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و با ولتاژ ۹۵ و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز [۲] (دستگاه الکتروفورز مدل Power Pac Basic، شرکت Bio- rad کشور انگلستان) انجام و با استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل[۳] (مدل DOC.CF08.XD، شرکت UV1 TECH کشور آمریکا) باندها مشاهده و از ژل عکسبرداری و طول قطعه DNA تکثیر شده تشخیص داده شد.

[2] . Electrophoresis
[3]. Gel documentation (Gene Flash, Syngene Bio Imaging)

www.SID.ir

Archive of SID

پس از تعیین طول قطعه DNA تکثیر شده، حضور ژن مورد نظر و یا عدم حضور ژن در نرم‌افزار اکسل به صورت صفر و یک امتیازدهی و با استفاده از نرم‌افزارهای تخصصی NTSYS-PC(2.02) (Rohlf,1998)، PopGene(1.32) (Yah et al., 1999)، GenAlex(6.501) (Peakall and Smouse, 2012) و Mega4(4.02) (Tamura et al., 2007) آنالیز شد. نمودارهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 ترسیم شدند.

جدول ۲. سیکل گرمایی استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای بیماری آتشک

Table 2. The Termal cyclre used in polymerase chain reaction using fire blight primers

تعداد چرخه Cycle number	بسط نهایی Ultimate expansion	بسط Expansion	اتصال Bond	واسرشت سازی Separation	واسرشت سازی اولیه Primary separation	آغازگر Primer
35سیکل	72 ºC (15 min)	72 ºC (1:40 min)	58 –53ºC (45 sec)	94 ºC (30 sec)	94 ºC (5 min)	CHO3E03
35سیکل	72 ºC (5 min)	72 ºC (2 min)	60 ºC (90 sec)	96 ºC (30 sec)	95 ºC (5 min)	CHO3G12Z
35سیکل	72 ºC (5 min)	72 ºC (2 min)	60 ºC (60 sec)	96 ºC (45 sec)	95 ºC (5 min)	AE10
35سیکل	72 ºC (5 min)	72 ºC (2 min)	60 ºC (60 sec)	96 ºC (45 sec)	95 ºC (5 min)	GE-8019
35سیکل	72 ºC (5 min)	72 ºC (2 min)	58 ºC (60 sec)	96 ºC (45 sec)	95 ºC (5 min)	CH-F7-FB1
35سیکل	72 ºC (5 min)	72 ºC (2 min)	63 ºC (60 sec)	96 ºC (45 sec)	95 ºC (5 min)	CH-SD1

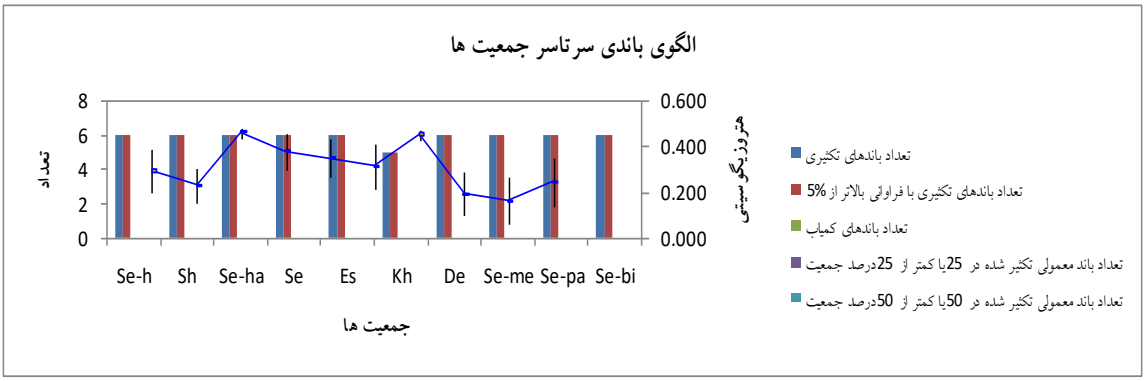
نتایج و بحث

تعداد کل نوارهای تکثیر شده توسط ۶ آغازگر برابر ۲۷۸ قطعه و در محدوده ۱۷۴ تا ۳۹۷ جفت باز بودند که بیشترین تعداد نوار تکثیر شده (۶۴ قطعه) مربوط به آغازگر CH-F7-FB1 و کمترین تعداد (۳۵ قطعه) متعلق به آغازگر GE-8019 بود. متوسط تعداد قطعه تولیدی با اندازه مختلف توسط هر آغازگر، ۴۶/۳۳ قطعه بود. شش آغازگر استفاده شده توانستند به خوبی تکثیر شده و تمایز بین جمعیت‌ها و نمونه‌ها را نشان دهند و باند نادر، باند معمولی تکثیر شده در ۲۵ یا کمتر از ۲۵ درصد جمعیت و باند معمولی تکثیر شده در ۵۰ یا کمتر از ۵۰ درصد جمعیت در هیچکدام از جمعیت‌ها مشاهده نگردید. همچنین تعداد مکان ژنی تکثیر شده و تعداد باندهای تکثیری با فراوانی بالاتر از ۵٪ در تمام جمعیت‌ها به جز جمعیت خمینی شهر (۵ مکان تکثیری) ۶ مکان ژنی بود

www.SID.ir

Archive of SID

(شکل ۱). این نتیجه می‌تواند تاییدی بر اختصاصی بودن آغازگرهای متصل به ژن و عدم تکثیر غیر اختصاصی آن‌ها باشد و همانطور که Kumar and Gupta (2008) گزارش کردند امکان تکثیر ژن هدف و تعیین حساسیت یا مقاومت ارقام با کمک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت بطور کامل وجود دارد.



شکل ۱. میزان واریانس تایید شده درون جمعیتی بر اساس کای‌اسکوئر مشاهده شده در مقابل تصادفی

Figure 1. Inter-population validated variance based on chi-square observed compared to random order

نتایج نشان داد که جمعیت سمیرم- حنا دارای بیشترین مقدار شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی، شاخص شانون، تعداد آلل موثر و متفاوت بود که این نتیجه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بیشتر این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها است. همچنین جمعیت سمیرم- پادنا دارای کمترین مقدار این شاخص ها بود (جدول 3). بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق پیشنهاد می‌گردد که ازگیاهان دگرگشن منتخب در این جمعیت‌ها و انتخاب بهترین‌ها پس از بیمار کردن نتاج حاصل از تلاقی در هر نسل جهت هرمی کردن ژن‌های مقاوم و تولید نوترکیبی جدیدی بین ژن‌های مقاوم که دارای هتروسیس و قدرت مقاومت بالاتری باشند بهره برد. مشابه این پژوهش را Przybylkowicz et al. (2009) انجام و اقدام به ردیابی و انتخاب ژن‌های مقاومت برای تلاقی گیاهان به منظور ایجاد نتاج مقاوم در برابر بیماری آتشک نمودند. همانگونه که می‌دانیم تنوع ژنتیکی راهی است برای آن که جمعیت یک گونه به دگرگونی‌های محیط طبیعی وفق پیدا کند و هرچه میزان این تنوع بیشتر باشد، احتمال بیشتری وجود دارد که بعضی از اعضای جمعیت، آن تعداد از آلل‌ها که باعث دوام در محیط می‌شوند را به دست بیاورند. از این روی احتمال آن‌که اعضای بیشتری به بلوغ برسند و دارای فرزندانی شوند که حامل آن آلل‌ها هستند بیشتر است (Romesburg 1990).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از شاخص‌های نی، شانون، تعداد آلل موثر و متفاوت

Table 3. Genetic diversity of the studied populations using Nei, Shannon, effective and different allele numbers

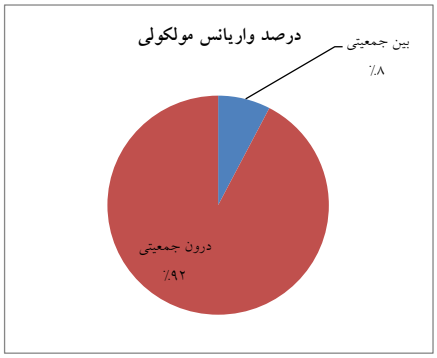
تعداد آلل متفاوت Different allele numbers	تعداد آلل موثر Effective allele numbers	شاخص شانون Shannon Index	تنوع ژنتیکی نی Nei genetic diversity	جمعیت Population
1/67	1/55	0/42	0/29	سمیرم- حنا
1/67	1/35	0/35	0/23	شهرضا
2/00	1/87	0/65	0/46	سمیرم- حاجی‌آباد
1/83	1/71	0/54	0/38	سمیرم
1/83	1/64	0/50	0/35	اصفهان
1/50	1/59	0/44	0/31	خمینی‌شهر
2/00	1/83	0/64	0/45	دهاقان
1/50	1/35	0/28	0/19	سمیرم- مهرگرد
1/33	1/32	0/23	0/16	سمیرم- پادنا
1/50	1/48	0/34	0/24	سمیرم- بیده

بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به بیماری آتشک در ژنوتیپ‌های سیب با استفاده از نرم‌افزار GenAlex نیز نشان داد که ۷ ژنوتیپ دارای ۶ مکان ژنی مقاوم به این بیماری می‌باشند. این ژنوتیپ‌ها همه از ارقام گلدن (GD8، GD7، GD25، GD20، GD14، GD12 و GD11) می‌باشند. همچنین دو ژنوتیپ سیب زرد مرداد اصفهان (Zm1) و گلدن دلیشز سمیرم (GD17) با داشتن فقط یک مکان ژنی مقاومت به بیماری به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی گردیدند که با تلاقی این ژنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری می‌توان جمعیتی تولید کرد که در آن نتاج مقاوم‌تر از والدین باشند. این موضوع که هر چه فراوانی ژن مقاومت در رقم بیشتر باشد، آن نمونه دارای سطح تحمل بالاتری نسبت به بیماری می‌باشد توسط Hemmat et al. (2002) در مورد بیماری لکه سیاه سیب گزارش گردیده است. همچنین نتایج حاصل از آزمایش Stankovich et al. (2002)، وجود ژن مقاومت به بیماری لکه سیاه در کلیه ژنوتیپ‌های سیب و وجود رابطه مستقیم بین فراوانی این ژن با مقاومت به بیماری در نمونه-های سیب را تأیید می‌کند. در تحقیقی در خصوص تعیین نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن PL-D در سیب، مقاومت به سفیدک پودری توسط James et al. (2004) گزارش شد. همچنین Patzak et al. (2011) در تحقیقی مشابه وجود ژن‌های مقاوم به بیماری سفیدک پودری سیب و رابطه مستقیم بین فراوانی این ژن‌ها با مقاومت به بیماری در نمونه‌های سیب را گزارش نمودند. در تحقیق دیگری توسط Salmanian et al. (2014) بر روی نمونه‌های سیب استان فارس رابطه فراوانی ژن‌های مقاومت با مقاومت به بیماری آتشک تأیید گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): تفاوت‌های ژنوتیپی یکی از اجزای تنوع است که منجر به تنوع ژنتیکی میان افراد درون یک جمعیت یا بین جمعیت‌های یک گونه می‌شود و یکی از مهمترین نیازهای به‌نژادگران می‌باشد (Loos 1993). برای آنکه به‌نژادگر بتواند حداکثر بهره برداری را از پدیده هتروزیس به عمل آورد، ابتدا لازم است میزان تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را ارزیابی نماید و سپس با دورگ‌گیری بین ژنوتیپ‌هایی که از نظر تنوع، تفاوت عمده‌ای با یکدیگر دارند به هیبریدهای مقاوم و با صفات مطلوب دست یابد (Romesburg 1990). لذا در این تحقیق، به منظور ارزیابی درصد و سهم تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی در سطح مولکولی، با استفاده از نرم‌افزار GenAlex تجزیه واریانس مولکولی انجام گردید. بر اساس نتایج، تنوع معنی‌داری در بین جمعیت‌ها مشاهده نگردید. فقط ۸ درصد از کل تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها بود در حالی که ۹۲ درصد از تنوع کل مربوط به درون جمعیت‌ها بود (شکل ۲). از این موضوع چنین برداشت می‌شود که به دلیل دگرگشنی جمعیت سیب، انتقال دانه گرده درون جمعیت‌ها صورت گرفته و با گذشت زمان با هم اختلاط یافته‌اند و جریان ژنی سبب شده است تنوع بین جمعیت‌ها کم و تنوع درون جمعیت‌ها زیاد شود. این نتیجه مشابه نتایج به دست آمده توسط Salmanian et al. (2014) می‌باشد. آن‌ها میزان تنوع در جمعیت‌های سیب استان فارس را مورد بررسی قرار داده که در این تحقیق ۹۶ درصد تنوع درون جمعیتی و تنها ۴ درصد تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها بود. توزیع فراوانی ارزش جایگشت PhiPT تصادفی در مقابل ارزش PhiPT مشاهده شده نیز نتیجه واریانس بین جمعیت‌ها که از طریق تجزیه واریانس مولکولی ۸ درصد بدست آمد را تایید کرد (شکل 3).

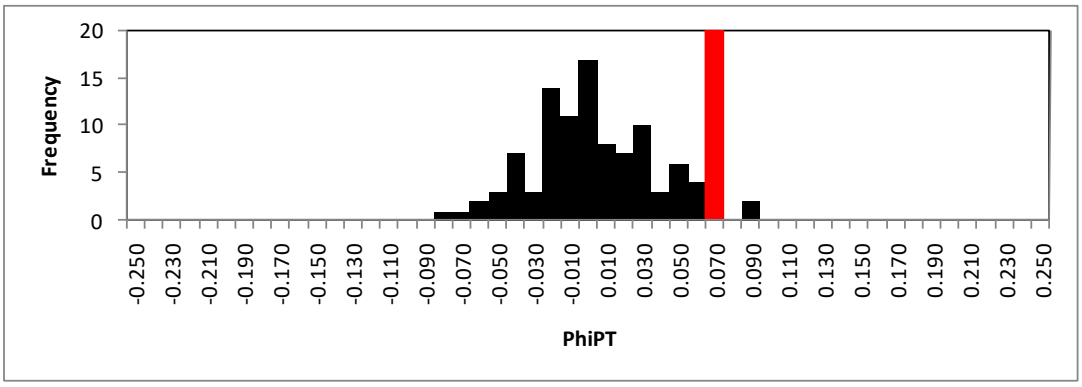


شکل ۲. میزان واریانس مولکولی بین و درون جمعیتی سیب‌های مورد بررسی در بیماری آتشک

Figure 2. The amount of molecular variance between and within the population of apples studied for fire blight

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. میزان واریانس تایید شده درون جمعیتی بر اساس کای‌اسکوئر مشاهده شده در مقابل تصادفی

Figure 3. Inter-population validated variance based on chi-square observed compare to random order

فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس ضریب فاصله نی و با نرم افزار GenAlex اندازه‌گیری شد. بر اساس ماتریس فاصله به دست آمده، این فاصله بین ۰/۰۲۱ و ۰/۴۷۹ متفاوت بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های سمیرم- حنا و سمیرم- پادنا و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های اصفهان و خمینی شهر وجود داشت (جدول 4). همانطور که نتایج نشان می‌دهد فاصله بین دورترین و نزدیکترین جمعیت‌ها خیلی کم می‌باشد که این نتیجه به‌وسیله روش تجزیه واریانس مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. تعیین فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها در اصلاح نباتات اهمیت زیادی دارد. از فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و نمونه‌ها می‌توان در برنامه‌های دورگ‌گیری به منظور تولید نتاج برتر مقاوم به بیماری آتشک سیب از والدین استفاده نمود. بدین منظور هر چه فاصله ژنتیکی والدین از هم بیشتر باشد، امکان تولید هتروزیس بیشتر شده و احتمال موفقیت در ایجاد ژنوتیپ‌های برتر افزایش خواهد یافت. در این تحقیق هر چند فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم می‌باشد اما با تلاقی دورترین و نزدیکترین جمعیت با هم و سپس تلاقی بین نتاج بدست آمده از تلاقی‌های مختلف، جهت هرمی شدن ژن‌های مورد نظر و تولید نوترکیبی جدید می‌توان بهره جست که احتمال تولید نتاج قوی‌تر و متنوع‌تر وجود دارد. با توجه به هزینه بالا و زمان طولانی جهت آلوده سازی درختان سیب و بررسی علائم ظاهری بیماری و ارزیابی فنوتیپی، روش‌های مولکولی راهی سریع‌تر جهت ارزیابی باغات سیب بوده و با توجه به سهم ژن‌ها در جمعیت‌های مورد نظر و اینکه کدام ژن‌ها بیشترین تاثیر را در مقاومت به بیماری دارند می توان هرم سازی ژنی را انجام داد. نتایج تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) جمعیت‌های سیب مورد بررسی در بیماری آتشک با استفاده از ضریب فاصله نی و روش خوشه‌بندی UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Mega4، جمعیت‌ها را به دو گروه تقسیم‌بندی کرد. بر این اساس جمعیت‌های سمیرم- حنا، شهرضا، اصفهان، خمینی شهر، سمیرم- حاجی آباد، دهاقان و سمیرم-بیده در یک گروه و جمعیت‌های سمیرم، سمیرم- مهرگرد و سمیرم- پادنا در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤. ماتریس فاصله ژنتیکی جمعیت‌های سیب مورد بررسی در بیماری آتشک بر اساس ضریب فاصله نی

Table 4. The matrix of the genetic distance of the apple populations studied for fire blight based on Nei distance

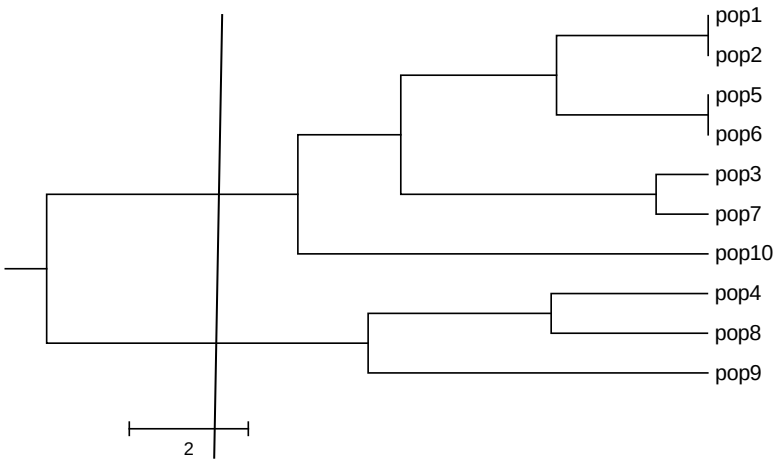
Se-h	Sh	Se-ha	Se	Es	Kh	De	Se-me	Se-pa	Se-bi	جمعیت Papulation
0/000										Se-h
0/025	0/000									Sh
0/230	0/228	0/000								Se-ha
0/239	0/310	0/177	0/000							Se
0/123	0/100	0/136	0/277	0/000						Es
0/087	0/055	0/137	0/360	0/021	0/000					Kh
0/107	0/119	0/089	0/142	0/167	0/149	0/000				De
0/133	0/185	0/339	0/086	0/268	0/318	0/223	0/000			Se-me
0/166	0/312	0/479	0/191	0/324	0/394	0/299	0/111	0/000		Se-pa
0/164	0/181	0/236	0/274	0/144	0/170	0/285	0/145	0/233	0/000	Se-bi

تعیین خط برش جمعیت‌ها بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی که حاکی از تنوع کمتر از ۸ درصد در بیماری بود تعیین شد. در گروه‌های به وجود آمده در نتیجه خط برش، از هر نمونه جمعیتی مشاهده می‌شود و نشان دهنده عدم تفکیک نمونه‌ها و شباهت نمونه‌های جمعیتی با یکدیگر است. یعنی نقطه برش جایی تعیین شده که بین جمعیت‌ها اختلاف کمی وجود داشته باشد و اختلاف در درون جمعیت‌ها باشد که گویا تأیید تجزیه واریانس مولکولی و فاصله ژنتیکی مبنی بر تنوع کم بین جمعیت‌ها می‌باشد. چرا که نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز در تأیید نتیجه تجزیه کلاستر نشان از تنوع بین جمعیتی خیلی کم و شباهت بسیار بین جمعیت‌ها و تفاوت‌های موجود در درون جمعیت‌ها می باشد. می‌توان از عوامل موثر در تنوع کم بین جمعیت‌ها و شباهت زیاد آن‌ها، انتخاب پایه‌های سیب از مناطق نزدیک به هم در یک استان دانست که موجب تداخل گرده‌افشانی جمعیت‌ها با هم به مرور زمان می‌گردد. همچنین تعداد کم آغازگرها می‌تواند از دلایل دیگر این موضوع باشد. نتایج تجزیه به محورهای اصلی جمعیت های سیب مورد مطالعه شامل واریانس توجیه شده به‌وسیله هر مولفه و واریانس تجمعی سه مولفه اول حاصل از آغازگرهای استفاده شده نشان می‌دهد سه محور اول در مجموع ۸۷/۰۹ درصد تغییرات را توجیه می‌کند (جدول 5). همچنین نمودار بای‌پلات تجزیه به مختصات اصلی، جمعیت‌ها را به ۴ گروه تقسیم کرد که این نتیجه با تجزیه کلاستر و نتایج فاصله ژنتیکی تطابق نداشت (شکل ۵). علت این عدم تطابق و تنوع کاذب بین جمعیت‌ها می تواند به این دلیل باشد که بای‌پلات تجزیه به مختصات اصلی از دو مولفه استفاده می‌نماید و این دو مولفه، ۷۱/۵۱ درصد اطلاعات را استفاده کرده و از ۱۰۰ درصد اطلاعات استفاده نکرده است. در صورتی که در تجزیه به مختصات اصلی، تجزیه کلاستر و فاصله ژنتیکی از ۱۰۰ درصد اطلاعات جهت انجام تجزیه‌ها استفاده می‌شود (Tamura et al.,2007) (Peakall and Smouse, 2012). با توجه به نتیجه به دست آمده

www.SID.ir

Archive of SID

از تجزیه به مختصات اصلی می‌توان گفت همبستگی نسبتاً خوبی بین ژن‌های مورد نظر در بیماری وجود دارد و احتمالا ژن‌های مورد بررسی در بیماری بر روی یک کروموزوم بوده‌اند.



شکل ٤. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد بررسی سیب در بیماری آتشک Se-h=pop1 (سمیرم-حنا)، Sh=pop2 (شهرضا)، Se-ha=pop3 (سمیرم-حاجی آباد)، Se=pop4 (سمیرم)، Es=pop5 (اصفهان)، Kh=pop6 (خمینی شهر)، De=pop7 (دهاقان)، Se-me =pop8 (سمیرم-مهرگرد)، Se-pa=pop9 (سمیرم-پادنا)، Se-bi =pop10 (سمیرم-بیده).

Figure 4. The cluster analysis of apple population studied under fire blight disease. Se-h= pop 1 (Semirom-hana), sh= pop 2 (Shahrezaa), Se-ha= pop3 (Semirom hajiabad), Se= pop 4 (Semirom), Es= pop 5 (Esfahan), Kh= pop 6 (Khomeynishahr), De= pop 7 (Dehghanan), Se-me= pop 8 (Semirom-mehrgard), Se-pa= pop9 (Semirom-Padena), Se-bi= pop 10 (Semirom-bideh).

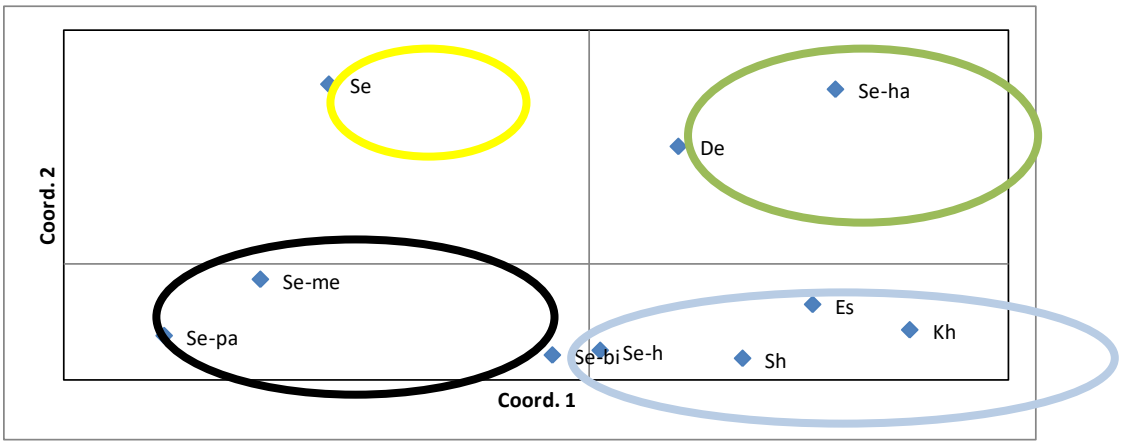
Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵. واریانس نسبی و تجمعی سه محور اول در تجزیه به مختصات اصلی

Table 5. The relative and cumulative variance of the first three axes in principle coordinate analysis

3	2	1	محور Axe
15/58	26/94	44/57	واریانس نسبی Relative Variance
87/09	71/51	44/57	واریانس تجمعی Cumulative Variance



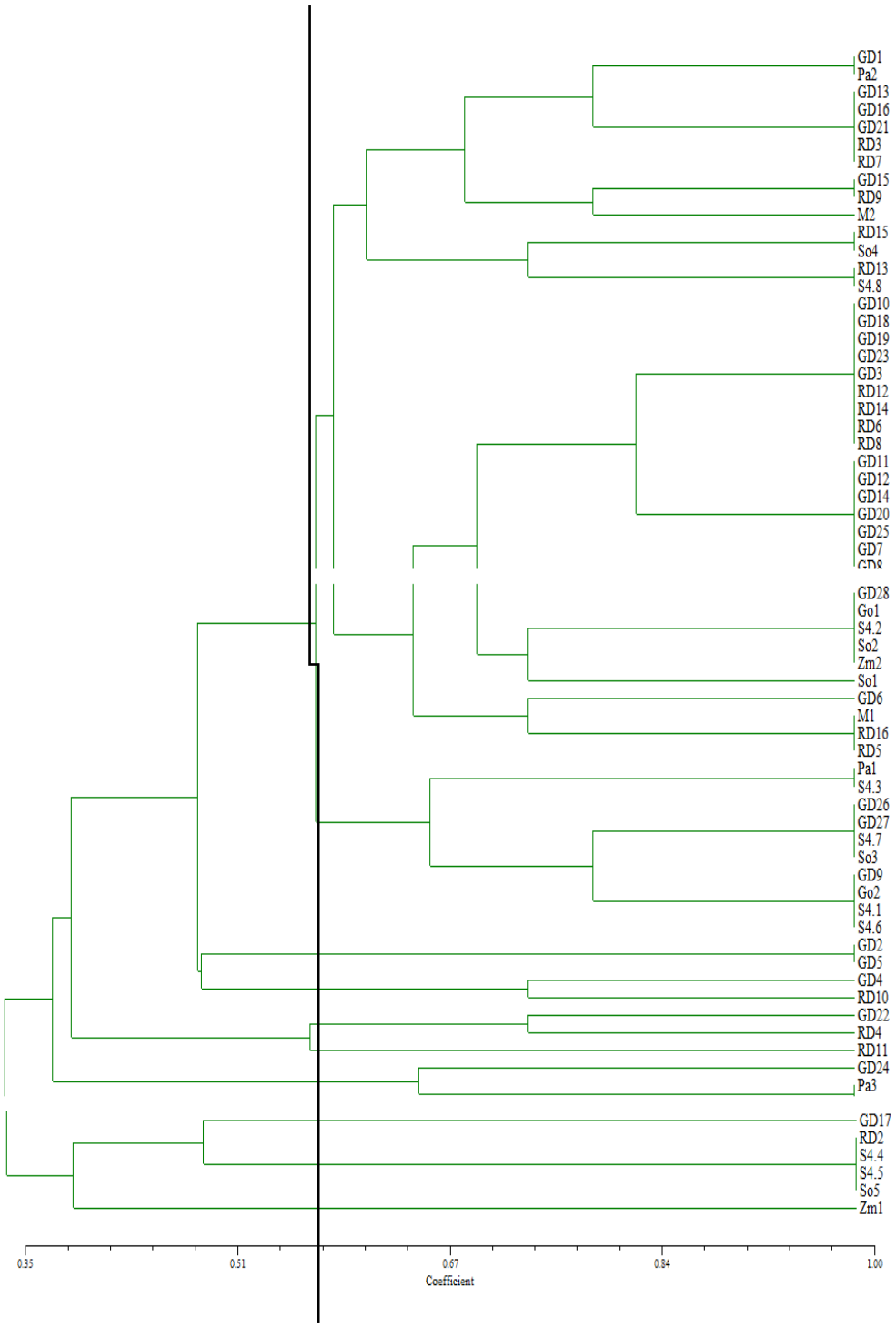
شکل ۵. بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌های سیب مورد بررسی در بیماری آتشک

Figure 5. Obtained result of principle coordinate analysis in the apple population studied under fire blight disease

در بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای اصولی ترین روش برآورد شباهت بین افراد در یک مجموعه ذخایر توارثی می‌باشد. هدف از تجزیه خوشه‌ای، انتساب ژنوتیپ‌ها به گروه‌ها است به طوری که ژنوتیپ‌های دارای شباهت و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار گیرند (Romesburg 1990). تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های سیب مورد بررسی با استفاده از نرم افزار GenAlEx با کمک ماتریس فاصله‌ای نی و روش خوشه‌بندی UPGMA نشان داد که این دو روش با هم ضریب کوفنتیک ۰/۶۹ را تولید کردند. نتایج خط برش، ژنوتیپ‌ها را به ۸ گروه تقسیم کرد که در شکل ۶ مشاهده می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سیب مورد بررسی در بیماری آتشک بر اساس آغازگرهای مولکولی SCAR و SSR استفاده شده دراین آزمایش

Figure 6. Cluster analysis of apple genotypes studied in a fire blight disease based on SCAR and SSR molecular primers used in this study

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری: از آنجا که آغازگر CH-SD1 دارای بیشترین شاخص‌های تنوع ژنتیکی (شاخص تنوع نی، شانون، تعداد آلل موثر) بود در نتیجه این آغازگر نسبت به آغازگرهای دیگر بهتر توانسته فاصله بین جمعیت‌ها را نمایان کند و به خوبی توانسته نمونه‌های جمعیتی سیب را از هم تفکیک و تنوع بین نمونه‌ها را از لحاظ ژن مورد بررسی نشان دهد لذا پیشنهاد می‌شود در کارهای آتی از آن بهره جست. نتایج تجریه واریانس مولکولی در جمعیت‌های سیب مورد بررسی در بیماری آتشک نشان داد که تنوع بین جمعیتی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد که این نتیجه نشان دهنده تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد در نتیجه جهت انجام برنامه‌های اصلاحی آتی باید بیشتر در درون جمعیت‌ها کار شود. لازم به ذکر است که هر چند فاصله ژنتیکی بین دورترین و نزدیکترین جمعیت ها در این بیماری کم می‌باشد اما با تلاقی این جمعیت‌ها با هم و سپس تلاقی بین نتاج بدست آمده از تلاقی-های مختلف، جهت هرمی شدن ژن‌های مورد نظر و تولید نوترکیبی جدید می‌توان بهره جست. در گروه‌های به وجود آمده در نتیجه خط برش در تجزیه کلاستر، از هر نمونه جمعیتی مشاهده می‌شود که نشان دهنده عدم تفکیک نمونه‌ها و شباهت نمونه‌های جمعیتی با یکدیگر است و این موضوع تأیید تجزیه واریانس مولکولی و فاصله ژنتیکی مبنی بر تنوع کم بین جمعیت‌ها می‌باشد و احتمال می‌رود تنوع کم بین جمعیت‌ها و شباهت زیاد آن‌ها، به دلیل شارش ژنی، تداخل گرده‌افشانی جمعیت‌ها با هم به مرور زمان، استفاده کم آغازگر و غیره باشد. لذا پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آتی از جمعیت‌های بیشتر و با فاصله مکانی دورتر از هم نمونه برداری انجام شود تا بتوان از تنوع بین جمعیتی بیشتر استفاده کرد. همچنین استفاده از آغازگرهای STS و EST در جهت تکمیل بهتر تحقیقات آتی می‌تواند مثمر ثمر باشد.

منابع

آگریوس جرج ان (1389) بیماری شناسی گیاهی. ترجمه ایزدپناه ک.؛ اشکان م؛ بنی هاشمی ض؛ رحیمیان ح؛ میناسیان و ویرایش پنجم، چاپ اول، تهران، انتشارات آییژ.

امیدوار رضا؛ شمس‌بخش مسعود؛ رحیمیان حشمت ا... (۱۳۸۴) تعیین خصوصیات و تفکیک استرین‌های ایرانی باکتری Ervinia amylovora با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی. چهارمین همایش بیوتکنولوژی ایران، ایران، کرمان

دولتی بانه حمید؛ مجدی وحید (1388) ژنتیک مقاومت در مقابل بیماری های سیب. مجموعه گزارش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، ۲۳صفحه

بهادر یاسر؛ محمدآبادی محمدرضا؛ خضری امین؛ اسدی مهدیه؛ مدحتی لیلا (1395) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی، سال هفتم، شماره ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.

سایت اداره کل هواشناسی استان اصفهان WWW.esfahanmet.ir

سلمانیان زهرا؛ نماینده آنیتا؛ هنرور مهرزاد (۱۳۹۳) کاربرد نشانگرهای مولکولی SSR و SCAR جهت بررسی ژنوتیپ‌های سیب

www.SID.ir

Archive of SID

مقاوم به آتشک. همایش ملی الکترونیکی دستاوردهای نوین در علوم مهندسی و پایه، مرداد ۱۳۹۳، ایران، تهران، مرکز پژوهش‌های زمین کاو.

عسکری ناهید؛ باقی زاده امین؛ محمدآبادی محمدرضا (1389) بررسی ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی رائینی با استفاده از لوکوس‌های بین ریزماهواره‌ای (ISSR). ژنتیک نوین، دوره پنجم، شماره ۲، ۴۹-۵۶.

ملکی بالاجو امید؛ کشاورزی منصوره؛ رضایی دانش یونس؛ دامیار سیما؛ جعفری مراد (1390) واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های کلکسیون سیب بومی ایران به E. amylovora.. مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۱-۲۷: ۲۳-۳۶.

نقوی محمدرضا. قره یاضی بهزاد. حسینی سالکده قاسم. (1384) نشانگرهای مولکولی. چاپ اول، تهران، انتشارات دانشگاه تهران.

References

Agrios GN (2010) Introduction to plant pathology. Elsevier Academic Press Publication (In Persian).

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 2, 49-56 (In Persian).

Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian J Biotechnol 9, 222–229.

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. J Anim Sci 7,186-192 (In Persian).

Calenge F, Faure A, Goerre M et al. (2004) Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of Venturia inaequalis. J Phytopathol 94, 370–379.

Calenge F, Drouet D, Denancé C et al. (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. Theor Appl Genet 111, 128–135.

Conner PJ, Brown SK, Weeden NF (1998) Molecular marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. Theor Appl Genet 96, 1027-1035.

Dolati Baneh H, Majidi V (2009) Genetics of Resistance to apple diseases.The Report of west Azarbayjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (In Persian).

Durel CE, Parisi L, Laurens F et al. (2003) Genetic analysis of partial resistance to race 6 of

www.SID.ir

Venturia inaequalis in apple. Genome 46, 224-234.

Evans KM, James CM (2003) Identification of SCAR markers linked to Pl-w mildew resistance in apple. Theor Appl Genet 106, 1178–1183.

Fahrentrapp J, Giovanni A, Broggini-Kellerhals M et al. (2012) A candidate gene for fire blight resistance in Malus × robusta 5 is coding for a CC-NBS-LRR. Tree Genet Genomes 1, 237-251.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Australian Journal of j basic appl. sci 4, 5758–5760.

Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R et al. (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor Appl Genet 96, 1069–1076.

Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression model for interval mapping in line crosses. J Hered 69, 315– 324.

Hemmat M, Brown SK, Weeden NF (2002) Tagging and mapping scab resistance genes from R12740–7A apple. J Am Soc Hortic Sci 127, 365–370.

Hokanson SC, Mcferson JR, Forsline PL et al. (1997) Collecting and managing wild Malus germplasm in its center of diversity. Hortic Sci 32, 173-176.

James CM, Clarke JB, Evans KM (2004) Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene Pl-d in apple. Theor Appl Genet 110, 175–181.

Kenis K, Keulemans J (2004) QTL analysis of growth characteristics in apple. Acta Hortic 663, 369–374.

Kumar J, Gupta PK (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnol Rep 2, 93

Khan MA, Duffy B, Gessler C, Patocchi A (2006) QTL mapping of fire blight resistant in apple. Mol Breed 17, 299-306.

Khan MA, Durel CE, Duffy B et al. (2007) Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker assisted selection. Genome 50, 568–577.

Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B et al. (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (Malus domestica Borkh). Mol Breed 10, 217-241.

Loos BP (1993) Morphological variation in Lolium (Poaceae) as a measure of species relationships. Plant Syst Evol 188, 87-99.

Maleki Balajoo O, Keshavarzi M, Rezaei Y, Damyar S (2011) Response of some Apple Genotypes from Local Apple Collection of Iran to Erwinia amylovora. Seed Plant Improve J 1-27, 23-36.

www.SID.ir

Archive of SID

McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002) Antibiotic use in plant agriculture. Ann Rev Phytopathol 40, 443–463.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. Ibm J Res Dev 5, 154.

Murray HG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res 8, 4321–4325.

Naghavi MR, Ghareyazie B, Salekdeh H (2005) Molecular Markers (1edn) Tehran, Iran, Tehran University (In Persian).

Omidvar R, Shams-Bakhsh M, Rahimian H (2005) Characterization and differentiation of Iranian Ervivia amylovora strain using biochemical and molecular methods. Proc. of 4th Iranian Biotechnology Conference. August 2005, Iran, Kerman (In Persian).

Patocchi A, Walser M, Tartarini S et al. (2005) Identification by genome scanning approach of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm. Genome 48, 630-636.

Patzak J, Paprstein F, Henychova A (2011) Identification of apple Scab and Powdery mildew resistance genes in czech apple (malus × domestica) genetic resource by PCR molecular markers. Plant Breed 47, 156-165.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update Bioinformation 28, 2537-2539.

Przybyłkowicz, KS, Lewandowski M, Korbin M (2009) Molecular screening of apple (Malus domestica) cultivars and breeding clones for their resistance to fire blight. J Fruit Ornam Plant Res 17, 31-43.

Rohlf FJ (1998) NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.01, Setuket, New Yourk

Romesburg HC (1990) Cluster Analaysis. For Research. Krieger Pub., Malabar, Florida. 85, 246-253.

Salmanian Z, Namayande A, Honarvar M (2014) ،The use of SSR and SCAR Molecular Markers to Investigate fire blight resistant Genotypes in apple trees. Proc of 2nd National. Electronic Conference on advances in Basic Sciences and Engineering August 2014, Iran, Tehran. Zaminkav Engineering company (In Persian).

Stankovich L, Koller B, Seglias N et al. (2002) Molecular selection in apple for resistance to scab caused by Venturia inaequalis. Theor Appl Genet 93, 199–204.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.02. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.

www.SID.ir

Yeh FC,Yang R, Boyle T (1999) PopGene, version 1.31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Edmonton, AB,Canada.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Res 132, 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR et al. (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812–1817.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir