

مقاله پژوهشی

مطالعه بالادست ژن MYB10 در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین سیب گوشت قرمز ایرانی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

محمد مهدی شریفانی^{۱*}، میترا جباری^۲ و احد یامچی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷)

چکیده

یکی از جایگاه‌های مهم تنوع ژنوتیپ‌های سیب در جهان، ایران می‌باشد که سیب‌های گوشت قرمز، در نواحی از ایران نظیر طالقان، مازندران و شاهرود وجود دارد. هدف از این پژوهش تشخیص تفاوت‌های تک و دو نوکلئوتیدی در منطقه بالادست ژن MYB10، عامل رونویسی ژن عامل سنتز آنتوسیانین، بود. با استفاده از آغازگر ویژه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بخشی از منطقه بالادست ژن تکثیر و توالی‌یابی گردید. جداسازی محصول PCR روی ژل آگارز و اندازه باندهای تکثیر شده در ارقام سیب گوشت قرمز با اندازه ال‌های شناخته شده در ارقام سیب خارجی شاهد و نشانگر جفت بازی مقایسه گردید. براساس نتایج حاصله از تغییرات توالی در بالادست ژن MYB10 ارقام سیب مازند ۲ و SH10 و سیب GH2 در یک گروه قرار گرفتند. اگرچه از بعد جهش نقطه‌ای در منطقه بالادست ژن با یکدیگر تفاوت داشتند ولی سیب‌های گوشت قرمز در مقایسه با سیب‌های گوشت سفید بیشترین شباهت را بین خود داشتند. این نتایج نشان داد که سیب‌های گوشت قرمز به نحوی خاص در بالادست ژن مذکور سازماندهی خاصی یافته‌اند و ارقام گوشت قرمز بومی ایران متفاوت از رقم سیب گوشت قرمز (منشا قزاقستان) هستند، که این امر نویدبخش ژنوتیپ‌های جدیدی از سیب گوشت قرمز می‌باشد. بطور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که سطح چندشکلی بالا بین ارقام سیب و ژنوتیپ‌های سیب گوشت قرمز ایرانی وجود دارد که نشان می‌دهد ایران می‌تواند یکی از مراکز تنوع سیب در دنیا باشد و در معرفی ارقام سیب گوشت قرمز بومی ایران به بازارهای مصرف با استفاده از برنامه‌های اصلاحی مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، عامل رونویسی، نشانگر مولکولی، نواحی حفاظت شده

۱- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد میوه‌کاری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* پست الکترونیک: msharifani2019@gmail.com

مقدمه

درختان میوه در دنیا از اهمیت بالایی برخوردار بوده و در ایران، سطح زیرکشت و تولید میوه‌ها رو به افزایش می‌باشد. اغلب گونه‌های سیب وحشی در کوه‌های مرکزی آسیا، غرب و جنوب غرب چین، سیبری و خاور دور یافت شده است (زویو-زی^۱، ۱۹۹۹). که این مناطق می‌تواند منابع با ارزش تنوع ژنتیکی برای تحقیقات مهم باغبانی و تنوع زیستی و محیطی باشند (هاریس^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). در حال حاضر بیش از ۱۰۰۰۰ رقم سیب در دنیا شناخته شده‌اند که تعداد محدودی از آنها ارزش تجارتي دارند (وای^۳ و همکاران، ۱۹۸۹) و بیشترین گونه‌ها از نوع سیب‌های میوه‌ریز، زینتی یا وحشی^۴ هستند (جانیک^۵ و همکاران، ۱۹۹۶). جنس سیب از خانواده رزاسه و زیرخانواده پوموئیده، آلوپلی‌پلوئیدی از دو خانواده اسپیروئیده ($x=9$) و پرونوئیده ($x=8$) است که منجر به ایجاد پایه هاپلوئیدی ($x=17$) در این زیرخانواده گردیده است (لسپیناسه^۶ و همکاران، ۱۹۹۶). سیب‌هایی که امروزه کشت و کار می‌شوند اکثراً دیپلوئید با ۳۴ کروموزم می‌باشند، اگرچه تعدادی از گونه‌های سیب وحشی مانند *M. ioensis*، *M. toringo* و *M. sikkimensis* تریپلوئید هستند (تاتیم^۷ و همکاران، ۲۰۰۵). طول کروموزم‌ها در هاپلوئید *M. domestica* بین ۱/۵ تا ۳/۵ μm و از لحاظ موقعیت سانترومتری ۱۱ تایی آن‌ها ساب‌متاسنتریک و شش عدد از آن‌ها متاسنتریک می‌باشد (بیوویر^۸ و همکاران، ۱۹۹۹). سیب نه تنها به خاطر ارزش اقتصادی آن، همچنین به دلیل اندازه کوچک نسبی ژنومی‌اش (75 Mb/haploid) به صورت یک گونه مدل برای تحقیقات کاربردی ژنومی در اکثر نهان‌دانگان چوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (وای و همکاران، ۱۹۸۹). سیب وحشی ایرانی را از گونه *M. Pumila* Mill می‌دانند (میر محمدی‌میبدی، ۱۳۸۲). با توجه به این موضوع می‌توان سیب گوشت قرمز^۹ را نیز جز این گونه دانست. نیاز سرمایی^{۱۰} این درختان پایین و بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ ساعت می‌باشد و به همین

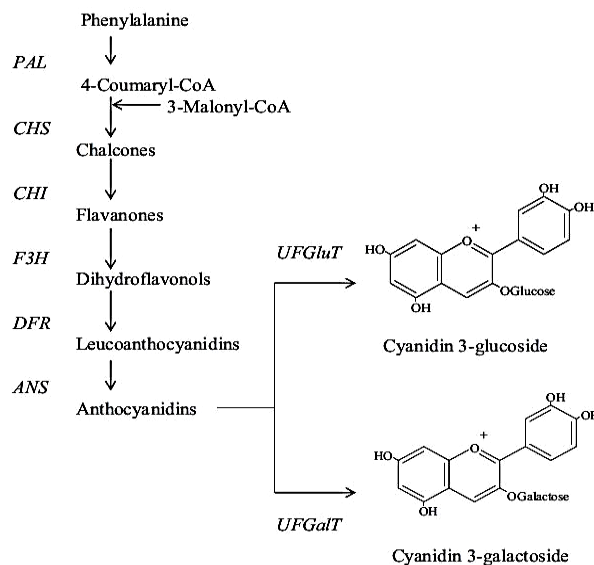
خاطر شاید بتوان آنها را در مناطق نیمه‌گرمسیری^{۱۱} نیز کاشت. همچنین با تکنیک‌های خاص می‌توان این درختان را وادار به گلدهی کرد و ۲ تا ۳ بار در سال محصول تولید کرد. رنگیزه آنتوسیانین عامل قرمزی سیب‌های گوشت قرمز است که در سایر بخش‌های گیاه اعم از تنه، برگ، گل و بذر وجود دارد (فرامرزی، ۱۳۸۹). درختان وحشی سیب گوشت قرمز در جنگل‌های قزاقستان و برخی از نواحی شمال و شمال‌غربی ایران مشاهده شده‌اند. میوه این درختان دارای تنوع زیادی در شکل، اندازه، الگوی رنگ‌گیری و مزه است (فرامرزی و همکاران، ۱۳۹۳). در مقایسه با ارقام تجاری معروف، ارقام بومی و قدیمی، طعم و عطر و ترکیبات ضداکسایشی بیشتری دارند (دابروسکا^{۱۲} و همکاران، ۲۰۰۷). بسیاری از این ارقام با ورود ارقام تجاری خارجی کمتر لحاظ شده‌اند و برخی در حال انقراض هستند. بعضی از این ارقام حتی فاقد نام محلی‌اند یا یک رقم ممکن است در هر منطقه‌ای نام محلی خاص آن منطقه را داشته باشد. بنابراین، شناسایی و بررسی علمی بیشتر در مورد این ارقام ضروری است (فرامرزی و همکاران، ۱۳۹۴). پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی و ابداع نشانگرهای مولکولی، امیدهای تازه‌ای را برای به‌نژادگران به وجود آورده است. در طول دو دهه اخیر، پیشرفت‌هایی چشمگیری در زمینه اصلاح نباتات مولکولی مخصوصاً فناوری نشانگرهای DNA، ابزارهای جدیدی را برای بالا بردن کارایی روش‌های اصلاحی فراهم نموده‌اند. یکی از مهمترین کاربردهای این نشانگرها، ارزیابی تنوع ژنتیکی و پتانسیل ذخایر توارثی است. از سوی دیگر، پیچیدگی صفات کمی، استفاده از روش‌های مولکولی به صورت تلفیق با روش‌های بیومتری را در اصلاح آنها اجتناب‌پذیر می‌نماید. از جمله روش‌های مولکولی، تجزیه صفات کمی با استفاده از نشانگرهای DNA با تکیه بر عدم تعادل پیوستگی به مطالعه روابط بین تنوع فنوتیپی و چندشکلی ژنتیکی می‌پردازد (بریسقیلو و سولارس^{۱۳}، ۲۰۰۶). کسب اطلاع از فاصله

8. Bouvier
9. Red flesh apple
10. Chilling Requirement
11. Subtropical Zone
12. D'abrosca
13. Bressegello and Sorrells

1. Zhou-Zhi
2. Harris
3. Way
4. Crabs
5. Janick
6. Lespinase
7. Tatum

مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و تعداد قندهای متصل به مولکول و موقعیت این ضمایم و تعداد اسیدهای آروماتیک یا آلیفاتیک متصل به قند مولکول است (کونگ^۶ و همکاران، ۲۰۰۳). متداول‌ترین فرم آنتوسیانین، سیانیدین است که فرم گالاکتوزیدی آن (Cyanidin-3-O-galactocid) مسئول رنگ قرمز پوست سیب‌های معمولی و گوشت سیب‌های گوشت قرمز است (روپاسینگه^۷ و همکاران، ۲۰۱۰؛ تساو^۸ و همکاران، ۲۰۰۳؛ لانکاستر و دوینگال^۹، ۱۹۹۲) (شکل ۱). دو دسته ژن بیوسنتز آنتوسیانین را تحت تأثیر قرار می‌دهند. دسته اول که بطور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است آنزیم‌های کدکننده مهم در بیوسنتز رنگدانه می‌باشد (ژن‌های بیوسنتزکننده یا ژن‌های ساختاری) (تاکوس^{۱۰} و همکاران، ۲۰۰۶). دسته دوم از عوامل رونویسی تشکیل شده‌اند که ژن‌های تنظیم‌کننده می‌باشند که شدت و الگوی تجمع آنتوسیانین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و به طور کلی بیان بسیاری از ژن‌های مختلف بیوسنتزکننده را کنترل می‌کنند (آلان^{۱۱} و همکاران، ۲۰۰۸).

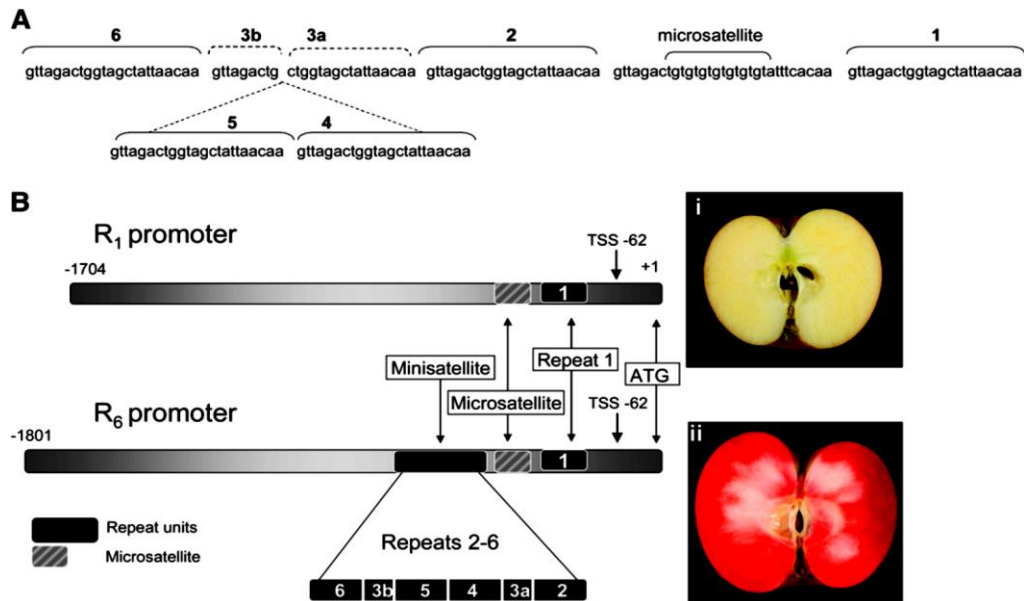
ژنتیکی میان افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. نشانگرهای مولکولی دارای فراوانی نسبی زیادی هستند و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند از این رو، مناسب‌ترین نوع نشانگرها در پژوهش‌های نوین محسوب می‌شوند (هوکانسون^۱ و همکاران، ۱۹۹۸). اساس کاربرد این روش استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای چندالل یا اختصاصی تک‌الل بوده که موجب تکثیر قسمتی از زنجیره DNA یعنی الل ژن مربوطه خواهد شد (چاننیونتاپیپات^۲ و همکاران، ۲۰۰۱). نشانگرهای مبتنی بر DNA به دلیل فراوانی ژنومی بالا، عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی، مرحله رشد، نوع بافت، اندام و چندشکلی بالا، کارایی بیشتری دارند (جوشی^۳ و همکاران، ۱۹۹۹). آنتوسیانین‌ها^۴ بخشی از ترکیبات فلاونوئیدی حاصل از گیاه هستند که مسئول تولید رنگ‌هایی از صورتی کمرنگ-قرمز تا بنفش و آبی پررنگ هستند (اندرسون و جوردهین^۵، ۲۰۰۶). بیش از ۵۰۰ آنتوسیانین در طبیعت پیدا شده است و اختلاف بین آنها



شکل ۱- مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در سیب (کوندو^{۱۲}، ۲۰۰۹).

7. Rupasinghe
8. Tsao
9. Lancaster and Dougall
10. Takos
11. Allan
12. Kondo

1. Hokanson
2. Channuntapipat
3. Joshi
4. Anthocyanin
5. Andersen and Jordhein
6. Kong



شکل ۲- توالی ناحیه ماهوارک راهانداز MYB10 در سیب‌های گوشت قرمز (اسپیلی^۱ و همکاران، ۲۰۰۹). (A) موقعیت نسبی واحدهای تکرار شونده در راهانداز ژن MYB10 می‌باشد. واحد ۱ در پایین دست ریزماهواره قرار دارد و واحد ۳ توسط واحد ۴ و ۵ جدا شده است (B) تفاوت بین راهانداز R₁ (که هم در ارقام گوشت قرمز و هم در ارقام گوشت سفید یافت می‌شود) و راهانداز R₆ که تنها در سیب‌های گوشت قرمز وجود دارد. واحدهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ تشکیل ماهوارک را می‌دهند.

آرس^۶، ۱۹۹۷). پروتئین‌های MYB گیاهی به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند: MYBR2R3ها که حاوی دو تکرار مجاور می‌باشند، MYBR1R2R3 با سه تکرار مجاور هم و یک گروه ناهمگن که در مجموع به عنوان پروتئین‌های مرتبط با MYB در نظر گرفته می‌شوند که معمولاً (اما نه همیشه) حاوی تنها یک تکرار MYB هستند (یانیهیو^۷ و همکاران، ۲۰۰۶). این تکرارهای محافظت‌شده تشکیل یک ساختار مارپیچ دور مارپیچ می‌دهند که شامل ۵۱ الی ۵۳ اسیدآمینو می‌باشد (استراسکی^۸ و همکاران، ۲۰۰۱). در سیب سه گروه مستقل شناسایی شده‌اند که فاکتور رونویسی R2R3MYB مسئول تجمع آنتوسیانین می‌باشند (بان^۹ و همکاران، ۲۰۰۷؛ اسپیلی^{۱۰} و همکاران، ۲۰۰۷). سطح رونویسی MdMYB10 بطور قوی با مقدار آنتوسیانین پوست همبستگی دارد و این ژن می‌تواند تجمع آنتوسیانین در سیستم‌های همولوگ و

فاکتورهای رونویسی پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند که بطور اختصاصی به ناحیه‌ای از پروموتور ژن‌های هدف متصل شده و میزان شروع سنتز mRNA به وسیله RNA پلیمرز را تنظیم می‌کنند و به این ترتیب بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را کنترل می‌کنند. فاکتورهای رونویسی، تشکیل خانواده‌های چندژنی را می‌دهند که از لحاظ اندازه و عملکرد بسیار متنوع هستند (ریچمان^۲ و همکاران، ۲۰۰۰). یکی از این خانواده‌ها MYB^۳ است که دارای یک دمین محافظت شده متصل‌شونده به DNA می‌باشد (یان^۴ و همکاران، ۲۰۲۱). براساس تعداد تکرارهای مجاور در دمین MYB، این خانواده به سه دسته تقسیم می‌شود که مهمترین و بزرگترین آنها در گیاهان R1R2-MYB است و تنها دسته کوچکی از آنها جزء R1R2R3ها هستند (رومرو^۵ و همکاران، ۱۹۹۸؛ مارتین و پاز-

1. Espley
2. Riechmann
3. Myeloblastosis
4. Yan
5. Romero
6. Martin and Paz-Ares
7. Yanhui
8. Stracke
9. Ban
10. Espley

(چاجنی^۵ و همکاران، ۲۰۰۷) و با افزایش سطح رونویسی آن‌ها، میزان آنتوسیانین نیز افزایش می‌یابد (چین^۶ و همکاران، ۲۰۱۹؛ اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ بان و همکاران، ۲۰۰۷). آنتوسیانین‌ها از نظر ویژگی‌های دارویی برای انسان حائز اهمیت هستند، امروزه به دلیل خواص فراوان نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی مختلف از جمله خواص ضدسرطانی، ضدالتهاب، ضدحساسیت و پیشگیری از انسداد شریان قلب، کاهش کلسترول و فشار خون بالا، مصرف آنتوسیانین در دنیا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (تزیولکیر^۷ و همکاران، ۲۰۰۷). مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی تعدادی از ارقام گوشت قرمز سیب در مقایسه با ارقام معمولی نشان داد که ارقام گوشت قرمز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به مراتب بالاتری هستند و به همین دلیل در مقایسه با سیب‌های گوشت سفید از نظر سلامتی ارزش بیشتری دارند روپاسینق و همکاران، ۲۰۱۰). سیب‌های گوشت قرمز همچنین در مقایسه با سیب‌های معمولی منابع غنی‌تری از فیبر هستند که این موضوع با توجه به دخالت فیبر در سلامت انسان حائز اهمیت است (سان-واترهوس^۸ و همکاران، ۲۰۱۳). علاوه بر فواید بهداشتی، سیب‌های گوشت قرمز از نظر تجاری نیز می‌توانند جایگاه ویژه‌ای داشته باشند به گونه‌ای که آب این گونه سیب‌ها به عنوان محصولی نوین و در حال گسترش در صنایع غذایی مطرح شده است، علاوه بر جاذبه‌های تجاری، رنگ قرمز طبیعی آب این سیب‌ها می‌تواند موجب کاهش مصرف مواد رنگی خوراکی در صنایع غذایی شود که نه تنها از نظر سلامتی بلکه از نظر اقتصادی نیز دارای ارزش است (اسچوارز^۹ و همکاران، ۲۰۰۹). سیب، چهارمین میوه مهم جهان و مهمترین میوه مناطق معتدله به شمار می‌آید (جانیسک و همکاران، ۱۹۹۶). با توجه به نیاز بشر به غذای سالم، امروز استفاده از ارقام با ارزش غذایی که با شرایط اقلیمی منطقه سازگارند، بسیار اهمیت پیدا می‌کند. هدف از این پژوهش تعیین تفاوت در ساختار منطقه ماهوارک بالادست ژن آنتوسیانین بین ارقام گوشت قرمز و سفید بود.

هترولوگ را القا کند (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷). در سیب‌های گوشت قرمز پنج واحد تکرار از یک توالی با ۲۳ جفت باز در راه‌انداز MdMYB10 از ۲۷۵ جفت باز بالادست شروع ترجمه ATG مورد هدف پروتئین MdMYB10 می‌باشد (شکل ۲) و تعداد واحدهای تکرار شونده با افزایش فعال‌سازی رونویسی ناشی از پروتئین MdMYB10 در ارتباط می‌باشد (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷). سطح رونویسی MdbHLH3 (مشابه TT8 در آراییدوپسیس) و MdbHLH33 (مشابه پروتئین Delila در گل میمون) در طی رشد و نمو سیب ثابت باقی می‌ماند و الگوی مشابه را به‌عنوان ژن‌های بیوسنتزکننده یا ژن MdMYB10 دنبال نمی‌کند (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷) (شکل ۲). مهمترین مسیر بیوسنتزی ثانویه که توسط ژن‌های MYB تنظیم می‌شوند، ساخت فلاونوئید^۱ است. این متابولیت ثانویه گروهی از ترکیبات فنولیکی گیاهی هستند که اهمیت زیادی در فیزیولوژی گیاهی و تغذیه انسان دارد، این مواد در رشد و توسعه گیاه شامل جوانه‌زنی دانه گرده، مقاومت به حشرات، تشکیل رنگدانه‌های گیاهی جذاب مانند آنتوسیانین‌ها، محافظت در برابر اشعه UV، مقاومت به پاتوژن‌ها، فعالیت به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در برهمکنش‌های گیاه-میکروب، نقش دارند (اومیکالسوم^۲ و همکاران، ۱۹۹۴؛ کویس^۳ و همکاران، ۱۹۹۴). تحریک بیوسنتز آنتوسیانین در سیب توسط عامل رونویسی MdMYB10 صورت می‌گیرد که به هم‌بیانی دو پروتئین bHLH به نام‌های MdbHLH3 و MdbHLH33 وابسته است. در سیب گوشت قرمز جایگاه ژنی Rni مسئول قرمز شدن و تشکیل رنگیزه آنتوسیانین می‌باشد (رامسای و گلوور^۴، ۲۰۰۵). در سیب ژن‌های MdMYB1 و MdMYBA به‌عنوان مسئول ایجاد رنگ قرمز در پوست شناسایی شده‌اند (بان و همکاران، ۲۰۰۷؛ تاکوس و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین ژن MdMYB10 که در بافت گوشت میوه بیان می‌شود کنترل رنگ قرمز در این بافت را به عهده دارد (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷). این ژن‌ها در انتهای کروموزوم ۹ سیب قرار دارند

6. Chen
7. Tzulker
8. Sun-Waterhouse
9. Schwarz

1. Flavonoids
2. Umikalsom
3. Koes
4. Ramsay and Glover
5. Chagné

مواد و روش‌ها

ارقام مختلف میوه‌های سیب مورد نیاز جهت آزمایش از درختان موجود در ایستگاه باغبانی کمال‌شهر کرج (استان البرز) وابسته به موسسه اصلاح و نهال و بذر تهیه شدند. ۱۲ رقم سیب که ۴ رقم آن سیب گوشت قرمز و ۸ رقم دیگر شامل سیب ایرانی و خارجی بودند در آزمایش بکار رفت. جهت استخراج DNA، نمونه‌برداری برگ از سرشاخه‌های جوان سالم درختان و از هر درخت ۸-۶ برگ تازه جمع‌آوری و در پاکت مربوط به هر نمونه و در بین لایه‌های یخ خشک قرار داده شد و پس از اتمام جمع‌آوری نمونه از تمامی درختان مورد نظر، برای استخراج DNA به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه، برگ‌ها تا مرحله استخراج DNA در فریزر و دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش دوپیل و دوپیل^۱ (۱۹۸۷) با کمی تغییر انجام شد. با این تغییر که در مرحله رسوب‌گذاری DNA مقدار ایزوپروپانول افزایش یافت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد و با هر دو روش مناسب ارزیابی گردید. برای تهیه ژل از آگارز ۱٪ و بافر TAE^۲ استفاده شد. در موقع بارگذاری نمونه‌ها در ژل آگارز، دی‌ان‌ا لدر با اندازه ۱۰۰۰ جفت باز بکار رفت. رنگ‌آمیزی ژل آگارز به منظور قابل روئت شدن DNA ژنومی، قطعات DNA و محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تحت اشعه ماوراء بنفش صورت گرفت. به منظور عکس‌برداری از ژل آگارز از دستگاه ژل داکيومنت^۳ و تحت اشعه ماوراء بنفش استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر^۴ در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام پذیرفت. غلظت مواد استفاده شده در PCR (جدول ۱)، توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ژن MYB10 (جدول ۲) و توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ژن MYB10-Promoter (جدول ۳) (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۹) ذکر گردید. جهت چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، غلظت پایه آغازگرها ۱۰۰ پیکومول/میکرولیتر بود که توسط آب دوبار تقطیر استریل به مقدار ۰/۱ رقیق شد و غلظت آن‌ها به ۱۰ پیکومول/میکرولیتر رسید.

موارد استفاده شده برای واکنش PCR شامل مخلوط نوکلئوتیدی dNTPs، MgCl₂، بافر PCR و Taq پلیمرز DNA از شرکت سیناکلون تهیه گردید. واکنش PCR طبق جدول (۴ و ۵) انجام شد. الکتروفورز نیز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۷۰ ولت، انجام شد. سپس در دستگاه ژل داکيومنت با نور فرابنفش عکس‌برداری انجام گردید. جهت توالی‌یابی ژن MYB10، مقدار ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR و ۲۰ میکرولیتر از آغازگرها به شرکت سیناکلون ارسال گشت. پس از دریافت نتایج، توالی‌ها هم‌ردیف سازی شده و مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل

استخراج DNA به روش دوپیل و دوپیل انجام و پرایمرها و برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از مقاله اسپیلی و همکاران (۲۰۰۹) استخراج و استفاده شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار مگا^۵ نسخه ۶ و با روش آنالیز اتصال همسایه^۶ انجام شد. همچنین برای مقایسه توالی‌ها و بررسی جهش‌ها از نرم افزار تولوز^۷ و ابزارهای NCBI استفاده شد.

نتایج و بحث

استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر DNA در صورتیکه با سایر شاخص‌های بیوشیمیایی یا مورفولوژیک و یا مقاومت‌ها منطبق باشد کافی و قابل اعتماد است، بخصوص در مورد گونه‌هایی با تنوع ژنتیکی بالا مثل هلوها، شلیل‌ها و بادام‌ها، نشانگرهای DNA می‌توانند با صفات جالب توجهی پیوسته شده باشند (راددووا^۸ و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج حاصل از PCR ارقام نشان داد که DNA ارقام بدست آمده با آغازگرهای ماهوارک ژن MYB10 تکثیر گردید. شکل ۴ تکثیر ژن MYB10 برای منطقه ماهوارک راه انداز عامل رونویسی ژن آنتوسیانین برای ژنوتیپ‌های سیب گوشت قرمز و سایر ژنوتیپ‌های سیب می‌باشند. به‌طور کلی مشاهده می‌شود که سیب گلدن دلشیز دارای اندازه باند کوچکتری نسبت به سایر نمونه‌های سیب بود (شکل ۳). توالی‌یابی این ژن برای نمونه‌های سیب مشخص

5. MEGA
6. Neighbor-joining
7. Toulouse
8. Raddova

1. Doyle and Doyle
2. Tris-acetate-EDTA
3. Gel Document
4. Thermocycler

جدول ۱- غلظت مواد استفاده شده در PCR

واکنش دهنده‌ها	غلظت پایه	مقدار میکرولیتر
بافر	۱۰X	۲
Taq پلیمرز		۱/۵
آغازگر مستقیم	۱۵/۵۴nM	۲
آغازگر معکوس	۱۵/۵۲ nM	۲
دی اکسی نوکلئوتیدها	۰/۲ mM	۰/۴
کلرید منیزیم	۱/۵ mM	۰/۶
دی‌ان‌ای ژنومی	۲۰ng/	۲
آب مقطر استریل		۹/۵
مجموع		۲۰

جدول ۲- توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ژن MYB10 (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۹)

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگرها	طول آغازگر بر حسب bp	دمای بهینه شده
۱	MyB10-Min-F	GGAGGGGAATGAAGAAGAGG	۲۰	۶۰/۵
۲	MyB10-Min-R	TCCACAGAAGCAAACACTGAC	۲۱	۵۹/۵

جدول ۳- توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ژن MYB10-Promoter (اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۹)

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگرها	طول آغازگر بر حسب bp	دمای بهینه شده
۱	MyB10-Pro-F	CACTTTCCTCTCCATGAATCTCAAC	۲۶	۶۶/۲
۲	MyB10-Pro-R	CAGGTTTTCGTTATATCCCTCCATCTC	۲۷	۶۶/۶

جدول ۴- چرخه‌های حرارتی PCR پرایمر MYB10-Minisatellite

نام مراحل	چرخه	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
واسرشت اولیه ^۱	۱	۹۴	۲ دقیقه
واسرشت سازی	۴۰	۹۴	۵۵ ثانیه
اتصال آغازگر به رشته الگو ^۲	۴۰	۵۵	۵۵ ثانیه
بسط آغازگر ^۳	۴۰	۷۲	۱ دقیقه و ۳۹ ثانیه
گسترش نهایی	۱	۷۲	۱۰ دقیقه
نگهداری	۱	۴	-----

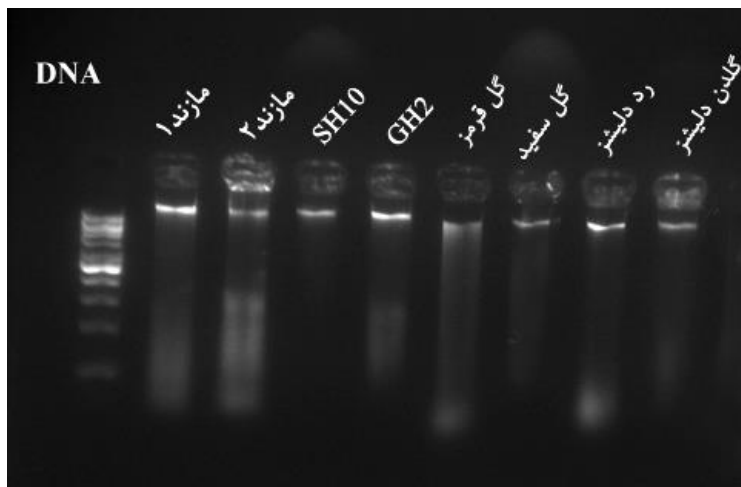
جدول ۵- چرخه‌های حرارتی PCR پرایمر MYB10-Promoter

نام مراحل	چرخه	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
واسرشت اولیه	۱	۹۴	۲ دقیقه و ۴۵ ثانیه
واسرشت سازی	۳۲	۹۴	۱ دقیقه
اتصال آغازگر به رشته الگو	۳۲	۶۰	۱ دقیقه
بسط آغازگر	۳۲	۷۲	۲ دقیقه
گسترش نهایی	۱	۷۲	۱۵ دقیقه
نگهداری	۱	۴	-----

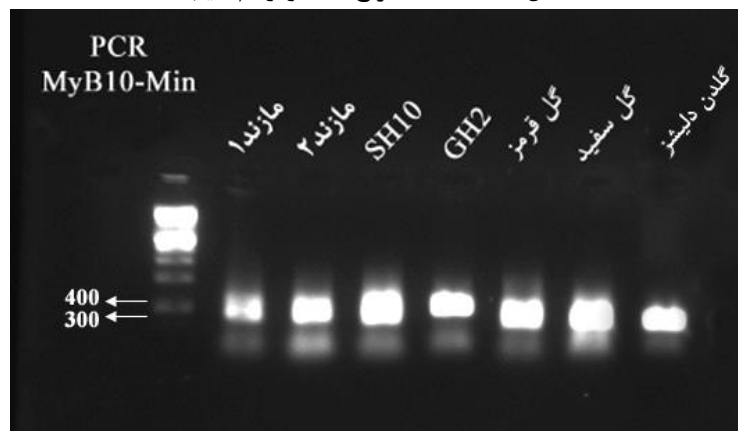
1. Denaturing step
2. Annealing step
3. Extension step

اندازه باندی کوچکتر دارد. جهت بررسی و مقایسه توالی‌های بدست آمده (شکل ۶) از ژن MYB10 در ارقام سیب توالی‌های آنها هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت فیلوژنی برای نشان دادن روابط تکاملی بین توالی‌ها حاصل از آغازگر ماهوارک حدفاصل بین آغاز ژن و ۶۰۰ جفت باز در بالادست ژن ترسیم گردید (شکل ۷). نمودار روابط خویشاوندی ارقام سیب و دو رقم گلابی که مشابهت ژنتیکی داشتند در شکل ۷ نشان داده شده است.

کننده تفاوت سیب‌های گوشت قرمز و سفید ایرانی برای منطقه بالادست ژن از ۲۷۰ تا ۶۷۰- بود (شکل ۵). همچنین سیب SH10، گل قرمز، گل سفید اندازه باند بزرگتری را نشان دادند که احتمالاً از توالی گسترده‌ای برخوردار می‌باشند. رقم ردلیشز هیچ باندی نداد. اندازه توالی این ژن‌ها براساس نشانگر اندازه مولکولی بین ۳۰۰-۴۰۰ جفت باز می‌باشد. نتایج حاصله بیانگر این احتمال است که ناحیه تکثیر شده مربوط به راه‌انداز ژن MYB10 است که برای نمونه‌های استفاده شده



شکل ۳- DNA استخراج شده از ارقام سیب



شکل ۴- تکثیر ژن MYB10 برای منطقه ماهوارک راه انداز عامل رونویسی ژن آنتوسیانین با کاربرد لدر ۱۰۰۰ جفت بازی

ارقام سیب و گلابی کامونیس^۲ (گلابی اروپایی) در یک گروه و گلابی پیریفولیا^۳ (گلابی ژاپنی چینی) در گروه دیگری قرار گرفتند. ارقام ایرانی در پنج زیرگروه قرار گرفتند. در بین

این نتایج (شکل ۷) نشان داد که به طور کلی ارقام گوشت قرمز ایرانی و سیب گوشت قرمز وحشی (با منشا قزاقستان^۱) برای ژن MYB10 متفاوت بودند. مطابق دندروگرام ترسیم شده،

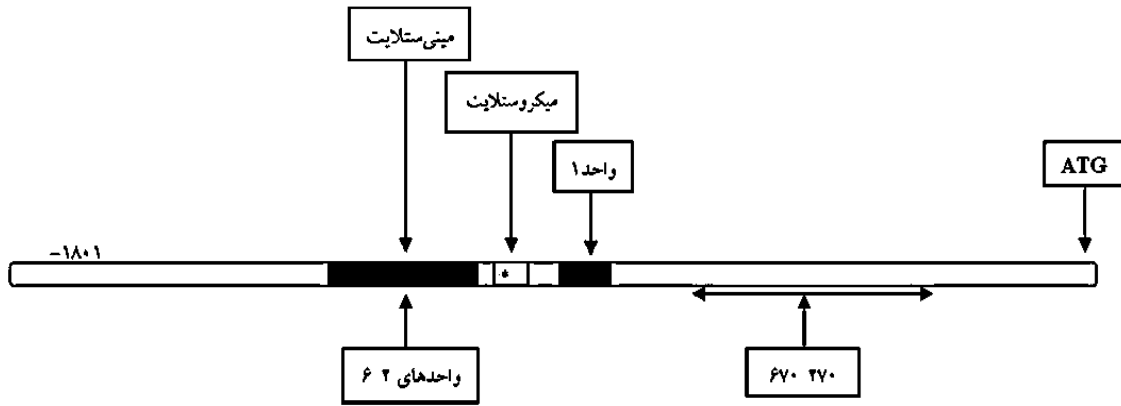
3. *Pyrus pyrifolia*

1. *Malus pumila* c.v Neidzwetzkyana

2. *Pyrus communis*

افزار تولوز مورد مقایسه قرار گرفتند و نقاط محافظت شده از نقاط جهش یافته جدا شدند. آنچه در زیر آمده است، مقایسه جهش‌ها در بین ژنوتیپ‌هاست که در جداول ۶ تا ۹ آمده است. نواحی از توالی‌های بدست آمده مورد مطالعه قرار گرفتند که بیشترین تغییرات و جهش‌ها در آن ناحیه وجود داشت. همانطور که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود تغییرات در نوکلئوتیدهای ۵۵۵-۵۵۶ نمونه‌های مورد آزمایش را بر اساس جهش در دی‌نوکلئوتید به سه دسته به شرح زیر تقسیم

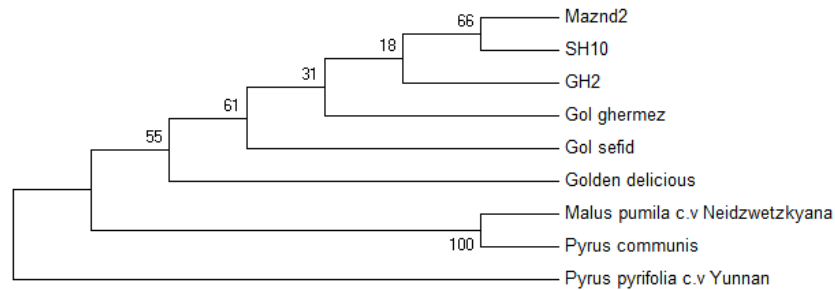
سیب‌های گوشت قرمز ایرانی ارقام مازند ۲ و SH10 قرابت زیادی با هم داشتند و به احتمال زیاد به دلیل نزدیک بودن منشا جغرافیایی آن‌ها می‌باشد که احتمالاً هر دو آنها از یک منشاء ژنتیکی سرچشمه گرفته‌اند. دو ژنوتیپ حاصل از تلاقی بین والدینی ژنوتیپ‌های شبیه و یا تلاقی نتاج‌ها با والدین دارای قرابت ژنتیکی بوده‌اند. به منظور بررسی اختلافات و شباهت‌ها بین توالی‌های منطقه بالادست ژن MYB10 توالی‌های بدست آمده به کمک نرم



شکل ۵- منطقه مورد بررسی بالادست ژن MYB10 در این مطالعه بین ۲۷۰ تا ۶۷۰-

	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
1-Malus-pumila-c-v-N	CAAGTGTGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
9-Pyrus-pyrifolia-c	CAAGTGTGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
10-Pyrus-communis-cd	CAAGTGTGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
2-Hazand2	GCCTGGGGCTCTATGGTTC-CCATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-GACACCCAAACAA--AACAAA-CCCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
3-SH10	CAATGCTAC-CATCCAC-CCATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-GACACCCAAACAA--AACAAA-CCCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
5-Gol-Ghermez	CGGGTGGCATATGACACT-CCATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-GACACCCAAACAA--AACAAA-CCCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
6-Gol-Sefid	CGAGGATTC-CCAGC-AAAATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-TGATCCCAACAA--AAAHAACCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
4-GH2	CAAGCTGCTATCTCC-CCATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-GA--AGCAAA--AACAA-CCCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
7-Golden-delicious	AGATTGATCAACAGCACT-CC-ATATATGCA-GCACACACTTTTITTTTTTTG-GA--AGCAAA--AACAA-CCCTTAAACCCCCCAACCCAGGAAAGGGTTTATAGGGG													
8-Pyrus-communis-n.s	AAATAGCCGATGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
Consensuscgaagg.ttt.a.....actl.ccgtaaktacaagcaaacac.tcttttttt.tl...g.acac.caasac...aac.aa.ccctt.aaaaaccccccaaa.g...aaaa.ggg.c.ttaggggg													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
1-Malus-pumila-c-v-N	ACCAATGATAGACCTCAGCCCAAAAATTCACAGAGTTCATATTAAGCGTAGAGAACCAATTCAGACATATTCATCAGCAGGAGATTAGTACGCCACCAACACACTGCTGCACR													
9-Pyrus-pyrifolia-c	ACCAATGATAGACCTCAGCCCAAAAATTCATCAGAGTTCATATTAAGCGTAGAGAACCAATTCAGACATATTCATCAGCAGGAGATTAGTACGCCACCAACACACTGCTGCACR													
10-Pyrus-communis-cd	ACCAATGATAGACCTCAGCCCAAAAATTCATCAGAGTTCATATTAAGCGTAGAGAACCAATTCAGACATATTCATCAGCAGGAGATTAGTACGCCACCAACACACTGCTGCACR													
2-Hazand2	GCCCAA--AATGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
3-SH10	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----ATTACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
5-Gol-Ghermez	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
6-Gol-Sefid	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
4-GH2	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
7-Golden-delicious	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
8-Pyrus-communis-n.s	GCCCAA--AAGGGGTTTARACC-----TATACCCCAATCCCTTCCCTTCCAAAGGGGG-----TTTTAARATTTTATACCCCAAAAATTTTCCCGGGGTTTTTCCCTGACR													
Consensus	gccaana.a.ggggg.t.aacc.....tttt.ccc.aacc...ctccctt.caasaa.gggg...tttt.aaa..taa.tl.cccccaaaaaattttt.cccc.ggg..tt.tttccc.tg.caa													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
1-Malus-pumila-c-v-N	CAAGATGATGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
9-Pyrus-pyrifolia-c	CAAGATGATGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
10-Pyrus-communis-cd	CAAGATGATGATGATGCTAGAGACCTCCAGGAGAGACGCAATGCTGAGAAATATTGGAGACCTCGATTTCGGATCGATTCTCGCATGAAACCGTGAARAAATTAATCTCAGAAATCGAGAG													
2-Hazand2	TTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
3-SH10	TTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
5-Gol-Ghermez	ATGTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
6-Gol-Sefid	TTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
4-GH2	GGGTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
7-Golden-delicious	TTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
8-Pyrus-communis-n.s	TTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTACCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
Consensus	.t.tg.ccggaaaaa.tttt.....ttt.....tt.....gggggg.....atttc.a.....attt.a.ggg...cc.....aaaa.....gaa.....ttt.....aatlcccc													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
1-Malus-pumila-c-v-N	AAATCATGCGCCCAATTTCCCTGAGG--GACGAGTAGAGTGAATTCCTTTAGCAGGACCTTTGGAATCATTCAAAAGAGAGATAG													
9-Pyrus-pyrifolia-c	AAATCATGCGCCCAATTTCCCTGAGGAGGACCAAGTAGAGTGAATTCCTTTAGCAGGACCTTTGGAATCATTCAAAAGAGAGATAG													
10-Pyrus-communis-cd	AAATCATGCGCCCAATTTCCCTGAGGAGGACCAAGTAGAGTGAATTCCTTTAGCAGGACCTTTGGAATCATTCAAAAGAGAGATAG													
2-Hazand2	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
3-SH10	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
5-Gol-Ghermez	GGGTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
6-Gol-Sefid	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
4-GH2	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
7-Golden-delicious	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
8-Pyrus-communis-n.s	GGTTTTTCCCGGAAATTTTATCCCTTTCARATTTGGGGGGGG-----GGGGGGGG--ATTTCCAA--AAATTAARAGGTTTCCCTTAAACCTTTTAAAGGGTTTA--AAATTTCC													
Consensus	g.tttt.ccccc.....aaaaa.....													

شکل ۶- نتایج توالی‌یابی بالادست ژن MYB10 از ناحیه ۲۷۰ تا ۶۷۰. نواحی آبی رنگی در توالی بخشی است که در بیشتر نمونه‌ها دچار تغییر شده و نواحی قرمز رنگ بصورت نواحی حفاظت شده در کلیه نمونه‌ها می‌باشد.



شکل ۷- دندوگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای PCR مربوط به ارقام و ژنوتیپ های سیب مورد آزمایش بر اساس توالی ژن MYB10

جدول ۶- تغییرات توالی در بالادست ژن MYB10 برای نوکلئوتید شماره ۵۵۶-۵۵۵ برای نمونه‌های سیب گوشت قرمز و گوشت سفید

ردیف	ژنوتیپ	تغییر پایه	ملاحظات
۱	<i>Malus pumila c.v Neidzwetzkyana</i>	AG	توالی شاهد از NCBI
۲	<i>Pyrus pyrifolia c.v Yunnan</i>	AG	توالی شاهد از NCBI
۳	<i>Pyrus communis</i>	CG	توالی شاهد از NCBI
۴	Mazand2	TT	نمونه آزمایشی
۵	SH10	TT	نمونه آزمایشی
۶	Gol Ghermez	TT	نمونه آزمایشی
۷	Gol Sefid	TC	نمونه آزمایشی
۸	GH2	CC	نمونه آزمایشی
۹	Golden delicious	TG	نمونه آزمایشی

۱- سیب گوشت قرمز، ۲- گلابی آسیایی، ۳- گلابی اروپایی، ۴- سیب گوشت قرمز مازندران، ۵- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۶- سیب گل قرمز (وحشی) گوشت کمی قرمز، ۷- سیب گل سفید گوشت سفید (وحشی) ۸- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۹- گلدن دلشز

گونه‌های گلابی گروه آسیایی پریفولیا و گونه اروپایی کمونیس دارای نوکلئوتیدهای AAC. ب- گروه با تغییرات GGC شامل دو نمونه مازند ۲ و SH10. ج- گروه با تغییر GGG برای دو نمونه گل قرمز و GH2. د- گروه با تغییر نادر شامل GGT برای گل سفید و GTT برای گلدن دلشز. در این قسمت از ژن نیز ارقام گوشت قرمز ایرانی نسبت به نیای خود دارای جهش نقطه‌ای می‌باشد ولی جهش رقم GH2 باز هم با ارقام گوشت قرمز ایرانی متفاوت بوده است.

همانطور که در جدول (۸) ملاحظه می‌شود تغییرات در نوکلئوتیدهای ۵۸۱-۵۸۲ نمونه‌های مورد آزمایش را به چهار دسته به شرح زیر تقسیم می‌نماید: الف- گروه اول نمونه‌های پایه یا سنتی مورد آزمایش که شامل گونه سیب پومیلا و گونه‌های گلابی گروه آسیایی پریفولیا و گونه اروپایی کمونیس دارای نوکلئوتیدهای CT. ب- گروه با تغییرات GA شامل دو نمونه مازند ۲ و SH10. ج- گروه با تغییرات GG شامل سه نمونه گل قرمز، گل سفید و گلدن دلشز. د- گروه با تغییرات نادر شامل CT برای GH2. ارقام گوشت قرمز مازند ۲ و SH10

می‌نماید: الف- گروه اول نمونه‌های پایه مورد آزمایش که شامل گونه سیب پومیلا و گونه‌های گلابی گروه آسیایی پریفولیا دارای نوکلئوتید AG و گونه اروپایی کمونیس دارای نوکلئوتیدهای CG. ب- گروه با تغییرات TT شامل سه نمونه مازند ۲، گل قرمز و SH10. ج- گروه با تغییرات نادر شامل TC برای گل سفید و CC برای GH2 و TG برای گلدن دلشز. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که ژن سیب‌های گوشت قرمز ایرانی در مقایسه با جدشان سیب گوشت قرمز قزاقستان دارای جهش نقطه‌ای از نوع جهش متقاطع شده‌اند و جهش رقم GH2 نسبت به ارقام مازند ۲ و SH10 متفاوت بوده است. همچنین رقم گل قرمز که دارای هاله‌ای از رنگ قرمز در گوشت است، جهش مشابه‌ای با ارقام گوشت قرمز ایرانی (مازند ۲ و SH10) داشته است.

همانطور که در جدول (۷) ملاحظه می‌شود تغییرات در نوکلئوتیدهای ۴۵۸-۴۵۶ نمونه‌های مورد آزمایش را به چهار دسته به شرح زیر تقسیم می‌نماید: الف- گروه اول نمونه‌های پایه یا سنتی مورد آزمایش که شامل گونه سیب پومیلا و

جدول ۷- تغییرات توالی در بالادست ژن MYB10 برای نوکلئوتید شماره ۴۵۸-۴۵۶ برای نمونه‌های سیب گوشت قرمز و گوشت سفید

ردیف	ژنوتیپ	تغییر پایه	ملاحظات
۱	<i>Malus pumila c.v Neidzwetzkyana</i>	AAC	توالی شاهد از NCBI
۲	<i>Pyrus pyrifolia c.v Yunnan</i>	AAC	توالی شاهد از NCBI
۳	<i>Pyrus communis</i>	AAC	توالی شاهد از NCBI
۴	Mazand2	GGC	نمونه آزمایشی
۵	SH10	GGC	نمونه آزمایشی
۶	Gol Ghermez	GGG	نمونه آزمایشی
۷	Gol Sefid	GGT	نمونه آزمایشی
۸	GH2	GGG	نمونه آزمایشی
۹	Golden delicious	GTT	نمونه آزمایشی

۱- سیب گوشت قرمز، ۲- گلابی آسیایی، ۳- گلابی اروپایی، ۴- سیب گوشت قرمز مازندران، ۵- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۶- سیب گل قرمز (وحشی) گوشت کمی قرمز، ۷- سیب گل سفید گوشت سفید، ۸- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۹- گلدن دلشیز

جدول ۸- تغییرات توالی در بالادست ژن MYB10 برای دی نوکلئوتید شماره ۵۸۲-۵۸۱ برای نمونه‌های سیب گوشت قرمز و گوشت سفید

ردیف	ژنوتیپ	تغییر پایه	ملاحظات
۱	<i>Malus pumila c.v Neidzwetzkyana</i>	CT	توالی شاهد از NCBI
۲	<i>Pyrus pyrifolia c.v Yunnan</i>	CT	توالی شاهد از NCBI
۳	<i>Pyrus communis</i>	CT	توالی شاهد از NCBI
۴	Mazand2	GA	نمونه آزمایشی
۵	SH10	GA	نمونه آزمایشی
۶	Gol Ghermez	GG	نمونه آزمایشی
۷	Gol Sefid	GG	نمونه آزمایشی
۸	GH2	CT	نمونه آزمایشی
۹	Golden delicious	GG	نمونه آزمایشی

۱- سیب گوشت قرمز، ۲- گلابی آسیایی، ۳- گلابی اروپایی، ۴- سیب گوشت قرمز مازندران، ۵- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۶- سیب گل قرمز (وحشی) گوشت کمی قرمز، ۷- سیب گل سفید گوشت سفید (وحشی) ۸- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۹- گلدن دلشیز

جدول ۹- تغییرات توالی در بالادست ژن MYB10 برای نوکلئوتید شماره ۶۲۹-۶۲۸ برای نمونه‌های سیب گوشت قرمز و گوشت سفید

ردیف	ژنوتیپ	تغییر پایه	ملاحظات
۱	<i>Malus pumila c.v Neidzwetzkyana</i>	TG	توالی شاهد از NCBI
۲	<i>Pyrus pyrifolia c.v Yunnan</i>	TG	توالی شاهد از NCBI
۳	<i>Pyrus communis-cds</i>	TG	توالی شاهد از NCBI
۴	Mazand2	GA	نمونه آزمایشی
۵	SH10	GA	نمونه آزمایشی
۶	Gol Ghermez	GG	نمونه آزمایشی
۷	Gol Sefid	GG	نمونه آزمایشی
۸	GH2	AA	نمونه آزمایشی
۹	Golden delicious	GG	نمونه آزمایشی

۱- سیب گوشت قرمز، ۲- گلابی آسیایی، ۳- گلابی اروپایی، ۴- سیب گوشت قرمز مازندران، ۵- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۶- سیب گل قرمز (وحشی) گوشت کمی قرمز، ۷- سیب گل سفید گوشت سفید (وحشی) ۸- سیب گوشت قرمز شاهرود، ۹- گلدن دلشیز

تقسیم می‌نماید: الف- گروه اول نمونه‌های پایه یا سنتی مورد آزمایش که شامل گونه سیب پومیلا و گونه‌های گلابی گروه آسیایی پریفولیا و گونه اروپایی کمونیس و سیب گلدن دلشیز دارای نوکلئوتیدهای TG. ب- گروه با تغییرات GA شامل دو

دارای جهشی متفاوت با نیای خود داشته‌اند، اما رقم GH2 دارای نوکلئوتید یکسان با نیای خود بوده است. همانطور که در جدول (۹) ملاحظه می‌شود تغییرات در نوکلئوتیدهای ۶۲۹-۶۲۸ نمونه‌های مورد آزمایش را به چهار دسته به شرح زیر

در بالادست ژن MYB10 ارقام گوشت قرمز ایرانی مازند ۲ و SH10 شباهت بیشتری نسبت به هم داشته‌اند. رقم GH2 که گوشت قرمز ایرانی می‌باشد شباهت کمتری با دو رقم مذکور داشته است که با نتایج به دست آمده از درختچه فیلوژنی مشابهت داشته است. با توجه به مزایای PCR و نتایج بدست آمده در این پژوهش، توصیه می‌شود که جهت شناسایی مولکولی و مطالعه تنوع ژنتیکی و فیلوژنی و تکاملی سیب از این نشانگر استفاده شود. البته باید توجه داشت که استفاده همزمان از چندین تکنیک و ترکیب اطلاعات حاصل از چندین نشانگر به‌همراه اطلاعات شجره‌ای و مورفولوژیکی نتایج صحیح‌تری از روابط ژنتیکی نسبت به روش‌های جداگانه فراهم می‌کند. از طرفی دیگر به دلیل کارایی تکنیک PCR و مزایای از جمله سادگی و ارزان بودن آن، بررسی ابتدایی منابع ژنتیکی سیب و دیگر گونه‌ها با استفاده از این روش امکان‌پذیر است، لذا پیشنهاد می‌شود شناسایی ابتدایی و بررسی مقدماتی تنوع با این تکنیک صورت پذیرد و در آخر در ادامه این طرح تحقیقاتی توالی‌یابی کامل بالادست ژن MYB10 و انتقال منطقه بالادست ژن MYB10 برای سایر ارقام و گونه‌های سیب گوشت قرمز و سفید پیشنهاد می‌شود. به بیان دیگر افزایش بیان ژن MYB منجر به افزایش نسخه‌برداری ژن‌های مسیر آنتوسیانین شده که در نهایت این رنگدانه، رنگ قرمز را در گیاه سبب می‌شود. نکته قابل توجه اینکه با وجود مزایای زیاد، اما مقدار کم و سطح تولید پایین این مواد در گیاهان قابل تأمل است. یکی از راه‌های حل این مسأله، استفاده از این فاکتورهای رونویسی برای فعال کردن مسیرهای بیوسنتزی است. از این فعال‌کننده‌ها می‌توان به عنوان ابزارهای ملکولی ارزشمند برای مهندسی متابولیت‌های گیاهی در جهت افزایش و تولید ترکیبات با ارزش استفاده کرد (جاننت و مملینک^۸، ۲۰۰۲). به این ترتیب بدون نیاز به دانش کافی در یک مسیر بیوسنتزی و همچنین صرفه‌جویی در زمان می‌توان محصولات مورد نظر را تولید کرد.

نمونه مازند ۲ و SH10 ج-گروه با تغییرات GG شامل سه نمونه گل قرمز و گل سفید و گلند دلشیز د-گروه با تغییر نادر شامل AA برای GH2. همچنین در این قسمت نیز ارقام مازند ۲ و SH10 دارای نوکلئوتیدهای متفاوت با نیای خود بوده و رقم GH2 با آن‌ها متفاوت بوده است. با توجه به محدوده وسیع تشابه ژنتیکی بین ارقام سیب می‌توان گفت که تنوع بین ارقام سیب مورد مطالعه قابل توجه بوده که شاید دلیل آن علاوه بر متفاوت بودن منشا جغرافیایی وجود ارقام داخلی و خارجی باشد. از دلایل احتمالی ایجاد تنوع می‌توان به تنش‌ها که اثر شدیدی در ساختار ژنوم گیاهی دارند و در نتیجه باعث تنوع می‌شوند، اشاره کرد.

نتیجه‌گیری کلی

تنوع ژنتیکی، پایه و اساس بقا گیاهان و بهبود محصولات است (بهنداری^۱ و همکاران، ۲۰۱۷). وجود تنوع در منابع ژنتیکی گیاهان فرصتی را برای اصلاح‌گران گیاه فراهم می‌کند که رقم‌های جدید بهبود یافته‌ای را با صفاتی که هم مطلوب کشاورزان است و هم اصلاح‌گران، توسعه دهند (گویندراج^۲ و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات روز افزون سبب شناسایی ژن‌های MYB تنظیم‌کننده مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهان میوه‌دار مانند سیب (لیانگ^۳ و همکاران، ۲۰۱۹؛ پلونکیت^۴ و همکاران، ۲۰۱۹؛ محمودی^۵ و همکاران، ۲۰۱۲؛ اسپیلی و همکاران، ۲۰۰۷)، انگور (والکر^۶ و همکاران، ۲۰۰۷)، زردآلو (ایکسی^۷ و همکاران، ۲۰۱۹)، هلو، بادام، گلابی، توت‌فرنگی (وانگ^۸ و همکاران، ۲۰۲۰؛ مدینا-پانچی^۹ و همکاران، ۲۰۱۴؛ لین-وانگ^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۰)، برگ هلو (وانگ^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۶)، صنوبر (بیو^{۱۲} و همکاران، ۲۰۲۱) و آلو (فانگ^{۱۳} و همکاران، ۲۰۲۱) شده است. نتیجه مناسبی که از این تحقیق بدست آمد سطح چندشکلی بالا بین ارقام ایرانی و خارجی سیب بود که نشان می‌دهد ایران می‌تواند یکی از مراکز تنوع سیب باشد. برطبق نتایج حاصله از تغییرات توالی

8. Wang
9. Medina-Puche
10. Lin-Wang
11. Wang
12. Bu
13. Fang
14. Gantet and Memelink

1. Bhandari
2. Govindaraj
3. Jiang
4. Plunkett
5. Mahmoudi
6. Walker
7. Xi

منابع

- فرامرزی، ش. ۱۳۸۹. مطالعه صفات مورفولوژیک و تنوع ژنتیکی سیب‌های گوشت قرمز ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. پایان نامه کارشناسی‌ارشد دانشگاه تربیت مدرس.
- فرامرزی، ش.، یدالهی، ع.، برزگر، م. و کریم‌زاده، ق. ۱۳۹۴. مقایسه مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی میوه سیب گوشت قرمز و تعدادی از ارقام سیب گلاب. به‌زراعی کشاورزی، ۱۷(۳): ۷۲۹-۷۴۱.
- فرامرزی، ش.، یدالهی، ع.، حاج‌نجاری، ح.، شجاعیان، ع. و دامیار، س. ۱۳۹۳. بررسی صفات مورفولوژیک سیب‌های گوشت قرمز ایرانی در مقایسه با تعدادی از ارقام بومی و تجاری. به‌زراعی کشاورزی، ۱۶(۱): ۱-۱۰.
- میرمحمدی‌میبدی، ع.م. ۱۳۸۲. اصلاح نباتات در باغبانی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲۲۴ ص.
- Allan, A.C., Hellens, R.P. and Laing, W.A., 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in plant science, 13(3): 99-102.
- Andersen, O.M. and Jordhein, M. 2006. The anthocyanins. In: O.M. Andersen and K.R. Markham (Eds.). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. London, CRC Press. 471-552.
- Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H. and Moriguchi, 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 and cell physiology, 48(7): 958-970.
- Bhandari, H.R., Bhanu, A.N., Srivastava, K., Singh, M.N. and Shreya, H.A. 2017. Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. Advances in Plants and Agriculture Research, 7(3): 279-286.
- Bouvier, L., Lespinasse, Y. and Schuster, M., 1999, September. Karyotype analysis of a haploid plant of apple (*Malus domestica*). In Eucarpia symposium on Fruit Breeding and Genetics 538 (pp. 321-324).
- Breseghele, F. and Sorrells, M.E., 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. Crop Science, 46(3): 1323-1330.
- Bu, Y., Wu, X., Sun, N., Man, Y. and Jing, Y. 2021. Codon usage bias predicts the functional MYB10 gene in *Populus*. Journal of plant physiology, 265: 153491.
- Chagné, D., Carlisle, C.M., Blond, C., Volz, R.K., Whitworth, C.J., Oraguzie, N.C., Crowhurst, R.N., Allan, A.C., Espley, R.V., Hellens, R.P. and Gardiner, S.E. 2007. Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. BMC genomics, 8(212): 1-11.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G. 2001. Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theoretical and Applied Genetics, 103: 1115-1122.
- Chen, L., Hu, B., Qin, Y., Hu, G. and Zhao, J. 2019. Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors. Plant physiology and biochemistry, 136: 178-187.
- D'Abrosca, B., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C. and Fiorentino, A. 2007. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. Food chemistry, 104(4): 1333-1337.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin.
- Espley, R.V., Brendolise, C., Chagne, D., Kutty-Amma, S., Green, S., Volz, R., Putterill, J., Schouten, H.J., Gardiner, S.E., Hellens, R.P. and Allan, A.C. 2009. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. The Plant Cell, 21(1): 168-183.
- Espley, R.V., Hellens, R.P., Putterill, J., Stevenson, D.E., Kutty-Amma, S. and Allan, A.C. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. The Plant Journal, 49(3): 414-427.
- Fang, Z.Z., Lin-Wang, K., Zhou, D.R., Lin, Y.J., Jiang, C.C., Pan, S.L., Espley, R.V., Andre, C.M. and Ye, X.F. 2021. Activation of PsMYB10. 2 transcription causes anthocyanin accumulation in flesh of the red-fleshed mutant of 'Sanyueli' (*Prunus salicina* Lindl.). Frontiers in Plant Science, 12: p.680469.
- Gantet, P. and Memelink, J. 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. Trends in Pharmacological Sciences, 23(12): 563-569.

- Govindaraj, M., Vetriventhan, M. and Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*, 2015. 1-14.
- Harris, S.A., Robinson, J.P. and Juniper, B.E., 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS in Genetics*, 18(8): 426-430.
- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F. and McFerson, J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus× domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and applied genetics*, 97: 671-683.
- Janick, J., Cummins, J.N., Susan, K., Brown, S.K. and Hemmat, M. 1996. Apple In: *Fruit Breeding*, Vol. 1: *Tree and Tropical Fruit*, J. Janick and Moore, J.N. (eds.) John Wiley and Sons, Inc. 1-77.
- Jiang, S., Chen, M., He, N., Chen, X., Wang, N., Sun, Q., Zhang, T., Xu, H., Fang, H., Wang, Y. and Zhang, Z. 2019. MdGSTF6, activated by MdMYB1, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple. *Horticulture Research*, 6, p.40.
- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K. and Gupta, V.S. 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77: 230-240.
- Kando, S. 2009. Fruit ripening and characteristics regulated by physiologically active substances. *Fresh Produce Journal (Special Issue)*, 17: 7-11.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N., 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16(2), pp.123-132.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5): 923-933.
- Lancaster, J.E. and Dougall, D.K., 1992. Regulation of skin color in apples. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(6), pp.487-502.
- Lespinasse, Y., Bouvier, L., Djulbic, M. and Chevreau, E., 1996. Haploidy in apple and pear. In *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics* 484: 49-54.
- Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T.K., Espley, R.V., Hellens, R.P. and Allan, A.C. 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC plant biology*, 10: 1-17.
- Mahmoudi, E., Mohammad, S.B., Yadollahi, A. and Hosseini, E. 2012. Independence of color intensity variation in red flesh apples from the number of repeat units in promoter region of the MdMYB10 gene as an allele to MdMYB1 and MdMYBA. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10: 153-160.
- Martin, C. and Paz-Ares, J., 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 13(2), pp.67-73.
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., Hoffmann, T., Ring, L., Rodríguez-Franco, A., Caballero, J.L., Schwab, W., Muñoz-Blanco, J. and Blanco-Portales, R. 2014. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria×ananassa* fruits. *Journal of experimental botany*, 65(2): 401-417.
- Plunkett, B.J., Henry-Kirk, R., Friend, A., Diack, R., Helbig, S., Mouhu, K., Tomes, S., Dare, A.P., Espley, R.V., Putterill, J. and Allan, A.C. 2019. Apple B-box factors regulate light-responsive anthocyanin biosynthesis genes. *Scientific reports*, 9(1):17762.
- Raddova, J., Beránek, M., Oukropec, I. and Vachůn, M. 2003. RAPD analysis of peaches within Czech National Collection. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39(4): 113.
- Ramsay, N.A. and Glover, B.J. 2005. MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant science*, 10(2): 63-70.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G Reuber, L.C.-Z. Jiang , C-Z Keddie, J Adam, L., Pineda, O Ratcliffe, O.J and Yu, G.L. 2000. *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 5490 (299):2105-2110.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., and Paz-Ares, J. 1998. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 14(3): 273-284.
- Rupasinghe, H.P., Huber, G.M., Embree, C. and Forsline, P.L. 2010. Red-fleshed apple as a source for functional beverages. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 90: 95-100.

- Schwarz, H.P., Braun, P. and Keiciier, R. 2009. Red apple juice: breeding, drink-and growing technology for the development of a new, innovative product. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 66(1): 218-231.
- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 4(5): 447-456.
- Sun-Waterhouse, D., Luberriaga, C., Jin, D., Wibisono, R., Wadhwa, S.S. and Waterhouse, G.I.N. 2013. Juices, fibres and skin waste extracts from white, pink or red-fleshed apple genotypes as potential food ingredients: A comparative study. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 377-390.
- Takos, A.M., Jaffé, F.W., Jacob, S.R., Bogs, J., Robinson, S.P. and Walker, A.R. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant physiology*, 142(3) 1216-1232.
- Tatum, T.C., Stepanovic, S., Biradar, D.P., Rayburn, A.L. and Korban, S.S. 2005. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. *Genome*, 48(5): 924-930.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. and Zhu, H., 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21): 6347-6353.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M. and Amir, R. 2007. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23): 9559-9570.
- Umikalsom, Y., Grayer-Barkmeijer, R.J. and Harborne, J.B., 1994. A comparison of the flavonoids in *Athyriaceae* and *Aspleniaceae*. *Biochemical systematics and ecology*, 22(6), pp.587-594.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A., Thomas, M.R. and Robinson, S.P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 49(5) 772-785.
- Wang, H., Zhang, H., Yang, Y., Li, M., Zhang, Y., Liu, J., Dong, J., Li, J., Butelli, E., Xue, Z. and Wang, A. 2020. The control of red colour by a family of MYB transcription factors in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5) 1169-1184.
- Wang, X.Q., Han, J., Wen, Y., Jiang, W.B., Fang, J.G., Zhang, B.B. and Ma, R.J. 2016. Cloning and bioinformatic analysis of transcription factor MYB10 from the red-leaf peach. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15(4).
- Way, R.D., Aldwinckle, H.S., Lamb, R.C., Rejman, A., Sansavini, S., Shen, T., Watkins, R., Westwood, M.N. and Yoshida, Y. 1991. Apples (*malus*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290: 3-46.
- Xi, W., Feng, J., Liu, Y., Zhang, S. and Zhao, G. 2019. The R2R3-MYB transcription factor PaMYB10 is involved in anthocyanin biosynthesis in apricots and determines red blushed skin. *BMC plant biology*, 19: 1-14.
- Yan, H., Pei, X., Zhang, H., Li, X., Zhang, X., Zhao, M., Chiang, V.L., Sederoff, R.R. and Zhao, X. 2021. MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6): 3103-3121.
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q. and Yunping, S. 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant molecular biology*, 60: 107-124.
- Zhou-Zhi, Q. 1999. The apple genetic resources in China: The apple species and their distributions, informative characteristics and utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46: 599-609.