مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال هشتم، شماره بیست و هفت،زمستان ۹۵

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور *Vitis vinifera* با استفاده ازنشانگر مولکولی ISSR

عطیه خلخالی[۱]، حسین عباسپور[۲]

تاریخ دریافت: ۹٤/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۹/۰۳

چکیده

انگور یکی از محصولات مهم باغی در دنیا و ایران به شمار می‌رود و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است لذا هدف در این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مطرح انگور (*Vitis vinifera*) در سطح مولکولی توسط نشانگر ISSR بود. به منظور استخراج DNA از روش تغییر یافته Doyle and Doyle استفاده شد و در گام بعد ۱۲ ژنوتیپ با ۱۲ آغازگر مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای با دو نرم‌افزارPopGen32 و SPSS9 انجام شد. خوشه‌بندی حاصل با هردو نرم افزار واریته‌ها را در ۵ گروه مجزا قرار داد. در تجزیه داده‌ها، درصد پلی‌مورفیسم ۹٦/٤۹ درصد و تعداد لوکوس پلی‌مورف ۵۵ بدست آمدند. ضریب کوفنتیک برای ضریب تشابه جاکارد و نی، ۰/۸ است که نشان دهنده برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی است. نتایج نشان داد که در مجموع ۳۵۳ باند توسط این نشانگرها تولید شد. اندازه باندها بین ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. در این بین بیشترین تشابه برای واریته‌های ۱ و ۷ با مقدار ۰/٦۱۹ و کمترین تشابه برای واریته‌های ۱۰و ۲ با مقدار ۰/۲۰۵ بود. از آنجا که بیشترین میزان باند توسط آغازگر a (٥٦ باند) مشاهده شد، این آغازگر بهتر از سایر آغازگرها توانست فاصله ژنتیکی واریته‌های مربوط به آغازگر را مشخص کند.

واژه‌های کلیدی: انگور ، مارکر مولکولی، تنوع ژنتیکی، آنالیزهای استاتیک، درخت فیلوژن

خلخالی، ع. وح. عباسپور. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور *Vitis vinifera* با استفاده ازنشانگر مولکولی ISSR. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۲۷: ۲٤۵-۲۳۵.

۱-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه ازاد اسلامی واحد دامغان

۲-دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان مسئول مکاتبات: پست الکترونیک: Abbaspour75@yahoo.com

مقدمه

انگور از تیره Amplidaceae است که آن را Vitaceae نیز می‌نامند. گونه‌هایی که در موکاری استفاده می‌شوند و ارزش تجاری دارند از جنس Vitis هستند (جداری کوهی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین این گیاه دارای ٦۰ گونه است که مهمترین آن vinifera است (ارسیسلی و همکاران، ۲۰۰۸). استفاده از انگور محدود به میوه رسیده نیست بلکه، برگ و میوه نارس آن به صورت غوره مصرف غذایی دارد. (کریمی‌شهری وهمکاران، ۱۳۹۱). کلیه قسمت‌های درخت انگور قابل استفاده دارویی است و دارای خواص بسیاری از جمله دفع سموم بدن، تقویت کبد، موثر در درمان سل، سیاه سرفه، نقرس و غیره میباشد (نراقی، ۱۳۸۹).

به دلیل حجم زیاد ژرم‌پلاسم انگور در نواحی مختلف اکولوژیکی کشور تاکنون بیش از ۲۵۰ رقم از آنها گزارش شده است. در سالهای اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزاری توانمند برای شناسایی چندشکلی و مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (گالت و همکاران، ۱۹۹۸)، (زیتکیویز و همکاران، ۱۹۹٤)، (دانورکار، ۲۰۰۵). تنوع زیستی برای تضمین تولید مواد غذایی و دارویی در آینده، حفظ ذخایر توارثی موجود در طبیعت دست نخورده و بکر، امری ضروری است (مجنونیان و همکاران، ۱۳۸۲). تنوع ژنتیکی که مرحله ای از تنوع زیستی است روشی برای آن است که جمعیت یک گونه به دگرگونی‌های محیط طبیعی وفق پیدا کند (گروم و همکاران، ۲۰۰٦). پیش شرط استفاده از ذخایر توارثی، شناسایی و مطالعه تنوع ژنتیکی صفات مختلف در آنهاست. با توجه با این مورد که برای اصلاح یک صفت بایستی تنوع کافی در دسترس باشد تا به اصلاح آن اقدام کرد؛ اگر تنوع نباشد نمی‌توان گزینش انجام داد. کاهش تنوع ژنتیکی علاوه بر اینکه بازدهی برنامه اصلاحی را کاهش می‌دهد باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب‌پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی می‌گردد (استراس و لانکو، ۲۰۰۷).

امروزه با توجه به توسعه نشانگرهای DNA و قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی آنها، بطور گسترده ای از این نشانگرها در کشاورزی استفاده می شود (آمیراجو و همکاران، ۲۰۰۱). نشانگرهای مولکولی می توانند اطلاعاتی در مورد اهمیت خصوصیات تنوع، نظیر جربان ژنی و الگوی اصلی یک جمعیت، در اختیار محقق قرار داده (هادکینگ و راماناتا، ۲۰۰۲) و پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (فرگوسون و همکاران، ۱۹۹۵). یکی از این نشانگرها ISSR می باشد که می توان از آن به عنوان ابزاری مفید در نقشه یابی و انگشت نگاری ژنتیکی استفاده کرد. این روش به DNA الگوی کمی نیاز داشته و به علت طول زیاد آغازگرها، دمای بالای اتصال، سرعت و سادگی فنی و رفتار مندلی ممکن است به سرعت ابزاری با ارزش برای تجزیه ژنوم گیاه در آینده محسوب شوند (آمیراجو و همکاران، ۲۰۰۱). بر اساس یافته های سوفرامانین و گوپال کریشنا (۲۰۰٤) که مبتنی بر مقایسه بین نشانگرهای ISSR و RAPD بوده است، مشخص شد که نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارند. در سال ۱۳۹۱ سیدی مرادی و همکاران، به مطالعه ارزیابی روابط ژنتیکی ۲۱ رقم بومی انگور استان کردستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR پرداختند که بر این اساس ژنوتیپ ها به ٤ گروه مجزا تقسیم شدند. همچنین در سال ۲۰۱۲ بیان کردند حفاظت و خصوصیات منابع ژنتیکی انگور (*Vitis vinifera*) در بانک‌های ژرم‌پلاسم، اساس استفاده آنها در برنامه‌های اصلاحی بوده است که سبب توسعه ارقام جدید می‌شود. در آزمایش آرگاد و همکاران (۲۰۰۹) ٤۳ واریته انگور بیدانه (*Vitis vinifera*) با استفاده از ١٤ پرایمر ISSR ارزیابی شدند. گروه‌بندی کلی بر اساس خصوصیات موفولوژیکی و شجره‌نامه بود که ثابت‌کننده سودمندی مارکرهای ISSR برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته‌های انگور بود. با توجه به یافته علیزاده و سین (۲۰۰۹)، که برآورد ثبات ژنتیکی گیاهچه‌های ریزازدیاد شده مشتق شده از سه ژنوتیپ پایه مادری مختلف انگور بود، ایجاد گیاهچه‌های انگور پایدار ژنتیکی را ثابت کرد و کاربرد پروتکل ریزازدیادی برای مقیاس تجاری توسعه یافته است. در سال ۲۰۰۷ مانجوشا و همکاران، تنوع و روابط ژنتیکی میان برخی واریته‌های انگور را به کمک ISSR-PCR بررسی کردند که نتایج بیان داشت، در میان ارقام مختلف انگور، *Vitis vinifera* تنوع بیشتری را توسط شکل‌گیری زیرخوشه‌ای مجزا بر اساس رنگ، عطر و طعم و بذر آنها را آشکار ساخت.

چوداری و همکاران (۲۰۱٤) نیز با بررسی تمایز ژنتیکی انگور با ISSR نشان دادند که قدرت حل و فصل پرایمرهای ISSR مابین ۳ و ۱۰، ارزش PIC از ۰/۷۸ تا ۰/۸۸ و شاخص نشانگر (MI) از ۳/۸۹ تا ۸/۸۰ با ارزش متوسط ٦/١٤ و ٦/٨٨ به ترتیب

قرار گرفته‌اند. و بیان کردند که ISSR می‌تواند وسیله‌ای مناسب برای تکامل تنوع ژنتیکی میان ارقام انگور باشد. تامهانکار و همکاران (۲۰۰٦) بیان کردند مطالعه روابط ژنتیکی در انگورها نه تنها برای اصلاح مهم است بلکه برای مطالعات تکاملی و حفظ ژرم‌پلاسم با اهمیت است. بر اساس تحقیق آنها که جداسازی واریته های انگور با استفاده از نشانگر ISSR بود، مشاهده شد که واریته‌های متعلق به *Vitis vinifera* تنوع زیادی دارند. آنها بیان کردند نشانگرهای ISSR به نظر می‌رسد برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته‌های انگور کارآمد و قابل اطمینان باشند. دانورکار و همکاران (۲۰۰۵) نیز با ارزیابی روابط ژنتیکی میان واریته‌های انگور در هند نشان دادند که ISSR یک سیستم مارکری کارآمد و قابل اطمینان برای تجزیه و تحلیل ارقام انگور است و واریته‌های متعلق به *Vitis vinifera* به نظر رسیدند که بسیار متنوع می‌باشند. با توجه به بررسی نوین و همکاران (۲۰۱۱) بر چندشکلی مورفولوژیکی و ISSR در برخی از انگورهای مصری، گزارش کردند که چگونه تجزیه و تحلیل ذکر شده می‌تواند نشانگرهای مناسبی برای برآورد تکامل تنوع ژنتیکی انگور و به عنوان معیار در تعیین رقم و مطالعه روابط فیلوژنی میان ارقام را فراهم کند. همچنین این صفات برای حفظ ژنتیکی در این محصول مفید بودند. بنابراین این آزمایش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و میزان قرابت خویشاوندی واریته های انگور در استان سمنان با استفاده از نشانگر ISSR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

رقم انگور از مرکز تحقیقات شاهرود جمع‌آوری شد (جدول ۱). در این آزمایش برگ به عنوان بافت مورد نظر برای استخراج DNA انتخاب گردید. در آزمایشگاه برای جلوگیری از هضم DNA ژنومی توسط آنزیم‌های خود سلول، نمونه‌ها به یخچال ۲۰oC – منتقل گردیدند.

استخراج DNA

مواد مورد استفاده در تخلیص DNA: Tris-HCl، Ethylenediamine- tetra acetic acid- (EDTA) carboxyle، Sodium dodecyl sulfate(SDS)، Phenol، Chloroform، Isoamylalchole، Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)، NaCl، Proteinase K، RNase A، Isopropanol، Ethanol (70%) و آب دو بار تقطیر. در این پژوهش، از روش تغییریافته Doyle&Doyle استفاده شد.

جدول ۱- ارقام انگور مورد آزمایش

ردیف	کد	نام رقم
۱	٦۰۰۱	سبزمال کاشمر
۲	٦۰۰۲	شاه پسند
۳	٦۰۰۳	فخری نیشابور
٤	٦۰۰٥	سبز درگز
٥	٦۰۰۹	طرقی کاشمر
٦	٦۰۱۰	شاهانی
۷	٦۰۱۱	خلیلی بیدانه قوچان
۸	٦۰۱۲	کلدری بیرجند
۹	٦۰۱۳	پیر قلی شماره ۱
۱۰	٦۰۱٤	پیر قلی شماره ۲
۱۱	٦۰۱٥	خلیلی نر قوچان
۱۲	٦۰۱٦	شغالی نیشابور

مراحل استخراج: به منظور بالا رفتن کیفیت کار، بافر استخراج هر روز درست و استفاده می‌شد. به میکروتیوپ‌های حاوی بافر استخراج، ۱٪ مرکاپتواتانول و ۲٪ PVP به منظور حذف ترکیبات پلی‌فنولی اضافه شد. میکروتیوپ‌ها به حمام آب گرم به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند چراکه فعالیت بافر CTAB در ٦٥ درجه‌ی سانتیگراد است. پس از ضدعفونی بافت برگی ۰/۳تا ۰/۷ گرم از آن را به همرا ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB گرم شده درون هاون ساییده شد تا محلول نرم و یکنواختی به دست آید. نمونه‌ی حاصله به میکروتیوپ تمیز منتقل شده و ۷ تا ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن افزوده شد. نمونه‌ها به حمام آب گرم ٦٥ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ٤٥ دقیقه قرار گرفتند و مداوم تکان داده شدند. سپس داخل میکروفیوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. به محلول مورد نظر ایزوآمیل الکل-کلروفرم-فنل با نسبت ۲٥:۲٤:۱ به هر نمونه اضافه گردید. پس از تکان محلول میکروفیوژ rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. لایه شفاف فوقانی با دقت به کمک سمپلر جدا شد. به محلول مورد نظر ایزوآمیل الکل-کلروفرم-فنل به هر نمونه اضافه گردید. سپس سانتریفوژ نمونه‌ها انجام شد و سوپرناتانت به میکروتیوپ جدید منتقل گردید. در این مرحله به هر نمونه ۲/۳ حجم ایزوپروپانول سرد افزوده و سپس

میکروتیوپ‌ها چندین بار به آرامی اینورت کرده تا به تدریج رشته‌های DNA ظاهر شدند. نمونه‌ی مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- فریزر قرار داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۲۰۰ دور، میکروفیوژ شدند. محلول رویی را خارج کرده و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده شد. میکروفیوژ به مدت ۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور تا نمک‌های موجود به طور کامل شسته شوند. نمونه را در معرض هوا قرار داده تا اتانول باقی مانده در میکروتیوپ حذف شود سپس با توجه به رسوب مورد نظر به نمونه ها آب دو بار تقطیر افزوده شد.

پس از استخراج ماده وراثتی، کیفیت نمونه‌های دی ان ای با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۵ درصد در بافـر TBE x ۰/۵ و کمیت آنها با استفاده از روش اسپکترفتومتری تعیین شد.

انتخاب آغازگرها

در این پژوهش از ۱۲ آغازگر سنتز شده توسط شرکت محترم سیناکلون انجام شد. جدول ۲، توالی و نام آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش‌های تکثیر را نشان می‌دهد.

انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱۲ پرایمر آورده شده در جدول ۲ که از سایت دانشگاه کلمبیا انتخاب و توسط شرکت سینا کلون سنتز شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر با توجه به جدول ۳ انجام گرفت.

جدول ۲- ویژگی مربوط به آغازگرها

توالی آغازگر(۳′-۵′)	نام آغازگر	ردیف
۵ -vhvgtgtgtgtgtgtgtgt-۳′	Ubc۸۹۰	۱
۵-gagagagagagagagayc-۳′	Ubc۸٤۱	۲
۵ -gagagagagagagagac-۳′	Ubc۸۱۱	۳
۵ -agagagagagagagagca-۳′	Ubc۸۳٦	٤
۵- gagagagagagagagayt-۳′	Ubc۸٤۰	۵
۵ - gagagagagagagagayt -۳′	Ubc۸٤۲	٦
۵-acacacacacacacacyg-۳′	Ubc۸۵۷	۷
۵-cacacacacacaag-۳′	A۱۷۸۹۹	۸
۵- (gt)8c-۳′	Ubc۸۲۰	۹
۵-ACACACACACACACACT-۳′	Ubc۸۲۵	۱۰
۵-CACACACACACACACAG-۳′	Ubc۸۱۸	۱۱
۵-ATTAGCGCTTAATATAGG-۳′	Ubc۸۷۹	۱۲

جدول۳- غلظت مواد به کار رفته در واکنش زنجیره پلی‌مراز

مواد واکنش	غلظت	مقدار	غلظت نهایی در واکنش
PCR Buffer	۱۰x	۲/۵ میکرولیتر	۱x
dNTPs	۰/۲ میلی‌مولار	۱/۵ میکرولیتر	۰/۸ میلی‌مولار
Primer mix	۱۰ میکرومولار	۱.۲ میکرولیتر	۰/۲ میکرومولار
Taq DNA Polymeras	۵ واحد/میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر	۱ واحد
MgCl2	۵۰ میلی مولار	۰.۷۵ میکرولیتر	۱.۵ میلی‌مولار
dd H2O	ـــــ	۱۷/۸ میکرولیتر	ـــــ
DNA	۲۵نانوگرم	میکرولیتر ۱	۲۵ نانوگرم

در نهایت پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل Reccobet با چرخه دمایی یک سیکل ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه که واسرشته‌سازی اولیه در این مرحله رخ می‌دهد در گام بعد ۳۵ سیکل که واسرشت دومین در ۹٤ درجه به مدت ۷ ثانیه، ۳٦ درجه ٤۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به عنوان بسط نهایی ۷ دقیقه انجام گردید (یو، ۱۹۹۲).

الکتروفورز فرآورده‌هایPCR

مواد مورد استفاده در الکتروفورز دی ان ای ژنومی و محصول پی سی آر: (D.D.W) آب دو بار تقطیر، Ethylenediamine-tetra acetic acid-carboxyle (EDTA)، Buric acid، Agarose، Tris-base، رنگ Safe Stain و Lader 1kb. به منظور کنترل تکثیر فرآورده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز، ۸ میکرولیتر از فراورده‌های یک یا دو واکنش اول بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید.

از خط کشی ژنی (لدر) 1kbساخت فرمنتاز آلمان به منظوره بررسی باندهای پی سی آر استفاده شد. با توجه به دفترچه راهنمای خود سیستم، توان ثابت ۸۰ وات مورد استفاده قرار گرفت. زمان الکتروفورز نیز با توجه به وزن نوارهای حاصل از پی سی آر بر حسب جفت باز در این پژوهش و با توجه به نتایج آزمایشات اولیه و بهینه‌سازی شرایط الکتروفورز ۱۲۰–۱۵۰ دقیقه زمان مناسبی برای تفکیک محصولات پی سی آر از یکدیگر تشخیص داده شد.

نتایج و بحث

تعیین کمیت و کیفیت دی ان ای ژنومی

در این پژوهش به منظور استخراج دی ان ای، از روش Doyle and Doyle استفاده شد، نتایج نشان داد روشی که از ترکیب PVP وCTAB، هرکدام به میزان ۲٪ استفاده شود روش مناسبی جهت استخراج دی ان ای گیاه انگور می‌باشد؛ چرا که CTAB به منظور حذف پلی‌ساکاریدها و PVP به‌منظور حذف ترکیبات پلی‌فنولی از طریق شکل‌گیری پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی‌فنولی اضافه شدند. آلودگی با ترکیبات پلی‌فنولی باعث افزایش ویسکوزیته‌ی محلول شده وOD، ۲٦۰/۲۸۰ پایین‌تر از ۱/٦ خواهد بود (مالیاکال، ۱۹۹۲).

نتایج حاصل از تکثیر قطعات دی ان ای

برای انجام این مطالعه از ۱۲ آغازگر استفاده شد که ۸ پرایمر باندهای الکتروفورزی مشخص تولید نمودند. کلیه‌ی آغازگرهای بکار رفته دارای ٦۰ تا ۷۰ درصد G + C بودند و توالی هیچ کدام از آغازگرها، دارای بخش‌های خود مکملی نبودند. هر آغازگر تعدادی باند تولید کرد که تنها باندهایی که بطور واضح قابل مشاهده بودند امتیازبندی و به منظورگروه‌بندی اکوتیپ‌ها انتخاب شدند. مشخصات باندهای حاصل از ۸ آغازگر در جدول ٤ مرتب شده است . همچنین نمودار ستونی تعداد کل باندهای حاصله توسط هر آغازگر در شکل ۱ ترسیم شده است.

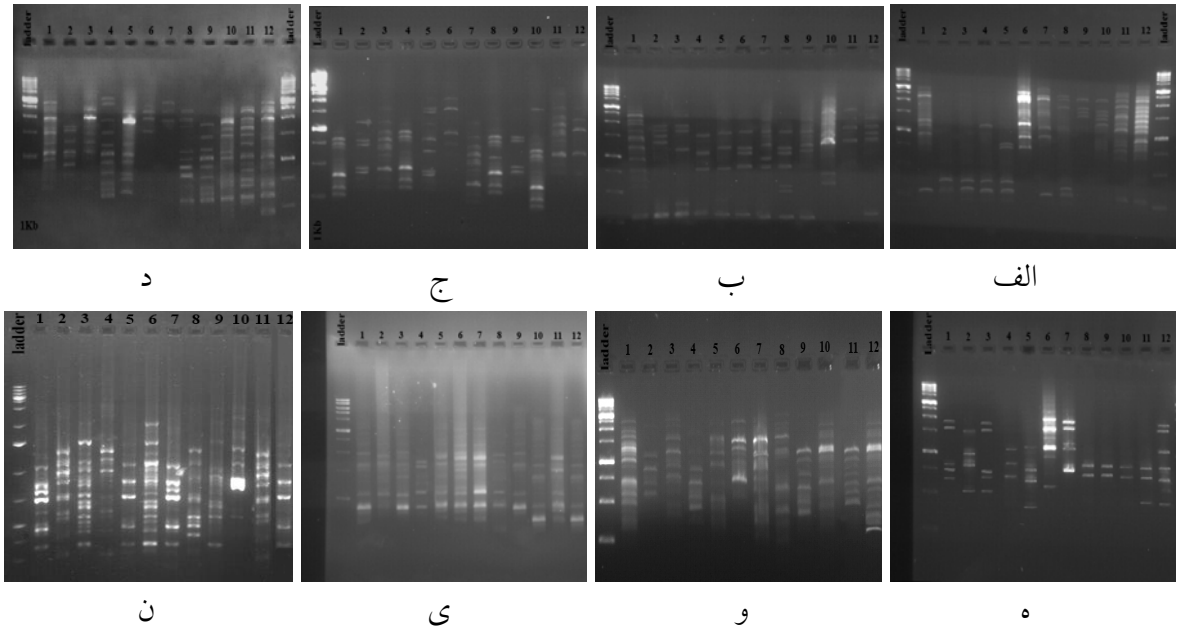
جدول ٤- نتایج حاصل از امتیازدهی باندهای ژل و تجزیه و تحلیل آنها

ردیف	آغازگر	دامنه انتخاب باندها	تعداد کل باندها	تعداد لوکوس	لوکوس چندشکلی
۱	A	۲۵۰–۲۵۰۰	۵٦	۸	۷
۲	۸٤۲	۲۰۰–۳۰۰۰	٤۱	۷	۷
۳	۸٤۰	۳۰۰–۲۰۰۰	٤۵	۹	۹
٤	۸۵۷	۵۰۰–۳۰۰۰	۳۹	٦	٦
۵	۸۱۱	۲۵۰–۳۵۰۰	٤۳	۸	۸
٦	۸۳٦	۲۰۰–۲۵۰۰	۳٦	٦	٦
۷	۸۹۰	۲۰۰–۲۵۰۰	٤۸	۷	۷
۸	۸٤۱	۲۰۰–۲۰۰۰	٤۵	٦	۵

به طور کلی در مجموع ۳۵۳ باند توسط کل نشانگرها به وجود آمد که از این میان بیشترین تعداد باند به دست آمده مربوط به آغازگر a با ٥٦ باند و کمترین تعداد باند بدست آمده مربوط به آغازگر ۸۳٦ با ۳٦ باند است. ازآنجا که دامنه انتخاب باندها از ۳۵۰۰-۲۰۰ جفت باز تعیین شد، آغازگر ۸۱۱ با داشتن قطعاتی با ۳۵۰۰ جفت باز دارای بزرگترین اندازه دی ان ای و ٤ آغازگر ۸٤۱، ۸۹۰، ۸۳٦ و ۸٤۲ با دارا بودن قطعاتی به اندازه ۲۰۰ جفت باز دارای کوچکترین اندازه دی ان ای می‌باشند.

نتایج این آزمایش نشان میدهد که آغازگر ۸٤۰ دارای بیشترین تعداد لوکوس میباشد (۹ لوکوس) که همه لوکوس‌ها چندشکلی را نشان دادند (۱۰۰٪) و بیشترین سهم چندشکلی را دارا بود. همچنین کمترین تعداد لوکوس‌ها در آغازگرهای ۸۵۷، ۸۳٦ و ۸٤۱ با ٦ لوکوس بودند که از میان اینها آغازگر ۸٤۱ ، ۵ لوکوس چندشکلی را نشان داد که با کمترین تعداد لوکوس چندشکلی در میان سایر آغازگرها بود.

به غیر از آغازگرهای a و ۸٤۱ که به ترتیب ۸۷/۵ و ۸۳/۳ درصد چندشکلی داشتند، سایر آغازگرها دارای ۱۰۰ درصد چندشکلی از میان لوکوس های خود بودند. در این آزمایش ۲ آغازگر (a و ۸٤۱) در ۲ لوکوس دارای یک شکلی(منومورف) بودند و در ۵۵ لوکوس دیگر تولید شده توسط این ۸ آغازگر چندشکلی مشاهده شد.



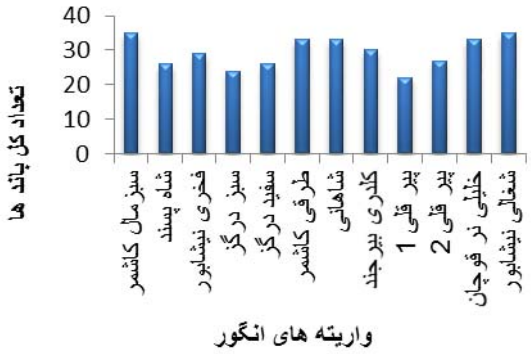
شکل ۱- الف) واکنش زنجیره پلی‌مراز آغازگرهای ۸۱۱ با ۱۲ نمونه انگور، ب) ۸۳٦ با ۱۲ نمونه، ج) ۸٤۰ با ۱۲ نمونه، د) ۸٤۱ با ۱۲ نمونه، ه) ۸٤۲ با ۱۲ نمونه، و) ۸۵۷ با ۱۲ نمونه، ی) a با ۱۲ نمونه و ن) ۸۹۰ با ۱۲ نمونه.

این نتایج بیان داشت نشانگرهای ISSR می‌تواند پلی‌مورفیسم بالایی را در بین ژنوتیپ‌های انگور و هیبریدهای آنها تعیین کند، و همچنین تکنیک ISSR روش مناسبی برای تعیین تنوع ژنتیکی در بین ارقام انگور می‌باشد (قریشی و همکاران، ۱۳۹۱).

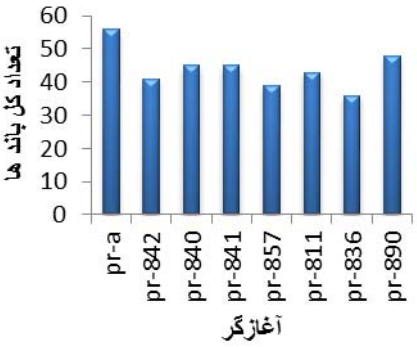
با توجه به نتایج حاصل از مشاهده کل باندهای بدست آمده از ۱۲ واریته انگور، به ازای کلیه آغازگرهای استفاده شده بیشترین تعداد این باندها در ارقام سبزمال کاشمر، شغالی نیشابور با ۳۵ باند و پس از آنها در ارقام طرقی کاشمر، شاهانی و خلیلی نر قوچان با ۳۳ باند مشاهده شد. کمترین میزان باندهای بدست آمده به ازای کلیه آغازگرها نیز در ارقام پیرقلی ۱ با ۲۳ باند و سبز درگز با ۲٤ باند بود (نمودار ۱:الف).

همچنین نتایج بدست آمده از تکثیر قطعات دی ان ای ۱۲ واریته انگور نشان داد، بیشترین تعداد کل باندهای بدست آمده

توسط آغازگر a با ۵۵ باند مشاهده شد. پس از آن پرایمر ۸۹۰ با ٤۸ باند در مرتبه بعدی قرار گرفت و کمترین تعداد باند تشکیل شده با آغازگر ۸۳٦ با ۳٦ باند بود (نمودار ۱:ب).



الف



ب

نمودار ۱- الف) تعداد کل باندهای تولید شده در هر واریته به ازای کلیه آغازگرهای استفاده شده و ب) تعداد کل باند های حاصل از هر آغازگر

این نتایج با نتایج رمضانی و همکاران (۱۳۸٦) مطابقت داشت، مبنی بر اینکه نشانگرهای استفاده شده در تمام ژنوتیپ‌ها چندشکلی بالایی نشان دادند. لذا تکنیک ISSR یک مجموعه نشانگری مفید برای شناسایی ژنتیکی انگورهای ایرانی به حساب می‌آید. همچنین این نتایج در تطابق با نتایج سیدی مرادی و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشت، انگشت‌نگاری ISSR می‌تواند برای کشف چندشکلی برای ژنوتیپ‌های انگور استفاده شود.

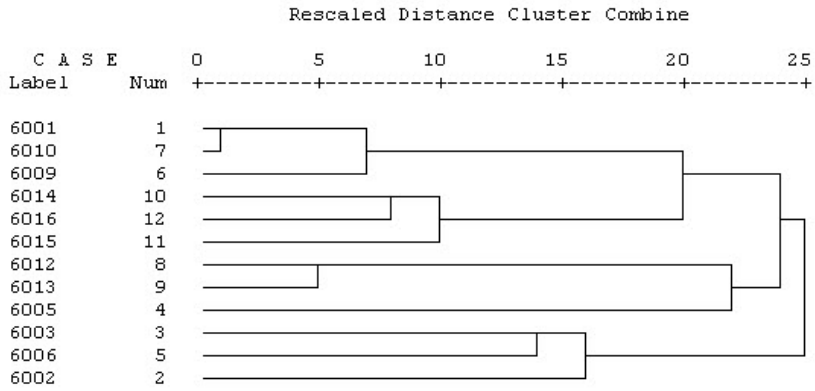
نتایج حاصل از تجزیه تحلیل داده‌ها در تعیین قرابت ژنوتیپ‌ها با توجه به دی ان ای تکثیر شده و باندهای حاصل، تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS16 انجام شد و میزان تشابه بین ارقام محاسبه گردید (جدول۵). گروه‌بندی ارقام بر اساس ماتریس ۱ و ۰ حاصل از نشانگر رپید و برمبنای ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها و دندروگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب جاکارد، ارقام در ۵ گروه دسته‌بندی شدند. بر این اساس ارقام سبزمال کاشمر، خلیلی بیدانه قوچان و شاهانی در ردیف اول قرار گرفتند. همچنین این نتایج نشان داد که بیشترین تشابه بین ارقام ۱ و ۷ (سبزمال کاشمر و خلیلی بیدانه قوچان) که معادل ۰/٦۱۹ می‌باشد، وجود دارد.

در ردیف دوم ارقام پیرقلی ۲، شغالی نیشابور و خلیلی نر قوچان (۱۰، ۱۲ و ۱۱) قرار گرفتند. همچنین ارقام کلدری بیرجند و پیرقلی شماره ۲ در ردیف سوم جای گرفتند. تنها در ردیف چهارم یک رقم جدا قرار گرفت که رقم سبز درگز می‌باشد. در ردیف پنجم نیز ارقام فخری نیشابور، طرقی کاشمر و شاه پسند قرار گرفتند که تشابه ژنتیکی نزدیکتری نسبت به یکدیگر داشتند. کمترین میزان تشابه را ارقام ۲ و ۱۰ (که ارقام شاه پسند و پیرقلی ۲ هستند) دارا می‌باشند که برابر ۰/۲۰۵ می‌باشد.

جدول ۵- گروه‌بندی ارقام

ردیف	۱	۲	۳	٤	۵
گروه	۱ ، ۷ ، ٦	۱۰ ، ۱۲ ، ۱۱	۸ ، ۹	٤	۳ ، ۵ ، ۲

از آنجا که تکنیک ISSR توانست در این تحقیق ارقام مختلف را در گروه های مجزا قرار دهد، لذا میتوان گفت که ISSR یک سیستم مارکری کارآمد و قابل اطمینان برای تجزیه و تحلیل ارقام انگور است که با نتایج دانورکار و همکاران (۲۰۰۵) مشابه بود. همچنین این مطالعه آشکار کرد که رابطه ژنتیکی میان ارقام انگور می‌تواند با استفاده از نشانگر ISSR ارزیابی شود که با نتایج مانجوشا و همکاران (۲۰۰۷) در یک راستا بودند. همینطور در تطابق با نتایج آرگاد و همکاران (۲۰۰۹) بود که بیان کردند گروه‌بندی کلی بر اساس خصوصیات موفولوژیکی و شجره‌نامه بود که ثابت‌کننده سودمندی مارکرهای ISSR برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته‌های انگور بود.

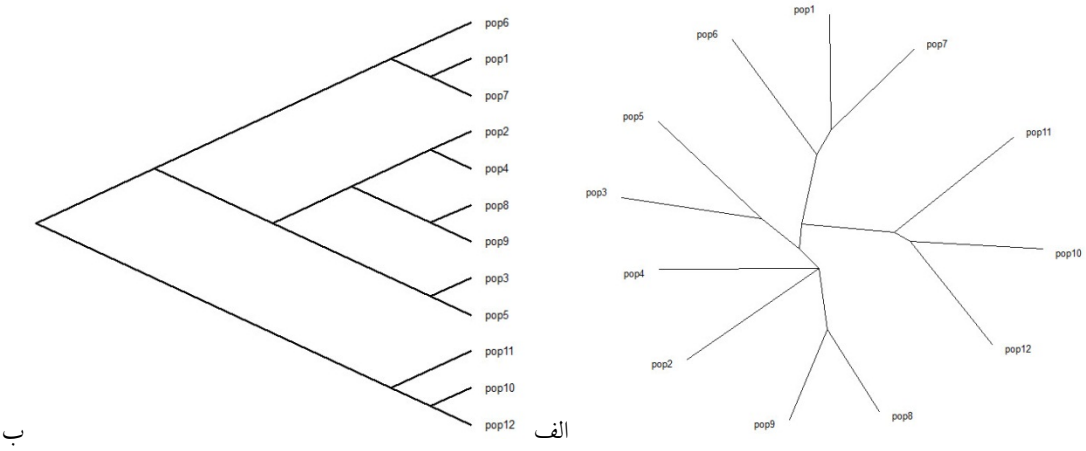


شکل ۲- دندروگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده ها(نرم افزارPopGen32)

نرم افزار PopGen32 در سال ۱۹۹۹ توسط فرانسیس و همکاران طراحی شد. PopGen32 نرم‌افزاری است که تجزیه داده‌ها را بر اساس ضریب تشابه نی و روش UPGMA انجام می‌دهد. همچنین این نرم افزار برای محاسبه هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، تعداد آلل های موثر، شاخص تثبیت و ضریب شانون استفاده میشود. نرم‌افزار TreeView که از داده‌های PopGen استفاده می‌کند به ٤ شکل متفاوت می‌تواند نمودار (گراف) رسم کند که دو نمونه از این گراف‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است.

به طور کلی امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی منجر به افزایش سرعت و دقت برنامه‌های اصلاحی شده است (حدادی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱). این نتایج نشان داد که مارکرهای ISSR دارای پتانسیل و توانایی در شناسایی و متمایز نمودن ارقام دارند و مسئله مهمی که می‌توان به آن اشاره کرد، کاربرد ISSR در شناسایی ارقام و ارتباط ژنتیکی ارقام با یکدیگر می‌باشد. به طوری که در دست داشتن اطلاعات نژادی و یا مبداهای جغرافیایی ارقام نمی‌تواند به طور صحیحی ارتباط ژنتیکی ارقام را نشان بدهد. در حالیکه دی ان ای مارکرها، ارتباطات ژنتیکی و دوری و نزدیکی ارقام با یکدیگر را بهتر و بیشتر نشان می‌دهند. اگر به اندازه کافی دی ان ای مارکرها مورد استفاده قرار گیرند و در سرتاسر کروموزوم پراکنده شده باشند این مسئله توسط چندین محقق بیان شده است. (ژانگ، ۲۰۰۵؛ ایکبال، ۱۹۹۷؛ مولتانی، ۱۹۹۵). همچنین سطح بالای تنوع مشاهده شده در ارقام بومی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام بهتر و استفاده از این ارقام به عنوان والد بخشنده جهت انتقال صفات مطلوب به واریته‌های پرمحصول مورد استفاده قرار گیرد (صیدی مرادی و همکاران، ۱۳۹۱).



شکل ۳- گراف های رسم شده با الف) نرم افزار PopGen و ب) (Slanted Cladogram) بر اساس ماتریس تشابه مبتنی بر ضریب تشابه نی و روش U

منابع

جداری کوهی، ب.، ق. گروسی و ر. حسینی. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی‌دانه انگور توسط نشانگر مولکولی RAPD. مجله سلول و بافت. جلد دوم، شماره ۲: ۹۹-۱۰۶.

حدادی نژاد، م.، ع. عبادی و م. نقوی. ۱۳۸۸. ارزیابی مولکولی و موفولوژیکی والدین و نتاج برتر حاصل از تلاقی انگورهای دانه‌دار و بی‌دانه به منظور تعیین رابطه والدین-نتاج. مجله علوم باغبانی ایران، دوره چهلم، شماره ۳: ۳۷-۴۹.

رمضانی، ا.، ح. رحیم و ح. مردی. ۱۳۸۶. تعیین تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های انگور ایرانی با استفاده از نشانگر ریزماهواره. ژنتیک نوین. دوره دوم، شماره ٤: ۳۱-۳۸.

سیدی مرادی ه. ر، د. طالبی حسنی و ف. کرمی. ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام محلی انگور استان کردستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی)، ٦ صفحه.

قریشی، م.، ف. رحمانی.، ح. دولتی بانه و ک. دیلمقانی. ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور در ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی ISSR. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.

نراقی، م. ۱۳۸۹. خوردنی‌های شفابخش. نشر امیرکبیر. ۱٦۰ صفحه.

Alizadeh, M. and S. K. Singh. 2009. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* Spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. I.J.B.7(1):37-44.

Ammiraju, J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theor. Appl. Genet. 102: 726-732.

Argade, N. C., S. A. Tamhankar, G. S. Karlbasappa, S. G. Patil and V. S. Rao. 2009. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. J. Plant Biochem Biot. 18(1):45-51.

Choudhary, R. S., V. S. Zagade Maboodurrahman, G. D. Khalakar and N. K. Singh. 2014. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera* L.). The Bioscan. 9(2):823-828.

Dhanorkar, V. M., S.A. Tamhankar, S. G. Patil and V.S. Rao. 2005. ISSR-PCR for assessment of genetic relationshipamong grape varieties cultivated in India. Vitis. 44(3):127–131.

Ercisli, S. and E. Orhan. 2008. Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh Valley revealed by RAPD Markers. Guleray. Agar. Biochem. Genet. 46:590-597.

Ferguson, A., J. B. Taggart, P. A. Prodohl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. McGinnity and R. A. Hynes. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations whit special reference to Salmo. Fs. Bi. 47:103-126.

Galet, P. 1998. CépagesetVignobles de France, Tome 1. LesVignesAméricaines, 2nd end. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France.

Groom M. J., G. K. Meffe and C. R. Carroll. 2006. Principles of Conservation Biology (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Hodgkin, T. and R.V. Ramanata. 2002. People, plant, and DNA: Prespectives on the scientific and technical aspects of conserving and using plant genetic resource. CABI.

Iqbal, M. J., N. Aziz, N. A. Saeed, Y. Zafar and K. A. Malik. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 87: 934-940.

Maliyakal E. J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. Nucl. Acids Res. 20: 2381.

Manjusha, D., S. A. Tamhankar, S. G. Patil, G. S. Karibasappa and V. S. Rao. 2007. Assessment of genetic diversity and relationships among some grape varieties using ISSR-PCR based markers. Vellanikara, Karala, India, 2:491-496.

Multani D. S. and B. R. Lyon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome. 38: 1005-1008.

Neveen, A. H., A. El-Homosany, H. G. Amina and A. S. Mohamed. 2011. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinefera* L.) collection. World Appl. Sci. J. 15(10): 1369-1375.

Seyedimoradi, H., R. Talebi, D. Hassani and F. Karami. 2012. Comparative genetic diversity analysis in Iranian local grapevine cultivars using ISSR and DAMD molecular markers. EEB. 10: 125-132.

Souframanien, J. and T. Gopalkrishna. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 109(8):1687-93.

Strauss, S. and R. Lankau. 2007. Study: loss of genetic diversity threatens species diversity. J. Sc. 14 issue.

Tamhankar, S. A., N. C. Argade, M. N. More, V. M. Dhanorkar, S. G. Patil, V. S Rao, G. S. Karibasappa and D. C. Agrawal. 2006. ISHS Acta Horticulture 785.

Yu, K. and K. P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucl. Acids Res. 20(10):113-117.

Zhang Z. S., Y. H. Xiao, M. Luo, X. B. Li, X. Y. Luo, L. Hou, D. M. Li and Y. Pei. 2005. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of fibre related traits in upland cotton. Euphytica. 144: 91-99.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome Fingerprintingby simple sequence repeat (FSR)-anchoredpolymerase chain reaction amplification. Genomics. 20:176–183.

Investigation of genetic diversity in different grape varieties *(Vitis vinifera*) using ISSR molecular marker

A. Khalkali[1], H. Abaspoor[2]

Received: 2015-05-29 Accepted: 2015-11-24

Abstract

Grapes is one of the most important horticultural products in the world and Iran and has a wide genetic diversity, so the purpose of this research was to investigate of the genetic diversity and to asses of introduced grapes cultivars (*Vitis vinifera*) at the molecular level using ISSR marker. For DNA extraction modified method of Doyle and Doyle was used and at the next step, 12 genotypes were examined by 12 primers. Cluster analysis was performed by PopGen32 and SPSS9 softwares. The resulted clustering were divided cultivars into 5 groups by both softwares. In analyzing data, the percentage of polymorphism and the number of polymorphic loci were obtained 96.49 percent and 55, respectively. Cophenetic coefficient was 0.8 for Jaccard coefficient and straw, is indicating a fine fit between the dendrogram and the main similarity matrix. The bands that were obviously visible were reviewed. Results showed that a total of 353 bands were generated by the markers. Results showed that a total of 353 bands were generated by the markers. Results showed that 353 bands were generated by the markers. The size of bands was various between 200 and 3000 bp. The highest similarity was 0.619 for number one and number 7 varieties and the least one was 0.205 for number10 and number 2 varieties. Because the most amount of bond were observed by primer a (56 bands), this primers was able to determine the genetic gap of Primerrelated varieties better than other primers.

Keywords: Grape, genetic diversity, molecular markers, phylogenic tree, static analysis.

1- Master of Science in Agricultural Biotechnology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2-Associate Professor, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran