



مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی  
سال هشتم، شماره بیست و هفت، زمستان ۹۵

## بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور *Vitis vinifera* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

عطیه خلخالی<sup>۱</sup>، حسین عباسپور<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۰۳

### چکیده

انگور یکی از محصولات مهم باغی در دنیا و ایران به شمار می‌رود و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است لذا هدف در این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مطرح انگور (*Vitis vinifera*) در سطح مولکولی توسط نشانگر ISSR بود. به منظور استخراج DNA از روش تغییر یافته Doyle and Doyle استفاده شد و در گام بعد ۱۲ ژنوتیپ با ۱۲ آغازگر مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای با دو نرم‌افزار PopGen32 و SPSS9 انجام شد. خوشه‌بندی حاصل با هردو نرم افزار وارسته‌ها را در ۵ گروه مجزا قرار داد. در تجزیه داده‌ها، درصد پلی‌مورفیسم ۹۶/۴۹ درصد و تعداد لوکوس پلی‌مورف ۵۵ بدست آمدند. ضریب کوفتتیک برای ضریب تشابه جاکارد و نی، ۰/۸ است که نشان دهنده برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی است. نتایج نشان داد که در مجموع ۳۵۳ باند توسط این نشانگرها تولید شد. اندازه باندها بین ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. در این بین بیشترین تشابه برای وارسته‌های ۱ و ۷ با مقدار ۰/۶۱۹ و کمترین تشابه برای وارسته‌های ۱۰ و ۲ با مقدار ۰/۲۰۵ بود. از آنجا که بیشترین میزان باند توسط آغازگر a (۵۶ باند) مشاهده شد، این آغازگر بهتر از سایر آغازگرها توانست فاصله ژنتیکی وارسته‌های مربوط به آغازگر را مشخص کند.

واژه‌های کلیدی: انگور، مارکر مولکولی، تنوع ژنتیکی، آنالیزهای استاتیک، درخت فیلوژن

خلخالی، ع. وح. عباسپور. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور *Vitis vinifera* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی.

۲۷: ۲۳۵-۲۴۵

۱-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲-دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان مسئول مکاتبات: پست الکترونیک: Abbaspour75@yahoo.com

## مقدمه

در اختیار محقق قرار داده (هادکینگ و راماناتا، ۲۰۰۲) و پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (فرگوسون و همکاران، ۱۹۹۵). یکی از این نشانگرها ISSR می باشد که می توان از آن به عنوان ابزاری مفید در نقشه یابی و انگشت نگاری ژنتیکی استفاده کرد. این روش به DNA الگوی کمی نیاز داشته و به علت طول زیاد آغازگرها، دمای بالای اتصال، سرعت و سادگی فنی و رفتار مندلی ممکن است به سرعت ابزاری با ارزش برای تجزیه ژنوم گیاه در آینده محسوب شوند (آمیراجو و همکاران، ۲۰۰۱). بر اساس یافته های سوفرامانین و گوپال کریشنا (۲۰۰۴) که مبتنی بر مقایسه بین نشانگرهای ISSR و RAPD بوده است، مشخص شد که نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارند. در سال ۱۳۹۱ سیدی مرادی و همکاران، به مطالعه ارزیابی روابط ژنتیکی ۲۱ رقم بومی انگور استان کردستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR پرداختند که بر این اساس ژنوتیپ ها به ۴ گروه مجزا تقسیم شدند. همچنین در سال ۲۰۱۲ بیان کردند حفاظت و خصوصیات منابع ژنتیکی انگور (*Vitis vinifera*) در بانک های ژرم پلاس، اساس استفاده آنها در برنامه های اصلاحی بوده است که سبب توسعه ارقام جدید می شود. در آزمایش آرگاد و همکاران (۲۰۰۹) ۴۳ واریته انگور بیدانه (*Vitis vinifera*) با استفاده از ۱۴ پرایمر ISSR ارزیابی شدند. گروه بندی کلی بر اساس خصوصیات موفولوژیکی و شجره نامه بود که ثابت کننده سودمندی مارکرهای ISSR برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته های انگور بود. با توجه به یافته علیزاده و سین (۲۰۰۹)، که برآورد ثبات ژنتیکی گیاهچه های ریزازدیاد شده مشتق شده از سه ژنوتیپ پایه مادری مختلف انگور بود، ایجاد گیاهچه های انگور پایدار ژنتیکی را ثابت کرد و کاربرد پروتکل ریزازدیادی برای مقیاس تجاری توسعه یافته است. در سال ۲۰۰۷ مانجوشا و همکاران، تنوع و روابط ژنتیکی میان برخی واریته های انگور را به کمک ISSR-PCR بررسی کردند که نتایج بیان داشت، در میان ارقام مختلف انگور، *Vitis vinifera* تنوع بیشتری را توسط شکل گیری زیرخوشه ای مجزا بر اساس رنگ، عطر و طعم و بذر آنها را آشکار ساخت.

چوداری و همکاران (۲۰۱۴) نیز با بررسی تمایز ژنتیکی انگور با ISSR نشان دادند که قدرت حل و فصل پرایمرهای ISSR مابین ۳ و ۱۰، ارزش PIC از ۰/۷۸ تا ۰/۸۸ و شاخص نشانگر (MI) از ۳/۸۹ تا ۸/۸۰ با ارزش متوسط ۶/۱۴ و ۶/۸۸ به ترتیب

انگور از تیره *Amplidaceae* است که آن را *Vitaceae*

نیز می نامند. گونه هایی که در موکاری استفاده می شوند و ارزش تجاری دارند از جنس *Vitis* هستند (جداری کوهی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین این گیاه دارای ۶۰ گونه است که مهمترین آن *vinifera* است (اریسلی و همکاران، ۲۰۰۸). استفاده از انگور محدود به میوه رسیده نیست بلکه، برگ و میوه نارس آن به صورت غوره مصرف غذایی دارد. (کریمی شهری و همکاران، ۱۳۹۱). کلبه قسمت های درخت انگور قابل استفاده دارویی است و دارای خواص بسیاری از جمله دفع سموم بدن، تقویت کبد، موثر در درمان سل، سیاه سرفه، نقرس و غیره میباشد (نراقی، ۱۳۸۹).

به دلیل حجم زیاد ژرم پلاس انگور در نواحی مختلف اکولوژیکی کشور تاکنون بیش از ۲۵۰ رقم از آنها گزارش شده است. در سالهای اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزاری توانمند برای شناسایی چندشکلی و مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (گالت و همکاران، ۱۹۹۸)، (زیتکیویز و همکاران، ۱۹۹۴)، (دانورکار، ۲۰۰۵). تنوع زیستی برای تضمین تولید مواد غذایی و دارویی در آینده، حفظ ذخایر توارثی موجود در طبیعت دست نخورده و بکر، امری ضروری است (مجنونیان و همکاران، ۱۳۸۲). تنوع ژنتیکی که مرحله ای از تنوع زیستی است روشی برای آن است که جمعیت یک گونه به دگرگونی های محیط طبیعی وفق پیدا کند (گروم و همکاران، ۲۰۰۶). پیش شرط استفاده از ذخایر توارثی، شناسایی و مطالعه تنوع ژنتیکی صفات مختلف در آنهاست. با توجه با این مورد که برای اصلاح یک صفت بایستی تنوع کافی در دسترس باشد تا به اصلاح آن اقدام کرد؛ اگر تنوع نباشد نمی توان گزینش انجام داد. کاهش تنوع ژنتیکی علاوه بر اینکه بازدهی برنامه اصلاحی را کاهش می دهد باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات و بیماری ها و تنش های محیطی می گردد (استراس و لائکو، ۲۰۰۷).

امروزه با توجه به توسعه نشانگرهای DNA و قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی آنها، بطور گسترده ای از این نشانگرها در کشاورزی استفاده می شود (آمیراجو و همکاران، ۲۰۰۱). نشانگرهای مولکولی می توانند اطلاعاتی در مورد اهمیت خصوصیات تنوع، نظیر جبران ژنی و الگوی اصلی یک جمعیت،

بار تقطیر. در این پژوهش، از روش تغییر یافته Doyle & Doyle استفاده شد.

جدول ۱- ارقام انگور مورد آزمایش

ردیف	کد	نام رقم
۱	۶۰۰۱	سبزمال کاشمر
۲	۶۰۰۲	شاه پسند
۳	۶۰۰۳	فخری نیشابور
۴	۶۰۰۵	سبز درگز
۵	۶۰۰۹	طرقی کاشمر
۶	۶۰۱۰	شاهانی
۷	۶۰۱۱	خلیلی بیدانه قوچان
۸	۶۰۱۲	کلدری بیرجند
۹	۶۰۱۳	پیر قلی شماره ۱
۱۰	۶۰۱۴	پیر قلی شماره ۲
۱۱	۶۰۱۵	خلیلی نر قوچان
۱۲	۶۰۱۶	شغالی نیشابور

مراحل استخراج: به منظور بالا رفتن کیفیت کار، بافر استخراج هر روز درست و استفاده می‌شد. به میکروتیوپ‌های حاوی بافر استخراج، ۱٪ مرکاپتواتانول و ۲٪ PVP به منظور حذف ترکیبات پلی‌فنولی اضافه شد. میکروتیوپ‌ها به حمام آب گرم به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند چراکه فعالیت بافر CTAB در ۶۵ درجه‌ی سانتیگراد است. پس از ضد عفونی بافت برگی ۰/۳ تا ۰/۷ گرم از آن را به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB گرم شده درون هاون ساییده شد تا محلول نرم و یکنواختی به دست آید. نمونه‌ی حاصله به میکروتیوپ تمیز منتقل شده و ۷ تا ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K به آن افزوده شد. نمونه‌ها به حمام آب گرم ۶۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند و مداوم تکان داده شدند. سپس داخل میکروفیوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. به محلول مورد نظر ایزوآمیل‌الکل-کلروفرم-فنل با نسبت ۱:۲۴:۲۵ به هر نمونه اضافه گردید. پس از تکان محلول میکروفیوژ rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. لایه شفاف فوقانی با دقت به کمک سمپلر جدا شد. به محلول مورد نظر ایزوآمیل‌الکل-کلروفرم-فنل به هر نمونه اضافه گردید. سپس سانتریفوژ نمونه‌ها انجام شد و سوپرناتانت به میکروتیوپ جدید منتقل گردید. در این مرحله به هر نمونه ۲/۳ حجم ایزوپروپانول سرد افزوده و سپس

قرار گرفته‌اند. و بیان کردند که ISSR می‌تواند وسیله‌ای مناسب برای تکامل تنوع ژنتیکی میان ارقام انگور باشد. تامهانکار و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند مطالعه روابط ژنتیکی در انگورها نه تنها برای اصلاح مهم است بلکه برای مطالعات تکاملی و حفظ ژرمپلاسم با اهمیت است. بر اساس تحقیق آنها که جداسازی واریته‌های انگور با استفاده از نشانگر ISSR بود، مشاهده شد که واریته‌های متعلق به *Vitis vinifera* تنوع زیادی دارند. آنها بیان کردند نشانگرهای ISSR به نظر می‌رسد برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته‌های انگور کارآمد و قابل اطمینان باشند. دانورکار و همکاران (۲۰۰۵) نیز با ارزیابی روابط ژنتیکی میان واریته‌های انگور در هند نشان دادند که ISSR یک سیستم مارکری کارآمد و قابل اطمینان برای تجزیه و تحلیل ارقام انگور است و واریته‌های متعلق به *Vitis vinifera* به نظر رسیدند که بسیار متنوع می‌باشند. با توجه به بررسی نوین و همکاران (۲۰۱۱) بر چندشکلی مورفولوژیکی و ISSR در برخی از انگورهای مصری، گزارش کردند که چگونه تجزیه و تحلیل ذکر شده می‌تواند نشانگرهای مناسبی برای برآورد تکامل تنوع ژنتیکی انگور و به عنوان معیار در تعیین رقم و مطالعه روابط فیلوژنی میان ارقام را فراهم کند. همچنین این صفات برای حفظ ژنتیکی در این محصول مفید بودند. بنابراین این آزمایش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و میزان قرابت خویشاوندی واریته‌های انگور در استان سمنان با استفاده از نشانگر ISSR انجام گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه نمونه گیاهی

رقم انگور از مرکز تحقیقات شاهرود جمع‌آوری شد (جدول ۱). در این آزمایش برگ به عنوان بافت مورد نظر برای استخراج DNA انتخاب گردید. در آزمایشگاه برای جلوگیری از هضم DNA ژنومی توسط آنزیم‌های خود سلول، نمونه‌ها به یخچال ۲۰°C - منتقل گردیدند.

#### استخراج DNA

مواد مورد استفاده در تخلیص DNA: Tris-HCl، Ethylenediamine-tetra acetic acid (EDTA)، Phenol، Sodium dodecyl sulfate (SDS)، carboxyle Cetyl Trimethyl، Isoamylalchole، Chloroform، Proteinase، NaCl-Ammonium Bromide (CTAB)، RNase A، K، Ethanol (70%) و آب دو

## انتخاب آغازگرها

در این پژوهش از ۱۲ آغازگر سنتز شده توسط شرکت محترم سیناکلون انجام شد. جدول ۲، توالی و نام آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش‌های تکثیر را نشان می‌دهد. انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱۲ پرایمر آورده شده در جدول ۲ که از سایت دانشگاه کلمبیا انتخاب و توسط شرکت سیناکلون سنتز شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر با توجه به جدول ۳ انجام گرفت.

میکروتیوپ‌ها چندین بار به آرامی اینورتن کرده تا به تدریج رشته‌های DNA ظاهر شدند. نمونه‌ی مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- فریزر قرار داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۲۰۰ دور، میکروفیوژ شدند. محلول رویی را خارج کرده و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده شد. میکروفیوژ به مدت ۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور تا نمک‌های موجود به طور کامل شسته شوند. نمونه را در معرض هوا قرار داده تا اتانول باقی مانده در میکروتیوپ حذف شود سپس با توجه به رسوب مورد نظر به نمونه‌ها آب دو بار تقطیر افزوده شد. پس از استخراج ماده وراثتی، کیفیت نمونه‌های دی ان ای با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۵ درصد در بافر ۰/۵ x TBE و کمیت آنها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد.

جدول ۲- ویژگی مربوط به آغازگرها

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر (۳'-۵')
۱	Ubc۸۹۰	۵ -vhvgtgtgtgtgtgtgtgt-۳'
۲	Ubc۸۴۱	۵-gagagagagagagagayc-۳'
۳	Ubc۸۱۱	۵ -gagagagagagagagac-۳'
۴	Ubc۸۳۶	۵ -agagagagagagagagca-۳'
۵	Ubc۸۴۰	۵- gagagagagagagagayt-۳'
۶	Ubc۸۴۲	۵ - gagagagagagagagayt -۳'
۷	Ubc۸۵۷	۵-acacacacacacacacyg-۳'
۸	A۱۷۸۹۹	۵-cacacacacacaag-۳'
۹	Ubc۸۲۰	۵- (gt)8c-۳'
۱۰	Ubc۸۲۵	۵-ACACACACACACACT-۳'
۱۱	Ubc۸۱۸	۵-CACACACACACACAG-۳'
۱۲	Ubc۸۷۹	۵-ATTAGCGCTTAATATAGG-۳'

جدول ۳- غلظت مواد به کار رفته در واکنش زنجیره پلی‌مراز

مواد واکنش	غلظت	مقدار	غلظت نهایی در واکنش
PCR Buffer	۱۰x	۲/۵ میکرولیتر	۱x
dNTPs	۰/۲ میلی مولار	۱/۵ میکرولیتر	۰/۸ میلی مولار
Primer mix	۱۰ میکرومولار	۱.۲ میکرولیتر	۰/۲ میکرومولار
Taq DNA Polymeras	۵ واحد/میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر	۱ واحد
MgCl2	۵۰ میلی مولار	۰.۷۵ میکرولیتر	۱.۵ میلی مولار
dd H2O	—	۱۷/۸ میکرولیتر	—
DNA	۲۵ نانوگرم	۱ میکرولیتر	۲۵ نانوگرم

زمان مناسبی برای تفکیک محصولات پی سی آر از یکدیگر تشخیص داده شد.

### نتایج و بحث

#### تعیین کمیت و کیفیت دی ان ای ژنومی

در این پژوهش به منظور استخراج دی ان ای، از روش Doyle and Doyle استفاده شد، نتایج نشان داد روشی که از ترکیب PVP و CTAB، هر کدام به میزان ۲٪ استفاده شود روش مناسبی جهت استخراج دی ان ای گیاه انگور می باشد؛ چرا که CTAB به منظور حذف پلی ساکاریدها و PVP به منظور حذف ترکیبات پلی فنولی از طریق شکل گیری پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی فنولی اضافه شدند. آلودگی با ترکیبات پلی فنولی باعث افزایش ویسکوزیته ی محلول شده و OD، ۲۶۰/۲۸۰ پایین تر از ۱/۶ خواهد بود (مالیکال، ۱۹۹۲).

#### نتایج حاصل از تکثیر قطعات دی ان ای

برای انجام این مطالعه از ۱۲ آغازگر استفاده شد که ۸ پرایمر باندهای الکتروفورزی مشخص تولید نمودند. کلیه ی آغازگرهای بکار رفته دارای ۶۰ تا ۷۰ درصد G + C بودند و توالی هیچ کدام از آغازگرها، دارای بخش های خود مکملی نبودند. هر آغازگر تعدادی باند تولید کرد که تنها باندهایی که بطور واضح قابل مشاهده بودند امتیازبندی و به منظور گروه بندی اکوتیپ ها انتخاب شدند. مشخصات باندهای حاصل از ۸ آغازگر در جدول ۴ مرتب شده است. همچنین نمودار ستونی تعداد کل باندهای حاصله توسط هر آغازگر در شکل ۱ ترسیم شده است.

در نهایت پس از آماده سازی مخلوط واکنش میکروتیوپ ها به دستگاه ترموسایکسر اپندورف مدل Reccobet با چرخه دمایی یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه که واسرشته سازی اولیه در این مرحله رخ می دهد در گام بعد ۳۵ سیکل که واسرشت دومین در ۹۴ درجه به مدت ۷ ثانیه، ۳۶ درجه ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به عنوان بسط نهایی ۷ دقیقه انجام گردید (یو، ۱۹۹۲).

#### الکتروفورز فرآورده های PCR

مواد مورد استفاده در الکتروفورز دی ان ای ژنومی و محصول پی سی آر: (D.D.W) آب دو بار تقطیر، Ethylenediamine-tetra acetic acid-carboxyle Safe (EDTA)، رنگ Tris-base، Agarose، Buric acid، Stain و Lader 1kb. به منظور کنترل تکثیر فرآورده های حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز، ۸ میکرولیتر از فرآورده های یک یا دو واکنش اول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید.

از خط کشی ژنی (لدر) 1kb ساخت فرمتناز آلمان به منظوره بررسی باندهای پی سی آر استفاده شد. با توجه به دفترچه راهنمای خود سیستم، توان ثابت ۸۰ وات مورد استفاده قرار گرفت. زمان الکتروفورز نیز با توجه به وزن نوارهای حاصل از پی سی آر بر حسب جفت باز در این پژوهش و با توجه به نتایج آزمایشات اولیه و بهینه سازی شرایط الکتروفورز ۱۲۰-۱۵۰ دقیقه

جدول ۴- نتایج حاصل از امتیازدهی باندهای ژل و تجزیه و تحلیل آنها

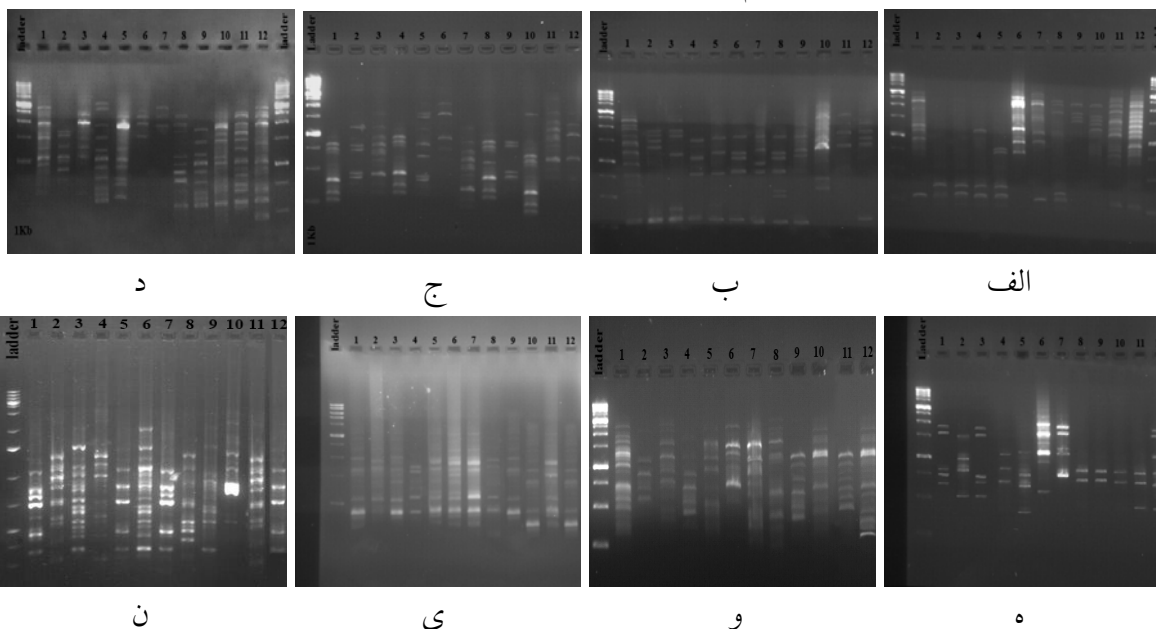
ردیف	آغازگر	دامنه انتخاب باندها	تعداد کل باندها	تعداد لوکوس	لوکوس چندشکلی
۱	A	۲۵۰-۲۵۰۰	۵۶	۸	۷
۲	۸۴۲	۲۰۰-۳۰۰۰	۴۱	۷	۷
۳	۸۴۰	۳۰۰-۲۰۰۰	۴۵	۹	۹
۴	۸۵۷	۵۰۰-۳۰۰۰	۳۹	۶	۶
۵	۸۱۱	۲۵۰-۳۵۰۰	۴۳	۸	۸
۶	۸۳۶	۲۰۰-۲۵۰۰	۳۶	۶	۶
۷	۸۹۰	۲۰۰-۲۵۰۰	۴۸	۷	۷
۸	۸۴۱	۲۰۰-۲۰۰۰	۴۵	۶	۵

دارا بود. همچنین کمترین تعداد لوکوس‌ها در آغازگرهای ۸۵۷، ۸۳۶ و ۸۴۱ با ۶ لوکوس بودند که از میان اینها آغازگر ۸۴۱، ۵ لوکوس چندشکلی را نشان داد که با کمترین تعداد لوکوس چندشکلی در میان سایر آغازگرها بود.

به غیر از آغازگرهای a و ۸۴۱ که به ترتیب ۸۷/۵ و ۸۳/۳ درصد چندشکلی داشتند، سایر آغازگرها دارای ۱۰۰ درصد چندشکلی از میان لوکوس‌های خود بودند. در این آزمایش ۲ آغازگر (a و ۸۴۱) در ۲ لوکوس دارای یک شکلی (منومورف) بودند و در ۵۵ لوکوس دیگر تولید شده توسط این ۸ آغازگر چندشکلی مشاهده شد.

به طور کلی در مجموع ۳۵۳ باند توسط کل نشانگرها به وجود آمد که از این میان بیشترین تعداد باند به دست آمده مربوط به آغازگر a با ۵۶ باند و کمترین تعداد باند بدست آمده مربوط به آغازگر ۸۳۶ با ۳۶ باند است. از آنجا که دامنه انتخاب باندها از ۲۰۰-۳۵۰۰ جفت باز تعیین شد، آغازگر ۸۱۱ با داشتن قطعاتی با ۳۵۰۰ جفت باز دارای بزرگترین اندازه دی ان ای و ۴ آغازگر ۸۴۱، ۸۹۰، ۸۳۶ و ۸۴۲ با دارا بودن قطعاتی به اندازه ۲۰۰ جفت باز دارای کوچکترین اندازه دی ان ای می‌باشند.

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که آغازگر ۸۴۰ دارای بیشترین تعداد لوکوس می‌باشد (۹ لوکوس) که همه لوکوس‌ها چندشکلی را نشان دادند (۱۰۰٪) و بیشترین سهم چندشکلی را



شکل ۱- الف) واکنش زنجیره پلی‌مراز آغازگرهای ۸۱۱ با ۱۲ نمونه انگور، ب) ۸۳۶ با ۱۲ نمونه، ج) ۸۴۰ با ۱۲ نمونه، د) ۸۴۱ با ۱۲ نمونه، ه) ۸۴۲ با ۱۲ نمونه، و) ۸۵۷ با ۱۲ نمونه، ی) a با ۱۲ نمونه و ن) ۸۹۰ با ۱۲ نمونه.

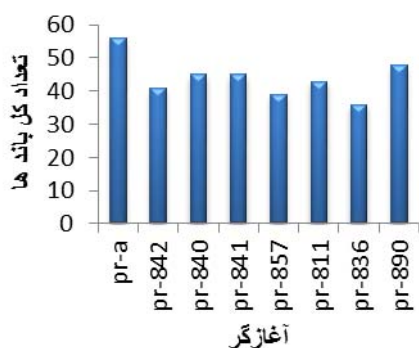
بیشترین تعداد این باندها در ارقام سبزمال کاشمر، شغالی نیشابور با ۳۵ باند و پس از آنها در ارقام طرقی کاشمر، شاهانی و خلیلی نر قوچان با ۳۳ باند مشاهده شد. کمترین میزان باندهای بدست آمده به ازای کلیه آغازگرها نیز در ارقام پیرقلی ۱ با ۲۳ باند و سبز درگز با ۲۴ باند بود (نمودار ۱:الف).

همچنین نتایج بدست آمده از تکثیر قطعات دی ان ای ۱۲ وارپته انگور نشان داد، بیشترین تعداد کل باندهای بدست آمده

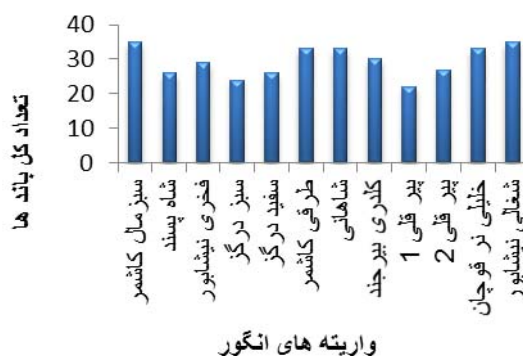
این نتایج بیان داشت نشانگرهای ISSR می‌تواند پلی‌مورفیسم بالایی را در بین ژنوتیپ‌های انگور و هیبریدهای آنها تعیین کند، و همچنین تکنیک ISSR روش مناسبی برای تعیین تنوع ژنتیکی در بین ارقام انگور می‌باشد (قریشی و همکاران، ۱۳۹۱).

با توجه به نتایج حاصل از مشاهده کل باندهای بدست آمده از ۱۲ وارپته انگور، به ازای کلیه آغازگرهای استفاده شده

شده با آغازگر ۸۳۶ با ۳۶ باند بود (نمودار ۱:ب).



توسط آغازگر a با ۵۵ باند مشاهده شد. پس از آن پرایمر ۸۹۰ با ۴۸ باند در مرتبه بعدی قرار گرفت و کمترین تعداد باند تشکیل



ب

الف

نمودار ۱- الف) تعداد کل باندهای تولید شده در هر واریته به ازای کلیه آغازگرهای استفاده شده و ب) تعداد کل باندهای حاصل از هر آغازگر

ضریب جاکارد، ارقام در ۵ گروه دسته‌بندی شدند. بر این اساس ارقام سبزمال کاشمر، خلیلی بیدانه قوچان و شاهانی در ردیف اول قرار گرفتند. همچنین این نتایج نشان داد که بیشترین تشابه بین ارقام ۱ و ۷ (سبزمال کاشمر و خلیلی بیدانه قوچان) که معادل ۰/۶۱۹ می‌باشد، وجود دارد.

در ردیف دوم ارقام پیرقلی ۲، شغالی نیشابور و خلیلی نر قوچان (۱۰، ۱۲ و ۱۱) قرار گرفتند. همچنین ارقام کلدری بیرجند و پیرقلی شماره ۲ در ردیف سوم جای گرفتند. تنها در ردیف چهارم یک رقم جدا قرار گرفت که رقم سبز درگز می‌باشد. در ردیف پنجم نیز ارقام فخری نیشابور، طرقی کاشمر و شاه پسند قرار گرفتند که تشابه ژنتیکی نزدیکتری نسبت به یکدیگر داشتند. کمترین میزان تشابه را ارقام ۲ و ۱۰ (که ارقام شاه پسند و پیرقلی ۲ هستند) دارا می‌باشند که برابر ۰/۲۰۵ می‌باشد.

این نتایج با نتایج رضایی و همکاران (۱۳۸۶) مطابقت داشت، مبنی بر اینکه نشانگرهای استفاده شده در تمام ژنوتیپ‌ها چندشکلی بالایی نشان دادند. لذا تکنیک ISSR یک مجموعه نشانگری مفید برای شناسایی ژنتیکی انگورهای ایرانی به حساب می‌آید. همچنین این نتایج در تطابق با نتایج سیدی مرادی و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشت، انگشت‌نگاری ISSR می‌تواند برای کشف چندشکلی برای ژنوتیپ‌های انگور استفاده شود.

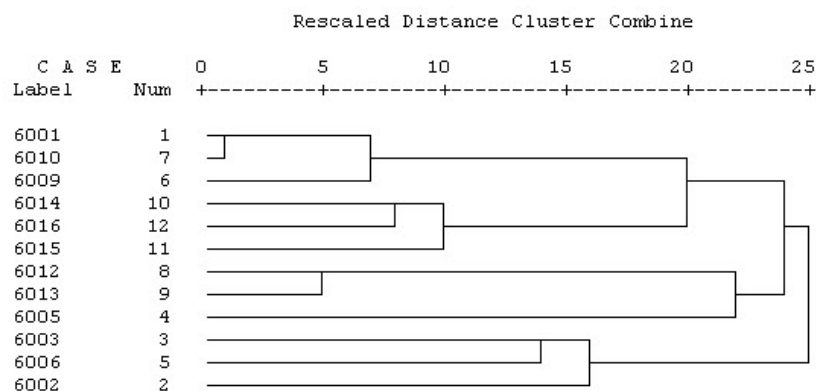
نتایج حاصل از تجزیه تحلیل داده‌ها در تعیین قرابت ژنوتیپ‌ها با توجه به دی ان ای تکثیر شده و باندهای حاصل، تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS16 انجام شد و میزان تشابه بین ارقام محاسبه گردید (جدول ۵). گروه‌بندی ارقام بر اساس ماتریس ۱ و ۰ حاصل از نشانگر رپید و بر مبنای ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها و دندروگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها بر اساس

جدول ۵- گروه‌بندی ارقام

ردیف	۱	۲	۳	۴	۵
گروه	۶، ۷، ۱	۱۱، ۱۲، ۱۰	۹، ۸	۴	۲، ۵، ۳

مانجوشا و همکاران (۲۰۰۷) در یک راستا بودند. همینطور در تطابق با نتایج آرگاد و همکاران (۲۰۰۹) بود که بیان کردند گروه‌بندی کلی بر اساس خصوصیات موفولوژیکی و شجره‌نامه بود که ثابت‌کننده سودمندی مارکرهای ISSR برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان واریته‌های انگور بود.

از آنجا که تکنیک ISSR توانست در این تحقیق ارقام مختلف را در گروه‌های مجزا قرار دهد، لذا میتوان گفت که ISSR یک سیستم مارکری کارآمد و قابل اطمینان برای تجزیه و تحلیل ارقام انگور است که با نتایج دانورکار و همکاران (۲۰۰۵) مشابه بود. همچنین این مطالعه آشکار کرد که رابطه ژنتیکی میان ارقام انگور می‌تواند با استفاده از نشانگر ISSR ارزیابی شود که با نتایج



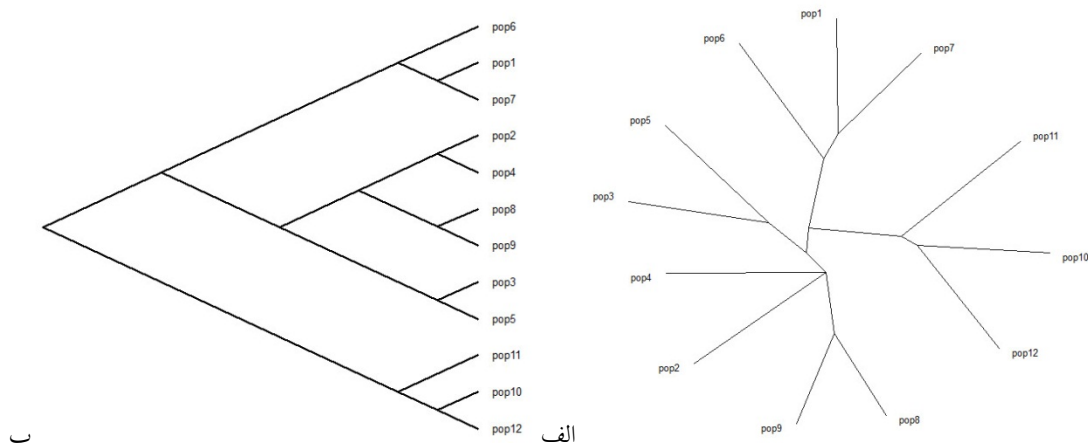
شکل ۲- دندروگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد

و مسئله مهمی که می‌توان به آن اشاره کرد، کاربرد ISSR در شناسایی ارقام و ارتباط ژنتیکی ارقام با یکدیگر می‌باشد. به طوری که در دست داشتن اطلاعات نژادی و یا مبداهای جغرافیایی ارقام نمی‌تواند به طور صحیحی ارتباط ژنتیکی ارقام را نشان بدهد. در حالیکه دی ان ای مارکرها، ارتباطات ژنتیکی و دوری و نزدیکی ارقام با یکدیگر را بهتر و بیشتر نشان می‌دهند. اگر به اندازه کافی دی ان ای مارکرها مورد استفاده قرار گیرند و در سرتاسر کروموزوم پراکنده شده باشند این مسئله توسط چندین محقق بیان شده است. (ژانگ، ۲۰۰۵؛ ایکبال، ۱۹۹۷؛ مولتانی، ۱۹۹۵). همچنین سطح بالای تنوع مشاهده شده در ارقام بومی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام بهتر و استفاده از این ارقام به عنوان والد بخشنده جهت انتقال صفات مطلوب به واریته‌های پرمحصول مورد استفاده قرار گیرد (صیدی مرادی و همکاران، ۱۳۹۱).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها (نرم افزار PopGen32) نرم افزار PopGen32 در سال ۱۹۹۹ توسط فرانسیس و همکاران طراحی شد. PopGen32 نرم‌افزاری است که تجزیه داده‌ها را بر اساس ضریب تشابه نی و روش UPGMA انجام می‌دهد. همچنین این نرم افزار برای محاسبه هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، تعداد آلل‌های موثر، شاخص تثبیت و ضریب شانون استفاده میشود. نرم‌افزار TreeView که از داده‌های PopGen استفاده می‌کند به شکل متفاوت می‌تواند نمودار (گراف) رسم کند که دو نمونه از این گراف‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است.

به طور کلی امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی منجر به افزایش سرعت و دقت برنامه‌های اصلاحی شده است (حدادی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱). این نتایج نشان داد که مارکرهای ISSR دارای پتانسیل و توانایی در شناسایی و متمایز نمودن ارقام دارند





شکل ۳- گراف های رسم شده با الف) نرم افزار PopGen و ب) (Slanted Cladogram) بر اساس ماتریس تشابه مبتنی بر ضریب تشابه نی و روش U

#### منابع

- جداری کوهی، ب.، ق. گروسی و ر. حسینی. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی دانه انگور توسط نشانگر مولکولی RAPD. مجله سلول و بافت. جلد دوم، شماره ۲: ۹۹-۱۰۶.
- حدادی نژاد، م.، ع. عبادی و م. نقوی. ۱۳۸۸. ارزیابی مولکولی و موفولوژیکی والدین و نتاج برتر حاصل از تلاقی انگورهای دانه دار و بی دانه به منظور تعیین رابطه والدین-نتاج. مجله علوم باغبانی ایران، دوره چهارم، شماره ۳: ۳۷-۴۹.
- رمضانی، ا.، ح. رحیم و ح. مردی. ۱۳۸۶. تعیین تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های انگور ایرانی با استفاده از نشانگر ریزماهواره. ژنتیک نوین. دوره دوم، شماره ۴: ۳۱-۳۸.
- سیدی مرادی، ه. ر.، د. طالبی حسنی و ف. کرمی. ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام محلی انگور استان کردستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی)، ۶ صفحه.
- قویشی، م.، ف. رحمانی، ح. دولتی بانه و ک. دیلمقانی. ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور در ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی ISSR. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. نراقی، م. ۱۳۸۹. خوردنی های شفابخش. نشر امیرکبیر. ۱۶۰ صفحه.
- Alizadeh, M. and S. K. Singh. 2009. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis Spp.*) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. I.J.B.7(1):37-44.
- Ammiraju, J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theor. Appl. Genet. 102: 726-732.
- Argade, N. C., S. A. Tamhankar, G. S. Karlbasappa, S. G. Patil and V. S. Rao. 2009. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. J. Plant Biochem Biot. 18(1):45-51.
- Choudhary, R. S., V. S. Zagade Maboodurrahman, G. D. Khalakar and N. K. Singh. 2014. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera* L.). The Bioscan. 9(2):823-828.
- Dhanorkar, V. M., S.A. Tamhankar, S. G. Patil and V.S. Rao. 2005. ISSR-PCR for assessment of genetic relationship among grape varieties cultivated in India. Vitis. 44(3):127-131.
- Ercisli, S. and E. Orhan. 2008. Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh Valley revealed by RAPD Markers. Guleray. Agar. Biochem. Genet. 46:590-597.

- Ferguson, A., J. B. Taggart, P. A. Prodohl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. McGinnity and R. A. Hynes. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations whit special reference to *Salmo*. *Fs. Bi.* 47:103-126.
- Galet, P. 1998. *Cépages et Vignobles de France*, Tome 1. *Les Vignes Américaines*, 2nd end. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France.
- Groom M. J., G. K. Meffe and C. R. Carroll. 2006. *Principles of Conservation Biology* (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Hodgkin, T. and R.V. Ramanata. 2002. *People, plant, and DNA: Prespectives on the scientific and technical aspects of conserving and using plant genetic resource*. CABI.
- Iqbal, M. J., N. Aziz, N. A. Saeed, Y. Zafar and K. A. Malik. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
- Maliyakal E. J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucl. Acids Res.* 20: 2381.
- Manjusha, D., S. A. Tamhankar, S. G. Patil, G. S. Karibasappa and V. S. Rao. 2007. Assessment of genetic diversity and relationships among some grape varieties using ISSR-PCR based markers. *Vellanikara, Karala, India*, 2:491-496.
- Multani D. S. and B. R. Lyon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. *Genome.* 38: 1005-1008.
- Neveen, A. H., A. El-Homosany, H. G. Amina and A. S. Mohamed. 2011. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinefera* L.) collection. *World Appl. Sci. J.* 15(10): 1369-1375.
- Seyedimoradi, H., R. Talebi, D. Hassani and F. Karami. 2012. Comparative genetic diversity analysis in Iranian local grapevine cultivars using ISSR and DAMD molecular markers. *EEB.* 10: 125-132.
- Souframanien, J. and T. Gopalkrishna. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109(8):1687-93.
- Strauss, S. and R. Lankau. 2007. Study: loss of genetic diversity threatens species diversity. *J. Sc.* 14 issue.
- Tamhankar, S. A., N. C. Argade, M. N. More, V. M. Dhanorkar, S. G. Patil, V. S Rao, G. S. Karibasappa and D. C. Agrawal. 2006. *ISHS Acta Horticulture* 785.
- Yu, K. and K. P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* 20(10):113-117.
- Zhang Z. S., Y. H. Xiao, M. Luo, X. B. Li, X. Y. Luo, L. Hou, D. M. Li and Y. Pei. 2005. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of fibre related traits in upland cotton. *Euphytica.* 144: 91-99.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (FSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20:176-183.

## Investigation of genetic diversity in different grape varieties (*Vitis vinifera*) using ISSR molecular marker

A. Khalkali<sup>1</sup>, H. Abaspoor<sup>2</sup>

Received: 2015-05-29 Accepted: 2015-11-24

### Abstract

Grapes is one of the most important horticultural products in the world and Iran and has a wide genetic diversity, so the purpose of this research was to investigate of the genetic diversity and to asses of introduced grapes cultivars (*Vitis vinifera*) at the molecular level using ISSR marker. For DNA extraction modified method of Doyle and Doyle was used and at the next step, 12 genotypes were examined by 12 primers. Cluster analysis was performed by PopGen32 and SPSS9 softwares. The resulted clustering were divided cultivars into 5 groups by both softwares. In analyzing data, the percentage of polymorphism and the number of polymorphic loci were obtained 96.49 percent and 55, respectively. Cophenetic coefficient was 0.8 for Jaccard coefficient and straw, is indicating a fine fit between the dendrogram and the main similarity matrix. The bands that were obviously visible were reviewed. Results showed that a total of 353 bands were generated by the markers. Results showed that a total of 353 bands were generated by the markers. Results showed that 353 bands were generated by the markers. The size of bands was various between 200 and 3000 bp. The highest similarity was 0.619 for number one and number 7 varieties and the least one was 0.205 for number10 and number 2 varieties. Because the most amount of bond were observed by primer a (56 bands), this primers was able to determine the genetic gap of Primerrelated varieties better than other primers.

**Keywords:** Grape, genetic diversity, molecular markers, phylogenetic tree, static analysis.

---

1- Master of Science in Agricultural Biotechnology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2-Associate Professor, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran