Archive OF SID

بررسی ضرورت پوشانیدن گل‌ها در گرده افشانی کنترل شده سیب با ردیابی آلل‌های ریزماهواره در نتاج تلاقی ارقام گلدن ' اسموتی' × ' شفیع آبادی'

علی قرقانی[۱*]، علیرضا طلایی[۲]، ذبیح الله زمانی[۲]، محمدرضا فتاحی مقدم[۲]، حسن حاج نجاری[۲] و سو گاردینر[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۵/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۳۱)

چکیده

برای بررسی توارث آلل‌های مکان‌های ریز ماهواره و ضرورت استفاده از پوشش برای گرده افشانی کنترل شده در سیب، دورگه‌های حاصل از تلاقی ارقام سیب 'گلدن اسموتی' × 'شفیع آبادی' که حاصل دو روش استفاده و عدم استفاده از پوشش بعد از گرده افشانی کنترل شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. از تعداد ۶۰ دانهال (۳۰ مورد برای هر روش گرده افشانی) به همراه والدین و ارقامی که به عنوان منابع احتمالی دانه گرده مطرح بودند، DNA استخراج شد. چهار نشانگر ریز ماهواره (شامل CH03d12 ، CH03d07، CH04a12 و CH03c07) چند شکل بین والدین گزینش شده و آغازگرهای فلورسنت ویژه آنها تهیه شد. قطعه‌های DNA به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای فلورسنت نشان‌دار شده با رنگ‌های مختلف تکثیر شدند و با استفاده از یک توالی یاب اتوماتیک ABI 377 و نرم‌افزار ژن اسکن نسخه ۲ و براساس استاندارد درونی، اندازه باندها تعیین شد. نتایج نشان داد که تمام دانهال‌ها هر یک از آلل‌های خود را در هر مکان ریزماهواره از یکی از والدین به ارث برده‌اند و دو روش استفاده و عدم استفاده از پوشش از نظر گرده افشانی با منبع گرده ناخواسته، هیچ‌گونه تفاوتی با همدیگر نداشتند و در بین دانهال‌های مورد بررسی هیچ دانهال حاصل از گرده ناخواسته دیده نشد. توزیع آلل‌های ریز ماهواره در هر مکان نشان داد که توارث آنها به صورت هم بارز بوده و با توجه به آزمون کای اسکور اختلاف معنی‌داری با نسبت‌های مندلی ۱:۱:۱:۱ و ۱:۰ نداشتند. این نتایج نشان داد که حداقل در موارد با حساسیت کمتر مثل اصلاح رقم که مستلزم گرده افشانی کنترل شده تعداد زیادی گل در زمانی محدود است، ضرورتی برای استفاده از پوشش وجود ندارد. این نتایج هم‌چنین کارایی ریزماهواره‌ها را در تعیین روابط والد- نتاج جمعیت‌ها برای استفاده در مطالعاتی نظیر توارث‌پذیری صفات و آلل‌ها، تجزیه جمعیت‌های در حال تفرق، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و پیوستگی و بازیابی شجره تاریخی درختان میوه نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سیب، مکان‌های ریزماهواره، گرده افشانی کنترل شده، برنامه‌های اصلاحی

۱. دانشجوی سابق دکتری علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران و در حال حاضر استادیار باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. به ترتیب دانشیاران و استادیار علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳. استاد بخش ژنومیکس، مؤسسه تحقیقات باغبانی، نیوزیلند

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: agharghani@shirazu.ac.ir

www.SID.ir

Archive OF SID

مقدمه

مطالعات ژنتیکی و اصلاحی سیب به خاطر دوره نونهالی طولانی که مستلزم فضا، وقت و هزینه زیاد برای نگه‌داری و غربالگری جمعیت‌هاست و هم‌چنین تعداد کروموزوم زیاد (۲n = ۳۴) و درجه هتروزایگوسیتی بالا با مشکلات عدیده‌ای روبه‌رو است (۱۱). این ملاحظات باعث توجه ویژه محققین به ژنتیک مولکولی و به ویژه نشانگرهای مولکولی شده است. در دو دهه اخیر توسعه نشانگرهای DNA یک ابزار قوی و مطمئن برای تعیین و شناسایی چند شکلی فراهم آورده است که از کاربردهای آن در برنامه‌های اصلاحی می‌توان به انگشت‌نگاری ژنتیکی، تعیین روابط فیلوژنیک، شناسایی ارقام و تعیین روابط والد- نتاج، نشانمند کردن ژن‌ها، تهیه نقشه‌های پیوستگی و گزینش براساس نشانگر همراه صفات خاص پیش از ظهور آنها اشاره کرد (۹ و ۲۱).

ریزماهواره‌ها [Simple Sequence Repeats (SSR)] به خاطر تنوع بسیار زیاد، وراثت همبارز، محتوای اطلاعات زیاد و قابلیت مبادله این اطلاعات بین آزمایشگاه‌های مختلف و نیاز به میزان کم DNA، در حال حاضر به عنوان نشانگرهای برتر در تحقیقات ژنتیکی، تهیه نقشه‌های لینکاژی و بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام مطرح هستند (۴، ۷، ۱۲ و ۱۶). ریز ماهواره‌ها براساس قوانین مندلی و به صورت همبارز به نتاج منتقل می‌شوند. به همین دلیل، در هر تلاقی، هر یک از والدین تنها یک آلل در هر مکان ریزماهواره را به نتاج منتقل می‌نماید که می‌توان از آنها در بازیابی شجره والد- نتاج استفاده نمود (۴). لازم به ذکر است که مسیر تلاقی یعنی چه پایه‌ای پدر یا مادر بوده است را نیز می‌توان از روی ریز ماهواره‌های مربوط به ژنوم کلروپلاستی مشخص نمود (۲۰).

گالی و همکاران (۵) از شش نشانگر ریزماهواره برای شناسایی ۶۶ رقم تجاری سیب موجود در کشور مجارستان استفاده کرده و توانستند تمامی ارقام را به کمک پنج نشانگر ریزماهواره از همدیگر تفکیک نمایند. در این مطالعه موتانت‌ها از ارقام اصلی تفکیک نشدند. کاب و همکاران (۳) از نشانگرهای ریزماهواره برای تعیین والدین سیب 'هانی کریسپ' ('Honey Crisp') که حاصل برنامه‌های اصلاحی دانشگاه مینسوتا است استفاده کردند. آنان نشان دادند که ارقامی که به عنوان والدین این رقم ذکر می‌شد، اشتباه بوده و این مسأله به دلیل اشتباه در یادداشت‌برداری‌های انجام شده در مراحل اصلاح این رقم در سال‌ها قبل بوده است. در این پژوهش والدین واقعی این رقم نیز مشخص شد. کیتاهارا و همکاران (۱۴) در ژاپن با استفاده از آنالیز S-RNase و نشانگرهای ریزماهواره اقدام به تعیین والدین هشت رقم تجاری سیب در این کشور نمودند و مشخص شد که والدین نسبت داده شده به بعضی از ارقام اشتباه بوده است. این پژوهشگران با به کارگیری دو روش به صورت مکمل، توانستند با کارآمدی و اطمینان بیشتر در مورد روابط ارقام اظهار نظر کنند. ارشادی و همکاران (۱) تنوع ژنتیکی و روابط بین ۳۳ رقم و ژنوتیپ سیب ایرانی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی و گزارش کردند که با استفاده از چهار نشانگر تمامی ارقام به جز دو تای آنها از همدیگر تفکیک شدند.

کنیس و کولمنس (۱۳) از نتاج حاصل از تلاقی ارقام سیب برابرن و تلامون برای ایجاد نقشه ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای AFLP و ریز ماهواره استفاده کردند. در این پژوهش از ۲۳ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شده بود که در ۱۵ مورد آن هر دو والد هتروزایگوت و چند شکل بودند که به نسبت ۱:۱:۱:۱ در نتاج توزیع شدند. این موضوع بیانگر ماهیت همبارز بودن نشانگرهای ریز ماهواره و تطابق آن با قوانین مندلی بود.

در مطالعاتی دیگر نیز با استفاده از نشانگر ریز ماهواره والدین واقعی برخی ارقام انگور که در مورد والدین آنها تردید وجود داشت مشخص گردید (۱۷، ۱۹ و ۲۰). فتاحی مقدم و همکاران (۲) ضمن بررسی نحوه توارث نشانگرهای ریزماهواره در نتاج حاصل از تلاقی ارقام انگور 'بیدانه قرمز' × 'موسکات هامبورگ' توانستند نتاج حاصل از تلاقی و نتاج حاصل از خود گرده افشانی (که به عنوان یکی از مشکلات

www.SID.ir

Archive OF SID

گرده افشانی کنترل شده در گیاهان خودگشن است) را از هم دیگر تفکیک کنند.

گزارش‌های ضد و نقیضی در باره لزوم استفاده از پوشش بعد از گرده افشانی کنترل شده در سیب وجود دارد. برخی عنوان می‌کنند که با توجه به خود ناسازگاری اغلب ارقام و هم‌چنین جذابیت ناچیز گل‌ها پس از اخته کردن احتمال حضور حشرات گرده افشان به حداقل می‌رسد (۱، ۱۱ و ۱۴). از طرف دیگر برخی بیشتر احتیاط کرده و به ویژه در کارهای دقیق و گرده افشانی ارقامی که درجاتی از خودگشنی دارند بر لزوم استفاده از پوشش تأکید می‌نمایند(۱ و ۱۱). حتی در کارهای دقیق مثل تهیه نقشه‌های لینکاژی قبل از شروع کار اصلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی گیاهان حاصل از گرده افشانی ناخواسته یا خودگشنی را در جمعیت مورد عمل شناسایی کرده و کنار می‌گذارند (۱۳، ۱۶ و ۱۸).

موارد ذکر شده بیشتر نظری بوده و مطالعات علمی دقیق و مستند در جهت رد یا تأیید آن کمتر دیده می‌شود. آنچه مسلم است، برنامه‌های اصلاحی مدون متعددی روی سیب در سراسر جهان در حال انجام است و در فصل بهار مستلزم حجم زیادی از دورگه‌گیری کنترل شده (استفاده از پوشش) است که این خود نیازمند صرف هزینه و وقت زیادی است. لذا آگاهی از نیاز یا عدم نیاز به پوشش که جهت جلوگیری از گرده افشانی ناخواسته انجام می‌گیرد، می‌تواند نقش به سزایی در مدیریت کارآمد سرمایه و وقت داشته باشد. بنابراین، برای امکان اظهار نظر قطعی در این مورد، در این آزمایش به عنوان یک مطالعه مقدماتی، ضمن ردیابی آل‌های مکان‌های ریزماهواره در نتاج حاصل از تلاقی ارقام سیب 'گلدن اسموتی' × 'شفیع آبادی'، از قابلیت این نشانگر مولکولی در تشخیص روابط والد- نتاج بهره جسته و درصد نهال‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده نا خواسته در دو روش استفاده و عدم استفاده از پوشش بعد از فرایند گرده افشانی کنترل شده تعیین شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش به عنوان یک کار تکمیلی در کنار برنامه اصلاحی سیب در گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران که با هدف ایجاد ارقام سیب زودرس و میان رس با کیفیت میوه خوب و مقاومت نسبی در برابر امراض مهم این محصول تدارک دیده شده است انجام گردید. والد پدری رقم ایرانی 'شفیع آبادی'و والد مادری رقم وارداتی 'گلدن اسموتی' بود. در فروردین ۱۳۸۴ اقدام به جمع‌آوری دانه گرده از 'شفیع آبادی' که گل‌دهی آن یک هفته زودتر از 'گلدن اسموتی' بود، گردید. در وسط بلوک مربوط به پایه مادری واقع در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران یک درخت بزرگ و سالم و با گل‌دهی مناسب به گونه ای انتخاب شد که از تمام جهات فاصله یکسانی با رقم گرده زای آن بلوک یعنی 'رد اسپار' داشت. لازم به ذکر است که علاوه بر بلوک مربوط به 'گلدن اسموتی'، دو بلوک بزرگ دیگر سیب یکی شامل 'گلاب کهنز' و 'شفیع آبادی' و دیگری 'گرانی اسمیت' نیز در مجاورت این بلوک در ایستگاه کشت شده بود که می‌توانستند به عنوان منبع گرده ناخواسته مطرح باشند. قبل از باز شدن گل‌ها تعداد ۱۲ شاخه تقریباً هم اندازه و یک‌نواخت از نظر گل‌دهی در شش جهت درخت مذکور (دو شاخه در هر طرف) انتخاب شد. گل‌های باز شده بدون تماس دست با اندام‌های زایشی حذف شده و تنها از گل‌هایی که در مرحله بالون (Balloon stage) بودند، به تعداد تقریبی۲۰ گل روی هر شاخه نگه داشته شدند. این گل‌ها با روشی خاص اخته شدند، به گونه‌ای که به وسیله دست و با احتیاط کامل پرچم‌ها به همراه کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها جدا می‌شد. سپس به سرعت اقدام به گرده افشانی آنها با گرده والد پدری نموده و پس از آن یکی از شاخه‌های واقع در هر سمت درخت در داخل یک پوشش کیسه‌ای که از پارچه سفید سبک و در عین حال نفوذ ناپذیر در برابر دانه گرده، که قبلاً آماده شده بود قرار داده شد و پایین کیسه با نخ بسته شد و شاخه دیگر بدون پوشش رها شد. در نهایت مشخصات تلاقی شامل والدین، تاریخ گرده افشانی،

www.SID.ir

Archive OF SID

تعداد گل گرده افشانی شده و برخی اصلاعات دیگر روی برچسب نوشته شد و به شاخه متصل گردید. لازم به ذکر است در تمام مراحل انجام دورگه‌گیری حداکثر احتیاط ممکن جهت جلوگیری از گرده افشانی ناخواسته و اشتباهات احتمالی دیگر صورت گرفت. دو هفته پس از گرده افشانی پوشش‌ها از روی شاخه‌ها برداشته شدند و بعد از آن به صورت هفتگی از باغ بازدید شد و وضعیت عمومی درخت حامل میوه‌های حاصل از گرده افشانی مورد بررسی و مراقبت قرار گرفت.

برداشت میوه‌های حاوی بذرهای دورگه که تعداد آنها در هر روش حدود ۵۰ عدد بود دو هفته قبل از رسیدگی کامل میوه و قبل از شروع ریزش میوه‌ها انجام شد. در مرحله برداشت احتیاط‌های لازم جهت عدم اختلاط میوه‌های دو روش با همدیگر صورت گرفت و در نهایت بذرهای آنها با رعایت حداکثر احتیاط جهت عدم اختلاط و ضایعات احتمالی استخراج و شمارش گردید که در هر یک از روش‌ها کمی بیشتر از ۳۰۰ بذر به دست آمد. بذرها سپس در داخل ظروف پلاستیکی بدون درب قرار گرفت و پس از برچسب زنی به مدت یک ماه خشک انباری شدند. پس از آن بذرها به مدت دو ماه در دمای $6^{\circ}C$ چینه سرمایی مرطوب شدند و جهت کشت به گلخانه منتقل گردیدند.

گیاهان به مدت چهار ماه درگلخانه نگه‌داری شد و در مرحله چند برگی به طور کاملاً تصادفی تعداد ۳۰ گیاه از مجموع گیاهان حاصل از هر روش (حدود ۲۷۰ گیاه در روش با پوشش و ۲۴۵ گیاه در روش بدون پوشش) برچسب‌گذاری شد و نمونه برگی جهت استخراج DNA از آنها برداشت شد. تمام گیاهان در اوایل اردیبهشت به ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران منتقل شد و در کنار بلوک مربوط به اصلاح سیب کشت گردیدند. هم‌چنین از از والدین و سه رقم دیگر تحت کشت در ایستگاه (که به عنوان منابع احتمالی دانه گرده ناخواسته مطرح بودند) نیز نمونه برگی جهت استخراج DNA برداشت شد.

استخراج DNA

از نمونه‌های برگی دانهال‌های تولیدی، با استفاده از روش گاردینر و همکاران (۶) DNA استخراج شد و سپس نمونه‌های DNA به کمک دستگاه خشک کن تحت خلأ کاملاً خشک و به آزمایشگاه تهیه نقشه‌های ژنتیکی (Genome mapping Laboratoty) مؤسسه تحقیقات باغبانی کشور نیوزیلند منتقل گردید. کمیت نمونه‌های DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز ۰/۹٪ در بافرTAE یک برابر غلظت و با استفاده از DNA فاژ لامبدا (λ Phage) به عنوان استاندارد تعیین شد. در نهایت برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز [Polymerase Chain Reaction(PCR)] مقدار ۱۰۰ میکرو لیترDNA با غلظت یک نانو گرم در میکرو لیتر تهیه شد.

مکان‌های ژنی ریز ماهواره

در این پژوهش ابتدا ۱۰ نشانگر ریزماهواره روی والدین اصلی و منابع احتمالی دانه گرده ناخواسته بررسی شدند و چهار نشانگر ریزماهواره که والدین در آن آلل‌های ویژه خود را داشتند، گزینش و آغازگرهای فلورسنت ویژه آنها تهیه گردید (جدول ۱).

PCR و تعیین اندازه آلل‌ها

دنباله M13 با توالی TGTAAAACGACGGCCAGT برای استفاده از سیستم رنگ آمیزی فلورسنت، به انتهای '۵ آغازگر پیشرو (Applied Biosystem, Foster city, CA. USA) اضافه شد. واکنش PCR در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر و با ۲۰ میلی‌مولار Tris HCl؛ ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs ؛ ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۰۱ میلی‌مولار آغازگر پیشرو، ۰/۱۵ میلی‌مولار آغازگر معکوس، ۰/۱۵ میلی مولار آغازگر نشاندار شده با دنباله M13؛ ۰/۲۵ واحد از *Taq* DNA پلیمراز (*Taq* DNA Polymerase) (Invitrogene) و ۳ نانو گرم DNA انجام شد.

برنامه PCR برای تمام نشانگرها مشابه و به شرح زیر بود: واسرشت سازی اولیه به مدت ۱۵۰ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$، سپس

www.SID.ir

Archive OF SID

جدول ۱. مکان‌های ریز ماهواره‌ای مورد استفاده و مشخصات آنها

مکان‌های ریز ماهواره	برچسب فلورسنت	اندازه (جفت باز)	دمای اتصال °C	منبع
CH03d12	FAM (Blue)	۱۴۳-۱۴۶	۶۵-۶۰ *TD	لیبهارد و همکاران، ۲۰۰۲
CH03d07	NED (Yellow)	۲۱۱-۲۲۹	۶۵-۶۰TD	لیبهارد و همکاران، ۲۰۰۲
CH03c07	VIC (Green)	۱۵۰-۱۷۲	۶۵-۶۰TD	لیبهارد و همکاران، ۲۰۰۲
CH04a12	FAM (Blue)	۱۷۶-۲۰۴	۶۵-۶۰TD	لیبهارد و همکاران، ۲۰۰۲

*: Touch Down

چهار چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C و به دنبال آن یک دقیقه در ۶۵ °C و یک دقیقه در ۷۲ °C درجه با کاهش دمای اتصال به میزان یک درجه در هر چرخه اعمال شد. به دنبال این چهار چرخه، سی چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۶۰°C و یک دقیقه در ۷۲°C درجه و نهایتاً ۵ دقیقه در ۷۲°C جهت توسعه نهایی به کار برده شد (۱۰).

محصولات PCR نشان دار شده با نسبت ۴ میکرولیتر FAM، ۲ میکرولیتر از هرکدام از NED و VIC با ۲ میکرو لیتر آب مخلوط گردید و ۲ میکرو لیتر از ترکیب حاصل با دو میکرو لیتر از استاندارد اندازه درونی ET-900 Rox مخلوط شده و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C واسرشت سازی شد و بلافاصله به روی یخ منتقل شد. سپس محصول نهایی در یک توالی یاب اتوماتیک ABI 377 (PE Applied Biosystem) بارگذاری شد. اندازه باندها با استفاده از نرم افزار ژن اسکن (Gene Scan) نسخه ۲ و بر اساس استاندارد درونی تعیین شد. خروجی نرم افزار به صورت منحنی‌هایی به همراه یک جدول بود که با انتخاب منحنی مربوط به هر آلل، اندازه آن به صورت یک عدد که بیانگر تعداد جفت باز بود در جدول همراه مشخص می‌شد.

محاسبه ماتریس فاصله‌های ژنتیکی عدم تشابه برای تمام نتاج و والدین و رسم دندروگرام مربوط به آن با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (Applied Biostatistics Inc.) انجام شد. از نرم افزارSPSS نیز برای آزمون کای اسکور استفاده شد.

نتایج و بحث

تکثیر DNA برای تمام دانهال‌ها به استثنای دو مورد GS۲۷ و GS۳۹ (احتمالاً به دلیل مشکل کیفیت DNA)، والدین و سه رقم دیگر در هر چهار مکان ژنی ریزماهواره انجام و اندازه آلل‌های مربوطه به دست آمد (جدول ۲). همان‌طور که از جدول ۲ پیداست تمام دانهال‌ها هر یک از آلل‌های خود را در هر مکان ژنی از یکی از والدین به ارث برده‌اند و در هر دو روش استفاده و عدم استفاده از پوشش از نظر گرده افشانی با منبع گرده ناخواسته، هیچ‌گونه تفاوتی دیده نشد. در بین ۵۸ دانهال مورد بررسی که ۲۹ دانهال اول (GS۱-۳۰) مربوط به روش استفاده از پوشش و ۲۹ دانهال بعدی (GS۳۱-۶۰) نیز مربوط به روش عدم استفاده از پوشش بود، هیچ دانهال حاصل از گرده ناخواسته مشاهده نشد و تمامی آنها حاصل گرده‌افشانی کنترل شده بودند. با وجود غربالگری اولیه با ۱۰ نشانگر ریز ماهواره و انتخاب چهار مورد از آنها، به علت خویشاوندی قابل توجه والدین تلاقی با منابع احتمالی دانه گرده ناخواسته یعنی 'شفیع آبادی' با 'گلاب کهنز' (۱) و 'گلدن اسموتی' با 'رد اسپار' (۷) هنوز در چند مورد آلل‌های والدین و منابع احتمالی دانه گرده در مکان‌های ریز ماهواره مطالعه شده مشابه بودند. با توجه به جمع‌آوری بذرها از روی والد مادری، حتی دانهال‌های با گرده افشانی ناخواسته الزاماً بایستی یکی از آلل‌های خود را از والد مادری دریافت کرده باشد. بنابراین، آلل‌های مشترک با والد مادری نمی‌توانند از محل دانه گرده ناخواسته باشند. در مورد آلل‌های مشترک با والد پدری نیز با توجه به پروفیل آللی

www.SID.ir

Archive OF SID

جدول۲. توزیع توارثی آلل‌های چهار مکان ریزماهواره از والدین به ۵۸ دانهال حاصل از تلاقی ارقام سیب 'گلدن اسموتی' × 'شفیع آبادی' به همراه آلل‌های سه رقم محتمل از نظر منبع دانه گرده ناخواسته

مکان ژنی	CH3d12		CH03d7				CH03c07				CH04a12			
والدین	والد مادری	والد پدری	والد مادری		والد پدری		والد مادری		والد پدری		والد مادری		والد پدری	
آلل(جفت باز)	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹	۲۱۱	۲۲۵	۲۱۵	۱۷۲	۱۶۰	۱۶۲	۱۵۰	۲۰۴	۱۹۸	۱۹۶	۱۸۶
نتاج														
۱GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۲GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۳GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۴GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۵GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۸		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۶GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۷GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۸GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۹GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۱۰GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۱۱GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۱۲GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۱۳GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۱۴GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۱۵GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۱۶GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۱۷GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۱۸GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۱۹GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۲۰GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۲۱GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۲۲GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۲۳GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۲۴GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۲۵GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۲۶GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۲۸GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۲۹GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۳۰GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۳۱GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۳۲GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶

www.SID.ir

Archive OF SID

ادامه جدول ۲.

۳۳GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۳۴GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۳۵GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۳۶GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۳۷GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۳۸GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۴۰GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۴۱GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۴۲GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۴۳GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰		۱۵۰		۱۹۸		۱۸۶
۴۴GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۴۵GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸		۱۸۶
۴۶GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴		۱۹۶	
۴۷GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲		۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۴۸GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۴۹GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱	۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۵۰GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۵۱GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰		۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۵۲GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۵۳GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۵۴GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵			۱۶۰	۱۶۲			۱۹۸	۱۹۶	
۵۵GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲		۲۰۴		۱۹۶	
۵۶GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
۵۷GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲			۱۵۰	۲۰۴			۱۸۶
۵۸GS	۱۴۳	۱۴۶		۲۱۱		۲۱۵	۱۷۲		۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۵۹GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹			۲۱۵		۱۶۰	۱۶۲		۲۰۴			۱۸۶
۶۰GS	۱۴۳	۱۴۶	۲۲۹		۲۲۵		۱۷۲			۱۵۰		۱۹۸	۱۹۶	
فراوانی	۵۸	۵۸	۳۰	۲۸	۳۰	۲۸	۳۰	۲۸	۲۸	۳۰	۲۸	۳۰	۳۰	۲۸
رد اسپار	۱۳۶	۱۴۶			۲۲۹	۲۵۰			۱۷۲	۱۳۶			۲۰۴	۱۹۴
گرانی اسمیت	۱۲۲	۱۳۹			۲۵۰	۲۱۵			۱۶۲	۱۶۴			۲۰۰	۲۰۰
گلاب کهنز	۱۴۳	۱۴۳			۲۰۹	۲۲۷			۱۶۲	۱۶۲			۲۰۰	۱۸۶

نتاج در هر چهار مکان ریز ماهواره با اطمینان می‌توان گفت کـه تمامی نتاج حاصل گرده افشانی کنترل شده از والدین مورد نظر هستند. لازم به ذکر است که والد مادری (’گلـدن اسـموتی‘) از نادر ارقام سیب است که درصد بالایی از خود گشنی دارد (۱۱) و عدم اخته کردن به موقع جهت گرده افشانی کنترل شـده ایـن نوع از ارقام به ویژه اخته کردن دیر هنگام مـی‌توانـد منجـر بـه

www.SID.ir

Archive OF SID

ایجاد درصد قابل توجهی از نتاج حاصل خودگشنی رقم مادری شود (۲). با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ۲) هیچ گیاه حاصل از خودگشنی والد مادری (دریافت هر دو آلل در هر مکان ریز ماهواره از والد مادری) در بین نتاج دیده نمی‌شود و این مسأله بیانگر این واقعیت است که گرده افشانی کنترل شده در مرحله بالون که مورد اتفاق محققین است (۱۱)، برای این هدف مناسب بوده و می‌تواند مشکل تولید نتاج حاصل از خودگشنی را به طور کامل منتفی کند. نتایج به دست آمده در این پژوهش با اظهارات جنیک و همکاران (۱۱) و کیتاهارا و همکاران (۱۴) که عنوان می‌کنند با توجه به درصد بالای خود ناسازگاری در اغلب ارقام سیب و هم‌چنین جذابیت ناچیز گل‌ها پس از اخته کردن احتمال حضور حشرات گرده افشان به حداقل می‌رسد، را تأیید می‌کند. البته در کارهای دقیق از جمله تولید جمعیت جهت مطالعات ژنتیکی و تهیه نقشه‌های لینکاژی و گرده‌افشانی ارقامی که درجاتی از خودگشنی دارند، بر لزوم استفاده از پوشش تأکید دارند (۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۱۸). شایان ذکر است که با توجه به ملاحظات اقتصادی و زمانی، امکان بررسی تعداد بیشتری از نتاج وجود نداشت و علی‌رغم گزینش کاملاً تصادفی نتاج، شاید در صورت بررسی تعداد بیشتری از نتاج، ممکن بود که نمونه‌های حاصل از گرده ناخواسته نیز مشاهده شوند.

آزمون کای اسکور برای تمام آلل‌ها در مکان‌های ریز ماهواره هتروزیگوت که والدین نیز در آن به طور کامل چندشکل بودند (جدول ۳) نشان داد که توارث آنها تابع قوانین مندلی بوده و اختلاف آنها با نسبت‌های مندلی ۱:۱:۱:۱ مورد انتظار در تلاقی مربوط به یک مکان ژنی هتروزیگوت که والدین نیز در آن به طور کامل چند شکل هستند، معنی‌دار نمی‌باشد. در مکان ریز ماهواره CH03d12 هرکدام از والدین تنها یک آلل نشان دادند، که این مکان می‌تواند به صورت آلل‌های هموزایگوس یا به صورت یک آلل- یک خنثی در نظر گرفته شود. ولی با توجه به این که در تمامی نتاج به طور یکسان تنها یک آلل دیده شد، لذا با احتمال بسیار قوی این مکان ژنی به صورت هموزایگوس بوده و هر دو آلل آن اندازه مساوی داشته و آلل نول در آن وجود ندارد. این مورد در تطابق کامل با نتایج گزارش شده توسط فتاحی مقدم و همکاران (۲) و پیلجاک و همکاران (۱۹) است. نتایج آزمون کای اسکور با نتایج گزارش شده توسط کنیس و کولمانس (۱۳) در سیب و فتاحی مقدم و همکاران (۲) درانگور که نسبت‌های ۱:۱:۱:۱ را برای مکان‌های ریز ماهواره که هر دو والد در آن هترو زایگوت و به طور کامل چند شکل و ۱:۰ را برای مکان ریز ماهواره که هر دو والد در آن همو زایگوس و تک شکل باشند، گزارش کرده‌اند در تطابق کامل است. نتایج آزمون کای اسکور در تأیید نتایج دیگر تحقیقات (۲، ۳، ۵، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۹ و ۲۰) بازدهی و دقت بالای مکان‌های ژنی ریز ماهواره در مطالعات والدین- نتاج را به اثبات می‌رساند.

دندروگرام مربوط به تجزیه خوشه‌ای (شکل ۱) نیز به وضوح رابطه والد- نتاج را به نمایش گذاشته، به گونه‌ای که والدین در دو طرف دندروگرام و تمامی نتاج در حد فاصل آنها واقع شده‌اند. از موارد قابل توجه، همسانی کامل پروفیل ژنتیکی تعداد قابل توجهی از دانهال‌ها با همدیگر در تمامی چهار مکان ریز ماهواره است. البته این مسأله دور از انتظار نیست و در مطالعه‌ای روی انگور (۲) علی‌رغم بررسی شش مکان ریز ماهواره (در مقایسه با چهار مکان ریز ماهواره در پژوهش حاضر) و استفاده از ۴۶ دانهال (به جای ۵۸ مورد در این مطالعه) دو مورد تشابه کامل پروفیل مشاهده گردید، که با توجه به تعداد مکان کمتر و تعداد دانهال بیشتر در این بررسی، مشاهده تعداد بیشتری تشابه کامل پروفیل آللی امری طبیعی به نظر می‌رسد.

نتایج این پژوهش نشان داد که دو روش استفاده و عدم استفاده از پوشش تفاوتی از نظر دریافت گرده ناخواسته با همدیگر نداشتند. بنابراین پیشنهاد می‌شود در برنامه‌های اصلاح رقم تجاری که مستلزم انجام گرده افشانی کنترل شده هزاران گل در زمان بسیار محدود است و پوشاندن شاخه‌های حامل گل‌های گرده‌افشانی شده می‌تواند هزینه و زمان قابل ملاحظه‌ای را به

www.SID.ir

Archive OF SID

جدول ۳. نتیجه آزمون کای اسکور در مورد توارث آلل‌های مکان های ریزماهواره در نتاج حاصل از تلاقی ارقام سیب 'گلدن اسموتی' × 'شفیع آبادی'

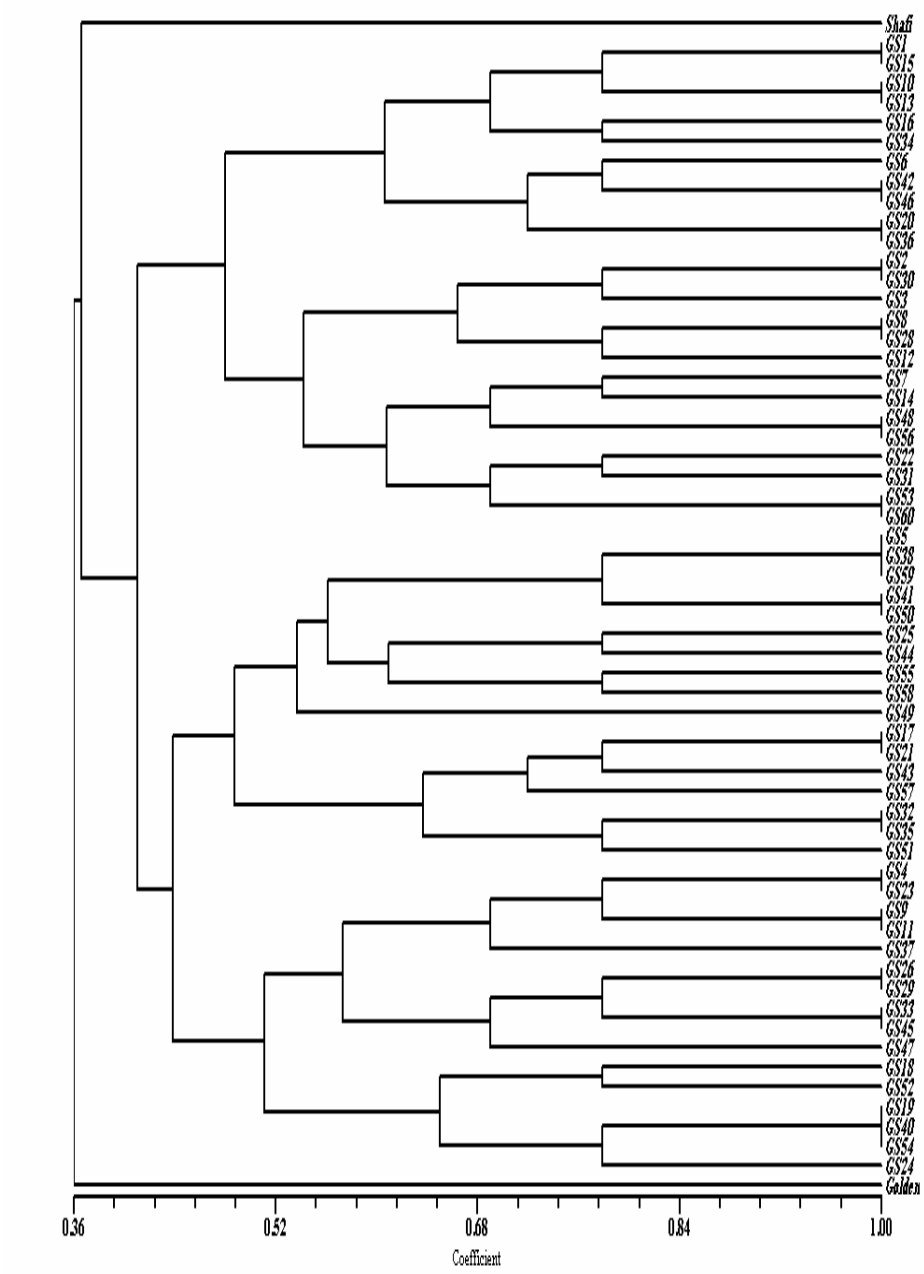
مکان‌های ریز ماهواره	آلل‌های والد مادری (جفت باز)	آلل‌های والد پدری (جفت باز)	آلل‌های نتاج (جفت باز)	فراوانی آلل‌ها	نسبت مندلی	مقدار کای اسکور
CH03d12	۱۴۳	۱۴۶	۱۴۳:۱۴۶	۵۸	۱	۰/۰۰
CH03d07	۲۱۱	۲۱۵	۲۱۱:۲۱۵	۱۵	۱	۰/۱۹۶
	۲۲۹	۲۲۵	۲۱۱:۲۲۵	۱۳	۱	۰/۱۷۰
			۲۲۹:۲۱۵	۱۳	۱	۰/۱۷۰
			۲۲۹:۲۲۵	۱۷	۱	۰/۲۲۲
				۵۸		۰/۷۵۹
						$p = ۰/۸۵۹^{ns}$
CH03c07	۱۶۰	۱۵۰	۱۶۰:۱۵۰	۱۴	۱	۰/۰۸۳
	۱۷۲	۱۶۲	۱۶۰:۱۶۲	۱۵	۱	۰/۰۸۹
			۱۷۲:۱۵۰	۱۶	۱	۰/۰۹۵
			۱۷۲:۱۶۲	۱۳	۱	۰/۰۷۷
				۵۸		۰/۳۴۵
						$P = ۰/۹۵۱^{ns}$
CH04a12	۱۹۸	۱۸۶	۱۹۸:۱۸۶	۱۵	۱	۰/۰۵۴
	۲۰۴	۱۹۶	۱۹۸:۱۹۶	۱۵	۱	۰/۰۵۴
			۲۰۴:۱۸۶	۱۳	۱	۰/۰۴۶
			۲۰۴:۱۹۶	۱۵	۱	/۰۵۴
				۵۸		۰/۲۰۷
						$P = ۰/۹۷۶^{ns}$

ns = not significant

خود اختصاص دهد، با اطمینان نسبی بالا می‌توان از پوشش صرف نظر کرد. با توجه به دسترسی به نشانگرهای ریز ماهواره و سهولت به کارگیری آنها، در مراحل بعدی کار که در اثر گزینش تعداد دانهال‌های حاصل از هر تلاقی به میزان زیادی کاسته می‌شود، می‌توان جهت اطمینان از ماهیت آنها از این نشانگرها بهره برد که می‌تواند صرفه‌جویی قابل توجهی در وقت و زمان به همراه داشته باشد. کارهای دقیق‌تر مثل مطالعات ژنتیکی صفات، و تهیه انواع نقشه‌های ژنتیکی مرجع، پیوستگی و یا نقشه مکان‌های ژنی کمی(QTL) در مقایسه با اصلاح رقم تجاری نیاز به جمعیت‌های با تعداد نتاج بسیار کمتر دارد. در این موارد بهتر است از پوشش استفاده شود، یا قبل از شروع کار اصلی، نتاج و والدین به کمک چند نشانگر ریزماهواره بررسی شده و نهال‌های حاصل از گرده افشانی ناخواسته احتمالی حذف شوند.

www.SID.ir

Archive OF SID



شکل ۱. گروه‌بندی ۵۸ دانهال حاصل از تلاقی ارقام سیب 'گلدن اسموتی' × 'شفیع آبادی' و والدین آنها بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد و الگوریتم UPGMA

هم‌چنین نتایج نشان داد که برای جلوگیری از ایجاد نتاج حاصل از خودگشنی در ارقامی از سیب که درصد بالایی از خود گشنی دارند، مرحله بالون زمان مناسبی برای گرده افشانی کنترل شده است و با اطمینان بالا این مشکل را منتفی می‌نماید.

یافته‌های این پژوهش در راستای مطالعات دیگر محققان در کاربرد مکان‌های ریزماهواره در بررسی رابطه والدین- نتاج، کارایی بسیار بالا و بی نظیر ریزماهواره‌ها را در تعیین روابط والدین- نتاج به اثبات می‌رساند. لذا در مطالعاتی مانند توارث‌پذیری صفات، آنالیز جمعیت‌های در حال تفرق و تهیه

www.SID.ir

Archive OF SID

نقشه‌های ژنتیکی و پیوستگی که نیازمند نتاج دو رگه هستند، می‌توان برای اطمینان از ماهیت دورگه نتاج از این مکان‌های ژنی که دارای چند شکلی بالایی بوده و کاربرد آنها نیز نسبتاً ساده است بهره برد.

سپاسگزاری

از دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی دانشگاه به خاطر تامین بخشی از هزینه‌های پژوهش، از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به خاطر فراهم نمودن شرایط سفر به کشور نیوزیلند و از مؤسسه تحقیقات باغبانی کشور نیوزیلند به خاطر تامین مواد و وسایل لازم جهت انجام بخش مولکولی این پژوهش، صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. ارشادی، ا. ۱۳۸۱. بررسی گرده افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. پایان‌نامه دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. فتاحی مقدم، م. ر، ذ. زمانی، ع. عبادی، ب. قره یاضی و ش. ا. ملنباکر. ۱۳۸۱. توارث آلل‌های مکان‌های ژنی ریزماهواره (میکرو ساتلایت) در جمعیت حاصل از تلاقی انگور رقم‌های 'بیدانه قرمز' × 'موسکات هامبورگ'. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ۳(۳ و ۴):۳۷-۵۰.

3. Cabe, P.R., A. Baumgarten, K. Onan, J.J. Luby and D.S. Bedford. 2005. Using microsatellite analysis to verify breeding records: A study of 'Honeycrisp' and other cold-hardy apple cultivars. HortScience 40: 15-17.
4. Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142: 169–196.
5. Galli, Z., G. Halasz, E. Kiss, L. Heszky and J. Dobranszki. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. HortScience 40: 1974-1977.
6. Gardiner, S.E., H.C.M. Bassett, C. Madie and D.A.M. Noiton. 1996. Isozyme, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment-length polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121: 996–1001.
7. Goulão, L., L. Cabrita and C.M. Oliveira. 2001b. Molecular characterization of cultivars of apple (Malus × domestica Borkh.) using micro satellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122: 81-89.
8. Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor. Appl. Genet. 96: 1069–1076.
9. Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner and H. Bassett. 1997. Microsatellites in Malus x domestica (apple): abundance, polymorphism, and cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 94: 249–254.
10. Hokanson S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a (Malus × domestica Borkh.) Core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97: 671–683.
11. Janick, J., J.N. Cummins, S.K. Brown and M. Hemmat. 1996. Apple. PP. 1–77. *In*: Janick J. and J.N. Moore (Eds.), Fruit Breeding. Volume I, Tree and Tropical Fruits. John Wiley & Sons Inc., USA.
12. Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala and C. van de Wiel. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breed. 3: 381–390.
13. Kenis, K. and J. Keulemans. 2004. Genetic linkage maps of two apple cultivars (Malus × domestica Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. Mol. Breed. 15: 205–219.
14. Kitahara, K., S. Matsumoto, T. Yamamoto, S. Soejima,T. Kimura, H. Komatsu and K. Abe. 2005. Parent identification of eight apple cultivars by S-Rnase analysis and simple sequence repeat markers. HortScience 40: 314-317.
15. Liebhard, R, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van de Weg and C. Gessler. 2002. Development and Ÿharacterization of 140 new microsatellites in apple (Malus domestica Borkh.). Mol. Breed. 10:217–241.

www.SID.ir

Archive OF SID

16. Liebhard, R, B. Koller, L. Gianfranceshi and C. Gessler, 2003. Creating a saturated reference map for the apple (Malus × domestica Borkh.) genome. Theor. Appl. Genet. 106: 1497–1508.
17. Lopes, M.A., K.M. Sefc, E. Erias Dias, H. Steinkellner, M.L. Da Camara Machado and A. Da Camara Machado. 1999. The use of microsatellite for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. Theor. Appl. Genet. 99: 733-739.
18. Maliepaard C., F. H. Alston, G. van Arkel, L. M. Brown, E. Chevreau, F. Dunemann, K.M. Evans, S. Gardiner, P. Guilford, A.W. van Heusden, J. Janse, F. Laurens, J. R. Lynn, A.G. Manganaris, A.P.M. Den Nijs, N. Periam, E. Rikkerink, P. Roche, C. Ryder, S. Sansavini, H. Schmidt, S. Tartarini, J. J. Verhaegh, M. Vrielink-van Ginkel and G.J. King. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. Theor. Appl. Genet. 97: 60-73.
19. Piljac, J., E. Maletic, J.K. Kontic, G.S. Dangle, I. Pejic, N. Mirosevic and C.P. Meredith. 2002. The parentage of 'Posip Bejeli' a major wine cultivar of Croatia. Vitis 41: 83-87.
20. Sefc, K.M., M.S. Lopes and F. Lefort. 1997. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet.100: 498–505.
21. Tartarini, S. 2003. Marker- assisted selection in pome fruit breeding. Eucarpia Symposium in Fruit Breeding and Genetics, 1-5 Sept., Angres, France.

www.SID.ir