مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۹ شماره ۲ صفحه های ۶۹ تا ۸۲ (۱۳۸۷)

ارزیابی تنوع ژنتیکی نژادگان های سیب 'گلاب' ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره SSR[1]

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF 'GOLAB' APPLE GENOTYPES USING MICROSATELLITE (SSR) MARKERS

فریبا نقشین، مسعود بهار، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی و حسن حاج نجاری[2]

چکیده

به منظور بررسی روابط ژنتیکی سیب های 'گلاب' ایران با رقم های تجاری داخلی و خارجی، از ۲۸ جفت آغازگر ریزماهواره SSR استفاده شد. بر اساس الگوی نواری حاصل، ۲۲ جفت آغازگر در ۲۷ نژادگان سیب الگوی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل ها از دو تا۱۱ آلل با میانگین ۵/۴ متغیر بود و محتوای اطلاعات چند شکلی در بین رقم های مورد بررسی از ۰/۳۷ تا ۰/۷۷ با میانگین ۶۸/. ارزیابی شد که هتروزیگوتی بالا را در بین رقم های سیب نشان داد. گروه بندی نژادگان ها با استفاده از ضریب تشابه نی و الگوریتم UPGMA، رقم های سیب مورد بررسی را به پنج گروه شامل چهار گروه سیب های ایرانی به استثنای 'اهر-۲' و یک گروه سیب های خارجی منتسب کرد. بیشترین شباهت ژنتیکی در بین رقم های سیب 'گلاب' مشاهده شد که از مناطق مختلف جمع آوری شده بودند. با در نظر گرفتن ویژگی های ظاهری مشابه رقم های سیب 'گلاب' و نزدیکی روابط ژنتیکی آن ها این فرضیه تقویت می شود که به احتمال رقم های سیب 'گلاب' منشاء مشترکی دارند.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، سیب 'گلاب'، نشانگر SSR، *Malus domestica* .

مقدمه

سیب .*Mauls domestica* Borkh، از تیره Rosaceae، بعد از مرکبات، انگور و موز چهارمین میوه مهم جهان و مهمترین میوه مناطق معتدله به شمار می آید (۱۶). از لحاظ تجاری، ایران چهارمین تولید کننده و هفدهمین کشور صادر کننده سیب می‌باشد و استان های آذربایجان شرقی و غربی، خراسان، اصفهان و تهران مهمترین مناطق تولید سیب در ایران هستند (۲، ۶).

منشا اولیه رقم های مختلف سیب، گونه های *M. pumilia*، *Malus sylvestris* یا *M. domestica* می‌باشند (۱۷). در حال حاضر بیش از ۱۰۰۰۰ رقم سیب در دنیا شناخته شده اند که تعداد محدودی از آن ها ارزش تجارتی دارند (۳۰) و بیشترین گونه ها از نوع سیب های میوه ریز، زینتی یا وحشی[3] هستند (۶ ، ۱۶).

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۲۳

۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان و استادیار بخش تحقیقات باغبانی. موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر کرج، کرج، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Crabs

Archive of SID

www.SID.ir

به دلیل نزدیکی ایران به خاستگاه سیب در ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان (۱۷)، تنوع ژنتیکی زیادی در رقم های سیب ایرانی مشاهده می شود که در این میان، سیب معروف به 'گلاب' به دلیل زودرسی و دارا بودن عطر و طعم خاص، شهرت و مطلوبیت ویژه ای دارد. در ایران نژادگان های مختلفی از سیب 'گلاب' وجود دارد که با وجود دارا بودن ویژگی های مشترک زیاد، به احتمال بر حسب شرایط محیطی و اقلیمی و شاید به علت جهش‌های مختصر از یکدیگر تفکیک شده اند (۱، ۵). به نظر می رسد که انواع سیب 'گلاب' در واقع همگروه های یک رقم خاص باشند که بر حسب محل پرورش به نام های مختلفی مانند سیب 'گلاب اصفهان'، 'گلاب کهنز' و 'گلاب مشهد' معروف شده اند. برخلاف ویژگی های ظاهری به تقریب مشابه، روابط ژنتیکی رقم های سیب 'گلاب' با نام های محلی چندان مشخص نیست. بنابراین تعیین موقعیت سیب 'گلاب' در بین رقم های دیگر سیب محلی و خارجی اهمیت زیادی دارد.

برای طبقه بندی سیب ها معیار های مختلفی به کار می رود. در روش های سنتی برای تشخیص رقم های سیب از ویژگی های مورفولوژیکی و کیفیت میوه ها استفاده می شد، ولی به دلیل تاثیر شرایط محیطی بر صفات ظاهری، نتایج به دست آمده چندان مورد اعتماد نیستند و بنابراین در سال های اخیر پژوهشگران برای طبقه بندی رقم های سیب از نشانگر های مولکولی استفاده نموده اند (۲۱).

اولین نقشه ژنتیکی سیب با تکنیک RAPD[۱] در سال ۱۹۹۴ منتشرشد (۱۳) و از آن پس این روش در شناسایی رقم های سیب مرسوم گردید (۸، ۲۲). در مواردی نیز نشانگرهای RFLP [۲] برای تشخیص مناطق ژنی (۲۲، ۲۸) و AFLP[۳] برای تشخیص رقم های سیب (۲۹) و تهیه نقشه ژنتیکی (۳۲) به کار رفتند. امّا این روش ها به خاطر پیچیدگی تکنیکی و هزینه زیاد کمتر مورد توجه قرار گرفتند. در سال های اخیر استفاده از نشانگر ریزماهواره (SSR)[۴] به دلیل سادگی، تکرارپذیری بالا، همبارز بودن[۵] و مقدار زیاد چندشکلی[۶]، برای تهیه نقشه پیوستگی ژنی (۱۹) و طبقه بندی رقم های سیب رواج بیشتری داشته است (۱۱، ۱۲، ۱۹).

جفت آغازگرهای اختصاصی متفاوتی از ریزماهواره ها در سیب شناسایی شده اند (۱۱، ۱۲، ۱۹) که از این ریزماهواره ها در تفکیک رقم های سه گان (تریپلوئید) از دوگان (دیپلوئید) (۱۵)، تشخیص موقعیت ژن های مقاومت به بیماری (۹)، میزان حفاظت شدگی همگروه های سیب *M. domestica* (۱۸) و تهیه نقشه پیوستگی ژنومی (۱۹) استفاده گردیده است. تاکنون بیش از ۲۵۰ جفت آغازگر ریزماهواره ای برای بررسی نژادگان های سیب طراحی گردیده است (۳۱). به دلیل این تعداد فراوان نشانگر SSR ، احتمال یافتن چندشکلی در بین بیشتر گونه ها و رقم های سیب زیاد است (۱۴، ۱۵)، به طوری که در یک بررسی، با ۱۴۰ جفت آغازگر SSR دارای چندشکلی زیاد رقم های سیب به صورت موفقیت آمیزی از هم تفکیک شدند (۱۹). کارایی نشانگرهای ریزماهواره ای شناسایی شده در سیب برای تعیین تنوع ژنتیکی گونه های دیگر تیره Rosaceae مانند گلابی نیز به اثبات رسیده است (۳۱، ۳۳).

ارشادی و همکاران (۱)، تعداد ۳۳ رقم سیب ایرانی را با استفاده از چهار نشانگر ریزماهواره مقایسه نمودند. تشخیص دو آلل در هر مکان ژنی در کلیه رقم های نشان داد که رقم های مورد بررسی همگی دوگان

۱- Random Amplified Polymorphism DNA
۲- Restriction Fragment Length Polymorphism
۳- Amplified Fragment Length Polymorphism
۴- Simple Sequence Repeats
۵- Codominant
۶- Polymorphism

Archive of SID

www.SID.ir

هستند. با تجزیه خوشه ای رقم های بر اساس ضریب تشابه نی، سیب های ایرانی در ۱۰ گروه طبقه بندی شدند که نتایج این گروه بندی با شکل ظاهری درختان، ویژگی های میوه و در مواردی با پراکنش جغرافیایی آن ها رابطه منطقی داشت (۱).

با توجه به این که تاکنون اطلاعات کافی در زمینه ژنتیکی سیب های بومی ایران تهیه نشده است و شناسنامه مشخصی برای نژادگان های سیب 'گلاب' ایران در مقایسه با رقم های تجاری خارجی وجود ندارد، بنابراین تعیین روابط شجره ای سیب های ایران و ویژگی های ژنتیکی این رقم های در مقایسه با رقم های تجاری دیگر ضروری به نظر می رسد. از این رو این پژوهش با هدف بررسی رابطه ژنتیکی رقم های سیب ایرانی و خارجی و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی سیب 'گلاب' در بین رقم های شناخته شده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه های برگی انواع سیب (شامل ۱۴ نژادگان از سیب های معروف به 'گلاب'، نه نژادگان از سیب های تجاری و تابستانه ایرانی و چهار رقم سیب مهم تجاری خارجی) از رقم های موجود در مجموعه سیب واقع در ایستگاه تحقیقات کمال آباد کرج (بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ارومیه جمع آوری گردیدند (جدول ۱).

جدول۱- نژادگان های سیب مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1. Apple genotypes used in this study.

'Golab' apples سیب های 'گلاب'			
سیب 'گلاب کهنز' 'گلاب کرمانشاه-۱' 'گلاب صحنه' 'گلاب جنتی'	'گلاب تابستانه مشهد' 'گلاب کرمانشاه-۲' 'گلاب رسمی' 'گلاب دماوند'	'گلاب ارومیه' 'گلاب زرد' 'گلاب اصفهان'	'گلاب شفیع آبادی' 'گلاب قرمز' 'گلاب نعمتی'
سیب های تابستانه			
'قندک کاشان' 'شفیعی ' 'اهر-۲'	'کولی محلات' 'شیخ احمد'	'مشهد نوری' 'اردبیل-۱'	'حیدرزاده' 'کمپوتی'
سیب های تجاری خارجی			
'یلو ترانسپارنت'[۱]	'گلدن دلیشس'[۲]	'گرانی اسمیت'[۳]	'جاناتان'[۴]-۱'

۱- 'Yellow Transparent' ۲- 'Golden Delicious' ۳- 'Granny Smith' ۴- 'Jonathan'

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج DNA از برگ های جوان ۲۷ نژادگان سیب جمع آوری شده به روش موری و تامسون (۲۴) انجام گرفت، با این تفاوت که بافر استخراج محتوی مقدار ۲٪ مرکاپتواتانول[۱] بود و خالص سازی با مخلوط کلروفرم/ ایزوامیل الکل (۲۴:۱) برای هر نمونه دوبار انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA نمونه ها با استفاده از روش الکتروفورز پنج میکرولیتر از DNA به دست آمده در ژل آگاروز ۰/۷٪ در بافر TAE[۲] و مقایسه تراکم باند آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III (λDNA برش یافته با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hin*d III) تعیین گردید. برای استفاده در واکنش زنجیره ای پلی مراز، نمونه های DNA در حدود غلظت ۲۵ ng/µl رقیق گردیدند.

تکثیر ریزماهواره ها

تعداد ۲۸ جفت آغازگر اختصاصی سیب (جدول۲)، بر اساس مطالعات قبلی (۱۰،۱۱، ۱۲، ۱۹) انتخاب شد و پس از سنتز توسط شرکت ایزوژن (Isogene) هلند، طی این پژوهش استفاده گردید. اطلاعات مربوط به این جفت آغازگرها شامل اندازه باندی، نوع موتیف (کامل، ناقص و مرکب) و توالی آن ها در نشانی اینترنتی http://www.hidras.unimi.it موجود است.

انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

واکنش زنجیره ای پلی مراز برای نمونه ها در حجم ۱۵ میکرولیتری محتوی ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۳ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۳ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. برنامه گرمایی PCR، در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف (Master gradient)، شامل یک چرخه واسرشت سازی[۳] اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و سپس تعداد ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA[۴]، بسته به نوع آغازگر (جدول ۲) به مدت ۴۵ ثانیه، بسط[۵] در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود (۱۲).

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (۹۵٪ فرمامید، ۰/۵٪ برموفنل بلو، ۰/۵٪ زایلن سیانول و ۱۰ میلی مولار EDTA) مخلوط شد و پس از سه دقیقه گرم کردن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و سرد کردن در یخ، مقدار هشت میکرولیتر از هر نمونه در چاهک ژل اکریل آمید ۶٪ واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بار گذاری شد. ژل با شدت جریان ۲۰۰ میلی آمپر به مدت دو ساعت الکتروفورز شد و جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره (۷) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

الگوهای نواری به دست آمده از واکنش PCR نمونه ها، در مقابل هر آغازگر بر حسب وجود یا عدم وجود نوارها با حروف الفبای انگلیسی امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه ای داده ها بر اساس ضریب تشابه نی[۶]

۱- ß-mercaptoethanol ۲- Tris-Acetate-EDTA ۳- Denaturing ۴- Annealing ۵- Extension
۶- Nei

Archive of SID

www.SID.ir

(۲۵) به روش UPGMA [۱] انجام شد و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارPowerMarker V3.25 (http://www.powermarker.net) صورت گرفت. بر اساس دندروگرام‌های مختلف به دست آمده با این نرم افزار به واسطه آزمون Bootstrap، درخت فیلوژنتیکی مورد توافق (Consensus tree) با کمک نرم افزار MEGA3 رسم گردید.

جدول۲- اطلاعات مربوط به نشانگرهای SSR مورد استفاده در این پژوهش برای انگشت نگاری ژنتیکی رقم های سیب.

Table 2. Microsatellite sets used to fingerprint apple cultivars in this study.

نام جفت آغازگر SSR name	توالی آغازگرها Primer seqnence	نوع موتیف	نوع نشانگر	محدوده اندازه مورد انتظار	دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد) Annealing temp.
CH01B12	F: CGC ATG CTG ACA TGT TGA AT R: CGG TGA GCC CTC TTA TGT GA	کامل	چند مکانی	125-178	59/3
CH01D03	F: CCA CTT GGC AAT GAC TCC TC R: ACC TTA CCG CCA ATG TGA AG	کامل	چند مکانی	136-160	57
CH01D09	F: GCC ATC TGA ACA GAA TGT GC R: CCC TTC ATT CAC ATT TCC AG	کامل	تک مکانی	134-172	60/5
CH01E12	F: AAA CTG AAG CCA TGA GGG C R: TTC CAA TTC ACA TGA GGC TG	کامل	تک مکانی	246-278	56/3
CH01F02	F: ACC ACA TTA GAG CAG TTG AGG R: CTG GTT TGT TTT CCT CCA GC	کامل	تک مکانی	168-222	60
CH01F03b	F: GAG AAG CAA ATG CAA AAC CC R: CTC CCG GGC TCC TAT TCT AC	ناقص	تک مکانی	139-183	58
CH01H01	F: GAA AGA CTT GCA GTG GGA GC R: GGA GTG GGT TTG AGA AGG TT	کامل	تک مکانی	107-141	57/3
CH01H10	F: TGC AAA GAT AGG TAG ATA TAT GCC A R: AGG AGG GAT TGT TTG TGC AC	کامل	تک مکانی	93-119	57/3
CH02B07	F: CCA GAC AAG TCA TCA CAA CAC TC R: ATG TCG ATG TCG CTC TGT TG	کامل	تک مکانی	180-202	60
CH02F06	F: CCC TCT TCA GAC CTG CAT ATG R: ACT GTT TCC AAG CGA TCA GG	مرکب $(TG)_{20}(AG)_{20}$	تک مکانی	138-158	56
CH03C02	F: TCA CTA TTT ACG GGA TCA AGC A R: CTG CAG AGT CTT TGA CAA GGC	کامل	تک مکانی	116-136	57/3
CH04G04	F: AGT GGC TGA TGA GGA TGA GG R: GCT AGT TGC ACC AAG TTC ACA	کامل	تک مکانی	170-186	60

۱- Unweighted pair-Group Method Using arithmetic Average

Archive of SID

www.SID.ir

CH05A02	F: GTT GCA AGA GTT GCA TGT TAG C R: TTT TGA CCC CAT AAA ACC CAC	کامل	چند مکانی	111-135	57
CH05D03	F: TAC CTG AAA GAG GAA GCC CT R: TCA TTC CTT CTC ACA TCC ACT	کامل	تک مکانی	152-187	58
CH05E03	F: CGA ATA TTT TCA CTC TGA CTG GG R: CAA GTT GTT GTA CTG CTC CGA C	کامل	تک مکانی	158-190	57/4
02b1	F: CCG TGA TGA CAA AGT GCA TGA R: ATG AGT TTG ATG CCC TTG GA	---	تک مکانی	212-238	60/5
05g8	F: CGG CCA TCG ATT ATC TTA CTC TT R: GGA TCA ATG CAC TGA AAT AAA CG	---	تک مکانی	115-147	57/3
23g4	F: TTT CTC TCT CTT TCC CAA CTC R: AGC CGC CTT GCA TTA AAT AC	---	تک مکانی	86-116	60
GD12	F: TTG AGG TGT TTC CCA TTG GA R: CTA ACG AAG CCG CCA TTT CTT T	نامشخص	نامشخص	141-191	56
GD96	F: CGG CGG AAA GCA ATC ACC T R: GCC AGC CCT CTA TGG TTC CAG A	---	نامشخص	152-197	60/5
GD100	F: ACA GCA AGG TGT TGG GTA AGA AGG T R: TGC GGA CAA AGG AAA AAA AAA AGT G	---	نامشخص	223-242	60
GD147	F: TCC CGC CAT TTC TCT GC R: AAA CCG CTG CTG CTG AAC	نامشخص	تک مکانی	135-155	59

نتایج و بحث

از مجموع ۲۸ جفت آغازگر مورد استفاده، ۲۲ جفت آغازگر الگوی نواری چند شکل در رقم های سیب تولید کردند.. شش جفت آغازگر به علت عدم تکثیر(CH04E03، CH02C06، 01a6) یا تولید نوارهای غیر اختصاصی (CH03A04، CH03D01، GD142) از ادامه آزمایش ها حذف گردیدند. تعداد آلل های تکثیر یافته با این آغازگرها ازسه (جفت آغازگر GD100) تا ۱۱آلل (جفت آغازگر 23g4) با میانگین ۵/۴ آلل برای هر آغازگر متغیر بود (جدول۳). بر اساس نتایج به دست آمده، رقم های سیب مورد مطالعه دوگان و هتروزیگوت بودند.

بیشتر ریزماهواره های مورد استفاده دارای واجدهای تکراری دو نوکلئوتیدی و تک مکانی بودند (جدول۲). تنها جفت آغازگرهای CH01D03، CH05A02 و CH01B12، دو مکان را تکثیر نمودند که از بین آن ها، جفت آغازگر CH01D03 چند شکلی مناسبی را دربین نژادگان های سیب های زودرس ایرانی و سیب های 'گلاب' نشان نداد. گمان می‌رود علت این امر قرابت نژادگان های سیب 'گلاب' و رقم های سیب تابستانه ایرانی باشد. بنابراین، عدم ایجاد چند شکلی توسط برخی از این جفت آغازگرها چندان دور از انتظار نبود (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

نوع واحدهای تکراری جایگاه های ریز ماهواره با کد CH به طور عمده به صورت کامل بود و تنها جفت آغازگرهای CH01F03b و CH03D01 واحدهای تکراری ناقص داشتند. جفت آغازگر CH01F03b نوارهای زیادی تکثیر کرد ولی جفت آغازگرCH03D01 در رقم های سیب تکثیر نشد. جفت آغازگر CH02F06 با واحدهای تکراری مرکب $(TG)_{20}(AG)_{20}$ ، فقط در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد تکثیر قابل تفسیری تولید نمود که شاید به دلیل تاثیر نوع ترکیب توالی بر تکثیر واحدهای تکراری باشد (۲۲، ۲۷).

ارشادی (۱) در بررسی ژنتیکی ۳۳ رقم سیب، کاربرد چهار جفت آغازگر23g4، 05g8، 02b1 و04H11 را برای تمایز رقم های سیب ایرانی، به استثنای دو رقم 'زنوز مرند' و 'اهر-۲'، سودمند گزارش کرده است. در مطالعه حاضر جفت آغازگرهای 02b1 و 05g8 هر یک چهار آلل و جفت آغازگر 23g4 نیز ۱۱ آلل تکثیر نمودند، در حالی که تعداد آلل تکثیر شده برای این سه جفت آغازگر در پژوهش ارشادی هفت و ۱۴ آلل بود (۱). این تفاوت در تکثیر آغازگرها می تواند به دلیل اختلاف در رقم های سیب مورد بررسی باشد. ازآن جایی که در این پژوهش بیشتر رقم های سیب مورد ارزیابی از نژادگان های سیب 'گلاب' بودند، احتمال بروز تنوع در میان این رقم های کمتر از یافته های ارشادی بوده و در نتیجه باندهای چندشکلی به صورت محدودتری ظاهر شدند.

اگر چه میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار برای ۲۲ جفت آغازگر مورد استفاده، ۰/۶۵ بود ولی دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۶۶ تا ۱/۰۰ با میانگین ۰/۹۷۶۲ در مکان ژنی اکثر جفت آغازگرها ارزیابی گردید (جدول ۳). مقدار بالای هتروزیگوسیتی مشاهده شده نشان دهنده میزان بالای خود ناسازگاری و دگرگرده افشانی در رقم های سیب مورد بررسی است. میزان هتروزیگوسیتی بالا با میانگین ۰/۹۷۶۲ و تعداد زیاد آلل های مشاهده شده با میانگین ۵/۴ برای کلیه مکان های ژنی نشان داد که نشانگرهای ریز ماهواره سیب بسیار چندشکل بوده و می‌توانند در مطالعه های تنوع ژنتیکی سیب سودمند باشند.

در این پژوهش میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی یا PIC [۱] به دست آمده ۰/۶۸ بود. بالاترین PIC (۰/۷۷) مربوط به جایگاه 23g4 با تعداد ۱۱ آلل بود و پایین ترین PIC (۰/۳۷) در نشانگر CHO2b07 دیده شد که دو آلل را تکثیر نمود. چون بزرگتر بودن عدد PIC نشان دهنده تعداد آلل زیادتر و چند شکلی بالاتر است (۲۶)، می توان گفت با افزایش هتروزیگوسیتی، PIC هم افزایش می یابد. از آن جایی که آلل‌های نادر نسبت به آلل های مشترک اثر کمتری روی ارزش های PIC دارند، این روند همواره یکنواخت نیست. به عنوان مثال اگرچه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در هر دو مکان ریزماهواره CH05E03 و CH01H10 برابر ۰/۹۲۵ بود ولی در نشانگر CH05E03، PIC بیشتری (۰/۶۶) نسبت به نشانگر GHO4g04 (۰/۵۳) به دست آمد.

میانگین تعداد آلل های تولید شده توسط هر رقم در دو گروه رقم های ایرانی و خارجی نشان داد که در بیشتر جفت آغازگر ها میانگین تعداد آلل رقم های ایرانی کمتر است. از این رو انجام تلاقی بین رقم های ایرانی و خارجی با توجه به دور بودن آن ها از نظر خویشاوندی ژنتیکی می‌تواند هتروزیگوسیتی و در نتیجه تنوع را افزایش دهد.

بر اساس فراوانی آلل های به دست آمده از جفت آغازگرهای SSR و مطابق دندروگرام ترسیم شده، نژادگان های سیب مورد بررسی در پنج گروه قرار گرفتند (شکل ۲).

۱- Polymorphism Information Content

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تعداد و فراوانی آلل، هتروزیگوتی مورد انتظار، هتروزیگوتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی جفت آغازگرهای SSR مورد استفاده برای انگشت نگاری ژنتیکی نژادگان های سیب.

Table 3. Number and frequency of alleles, observed heterozygoties, polymorphic information contents for each SSR set used forgenetic fingerprinting of apple genotypes.

جفت آغازگر Primers	فراوانی آلل اصلی SSR Loci	تعداد نژادگان No. genotype	تعداد نمونه Samples	تعداد آلل No. of alleles	درصد داده ها	هتروزیگوتی مورد انتظار Gene diversity	هتروزیگوتی مشاهده شده Heterozygoties	PIC[1]
CH03C02	0.4444	5.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.6701	1.0000	0.6129
CH05D03	0.2963	7.0000	27.0000	7.0000	1.0000	0.7668	1.0000	0.7297
CH01E12	0.4444	4.0000	27.0000	4.0000	1.0000	0.6125	1.0000	0.5343
CH01F03b	0.3519	8.0000	27.0000	6.0000	1.0000	0.7791	1.0000	0.7484
CH04G04	0.2963	9.0000	27.0000	8.0000	1.0000	0.7942	1.0000	0.7662
CH01D09	0.5556	7.0000	27.0000	6.0000	1.0000	0.6097	0.6667	0.5574
CH05E03	0.4259	7.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.7092	0.9630	0.6623
CH01F02	0.4000	6.0000	27.0000	6.0000	0.9259	0.7496	1.0000	0.7152
CH01B12	0.5000	8.0000	27.0000	9.0000	1.0000	0.5000	1.0000	0.3750
CH02B07	0.5000	1.0000	27.0000	2.0000	1.0000	0.5000	1.0000	0.3750
CH01D03	0.4074	3.0000	27.0000	4.0000	1.0000	0.6619	1.0000	0.5982
CH02F06	0.3519	8.0000	27.0000	7.0000	1.0000	0.7990	1.0000	0.7752
CH05A02	0.4259	6.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.7051	1.0000	0.6578
CH01H01	0.3704	5.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.7030	1.0000	0.6526
CH01H10	0.5000	6.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.6070	0.9630	0.5339
02b1	0.3333	2.0000	27.0000	4.0000	1.0000	0.7222	1.0000	0.6713
05g8	0.4259	2.0000	27.0000	4.0000	1.0000	0.6262	1.0000	0.5524
23g4	0.5000	8.0000	27.0000	11.0000	1.0000	0.5000	1.0000	0.7850
GD12	0.4259	3.0000	27.0000	4.0000	1.0000	0.6742	1.0000	0.6141
GD96	0.5577	3.0000	27.0000	4.0000	0.9630	0.4933	0.8846	0.3716
GD100	0.5000	2.0000	27.0000	3.0000	1.0000	0.5000	1.0000	0.3750
GD147	0.3889	4.0000	27.0000	5.0000	1.0000	0.6955	1.0000	0.6414
میانگین	0.4274	5.1818	27.0000	5.499	0.9949	0.6536	0.9762	0.6858

Archive of SID

www.SID.ir

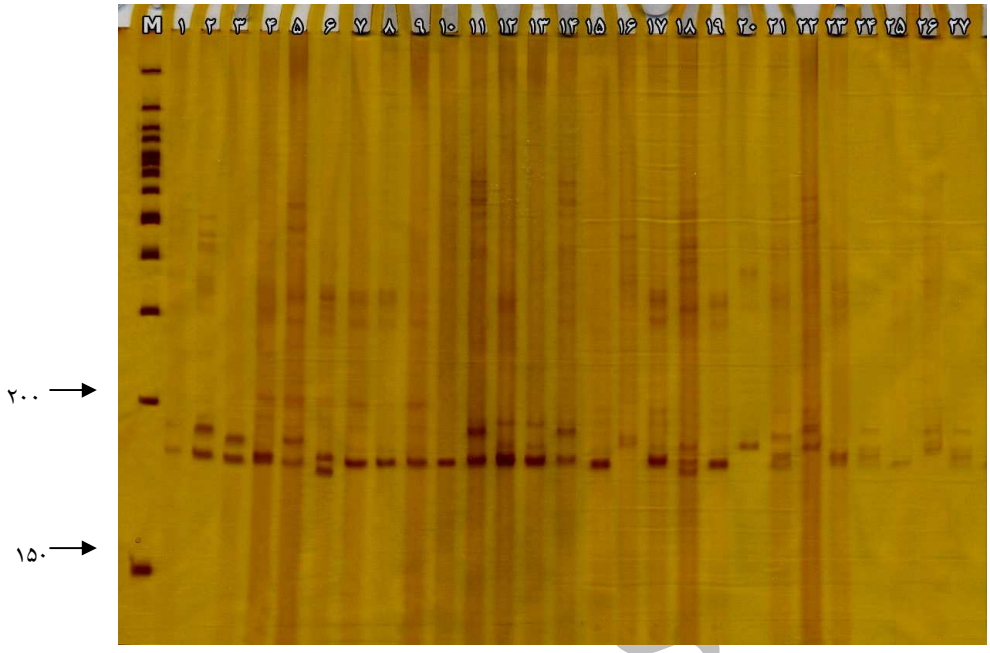


Fig. 1. Electrophoretic patterns of apple genotypes amplified with microsatellite CH01E12.

شکل۱- الگوی باندی SSR حاصل از جفت آغازگر CH01E12.

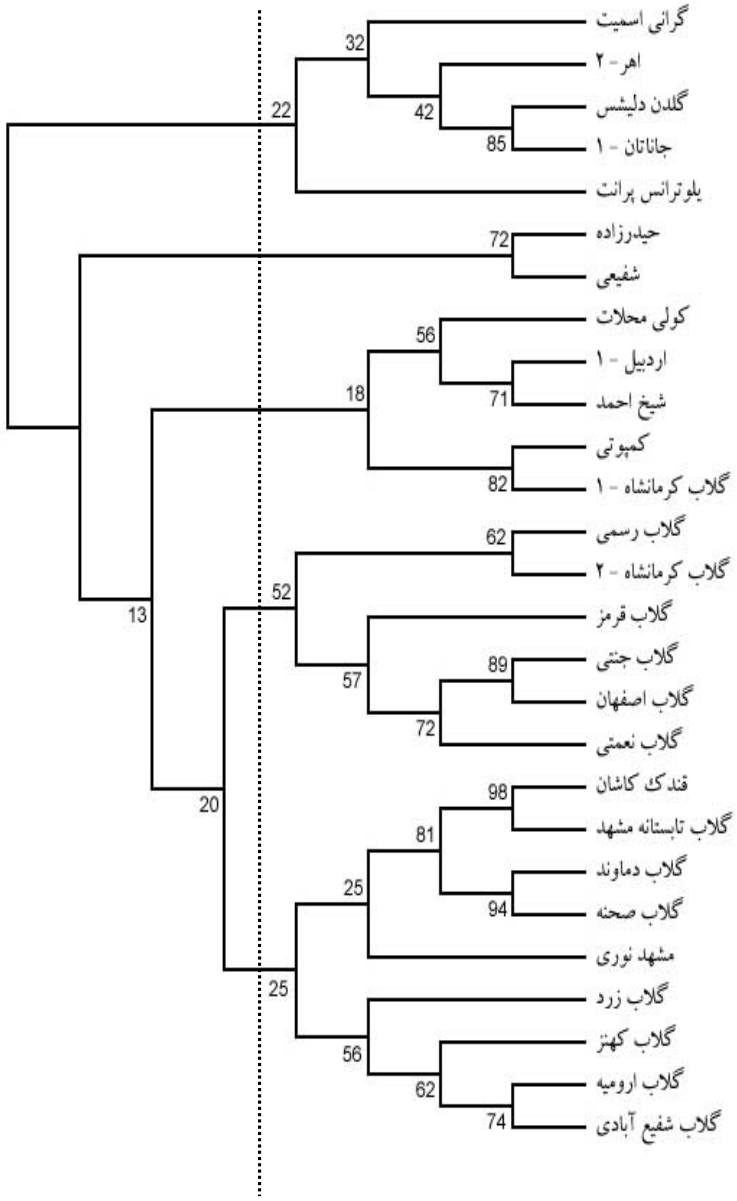
M: Marker Ladder DNA 50. 1- 'Golab e Kohanz', 2- 'Golab e Tabestaneh Mashhad', 3- 'Golab e Oroomiyeh' 4- 'Golab e Shafi abadi', 5- 'Golab e kermanshah-1', 6- 'Golab e kermanshah-2', 7- 'Golab e zard', 8-'Golab e ghermez', 9- 'Golab e Sahneh', 10- 'Golab e Rasmi', 11- 'Golab e Isfahan', 12- 'Golab e Nemati', 13- 'Golab e Janati', 14- 'Golab e Damavand', 15-'Ghandak kashan', 16-'Koli mahalat', 17- 'Mashhad noori', 18- 'Heydarzadeh', 19-'shafiee' 20-'Shaykh ahmad', 21-'Ardebil-1', 22- 'Kompoti', 23- 'AHAR-2', 24-'Yellow Transparent', 25-'Golden Delicious', 26-'Granny Smith', 27- 'Jonathan'.

M : نشانگر اندازه ۵۰، ۱- 'سیب گلاب کهنز'، ۲- 'گلاب تابستانه مشهد'، ۳- 'گلاب ارومیه'، ۴- 'گلاب شفیع آبادی'، ۵- 'گلاب کرمانشاه -۱'، ۶- 'گلاب کرمانشاه- ۲'، ۷- 'گلاب زرد'، ۸- 'گلاب قرمز'، ۹- 'گلاب صحنه'، ۱۰- 'گلاب رسمی'، ۱۱- 'گلاب اصفهان'، ۱۲- 'گلاب نعمتی'، ۱۳- 'گلاب جنتی'، ۱۴- 'گلاب دماوند'، ۱۵- 'قندک کاشان'، ۱۶- 'کولی محلات'، ۱۷- 'مشهد نوری'، ۱۸- 'حیدر زاده'، ۱۹- 'شفیعی'، ۲۰- 'شیخ احمد'، ۲۱- 'اردبیل-۱'، ۲۲- 'کمپوتی'، ۲۳- 'اهر-۲'، ۲۴- 'یلوترانسپرانت' ۲۵- 'گلدن دلیشس'، ۲۶- 'گرانی اسمیت'، ۲۷- 'جاناتان'.

۱. 'گرانی اسمیت'، اهر-۲' ، 'گلدن دلیشس'، 'جاناتان- ۱' و 'یلوترانسپارنت'
۲. 'حیدر زاده'،'شفیعی'
۳. 'کولی محلات'، 'اردبیل- ۱'، 'شیخ احمد'، 'کمپوتی'، 'گلاب کرمانشاه -۱'
۴. 'گلاب رسمی'، 'گلاب کرمانشاه- ۲'، 'گلاب قرمز'، 'گلاب جنتی'، 'گلاب اصفهان'، 'گلاب نعمتی'
۵. 'قندک کاشان'، 'گلاب تابستانه مشهد'، 'گلاب دماوند'، 'گلاب صحنه'، 'مشهد نوری'، 'گلاب زرد'، 'گلاب کهنز'، 'گلاب ارومیه'، 'گلاب شفیع آبادی'

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲- دندروگرام ۲۷ نژادگان سیب بر اساس اطلاعات الگو های باندی ۲۲ نشانگر چند شکلی ریز ماهواره، با استفاده از ضریب تشابه نی ۱۹۸۳ و روش UPGMA و Bootstrap consensus tree.

Fig. 2. Phylogenetic dendrogram of 27 apple genotypes constructed using data from 22 polymorphic SSR markers. The phenogram was produced using the UPGMA method of Nei's genetic identity between varieties.

بر اساس این دندروگرام، رقم های سیب خارجی در گروه ۱ و متفاوت از سیب های ایرانی تقسیم بندی شدند. تنها استثنا در این مورد رقم 'اهر-۲' بود که در گروه رقم های خارجی قرار گرفت. گروه بندی جداگانه رقم های خارجی از رقم های ایرانی نشان می دهد که به احتمال این رقم های مدت زمان کوتاهی است که در

www.SID.ir

ایران کشت می شوند (۳، ۶). در این گروه رقم های زودرس آمریکایی 'گلدن دلیشس' و 'جاناتان-۱' به عنوان دانهال های تصادفی از دو والد' Grimes Golden 'و' Esopus Spitzenburg' (۲۳)، قرابت زیادی با هم داشتند. در بررسی های قبلی نیز معلوم شده بود که رقم 'جاناتان-۱' به علت داشتن شباهت زیاد به رقم 'گلدن دلیشس'، در تلاقی با این رقم جهت ایجاد رقم های جدید و مقاوم سیب مثل 'جوناگولد'[۱] به کار می‌رود (۲۰). قرار گرفتن سیب 'اهر-۲' به عنوان یک رقم تابستانه با مبدأ احتمالی از قفقاز (۶) در مجاورت رقم دیررس استرالیایی 'گرانی اسمیت'، در نوع خود جالب توجه بود.

در گروه دوم، سیب های 'حیدرزاده' و 'شفیعی' قرار گرفتند. رقم سیب 'حیدرزاده' به دلیل عملکرد بالا و ویژگی‌های پومولوژیکی مناسب به عنوان والد مادری برای اصلاح و تولید رقم های زودرس ومیان رس سیب مورد توجه می باشد (۳). در مورد رقم 'شفیعی' اطلاعات زیادی در دسترس نیست ولی به نظر می رسد از جمله سیب های تابستانه در اطراف تهران و کرج باشد.

در گروه سوم دندروگرام، سیب های زودرس 'کولی محلات، 'اردبیل-۱'، 'شیخ احمد'، 'کمپوتی' و 'گلاب کرمانشاه-۱' قرار گرفتند که با وجود پراکنش جغرافیایی مختلف، صفات مورفولوژیکی آن ها تا حدودی مشابه است (۳، ۴). گمان می رود منطقه پراکنش سیب های 'اردبیل-۱' و 'شیخ احمد' ناحیه آذربایجان، 'گلاب کرمانشاه-۱' منطقه کرمانشاه و رقم 'کمپوتی' منطقه خراسان باشد. در این گروه 'کمپوتی' و 'اردبیل-۱' بعد از 'شیخ احمد' نزدیک ترین رقم به یکدیگر بودند، هر چند از لحاظ ظاهری (شکل تاج، فرم رویشی، شکل میوه، ارتفاع، شعاع گسترش تاج) شباهت 'اردبیل-۱' با 'کمپوتی' بیش از 'شیخ احمد' است. توجه به این مورد ضروری است که 'اردبیل-۱' و 'شیخ احمد' هر دو از نژادگان های بومی آذربایجان به شمار می‌روند (۳) و به احتمال به دلیل منشا جغرافیایی مشابه روابط خویشاوندی نزدیکتری با هم دارند. در بررسی های انجام شده توسط نشانگرهای SSR بر روی سیب های اروپایی نیز مطابقت تفکیک ژنتیکی رقم های با پراکنش جغرافیایی آن ها گزارش گردیده است (۱۹، ۲۱).

به تقریب تمام رقم های سیب 'گلاب' به استثنای 'گلاب کرمانشاه-۱' در گروه های چهارم و پنجم قرار گرفتند. گروه چهارم، شامل سیب های 'گلاب رسمی'،'گلاب کرمانشاه-۲'،'گلاب قرمز'،'گلاب جنتی'،'گلاب اصفهان' و 'گلاب نعمتی' بود که رابطه ژنتیکی بسیار نزدیک 'گلاب اصفهان' با 'جنتی' و 'نعمتی' حائز اهمیت است. سیب 'گلاب اصفهان' به صورت تجاری و در سطح گسترده ای در منطقه اصفهان کشت می‌گردد. شاید این سیب به دلیل مرغوبیت و بازارپسندی به مناطق دیگری برده شده و نام های محلی مانند 'گلاب نعمتی' و 'گلاب جنتی' برای آن ها در نظر گرفته شده باشد. در گروه پنجم رقم های سیب 'گلاب تابستانه مشهد'،'قندک کاشان'،'گلاب دماوند'،'گلاب صحنه'،'مشهد نوری'،'گلاب زرد'،'گلاب کهنز'،'گلاب ارومیه' و 'گلاب شفیع آبادی' دسته بندی شدند. قرارگیری 'گلاب صحنه' و 'دماوند' در نزدیک یکدیگر با توجه به صفات مورفولوژیکی (شکل میوه، نسبت طول به قطر میوه، و اندازه بذر) آن ها منطقی به نظر می‌رسد، هرچند 'گلاب صحنه' از منطقه کردستان منشا گرفته است (۳، ۶). گر چه سیب 'قندک کاشان' نیز عنوان 'گلاب' ندارد اما با داشتن ویژگی هایی همچون مزه 'گلاب'شیرین، شکل کروی واندازه کوچک میوه، زمان گلدهی و زودرس بودن آن (۶) در دسته سیب های گلاب قرار می‌گیرد. در مو'گلاب'رد سیب 'مشهد نوری' نیز منشا جغرافیایی قطعی وجود ندارد، برخی

۱- 'Jonagold'

Archive of SID

www.SID.ir

آن را از ناحیه خراسان و عده ای از منطقه مراغه می دانند (۶). در این گروه 'گلاب کهنز'، 'گلاب ارومیه'، 'گلاب شفیع آبادی' و 'گلاب زرد' قرار دارند که پراکنش آن ها در ناحیه آذربایجان می‌باشد (۳، ۴).

سیب های 'گلاب' به ویژه 'گلاب اصفهان'، 'صحنه' و 'کهنز' از گروه سیب های مهم تجاری هستند که بیش از ۹۰٪ سطح زیر کشت سیب های 'گلاب' را به خود اختصاص داده اند. در بررسی های قبلی، مشابهت صفات مورفولوژیکی این رقم های مانند شکل کروی، طعم شیرین و آبدار میوه، اندازه میوه و زودرسی آن ها تایید شده است (۴) و این همبستگی بین ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با گروه بندی ژنتیکی آن ها مطابقت زیادی دارد، هرچند این همبستگی در مورد منشا جغرافیایی آن ها چندان قابل توجه نیست. به طوری که سیب های 'گلاب' ناحیه آذربایجان (مانند 'گلاب زرد'، 'گلاب ارومیه' و 'گلاب شفیع آبادی') با سایر سیب های سایر مناطق کشور مانند کردستان، کرمانشاه و خراسان در کنار یکدیگر قرار گرفتند. تعبیر دیگری که از این مقایسه می توان داشت، عدم صحت در گزارش های مربوط به منشا رقم های سیب می باشد. به این ترتیب که بر خلاف نامگذاری منطقه ای نام سیب ها مانند 'گلاب اصفهان'، 'گلاب ارومیه' و 'گلاب کرمانشاه' به طور واقعی خاستگاه اصلی آن ها این مناطق نبوده و از یک مکان مشترک خاصی منشا گرفته و سپس در مناطق مختلف پراکنده شده باشند.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، به نظر می رسد تنوع ژنتیکی رقم های سیب ایرانی به طور کامل تابعی از تنوع جغرافیایی نبوده است، به طوری که سیب های 'گلاب' بومی با مراکز پراکنش متفاوت درگروه های ژنتیکی مجاور هم قرارگرفتند. ارشادی (۱) نیز نتیجه گیری کرده است که تنوع ژنتیکی برخی از رقم های سیب مربوط به استان های تهران و مرکزی با تنوع جغرافیایی آن ها مطابقت ندارد که دلیل آن انتقال احتمالی رقم های از سایر استان ها به این منطقه ذکر شده است (۱). به این ترتیب، این فرضیه تقویت می شود که ممکن است سیب های گلاب از یک والد مشترک منشا گرفته و سپس در نواحی مختلف ایران پراکنده شده باشند. شاید این رقم ها طی یک دوره طولانی و بر اثر بروز 'گلاب'جهش ها و عوامل محیطی با یکدیگر تفاوت های ظاهری پیدا کرده اند، هرچند این تفاوت ها در حدی نیست که آن ها را از نظر ژنتیکی از همدیگر دور نماید.

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد نشانگرهای SSR برای مطالعات تنوع ژنتیکی و شناسایی نژادگان‌های مختلف سیب سودمند هستند و انتظار می رود در آینده با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره ای بیشتر، صحت نتایج به دست آمده در این پژوهش بررسی گردد تا با اطمینان بیشتر نسبت به جایگاه سیب های ایرانی و به ویژه سیب 'گلاب' اظهار نظر شود. این نوع پژوهش ها برای انتخاب و اصلاح نژادگان های بومی سیب جهت معرفی و تولید کمک فراوانی خواهد نمود.

منابع REFRENCES

۱. ارشادی، ا. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ رقم سیب ایرانی (*Malus domestica* Borkh.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، پایان نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. آمار نامه کشاورزی ایران. ۱۳۸۴. انتشارات وزارت کشاورزی.

۳. حاج نجاری، ح. ۱۳۸۵. گزارش سالانه طرح تحقیقاتی" بررسی فنولوژی، میوه بندی و پومولوژی ۱۰۸ رقم سیب در شرایط آب و هوایی کرج". واحد دانه دارها. بخش تحقیقات باغبانی. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.

Archive of SID

www.SID.ir

۴. دامیار، س .۱۳۸۵. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی" شناسایی، جمع آوری و ارزیابی نژادگان های سیب بومی برخی از استانهای کشور". واحد دانه دارها. بخش تحقیقات باغبانی. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.

۵. کلانتری، س. ۱۳۷۱. شناسایی رقم های بومی سیب کرج، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۶. منیعی، ع. ۱۳۸۰.سیب وپرورش آن، ویرایش دوم. انتشارات فنی ایران.

7. Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA inpolyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19:680-683.
8. Conner, P.J., S.K. Brown and N.F. Weeden. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122:350-359.
9. Erdin, N., S. Tartarini, G.A.L. Broggini, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler, A. Patocchi, 2006. Mapping of the apple scab-resistant gene vb Genome 49:1238-1249.
10. Gianfranceschi, L., N. Segilas, R. Tarchini, M. Komjanc, and C. Gessler, 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor. Appl. Genet. 96:1069-1076.
11. Goulao, L. and C.M. Oliveira. 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica, 122:81-89.
12. Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett and R. Forster. 1997. Microsatellites in *Malus domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 94:249-254.
13. Hemmat, M., N.F. Weeden, A.G. Manganaris and D.M. Lawson. 1994. Molecular marker linkage map for apple. J. Hered. 85:4-11.
14. Hemmat, M., N.F. Weeden and S.F. Brown. 2003. Mapping and evaluation of *Malus domestica* microsatellites in apple and pear. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:515-520.
15. Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy, 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.
16. Janick, J., J.N. Cummins, K. Susan, S.K. Brown, and M. Hemmat, 1996. Apples In: Fruit Breeding, Vol. I: Tree and Tropical Fruits, J. Janick and Moore, J.N. (eds.) John Wiley and Sons, Inc.1-77.
17. Juniper, B.E., R. Watkins and S.A. Harris. 1999. The origin of apple. Acta Hort. 484:27-33.
18. Koller, B., I. Tenzer and C. Gessler. 2000. SSR analysis of apple scab lesions. Integrated Control of Pome Fruit Diseases. IOBC/WPRS Bulletin. 23:93–98.
19. Liebhard, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg, and C. Gessler, 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). Mol. Breed. 10:217–241.
20. Korban, S.S. and R.M. Skirvin. 1994. Nomenclature of the cultivated apple. HortScience 19:177-180.
21. Lespinasse, Y., C.E. Durel., L. Parisi., F. Laurens., M. Chevalier and C. Pinet. 2000. An European Project: D.A.R.E. – Durable apple resistance in Europe. Acta Hort. 538: 197–200.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Maliepaard, C., F. 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. Vrielinkvan 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.
23. Morgan G. and A. Richards. 2002. Apples. Ebury Press. London, UK.
24. Murray, G.C. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321–4325.
25. Nei, M. and N. Takezaki. 2004. Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis. 5th World Cong. Genet. Appl. Livstock Prod. 21:405-412.
26. Pewell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci. 1:215-222.
27. Pierantoni, L., K.H. Cho, I.S. Shin, R. Chiodini, S. Tartarini, L. Dondini, S.J. Kang and S. Sansavini. 2004. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. Theor. Appl. Genet. 109:1519-1524.
28. Roche P., G. Van Arkel and A.W. Van Heusden 1997 A specific PCR assay based on an RFLP marker closely linked to the *Sd*1 Gene for resistance to biotypes 1 and 2 of the rosy leaf curling aphid in apple. Plant Breed. 116:567-572.
29. Tignon, M., R. Kettmann and B.Watillon. 2000. AFLP: Use for the identification of apple cultivars and mutants. Acta Hort. 521:219-226.
30. Way. R.D., H.S. Aldwinckle, R.C. Lamb, A. Rejman, S. Sansavini, T. Shen, R. Watkins, M. M. Westwood and Y. Yoshida. 1990. Apples (*Malus*). In: J. N. Moore and J. R. Ballington Jr. (eds.). Genetic Resources of Temperate Fruit and Nuts. Int. Soc. Hort. Sci., Wageningen 1-62.
31. Wünsch, A. and J.I. Hormaza. 2007. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. Sci Hort. 113:37-43.
32. Xu, M.L. and S.S Korban. 2000. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 101: 844–851.
33. Yamamoto, T., T.Kimura., Y. Sawamura., K.Kotobuki., Y. Ban and T. Hayashi. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor. Appl. Genet. 102:865–870.

Archive of SID

www.SID.ir