مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع و روابط ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انگور (*Vitis vinifera* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

محمدقاسم کشاورزخوب[۱]، شاهرخ قرنجیک*[۲]، اسد معصومی اصل[۳]، بابک عبدالهی مندولکانی[٤]

[۱]فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.
[۲]دکترای ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.
[۳]دکترای ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج.
[٤]دکترای ژنتیک ملکولی و مهندسی ژنتیک، دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۸/۳۰

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) شهرستان شاهرود و ۳ رقم انگور شهر سی‌سخت با استفاده از ٦ آغازگر مولکولی ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نشانگرهای مورد استفاده در مجموع ٦۹ باند تولید کردند که از این تعداد ٦٥ باند در بین ارقام مورد استفاده چندشکل بودند. بیشترین باند چندشکل مربوط به آغازگر UBC825 با ١٦ باند و کمترین باند مربوط به آغازگر UBC857 با ٦ باند بود. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها ۹٤/۱ درصد محاسبه گردید. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و میانگین ضریب شانون (SI) برای این آغازگرها به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/٥٤ بدست آمد. بیشترین مقدار ضریب شانون (۰/٦۱) مربوط به آغازگر UBC825 و کمترین میزان آن (۰/٤۸) مربوط به آغازگر UBC849 بود. همچنین آغازگر UBC825 بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/٤۲)، بیشترین تعداد آلل‌های موثر (۱/۷٥) و بیشترین تعداد آلل‌های متفاوت (۲) را نشان داد.گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه-ای بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و با استفاده از الگوریتم UPGMA ارقام مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR می‌توانند به عنوان ابزاری کارا در ارزیابی تنوع ژنتیکی و تسریع برنامه‌های اصلاحی در انگور مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: *تنوع ژنتیکی، انگور، نشانگرهای مولکولی، ISSR*

*نویسنده مسئول: شاهرخ قرنجیک تلفن: ۰۹۱۱۱۷۲۱٤٦۲ Email: gharanjik@hotmail.com

مقدمه

انگور گیاهی از خانواده Vitacea و از جنس Vitis است. تعداد گونه‌های انگور زیاد هستند که یکی از این گونه‌ها *V. vinifera* می‌باشد. گیاه‌شناسان، گونه vinifera را به دو زیرگونه sylvestris و caucasia تقسیم می‌کنند (Galet, 1998). در حال حاضر منشأ انگور مورد بحث کارشناسان می‌باشد، به ویژه اینکه هیچ توافقی در مورد مرکز اولیه اهلی شدن انگور و یا مراکز ثانویه آن وجود ندارد. بر اساس برخی مطالعات، ناحیه خاور نزدیک به عنوان مرکز اولیه انگور معرفی شده است (Zohary and Hopf, 1993). انگور یکی از محصولات مهم باغی بوده و به دلیل موارد مصارف متعدد قرن‌هاست که مورد توجه بشر قرار گرفته است. میوه انگور در میان دیگر میوه‌های درختی به واسطه داشتن متابولیت‌های ثانویه و تنوع مصرف منحصر به فرد است و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد و استفاده و استخراج رنگدانه‌های موجود در انگور مانند آنتوسیانین نیز از مصارف دیگر انگور است (Commbe, 1992). ایران به علت برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، از مراکز مهم تولید و پرورش انگور در جهان محسوب می‌شود و در استان‌های مختلف کشور تولید این محصول انجام گرفته و موجب اشتغال افراد زیادی شده است. انگور از نظر اقتصادی نیز به دلیل اینکه یکی از محصولات صادراتی (عمدتا به صورت کشمش) می‌باشد، در ارز آوری و افزایش صادرات غیرنفتی نقش زیادی دارد که برای رسیدن به این هدف، بایستی محصولی با کیفیت مناسب تولید کرد. یکی از راه‌هایی که می‌تواند کیفیت فرآورده‌ها را در ارتباط با نوع مصرف افزایش دهد، استفاده از ژنوتیپ‌های مناسب برای اهداف خاص می‌باشد. تعداد ژنوتیپ‌های انگور در جهان بیش از ۱۰۰۰۰ می‌باشد که در بین آنها هم‌نام‌ها (Homonyms) و دگرنام‌های (Synonyms) زیادی دیده می‌شوند که نیازمند برنامه‌ی جامعی جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها در سطح جهانی می‌باشد (Galletta *et al*., 1989). این مشکل در بین ژنوتیپ‌های انگور ایران نیز مشاهده می‌شود به طوری که یک ژنوتیپ انگور در مناطق مختلف دارای نام‌های متفاوت بوده یا چند ژنوتیپ مختلف را به یک نام می‌شناسند و این مسئله موجب بروز مشکلاتی برای تولیدکنندگان در انتخاب ژنوتیپ مناسب برای شرایط آب و هوایی خاص یا نوع مصرف شده است. همچنین به دلیل سابقه طولانی مدت کشت انگور در ایران، جهش‌های طبیعی در برخی ارقام به وجود آمده است که باعث تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف شده است. شناخت دقیق و قابل اطمینان ارقام در مدیریت صحیح ژرم‌پلاسم، گواهی نهال توسط خزانه‌داران، ایجاد باغ‌های یک دست و انتخاب والدین برای تلاقی‌های کنترل شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Dettweiler and Eibach, 2003). شناسایی ارقام انگور معمولا بر اساس مشخصات تاک-

نگاری گیاه بالغ صورت می‌گیرد که تحت تاثیر محیط قرار دارد. روش قابل اعتماد و جایگزین این روش استفاده از نشانگرهای مولکولی است که می تواند در تعیین تنوع و روابط ژنتیکی گیاهان باغی مورد استفاده قرار گیرد (Ghobadi *et al*., 2008). نشانگرهای مولکولی به طور مستقیم قادرند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (Ferguson *et al*., 1995). در بین نشانگرهای موجود، نشانگر ISSR برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است (Sicard *et al*., 2005; Williams *et al*., 1990). این نشانگر 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، به‌طور گسترده‌ای به‌خصوص در گیاهان به‌کار گرفته شده است. از این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف مانند برنج (Blair *et al*., 2004)، لوبیا (Gonzalez *et al*., 2005)، جو (Hou *et al*,. 2005)، پسته (Arjmand Ghahestani *et al*., 2015) و گلابی (Safarpoor Shorbakhlo *et al*., 2015) مورد استفاده قرار گرفته و تمامی این تحقیقات بر سودمند بودن این نشانگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی تاکید داشته اند. در تحقیقی تنوع موجود بین ارقام انگور (*Vitis vinifera*) کشور شیلی به وسیله نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته و کارایی این نشانگر در تشخیص تنوع ژنتیکی به اثبات رسید (Herrera *et al*., 2002). Dhanorkar *et al*. (2005) روابط ژنتیکی بین تعدادی از واریته-های انگور کشور هند را با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرارداده و این تکنیک را به عنوان یک روش مولکولی مناسب و قابل اطمینان برای آنالیز ژنتیکی واریته‌های انگور معرفی کردند. در پژوهشی Sabir *et al*. (2009) با استفاده از داده‌های آمپلوگرافی و نشانگر مولکولی ISSR تنوع ژنتیکی بین تعدادی از ارقام انگور را مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که نشانگر ISSR به خوبی روابط ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه را نشان می‌دهد. تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام انگور کشور مصر نیز با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تکنیک ISSR برای تعیین تنوع ژنتیکی و کشف روابط ژنتیکی ارقام انگور کارآمدتر از نشانگرهای مورفولوژیک می‌باشد (Neveen *et al*., 2011). در مطالعه ای که با هدف بررسی کارایی دو نشانگر ISSR و RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ارقام بومی انگور استان خراسان رضوی و یک رقم انگور غیربومی از گونه *Vitis muscadinia* و تعیین میزان قرابت و خویشاوندی ارقام مذکور انجام گرفت، نتایج تحقیق نشانگرهای مذکور را ابزار مفید و قدرتمندی برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت-های ژنتیکی و همچنین نشانگر ISSR را برتر از نشانگر RAPD برای نشان دادن تنوع معرفی کرد (Karimi *et al*,. 2013). با توجه به موارد فوق و این که استفاده از نشانگرهای ISSR نیازی به

اطلاعات توالی ژنوم ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چندجایگاهی و بسیار چندشکل می‌شود (Askari *et al*., 2011; Ghasemi *et al*., 2010; Zamani *et al*., 2011; Zamani *et al*., 2015) تحقیق حاضر با هدف بررسی کارایی نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ۲۲ رقم بومی و غیربومی انگور منطقه شاهرود و ۳ رقم بومی منطقه سی‌سخت و تعیین میزان قرابت و خویشاوندی این ارقام انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

ارقام انگور مورد بررسی در این تحقیق شامل ۲۲ رقم بومی و غیر بومی از کلکسیون مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود (استان سمنان) و ۳ رقم غیربومی از باغات انگور شهر سی‌سخت (استان کهگیلویه وبویراحمد) می‌باشند (جدول ۱). در اواسط بهار سال ۱۳۹۰ از ارقام مورد مطالعه ٦-۵ برگ جوان نزدیک به انتهای شاخه انتخاب و تا زمان استفاده در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه-های برگی جوان به روش Dellaporta *et al*. (1983) با کمی تغییرات (Kafkas *et al*., 2006) انجام گرفت.

در تحقیق حاضر از ۸ آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد.

برای انجام واکنش PCR، از دستورالعمل Williams *et al*. (1990) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین صورت که واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۷۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA polymerase با غلظت ۵ واحد بر میکرولیتر، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ ppm، ۲/۵ میکرولیتر Buffer 1x PCR دارای غلظت ۱۰x و ۱۸میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIORAD مدل MJ Mini (نورنبرگ، آلمان) انجام شد. واکنش PCR با ۹٤ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳٤ چرخه (۹٤ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد: ٤۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی-گراد: ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱۰ دقیقه) ادامه یافت. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد تفکیک گردید. الگوی باندی حاصل، براساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها، به صورت یک و صفر امتیاز دهی شدند. داده‌های حاصله توسط نرم افزارهای NTSYS-pc نسخه ۲/۰۲ (Rohlf, 2000)، نرم افزار GENALEX نسخه ٦/۵ (Peakall and Smouse, 2006) و PopGene نسخه ۱/۳۲ (Yeh *et al*., 1999) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول۱- ارقام انگور مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 1- Grapevine varieties used in this study.

English name	نام رقم	کد رقم Variety code	English name	نام رقم	کد رقم Variety code
Nishabor Fakhri	فخری نیشابور	3	Rish baba	ریش بابا	33
Kashmar laal	لعل کاشمر	4	Ghochan razaghi	رزاقی قوچان	35
Tarfi laal	طرفی کاشمر	9	Kashmar razaghi	رزاقی کاشمر	36
Ghochan khalili bidaneh	خلیلی بیدانه قوچان	11	Grape green	سبز انگور	37
Birjand kaldari	کلدری بیرجند	12	Lotf abad	لطف آباد	41
Number 2 pirgholi	پیرقلی شماره 2	14	Kolijeh	کولیجه	43
Ghochan male khalili	خلیلی نر قوچان	15	Ghochan keshmeshi	کشمشی قوچان	44
Nishabor shoghali	شغالی نیشابور	16	Red keshmeshi	کشمشی قرمز	53
Jartodeh keshmeshi	کشمشی جرتوده	17	White keshmeshi	کشمشی سفید	54
Pich kashmar	پیچ کاشمر	18	Askari	عسکری	C
Birjand hayeh mish	هایه میش بیرجند	20	Tall grain black	سیاه دانه بلند	A
Gol bar tabagh	گل بر طبق	23	Globular grain black	سیاه دانه گرد	B
Ghochan doshab	دوشاب قوچان	31			

توجه: ارقام با کد **a**، **b** و **c** از سی‌سخت و بقیه ارقام از مرکز تحقیقات شاهرود جمع‌آوری شدند.

Note: varieties with Codes a, b and c were collected from SiSakht and the rest of them were collected from Shahrood agriculture research Center.

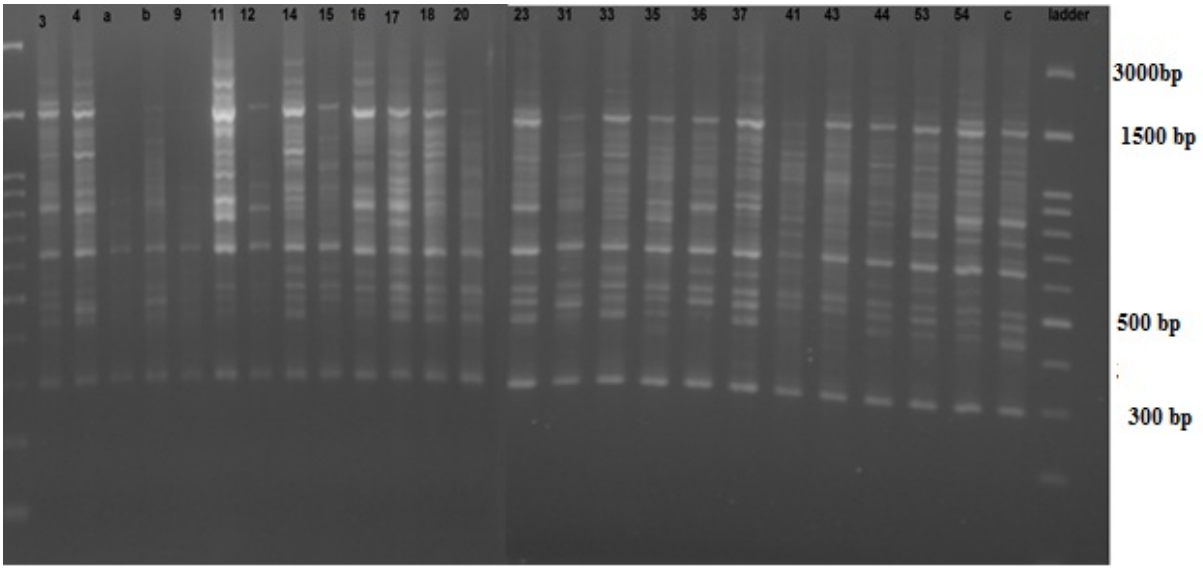
جدول۲- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 2- Name and sequence of ISSR primers used in this study.

آغازگر Primer	توالی (5' -> 3') sequence	نوع نشانگر Marker type
A7	agagagagagagagagagt	ISSR
UBC812	gagagagagagagagaa	ISSR
UBC815	ctctctctctctctt	ISSR
UBC825	acacacacacacacact	ISSR
UBC840	gagagagagagagagaYt	ISSR
UBC848	cacacacacacacacaRg	ISSR
UBC849	gtgtgtgtgtgtgtgtcg	ISSR
UBC857	acacacacacacacacYg	ISSR
R= Purine (A/G)	Y=Pyrimidine (C/T)	

نتایج و بحث

از بین ۸ آغازگر ISSR استفاده در این تحقیق، ۲ آغازگر (A7 و UBC815) باندهای واضح تکثیر نکردند. تعداد ٦ آغازگر دیگر در مجموع ٦۹ باند در ۲۵ رقم انگور تولید کردند که ٦۵ باند چندشکل و ٤ باند مونومورف بودند (شکل ۱). باندهی توسط آغازگرهای مذکور، چندشکلی بین ارقام را به طور مطلوب نشان داد. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر آغازگر ۱۱/۵ و میانگین باندهای چند شکل ۱۰/۸۳ باند بود، این در حالی است که میانگین باندهای چند شکل در آغازگرهای رتروترانسپوزونی IRAP استفاده شده بر روی همین ارقام ۱۱ باند بوده است (Keshavarz *et al.*, 2013 Khub). این نتایج نشان می‌دهد که میزان چندشکلی این آغازگر کمتر از آغازگرهای IRAP است. بیشترین باند چندشکل مربوط به آغازگر UBC825 با ۱٦ باند و کمترین باند مربوط به آغازگر UBC857 با ٦ باند بود (جدول ٤). میانگین درصد چندشکلی آغازگرها ۹٤/۱۱ درصد بود. آغازگرهای UBC825 و UBC857 با میزان چندشکلی ۱۰۰درصد بیشترین درصد چندشکلی و آغازگرهای UBC812 و UBC849 با چندشکلی ۹۰ درصد کمترین درصد چندشکلی را نشان دادند. همچنین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و میانگین ضریب شانون (SI) برای این آغازگرها به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/٥٤ بود و بیشترین مقدارضریب شانون ۰/٦۱ و مربوط به آغازگر UBC825 و کمترین ضریب تنوع شانون ۰/٤۸ و مربوط به آغازگر UBC849 بود. همچنین بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/٤۲، تعداد آلل‌های موثر ۱/۷۵ و تعداد آلل‌های متفاوت ۲ مربوط به آغازگر UBC825 بود. بنابراین آغازگر UBC825 تنوع بین ارقام مورد بررسی را بهتر نشان می‌دهد و نسبت به سایر آغازگرهای ISSR چندشکلی بیشتری دارد. Sabir *et al.* (2009) در تحقیقی که روی ارقام انگور ترکیه انجام دادند گزارش کردند که آغازگرهای UBC815، UBC840، UBC840، UBC849 و UBC857 تولید باند چندشکل می‌کنند و به عبارتی تنوع بین ارقام مورد مطالعه را به خوبی نشان می‌دهند. در تحقیق حاضر نیز همه‌ی آغازگرهای مذکور بجز UBC815 تنوع بین ارقام مورد مطالعه را به خوبی نشان دادند. نمودار خوشه‌ای بر اساس ٦۵ باند به منظور بررسی و ارزیابی تنوع ژنتیکی ترسیم شد. سه ضریب تطابق ساده، دایس و جاکارد محاسبه و مقایسه شد، نتایج نشان داد که ضریب تشابه جاکارد با ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۸۷ درصد بهترین برآورد شباهت را برای گروه بندی ارقام در این آزمایش دارد. بر اساس دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR، ۲۵ رقم انگور در ۳ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۲)، که صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده تجزیه تابع تشخیص و آزمون اف-بیل تایید شد.



شکل ۱- قطعات حاصل از PCR با استفاده از آغازگر UBC825. اعداد نشان داده شده کد ارقام لیست شده در جدول ۱ می باشد.

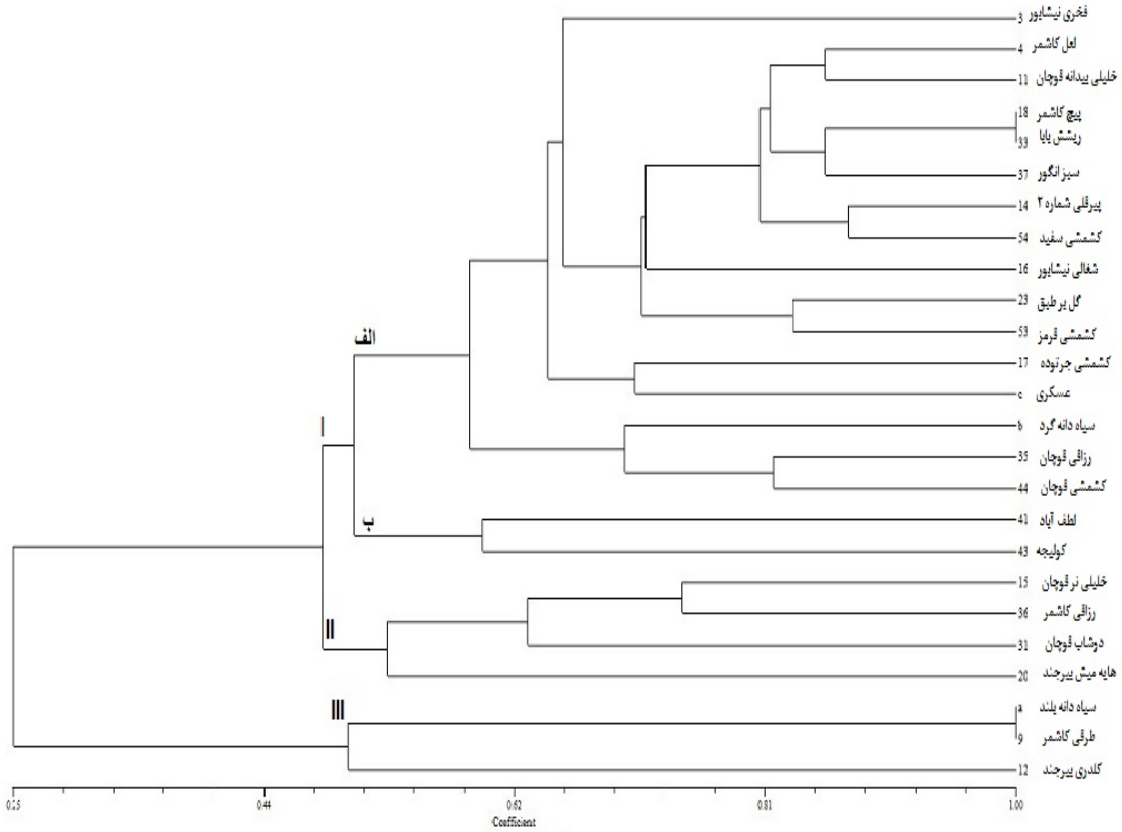
Figure 1- PCR products amplified with primer UBC 825 .Numbers represent the cultivar code listed in Table1.

جدول ٤- خصوصیات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر.

Table 4- Properties of ISSR primers used in this study.

آغازگر Primer	مجموع باندها Total bands	تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی % Polymorphism	شاخص شانون Shannon's index (SI)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity (He)	تعداد آلل‌های موثر (Ne)	تعداد آلل-های متفاوت (Na)
UBC 849	10	9	90	0.48	0.32	1.53	1.90
UBC 812	10	9	90	0.51	0.34	1.59	1.90
UBC 825	16	16	100	0.56	0.38	1.66	2
UBC 840	16	15	93.75	0.53	0.36	1.64	1.93
UBC 848	11	10	90.91	0.57	0.40	1.74	1.90
UBC 857	6	6	100	0.61	0.42	1.75	2
میانگین Average	11.5	10.83	94.11	0.54	0.37	1.65	1.93

گروه اول به دو زیر گروه تقسیم شد که در زیر گروه الف: ارقام فخری نیشابور، لعل کاشمر، خلیلی بیدانه قوچان، پیچ کاشمر، ریش بابا، سبز انگور، پیرقلی شماره ۲، کشمشی سفید، شغالی نیشابور، گل بر طبق، کشمشی قرمز، کشمشی جرتوده، عسکری، سیاه دانه گرد، رزاقی قوچان و کشمشی قوچان و در زیر گروه ب: ارقام لطف آباد و کولیجه، در گروه دوم: خلیلی نر قوچان، رزاقی کاشمر، دوشاب قوچان و هایه میش بیرجند و در گروه سوم: ارقام سیاه دانه بلند، طرقی کاشمر و کلدری بیرجند قرار گرفتند. در این گروه بندی از ۱۵ رقم غیربومی متعلق به استان خراسان ۹ رقم فخری نیشابور، لعل کاشمر، خلیلی بیدانه قوچان، پیچ کاشمر، شغالی نیشابور، کشمشی جرتوده، رزاقی قوچان و کشمشی قوچان و لطف آباد در گروه اول، ٤ رقم خلیلی نر قوچان، رزاقی کاشمر، دوشاب قوچان و هایه میش بیرجند در گروه دوم و ۲ رقم طرقی کاشمر و کلدری بیرجند در گروه سوم قرار گرفتند که این نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این ارقام می‌باشد. به نظر می‌رسد که رقم های کشمشی سفید، کشمشی قرمز، کشمشی جرتوده و کشمشی قوچان که همگی در زیر گروه الف قرار دارند در اصل یک رقم باشند که به خاطر انتقال آنها به مناطق مختلف و تاثیر شرایط مختلف محیطی اسامی متفاوتی را به خود گرفتند. همچنین سه رقم مورد مطالعه از شهر سی‌سخت در دو گروه جدا از هم قرار گرفتند بدین ترتیب که ۲ رقم عسکری و سیاه دانه گرد در گروه اول و رقم سیاه دانه بلند در گروه سوم قرار گرفت. در این بررسی با توجه به این که همه ارقام متعلق به گونه *V. vinifera* هستند تفاوت‌های ژنتیکی موجود را می‌توان به اختلافات درون گونه‌ای نسبت داد. براساس جدول ضریب تشابه جاکارد دامنه تشابه در بین ارقام مورد بررسی بین ۰/۷٤-۰/۲۷ درصد بود که بیشترین میزان تشابه بدست آمده بین ارقام کشمشی جرتوده و پیچ کاشمر با ضریب تشابه ۰/۷٤ و کمترین میزان تشابه بدست آمده بین ارقام ریش‌بابا از شاهرود و سیاه دانه بلند از سی‌سخت با ضریب تشابه ۰/۲۷ برآورد شد. فاصله زیاد بین این ارقام نشان از فاصله ژنتیکی زیاد بین این دو رقم دارد و همچنین ناشی از تفاوت منشا جغرافیایی این دو رقم است؛ اما شباهت زیاد بین ارقام کشمشی جرتوده و پیچ کاشمر حاکی از این است که احتمالا این ارقام تحت تاثیر شرایط محیطی (تنش های غیرزنده) یکسانی قرار گرفته اند. با توجه به فاصله ژنتیکی زیاد دو رقم ریش-بابا از شاهرود و سیاه دانه بلند از سی‌سخت، این ارقام به عنوان والدین بالقوه در تولید هیبرید و سایر برنامه های اصلاحی در انگور معرفی می شود. هر چند که تمام ارقام انگور موجود در کشور ایران به دلیل عدم دسترسی در این مطالعه بکار گرفته نشده‌اند. ولی با این وجود ارقام بکار گرفته شده در این پژوهش نشان از وجود تنوع ژنومی قابل توجهی در سطح کشور ایران دارد.



شکل ۲- دندروگرام ۲۵ رقم انگور با استفاده از داده‌های ISSR.

Figure 2- Dendrogram of 25 grapevine varieties using ISSR data.

در پژوهشی Zietkiewicz *et al.* (1994) نیز گزارش کردند که نشانگر ISSR نشانگر مفیدی برای شناسایی واریته‌های مختلف گیاهان است. این نشانگر برای نقشه‌یابی ژنتیکی و مطالعات جمعیت ایده‌ال است، به دلیل این که فراوانی و درجه چندشکلی بالایی بین افراد درون یک جمعیت دارند (Lanham *et al.*, 1998). بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که بر خلاف صفات مورفولوژیک که به دلیل عدم ثبات و تغییرپذیری در اثر عوامل طبیعی نمی‌توانند معیار خوبی برای تشخیص شباهت‌ها و تفاوت‌ها باشند؛ 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). 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 می آید (Sharma *et al.*, 2008). ازجمله نشانگرهای کم هزینه با تکرارپذیری بالا نشانگر ISSR است. گزارش‌های متعددی تکرارپذیری و ثبات این نشانگر را تایید کردند. از جمله

مطالعات انجام شده توسط این نشانگر بر روی ارقام مختلف انگور می‌توان به بررسی تنوع بین ٤۳ رقم انگور کشور هند با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR (Dhanorkar *et al.*, 2005)، استفاده از داده‌های آمپلوگرافی و ۲۰ آغازگر مولکولی ISSR به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین ارقام انگور ترکیه که ارقام مورد مطالعه را به دو خوشه، *V. labrusca* و *V. vinifera* تقسیم بندی کردند (Sabir *et al.*, 2009)،ارزیابی روابط خویشاوندی بین تعدادی از ارقام انگور کشور مصر با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگر مولکولی ISSR (Neveen *et al.*, 2011)، اشاره کرد که در تمامی این پژوهش‌ها مشخص شده که نشانگرهای ISSR یک نشانگر مناسب و قابل اطمینان برای آنالیز ژنتیکی واریته‌های انگور می-باشد.

این گونه تحقیقات برای شناسایی ارقامی که دارای ژنوتیپ‌های یکسان بوده و در مناطق گوناگون کشور با نام‌های مختلف خوانده می‌شوند یا بالعکس ارقام متفاوتی که به صورت یکسان نامگذاری شده‌اند جهت حفظ و نگهداری ژرم پلاسم 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.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بطور کلی فواصل جغرافیایی دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی افراد نمی باشد. بدین صورت که برخی از ژنوتیپ‌های مربوط به اقلیم‌های شمال شرق (استان خراسان و شهرستان شاهرود) درون گروه-های با ژنوتیپ‌های اقلیم جنوب غرب (شهر سی-سخت) و برعکس قرار می‌گیرند. پژوهش حاضر نشان داد که بین ارقام انگور موجود در ایران تنوع مطلوبی وجود دارد و از این تنوع می‌توان برای اهداف مختلف به‌نژادی استفاده کرد. همچنین نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام انگور امکان استفاده از نشانگرهای ISSR وجود دارد.

منابع

Arjmand Ghahestani R, Tavassolian I, Mohammadi Nejad GH (2015). Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 1-18.

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222–229.

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

Blair MW, Panaud O, and McCouch SR (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.

Commbe BG (1992). Research on development and ripening of the grapberry, American Journal of Enology and Viticulture 43:101-110.

Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology 4: 19-21.

Dettweiler E, Eibach R (2003). The two vitis databases as tools for germplasm management of vitis international variety catalogue and European vitis database. Acta Horticulturae 603: 505-509.

Dhanorkar VM, Tamhankar SA, Patil SG, and Rao VS (2005). ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. Vitis 44: 127–131.

Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations whit special reference to Salmo. Fish Biology 47:103-126.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010). Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Australian Journal of Basic Applied Science 4: 5758–5760.

Ghobadi C, Khoshkho M, Seyed Tabatabaei BI (2008). Gentetics relatedness and variation of some grape genotypes (*Vitis vinifera* L.) in Isfahan province using RAPD markers. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 45:627-635 (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.

Herrera R, Cares V, Wilkinson MJ, and Caligari PDS (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 YC, Yan ZH, Wei YM, and Zheng YL (2005). Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetics Newsletter 35: 9-22.

Kafkas S, Ozkan H, Ak BE, Acar I, Atl HS, and Koyuncu S (2006). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131: 522–529.

Keshavarz Khub M, Gharanjik Sh, Masumiasl A, Abdolahi Mandolakani B (2013) Assessment genetic relations of different grape (*Vitis vinifera*) cultivars using IRAP retrotransposon marker.1st International & 13th Iranian Genetics Congress.

Lanham P, and Brennan R (1998). Characterization of the genetic resource of red currant (Ribes rubrum: Subg. Ribesia) using anchored microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 96: 917-921.

Neveen AH, El-Homosany A, Amina HG, and Mohamed ASh (2011). Morphological and Issr Polymorphisms in Some Egyptian Grapes (*Vitis vinefera* L.) Collection. World Applied Sciences Journal 15: 1369-1375.

Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel.Population genetic so ftware for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288–295.

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

Sabir A, Tangolar S, Buyukalaca S, and Kafkas S (2009). Ampelographic and Molecular Diversity among Grapevine (*Vitis* spp.) Cultivars. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 45: 160–168.

Safarpoor Shorbakhlo M, Hosseini Monfared R, Paydar S, Sharifi M (2015). Determination of genetic diversity in pear genotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 115-132.

Sharma A, Namdeo AG, and Mahadik KR (2008). Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. Pharmacological Reviews 2: 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: 464–472.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalskiand JA, and Tingey SV (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid 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.htm.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Research 132: 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10: 1812–1817.

Zietkiewicz E, Rafalski A, and Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomic 20: 176-183.

Zohary D, and Hopf M (1993). Domestication of plants in the old world. Oxford, Clarendon Press. P.143-150.

Evaluation of diversity and genetic relationships among some grapevine cultivars using ISSR markers

Keshavarz- Khoob M.Gh.[1], Gharanjik Sh.[*2], Masoumiasl A.[3], Abdollahi-Mandoalkani B.[4]

[1]MSc student of Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood.
[2]Assisstant Professor of Plant Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood.
[3]Assisstant Professor of Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj.
[4]Associated Professor of Plant Breeding, Urmia University, Urmia.

Abstract

In this research, genetic variation among 22 grapevine cultivars of Shahrood region and 3 cultivars from Sisakht city were evaluated using 6 ISSR primers. The used primers produced totally 69 bands, which 65 bands showed polymorphism among evaluated cultivars. Primers UBC825 with 16 bands and UBC857 with 6 bands produced the highest and lowest numbers of polymorphic bands, respectively. Polymorphism percentage using these markers was 94.1%. Mean of expected heterozygosis (He) and mean of Shannon index were 0.37 and 0.54, respectively. The highest (0.61) and lowest (0.48) amount of Shannon index was belong to the primers UBC 825 and UBC849, respectively. Also primer UBC825 showed the highest amount of the expected heterozygosity (0.42), highest number of effective allele (1.75) and highest number of different alleles (2). Cluster analysis using Jaccard similarity coefficients and UPGMA algorithm put the 25 studied cultivars in three different groups. The results of this study showed that ISSR markers can be used as effective tools to evaluate the genetic variation and to accelerate grapevine breeding programs.

Keywords: *Genetic variation, Grapevine, Molecular marker, ISSR.*

[*] Corresponding Author: Gharanjik Sh. Tel: 09111721462 Email: gharanjik@hotmail.com