Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۵۶۸ - ۵۵۹

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انگور با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی IRAP و REMAP

Assessment of genetic diversity in Grapevine cultivars using IRAP and REMAP retrotransposon-based markers

محمدقاسم کشاورزخوب[۱]، شاهرخ قرنجیک*[۱]، اسد معصومی اصل[۲]، مهدیه پارسائیان[۱]، بابک عبدالهی مندولکانی[۳]

۱-به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

Keshavarz Khoob MGH[1], Gharanjik SH*[1], Masoumiasl A[2], Parsaeyan M[1], Abdollahi Mandoalkani B[3]

1- Former MSc Student, Assisstant Professors, Department of Plant Biotechnology College of Agriculture, University of Shahrood, Iran
2- Assisstant Professor, Department of Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj
3- Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Urmia University, Urmia

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gharanjik@shahroodut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

تعیین تنوع ژنتیکی مواد گیاهی، گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی بوده و اهمیت زیادی در اجرای برنامه‌های اصلاحی دارد. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم انگور شهرستان‌های شاهرود و سی‌سخت از ۹ آغازگر و ترکیب آغازگری رتروترنسپوزونی شامل سه آغازگر IRAP و شش ترکیب آغازگری REMAP استفاده شد. در مجموع ۸۷ باند تولید شد که ۷۹ باند در بین ارقام چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکل از چهار (Tvv1Fa+Ms11) تا ۱۲ باند (Vin1Fa) به ازای هر آغازگر متغیر بود. هتروزیگوسیتی موردانتظار از ۰/۲۹ (Tvv1Fa+ Ms8) تا ۰/۴۴ (Vine1Fa+ Ms3) متغیر و میانگین آن ۰/۳۵ به‌دست آمد. میانگین درصد چندشکلی در بین ارقام مورد مطالعه ۹۵/۸۳ درصد بود. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که پنج مولفه اول توانستند در مجموع، ۶۸/۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه کلاستر به روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد با ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۸۹، ارقام مورد مطالعه را در شش گروه متفاوت قرار داد به‌طوری‌که در گروه اول تا ششم به‌ترتیب ۱۳، ۴، ۲، ۳،۲ و ۱ رقم از ارقام مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس این گروه‌بندی سه رقم سیاه‌دانه بلند، سیاه دانه گرد و عسکری که از شهر سی‌سخت انتخاب شدند در سه گروه مجزا قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی این ارقام می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای IRAP و REMAP توسعه‌یافته بر اساس رتروترنسپوزون‌های فعال در ژنوم انگور می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ملکولی کارا در تسریع برنامه‌های اصلاحی در انگور مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

انگور
تنوع ژنتیکی
رتروترنسپوزون
IRAP
REMAP

Archive of SID

مقدمه

انگور گیاهی از خانواده Vitacea و از جنس Vitis است. شواهد نشان می‌دهد که انگورهای وحشی قبل از انسان وجود داشته‌اند. از طرف دیگر تعداد ژنوتیپ‌های انگور در جهان بیش از ۱۰۰۰۰ مورد می‌باشد که در بین آن‌ها هم‌نام‌ها[1] و دگر نام‌های[2] زیادی دیده می‌شوند که به برنامه جامعی جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها در سطح جهانی نیاز می‌باشد (Galletta et al. 1999). این مشکل در ژنوتیپ‌های انگور ایران نیز مشاهده می‌شود به‌طوری‌که، یک ژنوتیپ انگور در مناطق مختلف دارای نام‌های متفاوت بوده یا چند ژنوتیپ مختلف را به یک نام می‌شناسند. این مسئله موجب بروز مشکلاتی برای تولیدکنندگان در انتخاب ژنوتیپ مناسب برای شرایط آب و هوایی خاص یا نوع مصرف شده‌است. هم‌چنین به‌دلیل سابقه طولانی مدت کشت انگور در ایران، جهش‌های طبیعی در برخی ارقام آن به‌وجود آمده است که باعث تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف شده‌است. آگاهی از تنوع ژنتیکی، نقش مهمی در به‌نژادی دارد. لذا تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (Lawe et al. 1994). یکی از دغدغه‌های مهم جوامع گیاهی حفظ تنوع زیستی موجود می‌باشد (Hodgkin and Ramanata Roa 2002; Naghavi et al. 2005). نشانگرهای مولکولی می‌توانند اطلاعاتی در مورد خصوصیات تنوع، نظیر جریان ژنی و الگوی اصلی یک جمعیت در اختیار محقق قرار داده (Hodgkin and Ramanata Roa 2002) و پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (Ferguson et al. 1995).

عناصر ژنتیکی متحرک در واقع قطعاتی از ژنوم موجود زنده می‌باشند که قادرند در ژنوم میزبان جابه‌جا شوند. این قطعات ابتدا توسط باربارامک کلینتاک[3] در دهه ۱۹۶۰، در ذرت کشف شدند (Kumar et al. 1999; Lodish et al. 2003). این عناصر ژنتیکی متحرک به دلیل فراوانی زیاد و حضور در همه جای ژنوم، نقش مهمی را در تکامل گیاهان ایفا کرده و از پتانسیل بالایی جهت بررسی روابط و تنوع ژنتیکی گیاهان برخوردار هستند (SanMiguel et al. 1998). گروهی از این عناصر را که هنگام جابجایی در مکان اولیه باقی نمی‌مانند (DNA به‌صورت مستقیم جابه‌جا می‌شود) ترنسپوزون گویند که کمتر از ۶۰۰bp طول داشته و تعداد کپی‌های آن‌ها بسیار زیاد است. گروه دیگر که به‌واسطه یک رونوشت RNA و تبدیل آن به cDNA جابه‌جا شده و نسخه اصلی در مکان اولیه در ژنوم باقی می‌مانند را رتروترنسپوزون گویند. رتروترنسپوزون‌ها به ۹ گروه تقسیم شده و از مهم‌ترین آن‌ها، گروه LTR[4]دار می‌باشد. علت این نام‌گذاری، داشتن یک توالی تقریبا طولانی مشابه در دو انتهای این نوع رتروترنسپوزون‌ها می‌باشد. رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند و گاهی میزان آن‌ها به بیش از ۷۵ درصد ژنوم هم می‌رسد (SanMiguel et al. 1998). به‌نظر می‌رسد در گیاهان، رتروترنسپوزون‌های LTR فراوان‌ترین و فعال‌ترین آن‌ها باشند (Li et al. 2004). مطالعات انجام شده روی ژنوم انگور نشان داده که عناصر جابه‌جا شونده به فراوانی در ژنوم انگور حضور دارند. علاوه بر این، مشخص شده که فراوانی رتروترنسپوزون‌های LTR بیشتر از رتروترنسپوزون‌های غیر LTR می‌باشد (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007). اولین توالی رتروترنسپوزونی شناسایی شده از ژنوم انگور، رتروترنسپوزون Gret1 متعلق به گروه Ty3-gypsy می‌باشد (Kobayashi et al.2004). قبل از این، فقط دو بخش از توالی دو رتروترنسپوزون انگور از گروه Ty1-Copia شناسایی شده بود که یکی از آن‌ها Vine1 (عناصر شماره یک *V.vinifera*) (Verries et al. 2000) و دیگری Tvv1 نام داشت (Pelsy et al. 2002). در گذشته برای بررسی منشاء و روابط ما بین ارقام مختلف انگور بیش‌تر از مدارک تاریخی در ترکیب با داده‌های آمپلوگرافی استفاده شده‌است. امروزه با توسعه انواع نشانگرهای مولکولی، امکان بررسی دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ارقام انگور و ارتباط آن‌ها با ژنوتیپ‌های وحشی فراهم شده است (Karp et al. 1998). از جمله این نشانگرها، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها نظیر IRAP[5] و REMAP[6] می‌باشند که در انگور به‌منظور تعیین چند شکلی بر مبنای رتروترنسپوزون‌های vine1 در ارقام *Vitis vinifera* (Labra et al.

[1] Homonyms
[2] Synonyms
[3] Barbara McClintock
[4] Long terminal repeat
[5] Inter retrotransposon amplified polymorphism
[6] Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

2004)، تجزیه و تحلیل ژنومی رتروترنسپوزون Gret1 در ارقام *Vitis vinifera* (Pereira et al. 2005) و تکثیر ژنومی رتروترنسپوزون Gret1 در انگورهای سفید وحشی و زیرگونه‌های هیبرید (Cadle-Davidson and Owens 2008) استفاده شده است. مکان‌های الحاق رتروترنسپوزون‌ها، اطلاعات بسیار مهمی را جهت مطالعات فیلوژنی و شجره‌ای ژرم پلاسم‌ها در اختیار قرار می‌دهد. علاوه بر این مزیت، به‌واسطه پراکندگی گسترده، حضور در همه جای ژنوم و فراوانی این عناصر ژنی متحرک، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان یک نشانگر توانمند جهت بررسی تنوع ژنتیکی استفاده کرد. از ویژگی‌های مهم دیگر این نشانگرها این است که میزان پلی‌مورفیسم بیش‌تری را در مقایسه با دیگر نشانگرهای مولکولی نشان می‌دهند (Kalendar and Schulman 2006). در تحقیقی برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۹ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس Vitis، نشانگرهایS-SAP، IRAP و REMAP مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها با نشانگرهای SSR، ISSR و AFLP مقایسه و گزارش شد که نشانگرهای رتروترنسپوزونی REMAP بهتر از نشانگرهای دیگر روابط ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه را نمایان می‌سازد (D'Onofrio et al. 2010).

تاکنون تنوع ژنتیکی ارقام انگور موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود و باغات انگور شهر سی‌سخت با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت رتروترنسپوزون‌ها در این کلکسیون و استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP مبتنی بر این رتروترنسپوزون‌ها برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام موجود در کلکسیون مذکور بود.

مواد و روش‌ها

ارقام انگور مورد بررسی در این تحقیق شامل ۲۲ رقم تهیه شده از کلکسیون مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود (استان سمنان) و سه رقم جمع‌آوری شده از باغات انگور شهر سی‌سخت (استان کهگیلویه وبویراحمد) می‌باشند (جدول ۱). از سه آغازگر IRAP و شش ترکیب آغازگری REMAP برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد (جدول ۲).

جدول۱- ارقام انگور مورد مطالعه

* کد رقم	نام رقم	کد رقم	نام رقم
۳۳	ریش بابا	۳	فخری نیشابور
۳۵	رزاقی قوچان	۴	لعل کاشمر
۳۶	رزاقی کاشمر	۹	طرفی کاشمر
۳۷	سبز انگور	۱۱	خلیلی بیدانه قوچان
۴۱	لطف آباد	۱۲	کلدری بیرجند
۴۳	کولیجه	۱۴	پیرقلی شماره ۲
۴۴	کشمشی قوچان	۱۵	خلیلی نر قوچان
۵۳	کشمشی قرمز	۱۶	شغالی نیشابور
۵۴	کشمشی سفید	۱۷	کشمشی جرتوده
c	عسکری	۱۸	پیچ کاشمر
a	سیاه دانه بلند	۲۰	هایه‌میش بیرجند
b	سیاه دانه گرد	۲۳	گل بر طبق
		۳۱	دوشاب قوچان

* a، b و c کدهای ارقام جمع‌آوری شده از سی‌سخت و شماره‌ها کدهای ارقام تهیه شده از مرکز تحقیقات شاهرود را نشان می‌دهد.

استخراج DNA از نمونه‌های برگی جوان به روش CTAB (Ausubel et al. 1995) انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد. برای انجام واکنش PCR، از دستورالعمل Williams et al. (1990) با اندکی تغییرات استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۷۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول از هر کدام dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۱۰ پیکو مول از هر آغازگر، بافر PCR یک برابر (۱۰ میلی مول Tris-HCl، ۵۰ میلی مول KCL، pH= ۸/۳) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIORAD مدل MJ Mini (نورنبرگ، آلمان) انجام شد. دستورالعمل PCR با ۹۴ درجه سانتی‌گراد و پنج دقیقه آغاز شد و ۳۴ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۵۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱۰ دقیقه ادامه یافت. محصول تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد تفکیک شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی (′۳→′۵)	نوع آغازگر
Gret1Fa	R*TGCGTCCRGACACCCTGT	رتروترنسپوزون
Tvv1Fa	TCCARCTTCAGGGGGAGTGT	رتروترنسپوزون
Vine1Fa	TTCAGCACTCTTCATCAATAAA	رتروترنسپوزون
Ms3	$(CAC)_7T$	ISSR
Ms7	$(AG)_{10}G$	ISSR
Ms8	$(AG)_{10}$ C	ISSR
Ms11	$(CT)_{10}G$	ISSR

*R معرف پورین (A/G) می‌باشد.

الگوی باندی حاصل، براساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه-ها، به‌صورت یک و صفر امتیاز دهی شدند (شکل ۱). تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) توسط نرم‌افزار NTSYS-pc نسخه ۲/۰۲ (Rohlf et al. 2000)، شاخص شانون (SI) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) توسط نرم‌افزار GENALEX نسخه ۶/۵ (Peakall and Smouse 2006) و صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از آزمون اف-بیل توسط نرم‌افزار SAS، درصد چندشکلی توسط نرم‌افزار PopGene نسخه ۱/۳۲ (Yeh et al. 1999) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

آغازگرهای رتروترنسپوزونی مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۸۷ باند تولید کردند که در نهایت ۷۹ باند چندشکلی نشان دادند. از آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق ترکیب آغازگری Tvv1Fa+Ms11 با چهار باند کم‌ترین باند چندشکل و آغازگر Vin1Fa با ۱۲ باند، بیش‌ترین تعداد باند چندشکل را تولید کردند (جدول ۳). لذا به نظر می‌رسد که رتروترنسپوزون-های Vin1Fa در فرایند تکامل ارقام مورد بررسی بیشتر جابجا شده‌اند و تعداد نسخه‌های بیش‌تری را در ژنوم تکثیر کرده‌اند.

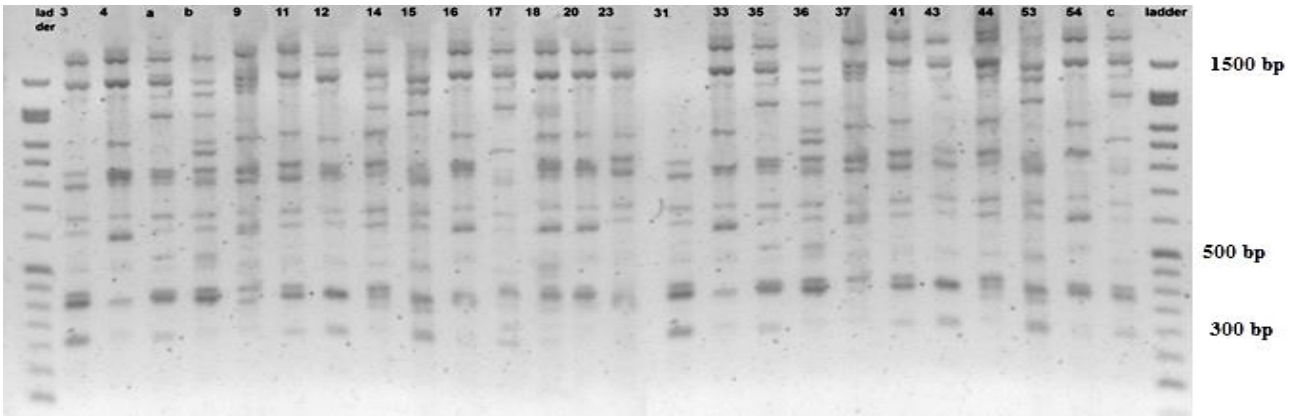
هم‌چنین این نشانگرها از گروه رتروترنسپوزون‌های Ty1-copia هستند لذا نتایج این تحقیق این احتمال را تقویت می‌کند که رتروترنسپوزون‌های گروه Ty1-copia بیش‌تر از رتروترنسپوزون-های گروه Ty3-gypsy در گیاه انگور تکثیر و در طی تکامل این گیاه بیش‌تر جابه‌جا شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که رتروترنسپوزون‌های Ty1-copia سطح متفاوتی از چند شکلی را در انگور نشان می‌دهند. وقوع و پراکنش رتروترنسپوزون‌های Vine-1, Tvv1 و Gret1 در ارقام انگور توسط D'Onofrio (2010) نیز نشان داد که رتروترنسپوزون‌های gypsy-like و copia-like در جنس انگور گسترده‌اند. تمامی آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، توانستند تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف انگور را به‌خوبی نشان دادند. از میان سه آغازگر Tvv1Fa، Vin1Fa و Gret1Fa برای نشانگر IRAP همگی تولید باند کردند. در واقع تمامی آغازگرهای رتروترنسپوزونی انگور که براساس توالی‌های LTR طراحی شده بودند الگوی نواری واضحی تولید کردند. به نظر می‌رسد که الگوی نواری نشانگرهای رتروترنسپوزونی مخصوصاً نشانگرهای IRAP بستگی به فعال یا عدم فعال بودن خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد استفاده و هم-چنین الگوی قرار گرفتن آن‌ها در ژنوم دارد. معمولاً رتروترنسپوزون‌های فعال در داخل رتروترنسپوزون‌های دیگر بیشتر درج می‌شوند. به‌عبارت دیگر به حالت آشیانه‌ای دیده می-شوند ولی خودشان توسط رتروترنسپوزون‌ها دیگر قطع نمی‌شوند (Leigh et al. 2003). اگر خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزونی حالت آشیانه‌ای داشته باشند در این صورت می‌توان در نشانگر IRAP از ترکیبات آغازگری استفاده کرد به‌طوری‌که هرکدام از آغازگرها به‌صورت مستقیم و معکوس بر اساس ناحیه LTR یک رتروترنسپوزون طراحی شود. در این تحقیق از تک آغازگرهای IRAP استفاده شد که نتیجه‌ی مطلوبی حاصل شد. اگر رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم نزدیک به هم باشند می‌توان آغازگرها را بر اساس نواحی داخلی‌تر LTR طراحی کرد ولی در غیر این صورت بهتر است آغازگرها بر اساس نواحی انتهایی LTRها طراحی شوند تا تکثیر مطلوبی حاصل شود (Kalendar et al. 1999; Leigh et al. 2003).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- خصوصیات آغازگرهای رتروترنسپوزونی مورد استفاده در این مطالعه

ترکیب آغازگری	نوع آغازگر	تعدادکل باندها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	شاخص شانون (SI)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)	تعداد آلل‌های موثر (Ne)
Vine1Fa+ Ms3	REMAP	۶	۶	۱۰۰	۰/۶۳	۰/۴۴	۱/۸۲
Gret1Fa +Ms7	REMAP	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۹	۰/۳۲	۱/۵۲
Gret1Fa+ Ms8	REMAP	۱۲	۱۱	۹۱/۶۷	۰/۵۱	۰/۳۴	۱/۵۹
Tvv1Fa+ Ms11	REMAP	۴	۴	۱۰۰	۰/۶۱	۰/۴۲	۱/۷۴
Tvv1Fa+ Ms7	REMAP	۹	۷	۷۷/۷۸	۰/۴۸	۰/۳۳	۱/۵۹
Tvv1Fa+ Ms8	REMAP	۱۲	۹	۷۵	۰/۴۳	۰/۲۹	۱/۵۲
Gret1Fa	IRAP	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۹	۱/۶۶
Tvv1Fa	IRAP	۱۳	۱۱	۸۴/۶۲	۰/۵۱	۰/۳۵	۱/۶۴
Vine1Fa	IRAP	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۵۱	۰/۳۴	۱/۶۰
مجموع		۸۷	۷۹	-	-	-	-
میانگین		۹/۶۶	۸/۷۷	۹۵/۸۳	۰/۵۲	۰/۳۵	۱/۶۳



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر Tvv1Fa. Ladder: نشانگر اندازه (۱۰۰ جفت‌باز)؛ ۳) فخری نیشابور؛ ۴) لعل کاشمر؛ a) سیاه دانه بلند؛ b) سیاه دانه گرد؛ ۹) طرفی کاشمر، ۱۱) خلیلی بیدانه قوچان؛ ۱۲) کلدری بیرجند؛ ۱۴) پیرقلی شماره ۲؛ ۱۵) خلیلی نر قوچان؛ ۱۶) شغالی نیشابور؛ ۱۷) کشمشی جرتوده؛ ۱۸) پیچ کاشمر؛ ۲۰) هایه‌میش بیرجند؛ ۲۳) گل بر طبق؛ ۳۱) دوشاب قوچان؛ ۳۳) ریش بابا؛ ۳۵) رزاقی قوچان؛ ۳۶) رزاقی کاشمر؛ ۳۷) سبز انگور؛ ۴۱) لطف آباد؛ ۴۳) کولیجه؛ ۴۴) کشمشی قوچان؛ ۵۳) کشمشی قرمز؛ ۵۴) کشمشی سفید؛ c) عسکری.

وجود و گستردگی عناصر رتروترنسپوزونی در سراسر ژنوم انگور به‌وسیله Pelsy (2007) برای توالی رتروترنسپوزونیLTR، Tvv1، هم‌چنین توسط Labra (2002) برای توالی رتروترنسپوزونی LTR، *Vin1* گزارش شده‌است. اگرچه در مطالعه Pereira (2005) که برروی چهار رقم از انگورهای کشور پرتغال با استفاده از نشانگرهای REMAP و IRAP و با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر توالی رتروترنسپوزونی *Gret1* انجام شد، گزارش شد که آغازگر Gret1Fa باندی تولید نکرده است. درصد چندشکلی بدست آمده در بین ارقام در این تحقیق از ۷۵ درصد برای ترکیب آغازگری Tvv1Fa+Ms8 تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای Vin1Fa، Gret1Fa+Ms7، Tvv1Fa+Ms11، Gret1Fa و Vin1Fa+Ms3 متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی بدست آمده در این تحقیق، ۹۵/۸۳ درصد بود. چندشکلی بالای نشانگرهای رتروترنسپوزونی و توزیع آن‌ها در همه نقاط ژنوم از

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیاتی است که باعث برتری این نشانگرها نسبت به سایر نشانگرها شده‌است زیرا نشانگرهای دیگر مانند RAPD و AFLP معمولا به‌صورت خوشه‌ای در نواحی خاصی دیده می‌شوند در حالی که خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزون‌ها در همه جای ژنوم توزیع شده، به‌طوری‌که می‌توان با استفاده از خانواده‌های مختلف، هرکدام با توزیع مخصوص به خود در ژنوم، پوشش مناسبی از ژنوم در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات مختلف ایجاد کرد (Waugh et al.1997؛ Yu and Schulman 2007؛ Queen et al. 2004؛Wise. 2000). به‌منظور تعیین کارایی آغازگرها در نشان دادن چندشکلی، شاخص‌های شانون، هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌های موثر محاسبه شدند. بالاترین میزان شاخص شانون مربوط به ترکیبات آغازگری Vine1Fa+Ms3، Tvv1Fa+Ms11 و آغازگر Gret1Fa بود که به ترتیب معادل ۰/۶۳، ۰/۶۱ و ۰/۵۷ بوده و کم‌ترین میزان شاخص شانون مربوط به ترکیب آغازگری Tvv1Fa+Ms8 و معادل ۰/۴۳ با میانگین شاخص شانون ۰/۵۲ بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این تحقیق، بین ۰/۲۹ تا ۰/۴۴ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۵ بود که بیشترین مقدار آن مربوط به ترکیب آغازگری Vine1Fa+Ms3 و معادل ۰/۴۴ و کمترین مقدار آن مربوط به ترکیب آغازگری Tvv1Fa+Ms8 و معادل ۰/۲۹ بود. هم‌چنین تعدادآلل‌های موثر (Ne) بین ۱/۵۲ تا ۱/۸۲ با میانگین ۱/۶۳ بود (جدول ۳)، که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. از بین این آغازگرها، ترکیب Vine1Fa+ Ms3 کارایی بهتری در نشان دادن تنوع بین ارقام نشان داد.

نتایج نشان داد که تجزیه کلاستر به روش UPGMA و براساس ضریب تشابه جاکارد با ضریب کوفنتیک ۰/۸۹ بهترین روش گروه بندی از بین روش‌های مورد بررسی است. بر اساس دندروگرام حاصل از آغازگرهای مورد استفاده، ارقام مختلف به شش گروه مختلف تقسیم شدند (شکل ۲). در گروه اول، ۱۳ رقم قرار گرفتند که شامل ارقام فخری نیشابور، کشمشی قوچان، سیاه‌دانه بلند، لعل کاشمر، کلدری بیرجند، طرقی کاشمر، پیرقلی شماره ۲، ریش بابا، خلیلی بیدانه قوچان، لطف‌آباد، رزاقی قوچان و رزاقی کاشمر هستند. در گروه دوم، چهار رقم پیچ کاشمر، گل برطبق، کشمشی قوچان و دوشاب قوچان قرار گرفتند. در گروه سوم، دو رقم سیاه دانه‌گرد و خلیلی نر قوچان، در گروه چهارم شغالی نیشابور، هایه‌میش بیرجند و کشمشی سفید، در گروه پنجم، دو رقم کشمشی جرتوده و عسکری و در گروه ششم رقم سبز انگور به تنهایی قرار گرفت. نکته قابل‌توجه در این دندروگرام، قرارگرفتن سه رقم مورد مطالعه شهر سی‌سخت در سه گروه مختلف بود که نشان‌دهنده این است که از نظر ژنتیکی با هم تفاوت دارند. بر اساس آغازگرهای بررسی‌شده، ارقام طرقی کاشمر و پیرقلی شماره ۲، خلیلی بیدانه قوچان و لطف‌آباد، کلدری بیرجند و کولیجه و پیچ کاشمر و گل برطبق به ترتیب با ضریب تشابه ۰/۷۳۰، ۰/۶۹۶، ۰/۶۷۱ و ۰/۶۵۷ بیش‌ترین شباهت را داشتند و ارقام سبز انگور و خلیلی نر قوچان با ضریب تشابه ۰/۳۳۳ کمترین شباهت را با هم داشتند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام، ارقامی که کم‌ترین تشابه و بیش‌ترین فاصله ژنتیکی را دارند، می‌توانند به‌عنوان والدین بالقوه در تولید ارقام هیبرید و سایر برنامه‌های اصلاحی در انگور استفاده شوند. گروه‌بندی ارقام در برخی از گروه‌ها با منشاء جغرافیایی آن‌ها هم‌خوانی داشت، به‌طوری‌که ارقام کشمشی قوچان، خلیلی بیدانه قوچان و رزاقی قوچان از قوچان و لعل کاشمر، طرقی کاشمر و رزاقی کاشمر از کاشمر در گروه اول و در کنار هم قرار گرفتند و کشمشی قوچان و دوشاب قوچان در گروه دوم در کنار هم بودند. از آنجا که فعالیت رتروترنسپوزون‌ها تابعی از تنش‌هاست و در اثر تنش‌هایی از جمله حمله آفات و بیماری‌ها و یا خشکسالی‌ها فعال می‌شوند (Grandbastien 1992) می‌تواند در توجیه چنین تقسیم‌بندی قابل بیان باشد.

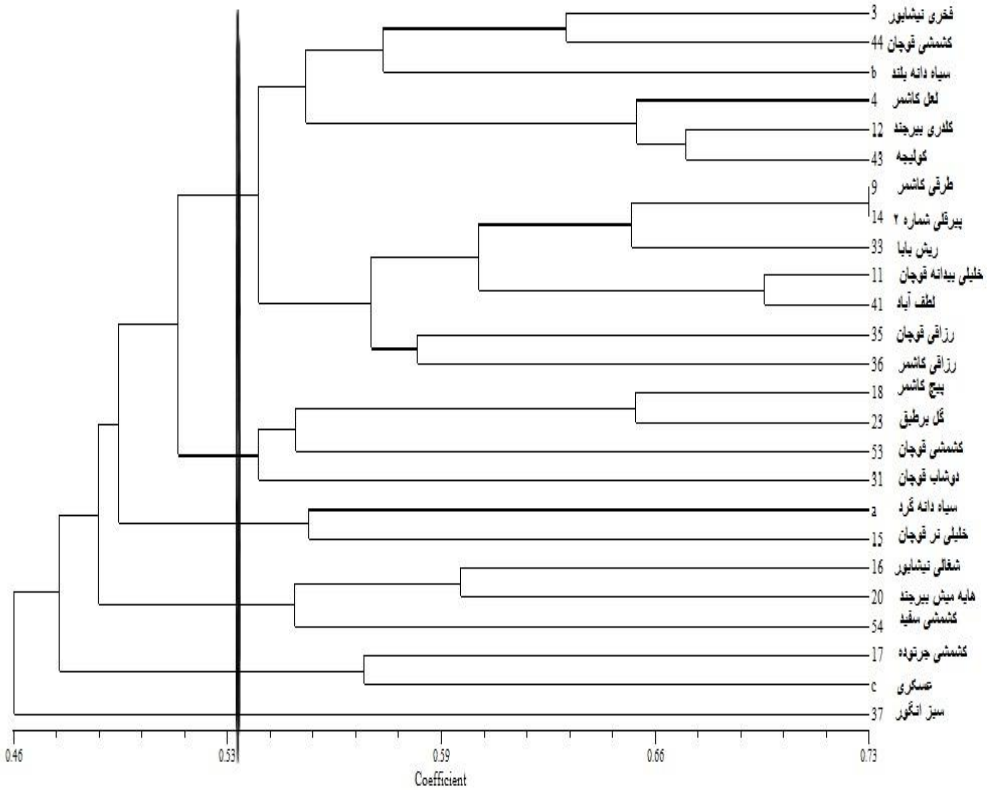
در تجزیه به مختصات اصلی، شش مولفه اول توانستند مجموعاً ۷۱/۵۰ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مولفه اول بیش‌ترین سهم را در توجیه تغییرات دارا بود (۵۳/۰۲ درصد). میزان واریانس نسبی هر مولفه نشان‌دهنده میزان اهمیت آن مولفه در واریانس کل است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. فاصله ژنتیکی بین دو موجود به‌منزله تفاوت قابل‌توجیه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آللی است. به‌عبارت دیگر، فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌هایی است که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

پلات دو بعدی رسم شده بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی، نتایج گروه‌بندی بدست آمده از تجزیه کلاستر را تایید نمود (شکل ۳).

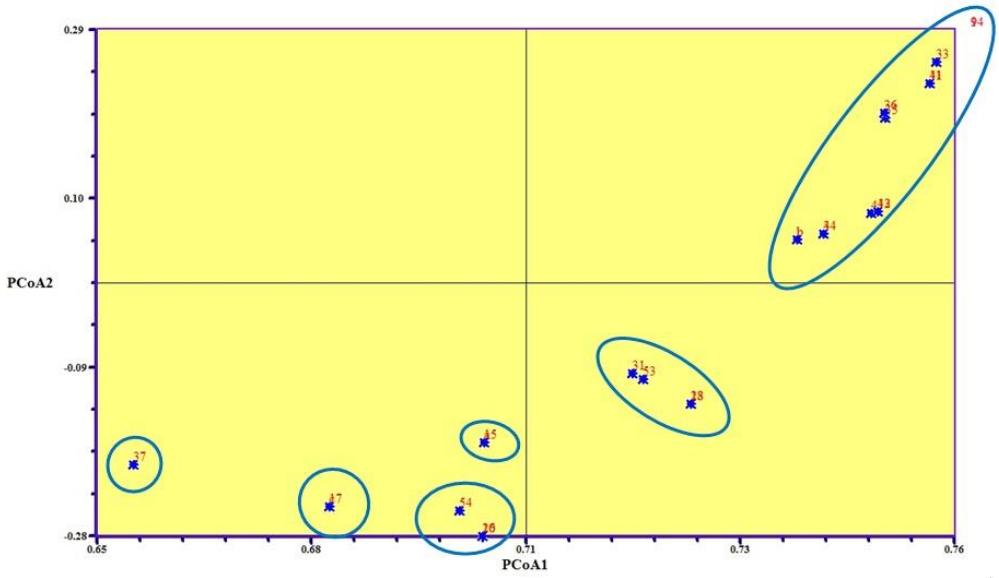
انتخاب نوع نشانگر از نظر برخی خصوصیات از جمله تکرارپذیری، سهولت انجام، تجزیه و تحلیل نتایج و هزینه آن یکی از مهم‌ترین مراحل در مطالعات مولکولی به حساب می‌آید (Sharma et al. 2008). گزارش‌های متعددی تکرارپذیری، چندشکلی و مناسب بودن نشانگرهای رتروترنسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و شناسایی ارقام مختلف انگور را تایید کردند. در تحقیقی مقایسه‌ای که بین نشانگرهای رتروترنسپوزونی با دیگر نشانگرهای غیرمبتنی بر رتروترنسپوزون مثل ISSR، SSR و AFLP برای مشخص کردن نشانگر مفید برای شناسایی و بررسی تکامل گونه‌ها روی واریته‌ها و کلون‌های انگور انجام شد، نتایج نشان داد که بر اساس نشانگر رتروترنسپوزونی REMAP، گونه‌های مختلف Vitis و واریته‌های *V. vinifera* دارای بیش‌ترین خویشاوندی بودند و مشخص شد که نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها تنوع و تکامل بین گونه‌های مورد مطالعه را بهتر نشان می‌دهد (Claudio et al. 2010). در تحقیق دیگری در کشور پرتغال تنوع ژنتیکی ۴۱ رقم مختلف انگور و ۳۷ کلون با استفاده از نشانگرهای AFLP و سه نشانگر رتروترنسپوزونی IRAP، REMAP و SSAP مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از ۱۸ آغازگر مبتنی بر توالی‌ها LTR رتروترنسپوزون‌های Vine-1، Tvv1 و Gret1 استفاده شد که این آغازگرها در مجموع ۵۷۱ باند تولید کردند که از این تعداد باند ۴۲۹ باند (۸۳ درصد) چندشکلی نشان دادند. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که نشانگرهای رتروترنسپوزونی تنوع ژنتیکی ارقام مورد مطالعه را بهتر نشان دادند (Castro et al. 2011).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۲۵ رقم انگور با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA بر اساس نشانگرهای IRAP و REMAP.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- پلات دوبعدی پراکنش ارقام مورد مطالعه بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)

نشانگرهای رتروترنسپوزونی داده‌های تاکسونومیکی را فراهم می‌آورند که سازگاری بیش‌تری با معیارهای جغرافیایی و مورفولوژیکی نسبت به سایر نشانگرها دارند (Ellis et al. 1998). زیرا الحاقات رتروترنسپوزون‌ها یک حادثه بیولوژیکی است؛ یعنی رتروترنسپوزون‌ها در گیاهان مختلف تحت استرس‌های زنده و غیره زنده فعال شده و در ژنوم جابه جا می‌شوند (Grandbastien 1992) و بدین وسیله تولید موتاسیون‌هایی در ژنوم کرده و میزان بیان ژن‌های اطراف ناحیه الحاق را تحت تاثیر قرار می‌دهند به همین دلیل نقش بسیار مهمی را در تکامل گیاهان بازی می‌کنند (Shapiro 1999). هم‌چنین الحاق رتروترنسپوزون‌ها غیرقابل برگشت است؛ در واقع حضور یک رتروترنسپوزون در یک ناحیه خاص از ژنوم حاصل یک حادثه بیولوژیکی بوده که در طی تاریخ تکاملی گیاه روی داده است (Shapiro 1999). در گذشته محدودیت اصلی به کار بردن این نشانگرها به خاطر در دسترس نبودن توالی LTR رتروترنسپوزون‌های مختلف بود. ولی در سال‌های اخیر با کمک تکنیک‌های جدید و سریع، توالی بسیاری از LTRها مشخص (Pearce et al. 1999) و این محدودیت نیز رفع شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که رتروترنسپوزون‌ها در نواحی گسترده‌ای از ژنوم ارقام انگور مورد مطالعه حضور داشته و می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور مورد استفاده قرارگیرند. از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای IRAP با میانگین ۹۴/۸۷ درصد بیش‌ترین چندشکلی را نشان دادند که تایید کننده فراوانی این نوع LTRها در ژنوم انگور می‌باشد. هم‌چنین نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد تعداد مولفه‌های زیاد توجیه کننده درصد کمی از تغییرات کل می‌باشد، لذا آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی بیش‌تری را تحت پوشش قرار داده و نشانگرهای رتروترنسپوزون مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند و این نشانگرها به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را مشخص کردند. هم‌چنین با بررسی تنوع ژنتیکی به‌دست آمده از این تحقیق و بررسی فواصل جغرافیایی و دوری و نزدیکی افراد مشخص شد که فواصل جغرافیایی دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی افراد نمی‌باشد. بالا بودن معیارهای شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تعداد آلل‌های موثر برای ترکیبات آغازگری Vine1Fa+Ms3، Tvv1Fa+Ms11 و آغازگر Gret1Fa نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ارقام مختلف انگور مورد بررسی در این تحقیق بود. لذا استفاده از این نشانگرها برای شناسایی ارقامی که دارای ژنوتیپ‌های یکسان بوده و در مناطق گوناگون کشور با نام‌های مختلف خوانده می‌شوند یا بالعکس، ارقام متفاوتی که به‌صورت یکسان نامگذاری شده‌اند جهت حفظ و نگهداری ژرم پلاسم انگور ایران پیشنهاد

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. پژوهش حاضر نشان داد که بین ارقام انگور مورد مطالعه تنوع مطلوبی وجود دارد و نشانگرهای IRAP و REMAP توسعه یافته بر اساس رتروترنسپوزون‌های فعال در ژنوم انگور، می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی کارا برای بررسی تنوع ژنتیکی و تسریع برنامه‌های اصلاحی در انگور مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج و با استفاده از ارقام کلکسیون انگور مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود انجام شده‌است که بدین وسیله از این همکاری سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons New York.

Baradakci F (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.Turkish Journal of Biology 25: 185-196.

Cadle-Davidson MM, Owens CL (2008) Genomic amplification of the Gret1 retroelement in white-fruited accessions of wild Vitis and interspecific hybrids. Theoretical and Applied Genetics 116:1079-1094.

Castro I, Claudio D, Pedro J, Martı´n, Jesu s, Marı O, Gabriella D, Vanessa F, Olinda P (2011) Effectiveness of AFLPs and retrotransposon based markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones. Molecular Biotechnology. 52: 176-183.

Claudio D, Gabriella D, Tommaso G, Lucia N, Andrea C, Giancarlo S (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. Tree Genetics and Genomes: 6:451-466.

Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation:VersionII. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

D'Onofrio C, DeLorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. Tree Genetics and Genomes 6: 451-466.

Ellis THN, Poyser IJ, Knox MR, Vershinin AV and Ambrose MJ (1998) Ty1 copia class retrotransposon insertion site polymorphism for linkage and diversity analysis in pea. Molecular Genetics and Genomics 260: 9–19.

Galleta G.J and Himelrick (1999) Small Fruit Crop Management, Prentice and Hall publ., USA.

Grandbastien MA (1992) Retroelements in higher plants. Trends in Genetics 8:103-108.

Grandbastien MA (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions.Trends in Plant Science 3:181-187.

Jaillon O, Aury J, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A,Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F,Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J,Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, UgarteE,Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, DiGaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M,Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè M, ValleG, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon A, WeissenbachJ,Quétier F, Wincker P (2007) The French–Italian public consortiumfor grapevine genome characterization the grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiospermphyla. Nature 449: 463-467.

Kalendar R.FastPCR ©. 1998-2007. http://www. Biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/ fastpcr.

Kalendar R, Schulman AH (2006). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocols 1:2478-84.

Karp A, Issac P. & Ingram D (1998) Molecular tools for screening biodiversity. 1st edition.Chapman & Hall, London, UK. 528pp.

Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 43: 304-314.

Kumar A, Bennetzen J (1999) Plant retrotransposons. Annual Reviewe of Genetic. 33: 479-532.

Labra M, Failla O, Forni G, Ghani A, Scienza A, Sal F (2002) Microsatellite analysis to define genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in central and western Mediterranean countries. Journal of Inernational Vigne Vinome, 36: 11-20.

Leigh F, Kalendar R, Lea W, Lee D, Donini P, Schulman AH (2003). Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. Molecular Genetics and Genomics 269: 464-474.

Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill BS (2004) Sequence composition, organization and evolution of the core Triticeae genome. The Plant Journal 40:500-511.

Lodish H, Berk A, Zipursky AL, Matsudaira P, Baltimor D, Darnell J (2003) Molecular Cell Biology. 5theditions,W. H. Freeman pub. New York. USA.

Lowe KM and Walker MA (2006) Genetic linkage map of theinterspecific grape rootstock cross Ramsey (VitisChampinii) xRipariaGloire (*Vitis riparia*). Theoretical and Applied Genetics 112:1582-1592.

Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel.Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288–295.

Pearce SR, Stuart-Rogers CM, Kumar A, Ellis THN and Flavell AJ (1999) Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. Plant Journal 19:711-17

www.SID.ir

Archive of SID

Gutin N, Stefanini M, Chen Y, SegalaC, Davenport C, Dematt L, Mraz A, Battilana J, StormoK,Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, PerbostC,Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, SterckL,Vandepoele K, Grando MS, Toppo S, Moser, C, LanchburyJ,Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar, SK, Fontana P,Gutin A, Vande Y, Salamini F, Viola R (2007) High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2(12).

Verriès C, Bès C, This P, Tesnière C (2000) Cloning and character-ization of Vine-1, a LTR-retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L, and other Vitis species. Genome 43: 366-376.

Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Molecular and General Genomics 253: 687-694.Williams JGK, Kubelik R, Livak KA, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers . Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ (1999) POPGENE version 1.32, Microsoft Window-based free ware for population genetic analysis. Computer program and documentation distributed by University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada http://www.ualberta.ca/;fyeh/index.html.

Yu GX, Wise RP (2000) An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena. Genome 43:736-749.

Pelsy F, Merdinoglu D (2002) Complete sequence of Tvv1, a family of Ty1 copia-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. Theoretical and Applied Genetics 105:614- 621.

Pereira HS, Barao A, Delgado M, Morais-Cecìlio L, Viegas W (2005) Genomic analysis of Grapevine Retrotransposon 1 (Gret1) in *Vitis vinifera*. Theoretical and Applied Genetics 111: 871-878.

Queen RA, Gribbon BM, James C, Jack P, Falvell AJ. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. Molecular Genetics and Genomics 271:91-97.

Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.

SanMiguel PJL (1988) Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergen retrotransposons. Annuals of Botany 20:43-45.

Schulman AH (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. Euphytica 158: 313-321 .

Shapiro J (1999) Transposonsable elements as the key to a 21st century viewe of evolution. Genetica 107:171-179.

Sharma A, Namdeo AG and Mahadik KR (2008) Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. Pharmaceutical Review 2: 24-34.

Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, PrussD, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, MalacarneG, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, MacalmaTM,Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, GattoP,Oyzerski R, Moretto M,

www.SID.ir