

استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و تنوع بالادستی فاکتور رونویسی MYB10 در مطالعه تنوع ژنتیکی سیب‌های گوشت قرمز در ایران

Analysis of genetic variation among red flesh apple genotypes using microsatellite markers and polymorphism of MYB10 gene

ابراهیم محمودی^{۱*}، عباس یداللهی^۱، بهرام محمدسلطانی^۱، لیلا دهاغین^۱، شاداب فرامرزی^۱

۱- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیاران و کارشناسان ارشد دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Mahmoudi E^{*1}, Yadollahi A¹, Mohammad Soltani B¹, Dahaghin L¹, Faramarzi S¹

1. Graduate Student, Assistant Professors, Graduated Students, Tarbiat Modares University, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eb.mahmoudi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

سیب‌های گوشت قرمز از نژادگان‌های سیب ایرانی هستند که حاوی مقادیر بالای آنتوسیانین در کورتکس و گوشت می‌باشد که موجب ایجاد رنگ قرمز درون میوه شده است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌های گوشت قرمز بومی، تعداد ۲۰ ژنوتیپ گوشت قرمز و سفید انتخاب شد و با استفاده از ۱۱ جفت آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این میان ۷ جفت آغازگر چندشکلی مناسبی بین کل ژنوتیپ‌ها نشان دادند و در مجموع ۵۶ آلل را شناسایی کردند. تعداد آلل در هر مکان ژنی بین ۳ تا ۱۱ متغیر و با میانگین ۸ بود. میانگین تعداد آلل موثر مقدار ۵/۷۴ برآورد شد. همچنین هتروزیکوسیتی قابل مشاهده ۰/۶ و هتروزیکوسیتی قابل انتظار ۰/۷۷ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس به عنوان معیار مقایسه و روش UPGMA انجام گرفت که کل ژنوتیپ‌ها به هفت گروه تقسیم شدند. بر اساس دندروگرام، ارتباطی میان گروه‌بندی و منشأ جغرافیایی مشاهده نشد و بنابراین ژنوتیپ‌های مربوط به مناطق یکسان در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند. از آنجا که عامل رنگ قرمز گوشت در سیب فاکتور رونویسی MYB10 می‌باشد لذا به منظور بررسی پلی‌مورفیسم احتمالی این ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ناحیه بالا دست ژن جداسازی و تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که یک ناحیه تکراری شامل پنج تکرار در ژنوتیپ‌های گوشت قرمز وجود دارد که در ژنوتیپ‌های سفید موجود نیست. با توجه به خودناسازگاری سیب به نظر می‌رسد که تلافی ژنوتیپ‌های گوشت قرمز هتروزیکوت (حامل ژن *MdMYB10*) با ژنوتیپ‌های گوشت سفید منجر به تولید ارقام سفید و قرمز نزدیک (از لحاظ ژنتیکی) شده است.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
سیب گوشت قرمز
نشانگر ریزماهواره
DNA
MYB10

مقدمه

سیب گوشت قرمز یکی از نژادگان سیب ایرانی است که دارای مقادیر متفاوتی از آنتوسیانین (کم تا زیاد) در کورتکس میوه می-باشد و همین امر سبب تمایز آن از سیب معمولی و ایجاد ظاهر جذاب شده است (Faramarzi 2011). آنتوسیانین دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه است که موجب رنگدگی در گیاهان می‌شود. آنتوسیانین در جلوگیری از جلوگیری از بیماری‌های قلبی، سرطان و دیابت نقش دارد (Konczak et al. 2004). تنظیم ژن‌های مسیر آنتوسیانین توسط فاکتورهای رونویسی MYB صورت می‌گیرد. ژن‌های MYB در بسیاری از گیاهان شناسایی و تعیین هویت شده‌اند (Allan et al. 2008). در سیب ژن‌های *MdMYB1* و *MdMYB10* به ترتیب مسئول رنگ قرمز در پوست و گوشت میوه می‌باشند (Ban et al. 2007; Espley et al. 2007). این ژن‌ها در انتهای کروموزوم ۹ سیب قرار دارند (Chagne et al. 2007) و با افزایش سطح رونویسی آنها، میزان آنتوسیانین نیز افزایش می‌یابد (Ban et al. 2007; Espley et al. 2007).

نشانگرهای ریزماهوره یک توالی تکراری DNA می‌باشد که عموماً شامل واحد ۶-۱ نوکلئوتیدی است. به علت توانایی بالای این نشانگرها در نشان دادن پلی‌مورفیسم، توارث همباز و فراوانی نسبی در ژنوم از آنها برای مطالعات رده‌بندی، بررسی تنوع ژنتیکی و ترکیب نقشه‌های لینکاژی گونه‌های مختلف استفاده می‌شود. بررسی‌های زیادی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بمنظور بررسی ژنتیکی سیب انجام شده است. نشانگرهای SSR در مطالعات ژنتیکی و انگشت نگاری گونه‌های درختان میوه دانه دار مانند سیب و گلابی نسبت به سایر نشانگرها کاربرد وسیع‌تری دارند (Gianfranceschi et al. 1998). در بررسی دیگری ۱۴۲ رقم از ۲۳ گونه سیب با ۸ نشانگر SSR سطح بالای تنوع با متوسط ۲۶/۴ الل در هر مکان ژنی گزارش شد (Hokanson et al. 1998). در مطالعه دیگر ۶۶ رقم سیب تجاری از ۶ آغازگر SSR استفاده شد که ۵۵ الل با میانگین الل ۹/۲ در هر مکان ژنی شناسایی شد (Gábor et al. 2005). در یک پژوهش ۳۵۰ رقم از اروپا توسط ۸۰ نشانگر ریزماهوره مورد بررسی قرار گرفت و بیان داشت اهمیت این نشانگرها در ارزیابی ژنوم سیب احتمالاً به پراکنش مناسب آنها در سطح ژنوم مرتبط

است (Silfverberg-Dilworth et al. 2006). همچنین به کمک این نشانگرها پراکنش ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های مختلف سیب ارزیابی شده است (Gianfranceschi et al. 1998; Hokanson et al. 1998). علاوه بر این با استفاده از ریزماهوره‌ها مطالعات تکاملی در مورد منشا سیب صورت گرفته است (Harris et al. 2002). با بهره‌گیری از نشانگرهای ریز ماهوره و ISSR، انگشت نگاری و تعیین درجه شباهت بین ۴۱ رقم تجاری سیب انجام شد و نتیجه‌گیری شد که SSR و ISSR، برای شناسایی ارقام و ارزیابی روابط ژنتیکی سودمندتر از دیگر روش‌های مبتنی بر PCR هستند (Goulao et al. 2001). در ایران نیز تاکنون چندین مطالعه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره صورت گرفته است. تنوع ژنتیکی ۳۳ رقم و ژنوتیپ سیب ایرانی با چهار نشانگر ریزماهوره بررسی و به ده گروه طبقه‌بندی شد که گروه‌ها بر اساس منشا جغرافیایی و یا خصوصیات میوه نتایج منطقی داشتند (Ershadi 2002). همچنین انگشت‌نگاری و بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب گلاب ایران انجام شد که تنوع ژنتیکی کمی بین سیب‌های گلاب گزارش شد (Nagshin et al. 2008). در مطالعه دیگر، منشا و تکامل سیب و همچنین روابط ژنتیکی ۱۵۹ رقم داخلی و خارجی بررسی شد و نتایج گروه‌بندی منطقی ارزیابی شد (Gharghani et al. 2009). همچنین تنوع ژنتیکی ۴۴ رقم سیب از مناطق مختلف ایران به کمک ۱۶ جفت نشانگر ریزماهوره ارزیابی شد که در این بررسی ۴۵ الل شناسایی شناسایی و جمعیت مورد مطالعه خارج از تعادل هاردی-واینبرگ گزارش شد (Farrokhi et al. 2012). در یک پژوهش کارایی نشانگر ملکولی ریزماهوره (SSR) در شناسایی ۲۴ ژنوتیپ و ۵ پایه بومی و خارجی سیب مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بیانگر کارایی بالای نشانگر ریزماهوره در شناسایی ارقام و پایه های سیب بود (Gahromee et al. 2009).

مواد و روش‌ها

جمع آوری مواد گیاهی

در اردیبهشت ۱۳۸۸ عملیات نمونه‌گیری از درختان سیب صورت گرفت. تعداد ۲۰ رقم گوشت قرمز و سفید مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱) که ۱۷ رقم از کلکسیون درختان میوه کمال آباد

جدول ۱- اسامی ارقام و ژنوتیپ‌های سیب مورد استفاده در این پژوهش

ژنوتیپ‌های گوشت قرمز (همگی پوست قرمز)			
ژنوتیپ	منشا	ژنوتیپ	منشا
حاجی قرمز	تهران	B.9	روسیه
گوشت قرمز	تهران	قزوین-۱	قزوین
شاهرود ۱۰	شاهرود	قزوین-۲	قزوین
عروس گوشت قرمز	تهران	قزوین-۳	قزوین
ارقام ایرانی			
رقم	منشا	رقم	منشا
شفیعی	ناشناخته	گلاب صحنه	کرمانشاه
گلاب کهنز	شهریار	حیدر زاده	مشهد
سلطانی شبستر	آذربایجان	شفیع آبادی	کرج
ارقام خارجی			
رقم	منشا	رقم	منشا
جانانان	نیویورک-آمریکا	فوجی	ژاپن
گلدن دلشز	ویرجینیا-آمریکا	رد دلشز	آمریکا
گرانی اسمیت	استرالیا	گالا	نیوزیلند

۹۵°C به مدت ۳ دقیقه آغاز شد و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعات در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه ادامه یافت. در انتها یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دمای ۴°C نگهداری شدند. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد صورت گرفت و سپس رنگ آمیزی با نیترا ت نقره انجام شد. هر باند SSR نشان دهنده یک آل است که به صورت صفر (نبود باند) و یک (وجود باند) نمره‌دهی شدند. پارامترهای مربوط به جمعیت شامل تعداد آل مشاهده شده و موثر، هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار توسط نرم افزار POPGEN v1.32 اندازه‌گیری شد. برای رسم دندروگرام از نرم‌افزار NTSYS V2.02 و بر اساس ضریب دایس و الگوریتم UPGMA استفاده شد.

وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و سه ژنوتیپ از قزوین انتخاب شد. انتخاب ارقام براساس ویژگی‌های مناسب مورد نظر آنها برای این تحقیق صورت گرفت. برگ‌های جوان سرشاخه‌ها انتخاب و بلافاصله در ازت مایع منجمد شد و در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی نشانگرهای ریزماهواری در این تحقیق از ۷ آغازگر ریزماهواری معرفی شده سیب که تعدادی از آنها برای بررسی لینکاژ با رنگ قرمز معرفی شده بودند و میزان چندشکلی بالایی نشان دادند، استفاده شد (جدول ۲) (et al. 2007, Chagne). استخراج DNA ژنومی به روش دوپل و دوپل صورت گرفت (Doyle and Doyle 1987). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر هر یک از ۷ نشانگر ریزماهواری سیب در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر ۱۰x dNTPs (۱۰ میلی مولار)، MgCl₂ (۴۰ میلی‌مولار)، آغازگر (۵ میکرومولار) و ۰/۱ واحد از آنزیم تک پلیمرز (سینازن) انجام شد. برنامه تکثیر ریزماهواریها به صورت یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای

جدول ۲- تعداد و توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق.

منبع	نام آغازگر	توالی آغازگر (۵' - ۳')
(Espley et al. 2009)	MdBHLH3	F: CAACTCCCCTTATTCTTCTTCTCTC R: CACCTGACCTTCTCTCTACCTCTAC
(Espley et al. 2009)	MdMYB12	F: CTCGGCAATCGGTAAAGCTA R: TATGAACAGTGAAACCCTAACCCCT
(Espley et al. 2009)	NZmsPa18	F: GGCACAAGCACAAGGAAACA R: GTTTGAGCCAGTCCATTTTTCCCTAT
(Espley et al. 2009)	NZmsPa113	F: TCGATGAACAAGGCCCAAAG R: GTTTAGGGGGACGGAAGGAACAAG
(Espley et al. 2009)	NZmsPa136	F: CCTCAACAAATATAAGACTCTCTC R: GTTCTCCACTCTGTCCGTACATT
(Espley et al. 2009)	NZmsPa145	F: AAAACCCAACACCACAGC R: GCTTCTTTGGATTCTGGATG
(Espley et al. 2009)	NZmsPa1213rd	F: CAACCTTTCTCTCATTCACTC R: GTTTCCTTTTATGTACCGGCTT

ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشته باشند و در مجموع ۵۶ آلل را شناسایی کردند (شکل ۱). در جدول ۳ اطلاعات مربوط به چندشکلی آلل‌ها نشان داده شده است. بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۱ عدد و مربوط به آغازگرهای NZmsPa113 و MdBHLH3 و کمترین تعداد آلل مشاهده شده ۳ عدد و مربوط به آغازگر NZmsPa145 بود. میانگین تعداد آلل مشاهده شده، ۸ آلل در هر مکان ژنی بود که با تحقیقات قبلی شامل ۴/۵ آلل در هر مکان ژنی در ۲۱ رقم سیب (Guilford et al. 1997)، ۸/۲ آلل در هر مکان ژنی در ۱۹ رقم سیب با استفاده از ۱۶ آغازگر SSR (Hokanson et al. 1998)، ۶/۵ آلل در هر مکان ژنی در ۴۱ ژنوتیپ سیب با استفاده از ۱۳ آغازگر SSR (Harris et al. 2002)، ۹/۲ آلل در هر مکان ژنی در ۶۶ رقم سیب با استفاده از ۶ آغازگر (Galli et al. 2005)، ۱۰/۹ آلل در هر مکان ژنی در ۴۴ ژنوتیپ سیب با استفاده از ۹ آغازگر SSR (Cavanna et al. 2008) و ۱۴/۷ آلل در هر مکان ژنی در ۹۴۹ کولتیوار سیب با استفاده از ۷ آغازگر SSR مطابقت داشت (Richards et al. 2009). بیشترین تعداد آلل موثر، ۱۰/۲۵ برای آغازگر MdBHLH3 و کمترین تعداد آلل موثر ۲/۰۶ برای آغازگر NZmsPa145 بود و میانگین تعداد آلل موثر ۵/۷۴ در هر مکان ژنی محاسبه شد (جدول ۳).

بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با یک برای آغازگر

تکثیر ناحیه تکراری ژن *MdMYB10b*

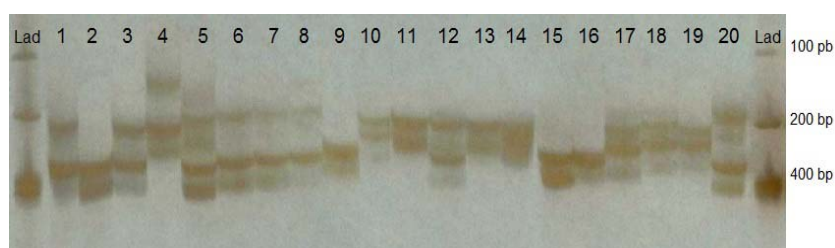
مقدار ۱۲۰ ng از DNA ژنومی برای واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ناحیه تکراری ژن *MdMYB10b* (شماره دسترسی AB592747.1) از یک جفت آغازگر اختصاصی (۵'-F; AGCAGCGAAAGCATGATAAAGGTATCT و 5'-R; AAGGCCAGTGACGTGCATGTCTG) واقع در دو طرف توالی تکراری استفاده شد. مخلوط PCR مطابق با مقادیر ذکر شده برای نشانگر ریزماهواره بود. واکنش PCR با دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه آغاز و در ۳۵ چرخه (۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه) انجام شد و در نهایت در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و با اتیدیوم بروماید رنگ-آمیزی شد. در نهایت مورد توالی‌یابی قرار گرفت. بررسی تنوع ناحیه تکراری در تمامی ژنوتیپ‌های گوشت قرمز و سفید انجام شد.

نتایج و بحث

به منظور بررسی میزان خویشاوندی ژنوتیپ‌های سبب قرمز بومی با برخی از ارقام تجاری گوشت سفید داخلی و خارجی، ۲۰ ژنوتیپ انتخاب و با استفاده از ۷ جفت آغازگر SSR مورد ارزیابی قرار گرفت. این آغازگرها توانستند تکثیر خوبی در همه

جدول ۳- پارامترهای چندشکلی مربوط به هر یک از آغازگرهای ریزماهواری مورد استفاده در این پژوهش

نام آغازگر	تعداد ال	تعداد ال موثر	ضریب شانون	هتروزیگوسیتی قابل مشاهده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
MdBHLH3	۱۱	۱۰/۲۵	۲/۳۵	۰/۵۵	۰/۹۲
MdMYB12	۵	۲/۱۲	۱/۰۳	۰/۲۵	۰/۵۴
NZmsPa18	۸	۶/۱۰	۰/۹۲	۰/۹۰	۰/۸۵
NZmsPa113	۱۱	۷/۵۴	۲/۱۵	۰/۷۵	۰/۸۸
NZmsPa136	۸	۵/۴۴	۱/۸۴	۰/۳۰	۰/۸۳
NZmsPa145	۳	۲/۰۶	۰/۸۸	۰/۴۵	۰/۵۲
NZmsPa1213rd	۱۰	۶/۶۶	۲/۰۷	۱/۰۰	۰/۸۷
میانگین	۸	۵/۷۴	۱/۷۵	۰/۶	۰/۷۷



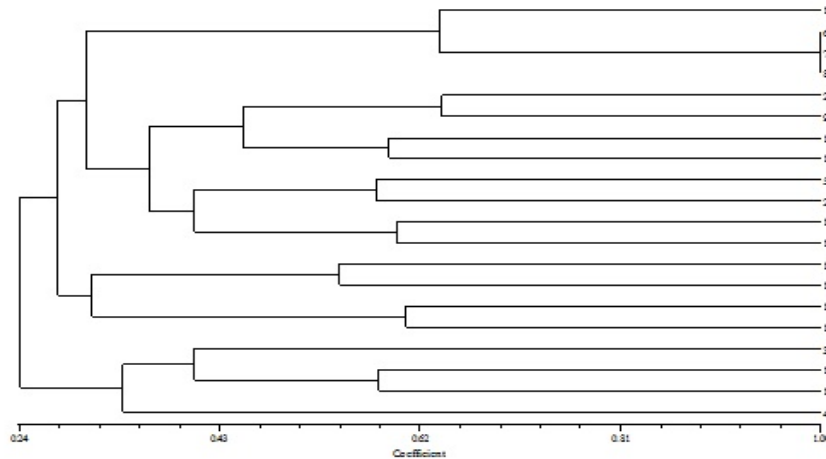
شکل ۱- آغازگر MdBHLH3 با ۱۱ ال- ژنوتیپ‌ها بترتیب شامل (۱ حاجی قرمز؛ ۲ گوشت قرمز؛ ۳ شاهرود-۱۰؛ ۴ عروس گوشت قرمز؛ ۵ B.9؛ ۶ قزوین-۱؛ ۷ قزوین-۲؛ ۸ قزوین-۳؛ ۹ شفیع؛ ۱۰ گلاب کهنز؛ ۱۱ جانانان؛ ۱۲ گلدن دلشز؛ ۱۳ گرانی اسمیت؛ ۱۴ سلطانی شستر؛ ۱۵ فوجی؛ ۱۶ رد دلشز؛ ۱۷ حیدرزاده؛ ۱۸ گلاب صحنه؛ ۱۹ گالا؛ ۲۰ شفیع آبادی. چاهک اول و آخر مربوط به ladder است که سه باند ۱۰۰ bp، ۲۰۰ bp و ۴۰۰ bp مشخص است.

ژنوتیپ‌های قزوین یکسان بود. به نظر می‌رسد که هر سه از طریق تکثیر رویشی ازدیاد یافته‌اند به همین علت تفاوت ژنتیکی نشان ندادند. در گروه دوم، گوشت قرمز، شفیع، گلدن دلشز و گالا قرار گرفت که گوشت قرمز و شفیع جز ارقام ایرانی و گلدن دلشز و گالا جز ارقام خارجی هستند که موید تکثیر این ژنوتیپ-ها از طریق رویشی می‌باشد. در گروه سوم یک ژنوتیپ گوشت قرمز B.9 و سه ژنوتیپ گوشت سفید شفیع آبادی، جانانان و گرانی اسمیت قرار دارد. از آنجا که نواحی ژنومی حاوی ریزماهواری‌ها غالباً کنترل کننده صفات نمی‌باشند به این مفهوم که در نواحی کدکننده ژنوم قرار ندارند و نیز تعداد معدودی از آنها در این تحقیق استفاده شد، آغازگرهای فوق نتوانستند در تفکیک صفت قرمزی گوشت میوه سیب موثر واقع شوند. دو ژنوتیپ بومی گوشت سفید شامل گلاب صحنه و گلاب کهنز نیز در یک گروه قرار گرفتند که از لحاظ مورفولوژیکی نیز به یکدیگر شبیه هستند. در گروه پنجم، فوجی و رد دلشز قرار گرفتند که به خاطر والد بودن رد دلشز برای فوجی، منطقی به نظر می‌رسد (سیب

NZmsPa1213 و کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۲۵ برای آغازگر MdMYB12 و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۶ بود (جدول ۳). بیشترین هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۹۲ برای آغازگر MdBHLH3 و کمترین هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۵۲ برای آغازگر NZmsPa145 و میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۷۷ بود. بیشترین مقدار شاخص شانون برابر با ۲/۳۵ و مربوط به آغازگر MdBHLH3، کمترین مقدار برابر با ۰/۸۸ و مربوط به آغازگر NZmsPa145 و میانگین آن برابر با ۱/۷۵ بود (جدول ۳).

تجزیه خوشه‌ای بین افراد با استفاده از ضریب تشابه دایس به عنوان معیار مقایسه و روش UPGMA انجام گرفت و نتایج حاصل به صورت دندروگرام (شکل ۲) ترسیم شد. بر اساس دندروگرام ترسیم شده، ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در ۷ گروه به ترتیب زیر قرار گرفتند.

گروه اول شامل حاجی قرمز، قزوین-۱، قزوین-۲ و قزوین-۳ بود. خصوصیات مورفولوژیک درخت و میوه و نیز منشا جغرافیایی



شکل ۲- دندروگرام ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس الگوهای باندهای SSR با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA. ژنوتیپ‌ها شامل (۱ حاجی قرمز؛ ۲) گوشت قرمز؛ ۳) شاهرود-۱۰؛ ۴) عروس گوشت قرمز؛ ۵) B.9، ۶) قزوین-۱؛ ۷) قزوین-۲؛ ۸) قزوین-۳؛ ۹) شفيعی؛ ۱۰) گلاب کهنز؛ ۱۱) جانانان؛ ۱۲) گلدن دلپزش؛ ۱۳) گرانی اسمیت؛ ۱۴) سلطانی شبستر؛ ۱۵) فوجی؛ ۱۶) رد دلپزش؛ ۱۷) حیدر زاده؛ ۱۸) گلاب صحنه؛ ۱۹) گالا؛ ۲۰) شفيع آبادی.

مسئول رنگ قرمز در میان ارقام مختلف از نواحی متفاوت انتقال یافته است. همچنین بر اساس دندروگرام، ارتباطی میان گروه‌بندی و منشأ جغرافیایی مشاهده نشد و بنابراین ژنوتیپ‌های مربوط به مناطق یکسان در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند (شکل ۲). مطابق با نتایج گروه‌بندی، ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و ارقام خارجی در بعضی از کلاسترها بطور مشترک قرار گرفتند (شکل ۲) که نشان داد بعضی از ارقام خارجی ارتباط خویشاوندی نزدیکی با ارقام و ژنوتیپ‌های بومی (ایرانی) دارند. همچنین بر اساس نتایج گروه‌بندی (شکل ۲)، ارتباطی میان کلاسترهای ارقام و ایرانی یا خارجی بودن سیب‌ها مشاهده نشد و بنابراین ژنوتیپ‌های مربوط به مناطق یکسان در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند.

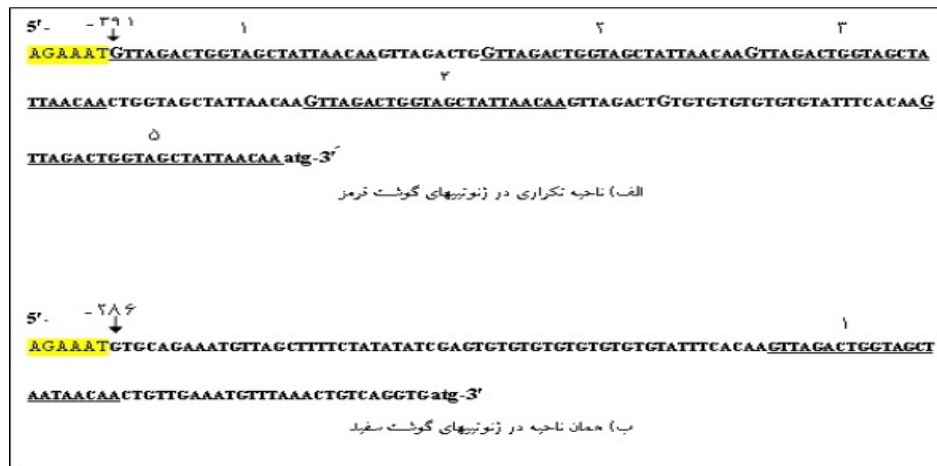
از آنجا که علت تفاوت رنگ گوشت در سیب مربوط به توالی متفاوت ناحیه راه‌انداز ژن *MYB10b* است (Espley et al. 2009) لذا جهت بررسی و یافتن هرگونه پلی‌مورفیسم بیشتر در این ناحیه در میان ژنوتیپ‌های گوشت قرمز و گوشت سفید، راه‌انداز این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ژنوتیپ‌های گوشت قرمز و گوشت سفید مورد مطالعه که مربوط به اقلیم‌های متفاوت نیز بودند (جدول ۱)، تکثیر و توالی آن مورد بررسی قرار داده شد. بدلیل اینکه اغلب ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، بومی ایران است لذا احتمال یافتن نواحی تکراری دیگر (که در گزارشات گذشته کشف نشده است) وجود داشت بنابراین هدف از این کار یافتن

فوجی یک رقم هیبریدی معرفی شده در ژاپن است که از تلاقی دو رقم آمریکایی 'Red Delicious' و 'Virginia Ralls Genet' بدست آمده است). در گروه ششم، سه ژنوتیپ بومی شاهرود-۱۰، سلطانی شبستر و حیدرزاده وجود دارد که شاهرود-۱۰ جز سیب‌های گوشت قرمز ایرانی است و در گروه آخر عروس گوشت قرمز قرار گرفت.

همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود ژنوتیپ‌های گوشت قرمز تنوع ژنتیکی بالایی را نشان می‌دهد. ارقام گوشت قرمز ایرانی در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند چرا که خصوصیات ظاهری آنها هم تا حدی متفاوت می‌باشد و این به علت وجود تنوع ژنتیکی بالا در این ارقام بود. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های قزوین و کمترین تشابه بین ژنوتیپ گوشت قرمز و عروس گوشت قرمز (۰/۰۸) بود. ژنوتیپ‌های گوشت قرمز در میان ارقام گوشت سفید گروه‌بندی شده است. با توجه به گروه‌بندی نمی‌توان میان ژنوتیپ‌های گوشت قرمز با ژنوتیپ‌های گوشت سفید تفاوت معناداری از لحاظ ژنتیکی مشاهده کرد که بر آن اساس آن دو دسته را از دو منشأ متفاوت در نظر گرفت. بنابراین با توجه به خونداسازگاری سیب می‌توان استنباط کرد که تلاقی ژنوتیپ‌های گوشت قرمز (حامل ژن *MdMYB10*) با ژنوتیپ‌های گوشت سفید منجر به تولید ارقامی شده است (اعم از گوشت سفید و گوشت قرمز) که از لحاظ ژنتیکی نزدیک است و بدین وسیله ژن

احتمالا مستقل از ناحیه تکراری است اما همچنان فنوتیپ قرمز تابع وجود ناحیه تکراری است. بنظر می‌رسد که این تنوع رنگی تابع محیط و ژن‌های دیگر باشد. تعداد و توالی یکسان واحدهای تکراری در همه ژنوتیپ‌های مورد استفاده، در کنار نتایج مطالعه (Espley et al. 2009) پیشنهاد می‌کند که احتمالا موتاسیون (بوجود آمدن توالی تکراری) در بالادست ژن *MYB10* تنها یکبار در طول تکامل صورت گرفته است. همچنین بنظر می‌رسد این موتاسیون ناگهانی در یک والد اولیه اتفاق افتاده که توسط فرایند انتخاب انتشار یافته و به نسل‌های بعدی منتقل شده و در نهایت این ارقام در سطح جهان منتشر شده‌است. بنابراین ممکن است که ارقام گوشت قرمز در نقاط مختلف جهان از یک جد مشترک تکامل یافته و این موتاسیون هیچگاه در طول تکامل تغییر نکرده است. ذکر این نکته ضروری است که در این زمینه نمی‌توان از نتایج SSR این مطالعه بهره‌گرفت زیرا از منظر تکاملی و فیلوژنی صورت نگرفته و تنها به بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها پرداخته‌است. بنابراین به سختی می‌توان در مورد موتاسیون بوجود آمده اظهار نظر قطعی کرد و نیاز به پژوهش‌های تکاملی جهت شفافیت بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

تنوع بیشتر ناحیه بالادست ژن عامل رنگ قرمز (*MYB10b*) بود. در این بررسی یک ناحیه تکراری حاوی ۵ توالی تکراری ۲۳ bp (ناحیه ۲۱۹- تا ۳۹۱- از کدون آغاز) در تمام ژنوتیپ‌های گوشت قرمز مشاهده شد در حالیکه ژنوتیپ‌های گوشت سفید فاقد این ناحیه تکراری می‌باشد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که این توالی تکراری برای ایجاد رنگ قرمز گوشت ضروری است. بعبارت دیگر فنوتیپ گوشت قرمز با توالی تکراری ارتباط دارد. با بررسی ملکولی تعدادی از ژنوتیپ‌های گوشت قرمز وجود این پنج توالی تکراری و ارتباط مستقیم این ناحیه تکراری با فنوتیپ گوشت قرمز گزارش شد (Espley et al. 2009). نتایج پژوهش حاضر نیز با مطالعه فوق مطابقت دارد. لازم به ذکر است که یک توالی میکروساتلیتی نیز در همه ژنوتیپ‌ها دیده شد که میان گوشت قرمز و سفید مشترک بود و در بخش مارکر SSR مورد بررسی قرار گرفته است (آغازگر *MdMYB12*). با توجه به تنوع شدت و الگوی رنگ قرمز در میان ژنوتیپ‌های گوشت قرمز مختلف تصور می‌شد که این تنوع رنگ، با این ناحیه تکراری ۵ تکراره ارتباط دارد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که هیچگونه تنوعی در ناحیه تکراری میان ژنوتیپ‌های قرمز از نظر توالی و تعداد تکرارهای ۲۳ تایی وجود ندارد. بنابراین تنوع رنگی گوشت میوه



شکل ۳- موقعیت و توالی ناحیه تکراری واقع در بالادست ژن *MdMYB10b*. الف) اولین واحد ۲۳ جفت بازی تکراری در ۲۲۰ bp بالادست توالی آغازی قرار دارد که در ادامه ۴ واحد تکراری دیگر نیز قرار دارد؛ ب) در ژنوتیپ گوشت سفید تنها یک واحد تکراری قرار دارد. دو توالی همپوشانی ۲۶/۷ درصدی دارند. اعداد ۱ تا ۵ نشان‌دهنده واحدهای تکراری است. ۳۹۱- و ۲۸۶- تعداد نوکلئوتیدهای بالادست کدون آغاز می‌باشد.

منابع

- Allan AC, Hallens RP, Lainge AW (2008) Myb transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science* 13: 99-102.
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Morigushi T (2007) Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiology* 48: 958-970.
- Cavanna M, Marinoni T, Beccaro G, Bounous G (2008) Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm. *Genome* 52: 839-848.
- Chagne D, Carlisle CM, Blond C, Volz R, Witworth CJ, Oraguzie NC, Crowhurst RN, Allan AC, Espley RV, Hellens RP, Gardiner S (2007) Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC Genomics* 8: 212-220.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ershadi A (2002) Genetic evaluation of 32 Iranian apple cultivars (*M × domestica*) with using SSR markers. Dissertation, Tehran University, Iran.
- Espley RV, Brendolise C, Chagne D, Kutti-Amma S, Green S, Volz R, Putteril J, Schouten HJ, Gardiner SE, Hellens RP, Allan AC (2009) Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell* 21: 168-180.
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutti-Amma S, Allan AC (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor *MdMYB10*. *Plant Journal* 49: 414 - 427.
- Faramarzi S (2011) Study of morphological traits and genetic diversity among Iranian red flesh apples using microsatellite markers. Dissertation, Tarbiat Modares University, Iran.
- Farrokhi J, Naseri L (2012) Genetic diversity survey of Iranian native apples (*malus × domestica*) genotypes using ssr markers. *Agricultural Biotechnology* 2: 27-34.
- Gábor H, Kiss E, Heszky L (2005) Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *Hortical Science Journal* 7: 40-45.
- Gahrome SR, Keshavarzi M, Naghavi MR, Damyar S, Zahraee M (2009). Molecular identification of apple cultivars/rootstocks using SSR markers. *Agricultural Biotechnology* 1: 17-26.
- Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A (2005) Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 41: 1074-1084.
- Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie NC, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner SE (2009) Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica*) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeats (SSR) marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 13:1-14.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1069-1076.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998) SSRs for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1069-1076.
- Goulao L, Oliveira CM (2001) Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R (1997) Microsatellites in *Malus domestica* (Apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 249-254.
- Harris SA, Robinson JP, Juniper BE (2002) Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18: 426-430.
- Hokanson SC, Lamboy WF, McFadden AK, McFerson JR (2001) Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118:281-294.
- Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF, McFerson JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* borkh. core subset collection TAG *Theoretical and Applied Genetics* 97: 671-683.
- Konczak I, Zhang W (2004) Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 239-240.
- Nagshin F, Bahari M, Seyyed tabatabaie BA, Hajnajari H (2008) Genetic evaluation of some Iranian apple genotypes (sibe golab) using SSR markers. *Horticulture Science and Technology Journal* 9: 69-82.
- Richards CM, Volk GM, Reilley AA, Henk AD, Lockwood DR, Reeves PA, Forsline PL (2009) Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics and Genomes* 5: 339-347.
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg WE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Koller TB, Gessler C, Patocchi A (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes* 2: 202-224.