مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ۱۰۶-۹۹

بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی دانه انگور توسط نشانگر ملکولی RAPD

بهروز جداری کوهی، قاسمعلی گروسی، رامین حسینی*

- دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: r.hosseini@ikiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۸

چکیده

هدف: ارقام بسیار متنوعی از انگور در ایران کشت می‌شوند که در بین آن ها، ارقام بی دانه جز بهترین ارقام خشکباری انگور هستند. هدف از این پژوهش، پی بردن به پتانسیل نشانگر ملکولی RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) برای تعیین دوری و یا نزدیکی ارقام و یا احتمالاً یکی بودن برخی از آن ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۱ رقم انگور بی دانه و ۱۱ آغازگر RAPD مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج: از بین ارقام استفاده شده، ۸ آغازگر تکثیر DNA را بخوبی انجام و در بین ژنوتیپ‌ها چند شکلی بالایی نشان دادند. مجموعاً ۱۱۷ باند (آلل) چند شکل به دست آمد که بیشترین تعداد باند دهی مربوط به آغازگر H و کمترین تعداد مربوط به آغازگر B بود. درصد باندهای چند شکل در بین آغازگرها از ۷۱/۴ برای آغازگر B تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر C متغیر و متوسط باندهی برای هر آغازگر ۱۲/۸ باند بود. در تجزیه آماری، باندهای در محدوده ۳۰۰۰-۲۰۰ جفت باز که دارای تکرار پذیری بالایی بودند انتخاب و در محاسبه وارد شدند. تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه جاکارد مبتنی بر روش UPGMA (Unweighted pair-group method of arithmetic average) انجام و ارقام در ۳ گروه طبقه بندی شدند. دامنه ضریب تشابه از ۰/۲۱ تا ۰/۷۱۶ با میانگین ضریب تشابه ۰/۴۶ تعیین گردید.

نتیجه گیری: بیشترین تشابه بین ارقام عسگری قرمز و عسگری مشکین شهر و کمترین تشابه بین ارقام خلیلی بی دانه و عسگری نیشابور تشخیص داده شد. احتمالاً دو رقم عسگری قرمز و عسگری مشکین شهر دارای مبدا یکسانی هستند که در طی زمان به مکان‌های مختلفی برده شده‌اند.

واژگان کلیدی: انگور، تنوع ژنتیکی، چند شکلی، تکنیک RAPD

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

انگـور از تیـره Amplidaceae اسـت کـه آن را Vitaceae نیـز می‌نامند. گونه‌هایی کـه در موکـاری اسـتفاده مـی‌شـوند و ارزش تجاری دارند از جنس Vitis هسـتند. ایـن جـنس دارای دو زیـر جنس به نام‌های V. muscadine و V. euvitis است (۱). زیـر جـنس Muscadine دارای ۲n=۴۰ کرومـوزوم و زیـرجنس Euvitis دارای ۲n=۳۸ کروموزوم می‌باشد. گونه‌هـای زیـرجنس V. euvitis دارای صفات زراعی ویژه و جالـب توجـه بـوده و در موکاری استفاده می شوند بطوری که تا کنـون ۳۵ گونـه از ایـن زیرجنس شناخته شده است (۲).

منابع ژنتیک گیاهی علاوه بر این که بـه عنـوان عامـل زیربنـایی برای توسعه کشاورزی محسوب می شـوند، بـه عنـوان منبعـی از سازگاری ژنتیکـی و همچـون سـپری در برابـر تغییـرات عوامـل محیطی عمل می نمایند (۲). فرسایش ژنتیکی در اثـر گسـترش ارقام اصلاح شده، امنیت غذایی در جهان را با تهدید مواجـه مـی کند. نیاز به حفظ و بکارگیری منابع ژنتیکی به عنـوان محـافظی در برابر مشکلات غیر قابل پیش بینی در آینده بر همگان آشـکار است و چشم نگرانی از تضعیف تنـوع منـابع ژنتیکـی بـه همـراه تقاضای روزافزون به این منابع، آن ها را در مرکـز توجـه جهـانی قرار داده است. تنوع مبنای گزینش فنوتیپی و ژنوتیپی و اسـاس اصلاح کمی وکیفی محصولات کشاورزی اسـت. آگـاهی از تنـوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی ضمن حفاظت ذخـایر ژنتیکـی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه اصـلاحی ممکـن مـی سـازد (۳). حـذف تنـوع ژنتیکـی در تـوده هـای بـومی و تولیـد ارقـام یکنواخت، آینده را به خطر می انـدازد. بنـابراین شناسـایی تنـوع ژنتیکی و حفظ و نگهداری ذخایر توارثی، ضروری و یکی از اولین قدم‌ها در یک برنامه به نژادی موفق است (۴).

امروزه جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت های حفاظت شده علاوه بر شیوه های سنتی (مبتنی بـر خصوصـیات و نشـانگرهای مرفولوژیک و فیلوژنیک) از ابزارها و نشانگرهای نوین مولکـولی از جمله نشانگرهای DNA استفاده می شود. لذا میزان چند شکلی بدست آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهـای قابـل ارزیابی برای مطالعه جمعیت ها و درک تفاوت های ژنتیکی بـین آنها محسوب می شود (۵).

نشـانگرهای DNA مبتنـی بـر چنـد شـکلی طبیعـی در DNA هستند که اساس بهره برداری برای اهـداف کـاربردی را تشـکیل می دهند. یک نشانگر باید چند شکل باشد تا آن را نشانگر نامید، بدین معنی که باید فرم های مختلفی از آن وجود داشـته باشـد. به عنوان مثال کرومـوزوم حامـل ژن جهـش یافتـه از کرومـوزوم حامل ژن معمولی، از طریق نشانگری که حمـل مـی کنـد قابـل تشخیص باشد (۶). نشانگرهای DNA در مدت یک دهه از آغـاز پیدایش، تکـاملی شـگرف و تحسـین برانگیـز داشـته انـد. انـواع مختلف نشانگرهای DNA با تفاوت های زیادی از نظر تکنیکی و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیاز بندی و تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفـی گردیدنـد. بـدون تردیـد ابـداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بیشـترین نقـش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است.

با وجود گستردگی نشانگرهای مختلف DNA و ابداع روش هـا و تکنیک‌های جدیدتر، هنوز نشانگر ملکولی RAPD استفاده خـود را جهت بررسی‌های تنوع ژنتیکی حفظ نموده اسـت. Collins و Symons (۷) در سال ۱۹۹۳، برای اولـین بـار نشـانگر ملکـولی RAPD را در ارقام مختلف انگـور اسـتفاده نمودنـد. Ningsai و همکـاران (۸) بـا اسـتفاده از آغازگرهـای ۲۴-۱۷ نوکلئوتیـدی RAPD انگشت نگـاری ژنتیکـی از انگـور انجـام دادنـد و نقشـه ژنتیکی از این گیاه را رسم نمودنـد. از نشـانگر ملکـولی RAPD همچنین برای تعیین ارقام مقاوم به سفیدک پوری استفاده شـده است (۹). از دیگر بررسی ها می توان به برخی مطالعات که اخیراً در مورد انگور انجام شده اشاره کرد. Aras و همکـاران (۱۰) ۱۴ رقـم، Karatas و Agaglu (۱۱، ۱۲) بـه ترتیـب ۴۶ و ۴۹ رقـم انگور از ارقام انگور ترکیه، همچنین Bodea و همکاران (۱۳) ۲۶ رقم انگور رومانی و Gaffari و همکاران (۱۴) ارقام انگـور تـونس را با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD مورد بررسی قـرار دادنـد. در این مطالعه شناسایی تنوع مولکولی و تعیین فواصـل ژنتیکـی ۲۱ رقم مهم انگور بیدانـه بـا روش RAPD مـورد بررسـی قـرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۱ رقم انگور بصورت نمونه برگی از کلکسیون ژرم پلاسـم انگور تاکستان جمع آوری شد (جدول ۱). نمونه های برگی سالم و جوان انتخاب و بعد از وزن کردن در ازت مایع تثبیت و سـریعاً به داخل فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده هـای بعـدی منتقل گردیدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱. نام ارقام انگور مورد مطالعه قرار گرفته

شماره رقم	نام رقم	شماره رقم	نام رقم	شماره رقم	نام رقم
۱	کشمشی قرمز۱	۸	کشمشی تبریز	۱۵	عسگری مشکین شهر
۲	عسگری قوچان	۹	کشمشی مشکین شهر	۱۶	عسگری قرمز
۳	عسگری نر قوچان	۱۰	کشمشی سفید	۱۷	بی دانه جرتوده
۴	کشمشی قرمز۲	۱۱	عسگری تبریز	۱۸	عسگری نیشابور
۵	خلیلی بی دانه	۱۲	کشمشی جرتوده	۱۹	بی دانه قوچان
۶	سرخک قرمز	۱۳	سرخک قوچان	۲۰	بی دانه قرمز قزوین
۷	کشمشی قرمز	۱۴	عسگری بیرجند	۲۱	بی دانه سفید قزوین

استخراج DNA: استخراج DNA ژنومی مطابق با روش CTAB، Lodhi و همکاران (۱۵) با اعمال کمی تغییرات در روش و بافر استخراج (۲٪ w/v CTAB، Sodium EDTA ۲۰ میلی مولار، Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار (pH=۸) و NaCl ۱/۴ مولار) انجام شد. مقدار۰/۵ گرم بافت برگی در ازت مایع به صورت پودر درآمد. پودر حاصله به لوله ۱۵ میلی لیتری فالکون منتقل و به ازای هر ۰/۱ گرم بافت، ۵ میلی لیتر بافر استخراج و ۵۰ میلی گرم PVP (polyvinylpyrrolidone) به عصاره سلولی اضافه گردید. لوله در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگه داری و هر ۱۰ دقیقه به آرامی سر و ته گردید. هم حجم محتوای لوله، کلروفرم: ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه و در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Beckman, 64R, USA) شد. سپس فاز رویی به لوله جدید منتقل و مجدداً با شرایط قبل، سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به لوله جدید منتقل و مقدار ۰/۲ حجم NaCl ۵ مولار و ۲ حجم اتانول ۹۵ درصد (v/v) سرد اضافه شد. بعد از ظاهر شدن کلاف های DNA، تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب تشکیل شده با اتانول ۷۰ درصد (v/v) شستشو و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب DNA خشک و در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل گردید. برای از بین بردن RNA مقدار ۳ میکرولیتر RNaseA (Sibenzyme, Russia) به هر ۳۰۰ میکرولیتر محلول DNA اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمابه گذاری شد. جذب نوری نمونه های DNA به کمک دستگاه spectrophotometre (Labomed, UVD-3200, USA) در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشت که نشان دهنده کیفیت مناسب نمونه ها بود. نمونه های DNA در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای استفاده شده.

آغازگرها	توالی آغازگر (۵' به ۳')	درصد GC	دمای اتصال ^{o}C
B	CGGAGAGCGA	۷۰	۴۰
C	CCGGCATAGA	۶۰	۳۶
D	TGGGCTCGCT	۷۰	۴۰
E	ACTTGTGCGG	۶۰	۴۰
F	CCCACTGACG	۷۰	۴۰
G	CTGAGGAGTC	۶۰	۳۶
H	GGTCAACCCT	۶۰	۳۶
J	CCTCACCTGT	۶۰	۳۶

Archive of SID

www.SID.ir

انجام PCR: در این پژوهش ۱۱ آغازگر ده نوکلئوتیدی تصادفی (شرکت سیناژن، ایران) استفاده شدند، که بر مبنای پیش آزمایش ها ۸ آغازگر که دارای چند شکلی مطلوب تری بودند برای آزمایش های اصلی PCR انتخاب شدند (جدول ۲). در هر واکنش PCR، مقدار میلی مولار ۲ MgCl2، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۱ واحد Taq DNA polymerase، ۳۰ DNA نانوگرم و ۱ میلی‌مولار آغازگر، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شدند.

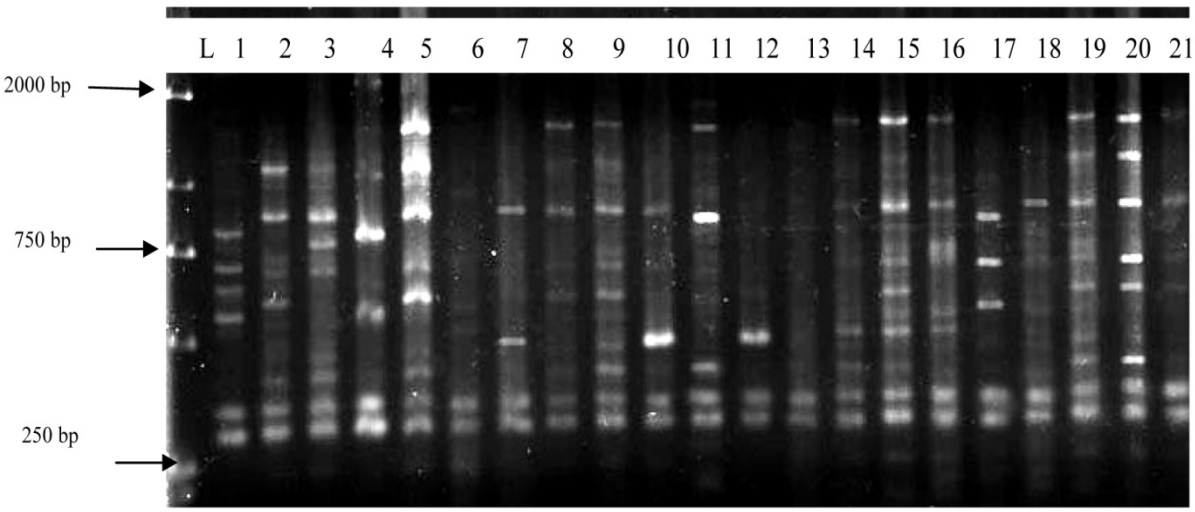
PCR طی ۳۵ سیکل (Primus, MWG-Biotech, Germany) انجام شد. قبل از شروع واکنش برای واسرشته سازی DNA دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال گردید و سپس توالی های DNA هدف طی ۳۵ چرخه (واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در ۳۶ درجه سانتی‌گراد (یا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک دقیقه، و گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه)، تکثیر شدند. آزمایش ها سه بار تکرار شدند.

تجزیه و تحلیل نتایج: تفکیک فرآورده های حاصل از تکثیر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (w/v) الکتروفورز گردید و سپس با محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. باندهای تکرار پذیر بر اساس حضور با عدد (۱) یا عدم حضور با عدد (۰) امتیاز دهی شدند و ماتریس شباهت داده‌ها بر اساس ضریب جاکارد تشکیل شد. دندروگرام شباهت نیز به روش UPGMA و به کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ ترسیم شد.

نتایج

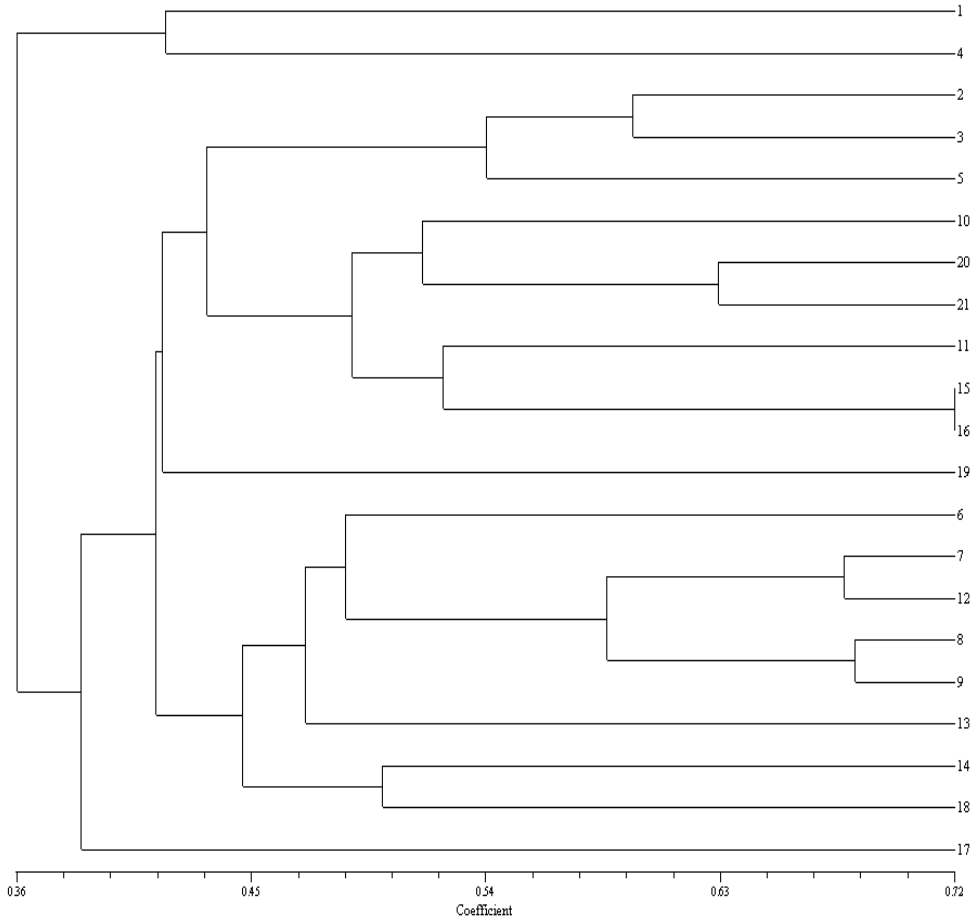
بطور کلی در این مطالعه از ۱۱ آغازگر ده نوکلئوتیدی اختیاری استفاده شد که حاوی ۷۰-۶۰ درصد GC بودند و توالی هیچکدام از آغازگرها دارای انتهای خود مکملی نبودند. از این تعداد، ۸ آغازگر باندهای واضح و مشخص تولید کردند (شکل ۱). تعداد کل باندهای چند شکل تولید شده ۱۱۷ عدد بود که بیشترین باندهی در آغازگر H با ۱۷ باند و کمترین تعداد باندهی در آغازگر B با ۷ باند مشاهده گردید. دامنه اندازه باندهای تکثیر شده در محدوده بین ۲۰۰ الی ۳۰۰۰ جفت بازی متغیر بود.

بر اساس ضریب تشابه جاکارد، دندروگرام توسط روش UPGMA و به کمک نرم افزار SPSS ترسیم شد و ارقام مورد مطالعه به ۳ گروه و دو گروه بیرونی (out group) طبقه بندی شدند (شکل۲).



شکل۱: نمونه الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR توسط آغازگر G. ستون L نشان دهنده نشانگر اندازه ملکولی و شماره‌های بالای تصویر نشان دهنده شماره ارقام مطابق جدول ۱ می باشد.

www.SID.ir



شکل۲: دندروگرام فاصله ژنتیکی ۲۱ رقم بر مبنای ضریب تشابه جاکارد و گروه بندی آن ها بر اساس روش UPGMA به کمک نرم افزار SPSS اعداد نشان دهنده شماره ارقام مطابق جدول ۱ می باشد.

گروه اول شامل رقم کشمشی قرمز ۱ و کشمشی قرمز ۲ بود. گروه دوم شامل ارقام عسگری قوچان، عسگری نر قوچان، خلیلی بی دانه، کشمشی سفید، بی دانه قرمز قزوین، بی دانه سفید قزوین، عسگری تبریز، عسگری مشکین شهر و عسگری قرمز بود. گروه بیرونی اول شامل رقم بی دانه قوچان بود. گروه سوم شامل ارقام سرخک قرمز کشمشی قرمز، کشمشی جرتوده، کشمشی تبریز، کشمشی مشکین شهر، سرخک قوچان، عسگری بیرجند و عسگری نیشابور بود. گروه بیرونی دوم شامل رقم بی دانه جرتوده بود. بر اساس میزان ضریب تشابه، بیشترین شباهت بین دو رقم عسگری قرمز و عسگری مشکین شهر با ضریب تشابه ۷۱/۶ درصد و پس از آنها بین ارقام کشمشی تبریز و کشمشی مشکین شهر با ضریب تشابه ۶۷/۹ درصد بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو رقم خلیلی بی دانه و عسگری نیشابور با ضریب تشابه ۲۰/۸ درصد و بعد از آن دو رقم سرخک قرمز و بی دانه قوچان با ضریب تشابه ۲۷/۴ درصد دارای کمترین تشابه ژنتیکی بود.

بحث

به دلیل هزینه پایین، سادگی و نیاز به مقدار کم DNA، RAPD هنوز به عنوان یکی از نشانگرهای ملکولی برای تشخیص تنوع ژنتیکی و نزدیکی و یا دوری گونه‌ها و ارقام در گیاهان بسیاری از جمله انگور مورد استفاده قرار می گیرد (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۱۸). در کشور ترکیه بیش از ۱۲۰۰ رقم انگور وجود دارند که اسامی بسیاری از آن ها یکسان یا مشابه‌اند. ارقام انگور موجود در ایران نیز ۱۰۵۲ عدد گزارش شده است (http://www.iana.ir/detailed_news.aspx?news_id=14162).

نتیجه گیری

در دو مطالعه که توسط Karatas و Agaglu (۸، ۹) با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD انجام شد، مشاهده گردید که بسیاری از ارقام که نام های یکسانی داشتند و در مناطق مختلف کشت می‌شدند، از نظر ملکولی بین ارقامی قرار گرفتند که کمترین

Archive of SID
www.SID.ir

شباهت را با هم داشتند. آن ها استفاده از نشانگر ملکولی RAPD را برای شناسایی چنین تفاوت ها یا شباهت هایی بسیار مفید دانستند. عکس این مورد نیز ممکن است اتفاق بیفتد یعنی ارقامی از نقطه ای به نقطه دیگر کشور برده شده باشند و با اسامی دیگری در آن محل کشت شوند.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان اظهار نمود که ممکن است این دو رقم عسگری قرمز و عسگری مشکین شهر یکسان و به دلیل مهاجرت به مناطق مختلف به دو نام متفاوت ثبت شده باشند. همچنین این موضوع در مورد دو رقم کشمشی تبریز و کشمشی مشکین شهر نیز صدق می کند. مشابه این نتیجه را با استفاده از نشانگر ملکولی SSR، Ramazani (۱۹) روی ۴۴ رقم انگور به دست آورد. بین ۴۴ رقم انگور بیشترین شباهت را دو رقم عسگری نیشابور و عسگری مشهد با ضریب تشابه ۹۶ درصد داشتند. با توجه به نزدیکی دو منطقه جمع آوری دو نمونه (مشهد و نیشابور)، وی نتیجه گیری کرد که به احتمال زیاد این دو رقم باید مبداء یکسانی داشته باشند.

ممکن است ارقام یکسانی در طی زمان و بر اثر مهاجرت به نقاط مختلف منتقل و نام های متفاوتی یافته باشند؛ در حالی که ممکن است از نظر مولکولی و یا مورفولوژیکی شباهت زیادی به هم نشان می دهند. استفاده از نشانگرهای ملکولی در بسیاری موارد به حل مشکلات به نژادگران کمک نموده است. در این مطالعه ۲۱ رقم انگور بی دانه جهت بررسی شباهت و یا تفاوت با کمک نشانگر ملکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. برای دقیق تر انجام شدن کار پیشنهاد می گردد که از تعداد آغازگرهای بیشتری استفاده گردد و همچنین برای حصول اطمینان کامل از یکی بودن ارقامی با نام های مختلف، از نشانگر ملکولی دیگری مانند SSR، AFLP و نشانگر های مورفولوژیک نیز بهره گرفته شود و اطلاعات به دست آمده در کنار هم تفسیر شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کمک مالی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که به این وسیله تقدیر می گردد.

منابع

1. Ghasemi, A. Grape. 1th Ed. Ayandegan Publications; 2003.

2. Rasoulzadegan, Y. Fruit Tree Cultivation in Moderate Cilmates. 1th Ed. Sanati Isfahan University publications; 1991.

3. Ghareyazi B. The application of DNA markers in plant breeding. Proceedings of the Fourth Conference on Agronomy and Plant Breeding. Sanati Isfahan University. 1998; 42(2): 328-381.

4. Ghasemi K. Investigation on genetic diversity in cotton genotypes by RAPD markers. MSc thesis in plant breeding, Tehran University. 1999; 16.

5. Bagheri A, Darbandi A, Malboobi MA. Practical applications of Plant Molecular Biology. Ferdowsi Mashad University Publications. 2002; 122-124.

6. Abdmishani S. The application of PCR technique as a DNA marker in Brassica, Agricultural Sciences of Iran. 1995; 1: 55-60.

7. Collins G, Symons RH. Polymorphism in grape DNA traits by RAPD-PCR technique. Plant Mol Biol Report. 1993; 11: 105-112.

8. Ningsayi W, Ziaping W, Yuping Z. An improved procedure for the isolation of DNA from leaves of grape vine for RAPD marker. Plant Mol Biol. 1996; 4: 369-373.

9. Dalbo MA. Genetic mapping, QTL analysis and marker associated selection for disease resistance loci in grapes. PhD thesis, Cornell University, USA. 1998; 52-56.

10. Aras S, Polat JB, Cansaran D, Soylemezoglu G. RAPD analysis of genetic relations between Buzuglu grape cultivars (Vitis vinifera) grown in different parts of Turkey. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 2005; 47: 77-82.

11. Karatas H, Agaglu S. Genetic diversity among Turkish local grape accessions (Vitis vinifera L.) using RAPD markers. Hereditas. 2008; 145: 58-63.

12. Karatas H, Agaglu S. RAPD analysis selected local Turkish grape cultivars (Vitis vinifera). Genet Mol Res. 2010; 9: 1980-1986.

13. Bodea M, Pamfil D, Pop R, Pop IF. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity among Romanian local vine (Vitis vinifera L.) cultivars. Bull UASVM Hort. 2009; 66: 17-22.

14. Ggaffari S, Hasnaoui N, Ferchichi A. Rapid, high quality DNA isolation from Tunisian grape vine (Vitis vinifera L.) cultivars and optimization of the RAPD marker technique. Roman Biotech Lett. 2011; 16: 5881-5890.

15. Lodhi MA, Guangning N, Norman F. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars. Plant Mol Rep. 1994; 12: 6-13.
16. Boham A, Zyprian E. RAPD marker in grape vine (Vitis spp) similar to plant retrotransposons. Plant Cell Rep. 1998; 17: 415-421.

17. Fanizza G, Colonna G, Resta P, Ferarra G. The effect of the number of RAPD markers on the

Archive of SID

www.SID.ir

evaluation of genotypic distances in Vitis vinifera. Euphytica. 1999; 107: 45-50.

18. Wolf T, Ortlieb C, Eimert K, Ries R. Routine extraction of DNA from grape vine (Vitis spp) canes and roots for variety identification by RAPD-PCR. Acta Hort. 2001; 547: 527-533.

19. Ramazani A. An investigation on grape genetic diversity, using SSR marker. MSc thesis. IKIU, Qazvin, Iran. 2006; 67-69.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Summer 2011; 2(2): 99-106

Investigation on Genetic Variation in Seedless Grapevine Cultivars, Using RAPD Molecular Marker

Jedari Kouhi B, Garoosi Gh, Hosseini R *

- Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* Email corresponding author: r.hosseini@ikiu.ac.ir

Received: 30 Aug. 2011 Accepted: 30 Oct. 2011

Abstract

Aim: A large variety of grapevine cultivars are cultivated in Iran, amongst which seedless cultivars are regarded as the best one to make dried-fruit. The aim of this research was to discover the potential of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular marker to identify similarity/dissimilarity or probable homogeneity between grape cultivars.

Materials and methods: In this study, 21 seedless grape cultivars and 11 RAPD primers were used.

Results: out of 11, eight primers could amplify DNA fragments very well and showed reasonable polymorphism between cultivars. Totally 117 polymorphic bands were produced at which primer H produced the highest and primer B produced the lowest number of bands. The percentage of polymorphism ranged from 71.4 % for primer B to 100 % for primer C and the average number of bands per primer was 12.8. For statistical analysis, only the reproducible bands which their length was between 200-3000 bp were considered. Cluster analysis was carried out using Jaccard's similarity coefficient based on UPGMA **(**Unweighted pair-group method of arithmetic average) method and the cultivars were classified in three main groups. The range of similarity coefficient with the average of 0.462 was determined between 0.208 to 0.716.

Conclusion: Asgari Ghermez and Asgari Meshkin shahr cultivars showed the highest similarity and Khalili Beedaneh and Asgari Neishabour showed the lowest similarity. Therefore it could be assumed that Asgari Ghermez and Asgari Meshkinshahr cultivars posses the same origin but have been moved to different places in the course of time.

Key words: Genetic variation, Grape, Polymorphism, RAPD technique

Archive of SID

www.SID.ir