

## تجزیه والدینی نتاج حاصل از تلاقی دو رقم سیب با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهوره<sup>۱</sup>

### PARENTAGE ANALYSIS IN THE PROGENY OF TWO APPLE CULTIVARS USING MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS

علیرضا فرخزاد، ذبیح اله زمانی، محمدرضا فتاحی مقدم، علیرضا طلایی و محسن مردی<sup>۲</sup>

#### چکیده

جهت تعیین درستی والدین جمعیت ایجاد شده از یک تلاقی کنترل شده، تشخیص نتاج احتمالی حاصل از گرده ناخواسته و ارزیابی درختان مورد استفاده به عنوان والد پدری و مادری، تعداد ۳۰ دانهدال از نتاج تلاقی رقم های 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' در کنار رقم های 'رد اسپار'، 'گلدن اسموتی'، 'گرانی اسمیت'، 'گلاب کهنز' و 'شفیع آبادی' به عنوان والدین احتمالی این نتاج با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره ارزیابی شدند. تعداد ۱۳ جفت آغازگر ریز ماهوره استفاده شد که از میان آن ها جفت آغازگرهای CH01d08، CH03d07، CH02g01، Col و هم به روش حذفی تعیین والدین و هم به روش انتساب والدین بر اساس درست نمایی، توانستند والدین نتاج حاصل از تلاقی را از رقم های دیگر متمایز کنند. توزیع آلل های ریزماهوره در نتاج نشان داد که توارث آن ها به صورت همباز بوده و اختلاف معنی داری با نسبت های مندلی بر اساس آزمون کای اسکور نداشتند. نتایج به دست آمده از این پژوهش توانست یکی از نتاج را که حاصل از گرده ناخواسته بود، مشخص نماید. همچنین بین چندین درخت از هر رقم والد پدری و یا مادری تفاوتی در نژادگان مکان های ریزماهوره مورد مطالعه مشاهده نشد.

واژه های کلیدی: سیب، گرده افشانی کنترل شده، گرده افشانی ناخواسته، نشانگر های ریزماهوره.

#### مقدمه

ارزیابی روابط والدین و نتاج و تشخیص درستی نژادگان های حاصل از تلاقی های کنترل شده، اولین و اساسی ترین مرحله در بیشتر کارهای بهنژادی به ویژه اصلاح مولکولی می باشد (۷). نشانگرهای مورفولوژیکی به دلیل این که زمان بر بوده، تنوع و فراوانی کمی داشته و به علت وجود خطا در مورد ویژگی هایی که زیر تاثیر محیط هستند، نمی توانند با اطمینان بالا برای تعیین قطعی والدین تلاقی و یا حذف نتاج ناخواسته مورد استفاده قرار گیرند (۲، ۱۰). از طرف دیگر در برخی درختان مانند هلو به دلیل شباهت زیاد رقم ها، امکان تعیین دقیق منشاء ژنتیکی و روابط والدین و نتاج با استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی وجود ندارد (۱۹). به علت کمبود

۱- تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران (zzamani@ut.ac.ir) و استاد گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج و استادیار بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، کرج، جمهوری اسلامی ایران.

شاخص های مورفولوژیکی به ویژه در مراحل اولیه رشد دانهال های سیب، تشخیص گیاهان حاصل از نامیزیدن<sup>۱</sup> از سایر دانهال ها امکان پذیر نیست (۴). وجود چنین محدودیت هایی باعث توجه پژوهشگران به استفاده از نشانگرهای مولکولی شده است. تفاوت موجود بین ردیف های بازی DNA کروموزوم ها که از والدین به نتاج منتقل می شود، می تواند به عنوان نشانگر مولکولی به کار رود (۱۱). از برخی روش ها همچون آلل های ناسازگاری مربوط به مکان های S (۱۴) یا مارکرهای RFLP (۲۴) و RAPD (۳) در درختان گلابی جهت تعیین والدین برخی نژادگان ها استفاده شده است. با این حال این نشانگر ها نیز کارایی محدودی در تفکیک نتاج و والدین داشته اند (۱۰).

نشانگر های ریزماهوره به دلیل تنوع بالا، نیاز به میزان کم DNA و قابل استفاده بودن در گونه های مختلف، در حال حاضر به عنوان نشانگرهای برتر در انگشت نگاری ژنتیکی، تعیین روابط فیلوژنیک، شناسایی رقم ها، تعیین روابط والدین و نتاج و تهیه نقشه های ژن پیوستگی<sup>۲</sup> استفاده می شوند (۵، ۶، ۱۵، ۲۳). ریزماهوره ها به صورت همباز و طبق نسبت های مندلی به ارث می رسند، بنابراین هر یک از نتاج در هر مکان ژنی فقط حامل یکی از آلل های والد مادری یا پدری خواهند بود که از این ویژگی برای شناسایی روابط والدین-نتاج و حذف نتاج ناخواسته احتمالی استفاده می شود (۲۱). فتاحی مقدم و همکاران (۱) نحوه توارث آلل های شش مکان ریز ماهوره را در ۴۶ نتاج حاصل از تلاقی انگور رقم های بی دانه قرمز و موسکات هامبورگ بررسی کرده و نشان دادند که ۹۴٪ از نتاج با داشتن یک آلل از هر والد، حاصل گرده افشانی کنترل شده و بقیه با داشتن هر دو آلل والد مادری حاصل خود گرده افشانی بودند. تستولین و همکاران (۲۵) با تطابق آلل های SSR مربوط به والدین و نتاج درستی تلاقی های انجام شده در مورد برخی نژادگان های هلو را تایید کردند. کیمورا و همکاران (۱۰) نیز با استفاده از نشانگرهای ریز ماهوره، والدین واقعی ۱۴ رقم گلابی حاصل از تلاقی رقم های ژاپنی، اروپایی و چینی را مشخص کردند. یاماموتو و همکاران (۲۷) با مقایسه آلل های والدین و نتاج در مکان های ریزماهوره مورد مطالعه، والدین واقعی ۹ رقم مهم و تجاری هلو در ژاپن را مشخص کردند. بیسوگنین و همکاران (۴) با استفاده از مارکرهای مولکولی ریزماهوره، سطح چندگانی<sup>۳</sup> دانهال های حاصل از تلاقی *Malus × sieboldii* و *Malus × domestica* را تعیین کردند. ایشان همچنین با مقایسه آلل های حاصل از مکان های ریزماهوره در والدین و نتاج حاصل از تلاقی، دانهال های حاصل از بذرهای جنسی و نامیزه را در سیب مشخص کردند.

در برخی گیاهان از جمله انگور (۱) بر خلاف اخته کردن گل ها، ممکن است در اثر شدن دانه گرده قبل از باز شدن گل یا ریزش دانه گرده از سطوح بالاتر بوته در اثر نیروی گرانش، هنگام باز نمودن پوشش گل های اخته شده، سطح کلاله به دانه گرده خودی آغشته شده و منجر به خود گرده افشانی شود که لازم است چنین نتاجی از جمعیت دورگه حذف شوند. با توجه به این که تولید بذرهای حاصل از نامیزیدن در برخی گیاهان از جمله تیره وردسانان به ویژه در گونه های چندگان سیب وجود دارد (۱۸) و همچنین در درختان سیب با این که خود گرده افشانی به دلیل ناسازگاری بسیار کم اتفاق می افتد، با این حال در برخی موارد در اثر سهل انگاری و اشتباه های آزمایشی، تلاقی های خارج از برنامه تلاقی ممکن است صورت گیرد، انجام تلاقی های کنترل شده اطمینان صد درصدی به نتاج را تضمین نمی کند (۱، ۴). از طرف دیگر در برخی برنامه های مولکولی همچون تهیه نقشه های ژنتیکی نیازمند استفاده از نتاج با اطمینان صد درصد و با والدین واقعی هستیم (۱۲). بنابراین انجام

چنین آزمایش هایی روی دورگه های حاصل از تلاقی در سال های اولیه و حذف نتاج ناخواسته برای پرهیز از به وجود آمدن مشکلات بیشتر در ارزیابی های آتی، اجتناب ناپذیر است.

با توجه به این که در محل انجام تلاقی ها رقم های 'رد اسپار'، 'گلدن اسموتی'، 'گرانی اسمیت'، 'گلاب کهنز' و 'شفیع آبادی' وجود داشتند و تلاقی های دیگری نیز در بین آن ها صورت گرفته بود، بنابراین این پژوهش جهت تعیین درستی والدین جمعیت  $F_1$  حاصل از تلاقی کنترل شده بین رقم های سیب 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' و شناسایی نتاج ناخواسته احتمالی صورت گرفت. از دیگر اهداف این پژوهش ارزیابی درختان مختلف مورد استفاده برای هر رقم جهت اطمینان از یکسانی ژنتیکی آن ها با استفاده از نشانگر ریزماهوره بود.

## مواد و روش ها

### مواد گیاهی و استخراج DNA

برای انجام این پژوهش از ۳۰ دانهال  $F_1$  حاصل از تلاقی کنترل شده بین رقم های 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز'، همراه با رقم های ایرانی 'گلاب کهنز' و 'شفیع آبادی' و رقم های خارجی 'رد اسپار'، 'گلدن اسموتی' و 'گرانی اسمیت' به عنوان والدین کاندید احتمالی این ترکیب استفاده شد. همچنین به علت محدودیت در تعداد گل های تک درخت والد پدری یا مادری برای انجام تلاقی از رقم های 'گلاب کهنز'، 'شفیع آبادی'، 'رد اسپار' و 'گرانی اسمیت' از ۳ درخت و برای رقم گلدن اسموتی از ۲ درخت استفاده شده بود که از این درختان نیز نمونه برگی تهیه شد. برگ های جوان گیاهان مورد نظر بیدرنگ پس از برداشت به فریزر منتقل شده و استخراج DNA با روش موری و تامسون (۱۶) انجام گرفت.

### نشانگرهای مولکولی و واکنش PCR

در این آزمایش از ۱۳ جفت آغازگر ریزماهوره CH01f02، CH01h02، CH04f10، H05d02، CH01d08، CH02g01، CH03d07، Col و CH05e03 معرفی شده توسط لیبهارد و همکاران (۱۳)، CH-Vf2 معرفی شده توسط ویناتزر و همکاران (۲۶)، GD100 و GD96 معرفی شده توسط هاک انسون و همکاران (۸) و Z71981 معرفی شده توسط سیلف برگ و همکاران (۲۲)، استفاده شد که در نهایت ۴ جفت آغازگر برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

حجم کل واکنش ۱۵ میکرولیتر شامل DNA نمونه ها (۳ میکرولیتر با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر)، بافر PCR،  $MgCl_2$ ، دو آغازگر (هر کدام ۰/۷۵ میکرولیتر با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، نوکلئوتیدها، آنزیم تک پلیمراز<sup>۱</sup> (شرکت سیناژن) و آب دیونیزه بود. برای PCR از روش Touch down با چرخه های چهار دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس جهت مرحله واسرشت سازی اولیه و سپس ۱۰ چرخه متوالی به ترتیب ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (بسته به نوع آغازگر) با کاهش ۱-۰/۵ درجه سلسیوس به ازای هر چرخه و ۱۰۵ ثانیه در ۷۲ درجه و سپس ۲۵ چرخه متوالی با ترتیب ۱ دقیقه در ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (بسته به نوع آغازگر) و ۱۰۵ ثانیه در ۷۲ درجه و در نهایت چرخه پایان به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس استفاده شد. برای تعیین دمای بهینه اتصال، از روش شیب دمایی استفاده شد و برای هر مکان ریزماهوره بهترین دمای اتصال مشخص شد (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی های مربوط به جفت آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در تجزیه والدینی از نظر توالی آغازگرها، دمای اتصال آغازگر و محدوده باندهای تولیدی.

Table 1. Characteristics of studied microsatellite primer pairs in parent analysis and primers sequence, annealing temperature and band ranges.

محدوده باندها (جفت باز) Band ranges (bp)	دمای اتصال (درجه سلسیوس) Annealing temperature (° C)	آغازگر پیش رو Forward primer آغازگر پس رو Reverse primer	مکان های ریزماهواره SSR loci
310-287	58	5'-CTCCGCCGCTATAACAACACTTC-3' 5'-TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG-3'	CH01d08
260-227	61.5	5'-GATGACGTCGGCAGGTAAG-3' 5'-CAACCAACAGCTCTGCAATC-3'	CH02g01
245-198	58	5'-CAAATCAATGCAAACTGTC-3' 5'-GGCTTCTGGCCATGATTTTA-3'	CH03d07
233-200	60.5	5'-AGGAGAAAGGCGTTTACCTG-3' 5'-GACTCATTCTTCGTCGTCCTG-3'	Col

### الکتروفورز<sup>۱</sup> محصول PCR

برای آزمایش محصول PCR از نظر تکثیر یا عدم تکثیر باندها و همچنین تعیین کیفیت اولیه باندها، مقدار ۴ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۳۵٪ در بافر TBE در ولتاژ ۷۵ به مدت ۱۰۰ دقیقه الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل آگارز توسط اتیدیم بروماید به غلظت ۵ میکروگرم در لیتر به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و پس از شستشوی با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه، باندها در شرایط نور UV مشاهده و از آن ها عکسبرداری شد.

پس از اطمینان از تکثیر DNA، محصول PCR در ژل پلی آکریل آمید ۶٪ به ضخامت ۰/۴ میلی متر و توسط دستگاه الکتروفورز عمودی (بیوراد<sup>۲</sup> - مدل Squi-Gen GT) الکتروفورز شد. برای واسرشت سازی نمونه ها ابتدا ۸ میکرولیتر محصول PCR با ۴ میکرولیتر دای فرماید مخلوط شده و در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. قبل از بارگذاری نمونه ها دستگاه تا دمای ۵۵ درجه سلسیوس گرم شد. بارگذاری نمونه ها در داخل چاهک ها به مقدار ۶ تا ۸ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR همراه با دای فرماید انجام شد. بر اساس دفترچه راهنمای دستگاه، برای الکتروفورز توان ثابت ۹۰ وات در دمای ۵۵ درجه به مدت ۶۰ تا ۷۰ دقیقه انتخاب شد. از محلول استیک اسید ۱۰٪ برای تثبیت، محلول نیترات نقره ۱ گرم در لیتر همراه با ۰/۱۵٪ فرمالدهید برای رنگ آمیزی و از محلول ۳۰ گرم در لیتر کربنات سدیم همراه با ۰/۱۵٪ فرمالدهید همراه با ۲/۵ میلی گرم در لیتر تیوسولفات سدیم برای ظاهر سازی باندهای درون ژل پلی آکریل آمید استفاده شد.

## تجزیه و تحلیل داده ها

امتیازبندی باندهای چند شکل به صورت یک و صفر برای حضور و عدم حضور باند صورت گرفت. میزان سودمندی نشانگرهای ریزماهواره، هتروزیگوتی، چند شکلی و برخی دیگر از شاخص های مربوط به آلل های ریز ماهواره برای مکان های مورد استفاده در این پژوهش که چندشکلی نشان داده بودند، مورد محاسبه قرار گرفت. برای تایید والدین از روش حذفی تعیین والدین و روش انتساب والدین بر مبنای درست نمایی با استفاده از نرم افزار Cervus (3.0) (۹)، استفاده شد. محاسبه محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) با استفاده از نرم افزار Cervus(3.0) و از طریق رابطه زیر استفاده شد که در آن برای مکان مشخصی مانند  $i$ ،  $P_{ij}$  میزان فراوانی هر آلل در مکان مورد مطالعه می باشد.

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

## نتایج

### تکثیر مکان های ریزماهواره

از ۱۳ مکان ریز ماهواره که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، ۴ مکان (CH01d08، CH02g01، Col، CH03d07) که چندشکلی خوبی در والدین و نتاج مورد استفاده نشان داده بودند برای ارزیابی روابط والدین و نتاج مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی های مربوط به این ۴ مکان از نظر توالی، دمای اتصال مورد استفاده و محدوده اندازه باندی که در رقم های مورد استفاده در این مطالعه نشان دادند، در جدول (۱) ارایه شده است. سایر آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش یا به صورت یک شکل هموزیگوت یا هتروزیگوت و یا به صورت چند مکانی و یا دارای آلل هایی بودند که تاثیری در انتخاب و تعیین والدین نداشتند و با توجه به روشی که در این مطالعه برای تعیین والدین مورد استفاده قرار گرفت، در تجزیه های بعدی حذف شدند.

### تجزیه والدین و نتاج با استفاده از روش حذفی والدین

جهت تعیین درستی والدین نتاج مورد نظر به روش حذفی والدین، از ۲ مکان ریزماهواره CH02g01 و CH03d07 استفاده شد. این دو جفت آغازگر به طور قطعی والدین نتاج مورد تلاقی را از دیگر رقم های مورد آزمایش مشخص نمودند. در جدول ۲ آلل های مربوط به چهار مکان مورد استفاده در ۳۰ نتاج حاصل از تلاقی و آلل های رقم های 'گلاب کهنز'، 'رد اسپار'، 'گرانی اسمیت'، 'شفیع آبادی' و 'گلدن اسموتی' که به عنوان والدین احتمالی تلاقی می توانستند محسوب شوند، نشان داده شده است. توجه به الگوی باندی والدین احتمالی و نتاج در مکان CH03d07 نشان داد که آلل با سایز ۲۰۵ جفت باز که در رقم های 'گرانی اسمیت' و 'شفیع آبادی' وجود داشت، در هیچ کدام از نتاج دیده نشد. آلل ۲۴۵ جفت بازی مربوط به نتاج در بین ۵ والد احتمالی، در رقم 'رد اسپار' و 'گرانی اسمیت' وجود داشت و در سه والد احتمالی دیگر یعنی 'گلاب کهنز'، 'گلدن اسموتی' و

'شفیع آبادی' مشاهده نشد (شکل ۱). از طرف دیگر چهار آلل مورد انتظار از باندهای موجود در دو والد 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' در نتایج مشاهده شد. توجه به داده های جدول (۲) مربوط به آلل های مکان CH02g01 نشان داد که آلل ۲۲۷ جفت بازی موجود در رقم های 'گرانی اسمیت' و 'شفیع آبادی' در هیچ کدام از نتایج تکثیر نشده است و آلل های ۲۳۰ و ۲۴۴ جفت بازی مربوط به برخی از نتایج فقط در رقم های 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' مشاهده شده است. جهت حذف احتمال خطای آزمایشی، نتایج و والدین دوباره در این دو مکان تکثیر گردیدند که نتایج مشابهی به دست آمد.

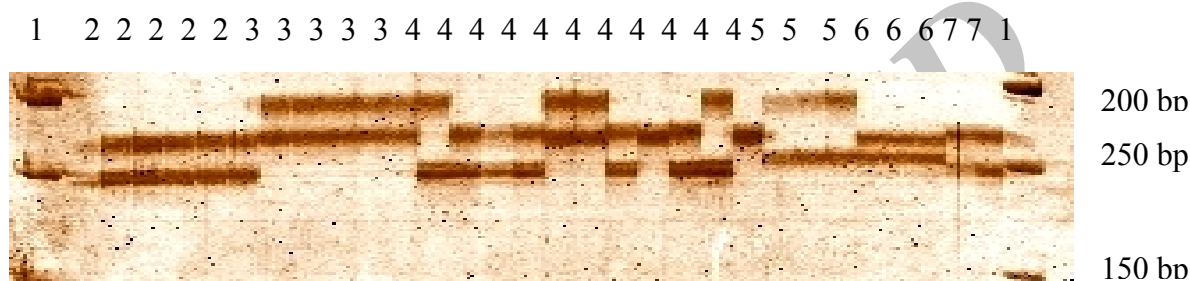


Fig. 1. Banding pattern of CH03d07 primer pair in 5 apple cultivars and their replications as well as some of the studied progeny. 1- Lader, 2- Golab-e Kohanz, 3- Red Spur, 4- Some of studied progeny, 5- Granny Smith, 6- Shafi Abadi, 7- Golden Smoothee.

شکل ۱- الگوی باندهای حاصل از جفت آغازگرهای CH03d07 در ۵ رقم سیب و تکرارهای آن ها و برخی از نتایج مورد مطالعه. ۱- سایز نشانگر، ۲- 'گلاب کهنز'، ۳- 'رد اسپار'، ۴- برخی نتایج مورد مطالعه، ۵- 'گرانی اسمیت'، ۶- 'شفیع آبادی'، ۷- 'گلدن اسموتی'.

### نتایج آزمون کای اسکور

نتایج آزمون کای اسکور برای آلل های مکان های SSR مورد استفاده در این آزمایش برای ۲۹ دانهال حاصل از تلاقی رقم های سیب 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مشخص شد که بین نسبت های مشاهده شده در توارث آلل ها برای ۴ مکان مورد استفاده، با نسبت های مورد انتظار (نسبت مندلی ۱:۱:۱) تفاوت معنی دار وجود ندارد که نشان دهنده تبعیت توارث آلل های مکان های SSR از قوانین مندلی می باشد.

جدول ۲- آلل های ۴ مکان ریزماهوره در رقم های سیب 'گلاب کهنز'، 'شفیع آبادی'، 'رد اسپار'، 'گرانی اسمیت'، 'گلدن اسموتی' و ۳۰ نتاج حاصل از تلاقی رقم های 'گلاب کهنز' و 'رد اسپار'.

Table 2. Alleles detected for four microsatellite loci in 'Golab-e Kohanz', 'Shafi Abadi', 'Red Spur', 'Granny Smith', 'Golden Smoothee' and 30 seedlings obtained from the cross 'Golab-e- Kohans' × 'Red Spur'.

(SSR marker (bp))		نشانگر SSR (جفت باز)		نژادگان
Col	CH03d07	CH02g01	CH01d08	Genotype
233:218	220:198	244:230	310:287	'گلاب کهنز' ('Golab-e- Kohanz')
230:208	220:205	227:227	287:287	'شفیع آبادی' ('Shafi Abadi')
220:200	245:223	260:244	297:287	'رد اسپار' ('Red Spur')
228:208	245:205	260:227	300:300	'گرانی اسمیت' ('Granny Smith')
218:200	223:198	260:260	310:310	'گلدن اسموتی' ('Golden Smoothee')
233:200	245:198	260:230	310:287	دانهال ۱ (Seedling 1)
233:200	223:198	244:244	287:287	دانهال ۲ (Seedling 2)
233:220	223:198	244:230	297:287	دانهال ۳ (Seedling 3)
233:220	223:198	244:230	310:287	دانهال ۴ (Seedling 4)
233:220	245:220	244:230	310:297	دانهال ۵ (Seedling 5)
233:200	223:198	244:244	297:287	دانهال ۶ (Seedling 6)
220:218	223:220	244:230	297:287	دانهال ۷ (Seedling 7)
218:200	223:198	244:244	310:287	دانهال ۸ (Seedling 8)
218:200	245:198	244:230	287:287	دانهال ۹ (Seedling 9)
233:200	223:220	244:230	310:297	دانهال ۱۰ (Seedling 10)
233:200	245:220	260:244	287:287	دانهال ۱۱ (Seedling 11)
233:200	223:220	244:244	310:297	دانهال ۱۲ (Seedling 12)
218:200	223:220	260:244	297:287	دانهال ۱۳ (Seedling 13)
233:200	245:220	244:244	310:297	دانهال ۱۴ (Seedling 14)
220:218	223:198	260:230	310:297	دانهال ۱۵ (Seedling 15)
233:220	245:220	260:230	310:297	دانهال ۱۶ (Seedling 16)
233:200	245:198	244:244	310:287	دانهال ۱۷ (Seedling 17)
233:200	223:220	260:244	310:287	دانهال ۱۸ (Seedling 18)
233:220	245:220	260:244	287:287	دانهال ۱۹ (Seedling 19)
233:200	223:220	244:244	310:287	دانهال ۲۰ (Seedling 20)
218:200	245:198	244:230	297:287	دانهال ۲۱ (Seedling 21)
218:200	223:220	260:244	310:287	دانهال ۲۲ (Seedling 22)
220:218	245:220	260:244	297:287	دانهال ۲۳ (Seedling 23)
220:218	245:220	260:244	310:287	دانهال ۲۴ (Seedling 24)
233:200	223:220	244:230	297:287	دانهال ۲۵ (Seedling 25)
228:200	245:245	260:244	300:287	دانهال ۲۶ (Seedling 26) †
218:200		260:230	310:287	دانهال ۲۷ (Seedling 27) ††
218:200	245:198	244:230	310:297	دانهال ۲۸ (Seedling 28)
220:218	245:198	244:230	310:287	دانهال ۲۹ (Seedling 29)
220:218	245:198	244:244	310:287	دانهال ۳۰ (Seedling 30)

† Seedling no. 26 obtained from unwanted pollen.

† دانهال ۲۶ حاصل از گرده ناخواسته.

†† There was missing data for CH03d07 locus in the seedling 27.

†† در دانهال ۲۷ در مکان CH03d07 داده گمشده وجود داشت.

جدول ۳- نتایج آزمون کای اسکور مربوط به توارث آلل های ۴ مکان ریزماهواره در دانهال های حاصل از تلاقی رقم های سیب 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز'.

Table 3. Results of chi-square test of the inheritance of four microsatellite alleles among the progeny obtained from crossing 'Red Spur' × 'Golab-e-Kohanz'.

p	$\chi^2$	درجه آزادی (df)	مکان ریزماهواره SSR loci
0.33 <sup>ns†</sup>	3.4	3	CH01d08
0.46 <sup>ns</sup>	2.5	3	CH02g01
0.94 <sup>ns</sup>	0.08	3	CH03d07
0.41 <sup>ns</sup>	2.8	3	Col

†<sup>ns</sup> Non-significant.

†<sup>ns</sup> غیر معنی دار.

### تجزیه والدین و نتاج و انتساب والدین بر مبنای درست نمایی

برای مطالعه و تجزیه روابط والدین و نتاج و انتساب والدین بر مبنای درست نمایی، از آلل های چهار مکان ریزماهواره (CH01d08، CH02g01، CH03d07 و Col) که والدین احتمالی و نتاج در آن ها چندشکی مناسب و خوبی نشان دادند، با استفاده از نرم افزار Cervus (3.0) (۹)، استفاده شد. این برنامه انتساب والدین بر مبنای درست نمایی را در سه مرحله تجزیه فراوانی آلل ها، مرحله شبیه سازی و تجزیه والدینی انجام می دهد.

### تجزیه فراوانی آلل ها

اطلاعات مربوط به فراوانی آلل های مربوط به چهار مکان ریزماهواره مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. در این مرحله دامنه ای از محاسبه های آماری شامل تعداد آلل هر مکان، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، فراوانی آلل نول و غیره انجام شد که در صورت مناسب بودن مکان های مورد استفاده بر اساس موارد اشاره شده زمینه را برای مرحله بعدی تجزیه آماده می کند. همان طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، مکان Col دارای بیشترین آلل و مکان CH02g01 دارای کمترین آلل در بین رقم های و نتاج مورد مطالعه بود. میزان هتروزیگوسی مشاهده شده در همه مکان ها بیشتر از هتروزیگوسی مورد انتظار بود. بالاترین محتوای اطلاعات چندشکی یا PIC به میزان ۰/۷۴ در مکان Col و کمترین آن به میزان ۰/۵۸ برای مکان CH02g01 مشاهده شد. میزان هتروزیگوسی و چندشکی مشاهده شده در این پژوهش امکان تعیین والدین مورد تلاقی را فراهم آورد.



جدول ۴- تجزیه فراوانی آلل ها، میزان هتروزیگوسیتی و برخی دیگر از ویژگی های مربوط به ۴ مکان ریزماهوره مورد مطالعه.

Table 4. Allele frequency, heterozygosity and some other parameters of studied microsatellite loci.

PIC <sup>۱</sup>	فراوانی آلل نول Null allele frequency	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	تعداد آلل Alleles number	مکان ریزماهوره Microsatellite loci
0.72	-0.09	0.91	0.77	5	CH01d08
0.58	-0.06	0.71	0.64	4	CH02g01
0.72	-0.12	0.97	0.77	5	CH03d07
0.74	-0.13	1	0.78	7	Col
0.69	-0.1	0.89	0.74	5.25	میانگین (Average)

### شبیه سازی تجزیه والدین

در این بخش مقدار بحرانی مربوط به LOD برای هر دو سطح اطمینان ۸۰ و ۹۵٪ که توسط نرم افزار تعیین می گردد، محاسبه گردید. میانگین LOD برای زمانی که شبیه ترین کاندید والد مادری، مادر واقعی باشد، ۱/۶۱ محاسبه شد که از انحراف استاندارد ۰/۹۶ برخوردار بود. میانگین LOD زمانی که والد پدری، پدر واقعی باشد ۲/۰۳ و با انحراف از استاندارد ۱/۳۰ بود. میانگین LOD زمانی که شبیه ترین جفت پدر و مادر همان جفت والدین مورد نظر باشد، ۴/۱۷ محاسبه شد که انحراف از استاندارد آن برابر با ۱/۵۶ بود. طبق برآورد های شبیه سازی شده تخمین زده شد که با تعداد مکان SSR به کار رفته و تعداد افراد موجود در این پژوهش والد مادری ۱۰۰٪ از نتاج با سطح اطمینان ۸۰٪ به طور قطعی مشخص گردید. در مورد والد پدری تخمین صد درصدی نتاج، پایین تر از سطح احتمال ۸۰٪ بود. طبق برآوردهای شبیه سازی شده، والدین واقعی ۱۰۰٪ نتاج شبیه سازی شدند (داده ها نشان داده نشده است).

### تجزیه والدینی

با استفاده از نرم افزار Cervus درست نمایی هر یک از والدین کاندید برای والد بودن در مورد تک تک نتاج و مقدار اطمینان از والد بودن شبیه ترین کاندید با توجه به سطح بحرانی LOD محاسبه و والدین نهایی هر یک از نتاج مشخص گردید. همان طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، تعداد جور شدگی اشتباهی برای همه نتاج غیر از دانهال شماره چهار از نظر والد مادری و پدری مشخص شده صفر می باشد که نشان دهنده پایین بودن احتمال خطا در تعیین والدین می باشد. مقدار عددی سایر مؤلفه های تجزیه والدینی در جدول ۵ نشان داده

شده است. مقادیر مثبت و بالای LOD نشان دهنده احتمال بالای والد بودن کاندید معرفی شده می باشد. در مقادیر LOD منفی با این که احتمال والد بودن کمتر می شود، با این حال به خاطر این که انتخاب والدین بر اساس بالاترین LOD صورت می گیرد، احتمال والد بودن آن کاندید برای نتایج مورد نظر بالاترین احتمال در بین سایر جفت والدین می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه LOD برای جفت والدین احتمالی کاندید برای دانهال های مورد بررسی، مشخص شد که والدین نتایج مورد مطالعه غیر از دانهال شماره ۲۶، رقم های 'گلاب کهنز' و 'رد اسپار' می باشند. برای دانهال شماره ۲۶ مشخص شد که والد پدری 'گرانی اسمیت' است که در اثر گرده افشانی ناخواسته و به علت نزدیکی به قطعه والد مادری 'رد اسپار' صورت گرفته است.

### ارزیابی درختان مورد استفاده به عنوان والد پدری و مادری

همان طور که اشاره شد در این تلاقی ها به علت محدودیت گل های تک درخت والد پدری یا مادری برای انجام تلاقی، از ۲ و در برخی رقم ها از ۳ درخت برای جمع آوری دانه گرده یا اخته کردن گل ماده استفاده شده بود. جهت مشخص شدن شباهت و یا تفاوت موجود بین آن ها، از این درختان نمونه DNA استخراج و الگوی آلی آن ها در مکان های مورد مطالعه، مورد مقایسه قرار گرفت. تجزیه خوشه ای رقم ها به همراه تکرارهای مورد استفاده به روش UPGMA نشان داد که بین درختان مورد استفاده از یک رقم، تفاوتی وجود ندارد (شکل ۲). همه درختان نمونه برداری شده از هر رقم الگوی باندی یکسانی نشان دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که این درختان در مکان های ریزماهواره مورد بررسی، ۱۰۰٪ شبیه هم بوده و بنابراین یک همگروه از رقم های مورد نظر هستند که به روش های رویشی تکثیر شده اند.

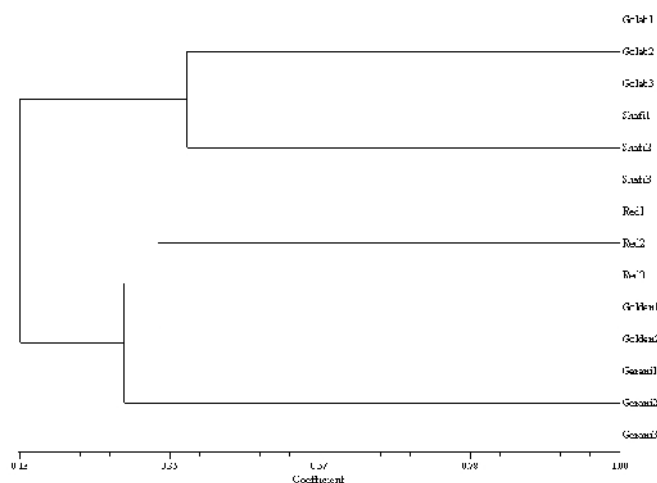


Fig. 2. Dendrogram of the cluster analysis of 5 apple genotypes and their replications based on UPGMA method.

شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۵ نژادگان سیب به همراه تکرارهای مورد استفاده برای هر رقم به روش UPGMA.

جدول ۵- نتایج مربوط به تجزیه جفت والدینی.

Table 5. Results of parent pair analysis.

بالاترین سطح LOD Top LOD	امتیاز LOD جفتی Pair LOD score	تعداد جفت شدگی ناجور Locus mismatching	تعداد مکان مقایسه شده No. of locus compared	والد پدری Candidate father	بالاترین سطح LOD Top LOD	امتیاز LOD جفتی Pair LOD score	تعداد جفت شدگی ناجور Locus mismatching	تعداد مکان مقایسه شده Locus compared	والد مادری Candidate mother	احتمال حذف نشدن والد دوم Second parent non-exclusion probability	احتمال حذف نشدن والد اول First parent non-exclusion probability	شماره نتایج Offspring number
0.12	0.12	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.017	0.31	1
0.34	0.34	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.12	-0.12	0	4	Red Spur	0.022	0.29	2
0.86	0.86	0	4	Golab-e-Kohanz	-0.12	-0.12	0	4	Red Spur	0.011	0.28	3
1.2	1.2	1	4	Golab-e-Kohanz	-4.5	-4.5	1	4	Red Spur	0.022	0.36	4
0.34	0.34	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.78	-0.78	0	4	Red Spur	0.031	0.42	5
0.34	0.34	0	4	Golab-e-Kohanz	0.001	0.001	0	4	Red Spur	0.020	0.27	6
0.86	0.86	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.011	0.27	7
0.068	0.068	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.028	0.32	8
0.98	0.98	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.9	-0.9	0	4	Red Spur	0.020	0.35	9
0.34	0.34	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.018	0.34	10
-0.45	-0.45	0	4	Golab-e- Kohanz	0.24	0.24	0	4	Red Spur	0.026	0.38	11
-0.17	-0.17	0	4	Golab-e- Kohanz	0.001	0.001	0	4	Red Spur	0.031	0.39	12
-0.33	-0.33	0	4	Golab-e- Kohanz	0.43	0.43	0	4	Red Spur	0.019	0.34	13
-0.17	-0.17	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.034	0.35	14
0.24	0.24	0	4	Golab-e- Kohanz	0.66	0.66	0	4	Red Spur	0.001	0.23	15
0.013	0.013	0	4	Golab-e-Kohanz	0.55	0.55	0	4	Red Spur	0.011	0.26	16
0.054	0.054	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.23	-0.23	0	4	Red Spur	0.034	0.35	17
-0.85	-0.85	0	4	Golab-e-Kohanz	0.35	0.35	0	4	Red Spur	0.033	0.42	18

Table 5 continued .

ادامه جدول ۵.

-0.45	-0.45	0	4	Golab-e-Kohanz	0.79	0.79	0	4	Red Spur	0.016	0.32	19
-0.17	-0.17	0	4	Golab-e-Kohanz	-0.11	-0.11	0	4	Red Spur	0.034	0.35	20
0.98	0.98	0	4	Golab-e- Kohanz	-0.78	-0.78	0	4	Red Spur	0.018	0.34	21
-0.72	-0.72	0	4	Golab-e-Kohanz	0.35	0.35	0	4	Red Spur	0.030	0.41	22
-0.33	-0.33	0	4	Golab-e-Kohanz	0.91	0.91	0	4	Red Spur	0.013	0.29	23
-0.72	-0.72	0	4	Golab-e- Kohanz	0.79	0.79	0	4	Red Spur	0.021	0.35	24
0.74	0.74	0	4	Golab-e-Kohanz	-0.66	-0.66	0	4	Red Spur	0.020	0.35	25
5.3	5.3	0	4	Granny Smith	1	0.92	0	4	Red Spur	0.004	0.11	26
-30.9	-30.9	0	4	Golab-e-Kohanz	0.93	0.93	0	4	Red Spur	0.038	0.39	27
0.59	0.59	0	4	Golab-e-Kohanz	-0.78	-0.78	0	4	Red Spur	0.025	0.39	28
0.59	0.59	0	4	Golab-e-Kohanz	-0.35	-0.35	0	4	Red Spur	0.018	0.33	29
0.068	0.068	0	4	Golab-e-Kohanz	0.31	0.31	0	4	Red Spur	0.019	0.27	30

Archive of SID

## بحث

روش حذفی تعیین والدین از ساده ترین و آسان ترین روش های مورد استفاده برای تعیین روابط والدین و نتاج می باشد. با توجه به الگوهای باندی نتاج و آلل هایی که این نتاج از والدین به ارث برده اند و با توجه به اینکه مکان های SSR طبق نسبت های مندلی از والدین به نتاج منتقل می شوند (۲۱)، می توان انتظار داشت که والدین احتمالی به طور یقین در مجموع دارای آلل هایی باشند که نتاج حاصل از تلاقی این والدین، آن ها را به ارث برده اند. ارزیابی روابط والدین و نتاج حاصل از تلاقی یا شناسایی نتاج ناخواسته، بر اساس مقایسه آلل های مادری و پدیری و آلل های نتاج F1 صورت می گیرد (۷). در این پژوهش به خاطر این که هیچ کدام از نتاج آلل های ۲۰۵ جفت بازی مکان CH03d07 و آلل ۲۲۷ جفت بازی مکان CH02g01 موجود در 'گرانی اسمیت' و 'شفیع آبادی' را دریافت نکرده بودند، این والدین نمی توانستند والدین واقعی نتاج مورد نظر باشند و بنابراین حذف شدند. از طرف دیگر وجود آلل ۲۴۵ جفت بازی موجود در برخی نتاج بر این مسئله تاکید می کند که یکی از والدین دارای این آلل باشد. با توجه به اینکه این آلل فقط در رقم 'رد اسپار' مشاهده شد، نتیجه گیری شد که این رقم یکی از والدین نتاج مورد مطالعه می باشد. داده های مربوط به مکان CH02g01 نشان داد که اگر رقم 'گلدن اسموتی' والد دوم فرض شود، طبق قوانین مندلی در نتاج مورد مطالعه باید حالت آلی ۲۶۰:۲۶۰ وجود داشته باشد که چنین حالتی مشاهده نشد. بنابراین رقم های 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' می توانستند والدین تلاقی باشند که انجام دوباره آزمایش در این مکان و تکرار نتایج به دست آمده، احتمال وجود خطای آزمایشی را حذف نمود.

با توجه به این که احتمال خطا در روش حذفی به علت های مختلف مانند اشتباه آزمایشی، یادداشت برداری های نادرست و یا خطای آنزیم و غیره وجود دارد (۹)، روابط نتاج و والدین توسط نرم افزار Cervus نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج به دست آمده از ارزیابی روابط نتاج و والدین به روش انتساب والدین بر مبنای درست نمایی، نتایج روش حذفی تعیین والدین را تایید کرد. مراحل تجزیه داده ها توسط این نرم افزار که با فرض استقلال خطاها از یکدیگر، عدم وجود پیوستگی در مکان ها و دوگان بودن افراد انجام گرفت، وجود چند شکلی و هتروزیگوسی قابل قبولی را برای تجزیه والدینی نشان داد. تجزیه والدینی به روش انتساب والدین بر مبنای درست نمایی، توانست والدین تمامی نتاج را مشخص کرده و کارایی این نرم افزار را در تجزیه داده های حاصل از مکان های ریزماهواره در تعیین والدین نتاج را مشخص کند. با این حال، به خاطر این که این روش نیازمند داشتن تعداد کل والدین کاندید در جمعیت می باشد، باید دقت کافی در تجزیه داده ها صورت گیرد (۱۷). نتایج به دست آمده از مقایسه آلل های والدین و نتاج در چندین مکان ریزماهواره مورد مطالعه در این پژوهش نشان داد که مارکرهای مولکولی ریزماهواره همان طور که در نتایج یاماموتو و همکاران (۲۷)، کیمورا و همکاران (۱۰) و بیسوگنین و همکاران (۴) به دست آمده بود، می توانند به طور موفقیت آمیزی برای تعیین روابط والدین و نتاج و تعیین سطح پلوئیدی دانهال های حاصل در مراحل اولیه رشد دانهال ها مورد استفاده قرار گیرند. نتایج مشابهی نیز در مطالعات بیسوگنین و همکاران (۴) روی دانهال های سیب به دست آمد.

نتایج آزمون کای اسکور نیز نشان داد که بین نسبت فراوانی آلل های موجود در نتاج که از والدین 'رد اسپار' و 'گلاب کهنز' به ارث برده بودند و نسبت های مورد انتظار تفاوت معنی داری وجود نداشت. عدم معنی داری این آزمون توارث آلل های مکان های SSR بر طبق قوانین مندلی را اثبات می کند. نتایج به دست آمده از آزمون کای اسکور نتایج سایر پژوهشگران (۱، ۲۵) مبنی بر تبعیت توارث آلل های مکان های SSR با

نسبت های مندلی را تایید می کند که نشان دهنده دقت بالای مکان های SSR در بررسی روابط والدین و نتاج می باشد.

همان طور که در بخش نتایج اشاره شد از ۳۰ نتاج مورد بررسی، تنها یک مورد حاصل از تلاقی ناخواسته بود. نتایج حاصل از این پژوهش توانست نتاج حاصل از تلاقی ناخواسته را از سایر نتاج جدا کند. در پژوهش حاضر ارزیابی روابط والدین و نتاج در روش حذفی تعیین والدین با استفاده از دو مکان ریزماهوره و روابط والدین و نتاج به روش انتساب والدین بر اساس درست نمایی و ارزیابی نتاج با استفاده از ۴ مکان ریزماهوره امکان پذیر گردید. نتایج پژوهش حاضر کارایی نشانگرهای ریزماهوره و قدرت تفکیک آن ها را در تفکیک رقم ها و تعیین خلوص نتاج نشان داد که مطابق با نتایج یاماموتو و همکاران (۲۷) و سالگادو و همکاران (۲۰) می باشد. وجود نتاج حاصل از گرده افشانی ناخواسته در بین نتاج مورد مطالعه، بر این مسئله تاکید کرد که انجام تلاقی های کنترل شده اطمینان صد در صدی به صحیح بودن نتاج دورگه را تضمین نمی کند که این مسئله می تواند به دلیل وجود خطا هنگام تلاقی یا گرده افشانی های ناخواسته بعد یا قبل از تلاقی باشد (۷). نتایج به دست آمده لزوم انجام چنین آزمایش هایی روی نتاج و والدین تلاقی ها حتی در مورد تلاقی های کنترل شده را نشان می دهد.

نتیجه دیگری که این پژوهش به همراه داشت، عدم تفاوت بین الگوی آلی درختان مختلف مورد استفاده از یک رقم به عنوان والد پدری و یا والد مادری در مکان های مورد مطالعه بود که نشان دهنده تکثیر رویشی و همگروه بودن درختان هر یک از این رقم ها می باشد.

### نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر ۴ جفت نشانگر ریز ماهوره به طور کامل توانستند والدین واقعی نتاج مورد نظر را شناسایی و جدا کنند. تنها نتاج تلاقی ناخواسته در بررسی جدا شده و والد پدری و مادری آن مشخص گردید که نشان دهنده توان و قدرت بالای نشانگرهای ریز ماهوره در تفکیک رقم ها و شناسایی والدین و نتاج می باشد. چنین آزمایش هایی می تواند در برنامه های اصلاحی جهت اطمینان از تلاقی های انجام شده قبل از هر گونه ارزیابی مورفولوژیکی و مولکولی، برای تعیین درستی تلاقی ها و حذف نتاج ناخواسته انجام گیرد. با این که در پژوهش حاضر بین درختان مورد استفاده برای هر رقم تفاوتی مشاهده نشد با این حال بهتر است که در برنامه های اصلاحی جهت اجتناب از هر گونه مشکل در برنامه های آینده در حد امکان از تک درخت والد مادری و پدری برای انجام تلاقی ها استفاده شود.

### REFERENCES

### منابع

۱. فتاحی مقدم، م. ر. ذ. زمانی، ع. عبادی، ب. قره یاضی و ش. ا. ملنباکر، ۱۳۸۱. توارث آلل های مکان های ژنی ریزماهوره (میکروساتلات) در جمعیت حاصل از تلاقی انگور رقم های بیدانه قرمز در موسکات هامبورگ. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۵۰-۳۷: ۳.
۲. نقوی، م. ر. ب. قره یاضی و ق. حسینی سالکده، ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۴ص.
- 3- Banno, K., Y. Hirano and H. Ishikawa. 2000. Some molecular markers to identify the parenthood of pear Oharabeni. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69:289-293.

4. Bisognin, C., E. Semuller, S. Citterio, R. Velasco, M.S. Grando and W. Jarausch. 2009. Use of SSR markers to assess sexual vs. apomictic origin and ploidy level of breeding progeny derived from crosses of apple proliferation-resistant *Malus sieboldii* and its hybrids with *Malus × domestica* cultivars. *Plant Breed.* 128:507-513.
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. Goulao, L., L. Cabrita and C.M. Oliveira. 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122:81-89.
7. Gumez, S.M., N.N. Denwar, T.R. Bramanian, C.E. Simpson, G. Burow, J.J. Burke, N. Puppala and M.D. Burom. 2008. Identification of peanut hybrid using microsatellite markers and horizontal polyacrylamide gel electrophoresis. *Peanut Sci.* 35:123-129.
8. 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.
9. Kalinowski, S., M. Taper and T. Marshal. 2007. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16:1099-1106.
10. Kimura, T., Y. Sawamura, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto. 2003. Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72:182-189.
11. Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement. *Biotechnol. Adv.* 17:143-183.
12. Liebhard, R., B. Koller, A. Patocchi, M. Kellerhals, W. Pfammater, M. Jermini and C. Gessler. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a Fiesta×Discovery progeny. *Phytopathology* 93:493-501.
13. Liebhard, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R.E. Tarchini, van de Weg, C. Gessler. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10:217-241.
14. Machida, Y., Y. Sato, T. Kozaki and K. Seike. 1982. S genotype of several cultivars of Japanese pear and doubts about the parents of Housui. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 5:58-59.
15. Mohller, V. and G. Schwarz. 2005. Biotechnology in agriculture and forestry. In: Lorz, H. and G. Wenzel, (eds.). *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphism to Single Nucleotide Polymorphism.* Springer-Verlage, Berlin. 478 p.
16. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
17. Nielsen, R., D.K. Mattila, P.J. Clapham, and P.J. Palsboll. 2001. Statistical approaches to paternity analysis in natural populations to the Northern Atlantic humpback whale. *Genetics* 157:1673-1682.
18. Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. In: Johri, B.M. (ed.). *Embryology of Angiosperms*, Springer-Verlag, Berlin. 475-518.
19. Rajapakse, S., L.E. Belthoff, G.H. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet and A.G. Abbott. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:503-510.
20. Salgado, K.C., M.G. Vieira, E.V. Pinho, C.T. Guimaraes, R.G. Pinho, and L.V. Souza. 2006. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. *Revista Brasileira de Sementes.* 28:169-175.
21. Sefc, K.M., M.S. Lopes, F. Lefort, R. Roubelakis, K.A. Anglakis, J. Ibanez, I. Pejic, H.W. Wagner, J. Glossl, and H. Steinkellner. 2001. 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.
22. Silfverberg-Dilworth, E., C.L. Matasci, W.E. Van de Weg, M.P. Van Kaauwen, M. Walser, L.P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C.E. Durel and F. Costa. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet. Geno.* 2:202-224.
23. Tartarini, S. 2003. Marker-assisted selection in pome fruit breeding. *Eucarpia Symposium in Fruit Breeding and Genetics*, 1-5 Sept., Angres, France.
24. Teramoto, S., Y. Kano- Murakami, M. Hori and K. Kamiyama. 1994. DNA finger printing to distinguish cultivars and parentage relation of Japanese pear. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63:17-21.
25. Testolin, R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Werde, M.T. Dettori, M. Pancaaldi and S. Sansavini. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genomic origin of cultivars. *Genome* 43:512-520.
26. Vinatzer B.A., A. Patocchi, S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance. *Plant Breed.* 123:321-326.
27. Yamamoto, T., K. Mochida, T. Imai, T. Haji, H. Ideaki, M. Yamaguchi, N. Matsuta, I. Ogiwara and T. Hayashi. 2003. Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers. *Breed. Sci.* 53:35-40.

Archive of SID



## PARENTAGE ANALYSIS IN THE PROGENY OF TWO APPLE CULTIVARS USING MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS

A. FAROKHZAD, Z. ZAMANI, M.R. FATAHI, A. TALAEI AND M. MARDI<sup>1</sup>

In order to analysis the parentage of offsprings from a controlled crosses, recognizing seedlings from unwanted pollination and evaluation of homogeneity of the analyzed trees, 30 seedlings of the cross ('Red Spur' × 'Golab-e-Kohanz') and the cultivars 'Red Spur', 'Golden Smoothee', 'Gerany smith', 'Golab-e-Kohanz' and 'Shafi Abadi' as probable parents were evaluated with microsatellite markers. From 13 pair of microsatellite primers, CH01d018, CH03d07, CH02g01 and Col pair primers could separate actual parents of these offsprings from the other cultivars using exclusion method and likelihood based assignment method. Allele distribution among the offsprings determined their codominant mode of inheritance and no significant differences with Mendelian codominant ratio were observed using chi-square test. The results of this experiment could recognize a progeny from an unwanted cross. In each parent cultivar, between several trees used as plant materials no difference was observed using microsatellite analysis.

**Key words:** Apple, Controlled pollination, Microstellite primers, Unwanted pollination.

---

1. Ph.D. Student, Associate Professors (zzamani@ut.ac.ir), Professor. Department of Horticultural Science, University of Tehran, Karaj, Assistant Researcher, Seed and Plant Improvement Institute, Biotechnology Section, Karaj, I.R., Iran, respectively.