

تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی بر اساس نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR

Genetic Diversity of some Grapevine Cultivars of Khorasan Razavi Province Based on RAPD and ISSR Markers

محمودرضا کریمی شهری^۱، ویدا دهواری^۲، محمد حاجیان شهری^۳ و علی مختاریان^۴

۱ و ۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

۲- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، کرج

۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۲۱

چکیده

کریمی شهری، م. ر.، دهواری، و.، حاجیان شهری، م. و مختاریان، ع. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی بر اساس نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸: ۱۷۲-۱۵۹.

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی پانزده رقم انگور شامل شش رقم بومی استان خراسان رضوی، هشت رقم وارداتی ترکمن متعلق به گونه *Vitis vinifera* و یک رقم متعلق به گونه *Vitis muscadiana* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. هفت آغازگر ریپید و هفت آغازگر ISSR به ترتیب تولید ۵۸ و ۵۹ نوار با وضوح بالا و تکرارپذیر کردند که همگی چندشکلی را در بین ارقام نشان دادند. گروه بندی ژنوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای و با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام و پانزده رقم در دو گروه بزرگ از یکدیگر جدا شدند. ارقام ترکمن در گروه اول و ارقام بومی خراسان رضوی به همراه رقم متعلق به گونه *Vitis muscadiana* در گروه دوم قرار گرفتند. با توجه به جدول ضریب تشابه جاکارد، بیشترین تشابه بین ارقام ترکمن ۶ و ترکمن ۸ و کمترین تشابه بین ارقام ترکمن ۳ و صاحبی نیشابور مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: انگور، ارقام بومی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

انگور (*Vitis spp.*) یکی از محصولات مهم باغی، به دلیل موارد مصارف متعدد قرن‌هاست که مورد توجه بشر قرار گرفته است. استفاده از انگور محدود به میوه رسیده آن نبوده بلکه، برگ و میوه نارس آن هم به صورت غوره مصرف غذایی دارند. به علاوه از عصاره آن به صورت آب یا شیره انگور، از خشک شده آن به صورت کشمش، از محصولات تخمیری یا تقطیری آن به صورت شراب، الکل و سرکه، از روغن هسته انگور و پوسته حاصل از استخراج روغن هسته انگور در تهیه تانن، از کنجاله حاصل از استخراج روغن هسته انگور برای خوراک دام و در نهایت مصارف طبی و غذایی دیگر استفاده می‌شود (Tafazzoli et al., 1994). استفاده و استخراج رنگدانه‌های موجود در انگور مانند آنتوسیانین نیز از مصارف دیگر انگور است. جنس *Vitis* با کاربوتیپ $2n=38$ در گروه نهاندانگان دولپه‌ای قرار دارد. این گیاه دارای ۶۰ گونه است که مهم‌ترین آن‌ها *Vitis vinifera* از آسیای غربی منشاء گرفته است. جنس *Vitis* به طور وسیع در منطقه بزرگی از عرض جغرافیایی ۲۵ و ۵۰ درجه در آسیای شرقی، اروپا، آمریکای شمالی، خاورمیانه و به صورت محدود در نواحی گرمسیر مکزیک، گواتمالا، جزایر وابسته به دریای کارائیب و شمال آمریکای جنوبی کشت می‌شود (Sajid et al., 2006)؛ (Ercisli and Orhan, 2008). ایران به علت

برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، یکی از مهم‌ترین مراکز تولید و پرورش انگور در جهان محسوب شده و بر اساس گزارش وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۸ هفتمین کشور تولید کننده این محصول در جهان به شمار می‌آید (Anonymous, 2009). استان خراسان رضوی به عنوان قطبی مهم در تولید تجاری انگور ایران مطرح است. ارقام مختلف انگور در این استان در سطح انبوه تولید و وارد بازارهای داخلی و خارجی می‌شوند. علاوه بر ارقام بومی این استان برخی ارقام غیربومی از کشورهای دیگر وارد برنامه کشت و تولید این محصول در استان شده‌اند و به دلیل سازگاری با شرایط محیطی در زمره ارقام پر محصول و با کیفیت قرار گرفته‌اند. از جمله ارقام غیربومی در این استان، ارقام ترکمن هستند که بومی کشور ترکمنستان بوده و اکنون در این استان مورد کشت و بهره‌برداری قرار می‌گیرند. برای تشخیص این ارقام از ارقام بومی و بررسی تنوع در بین ارقام داخلی می‌توان از روش تاک‌نگاری سنتی استفاده کرد، اما از آن‌جا که این روش کاملاً تحت تاثیر شرایط محیطی است نمی‌تواند نتایج ثابت و قابل اطمینانی را ارائه کند. نشانگرهای مولکولی به واسطه مستقل بودن از عوامل محیطی می‌توانند جایگزین مناسبی برای ارزیابی تنوع در گیاهان باشند. روش‌های بر پایه‌ی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به دلیل سهولت، هزینه پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو

شده است. به عنوان مثال توسط بلیر و همکاران (Blair *et al.*, 2004) در برنج، گنزالس و همکاران (Gonzalez *et al.*, 2005) در لوبیا و هائو و همکاران (Hou *et al.*, 2005) در جو به کار رفته و تمامی آن‌ها بر سودمند بودن این نشانگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی تأکید کرده‌اند. استفاده از نشانگر RAPD برای مطالعه تنوع در بین ارقام انگور رومانی گزارش شده است (Bodea *et al.*, 2009). در ترکیه نیز مطالعاتی روی تنوع ژنتیکی انگورهای بومی با نشانگر RAPD انجام شده است (Karatas and Sabit Agaoglu, 2008). وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 1999) از نشانگرهای RAPD برای تمایز ژنوتیپ‌های انگور متعلق به گونه‌های مختلف استفاده کردند. تنوع بین ارقام *Vitis vinifera* مرکز شیلی نیز به وسیله دو نوع نشانگر RAPD و ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته و کارایی این دو نوع نشانگر در تشخیص تنوع ژنتیکی به اثبات رسید (Herrera *et al.*, 2002). قبادی و همکاران (Ghobadi *et al.*, 2008) تنوع و روابط ژنتیکی بین تعدادی از ژنوتیپ‌های انگور استان اصفهان را با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار داده و این تکنیک را به عنوان یک روش مولکولی مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی، تجزیه ژنی و تعیین رابطه ژنتیکی ارقام انگور معرفی کردند. این تحقیق با هدف بررسی امکان کاربرد دو نشانگر ISSR و RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین هشت رقم انگور

امروزه به طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی در بین ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزار قدرتمندی برای شناسایی چند شکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است. در بین نشانگرهای موجود، نشانگرهای RAPD و ISSR برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته و کارآمد گزارش شده‌اند (Sicard *et al.*, 2005). Williams *et al.*, 1990 RAPD یکی از گسترده‌ترین روش‌ها برای مطالعات تنوع ژنتیکی است (Gupta and Rustgi, 2004). کارلیر و همکاران (Carlier *et al.*, 2004) در بررسی نقشه‌های ژنتیکی از این نوع نشانگر استفاده کردند. RAPD بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA ژنوم استوار بوده و نیازی به اطلاع دقیق از توالی DNA الگو ندارد. بر اساس یافته‌های سوفرامانین و گوپال کریشنا (Souframani and Gopalkrishna, 2004) که مبتنی بر مقایسه بین نشانگرهای ISSR و RAPD بوده است، مشخص شد که نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارند. به دلیل ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تکرارپذیری، تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا، به طور گسترده‌ای به خصوص در گیاهان به کار گرفته

غیربومی ترکمن، شش رقم انگور بومی خراسان رضوی و یک رقم انگور غیربومی از گونه *Vitis muscadinia* و تعیین میزان قرابت و خویشاوندی ارقام ذکر شده انجام شد.

استخراج مطابق با روش CTAB انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ در بافر 0.5X TBE و روش اسپکتوفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ارقام بومی و غیربومی انگور موجود در کلکسیون تحقیقاتی انگور مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی استفاده شد. استخراج DNA از برگ‌های جوان شاخه‌های دو ماهه هر رقم با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد. مقدار ۰/۷ گرم نمونه برگ در نیتروژن مایع منجمد شده و در هاون استریل به همراه ۵ میلی لیتر بافر حاوی سوکسینات، سترات و پلی وینیل پیرولیدین (SCPP) تا حصول مایع همگن ساییده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مایع حاصله به اپندورف‌های ۲ میلی لیتری استریل منتقل شده و در دستگاه سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفوژ دو فاز متمایز در هر اپندورف تشکیل شد. فاز مایع بالایی حذف و به رسوب باقیمانده آن ۵۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین به همراه سرم آلبومین گاوی (PBS/BSA)، ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB از پیش گرم شده در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرکاپتانول ۰/۲٪ (۳ میکرولیتر) اضافه گردید. سایر مراحل

واکنش‌های PCR

از بین ۲۰ آغازگر RAPD و ۱۵ آغازگر ISSR اولیه، ۷ آغازگر RAPD و ۷ آغازگر ISSR که تولید باندهای شفاف و تکرارپذیر کردند جهت انجام واکنش‌های PCR استفاده شدند. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار آغازگر، ۰/۲ میلی مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs)، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز (Taq DNA polymerase)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR حاوی ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای آغازگرهای RAPD و ISSR مطابق روش‌های پیشنهادی تنظیم شد. واکنش‌های PCR پس از بهینه‌سازی شرایط در ترموسایکلر پرموس مدل Primus 25 انجام شد. محصولات حاصل از واکنش‌های RAPD با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد و محصولات به دست آمده از واکنش‌های ISSR به وسیله ژل آگارز ۱/۸ درصد در بافر (TBE) 0.5x الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل به منظور قابل رؤیت شدن محصولات PCR تحت تابش اشعه ماوراء بنفش با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵٪ درصد انجام شد.

و دندروگرام بر مبنای الگوریتم خوشه‌ای UPGMA و بر اساس ضریب جاکارد رسم شد (Rohlf, 2005).

نتایج و بحث

نام و مشخصات ارقام انگور استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ و لیست آغازگرها و شرایط مورد استفاده در PCR در جدول‌های ۲ تا ۴ نشان داده شده‌اند.

اطلاعات حاصل از باندهای آغازگرها به صورت ماتریس صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) در Excel وارد و جهت تجزیه و تحلیل‌های بعدی در قالب یک فایل متنی ذخیره شد. در این تحقیق نرم‌افزارهای SPSS و NTSYS-pc 2.02 مورد استفاده قرار گرفتند. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد محاسبه شد. تجزیه کلاستر با استفاده از مدل SAHN در نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 محاسبه

جدول ۱- ارقام انگور مورد بررسی و خصوصیات مورفولوژیکی آنها

Table 1. Studied grapevine cultivars and their morphological characteristics

| کد Code | نام رقم Cultivar name | تعداد دانه در حبه Number of seed in berry | بازاریسندی Marketing | رنگ حبه Berry color | نوع مصرف Kind of use |
|------------|--------------------------|--|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| T1 | Torkaman 1 | ترکمن ۱ | Good | Black | Industrial |
| T2 | Torkaman 2 | ترکمن ۲ | Good | Pink | Table grape |
| T3 | Torkaman 3 | ترکمن ۳ | Good | Black | Industrial |
| T4 | Torkaman 4 | ترکمن ۴ | Good | Black | Industrial |
| T5 | Torkaman 5 | ترکمن ۵ | Good | pink | Table grape |
| T6 | Torkaman 6 | ترکمن ۶ | Very good | pink | Table grape |
| T7 | Torkaman 7 | ترکمن ۷ | Very good | pink | Table grape |
| T8 | Torkaman 8 | ترکمن ۸ | Very good | pink | Table grape |
| MU | Muscat | موسکات | Bad | Green | Industrial |
| KO | Kolahdari-e-Bojnourd | کلاه‌داری بجنورد | Very good | Green | Table grape |
| Kgh | Keshmeshi-e-Qochan | کشمشی قوچان | Good | yellow Cream | Raisin |
| SN | Sahebi-e-Neyshabur | صاحبی نیشابور | Very good | Purple red | Table grape |
| SR | Sahebi-e-Rezayeh | صاحبی رضایه | good | Purple | Table grape |
| SD | Sadi-e-Lotfabad-e-Dargaz | سعدی لطف‌آباد درگز | Good | Dark red | Industrial |
| Kghe | Red keshmeshi | کشمشی قرمز | Good | Red | Raisin/ Table grape |

کردند. باندهای توسط همه آغازگرها چند شکلی را بین ارقام نشان دادند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر آغازگر ۸/۴ باند بود و باندهای ایجاد شده در دامنه ۴۰۰ bp تا

هفت آغازگر ده جفت بازی که در جدول ۲ نشان داده شده‌اند برای تجزیه و تحلیل RAPD در این تحقیق به کار برده شدند. این آغازگرها در مجموع تولید ۵۹ باند در پانزده رقم انگور

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق، جهت شناسایی ارقام انگور
Table 2. Primers used for determination of different grapevine cultivars

| آغازگرها | نوع نشانگر | توالی | تعداد کل باندها | تعداد باندهای پلی مورفیسم | درصد پلی مورفیسم |
|----------|----------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Primers | Kind of marker | Sequence | Total no.of bands (a) | No. of Polymorphic bands (b) | Polymorphism (%) (b/a - 100) |
| OPM11 | RAPD | AGGTGACCGT | 11 | 11 | 100 |
| OPA9 | RAPD | GGGTAACGCC | 11 | 11 | 100 |
| OPA8 | RAPD | GTGACGTAGG | 11 | 11 | 100 |
| OPB6 | RAPD | GTCCACACGG | 7 | 7 | 100 |
| OPJ12 | RAPD | GTCCCGTGGT | 5 | 5 | 100 |
| OPJ15 | RAPD | TGTAGCAGGG | 6 | 6 | 100 |
| A9 | RAPD | GTCCACACGG | 11 | 11 | 100 |
| S1 | ISSR | CGCTGTGTGTGTGTGTG | 8 | 8 | 100 |
| S2 | ISSR | GAGCACACACACACACA | 8 | 8 | 100 |
| S3 | ISSR | AGAGAGAGAGAGAGAGG | 9 | 8 | 88.8 |
| S4 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGAA | 9 | 9 | 100 |
| S5 | ISSR | ACACACACACACACCCG | 10 | 10 | 100 |
| S6 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGATG | 5 | 2 | 40 |
| S7 | ISSR | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 9 | 7 | 77.7 |

جدول ۳- برنامه دمایی ترموسایکلر برای دو نوع آغازگر RAPD و ISSR
Table 3. The temperature program for both RAPD and ISSR primers

| نوع آغازگر | *دمای واسرشته سازی اولیه | تعداد چرخه | دمای واسرشته سازی ثانویه | دمای اتصال | دمای طولی شدن | دمای طولی شدن نهایی |
|-----------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Kind of markers | *Primary denaturation temperature | Cycle number | Secondry denaturation temperature | Anneling temperature | Extension temperature | Final extension temperature |
| RAPD | 95 | 40 | 95 | 37 | 72 | 72 |
| ISSR | 94 | 35 | 94 | Variable** | 72 | 72 |

* دما بر حسب درجه سلسیوس بیان شده است.

* Celsius degree.

** دمای اتصال آغازگرهای ISSR برای هر آغازگر به وسیله PCR گرادینت تعیین می‌شود.

**Anneling temperature for ISSR primer, followed by PCR is determined as gradient.

جدول ۴- برنامه زمانی ترموسایکلر برای دو نوع آغازگر RAPD و ISSR
Table 4. Thermocycler program for both primer RAPD and ISSR

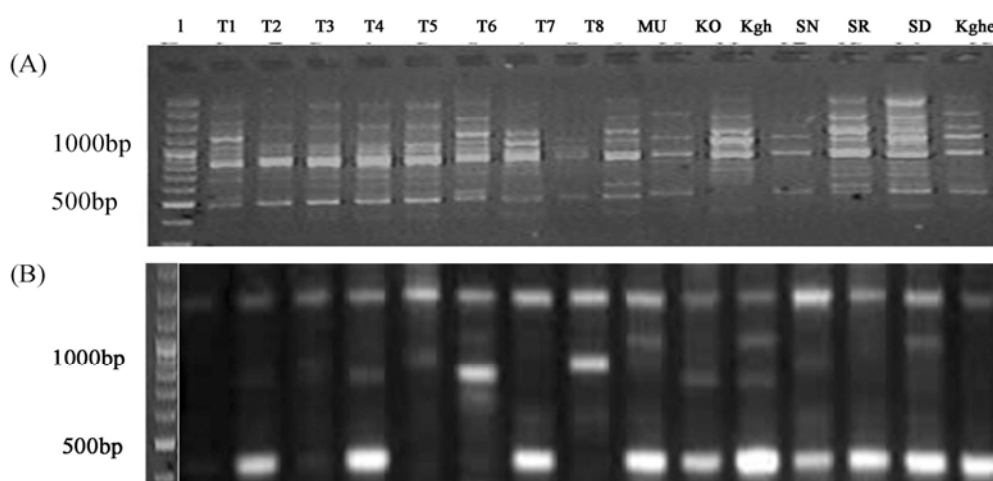
| نوع آغازگر | *زمان واسرشته سازی اولیه | دمای واسرشته سازی ثانویه | زمان اتصال | دمای طولی شدن | دمای طولی شدن نهایی |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------------|
| Kind of markers | * Primary denaturation time | Secondry denaturation temperature | Anneling time | extension temperature | Final extension temperature |
| RAPD | 4 | 1.40 | 1 | 2.45 | 8 |
| ISSR | 3 | 1.40 | 1 | 2.00 | 8 |

* Minute

*زمان بر حسب دقیقه بیان شده است.

ارقام ترکمن ۶ تا ترکمن ۸ به همراه رقم موسکات، کلاهداری، کشمشی قوچان و صاحبی رضاییه در زیر گروه B قرار گرفتند. ارقام صاحبی نیشابور به همراه کشمشی قرمز و سعدی لطف آباد در گز در گروه II جای گرفتند (شکل ۲).

۲۰۰۰bp قرار گرفتند. الگوی بانندی حاصل از آغازگر OPJ15 در شکل ۱-ب نشان داده شده است. بر اساس دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD، پانزده رقم انگور در دو گروه بزرگ I و II قرار گرفتند. گروه I به دو زیر گروه تقسیم شد که ارقام ترکمن ۱ تا ۵ در زیر گروه A و

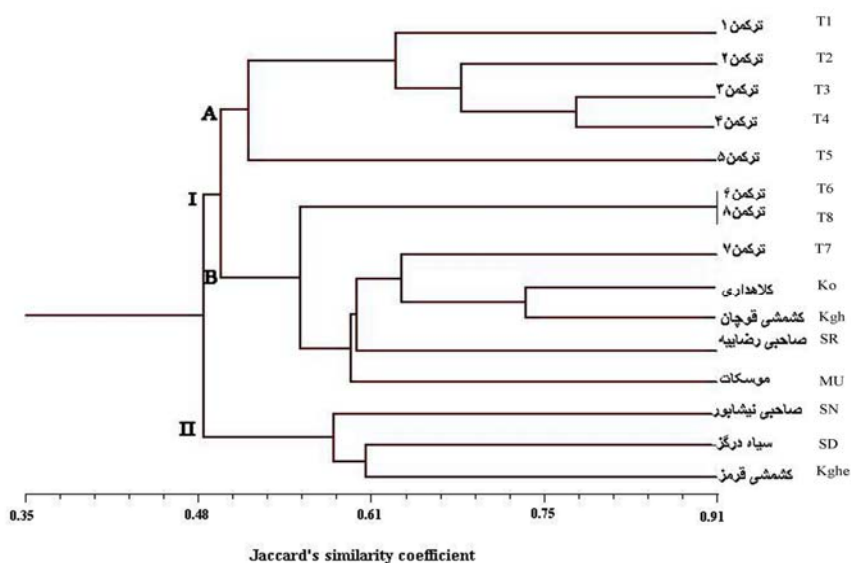


شکل ۱- الف: الگوی بانندی حاصل از آغازگر S7 از سری آغازگرهای ISSR. ب: الگوی بانندی حاصل از آغازگر OPJ15 از سری آغازگرهای RAPD برای شناسایی ارقام انگور

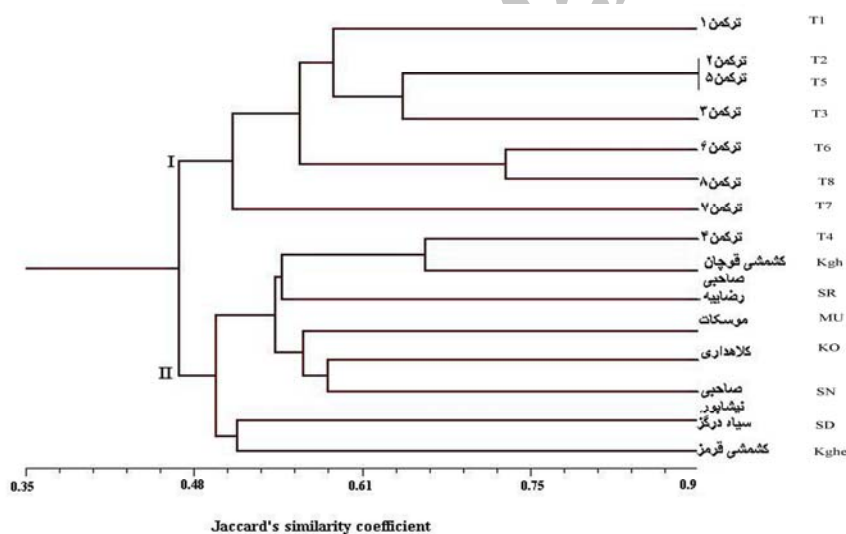
Fig. 1. A: DNA banding pattern by S7 primer distinguished grapevine cultivars. B: DNA banding pattern by OPJ15 primer distinguished grapevine cultivars, L: 100bp DNA ladder

هدف تکثیر شده به وسیله هر یک از نشانگرها یا احتمال خطا در فرآیند تکثیر باشد (Souframanien and Gopalakrishna, 2004). دندروگرام حاصله از داده‌های ISSR، ارقام مورد آزمایش را در دو گروه بزرگ I و II دسته‌بندی کرد. گروه I شامل ارقام ترکمن به جز ترکمن ۴ و گروه II شامل دیگر ارقام مورد بررسی بود. این دندروگرام شباهت زیادی به دندروگرام حاصل از RAPD نشان داد (شکل ۳). الگوی بانندی حاصل از آغازگر S7

هفت آغازگر ISSR مورد استفاده در مجموع تولید ۵۸ باندها در ارقام مورد بررسی کردند. از بین باندهای تولید شده ۵۲ باندها چند شکلی و ۶ باندها همشکلی نشان دادند. بازه‌ی باندهای در آغازگرهای ISSR در دامنه ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ bp قرار گرفت و میانگین تعداد باندهای تولید شده برای هر آغازگر ۸/۲ باندها محاسبه گردید. گروه‌بندی انجام گرفته طبق داده‌های ISSR کمی متفاوت از RAPD به دست آمد که می‌تواند ناشی از تفاوت قطعات



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA
 Fig. 2. Dendrogram showing relationship between 15 different grapevine cultivars based on RAPD analysis using UPGMA
 For name of cultivars see Table 1. برای نام ارقام به جدول ۱ مراجعه شود.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA
 Fig. 3. Dendrogram showing relationship between 15 different grapevine cultivars based on ISSR analysis using UPGMA
 For name of cultivars see Table 1. برای نام ارقام به جدول ۱ مراجعه شود.

در شکل ۱-ب نشان داده شده است. داده‌های تلفیقی دو نوع نشانگر جهت بررسی برای به دست آوردن نتایج قابل اطمینان، از میزان تنوع و گروه‌بندی ارقام استفاده شد. بر

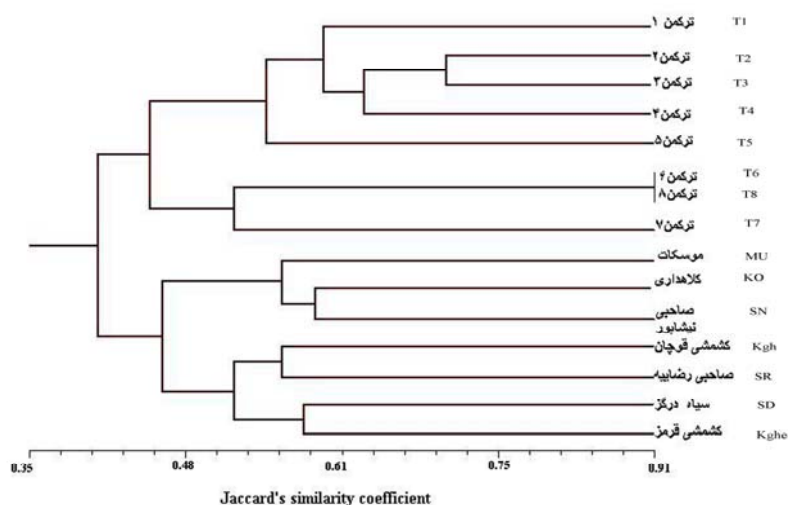
اختلافات درون گونه‌ای نسبت داد. در مورد رقم موسکات که از گونه *Vitis muscadinia* است نتایج قابل توجهی حاصل شد. این رقم وارداتی بیشترین تشابه را با رقم بومی کلاه‌داری بجنورد با ضریب تشابه ۴۹/۱٪ نشان داد. شاید بتوان این تشابه را به جهش‌های ژنتیکی در طی سالیان متمادی نسبت داد.

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیک به دلیل عدم ثبات و تغییرپذیری در اثر عوامل طبیعی نمی‌توانند معیار خوبی برای تشخیص شباهت‌ها و تفاوت‌ها باشند؛ در حالی که نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قدرتمندی برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی هستند، چرا که تحت تاثیر محیط قرار نگرفته و در کل ژنوم پراکنده‌اند و می‌توانند تفاوت‌های افراد را در سطح توالی نوکلئوتیدی مشخص نمایند (Baradakci, 2001).

نشانگرهای مولکولی DNA به طور وسیعی برای تشخیص تنوع گونه‌های گیاهی مختلف استفاده می‌شوند. در تحقیق اخیر نشانگرهای RAPD و ISSR برای مطالعه تنوع در بین ارقام مختلف بومی و غیربومی گونه *V. vinifera* و یک رقم وارداتی انگور وحشی از گونه *Vitis muscadinia* استفاده شد. انتخاب نوع نشانگر از نظر برخی خصوصیات از جمله تکرارپذیری، سهولت انجام و تجزیه و تحلیل نتایج و هزینه آن یکی از مهم‌ترین مراحل

اساس تجزیه کلاستر داده‌های تلفیقی RAPD و ISSR ارقام مورد مطالعه در دو گروه بزرگ دسته‌بندی شدند. در این گروه‌بندی هشت رقم غیربومی ترکمن در یک گروه و رقم موسکات به همراه ارقام بومی در گروه دیگر قرار گرفتند. در گروه دوم رقم موسکات به همراه ارقام کلاه‌داری و صاحبی نیشابور در یک زیرگروه و دیگر ارقام بومی در زیر گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۴). بر اساس جدول ضریب تشابه جاکارد، در بین ارقام مورد بررسی بیشترین تشابه بین ارقام ترکمن ۶ و ترکمن ۸ با ضریب تشابه ۹۱/۵ درصد و کمترین تشابه بین ارقام صاحبی نیشابور و ترکمن ۳ به دست آمد (جدول ۵). تشابه ژنتیکی ارقام ترکمن ۶ و ترکمن ۸ با توجه به همانندی کامل صفات مورفولوژیکی آن‌ها و احتمال این که این دو رقم در اصل یک رقم بوده و به واسطه تکثیر و انتشار آن در نواحی مختلف به عنوان دو رقم متفاوت معرفی شده‌اند بسیار زیاد است. فاصله ژنتیکی زیاد بین ارقام صاحبی نیشابور و ترکمن ۳ با بررسی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی این دو رقم که کاملاً با یک دیگر متفاوت بوده منطقی به نظر می‌رسد. صفات مورفولوژیکی مانند رنگ پوست و گوشت حبه از جمله صفات غیرمشابه این دو رقم به شمار می‌آیند.

در این بررسی با توجه به این که همه ارقام به جز رقم موسکات متعلق به گونه *V. vinifera* هستند تفاوت‌های ژنتیکی موجود را می‌توان به



شکل ۴- دندروگرام داده‌های تلفیقی ISSR و RAPD با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA

Fig. 4. Dendrogram showing relationship between 15 different grapevine cultivars based on combined ISSR and RAPD analysis using UPGMA
For name of cultivars see Table 1.
برای نام ارقام به جدول ۱ مراجعه شود.

متفاوتی طی آزمایش‌های مکرر نشان می‌دهد. از این رو تکرار آزمایش‌ها در آزمایشگاه‌های مختلف و با ترموسایکلرهای گوناگون می‌تواند میزان خطا را در این نشانگر کاهش دهد. استفاده از نشانگر دیگری که بتواند نتایج حاصل از داده‌های RAPD را تایید کند منطقی به نظر می‌رسد. از جمله نشانگرهای کم هزینه با تکرارپذیری بالا نشانگر ISSR است.

گزارش‌های متعددی تکرارپذیری و ثبات این نشانگر را تایید کرده‌اند. نشانگر ISSR در گونه‌های گیاهی مختلف جهت انگشت‌نگاری و بررسی تنوع مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله مطالعات انجام شده می‌توان به بررسی چند شکلی ایجاد شده توسط نشانگر ISSR در کتان اشاره کرد (Liu and Jonathan, 2001). هررا و همکاران (Herrera et al., 2002) با

در مطالعات مولکولی به حساب می‌آید (Sharma et al., 2008). رحمان و همکاران (Rahman et al., 2007) با انجام تحقیق بر روی انبه گزارش دادند که نشانگر RAPD ابزاری مفید جهت بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی است و علی‌رغم ناپایداری نتایج حاصل از آنها، به دلیل استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای پایین اتصال که باعث تکثیر غیر اختصاصی برخی از نواحی ژنوم می‌گردد کاربرد فراوان دارد (Ulanovsky, 2002). سی و شش رقم انگور بومی رومانی با استفاده از ۲۴ آغازگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند و در سه گروه بزرگ دسته بندی شدند (Bodea et al., 2009). با این حال واکنش‌های RAPD به دلیل تکرارپذیری پایین اغلب نتایج

جدول ۵ - جدول ضریب تشابه جاکارد برای پانزده ژنوتیپ انگور بر پایه داده‌های تلفیقی دو نشانگر RAPD و ISSR
 Table 5. Jaccard similarity coefficient of fifteen grapevine cultivars based on RAPD and ISSR analysis

| Cultivar | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | MU | KO | Kgh | SN | SR | SD |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T2 | 0.667 | | | | | | | | | | | | | |
| T3 | 0.636 | 0.746 | | | | | | | | | | | | |
| T4 | 0.600 | 0.676 | 0.645 | | | | | | | | | | | |
| T5 | 0.643 | 0.687 | 0.600 | 0.590 | | | | | | | | | | |
| T6 | 0.438 | 0.500 | 0.438 | 0.346 | 0.517 | | | | | | | | | |
| T7 | 0.479 | 0.466 | 0.357 | 0.456 | 0.471 | 0.500 | | | | | | | | |
| T8 | 0.450 | 0.513 | 0.472 | 0.392 | 0.528 | 0.915 | 0.515 | | | | | | | |
| MU | 0.420 | 0.429 | 0.333 | 0.394 | 0.356 | 0.357 | 0.349 | 0.412 | | | | | | |
| KO | 0.378 | 0.486 | 0.373 | 0.500 | 0.386 | 0.375 | 0.483 | 0.408 | 0.491 | | | | | |
| Kgh | 0.476 | 0.500 | 0.387 | 0.533 | 0.516 | 0.388 | 0.421 | 0.417 | 0.384 | 0.522 | | | | |
| SN | 0.333 | 0.400 | 0.303 | 0.343 | 0.333 | 0.310 | 0.317 | 0.343 | 0.434 | 0.509 | 0.456 | | | |
| SR | 0.381 | 0.405 | 0.277 | 0.410 | 0.374 | 0.345 | 0.355 | 0.341 | 0.412 | 0.493 | 0.608 | 0.469 | | |
| SD | 0.449 | 0.456 | 0.352 | 0.447 | 0.447 | 0.370 | 0.398 | 0.366 | 0.380 | 0.507 | 0.610 | 0.372 | 0.587 | |
| Kghe | 0.435 | 0.393 | 0.318 | 0.349 | 0.434 | 0.352 | 0.313 | 0.348 | 0.360 | 0.432 | 0.543 | 0.389 | 0.579 | 0.663 |

For name of cultivars see Table 1.

برای نام ارقام به جدول ۱ مراجعه شود.

نام‌های مختلف خوانده می‌شوند یا بالعکس ارقام متفاوتی که به صورت یکسان نامگذاری شده‌اند جهت حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسِم انگور ایران بسیار کاربردی است. برای بررسی‌های دقیق‌تر می‌توان نمونه‌گیری را از کلیه کلکسیون‌های انگور ایران در مناطق مختلف انجام داده و با استفاده از روش‌های مولکولی دقیق ارقام بومی شده در ایران را به طور صحیح نامگذاری و دسته‌بندی کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و با استفاده از ارقام موجود در کلکسیون انگور و امکانات آزمایشگاهی آن مرکز انجام شده است که بدین وسیله از این همکاری سپاسگزاری می‌شود.

استفاده از ده آغازگر RAPD و یازده آغازگر ISSR ارقام انگور بومی شیلی را با یکدیگر و همچنین دو رقم Merlot بومی شیلی و فرانسه را با هم مورد ارزیابی قرار دادند. بر اساس نتایج به دست آمده از آن تحقیق دو رقم همنام بومی شده در شیلی و فرانسه خویشاوندی ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر نداشته و دو ژنوتیپ متفاوت و همنام بودند. شباهت بسیار بالای دو رقم ترکمن ۶ و ترکمن ۸ با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زیاد این دو رقم این احتمال را که دو رقم در اصل یک رقم بوده و طی گذشت زمان و به واسطه برخی جهش‌ها از هم جدا شده باشند را تقویت می‌کند. همچنین قرار گرفتن رقم موسکات در کنار دو رقم کلاهداری و صاحبی نیشابور این فرضیه که سه رقم جهش یافته‌های یک رقم باشند را مطرح می‌سازد. این‌گونه تحقیقات برای شناسایی ارقامی که دارای ژنوتیپ‌های یکسان بوده و در مناطق گوناگون کشور با

References

- Anonymous, 2009.** Statistics of Agricultural Crops. Center of Statistics and Information, Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran (in Persian).
- Baradakci, F. 2001.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turkish Journal of Biology 25: 185-196.
- Blair, M. W., Panaud, O., and McCouch, S. R. 2004.** Inter-simple sequence repeats (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). Theoretical and Applied Genetics 109: 1432-1442.

- Bodea, M., Pamfil, D., Pop, R., and Pop, I. F. 2009.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity among Romanian local vine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. Bulletin UASVM Horticulture 66 (1): 17-22.
- Carlier, J. D., Reis, A., Duval, M. F., Conppens, G., and Leitaio, J. M. 2004.** Genetic maps of RAPD, AFLP, and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *Ananas comosus* using the pseudo-testcross strategy. Plant Breeding 123: 186–192.
- Ercisli, S., and Orhan, E. 2008.** Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh Valley revealed by RAPD Markers. Guleray Agar. Biochem. Genet. 46: 590–597.
- Ghobadi, C., Khoshkho, M., and Seyed Tabatabaei, B. I. 2008.** Genetic relatedness and variation of some grape genotypes (*Vitis vinifera* L.) in Isfahan province using RAPD markers. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 45 (2): 627-635 (in Persian).
- Gonzalez, A., Wong, A., Delgado-Salinas, A., Papa, R., and Gepts, P. 2005.** Assessment of ISSR markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. Crop Science 45: 606–615.
- Gupta, P. K., and Rustgi, S. 2004.** A review, molecular markers from the transcribed expressed region of genome in higher plants. Functional Integrative Genomic 4: 139–162.
- Herrera, R., Cares, V., Wilkinson, M. J., and Caligari, P. D. S. 2002.** Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. Euphytica 124: 139-145.
- Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wei, Y. M., and Zheng, Y. L. 2005.** Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetics Newsletter 35: 9-22.
- Karatas, H., and Sabit Agaoglu, Y. 2008.** Genetic diversity among Turkish local grape accessions (*Vitis vinifera* L.) using RAPD markers. Hereditas 145: 58-63.
- Liu, B., and Jonathan, F. W. 2001.** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. J. Mole. Eco. Not. 1: 205-208.

- Rahman, M. L., Rabbani, M. G., Siddique, M. N. A., Rahman, M. A., Garvey, E. J., and Rahaman, E. H. M. S. 2007.** Molecular characterization of 28 mango germplasm using RAPD. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 17(1): 71-77.
- Rohlf, F. J. 2005.** NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software: Setauket, New York.
- Sajid, G. M., Ilays, M. K., and Anwar, R. 2006.** Effect of diverse hormonal regimes on *in vitro* growth of grape germplasm. *Journal of Botany* 38 (2): 385-391.
- Sharma, A., Namdeo, A. G., and Mahadik, K. R. 2008.** Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. *Pharm. Rev.* 2 (3): 24-34.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., and Papa, R. 2005.** Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding* 124 (5): 464-472.
- Souframanien, J., and Gopalkrishna, T. 2004.** A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109 (8): 1687-93.
- Tafazzoli, E., Hekmati, J., and Firoozeh, P. 1994.** Grapes. University of Shiraz Publications. Shiraz, Iran. 343 pp. (in Persian).
- Ulanovsky, S., Gogrcena, Y., Martinez, F., and Ortiz, J. M. 2002.** Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines. *Scientia Horticulturae* 92: 241-254.
- Wang, Y., Chen, J., and Lu, J. 1999.** Random amplified polymorphic DNA analysis of vitis species and Florida bunch grapes. *Scientia Horticulturae* 82: 85-94.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalskiand, J. A., and Tingey, S. V. 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.