مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در انگور با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP

حامد دولتی بانه[1]، سید ابوالقاسم محمدی[2]، بابک عبدالهی مندولکانی*[3]، ساسان رحمان‌پور[4]

[1] دانشیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، ارومیه

[2] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[3] دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[4] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۰۷

چکیده

انگور متعلق به تیره *Vitaceae* است و به علت داشتن مصارف متعدد به عنوان یک منبع مهم غذایی همیشه مورد توجه بوده است. به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با ١٤ صفت شامل حجم آب میوه، درصد جوانه‌زنی دانه گرده، درصد تشکیل میوه، میانگین وزن تک خوشه و وزن تک حبه، وزن گوشت میوه، وزن تک بذر، طول و عرض خوشه و سیستم باردهی، مواد جامد محلول میوه، مقدار اسید و pH میوه در ٤٨ رقم انگور ایرانی موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی از ٢٢ جفت آغازگر SSR و ٧ ترکیب آغازگری AFLP استفاده گردید. تجزیه رگرسیون گام به گام رابطه معنی‌داری بین تعدادی از نشانگرهای SSR و تمامی ١٤ صفت مورد مطالعه در ارقام انگور نشان داد. در کل ٤٩ آلل از ١٨ نشانگر SSR ارتباط معنی‌دار با تغییرات ١٤ صفت نشان دادند. وزن حبه و وزن گوشت میوه هرکدام با ٧ آلل بیشترین و صفات pH میوه، اسید میوه، حجم آب میوه و درصد جوانه زنی گرده با یک آلل کمترین تعداد آلل مرتبط را داشتند. از ٧ جفت ترکیب آغازگری AFLP مورد استفاده، ٤٩ قطعه رابطه معنی‌داری با تغییرات ١٤ صفت نشان دادند. تعدادی از این قطعات برای صفات مختلف مشترک بودند. وزن گوشت میوه با ١١ نشانگر مرتبط بیشترین و صفات مواد جامد محلول، درصد تشکیل میوه، جوانه زنی گرده و عرض خوشه با یک نشانگر مرتبط، کمترین تعداد نشانگرهای مرتبط AFLP را به خود اختصاص دادند.

واژه‌های کلیدی: *انگور، تجزیه ارتباط، صفات مورفولوژیک، نشانگرهای مرتبط*

* نویسنده مسئول: بابک عبدالهی مندولکانی تلفن: ۰۹۱۲۲۳۸۶۹۹۰ Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir

مقدمه

انگور به علت داشتن مصارف متعدد به عنوان یک منبع مهم غذایی همیشه مورد توجه بشر بوده است. این گیاه متعلق به تیره *Vitaceae* است که بیش از ۱۳ جنس و ۷۰۰ گونه دارد. گل‌ها در این تیره یا کامل بوده و یا به صورت تک جنس نر و ماده دیده می‌شوند. جنس‌های *Ampelopsis*، *Vitis* و *Parthenocissus* در نواحی معتدله رشد می‌کنند و سایر جنس‌ها در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده می‌باشند (Doulati Baneh, 2007). مهم‌ترین جنس این خانواده از لحاظ اقتصادی و غذایی جنس *Vitis* می‌باشد که شامل دو زیرجنس *Euvitis* با ۳۸ کروموزوم و زیرجنس *Muscadinea* با ٤٠ کروموزوم است. زیرجنس *Muscadinea* در قاره آمریکا پراکنده بوده در حالی‌که زیر جنس *Euvitis* دارای تعداد زیادی گونه در مناطق مختلف جهان می‌باشد (Janick and James, 1996). در حال حاضر منشاء اغلب ارقام انگور موجود، مورد بحث کارشناسان می‌باشد بطوری‌که هیچ توافقی در مورد مرکز اولیه اهلی شدن انگور و یا مراکز ثانویه آن وجود ندارد (Labra *et al*., 2003). براساس مطالعات باستان‌شناسی گیاهی پیشنهاد شده است که اهلی‌شدن انگور ابتدا در نیمه دوم هزاره چهارم قبل از میلاد مسیح در دو ناحیه هم‌جوار، ناحیه مزوپوتامیا (شامل جنوب آناتولی، سوریه، شمال لبنان، کردستان و غرب ایران) و جنوب دریای خزر اتفاق افتاده است. برطبق تئوری واویلوف اهلی شدن انگور *Vinifera* ابتدا در ناحیه دریای خزر اتفاق افتاده که در آن ناحیه بیشترین تنوع ژنتیکی مشاهده گردیده‌است (McGovern, 2003).

بر اساس گزارشات موجود در حدود ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ رقم انگور در ایران وجود دارد که تعدادی از این ارقام از اهمیت اقتصادی بالایی بویژه برای مصارف تازه خوری و تهیه کشمش برخوردار می‌باشند (Zahedi, 1996). از جمله ارقام مهم انگور می‌توان به بیدانه سفید، بیدانه قرمز، عسکری، یاقوتی، شاهرودی، شاهانی، ریش بابا، پیکانی، فخری، رشه، صاحبی و چندین رقم دیگر اشاره نمود. انگورهای خوراکی ایران از گونه *Vinifera* می‌باشند. در ایران علاوه بر این گونه، دو نوع انگور شامل گونه *Labruscae* در شمال کشور و انگورهای وحشی از زیر گونه *Silvestris* در جنگل‌های شمال و مناطق مرطوب دامنه کوه‌های زاگرس نیز وجود دارند (Doulati baneh *et al*., 2007).

به دلیل تنوع ارقام انگور و اهمیت اقتصادی آن، مطالعات وسیعی در شناسایی ارقام و گونه‌های جدید، بهبود خصوصیات مورفولوژیکی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و تنش‌ها از طریق به‌نژادی انجام گرفته است (Karami, 1996). اندازه ژنوم انگور با ۳۸ کروموزوم در حدود $۴/۷۵ \times ۱۰^{۸}$ جفت باز است. این ژنوم ترکیبی از توالی‌های تکراری و غیرتکراری می‌باشد که DNA تکراری بیش از ۹۵٪

کل ژنوم را تشکیل می‌دهد (Grassi *et al*., 2002). شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی است و به دو روش اصلی صورت می‌گیرد: تجزیه پیوستگی که در این روش اغلب از جمعیت‌های ساختگی مانند نسل F2، تلاقی برگشتی، هاپلوییدهای مضاعف که در آنها عدم تعادل پیوستگی در بیشترین حد خود است استفاده می‌شود. این روش بر مبنای تعیین همبستگی نواحی کروموزومی مشترک بین خویشاوندان در یک جمعیت در حال تفرق با صفت مورد مطالعه است. امروزه علاوه بر این از روش تجزیه ارتباط (Association analysis) نیز برای شناسایی مکان‌های ژنی دخیل در صفات کمی و کیفی استفاده می‌شود. در این روش برخلاف تجزیه پیوستگی، ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیما برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت بررسی می‌شود. روش تجزیه پیوستگی در گیاهان چند ساله و بویژه درختان میوه بواسطه نیاز به زمان طولانی برای تولید جمعیت-های مصنوعی و حساسیت برخی از گونه‌ها به خویش‌آمیزی در راستای ایجاد این جمعیت‌ها، عملی به نظر نمی‌رسد. بنابراین به عنوان روشی جایگزین، اخیرا از تجزیه ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ در این گیاهان استفاده می‌شود (Gupta *et al*., 2005). این مطالعات شامل استفاده از ژرم‌پلاسم گیاهان برای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با تغییرات صفات مورد بررسی است. در پژوهشی Fanizza *et al*. (2005) برای شناسایی QTLهای موثر در عملکرد میوه در انگور، جمعیتی شامل ١٨٤ ژنوتیپ انگور *V. vinifera* را با استفاده از ٢٠٣ نشانگر AFLP و ٥٥ جفت آغازگر SSR مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عملکرد انگور با توجه به طبیعت چند ساله این گونه، کنترل ژنتیکی پیچیده‌ای دارد. نتایج حاصل از بررسی QTLهای موثر در باروری انگور نشان داد که یک QTL بزرگ اثر در گروه لینکاژی ٥ پایداری بالایی در نسل‌های بعدی دارد. بعلاوه ٣ QTL دیگر در گروه لینکاژی ٥ و دو QTL در گروه لینکاژی ١٤ شناسایی شدند که در نسل‌های بعدی فقط در برخی نتاج فعال بودند (Doligez *et al*., 2010). تاکنون تجزیه ارتباط برای بسیاری از صفات مورفولوژیک به منظور شناسایی مکان‌های کروموزومی دخیل در کنترل این صفات در انگور گزارش نشده است. بنابراین هدف از این تحقیق انگشت‌نگاری تعدادی از ژنوتیپ‌های انگور به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با برخی صفات مورفولوژیک بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه از ٤٨ رقم انگور زراعی موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی استفاده گردید (جدول ١).

جدول ۱- اسامی ارقام انگور مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 1- Grapevine varieties used in the current study.

English name	نام فارسی	English name	نام فارسی	English name	نام فارسی
Mayeh mo	مایه مو	Gara shireh	قره شیره	Red Rish baba	ریش بابا قرمز
Red tabarzeh	تبرزه قرمز	Askari	عسکری	Tayefi	طایفی
White shakh shakh	سفید شخ شخ	White bidaneh	بیدانه سفید	Red keshmesh	کشمش قرمز
Gezel uzum	قزل اوزوم	Rejin	رجین	Fakhri	فخری
Garmian	گرمیان	Sarguleh	سرقوله	Shahroudi	شاهرودی
Ink amji	اینک امجی	Chava ga	چاوه گا	Gara shani	قره شانی
Red laal	لعل قرمز	Yaguti	یاقوتی	Sahebi	صاحبی
Xandaei	گزندایی	Gara gandomeh	قره گندمه	White khalili	خلیلی سفید
Agh shani	آغ شانی	Dastarchin	دسترچین	Rezgi	رزقی
Jigh jigha	جیغ جیغا	Red khalili	خلیلی قرمز	Hoseini	حسینی
White laal	لعل سفید	Agh malhi	آق ملحی	White tabarzeh	تبرزه سفید
Kelkeh rivi	کلکه ریوی	Goi molki	گوی ملکی	Gara malhi	قره ملحی
Common black	سیاه معمولی	Sayani	سایانی	Sagal solyan	سقل سولیان
Sachakh	ساچاخ	kalati	کلاتی	At uzum	ات اوزوم
Shirazi	شیرازی	Mam braymeh	مام برایمه	Black laal	لعل سیاه
Angutka	انگوتکه	Bul mazu	بول مازو	Rasheh	رشه

ارزیابی صفات کمی و کیفی

از هرکدام از این ارقام ۱۲ بوته ۱٤ ساله انتخاب شدند. تاک‌ها به صورت ایستاده با روش تربیت کوردون دو طرفه، در باغ کلکسیون انگور ایستگاه تحقیقات باغبانی دکتر نخجوانی کهریز نگهداری می‌شوند. در زمان تشکیل میوه و زمان رسیدن حبه‌ها هرکدام از صفات حجم آب میوه، درصد جوانه‌زنی دانه گرده، درصد تشکیل میوه (در حالت گرده افشانی آزاد و کنترل شده)، میانگین وزن تک‌خوشه و وزن تک حبه، وزن گوشت میوه و تک بذر، تعداد بذر، طول، عرض خوشه، مواد

جامد محلول میوه، مقدار اسید و pH میوه در ۱۰ تکرار در ۳ سال اندازه‌گیری شدند. برای اندازه گیری حجم آب میوه (بر حسب میلی‌لیتر)، عصاره استحصالی از ۱۰۰ گرم میوه هر رقم بعد از آب-گیری و صاف کردن با استوانه مدرج اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی دانه گرده، خوشه‌های ارقام انگور در زمان ۵۰ الی ۷۰ درصد گل‌دهی از بوته جدا و روی یک ظرف شیشه‌ای تمیز تکان داده و سپس دانه‌های گرده با استفاده از تیغ، جمع‌آوری و در ظروف مخصوص نگهداری شدند. گرده‌ها روی محیط یک درصد آگار همراه با ۵ درصد ساکارز کشت و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس در چندین میدان دید میکروسکوپ تعداد دانه‌های جوانه‌زده و تعداد کل، شمارش و درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. برای محاسبه درصد تشکیل میوه، از دو روش کیسه گذاری سه عدد خوشه از هر رقم (با اندازه و موقعیت تقریباً مشابه) و هم بدون کیسه‌گذاری (گرده افشانی آزاد) استفاده شد.

با شمارش تعداد کالیپترا و تعداد حبه‌های تشکیل شده، درصد تشکیل میوه از فرمول ۱۰۰× تعدادگل/تعداد حبه = تشکیل میوه (٪) محاسبه شد. میانگین وزن تک خوشه و وزن تک حبه از توزین چهار عدد خوشه و ۱۰۰ عدد حبه به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری وزن گوشت میوه و تک‌بذر، تعداد ۳۰ حبه انگور از هر رقم انتخاب و توزین شدند و سپس با جدا کردن بذرهای هر حبه، وزن گوشت میوه به دست آمد و از اختلاف وزن کل به گوشت حبه، وزن بذر محاسبه شد. همچنین تعداد بذر موجود در هر حبه نیز شمارش و میانگین‌گیری گردید. از هر بوته تعداد سه خوشه از موقعیت‌های یکسان روی شاخه انتخاب و صفات طول و عرض خوشه اندازه‌گیری شدند. مقدار مواد جامد محلول میوه با استفاده از دستگاه رفراکتومتر، مقدار اسید با تیتراسیون و pH میوه با استفاده از دستگاه pHمتر اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی‌های مولکولی

جهت استخراج DNA، ۱۰-۵ عدد برگ جوان (۵-۲ سانتی متر) از هر نمونه انگور بدون دمبرگ برداشته شدند و پس از اتیکت‌گذاری، در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. استخراج DNA با روش Lodhi و همکاران (1994) انجام شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراجی به ترتیب از اسپکتروفتومتر در طول موجهای ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس از تعیین غلظت نمونه‌ها، جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز غلظت آنها به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای تجزیه نشانگرهای ریزماهواره و AFLP رقیق شدند.

واکنش‌های تکثیر ریزماهواره‌ها

در این بررسی از ۲۲ جفت آغازگر ریزماهواره هسته‌ای استفاده شد (جدول ۲). اساس انتخاب این آغازگرها، چندشکلی بالای آنها در مطالعات قبلی بود (Sefc *et al*., 2000; Laucou *et al*., 2011). برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزایی به ترکیب بافر PCR ۱ برابر، کلرید منیزیوم ۲/۵ میلی مولار، ۱۰dNTP میلی مولار، آنزیم Taq پلیمراز ۱ واحد، هر کدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومولار و DNA الگوی ۲۵ نانوگرم انجام شد. چرخه‌های حرارتی PCR بصورت یک چرخه شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه و دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی: ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو بسته به نوع آغازگرها ۵۰ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی شامل ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۷ دقیقه بود. برای تفکیک محصولات PCR از ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ٦ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. جهت تعیین اندازه نسبی قطعات تکثیری، از آلل‌های پنج رقم انگور مرجع شامل Cabernet sauvignon, Cabernet franch, Pinot noir, Chardoney, Barbera به صورت بارگذاری چند تایی محصول PCR آنها برای هر نشانگر در طول ژل و استفاده از نشانگر وزن مولکولی، DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11kbp) » از شرکت Roche در دو انتها و وسط ژل استفاده گردید. برای الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز عمودی شرکت Bio Rad استفاده شد.

واکنش‌های AFLP

واکنش‌های AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (1995) انجام گرفت. بدین ترتیب که DNA (۲۰۰ نانو گرم) به مدت سه ساعت با آنزیم-های برشی EcoR1(1U) وMse1(1U) هضم و سپس آداپتورهای EcoR1 (۵pmol) وMse1 (۵pmol) توسط آنزیم T4-DNA-Ligase به قطعات حاصل از برش متصل شدند. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت شش ساعت ادامه یافت. این محلول به عنوان الگو در واکنش تکثیر اولیه استفاده شد که حاوی آغازگرهای مکمل توالی ناحیه مرکزی آداپتورهای دو آنزیم بکار رفته می‌باشد. اجزای واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر مخلوط DNA برشی/ متصل شده به آداپتور، ۵۰ نانوگرم از آغازگرهای انتخابی، ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Dynazyme Π و ۵ میکرولیتر بافر بود.

جدول ٢- نام، توالی و خصوصیات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 2- Name, sequence and properties of SSR primers used in current study.

PIC[d]	He[c]	تنوع ژنی Genic diversity	تعداد آلل Number of alleles	بیشترین فراوانی آللی The max allelic frequency	سایز آلل Allele size	LG[b]	Ta[a]	Forward (5' – 3') Reverse (5' – 3')	آغازگر Primer
0.74	0.89	0.77	8	0.34	153-171	5	50	ggtctgaatacatccgtaagtatat acggtgtgctctcattgtcattgac	VrZAG47
0.76	0.75	0.78	11	0.39	186-206	7	50	ggtgaaatgggcaccgaacacacgc ccatgtctctcctcagcttctcagc	VrZAG62
0.82	0.97	0.84	11	0.26	135-163	10	58	tatgaaagaaacccaacgcggcacg tgcaatgtggtcagcctttgatggg	VrZAG64
0.37	0.26	0.45	3	0.68	188-200	4	52	ggcggaggcggtagatgagagggcg acgcaacggctagtaaatacaacgg	VrZAG83
0.83	0.75	0.85	12	0.23	224-246	16	56	ctagagctacgccaatccaa tataccaaaaatcatattcctaaa	VVMD5
0.79	0.78	0.81	9	0.24	236-264	7	54	agagttgcggagaacaggat cgaaccttcacacgcttgat	VVMD7
0.82	0.88	0.84	14	0.27	137-230	11	56	taacaaacaagaagaggaat agcacatccacaacataatg	VVMD8
0.46	0.48	0.53	5	0.62	212-224	18	56	tgactcgccaaaatctgacg cacacatatcatcaccacacgg	VVMD17
0.57	0.76	0.63	5	0.51	243-266	6	56	ggttgtctatggagttgatgttgc gcttcagtaaaaagggattgcg	VVMD21
0.74	0.68	0.78	8	0.26	237-267	11	56	ttccgttaaagcaaaagaaaaagg ttggatttgaaatttattgagggg	VVMD25
0.42	0.54	0.5	5	0.62	247-261	1	56	gagacgactggtgacattgagc ccatcaccaccatttctactgc	VVMD26
0.71	0.79	0.75	8	0.37	175-194	5	56	gtaccagatctgaatacatccgtaagt acgggtatagagcaaacggtgt	VVMD27
0.71	0.69	0.74	9	0.39	239-271	4	59	tatgatttttttagggggggtgagg ggaaagatgggatgactcgc	VVMD32
0.86	0.97	0.87	14	0.18	123-153	11	53.4	cagcccgtaaatgtatccatc aaattcaaaattctaattcaactgg	VVS2
0.37	0.65	0.49	2	0.56	212-218	2	52	tgccctatcaattagttcaccta tcgactttgatatattgatgatt	VVS3
0.49	0.59	0.53	6	0.64	166-180	8	58	ccatcagtgataaaacctaatgcc cccaccttgcccttagatgtta	VVS4
0.77	0.75	0.79	11	0.39	120-167	14	58	cactggcctgttgggagataat ccttcaactggaaaagcctgtc	ISV2 (VMC6e1)
0.59	0.83	0.65	5	0.4	133-149	2	58.4	aaggaggagttgagatgtagta gagtaagagagaagcaagaaaa	ISV3 (VMC6f1)
0.73	0.86	0.76	6	0.3	162-199	2	59	tgcatagtgctgtaggccattg tctgtcattgctgtccctttca	ISV4 (VMC6g1)
0.56	0.5	0.63	9	0.46	130-198	-	55	catcattcatccaaattatgtag tttagtaggttagggataccagt	VMC6g10
0.73	0.89	0.76	12	0.38	132-186	9	58	ctctcttttccgaaattggggt attttccctggaaacaaagtgg	VMC6d12
0.88	0.88	0.89	15	0.19	93-145	-	50	caacagaattcaaatgaaatgga caaacagcataaatacacaagga	VMC6g7
0.67	0.72	0.71	8.6	0.39					میانگین

Ta: دمای اتصال، **LG**: گروه لینکاژی، **He**: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، **PIC**: محتوای اطلاعاتی نشانگر. گروه لینکاژی نشانگرهای **VMC6g10** و **VMC6g7** مشخص نمی‌باشد.

این واکنش تکثیر در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه)، ۲۰ چرخه شامل واسرشته-سازی در ۹٤ درجه (٤٥ ثانیه)، اتصال در ٦۰ درجه (۳۰ ثانیه) و بسط در ۷۲ درجه (۱ دقیقه) و سپس مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود. محصول تکثیر اولیه به نسبت ۵۰ : ۱ با آب رقیق و برای تکثیر انتخابی استفاده شد. آغازگرهای ECOR1 با استفاده از ایزوتوپ Y32 p ATP نشان دار شدند. مخلوط تکثیر انتخابی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرو مخلوط رقیق شده تکثیر اولیه، ۵ نانوگرم از آغازگر ECOR1 نشان دار شده، ۳۰ نانو گرم از آغازگر MseI ، ۲۰۰ میکرو مول از هر dNTP ، ۰/۵ واحد آنزیم Dynazyme Π و ۱ میکرولیتر از بافر آنزیم بود. چرخه‌های حرارتی در این مرحله نیز شامل دو دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد و ۳٦ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ٦٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در چرخه اول و کاهش ۰/۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۳ چرخه بعدی و ٥٦ درجه سانتی گراد برای ۲۳ چرخه دیگر و در نهایت بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه بود. ۱/۵ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر با حجم مساوی از بافر بارگذاری (۸۰ درصد فرمامید، گزیلن سیانول FF یک mg/ml، بروموفنل بلو یک mg/ml، EDTA ۱۰ میلی مول، pH ۸) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد واسرشته شد. بقیه مراحل همانند روش تجزیه ریز ماهواره‌ها بود.

جدول ۳- نام و توالی آغازگرهای AFLP مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 3- Name and sequence of the AFLP primers used in current study.

Primer آغازگرها	Sequence توالی
M00	5’-GATGAGTCCTGAGTAA-3’
E00	5’-GACTGCGTACCAATTC-3’
E31	5’-GACTGCGTACCAATTCAAA-3’
E32	5’-GACTGCGTACCAATTCAAC-3’
E34	5’-GACTGCGTACCAATTCAAT-3’
E38	5’-GACTGCGTACCAATTCACT-3’
M31	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAA-3’
M32	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAC-3’
M34	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3’
M36	5’-GATGAGTCCTGAGTAAACA-3’
M38	5’-GATGAGTCCTGAGTAAACT-3’
M39	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAGA-3’

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای هر نشانگر ریزماهواره، آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد بررسی به صورت a، b و c نامگذاری شدند. همچنین براساس نشانگر وزن مولکولی، اندازه و طول هر کدام از باندها محاسبه گردید و به هر نشانگر بسط داده شد. در روش AFLP هر ردیف باندی چند شکل به عنوان یک مکان یا نشانگر در نظر گرفته شد. قطعات DNA تکثیری براساس هم‌ردیفی باندها و بصورت یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) امتیازبندی شد. به منظور انجام تجزیه ارتباط و بررسی ارتباط داده‌های ژنوتیپی حاصل از نشانگرهای ریزماهواره و AFLP و داده‌های فنوتیپی ارقام انگور، و شناسایی نواحی ژنومی درگیر در کنترل آن‌ها از تجزیه رگرسیون گام به گام با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ١٩ استفاده شد.

نتایج و بحث

ارتباط نشانگرهای ریزماهواره‌ای و صفات زراعی

تجزیه واریانس رگرسیونی رابطه معنی‌داری بین تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره و تمامی ١٤ صفت مورد مطالعه در ارقام انگور نشان داد. در کل ٤٩ آلل از ١٨ نشانگر ریزماهواره ارتباط معنی‌دار با تغییرات ١٤ صفت نشان دادند. وزن حبه و وزن گوشت هر کدام با ٧ آلل بیشترین و صفات pH، اسید میوه، حجم آب میوه و درصد جوانه‌زنی گرده با یک آلل کمترین تعداد آلل مرتبط را تولید نمودند. همه ٧ آلل مرتبط شناسایی شده برای صفات وزن حبه و وزن گوشت یکسان بودند و این آلل‌ها به ترتیب ٧٥ و ٧٤ درصد تغییرات وزن حبه و وزن گوشت میوه را در ارقام انگور مورد بررسی تبیین نمودند.

همچنین ٣ آلل مثبت مرتبط با وزن تک بذر و ٥ آلل مثبت مرتبط با طول خوشه، حدود ٦٠ درصد تغییرات این صفات را توجیه نمودند. کمترین میزان تغییرات تبیین شده توسط نشانگرهای مرتبط با به صفت pH میوه بود که حدود ٩ درصد تغییرات را شامل می‌شد. تعدادی از آلل‌ها برای صفات مختلف مشترک بودند. به عبارت دیگر رابطه معنی‌دار (مثبت یا منفی) با بیش از یک صفت داشتند (جدول ٥). بعنوان مثال آلل i جایگاه VMC6G7 دارای رابطه مثبت با صفات وزن حبه، وزن گوشت و تعداد بذر بود. آلل a جایگاه ISV4 دارای رابطه منفی با صفات تشکیل میوه و طول خوشه، آلل i در جایگاه VrZAG64 با صفات تشکیل میوه و عرض خوشه رابطه منفی و آلل b جایگاه VVMD25 برای صفات طول و وزن خوشه مشترک و دارای رابطه مثبت بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات در این آزمایش احتمالا ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد (Jun *et al*., 2008). جایگاه VMC6G7 با بیشترین تعداد آلل مرتبط، دارای رابطه مثبت با pH میوه (آلل h)، وزن حبه، وزن گوشت میوه، تعداد

بذر (آلل i) و عرض خوشه (آلل d) و رابطه منفی با طول خوشه (آلل m) بود. همچنین جایگاه VVMD8 با شش آلل مرتبط با صفات اندازه‌گیری شده، دارای رابطه مثبت با وزن حبه و وزن گوشت (آلل h)، وزن تک بذر (آلل i)، درصد تشکیل میوه (آلل f) و جوانه‌زنی گرده (آللg) و دارای رابطه منفی با عرض خوشه (آلل n) بود. جایگاه ISV4 با ٤ آلل مرتبط، رابطه منفی با صفات تعداد بذر (آلل d)، طول خوشه، درصد تشکیل میوه (آللa) و وزن خوشه (آلل f) نشان داد.

جدول٤- ترکیبات آغازگری AFLP مورد استفاده در تحقیق حاضر و خصوصیات آنها.

Table 4- AFLP primer combinations used in current study and their characteristics.

تعداد آللهای موثر Ne	تنوع ژنی Genic diversity	تعداد باندهای چند شکل Number of polymorphic bands	مجموع باندها Total bands	ترکیبات آغازگری Primer combinations
1.53	0.263	27	36	E32-M38
1.121	0.074	9	41	E34-M34
1.297	0.168	34	80	E38-M36
1.191	0.1.6	17	62	E34-M38
1.234	0.133	48	112	E31-M32
1.286	0.161	24	59	E32-M31
1.224	0.13	26	69	E34-M39
1.258	0.148	26.4	65.6	میانگین

ارتباط نشانگرهای AFLP و صفات زراعی

تجزیه رگرسیون گام به گام، رابطه معنی‌داری بین برخی نشانگرهای AFLP و صفات اندازه‌گیری شده در ارقام نشان داد. از هفت جفت ترکیب آغازگری مورد استفاده، ٤٩ باند رابطه معنی‌داری با تغییرات ١٤ صفت نشان دادند. تعدادی از این باندها برای صفات مختلف مشترک بودند. چنانچه قبلا ذکر شد وجود نشانگرهای مشترک برای برخی صفات احتمالا ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد (Jun *et al.*, 2008). وزن گوشت میوه با ١١ نشانگر مرتبط بیشترین و صفات مواد جامد محلول، درصد تشکیل میوه، جوانه زنی گرده و عرض خوشه با یک نشانگر مرتبط کمترین تعداد نشانگرها را به خود اختصاص دادند (جدول ٦).

جدول ٥ – ضریب تبیین (R^2) تصحیح شده و ضریب رگرسیون نشانگرهای SSR مرتبط با صفات زراعی در ارقام انگور.

Table 5- Adjusted R^2 and regression coefficient of SSR markers associated with agronomical traits in grapevine varieties.

ضریب رگرسیون Coefficient of regression	نشانگر مرتبط Associated marker	R^2 تصحیح شده Adjusted R^2	صفت Trait
0.48 -3.45 -1.94	VVMD27 (e*) VVS2 (f) VVS2 (h)	0.38	مواد جامد محلول Total soluble solids
0.32	VMC6G7 (h)	0.09	pH
0.37	VVMD5 (g)	0.17	میزان اسید میوه Acid content
1.08 1.05 0.84 -1.6 1.75 -0.56	VMC6G7 (i) VVMD8 (h) VVMD21 (d) ISV2 (j) VVS4 (a) VMC6G7 (j)	0.76	وزن حبه Berry weight
1.04 1.03 0.84 -1.59 -0.56 1.7	VMC6G7 (i) VVMD8 (h) VVMD21 (d) ISV2 (j) VMC6G7 (j) VVS4 (a)	0.75	وزن گوشت Fruit lobe weight
0.10 -0.02	VVMD8 (I) ISV3 (b)	0.61	وزن تک بذر Single seed weight
1.06 0.64 -0.45	VMC6G7 (i) ISV2 (f) ISV4 (d)	0.55	تعداد بذر Seed numbers
4.23	VMC6G10(c)	0.16	حجم آب میوه Fruit water content
11.44 +11.4 21.2 -7.57	VrZAG62 (c) VrZAG 64 (i) VVMD8 (f) ISV4 (a)	0.48	درصد تشکیل میوه(گرده افشانی آزاد) Percentage of fruit production
16.8	VVMD8 (g)	0.24	جوانه زنی گرده Percentage of pollen germination
4.4 2.77 -5.47 2.99 -2.6	VrZAG 62 (j) VVMD25 (b) VMC6G7 (m) VMC6D12 (f) ISV4 (a)	0.61	طول خوشه Bunch length
3.62 -2.09 -3.65	VMC6G7 (d) VrZAG 64 (i) VVMD8 (n)	0.38	عرض خوشه Bunch width
183.52 -137.02 -127.46	VVMD25 (b) VrZAG 47 (c) ISV4 (f)	0.45	وزن خوشه Bunch weight
19.8 12.4 8.96 30.4 7.05 6.07	VVMD21 (b) VVMD25 (c) VVMD27 (c) VMC6G10 (b) VVS2 (e) VVMD5 (f)	0.48	درصد تشکیل میوه (کنترل شده) Percentage of fruit production (controlled)

* حروف داخل پرانتز آلل‌های مرتبط با صفت در هر مکان ریزماهواره را نشان می‌دهد.

یازده نشانگر مرتبط شناسایی شده برای صفت وزن گوشت در مجموع ۹۱ درصد تغییرات این صفت را در ارقام انگور تبیین کردند. همچنین ٦ نشانگر مرتبط با pH میوه، ۵ نشانگر مرتبط با وزن حبه و ۵ نشانگر مرتبط با وزن تک بذر به ترتیب ٦٨، ٦٦ و ٦١ درصد از تغییرات کل این صفات را تبیین نمودند. کمترین میزان تغییرات توجیه شده (۱۵ درصد) توسط یکی از نشانگرهای مرتبط با صفت مواد جامد محلول بود.

برخی از نشانگر های AFLP با چندین صفت رابطه معنی‌داری داشتند. نشانگر شماره ٥٦ مربوط به ترکیب آغازگری E31-M32 دارای رابطه مثبت با وزن حبه، وزن گوشت و وزن تک بذر بود. همچنین نشانگر شماره ۳۸ حاصل از ترکیب آغازگری E38-M36 رابطه مثبت با مقدار اسید میوه و رابطه منفی با وزن گوشت نشان داد. نشانگر شماره ۱۲ از همین ترکیب آغازگری دارای رابطه مثبت با وزن حبه و رابطه منفی با درصد تشکیل میوه در گرده افشانی آزاد بود. نشانگر ٤٧ از آغازگر E34-M38 نیز رابطه منفی با وزن و گوشت حبه نشان داد. بیشترین و کمترین تعداد نشانگرهای AFLP مرتبط با صفات، به ترتیب مربوط به ترکیبات آغازگری E38-M36 (۱۵ نشانگر مرتبط) و ترکیبات آغازگری E34-M35 و E34-M32 (یک نشانگر مرتبط) بود. از ۱۵ نشانگر ترکیب آغازگری E38-M36، تعداد ۷ نشانگر با ٦ صفت رابطه مثبت نشان دادند. در بررسی ارتباط بین داده‌های مولکولی و صفات زراعی در انگور گزارش شد که صفات اندازه حبه و خوشه با تنوع مولکولی همبستگی دارند (Siret *et al*., 2002).

مطالعه حاضر اولین گزارش در استفاده از تجزیه ارتباط برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در ارقام انگور ایرانی می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات یاد شده نشان می-دهد که چنانچه از آغازگرهای بیشتر و جمعیت‌های بزرگتر و متنوع‌تری استفاده شود می‌توان نشانگرهای دارای همبستگی بالا و قابل اعتماد با صفات مورد مطالعه را شناسایی و از آنها در پژوهش‌های دیگر استفاده نمود. البته لازم است نشانگرهای مرتبط شناسایی شده در چنین مطالعاتی، در جمعیت‌های بزرگ و همچنین در جمعیت‌های در حال تفرق مورد آزمون قرار گیرد تا از پیوستگی آنها با صفات مربوطه اطمینان بعمل آید و بدین ترتیب کارآیی استفاده از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی افزایش یابد. همچنین با توجه به اینکه اکثر نشانگرهای تولیدی توسط آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند،

جدول ٦- ضریب تبیین (R^2) تصحیح شده و ضریب رگرسیون نشانگرهای AFLP مرتبط با صفات زراعی در ارقام انگور.

Table 6- Adjusted R^2 and regression coefficient of associated AFLP markers with agronomical traits in grapevine varieties.

Coefficient of regression ضریب رگرسیون	Associated marker نشانگر مرتبط	Adjusted R^2 R^2 تصحیح شده	Trait صفت
-2.19	E34-M39 (48)	0.16	Total soluble solids مواد جامد محلول
-0.24	E34-M38 (44)	0.68	pH
-0.444	E38-M36 (1)		
-0.24	E34-M34 (20)		
0.25	E31-M32 (34)		
-0.245	E34-M38 (35)		
-0.292	E34-M34 (34)		
0.205	E34-M34 (36)	0.56	میزان اسید میوه
0.654	E38-M36 (38)		Acid content
0.371	E38-M36 (29)		
-0.417	E32-M38 (23a)		
-1.41	E34-M38 (47)	0.67	وزن حبه
-0.95	E34-M34 (7)		Berry weight
1.99	E31-M32 (56)		
-0.695	E32-M38 (10a)		
0.6	E38-M36 (12)		
-1.14	E34-M38 (47)	0.92	وزن گوشت
1.57	E31-M32 (56)		Fruit lobe weight
-0.47	E32-M38 (26)		
-0.67	E38-M36 (65)		
-0.45	E34-M35 (2)		
1.32	E31-M32 (39)		
-1.72	E38-M36 (38)		
-0.65	E34-M38 (21)		
-0.44	E38-M36 (34)		
-0.56	E31-M32 (15)		
0.32	E38-M36 (66)		
0.026	E38-M36 (63)	0.61	وزن تک بذر
0.019	E31-M32 (37)		Single seed weight
-0.017	E34-M39 (13)		
0.058	E32-M38 (22a)		
0.041	E31-M32 (56)		
-0.871	E38-M36 (16)	0.39	تعداد بذر
-0.552	E34-M38 (84)		Seed number
6.1	E34-M38 (23)	0.32	حجم آب میوه
-5.2	E32-M38 (22)		Fruit water content
-10.43	E38-M36 (12)	0.19	Percentage of fruit production درصد تشکیل میوه
-16	E32-M38 (20)	0.18	Percentage of pollen germination جوانه زنی گرده
3.7	E34-M32 (16)	0.61	طول خوشه
3.5	E38-M36 (58)		Bunch length
-8.9	E31-M32 (38)		
-3.47	E38-M36 (29)		
4.97	E32-M38 (25)		
-3.43	E32-M38 (18)	0.23	Bunch width عرض خوشه
273.4	E34-M39 (50)	0.55	وزن خوشه
-185.9	E31-M32 (29)		Bunch weight
15.4	E38-M36 (15)	0.45	درصد تشکیل میوه
-15	E38-M36 (84)		Percentage of fruit production
-9.9	E32-M38 (27)		(controlled)

*** اعداد داخل پرانتز آلل‌های مرتبط با صفت در هر ترکیب آغازگری را نشان می‌دهد.**

بنابراین احتمال دارد بتوان از این نشانگرها و آغازگرهای مربوط به آنها در برنامه‌های اصلاحی انگور برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد. همچنین انجام چنین مطالعاتی می‌تواند دانش پایه‌ای در مورد ارقام انگور زراعی و ژنوتیپ‌های ایرانی را بهبود بخشیده و در آینده راهگشا و راهنما برای برنامه‌های اصلاحی انگور در کشور باشد.

منابع

Doligez A, Bertrand Y, Dias S, Grolier M, Ballester J, Bouquet A, This P (2010). QTLs for fertility in table grapevine (*Vitis vinifera* L.). Tree Genetics & Genomes 6: 413–422.

Doulati Baneh H, Mohammadi SA, Labra M, Nazemieh A, De Mattia F, Mardi M (2007). Chloroplast microsatellite markers to assess genetic diversity in wild and cultivated grapevines of Iran. Pakistan Journal of Biological Science 10: 1855–1859.

Fanizza G, Lamaj F, Costantini L, Chaabane R, Grando MS (2005). QTL analysis for fruit yield components in table grapevines (*Vitis vinifera*). Theorical Applied Genetics 111: 658-664

Grassi F, Labra M, Scienza A and Imazio S (2002) Chloroplast SSR markers to assess DNA diversity in wild and cultivated grapevine. Vitis 41: 157–158.

Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. Plant Molecular Biology 57: 461–485

Janick J, James N (1996). Fruit Breeding. Vol.2: Vine and small fruit crops, John Wiley and sons, 471 pp.

Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica 62: 179–191.

Karami MJ (1996). Identification of grapevines of Kurdistan state. M.Sc. thesis, Agriculture Faculty of Tabriz University.

Labra M, Imazio S, Grassi F, Rossoni M, Citterio S, Sgorobati S, Sceinza A, Failla O (2003). Molecular approach to assess the origin of cv. *Marzemino*. Vitis 42: 137–140

Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine vine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis. Plant Molecular Biology Reporter 12: 6–13.

Laucou V, Lacombe T, Dechesne F, Siret R, Bruno JP, Dessup M, Dessup T, Ortigosa P, Parra P, Roux C, Santoni S, Varès D, Péros JP, Boursiquot JM (2011). High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. Theoretical and Applied Genetics 122: 1233–1245.

McGovern PE (2003). Ancient wine: The search of the origin of viticulture, Princeton University Press, New Jersey.

Sefc KM, Lopes MS, Lefort F, Botta R, Roubelakis-Angelakis KA, Ibanez J, Pejic I, Wagner HW, Glossl J, Steinkellner H (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theoretical and Applied Genetics 100: 498–505.

Siret R, This P, Danzart M, Michel J (2002). Use of microsatellite markers for the analysis of genetic diversity in *Vitis vinifera* L.: correlation between molecular and agronomic data, Plant, Animal and microbe Genome Conference, January 12-16, Town and country center, San Diago, CA. 280 pp.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuliper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Researchs 23: 4407–4414.

Zahedi B (1996). Identification of grapevines of Lorestan state. M.Sc. thesis, Agriculture faculty of Tehran University.

Association analysis for morphological traits in grapevine using SSR and AFLP markers

Dolati Baneh H.[1], Mohammadi S.A.[2], Abdollahi Mandoulakani B.[*3], Rahmanpour S.[4]

[1] Associate professor, Agricultural and Natural Resource Research center, West Azarbayejan, Urmia.
[2] Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz University.
[3]Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University.
[4]MSc student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University.

Abstract

Grapevine (*Vitis* sp.), belongs to *Vitaceae* family, is one of the most important food sources in world because of its wide consumptions. In the current investigation, 22 SSR primer pairs and 7 AFLP primer combinations were used to identify molecular makers associated with 14 flower and fruit related traits in Iranian grapevine germplasm. The traits studied, included fruit water content, percentage of pollen germination, percentage of fruit production, bunch and berry weight, fruit lobe and single seed weight, bunch and yielding system length and width, total soluble solids, acid content and fruit pH. Stepwise regression analysis showed significant relationship between some SSR alleles and all 14 traits in grapevine varieties. In general, 49 alleles produced by 18 SSR primers, showed significant association with variation of 14 traits. The highest and lowest number of associated markers achieved for berry weight and fruit lobe weight each with 7 alleles and pH, fruit acid content, fruit water content and percentage of pollen germination each with 1 alleles, respectively. Significant association between polymorphism of AFLP markers and studied traits was also detected. Forty-nine AFLP fragments showed significant association with the variations of 14 traits. Some of the associated AFLP segments were common among different traits. The fruit lobe weight, with 11 associated markers and total soluble solids, percentage of fruit production, pollen germination and bunch width each with 1 associated marker, were the traits with the highest and lowest number of associated AFLP markers, respectively.

Keywords*: Grapevine, Association Analysis, Morphological traits, Associated markers.*

[*] Corresponding Author: Abdollahi Mandoulakani B. Tel: 09122386990 Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir