

رابطه بین نشانگرهای ملکولی SSR با صفات مهم میوه در انگور با استفاده از آنالیز رگرسیون Stepwise

علی خدیوی^۱، زینب مشهدی^{۱*}

^۱ استاد و دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
*نویسنده مسئول: mashzeinab@gmail.com

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی نشانگر مولکولی SSR مرتبط با صفات مهم میوه در انگور از طریق آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (MRA) بود. برخی از نشانگرهای SSR با صفات مورد مطالعه میوه ارتباط و همبستگی نشان دادند. برخی از این نشانگرهای آگاهی-بخش با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند که می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپیک QTL‌های مرتبط با هم در صفات مختلف باشد. به‌عنوان مثال، برخی از نشانگرهای آگاهی‌بخش با دو صفت وزن خوشه و وزن حبه همبستگی معنی‌دار نشان دادند که بیان‌کننده همبستگی مثبت این دو صفت با همدیگر می‌باشد. همچنین، برخی از این نشانگرها رابطه رگرسیونی با تعداد خوشه‌چه در خوشه (β مثبت) و وزن حبه (β منفی) نشان دادند که بیان‌کننده همبستگی منفی این دو صفت با همدیگر می‌باشد. نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی به‌کار روند. همچنین برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر به‌خصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آن‌ها مانند نقشه لینکاژی در دسترس نیست، مفید باشد.

کلمات کلیدی: *Vitis vinifera*، صفات میوه، SSR، رابطه رگرسیونی

مقدمه

در طی سال‌های گذشته نشانگرهای ملکولی مبتنی بر DNA به‌طور گسترده‌ای برای اهداف مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sefc *et al.*, 2001). پیشرفت دائمی در بهبود و اصلاح گونه‌های گیاهی به تنوع ژنتیکی گیاهان بستگی دارد. بنابراین شناسایی و مدیریت این تنوع برای برنامه‌های اصلاحی لازم می‌باشد. علاوه، آگاهی از تنوع ژنتیکی مدیریت حفاظت از ژرم‌پلاسما گیاهی را راحت‌تر می‌نماید. اگر چه نقشه‌یابی بر پایه مکان‌های صفات کمی (Quantitative trait loci, QTL) برای ردیابی ژن‌های وابسته به این صفات مناسب می‌باشد اما این عمل وقت‌گیر و پرهزینه است (Moreno-Sanz *et al.*, 2011). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت از طریق رگرسیون مناسب به نظر می‌رسد. آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (Multiple regression analysis, MRA) بر پایه رابطه بین نشانگرهای ملکولی (به‌عنوان متغیر مستقل) و صفات ریخت‌شناسی (به‌عنوان متغیر وابسته) روش مناسبی برای شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت می‌باشد. این آنالیز ضریب تبیین (R^2) را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطه صفت ریخت‌شناسی را با نشانگر ملکولی نشان می‌دهد (Selli *et al.*, 2007).

نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده وابسته به خصوصیات میوه می‌توانند راهنمای خوبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های دارای صفات با ارزش میوه باشند. در برنامه‌های اصلاحی انتخاب مواد گیاهی با کیفیت معمولاً وقت و هزینه زیادی می‌طلبد. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی نشانگرهای SSR مرتبط با صفات مهم میوه در انگور با استفاده از آنالیز رگرسیونی چندمتغیره (MRA) بود. نتیجه این مطالعه به شناسایی ژن‌های مسوول بروز صفات مهم کمک می‌نماید که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی به‌کار رود. همچنین نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر به‌خصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آنها مانند نقشه لینکاژی در دسترس نیست، مفید باشد. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی به‌کار بروند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، تعدادی از ۱۵ انگور از مناطق مختلف استان مرکزی مورد مطالعه قرار گرفتند. در مرحله مقدماتی، مطالعات کتابخانه‌ای به‌منظور بررسی سابقه موضوع و تعیین متغیرهای تحقیق انجام شد و سپس ژنوتیپ‌ها انتخاب و نشان‌گذاری شدند. در مرحله

بعد، خصوصیات کمی و کیفی میوه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برخی از صفات مورد مطالعه شامل طول خوشه، عرض خوشه، وزن خوشه و وزن حبه بود. برای انجام واکنش PCR برای نشانگرهای SSR ۱۲ از دستگاه ترموسایکلر AB9700 (Applied Biosystem) استفاده شد. تجزیه رگرسیونی گام به گام (Stepwise) برای ردیابی رابطه بین صفات میوه مورد آزمایش (به عنوان متغیرهای وابسته) و نشانگر SSR (به عنوان متغیرهای مستقل) با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 انجام شد. دو ضریب R^2 و β که با استفاده از آنالیز رگرسیونی و برای نشانگرهای مختلف وابسته به صفات محاسبه می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

رابطه بین صفات میوه و مارکرهای SSR با استفاده از MRA بررسی شد. نتایج نشان داد که صفات میوه (به عنوان متغیرهای وابسته) رابطه معنی داری با برخی از مارکرهای SSR (به عنوان متغیرهای مستقل) دارند. در مجموع، ۴۱ مارکر SSR رابطه معنی دار با صفات میوه نشان دادند. سه مارکر SSR شامل VrZag62-196، VVmd32-240 و VrZag79-246 رابطه معنی داری با طول خوشه نشان دادند. به علاوه، پنج مارکر SSR شامل VVmd25-247، VrZag62-186، VVS2-133، VVMD7-267 و VVmd25-237 رابطه معنی داری با عرض خوشه نشان دادند. سه مارکر SSR شامل VrZag62-186، VVmd5-222 و VVmd32-240 رابطه معنی داری با وزن خوشه نشان دادند. همچنین، پنج مارکر SSR شامل VrZag62-190، VrZag62-198، VrZag62-186، VvMD27- و VvMD32-252، VrZag62-192 رابطه معنی داری با طول دم خوشه نشان دادند. سه مارکر SSR شامل VrZag62-184، VrZag62-247، VVmd25-247 و VVS2-136 رابطه معنی داری با تعداد خوشه‌چه در خوشه نشان دادند. همچنین، هفت مارکر SSR شامل VrZag62-202، VrZag62-252، VrZag79-252، VVmd25-237، VVmd25-231 و VrZag79-246، VVmd7-271، VVmd32-246 رابطه معنی داری با طول حبه نشان دادند.

پنج مارکر SSR شامل VVS2-144، VrZag79-253، VVMD7-271، VrZag62-184 و VrZag62-186 رابطه معنی داری با وزن حبه نشان دادند. همچنین، پنج مارکر SSR شامل VrZag62-186، VVMD7-271، VVmd32-253، VVMD7-260 و VVmd32-240 رابطه معنی داری با رنگ حبه نشان دادند. چهار مارکر SSR شامل VVS2-140، VVS2-131، VVmd5-230 و VVmd5-238 رابطه معنی داری با مواد جامد محلول نشان دادند. همچنین، شش مارکر SSR شامل VVmd27-179، VVmd32-253، VVS2-123، VrZag79-244 و VVmd5-226 رابطه معنی داری با تعداد بذر نشان دادند.

نتایج نشان داد که برخی از مارکرهای SSR با بیش از یک صفت میوه رابطه رگرسیونی معنی دار دارند. برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت میوه ارتباط نشان دادند که ارتباط یک نشانگر با بیش از یک صفت می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپیک (Pleiotropic) QTL های مرتبط با هم در صفات مختلف باشد، اما برای آگاهی بیشتر از این رابطه ایجاد یک جمعیت در حال تفرق و نقشه‌یابی لینکاژی آن می‌تواند مفید باشد. اثر پلیوتروپیک زمانی رخ می‌دهد که یک ژن بتواند طور هم‌زمان در بروز چندین صفت تاثیر داشته باشد. همچنین QTL های مرتبط با همدیگر که صفات مختلف را کنترل می‌کنند نیز می‌توانند منجر به ایجاد یک نشانگر واحد شوند که با بیش از یک صفت همبستگی داشته باشد (Borrego et al., 2001). به عنوان مثال مارکر SSR VrZag79-246 رابطه معنی دار با طول خوشه و طول حبه نشان داد. مطالعات گذشته همبستگی معنی دار بین صفات مذکور را گزارش کرده‌اند (Leao et al., 2011).

همچنین، مارکر SSR VrZag62-186 دارای رابطه رگرسیونی معنی دار با وزن خوشه و وزن حبه بود. همبستگی معنی دار بین صفات مذکور گزارش شده است (Leao et al. 2011). به علاوه، مارکر SSR VrZag62-184 رابطه رگرسیونی معنی دار با تعداد خوشه‌چه در خوشه (β مثبت) و وزن حبه (β منفی) نشان دادند. همبستگی منفی بین این دو صفت گزارش شده است (Leao et al., 2011).

تجزیه رگرسیونی چندمتغیره (MRA) یک روش مناسب و سریع برای یافتن رابطه بین صفات و نشانگرها می‌باشد (Ruan and Mopper, 2009). نشانگرهای شناسایی شده در این مطالعه که با صفات میوه همبستگی نشان داده‌اند می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی MAS به برون. مزایای بارز این آنالیز این است که این روش می‌تواند مکان‌های صفات کمی (QTL) را ردیابی کند. همچنین نیاز به زمان و هزینه کمتری داشته و به تشکیل جمعیت جهت نقشه‌یابی نیاز ندارد (Virk et al., 1996).

انتخاب اولیه صفات مطلوب مربوط به میوه و گل نیاز به نمو گیاهان و وارد شدن آنها به مرحله بلوغ دارد و یا به عبارت دیگر درختان میوه باید مرحله طولانی نونهالی را طی نمایند و وارد مرحله میوه‌دهی شوند تا بتوان این صفات را مورد بررسی قرار داد و گیاهان دارای صفات مطلوب از نظر گل و میوه را پیدا نمود (Virk et al., 1996). اما با ردیابی نشانگرهای وابسته به این صفات، نیاز به وارد شدن گیاهان به مرحله بلوغ نمی‌باشد. به عبارت دیگر، برای گیاهان چوبی (مانند درختان میوه) دارای دوره طولانی نونهالی، انتخاب نتایج

برتر از نظر صفات مهم گل و میوه کاری دشوار می‌باشد اما با شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت (MAS)، می‌توان نتایج برتر را در مراحل اولیه رشد آنها شناسایی کرد (Virk *et al.*, 1996). روش کار به این است که می‌توان قطعات DNA چندشکل شناسایی شده به‌عنوان نشانگر آگاهی‌بخش برای صفت مورد مطالعه (مانند صفات مربوط به میوه) را از روی ژل جدا کرد و کلون نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه اطلاعاتی NCBI با توالی‌های موجود هم‌ردیف (Alignment) نمود و ژن‌های کاندید (Candidate genes) که شباهت بالایی به نشانگرهای آگاهی‌بخش مورد نظر را داشتند مشخص نمود. همچنین می‌توان از روی توالی به آمده، پرایمرهای SCAR را طراحی نمود و در انتخاب به‌واسطه نشانگر وابسته به صفت (MAS) در برنامه‌های اصلاحی بهره برد (Ruan and Mopper, 2009).

شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های اصلی کنترل‌کننده صفات مورد نظر در سال‌های اخیر از طریق ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق همچون F₁ در گیاهان هتروزیگوت و F₂، RIL، DH و در گیاهان هموزیگوت انجام گرفته است. بعضی از این نشانگرها جهت انجام کارهای اصلاحی استفاده شده‌اند، اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود همبستگی کافی بین صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ریخت‌شناسی می‌باشد اما انجام آنالیز همبستگی رگرسیونی فاقد این محدودیت‌ها می‌باشد (Gupta *et al.*, 2005).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده وابسته به خصوصیات میوه در انگور می‌توانند راهنمای خوبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های دارای صفات با ارزش میوه باشد. در برنامه‌های اصلاحی انتخاب مواد گیاهی با کیفیت معمولاً وقت و هزینه زیادی می‌طلبد. با این‌حال، نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر بخصوص وقتی که اطلاعاتی از پایه ژنتیکی آنها مانند نقشه لینکاژی در دسترس نیست، مفید باشد. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت جهت نقشه‌یابی به کار بروند.

منابع مورد استفاده

- Borrego, J., Rodriguez, I., Andres, M.T., Martin, J., Chavez, J., Cabello, F., Ibanez, J. 2001. Characterization of the most important Spanish grape varieties through isoenzyme and microsatellite analysis. *Proc Int Symp Mol Markers, Acta Hort.*, 546:371–375.
- Leão, P., Cruz, C., Motoike, S. 2011. Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits. *Scientia Agricola*, 68(1):42-49.
- Moreno-Sanz, P., Dolores Loureiro, M., Suárez, B. 2011. Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain) *Sci Hort.*, 129: 433–440
- Ruan, C.J., Li, H., Mopper, S. 2009. Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. *Mol Breed*, 24(3): 255–268.
- Sefc, K.M., Lefort, F. M., Gando, S.K.D., Scott, H., Steinkeller, M.R. 2001. Thomas, microsatellite markers for grapevine: a state of the art, in: K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, , pp. 433–463.
- Selli, F., Bakir, M., Inan, G., Aygun, H., Boz, Y., Yasasin, A.S., Ozer, C., Akman, B., Soylemezoglu, G., Kazan, K., Ergul, A. 2007. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in 'Dimrit' and 'Germe' grapevine accessions from Turkey. *Vitis* 46:182–187
- Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Hered.*; 76: 296–304.

Association between SSR markers with the main fruit traits in grape using stepwise regression analysis

Zeinab Mashhadi*, Ali Khadiv

MSc. student and Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

*Corresponding author: mashzeinab@gmail.com

Abstract

Grape (*Vitis vinifera*) is one of the most important crops in the world. In the present study, phenotypic and SSR marker-fruit traits association in a collection of Iranian grapes were investigated. The cultivars were phenotypically diverse, which bunch and berry traits showed high variation. The results of multiple regression analysis revealed statistically significant association between important fruit traits and some SSR markers which can provide clues for identification of the genotypes with higher values. The results of phenotypic and genotypic diversity here suggest that the germplasm studied representing the kind of variability would be a valuable genetic resource for future breeding.

Keywords: Associations, Fruit characters, SSR, *Vitis vinifera*

دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران - ۱۴ تا ۱۷ شهریور ماه ۱۴۰۰ - دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
رفسنجان، ۱۴ لغایت ۱۷ شهریور ماه ۱۴۰۰