بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

# بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ارقام مختلف انگور منطقه شاهرود با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP

دانشجو:

**محمدقاسم کشاورزخوب**

اساتید راهنما :

**دکتر شاهرخ قرنجیک - دکتر اسد معصومی اصل**

اساتید مشاور:

**دکتر مهدیه پارسائیان - دکتر بابک عبدالهی مندولکانی**

پایان‌نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

**آبان ماه ۱۳۹۲**

تقدیم به

همه عزیزانم،

به‌خصوص

مادرمهربانم

# تقدیر و تشکر

می ستایم خدایی را که به هر دانه لذت بالیدن، به من لذت آموختن این بالندگی را داد.

حال که به لطف و یاری خداوند به پایان این ره رسیده‌ام، لازم می‌دانم از اساتید راهنمای پرتلاش و گرانقدرم آقایان دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر اسد معصومی اصل به پاس راهنمایی‌های ارزشمند و کمک‌های بی‌دریغ‌شان تشکر و قدردانی نمایم. از زحمات جناب آقای دکتر بابک عبدالهی مندولکانی و دکتر مهدیه پارسائیان که مشاوره این پایان نامه را عهده دار بودند، سپاس‌گزارم.

از داوران گرامی، آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر حمیدرضا صمدلویی به جهت ارائه نظرات و پیشنهادات به جا و با ارزش و همدلی‌هایشان در تمام مراحل اجرای پایان نامه سپاس‌گزارم، از کارشناسان آزمایشگاهای دانشگاه یاسوج سرکار خانم حاجی زاده، خانم کرمی، خانم فرهاد پور و خانم صیادیان، از انتظامات دانشگاه یاسوج صمیمانه سپاس‌گزاری می‌کنم.

از اساتید بزرگوارم در دانشگاه یاسوج آقایان دکتر اشکبوس دهداری، دکتر محمد عبدالهی، دکتر رضا امیری فهلیانی، دکتر پیام فیاض، دکتر محقق دولت آبادی و سرکار خانم دکتر یوسفی نژاد به خاطر زحمات بی‌دریغ و همکاری‌های فراوانشان، بی نهایت سپاس‌گزارم.

در پایان از تمامی دوستان خوبم به‌خصوص آقایان جابر خورندی، علی مظهری نیا، نواب نیک بین، امیرعلی دمورپور، میثم روانفرد، فرهاد روانفرد، ستار علی پور، هدایت الله بیاد، پرهام رجبی و خانم‌ها سرکار خانم برزن، خانم هدایتخواه، خانم مرتضوی، خانم تاجی، خانم رحیمی، خانم قاسمی، خانم باقری و همه‌ی عزیزانی که در به اتمام رساندن این پروژه به بنده لطف نمودند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

**محمدقاسم کشاورزخوب**
**۱۳۹۲**

## تعهدنامه

اینجانب **محمدقاسم کشاورزخوب** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه **بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ارقام مختلف انگور منطقه شاهرود با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP** تحت راهنمائی آقایان دکتر **شاهرخ قرنجیک و دکتر اسد معصومی اصل** متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ: ۱۳۹۲/۰۸/۱۳

امضای دانشجو:


مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی گیاه انگور به تحقیقات به‌نژادی این گیاه کمک می‌نماید. هدف از این مطاالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم مختلف انگور با استفاده از داده‌های مورفولوژیکی، نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP و همچنین نشانگر ISSR بود. به منظور انجام این تحقیق، نمونه-برداری و ارزیابی صفات مورفولوژیکی در تابستان سال ۱۳۹۱ از مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود و باغات شهر سی‌سخت انجام شد. در این مطالعه، ۱۴ صفت مورفولوژیک مربوط به شکل برگ، خوشه و حبه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بخش مولکولی از ۲۱ آغازگر رتروترانسپوزونی و ISSR استفاده شد. براساس میزان تشکیل باند، چندشکلی و نیز تکرار پذیری باندها، از بین ۲۱ آغازگر مورد استفاده، تعداد ۱۵ آغازگر انتخاب شدند. ۱۵ آغازگر مذکور مجموعا ۱۵۶ باند تولید کردند که ۱۴۴ باند چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود، بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۱۶ عدد و مربوط به آغازگرهای ۸۲۵ و ۸۴۰ و کمترین آن ۶ عدد و مربوط به ترکیب آغازگری Vine1Fa+ Ms3 (REMAP) و آغازگر 857 (ISSR) بود. تعداد متوسط باندهای پلی‌مورف برای هر آغازگر ۹/۶ باند بود. بیشترین مقدار ضریب تنوع شانون و هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به آغازگر *Gret1Fa* از سری آغازگرهای IRAP بود که مبین این است که احتمالا نشانگر IRAP نسبت به دو نشانگر دیگر تنوع بین ارقام مورد مطالعه را بهتر نشان می‌دهد. تجزیه کلاستر نیز با استفاده از الگوریتم UPGMA و ماتریس تشابه جاکارد انجام شد. نتایج این پژوهش، مبین وجود تنوع مولکولی و مورفولوژیکی در بین ارقام انگور بوده و بیانگر کارآمدی نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP و همچنین نشانگر ISSR در تعیین تنوع ژنتیکی ارقام انگور مورد مطالعه می‌باشد.



واژه‌های کلیدی: انگور، REMAP، IRAP، تنوع ژنتیکی و صفات مورفولوژیک.

# لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

۱- بررسی روابط ژنتیکی ارقام مختلف انگور با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی REMAP.

همایش انگور و کشمش- دانشگاه ملایر- مهرماه ۱۳۹۲.

محمدقاسم کشاورزخوب*، شاهرخ قرنجیک، اسد معصومی اصل، بابک عبدالهی مندولکانی و مهدیه پارسائیان

۲- تنوع ژنتیکی رقم ها مختلف انگور با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و ISSR.

همایش انگور و کشمش- دانشگاه ملایر- مهرماه ۱۳۹۲.

محمدقاسم کشاورزخوب*، شاهرخ قرنجیک، اسد معصومی اصل، بابک عبدالهی مندولکانی و مهدیه پارسائیان

# فهرست مطالب


۱-۱- انگور ..... ۱

۱-۱-۱- گیاه‌شناسی انگور ..... ۲

۱-۱-۲- تاریخچه اصلاح انگور ..... ۵

۱-۲- تنوع ژنتیکی و بررسی آن ..... ۶

۱-۳- نشانگرها و انواع آن ..... ۶

۱-۳-۱-انواع نشانگرهای ژنتیکی ..... ۷

۱-۳-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیک ..... ۸

۱-۳-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی ..... ۸

۱-۳-۱-۳-نشانگرهای مولکولی در سطح DNA و RNA ..... ۱۰

۱-۳- نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیرهای پلیمراز ..... ۱۲

۱-۳-۲- رتروترانسپوزون‌های LTR ..... ۱۳

۱-۳-۲-۱-گروه *Ty1-Copia* از رتروترانسپوزون‌های LTRدار ..... ۱۵

۱-۳-۲-۲- گروه *Ty3-gypsy* از رتروترانسپوزون‌های LTRدار ..... ۱۷

۱-۳-۳- چگونگی تکثیر رتروترانسپوزون‌ها ..... ۱۷

۱-۳-۴- استفاده از رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای مولکولی ..... ۲۰

۱-۳-۴-۱- نشانگر IRAP ..... ۲۱

۱-۳-۴-۲- نشانگر REMAP ..... ۲۲

۱-۳-۵- منبع ژنتیکی ایدهآل جهت نشانگرهای رتروترانسپوزونی ..... ۲۴

۱-۳-۶- توسعه و کاربرد نشانگرهای رتروترانسپوزون ..... ۲۵

۱-۴- چندشکلی در تعداد تکرارهای پشت سر هم (ISSR) ..... ۲۸

۱-۴-۱-نشانگر ISSR ..... ۲۸

۱-۵- ضرورت تحقیق ..... ۳۰

۱-۶- هدف تحقیق ..... ۳۲

۲-۱- مروری بر پژوهش‌های انجام شده در گیاه انگور با استفاده از نشانگرهای مختلف.....۳۴
۳-۱-مواد و روش‌های بخش مورفولوژیک.....۴۳
۳-۱-۱- نمونه‌برداری و صفات مورد بررسی.....۴۳
۳-۱-۲- تجزیه و تحلیل آماری.....۴۳
۳-۲- مواد و روش‌های بخش مولکولی.....۴۴
۳-۲-۱- تجهیزات آزمایشگاهی.....۴۴
۳-۲-۲- استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB.....۴۵
۳-۲-۲-۱-مراحل استخراج DNA.....۴۵
۳-۲-۳- محلول‌های مورد نیاز.....۴۷
۳-۲-۳-۱- محلول تریس اسید کلریدریک ۱ مولار (Tris-HCl 1M pH = 8):.....۴۷
۳-۲-۳-۲- محلول اتیلن دیآمین تترا استیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA, 0.5M) pH= 8):.....۴۷
۳-۲-۳-۳- محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl 5M).....۴۷
۳-۲-۳-۴- بافر Tris-HCl- EDTA (TE):.....۴۷
۳-۲-۳-۵- بافر TBE:.....۴۷
۳-۲-۴- بررسی کمیت و کیفیت DNA.....۴۸
۳-۲-۴-۱- بررسی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری.....۴۸
۳-۲-۴-۲- الکتروفورز ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز افقی.....۴۸
۳-۲-۵-۱- الگوی دمایی.....۵۰
۳-۲-۵-۲- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز.....۵۱
۳-۲-۶- تجزیه داده‌ها.....۵۱
۳-۲-۷-تجزیه‌های چند متغیره آماری.....۵۲
۳-۲-۷-۱-ضریب تشابه جاکارد.....۵۲
۳-۲-۷-۲- تجزیه خوشه‌ای.....۵۲
۳-۲-۷-۳- UPGMA.....۵۳
۳-۲-۷-۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی.....۵۳
۳-۲-۷-۵- شاخص شانون.....۵۳
۳-۲-۷-۶- هتروزیگوستی.....۵۴
۴-۱- تجزیه خوشه ای ارقام مختلف انگور براساس داده‌های مورفولوژیکی.....۵۶

۴-۲- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های مورفولوژیک ..... ۵۸
۴-۳- تجزیه داده‌های مولکولی ..... ۶۱
۴ -۳-۱-نتایج آنالیز خوشه‌ای ..... ۶۲
۴-۳-۱-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP ..... ۶۳
۴-۳-۱-۲- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر REMAP ..... ۶۸
۴-۳-۱-۳-نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR ..... ۷۲
۴-۴- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ..... ۷۷
۴-۵- نتیجه گیری ..... ۸۰
۴-۶- پیشنهادات ..... ۸۲
منابع ..... ۸۸

# فهرست جدول‌ها

جدول - ۱-۱: گونه‌های آمریکایی معرفی شده توسط گالت (۱۹۹۸) و ویژگی‌های آنها..... ۴
جدول ۳- ۱: مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج..... ۴۶
جدول ۳- ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده..... ۵۰
جدول ۴- ۱: مقادیر مؤلفه‌های اصلی..... ۵۹
جدول ۴- ۲: ضرایب عاملی صفات مختلف در پنج مؤلفه اصلی برآورد شده..... ۶۰
جدول ۴- ۳: لیست آغازگرهایی چندشکل و تکرار پذیر به همراه دمای بهینه اتصال..... ۶۲
جدول ۴- ۵: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای IRAP..... ۶۵
جدول ۴- ۶: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای REMAP..... ۶۹
جدول ۴- ۴: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای ISSR..... ۷۴
جدول ۴- ۷: مقادیر مؤلفه‌های اصلی برای بخش مولکولی..... ۷۷

# فهرست شکل‌ها


شکل-۱- ۱: شمای کلی از یک رتروترانسپوزون..... ۱۶

شکل-۱- ۲: مراحل مختلف همانندسازی در رتروترانسپوزون‌ها..... ۱۸

شکل-۱- ۳: روش‌های مختلف نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها..... ۲۱

شکل-۱- ۴: شمایی از روش IRAP..... ۲۲

شکل-۱- ۵: شمایی از نشانگر REMAP..... ۲۳

شکل-۱- ۶: شمایی از روش ISSR..... ۲۹

شکل ۳- ۱: DNAهای استخراج شده از ۲۵ رقم انگور مورد مطالعه..... ۴۶

شکل-۴- ۱: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم‌های مختلف انگور به روش ward..... ۵۷

شکل-۴- ۴: الگوی باندی حاصل از آغازگر Tvv1Fa از سری آغازگرهای IRAP..... ۶۷

شکل-۴- ۵: دندروگرام حاصل از داده‌های IRAP ..... ۶۷

شکل-۴- ۶: الگوی باند ی حاصل از آغازگر Gret1Fa+Ms8..... ۷۱

شکل-۴- ۷: دندروگرام حاصل از داده‌های REMAP..... ۷۱

شکل-۴- ۲: الگوی باندی حاصل از آغازگر ۸۲۵ از سری آغازگرهای ISSR..... ۷۵

شکل-۴- ۳: دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR..... ۷۶

شکل-۴- ۸: پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای نشانگر REMAP..... ۷۸

شکل-۴- ۹: نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی..... ۷۹

# فهرست ضمائم

جدول ضمیمه ۱: ارقام انگور مورد مطالعه ..... ۸۴

جدول ضمیمه ۲: لیست صفات مورد بررسی ..... ۸۵

# فصل اول

# مقدمه و هدف

## ۱-۱- انگور

انگور (*V. vinifera* L.) یکی از گیاهان ریزمیوه مهم است که طبق روایات، حضرت نوح (ع) اولین کسی بود که به پرورش آن اقدام نمود. در منطقه زندگی انسان‌های اولیه، یعنی ناحیه‌ای بین دریای خزر تا دریای سیاه، هنوز هم انگورهای وحشی (*V. sylvestris*) یافت می‌شود. به همین دلیل گیاه‌شناسان، این منطقه را موطن اصلی انگور دنیای قدیم یعنی *V. vinifera* می‌دانند. این گیاه سپس از طریق خاور نزدیک به مدیترانه و اروپا منتقل شد و در اواخر قرن ۱۸ میلادی، شراب حاصل از آن به کالیفرنیا وارد شد .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 (زوهاری و هوف[1]، ۱۹۹۳). بر اساس مطالعات دیگر، پیشنهاد شده است که اهلی شدن انگور ابتدا در نیمه دوم هزاره چهارم قبل از میلاد مسیح در دو ناحیه هم جوار، مزوپوتامیا[2] (شامل جنوب آناتولی، سوریه، شمال لبنان، کردستان عراق و غرب ایران) و جنوب دریای خزر اتفاق افتاده است (لابرا[3] و همکاران، ۲۰۰۲).

اطلاعات باستان شناسی شامل پیدا شدن بذور انگورهای زراعی مربوط به هزاره چهارم قبل از میلاد در خاورمیانه و همچنین شواهدی مربوط به تولید شراب در ایران در هزاره ششم قبل از میلاد نیز این نظر را تأیید می‌کنند (مک گاورن[4]، ۲۰۰۳). کلیه ارقام قدیمی انگور (*V. vinifera* spp. *sativa*) از اجداد وحشی (*V. vinifera* spp. *sylvestris*) خود اهلی شدند (لوادوکس[5]، ۱۹۵۶). انگورهای وحشی گیاهان دوجنسی و

1- Zohary and Hopf
2- Mezopotamia
3- Labra
4- McGovern
5- Levadoux

دو پایه می‌باشند، و محیط‌های مرطوب را ترجیح می‌دهند، در حالی که انگورهای زراعی یا اهلی شده هرمافرودیت هستند و اغلب به محیط‌های نسبتا خشک عادت دارند (گراسی[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

گیاه‌شناسان، گونه vinifera را به دو زیرگونه sylvestris و caucasia تقسیم می‌کنند که اولی در جنوب و مرکز اروپا، جنوب غربی آفریقا، غرب ترکیه و فلسطین و دومی در جنوب روسیه، ارمنستان، قفقاز، آناتولی، ایران، ترکمنستان و کشمیر دیده می‌شود (گالت[2]، ۱۹۹۸).

### ۱-۱-۱- گیاه‌شناسی انگور

انگور گیاهی از خانواده Vitacea و از جنس Vitis است. شواهد نشان می‌دهد که انگورهای وحشی قبل از انسان وجود داشتند. تعداد گونه‌های انگور زیاد هستند که تعدادی از این گونه‌ها شامل: *V. aestivalis*، *V. rotundifolia*، *V. labrusca* و *V. vinifera* می‌باشند.

گونه‌ی *V. rotundifolia* خاص جنوب شرق ایالات متحده است. انگورهای معروف این گونه magnolia و scuppernong هستند. انگورهای این گونه پوست ضخیم و میزان عملکرد پایینی دارند.

گونه‌ی *V. aestivalis* یک گونه‌ی آمریکایی است که عموما به انگور نورتون و لنیور معروف است. میزان قند در آنها بالا ولی مقدار اسید پایین است. از انگورهای این گونه برای تولید شراب استفاده می‌شود. آنها دارای پوست ضخیم و دانه‌های زیادی هستند.

گونه‌ی *V. labrusca* که به انگور روباه معروف هستند و میزان قند و pH پایینی دارند و برای خوردن مناسب هستند. این گونه‌های امریکایی معمولا استفادهی خوراکی دارند و همچنین برای تولید شراب شیرین نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گونه شامل واریته‌های concord و niagara می‌باشد.

---

1- Grassi

2- Galet

گونه‌ی *V. vinifera* بیشتر در اروپا و قسمت‌هایی از آسیا و همچنین کالیفرنیا پیدا می‌شود. این گونه شامل واریته‌های sangiovese، sauvignon blanc، syrah، riesling، chasselas، flame seedless و muscat blanc می‌باشد. این واریته‌ها مقدار قند بالایی دارند و اندازه حبه در آنها متفاوت است. این نوع انگورها برای درست کردن کشمش و حمل و نقل مناسب هستند.

تمامی واریته‌های vitis خزان کننده و چوبی با ارتفاع ۱۲ تا ۲۰ متر هستند، شاخه‌های مسن به صورت پوسته پوسته ولی شاخه‌های جوان‌تر صاف هستند. برگ‌ها به صورت متناوب و بسته به گونه‌های مختلف شکل‌ها و اندازه‌های متفاوتی دارند. برخی دارای پهنک گرد و بدون لوب هستند این در حالی است که برخی قلبی شکل و لوب دارند. اندازه پهنک در گونه‌های مختلف متفاوت، لبه‌ی برگ‌ها زبر و دندانه‌دار و گل‌های کوچک و زرد متمایل به سبز دارند. گل‌ها معمولا در خوشه‌ها رشد می‌کنند و دارای ۵ کاسبرگ، کلبرگ و پرچم هستند و تخمدان دارای دو تخمک است. گل‌های کامل در انگور پرچم‌های بلند و مادگی کوتاهی دارند. بیشتر انگورها به خاطر داشتن گل کامل دارای خود گرده افشانی هستند. گرده افشانی توسط باد و حشرات انجام می‌شود. حبه‌ها در این گونه کوچک، گرد، آب‌دار و چهار تا دانه دارند و دارای رنگ‌های متفاوت قرمز، آبی، ارغوانی و سیاه هستند. پوست این انگورها معمولا نرم و صاف و به خوبی توسط یک لایه-ی مومی پوشیده شده است.

گونه *V.amurinsis* از شناخته شده‌ترین گونه‌های آسیایی می‌باشد که در شوروی سابق به عنوان منبع مقاومت به سرما و یخبندان با *V. vinifera* تلاقی داده شده است. گروه اروپا و خاورمیانه‌ای آن تنها شامل گونه‌ی *V. vinifera* می‌باشد، اما در گروه آسیایی ۱۰ تا ۱۵ گونه‌ی محلی وجود دارد (لوادکس و همکاران، ۱۹۶۲).

جدول - ۱-۱: گونه‌های آمریکایی معرفی شده توسط گالت (۱۹۹۸) و ویژگی‌های آنها

| ردیف | نام گونه | ویژگی |
|---|---|---|
| ۱ | *V. rupestris* | مقاوم به شته فیلوکسرا[1]، حساس به آهک و ریشه‌دهی سریع قلمه‌های |
| ۲ | *V. cordifolia* | بسیار مقاوم به سرما، مقاوم به فیلوکسرا، ولی حساس به آهک |
| ۳ | *V. riparia* | بسیار مقاوم به فیلوکسرا، مقاوم به بیماری‌های قارچی و سرمای زمستانه، ریشه‌دهی راحت قلمه‌ها و اما تحمل پایین نسبت به خاک‌های آهکی |
| ۴ | *V. monticola* | بسیار مقاوم به خاک‌های آهکی ولی ریشه‌دهی سخت قلمه‌های آن |
| ۵ | *V. aestivalis* | مقاوم به بیماری‌های قارچی، حساس به فیلوکسرا و دارای خواص مطلوب میوه |
| ۶ | *V. lineceumii* | مقاومت نسبی به فیلوکسرا و مقاوم به سفیدک |
| ۷ | *V. argentifolia* | خواصی شبیه به گونه *aestivalis* |
| ۸ | *V. candicans* | مقاوم به فیلوکسرا، مقاوم به گرما و خشکی، حساس به آهک و ریشه‌دهی قلمه‌ها کم |
| ۹ | *V. cinerea* | مقاوم به فیلوکسرا و بیماری‌های قارچی، حساس به آهک و ریشه‌دهی قلمه‌های ضعیف |
| ۱۰ | *V. berlandirei* | بسیار مقاوم به فیلوکسرا، بسیار مقاوم به خاک‌های آهکی و ریشه‌دهی قلمه‌های ضعیف |
| ۱۱ | *V. labrusca* | مقاوم به سرما و دارای حبه‌های درشت و گوشتالو با طعم و مزه خوب |

1- *Phylloxera vitifolia*

### ۱-۱-۲- تاریخچه اصلاح انگور

اولین تلاقی بین ارقام ریسلینگ[۱] و سیهانر[۲] انجام گردید و فرانسه و انگلستان در انتخاب ارقام مناسب انگور برای تازه خوری پیشتاز بودند (مولر[۳] و تورگائو[۴]، ۱۸۹۱).

در آمریکا نیز از اوایل قرن هفدهم تلاش‌هایی صورت گرفت اما به علت عدم مقاومت ارقام به بیماری-ها، آفات و سرمای زمستان، موفقیت چندانی حاصل نشد. در خلال سال‌های ۱۸۰۰ تا ۱۸۵۰ ارقامی چون کاتاوبا[۵]، کونکورد[۶] و ایزابلا[۷] معرفی شدند. بسیاری از آنها یا به وسیله به‌نژادگران آماتور به وجود آمدند و یا به صورت تصادفی از ارقام وحشی گزینش شدند.

از اولین به‌نژادگران انگور در آمریکا راجرز[۸] (۱۸۹۹-۱۸۲۶) می‌باشد. وی گونه *labrusca* را که دارای حبه‌های درشت و قرمز می‌باشد را با دو رقم *vinifera* آمیزش داد که نتاج آن به دورگ‌های راجرز معروف می‌باشند. بعد از وی مانسون[۹] (۱۹۱۳) کارهای ارزشمندی در مورد خواص گیاه‌شناسی و دورگ‌گیری انگور انجام داد. در اروپا، دورگ‌گیری بین گونه‌ها از موقعی که خسارت شته فیلوکسرا (*Phylloxera vitifolia*) در فرانسه مشاهده شد، آغاز گردید. فیلوکسرا قبل از دهه ۱۸۶۰ و احتمالا توسط قلمه‌های مقاوم به سفیدک سطحی مو (*Uncinula necator*) به فرانسه وارد شده است. همچنین در اروپا به منظور جمع کردن صفات مطلوب گونه‌های مختلف، دورگ‌گیری‌های زیادی بین ارقام مختلف آمریکایی و *vinifera* انجام گردید. دورگ‌های فرانسوی ترکیبی از مقاومت گونه‌های آمریکایی و کیفیت مطلوب میوه گونه *vinifera* می‌باشند (قنادها و همکاران، ۱۳۸۲).

---

1- Reisling
2- Syhanr
3- Muller
4- Thurgau
5- Catawba
6- Concord
7- Isabella
8- Rogres
9- Munson

پس از این تلاقی‌ها و همچنین ایجاد جهش‌های طبیعی در ژنوم ارقام مختلف انگور تنوع ژنتیکی به وجود آمده آمده است.

## ۱-۲- تنوع ژنتیکی و بررسی آن

تنوع ژنتیکی، مرحله‌ای از تنوع زیستی است که به همه ویژگی‌های ژنتیکی در ساختار ژنتیکی یک گونه اشاره دارد. تنوع ژنتیکی روشی برای آن است که جمعیت یک گونه به دگرگونی‌های محیط طبیعی وفق پیدا کند. هرچه میزان این تنوع بیشتر باشد، احتمال بیشتری وجود دارد که بعضی از اعضای جمعیت یک گونه تعداد از الل‌ها را که باعث دوام در محیط می‌شود را به دست بیاورند. روش‌های گوناگونی برای سنجش میزان تنوع ژنتیکی وجود دارند.

ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی معمولاً بر اساس نشانگرهای فنوتیپی، بیوشیمیایی (پروتئین و آیزوزایم ها)، سیتوژنتیکی (انواع نواربندی کروموزومی و سیتوژنتیک مولکولی) و مولکولی (نشانگرهای DNA[1] مبتنی بر PCR[2] و غیر مبتنی بر PCR) انجام می‌گیرد. هر یک از این دسته نشانگرها دارای نقاط قوت و ضعفی هستند که می‌بایست در موقع مناسب از آنها استفاده شود. در خیلی از موارد میزان تنوع ارزیابی شده با استفاده از نشانگرهای یاد شده نتایج یکسانی داده است که این امر موجب صرفه‌جویی و افزایش دقت و صحت کار شده است ( فرشادفر، ۱۳۷۴).

## ۱-۳- نشانگرها و انواع آن

هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم‌های آنهاست که به نتاج نیز منتقل می‌شود. حتی صفاتی که تحت تأثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می‌کنند، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانه یا نشانگر

1- Deoxyribonucleic Acid (DNA)
2- Polymerase chain reaction

ژنتیک به کار گرفته شوند. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسان‌های نخستین، حتی آنهایی که هنوز کشاورزی را فرانگرفته بودند و برای ادامه زندگی مجبور به جمع‌آوری بذر و میوه گیاهان بودند، بدون آنکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناختن و تمایز انواع بذر، میوه و جانوران وحشی استفاده کرده و برخی را بر برخی دیگر ترجیح می‌دادند. اما بصورت علمی، شاید مندل نخستین کسی بود که از نشانگرهای مورفولوژیک یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ[1] برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

### ۱-۳-۱-انواع نشانگرهای ژنتیکی

با وجود اینکه بهره‌مندی از علم ژنتیک و اصلاح نباتات، بیشترین نقش را در افزایش محصول و تولید فرآورده‌های غذایی به عهده داشته ولی به دلیل رشد روزافزون جمعیت، برای چیرگی بر شرایط نامساعد محیطی (اعم از عوامل زیستی و غیرزیستی) و افزایش کیفیت محصول تلاش بیشتری لازم است. پیشرفت علوم و فناوری موجب بهره‌مندی متخصصان اصلاح‌نباتات از ماشین‌های پیشرفته‌ی کشاورزی، ابزار دقیق آزمایشگاهی، روش‌های برتر جمع‌آوری اطلاعات و تجزیه و تحلیل رایانه‌ای آنها شده است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های تحسین‌برانگیزی که در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش‌های ژنتیک تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای DNA باشند که همان تفاوت‌های قابل ثبت ردیف‌های بازی DNA موجود بین دو یا چند نمونه‌اند. امروزه اطلاعات به‌دست آمده از نشانگرهای DNA کاربردهای زیادی دارند، که عمده‌ترین آنها در پزشکی قانونی، تشخیص بیماری‌های گیاهی و انسانی، قرنطینه گیاهی، پژوهش-های ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح‌نباتات است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

1- Phenotype bassed markers

### ۱-۳-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

برخی از تفاوت‌های موجود در توالی DNA در صفات ظاهری و قابل رؤیت تجلی پیدا می‌کنند که نشانگر مورفولوژیک نامیده می‌شوند. قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین مارکرهای مولکولی، در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه خاص، غالباً صفات مورفولوژیک نقش عمده را ایفا می‌نمودند. اخیراً علم زیست‌فناوری کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی در اصلاح گیاهان نموده است. نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژی هر دو می‌توانند تکمیل کننده یکدیگر باشند و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند. گزارشات مختلف مبنی بر ارتباط توام صفات مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از روش‌های آماری بیان شده است (مارتینز[1] و همکاران، ۲۰۰۳؛ مچارو[2] و همکاران، ۲۰۰۴؛ موری[3] و همکاران، ۱۹۸۰).

این نشانگرها دارای معایبی از جمله موارد زیر هستند:

- اغلب دارای توارث غالب و مغلوب بوده وآثار اپیستازی و پلیوتروپی دارند.
- تحت تاثیر شرایط محیطی و مرحله رشد موجود قرار می‌گیرند.
- فراوانی و تنوع کمی دارند.
- گاهی برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر ظهور آنها ماند. این کار در مورد گیاهان چند ساله بسیار مشکل است.
- اساس ژنتیک بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیک هنوز مشخص نشده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

### ۱-۳-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی

نشانگرهای پروتئینی محصول نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع بازتابی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم هستند. آلل‌های گوناگون ژن‌ها ممکن است پروتئین‌هایی با ترکیبات اسیدآمینه‌ای

1- Martinez
2- Mcharo
3- Murry

مختلف تولید کنند که به راحتی از طریق الکتروفورز روی ژل از یکدیگر جدا شده و شناسایی می‌شوند و بنابراین می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی از آنها استفاده کرد. از آن جایی که محصولات از روی قسمتی از توالی DNA ساخته می‌شوند، لذا در برگیرنده همه تغییرات در تنوع ژنتیکی در سطح DNA نیستند و نمی-توانند نماینده کل ژنوم باشند (گروسی و وجدانی، ۱۳۷۱).

معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی، آیزوزایم‌ها هستند که فرم‌های مختلف یک آنزیم را نشان می‌دهند. نشانگرهای پروتئین، تفاوت‌ها را در سطح ردیف و عمل ژن و به صورت نشانگرهای هم‌بارز نشان می‌دهند. از معایب این نشانگرها محدود بودن آنهاست. همچنین این نشانگرها تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه بوده و تظاهر کمی برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تحت تاثیر مرحله رشد گیاه قرار می‌گیرد. از آنجا که فراوانی این نوع از نشانگرها محدود است، از این‌رو نقشه‌های تهیه شده از این نشانگرها طوری بود که فقط چند نشانگر در یک کروموزوم قرار می‌گرفتند. بنابراین نشانگرهای پروتئینی نیز معایب ویژه خود را دارند. با توجه به - اینکه روش‌های رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در مورد آیزوزایم‌ها چندان زیاد نیست، آیزوزایم‌های قابل ثبت و مشاهده که می‌توان از آنها به عنوان نشانگر استفاده کرد، به یک‌صد عدد هم نمی‌رسد. محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم، از عمده‌ترین معایب آنها بوده و موجب کاهش کارایی آنها می‌شود. از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آیزوزایم‌هاست. به عبارت دیگر، آیزوزایم‌ها نه تنها کم هستند، بلکه چندشکلی و تفاوت قابل ثبت در آنها چندان زیاد نیست. پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزی آیزوزایم‌ها نیز که گاهی مشاهده شده است، از دیگر معایب این قبیل نشانگرهاست. این پیچیدگی که به دلیل دخیل بودن آنزیم‌های مرکب از چند پلی‌پپتید مستقل، در ترکیب برخی از آیزوزایم‌هاست، امتیاز بندی را دشوار می‌کند (دشتی، ۱۳۷۹).

### ۱-۳-۱-۳-نشانگرهای مولکولی در سطح DNA و RNA

کشف انواع آنزیم‌های محدودالاثر[1] توسط اسمیت و ویلکاکس[2] (۱۹۷۰)، همچنین کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط مولیس و فالونا[3] (۱۹۸۷) فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات مختلف در سطح DNA امکان‌پذیر کرده است. توسعه نشانگرهای مولکولی DNA عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده است، به‌طوری که به کمک این نشانگرها ایجاد نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده و همچنین شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کیفی و کمی امکان‌پذیر شده است. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای DNA معرفی شده و در تجزیه‌های ژنتیک موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند درجه چندشکلی، غالب یا هم‌بارز بودن، تعدادجایگاه‌های تجزیه‌شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی DNA الگو و هزینه مورد نیاز با همدیگر متفاوت‌اند. انتخاب بهترین نشانگر، به هدف مطالعه (انگشت‌نگاری[4]، تهیه‌ی نقشه پیوستگی[5]، ژنتیک جمعیت و رابطه تکاملی) و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

در اوایل دهه ۱۹۸۰ بوتستین و همکارانش استفاده از تفاوت طول قطعه‌های حاصل از هضم یا RFLP[6] را برای مطالعه مستقیم DNA و یافتن نشانگرهای ژنتیک جدید پیشنهاد و معرفی کردند. این تحول از پیامدهای منطقی کشف آنزیم‌های محدودالاثر بود. این آنزیم‌ها، آنزیم‌های بسیار اختصاصی هستند که ردیف‌های ویژه‌ای را روی مولکول DNA شناسایی کرده و آنها را از محل خاصی برش می‌دهند. نشانگرهای DNA در مدت یک دهه تکامل شگرف و تحسین برانگیزی داشتند. علاوه بر RFLP که هنوز هم از قدرتمندترین و معتبرترین نشانگرهای DNA است، انواع مختلف نشانگرهای DNA با تفاوت‌های زیادی از نظر تکنیکی و روش تولید، نحوه‌ی کاربرد، امتیازبندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و

1- Restriction enzymes
2- Smith and Wilkocx
3- Mullis and Faloona
4- Fingerprinting
5- Linkage map
6- Restriction fragment length polymorphism

معرفی شدند. بدون تردید، ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. PCR یک روش سریع تکثیر آزمایشگاهی قطعه یا قطعه‌های مورد نظر DNA است (قریاضی، ۱۳۷۵؛ فویست[1] و همکاران، ۱۹۹۰). شناسایی واحدهای تاکسونومیک در سطح گونه و تعیین ویژگی‌های منحصر به فرد آن، اطلاعات با ارزشی را برای حفاظت ژرم پلاسم، سیستماتیک، اکولوژی و تکامل گونه به ما می‌دهد (کیمار[2]، ۱۹۹۹؛ رگستاد[3]، ۱۹۹۶ و اوتا[4]، ۱۹۹۲ ).

به دلیل اهمیت و نقش موثر PCR در تحول و تکامل روزافزون فناوری نشانگرهای DNA، محققین نشانگرهای DNA را به دو دسته کلی نشانگرهای DNA مبتنی بر کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر کاربرد این روش طبقه بندی کنند. نشانگرهای DNA گروه بزرگی از نشانگرها را تشکیل می‌دهند. این نشانگرها سیر تحول و تکامل خود را به پایان نرسانده‌اند و ابداع و معرفی روش‌های متنوع و جدیدتر ثبت و مشاهده‌ی تفاوت‌های ژنتیک بین موجودات از طریق مطالعه‌ی مستقیم تفاوت‌های موجود بین ردیف DNA آنها همچنان ادامه دارد.

الف) نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

این دسته از نشانگرهای DNA بدون استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرگروه این دسته از نشانگرها همان تفاوت طول قطعه‌های حاصل از DNA توسط آنزیم‌های محدودالاثر است که RFLP نامیده می‌شود. از بین نشانگرهای DNA، چندشکلی‌های ناشی از تفاوت در طول قطعه‌ها، اولین نشانگرهایی بودند که برای نقشه‌یابی ژنوم انسان توسط بوتستین و همکاران (۱۹۸۰) و پس از آن برای نقشه‌یابی ژنوم گیاهان توسط بر[5] و همکاران (۱۹۸۳) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. البته روش RFLP اولین بار توسط گرودزیکر[6] و همکاران (۱۹۷۴) به منظور بررسی نژادهای جهش یافته آدنوویروس

1- Foisset
2- Kimar
3- Rogstad
4- Ohta
5- Burr
6- Grodzicker

مورد استفاده قرار گرفت، ولی در سال ۱۹۸۰ بوتستین و همکاران دریافتند که RFLP الزاما مختص ژن‌های خاص نیست، بلکه در کل ژنوم پراکنده است. از این‌رو، این پژوهشگران طرحی را ارائه دادند که در آن از نشانگرهای RFLP برای نقشه‌یابی تمامی ژن‌ها در ژنوم انسان استفاده می‌شد. در طی سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی متفاوتی برای بررسی تنوع ژنتیکی انگور در نقاط مختلف دنیا استفاده شد که گروه مهمی از آنها نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بودند.

## ۱-۳- نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

این نشانگرها شامل نشانگرهایی هستند که با بهره‌گیری از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در آنها، نیاز به کاوشگر و در نتیجه دورگ‌گیری حذف می‌شود. این گروه از نشانگرها، از توالی الیگونوکلئوتیدی به عنوان آغازگر برای تکثیر قطعه‌ی خاصی از DNA استفاده می‌کنند. روش‌های مختلف در این گروه، در طول و توالی آغازگرها، سختی شرایط PCR و روش‌های جداسازی و آشکار کردن قطعات با همدیگر فرق دارند. نشانگرهای زیادی در این گروه قرار می‌گیرند که در این پایان نامه، از دو گروه رتروترانسپوزون[1]ها و چندشکلی در تعداد تکرارهای پشت سر هم (ISSR[2]) استفاده می‌کنیم و به همین خاطر در ادامه فقط به توضیح این دو گروه می‌پردازیم.

### ۱-۳-۱- استفاده از ترانسپوزون[3]ها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی

عناصر متحرک در واقع قطعاتی از ژنوم موجود زنده می‌باشند که قادرند در ژنوم میزبان خود جا به جا شوند. این قطعات ابتدا توسط خانم باربارامک کلینتوک[4] در دهه ۱۹۶۰، در ذرت کشف شدند و ایشان به واسطه این کشف خود در سال ۱۹۸۲ موفق به دریافت جایزه نوبل گردید (کومار و همکاران، ۱۹۹۹؛ لودیش و همکاران، ۲۰۰۳).

1- Retrotransposon
2- Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)
3- Transposons
4- Barbara McClintock

ترانسپوزون‌ها یا عناصر جابه‌جا شونده (توالی‌هایی از DNA که می‌توانند به مکان‌های دیگر ژنوم منتقل شوند) در گونه‌های گیاهی، برای اولین بار در دهه‌ی ۱۹۴۰ میلادی مشاهده شدند (سان‌میگوئیل[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

این گروه از توالی‌ها، بسته به سازوکاری که از آن برای تکثیر و انتقال خود استفاده می‌کنند، و نیز ساختار ژنتیکی آنها، در دو خانواده بزرگ جای می‌گیرند که هر دو نوع آن نیز در گونه‌های گیاهی مشاهده شده است. گروهی که هنگام جابجایی در مکان اولیه باقی نمی‌مانند (DNA به صورت مستقیم جابه‌جا می شود) را، ترانسپوزون یا عناصر متحرک گویند که کمتر از ۶۰۰ bp طول دارند و تعداد کپی‌های آنها بسیار زیاد است، قابل ذکر است که عناصری که خانم کلینتوک کشف نمودند، از گروه ترانسپوزون‌ها بودند. گروه دیگر که نسخه‌هایی از خود را تکثیر و نسخه‌ای از خود را منتقل می‌کنند، را رتروترانسپوزون گویند، که خود به ۹ گروه تقسیم می‌شوند و از مهم‌ترین آنها گروه LTR[2] (تکرار انتهایی بلند) می‌باشد. علت این نام‌گذاری، داشتن یک توالی طولانی تقریبا مشابه در دو انتهای این نوع رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد.

### ۱-۳-۲- رتروترانسپوزون‌های LTR

رتروترانسپوزون که تیپ I عناصر قابل جابجایی نیز نامیده می‌شوند، در کل ژنوم گیاهی به وفور یافت می‌شوند. به نظر می‌رسد در گیاهان، رتروترانسپوزون‌های LTR فراوان‌ترین و فعال‌ترین ترانسپوزون باشند (لی[3] و همکاران، ۲۰۰۴). برخلاف ترانسپوزون‌های DNA یا عناصر قابل جابجایی تیپ II، که در آنها خود توالی DNA از یک جای ژنوم خارج و به جای دیگر وارد می‌شود، رتروترانسپوزون به عنوان یک ژن رونویسی می شوند. در واقع رتروترانسپوزون عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که انتقال آنها به واسطه mRNA[4] صورت می‌گیرد. این عناصر توسط آنزیم رونویسی کننده معکوس به DNA تبدیل شده و به نقاطی از ژنوم الحاق می یابند (لی و همکاران، ۲۰۰۴). رتروترانسپوزون به میزان زیاد در ژنوم گیاهان وجود دارند

1- SanMiguel
2- Long-terminal repeat
3- Li
4- messenger RNA

که گاهی میزان آنها به بیش از ۷۵ درصد ژنوم هم می‌رسد (سان‌میگوئیل و همکاران، ۱۹۹۸). این میزان از DNA در طول تکامل گیاهان حاصل شده است. رتروترانسپوزون‌های گیاهی هم از نظر ساختاری و هم از لحاظ کارکردی شبیه رتروترانسپوزون‌ها رتروویروس‌های می‌باشند. این عناصر ژنتیکی متحرک به دلیل فراوانی زیاد و حضور در همه جای ژنوم، نقش مهمی را در تکامل گیاهان بازی می‌کنند. با توجه به نکات ذکر شده در بالا، پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان یک نشانگر دارند. این نشانگرها مبتنی بر آغازگرهایی هستند که بر اساس دو انتهای حفاظت شده رتروترانسپوزون‌ها طراحی شده‌اند. علت نام‌گذاری LTR هم به این علت است که آنها توالی‌های تکراری مستقیمی از چند صد نوکلئوتید می‌باشند که در دو انتهای عناصر قرار گرفته‌اند. توالی LTR به صورت پروموتور جهت رونویسی عمل می‌کنند همچنین این توالی، سیگنال خاتمه رونویسی را نیز دارا می‌باشد. داخل LTR هم جایگاه‌هایی برای شروع نسخه‌برداری معکوس وجود دارد. قسمت مرکزی و بزرگ رتروترانسپوزون‌ها، پروتئین‌هایی که برای رونویسی معکوس ضروری می‌باشند را کد می‌کند. برخلاف ترانسپوزون‌ها، که مشکل فرار از ژنوم جهت آلوده کردن افراد جدید در آنها وجود دارد، رتروترانسپوزون‌ها فقط نسخه‌های جدیدی را داخل ژنوم میزبان خود وارد می‌کنند. اگر این الحاق رتروترانسپوزون‌ها در سلول‌های زاینده گرده و تخمک صورت گیرد، نسخه‌های جدید جهت تشخیص لاین-های اصلاحی، واریته‌ها یا جمعیت‌های گیاهان از سایر جمعیت‌ها، مفید خواهند بود. اگر چه بیشتر رتروترانسپوزون‌های متداول داخل ژنوم به صورت پراکنده واقع شده‌اند ولی در غلات و مرکبات اغلب نزدیک هم (در یک دومین) قرار گرفته‌اند، که اینها را به امواج یا دریاهای رتروترانسپوزونی[1] تشبیه کرده‌اند که این دریاها جزیره‌های ژنی را احاطه کرده‌اند (لندر[2] و همکاران، ۲۰۰۱).

رتروترانسپوزون‌های LTR نیز به نوبه‌ی خود از نظر شباهت توالی ژنتیکی به دو دسته *Ty1-Copia* و *Ty3-gypsy* تقسیم می‌شوند، این دو گروه هم در میزان شباهت توالی‌هایشان و هم در نوع ژن‌هایی که کد می‌کنند با همدیگر متفاوت هستند. *Ty1-Copia* در کل سلسله گیاهی از یک جلبک تک سلولی گرفته تا در بریوفیت‌ها، نهاندانگان و بازدانگان و *Ty3-gypsy* نیز به طور گسترده هم در نهاندانگان و هم در بازدانگان

1- Retrotransposon seas
2- Lander

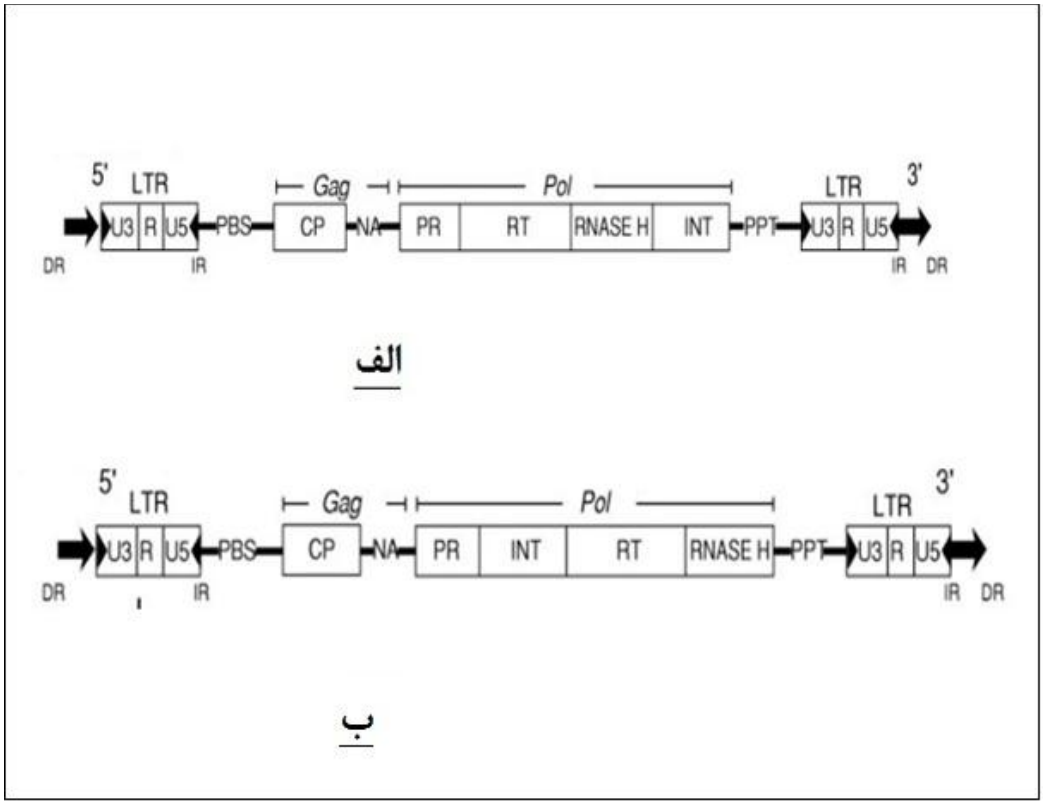
وجود دارند (کومار و بنتزن[1]، ۱۹۹۹؛ لودیش[2] و همکاران، ۲۰۰۳؛ اریکا[3] و همکاران، ۲۰۰۴). که از بین این-ها، رتروترانسپوزون‌های *Ty1-Copia* در گونه‌های گیاهی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته و توالی برخی هم به صورت کامل تعیین شده است (دامبروسکی[4] و همکاران، ۱۹۹۴).

### ۱-۳-۲-۱-گروه *Ty1-Copia* از رتروترانسپوزون‌های LTRدار

رتروترانسپوزون‌های LTRدار دارای یک توالی تکراری بلند انتهایی می‌باشند که این توالی بین ۱۰۰bp تا ۱kbp طول دارد. این توالی‌ها هیچ نوع پروتئینی را کد نمی‌کنند، بلکه دارای توالی‌های شروع و خاتمه جهت نسخه‌برداری رتروترانسپوزون‌ها می‌باشند. LTRها به یک توالی معکوس کوتاه ختم می‌شوند که معمولا به صورت ′3-5′-TG و ′3-5′-CA می‌باشد. گروه *Ty1-Copia* چند نوع پروتئین را کد می‌کنندکه ژن‌های کد کننده پروتئین را می‌توان به سه گروه اصلی *Gag*، *Pol* و *Int* تقسیم نمود (شکل ۱-۱-الف). این ژن‌ها و پروتئین‌های آنها همگی محصول یک مولکول mRNA با ساختار ′3-R-[6]$U_3$-PPT-[5]- ناحیه کد شونده -[8]BPS-[7]$U_5$-R-5′ می‌باشد. نسخه‌برداری از انتهای 5 توالی LTR یعنی نقطه‌ی R شروع شده و در ′3 توالی LTR به پایان می‌رسد. نتایج نشان داده که ′3 LTRها همچنین دارای یک پروموتوری است که می‌تواند توالی‌های پایین دست ناحیه الحاق رتروترانسپوزون را نسخه‌برداری نماید. پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های *Gag*، *Pol* و *Int* بصورت یک پلی‌پروتئین است و سپس این پلی‌پروتئین توسط پروتئاز کد شده توسط توالی *Pol* شکسته می‌شود. ژن *Gag* پروتئنی را کد می‌کند که نه تنها در بلوغ ژن *Pol* نقش داشته، بلکه یک آنزیم رونویسی کننده معکوس جهت همانندسازی رتروترانسپوزون را نیز کد می‌کند. این آنزیم علاوه بر نقش پلیمرازی نقش ریبونوکلئازی داشته و باعث تجزیه RNA[9] در حین تولید cDNA[10] می-

1- Bennetzen
2- Lodish
3- Errika
4- Dombroski
5- Polypurine tract
6- Repeat
7- Unique
8- Primer binding site
9- Ribonucleic acid (RNA)
10- complementary DNA (cDNA)

شود. ژن *Int* پروتئینی را کد می‌کند که جهت الحاق شکل cDNA رتروترانسپوزون در ژنوم موجود موثر است. در بعضی موارد ژن‌های *Gag*، *Pol* و *Int* در یک چهارچوب خواندن ترجمه‌ای[1] کد می‌شوند، اما در موارد دیگر دو یا بیشتر از دو چهارچوب وجود دارد که باعث تغییر چهارچوب و یا آغاز مجدد ترجمه می‌شود و این منجر به اختلاف در بیان ژن‌های مختلف یک رتروترانسپوزون می‌گردد. رتروترانسپوزون‌های LTR، در هسته ابتدا به یک مولکول mRNA نسخه‌برداری می‌شوند، و سپس جهت انتقال به نقاط دیگر ژنوم به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌گردند. در واقع این مولکول mRNA هم پروتئن‌های مورد نیاز جهت همانندسازی، الحاق و انتقال رتروترانسپوزون را فراهم می‌کنند و هم یک الگو جهت ایجاد DNA به وجود می‌آورد (کومار و همکاران، ۱۹۹۹؛ لودیش و همکاران، ۲۰۰۳).




شکل-۱- ۱: شمای کلی از یک رتروترانسپوزون الف) Ty3- gypsy با نواحی کدکنندگی آن، ب) شمای کلی از یک رتروترانسپوزون*Ty1-Copia* با نواحی کدکنندگی آن: ژن *Pol* پروتئاز کد می‌کند، ژن *Gag*، پروتئینی را که باعث بلوغ *Pol* و همچنین یک آنزیم رونویسی کننده معکوس جهت همانندسازی رتروترانسپوزون را کد می‌کند و ژن Int پروتئنی که باعث الحاق cDNA در ژنوم موجود می‌شود را کد می‌کند (رشیدی‌منفرد و همکاران، ۲۰۰۸).

1- Translational Reading Frame

### ۱-۳-۲-۲- گروه *Ty3-gypsy* از رتروترانسپوزون‌های LTRدار

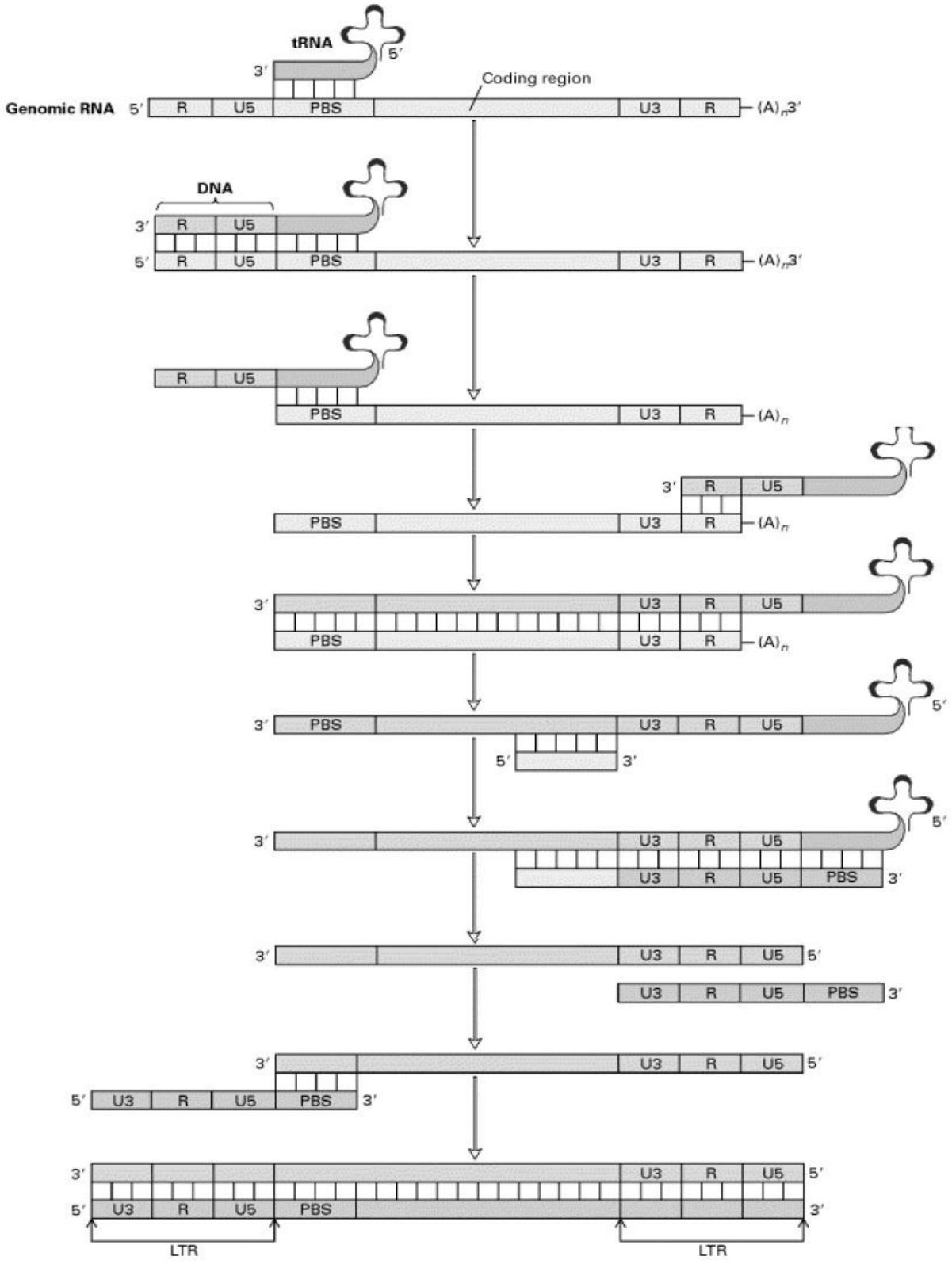
این عناصر مانند رتروترانسپوزون‌های گروه *Ty1-Copia* عمل می‌کنند و اختلاف بین این دو گروه در ترتیب ژن‌های *Pol* و *Int* می‌باشد (شکل ۱-۱-ب). مقایسه توالی آنزیم رونویسی کننده معکوس نشان داده که رتروترانسپوزون‌های *Ty1-Copia* و *Ty3-gypsy* از دودمان‌های مختلفی شکل گرفتند. بنابراین از روی بررسی این توالی‌ها می‌توان جهت تعیین نیای رتروترانسپوزون‌ها استفاده کرد. از طریق نوع توالی مشخص شد که رتروترانسپوزون‌های *Ty3-gypsy* منشا رتروویروس‌های حیوانی می‌باشند. مطالعات مختلف نشان دادند که مکانیسم انتقال درون سلولی، همانندسازی و الحاق رتروترانسپوزون‌های گروه *Ty3-gypsy* و *Ty1-Copia* و رتروویروس‌ها شبیه همدیگر می‌باشد (کومار و همکاران، ۱۹۹۹).

## ۱-۳-۳- چگونگی تکثیر رتروترانسپوزون‌ها

همانطور که در شکل۱-۲ نشان داده شد ابتدا مولکول mRNA توسط آنزیم پلیمراز II از DNA رتروترانسپوزون تولید می‌شود، که این مولکول mRNA دارای نواحی ذیل می‌باشد: ′3 -R-$U_3$-PPT- - ناحیه کد شونده - BPS-$U_5$- R -5، سپس یک مولکول tRNA[1] از سلول میزبان که قسمت انتهای ′3 آن مکمل ناحیه PBS در قسمت انتهای ′5، mRNA رتروترانسپوزون است به آنجا متصل می‌گردد.

بعد از آن آنزیم رونویسی کننده معکوس با عمل پلیمرازی خود، قسمت مکمل $U_5$ و R در انتهای ′5 رتروترانسپوزون را به OH-3 انتهای tRNA می‌افزاید. بعدا این آنزیم با فعالیت ریبونوکلئازی خود قسمت RNA مکمل را هضم می‌کند و در مرحله بعد ترکیب tRNA - ′3-$U_5$-R به ناحیه′3 رتروترانسپوزون (mRNA) منتقل می‌شود و از طریق توالی R موجود در ′3 رتروترانسپوزون به آنجا متصل می‌شود و آنزیم رونویسی کننده معکوس با استفاده از انتهای′3 ناحیه mRNA به عنوان آغازگر، ناحیه مکمل DNA تازه سنتز شده‌ی متصل به tRNA یعنی $U_5$، R و $U_3$ را سنتز می‌نماید.

1- transfer RNA (tRNA)




شکل-۱- ۲: مراحل مختلف همانندسازی در رتروترانسپوزون‌ها، توضیح کامل در قسمت ۱-۳-۱، (رشیدی‌منفرد و همکاران، ۲۰۰۸).

در واقع این عمل همراه با هضم RNA مکمل می‌باشد. یعنی اینکه همانندسازی در دو جهت ادامه پیدا می-کند. در مرحله بعد tRNA از DNA جدا می‌شود و سپس قطعه‌ی کوتاه DNA که دارای توالی‌های PBS، $U_5$، R و $U_3$ است به ناحیه DNA 3′ تازه سنتز شده از طریق توالی PBS خود که مکمل انتهای DNA 3′ است، متصل می‌گردد. سپس آنزیم رونویسی کننده معکوس، DNA مکمل این قطعه را به انتهای DNA 3′ که تازه سنتز شد، می‌افزاید و بعد به انتها 3′ این قطعه DNA مکمل را افزوده و رتروترانسپوزون تکمیل می-گردد. بعد از این DNA دو رشته‌ای، توسط آنزیم اینتگراز که رشته DNA هدف را به صورت اریب برش داده الحاق می‌یابد و همین برش اریب باعث تشکیل توالی‌های تکراری مستقیم در دو انتهای رتروترانسپوزون می-شود. طول این توالی تکراری مستقیم بین ۳ الی ۵ نوکلئوتید می‌باشد.

رتروترانسپوزون‌ها نشانگرهای ژنتیکی متنوعی می‌باشند که در مطالعه تکامل ژنوم استفاده می‌شوند. الحاق آنها به یک جایگاه جدید می‌تواند به عنوان نشانگر جدید استفاده شود. موقعیت آنها در داخل ژنوم، تاریخچه خانواده رتروترانسپوزون‌ها را نشان می‌دهد که آنها را به ویژه برای مطالعات فیلوژنی مناسب ساخته است. سیستم‌های مختلف نشانگری رتروترانسپوزون‌های مختلف از لحاظ خصوصیت و ویژگی‌های آغازگر مورد استفاده در واکنش PCR، متفاوت می‌باشند. همه‌ی این نشانگرها، به جز یکی از آنها، غالب می‌باشند (*RBIP*[1] به صورت هم بارز است).

از طرف دیگر، وجود روش مؤثر برای تولید جمعیت‌های دابل هاپلوئید از طریق جنین‌زایی گامتوفیتیک، استفاده از این نوع نشانگرها را سودمند ساخته است. در طول چند سال گذشته، نشانگرهای مبتنی بر ترانسپوزون‌ها برای گونه‌های زراعی و درختان و نیز برای قارچ‌ها و حشرات توسعه پیدا کرده است. ترانسپوزون‌ها خصوصیات بسیاری دارند که آنها را به عنوان پایه و اساس سیستم‌های نشانگرهای مولکولی جذاب جلوه داده است. ترانسپوزون‌ها معمولا در داخل ژنوم پراکنده شده و تغییرات ژنتیکی زیادی در نقطه‌ی الحاق به ژنوم دارند که می‌تواند با آغازگرهای تکثیری ویژه مربوطه ظاهر شوند. نشانگرهای

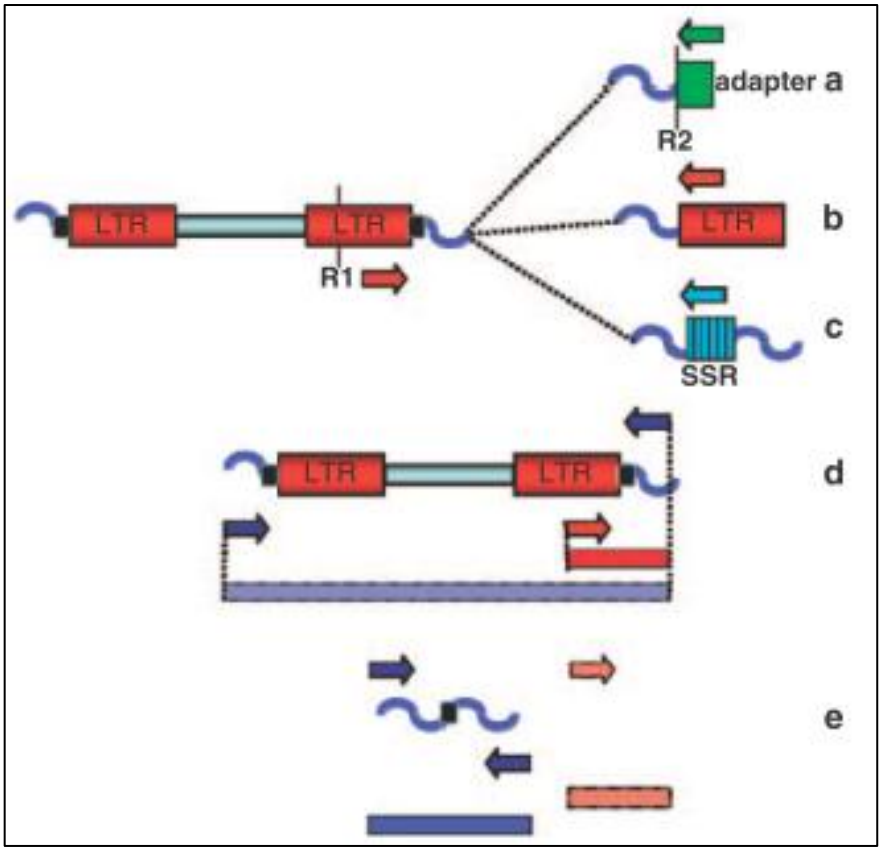
1- Retrotransposon-based insertional polymorphism

رتروترانسپوزونی در پیشبرد برنامه‌های تلاقی برگشتی، نشانمند کردن ژن‌های مطلوب و مورد نظر، ردیابی ژرم پلاسم، تصدیق و تولید شجره‌ها و آزمون تکامل محصول مفید می‌باشند.

### ۱-۳-۴- استفاده از رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای مولکولی

به‌وجود آمدن نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها، به زمانی برمی‌گردد که مشخص شد که این عناصر به میزان زیاد در سطح ژنوم گیاهی به صورت فعال وجود دارند. مشابه با بیشتر نشانگرهای اخیر، نشانگرهایی که براساس رتروترانسپوزون‌ها می‌باشند نیز متکی به PCR هستند. این تکنیک ها از جایگاه‌های متعدد الحاق رتروترانسپوزون‌ها، تولید اثر انگشت می‌کنند (ساوئر[1] و همکاران، ۲۰۰۰). این تکنیک‌ها از اتصالاتی بهره می‌گیرند که در طول الحاق رتروترانسپوزون‌ها بین DNA ژنومی و LTRهای واقع در دو انتهای رتروترانسپوزون، تشکیل می‌شوند. آغازگرها معمولا برای LTRهای نزدیک محل اتصال در دومین‌ها طراحی شده‌اند که این دومین‌ها در داخل خانواده‌ها حفاظت شده‌اند ولی بین خانواده‌ها متفاوت می‌باشند (شکل ۱-۳). اگر چه از نواحی داخل LTR هم که دارای قطعات حفاظت شده می‌باشند نیز، می‌توان استفاده کرد. عموما LTRها جهت کاهش اندازه قسمتی که باید تکثیر شود استفاده می‌شوند. ماهیت آغازگر دومی که در واکنش‌های تکثیری استفاده می‌شود در سیستم‌های نشانگری رتروترانسپوزون‌ها مختلف می-باشد (شکل ۱) (شولمن و همکاران، ۲۰۰۴). آغازگر دوم می‌تواند به هر شکلی در داخل ژنومی باشد که به دو صورت پراکنده و حفاظت شده می‌باشد (واگ[2] و همکاران، ۱۹۹۷).

1- Sauer
2- Waug



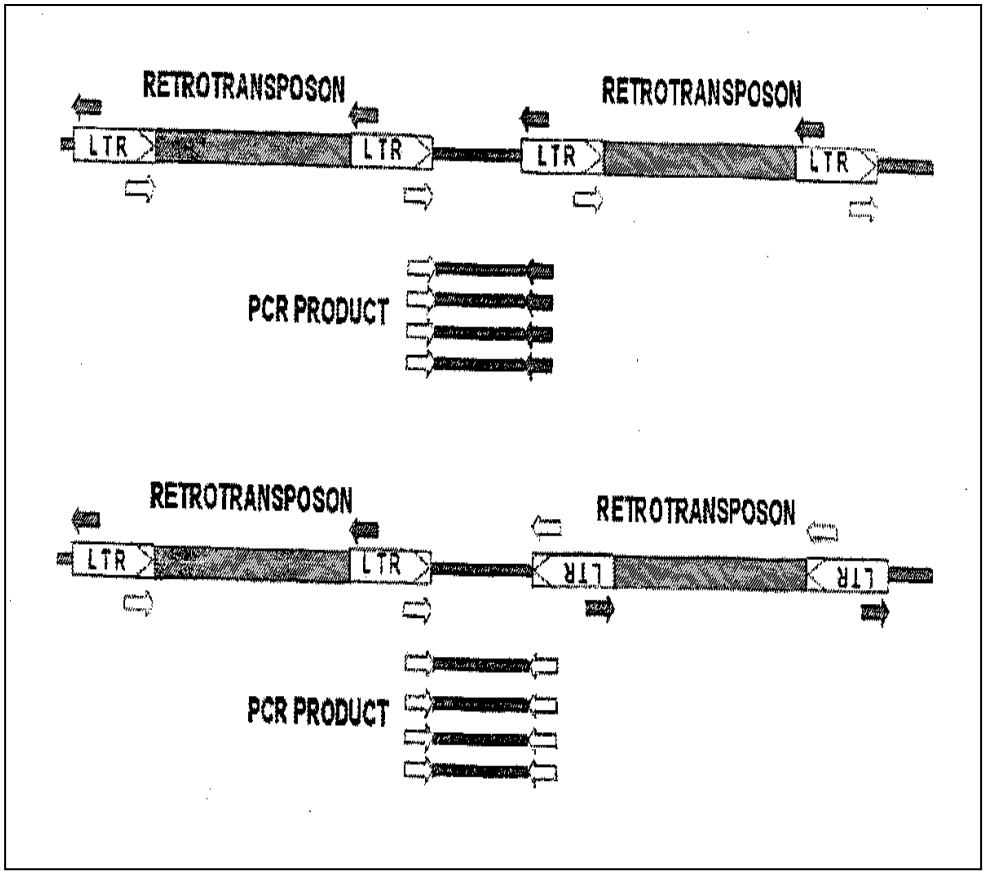

شکل-۱- ۳: روش‌های مختلف نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها: (a) روش S-SAP[1] می‌باشد. که در آن یک قطعه DNA برش یافته توسط دو آنزیم محدودگر (E2,E1)، دارای یک LTR رتروترانسپوزونی (سایه زده) و یک سازگارساز (منقوط) تکثیر می‌شود. آغازگرهای مورد استفاده با سازگارساز ($P_A$) و رتروترانسپوزون ($P_T$) جفت می‌شوند. (b) روش IRAP[2] می‌باشد.که در آن تکثیر نواحی بین رتروترانسپوزون‌های نزدیک به هم در داخل ژنوم و با استفاده از آغازگرهای رتروترانسپوزونی ($P_T$) صورت می‌گیرد. (c) روش REMAP را نشان می‌دهد که تکثیر بین یک دامنه ریزماهواره‌ای (خطوط عمودی) و یک رتروترانسپوزون، و با استفاده از آغازگرهای اتصال یافته به نواحی مجاور ریزماهواره ($P_M$) و آغازگر رتروترانسپوزونی ($P_T$) صورت می‌گیرد. (d) روش *RBIP* است، در این حالت تکثیر بین یک آغازگر در DNAی ژنومی احاطه‌گر (در اینجا، آغازگر $P_{FL}$ به سمت چپ متصل شده است) و یک آغازگر رتروترانسپوزونی ($P_T$) صورت می‌گیرد (کلندر و همکاران، ۲۰۱۱).

### ۱-۳-۴-۱- نشانگر IRAP

در روش IRAP قطعات بین دو رتروترانسپوزون نزدیک هم یا LTRها تکثیر می‌شود (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹). آغازگرهای IRAP می‌تواند از ناحیه ′5 یا ′3 انتهای LTR یک خانواده رتروترانسپوزون

1- Sequence-specific amplified polymorphism
2- Inter Retrotransposon amplified polymorphism

منفرد طراحی شوند یا می‌توانند از روی توالی‌های هر کدام از دو خانواده طراحی شوند. آغازگرهای LTR منفرد عناصر نزدیک را در جهت سر به سر یا دم به دم تکثیر می‌کنند (شکل ۱-۴).

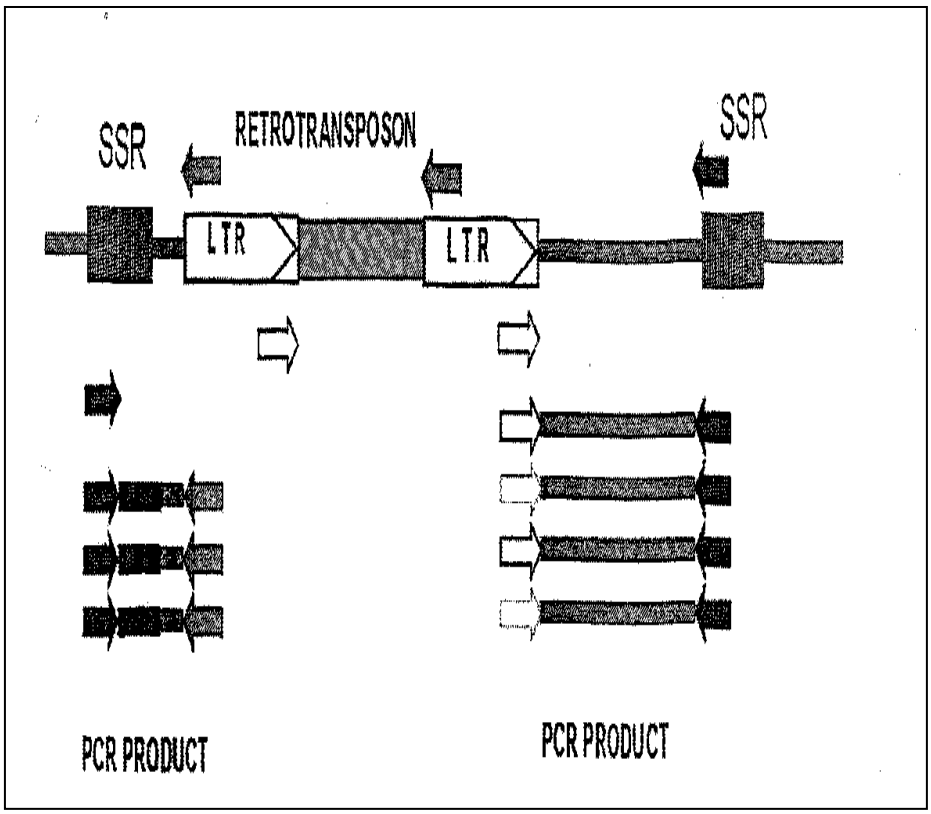



شکل-۱- ۴: شمایی از روش IRAP، در این شکل طراحی آغازگر بر اساس نواحی LTR یک خانواده منفرد یا بر اساس توالی LTR دو خانواده مختلف انجام می‌شود (کاستلو[1] و همکاران، ۲۰۰۷).

### ۱-۳-۴-۲- نشانگر REMAP

این نشانگر، رتروترانسپوزون های الحاق شده در نزدیکی یک ریزماهواره را آشکار می‌کند (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹). در این روش از یک آغازگر طراحی شده براساس توالی ریزماهواره نزدیک جایگاه الحاق رتروترانسپوزون و یک آغازگر اختصاصی توالی LTR بهره گرفته می‌شود (شکل ۱- ۵).

1- Castelo




شکل-۱- ۵: شمایی از نشانگر REMAP، در این روش یکی از آغازگر بر اساس توالی SSR و دیگری براساس توالی اختصاصی LTR طراحی می‌شوند و ناحیه‌ی بین این دو توالی تکثیر می‌شود (کاستلو و همکاران، ۲۰۰۷).

در نشانگرهای IRAP و REMAP آشکارسازی قطعات تکثیر شده در PCR روی ژل آگارز صورت می-گیرد در حالی که در روش S-SAP به‌علت زیاد بودن قطعات تکثیری، از ژل‌های توالی‌یابی استفاده می‌شود. با این حال ژل‌های توالی‌یابی را در نشانگرهای IRAP و REMAP نیز می‌توان استفاده کرد. در نشانگرهای رتروترانسپوزونی در هر واکنش تکثیری، بسته به هم‌بارزی یا غالب بودن خانواده رتروترانسپوزون و سازماندهی ژنوم گیاهی تحت مطالعه، ده‌ها تا صدها محصول تولید می‌شود. تعداد محصولات تکثیری می-توانند با اضافه کردن بازهای انتخابی به آغازگر سازگارساز یا آغازگر LTR کاهش یابد. در IRAP، بازهای انتخابی می‌توانند به آغازگر LTR اضافه گردند. در REMAP، آغازگر LTR یا آغازگر ریزماهواره می‌توانند با خاصیت انتخابی بیشتری طراحی شوند. تام[1] و همکاران، ۲۰۰۵) با مقایسه نشانگرهای مبتنی بر

1- Tam

رتروترانسپوزون با نشانگر AFLP[1]، نشان دادن که نشانگرهای رتروترانسپوزونی در محصولات زراعی متنوع اطلاعات بیشتر و مفیدتری را می‌دهند.

آغازگرهای RBIP با یک طرف DNA احاطه کننده جایگاه الحاق رتروترانسپوزون منطبق می‌باشند. عموما از آغازگر سومی از LTR یا آغازگر طراحی شده از ناحیه داخلی استفاده می‌شود که این آغازگر یکی از طرفین را به سمت جلو تکثیر می‌کند. استفاده از آغازگرهای طرفین با هم، یک محصول از یک جایگاه خالی تولید خواهد کرد، که فاقد رتروترانسپوزون می‌باشد و هیچ محصولی از جایگاه کامل تولید نخواهد شد. یک آغازگر مجاور[2] و یک آغازگر LTR روبرو[3] تولید یک محصول از جایگاه کامل و نه از جایگاه خالی می‌کنند. روش RBIP برای کارهایی که به بازده بالا نیاز دارند توسعه یافته است که در آن ژل الکتروفورز با دورگه-سازی بر روی یک فیلتر، جایگزین ژل آکریل آمید شده است. واکنش‌های PCR جایگاه‌های اشغال شده و اشغال نشده را آشکار می‌کند، محصولات بر روی غشاها لکه‌گذاری شده و با یک کاوشگر ویژه جایگاه ژنی جستجو می‌شوند (فلاول[4] و همکاران، ۱۹۹۸).

### ۱-۳-۵- منبع ژنتیکی ایده‌آل جهت نشانگرهای رتروترانسپوزونی

سیستم‌های نشانگری IRAP، REMAP و S-SAP همگی مثل نشانگرهای AFLP و RAPD غالب می‌باشند. غالب بودن نشانگرهای مبتنی رتروترانسپوزون بدین معنی است که یک محصول PCR، حاصل تکثیر یک ژنوم با شکل خاصی از الحاق عنصر است ولی الگوی PCR، حاصل تکثیر جایگاه آللی متغیر خاص است. واکنش‌های PCR چند هدفی[5] پیچیده می‌باشند و جایگاه‌های ناشناخته‌ای را تکثیر می‌کنند و به همین دلیل است که یک الحاق خاص مفقود، از قبل قابل پیش‌بینی نیست. با استفاده از الحاق یک رتروترانسپوزون در یک جایگاه ژنی، می‌توان دو چندشکلی را آشکار کرد. این دو یا چندشکلی آشکار شده به

1- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
2- Flanking
3- Facing
4- Flavell
5- Multi-target

صورت حضور یک باند در دو غلظت متفاوت نمایان خواهد بود که یکی از باندها روشن‌تر و باند دیگر تیره‌تر می‌باشد که این به‌علت نمره‌دهی هتروزیگوت‌ها و هموزیگوت‌ها می‌باشد. سپس می‌توان با استفاده از نقشه-یابی و توالی‌یابی پی برد که آیا این دو چندشکلی به دو جایگاه آللی تعلق دارد یا نه. ولی با این حال، این کار در عمل هم بسیار سخت بوده و هم اینکه ممکن است که شدت باندها به علت شرایط واکنش نیز تغییر کند. تنها نشانگر رتروترانسپوزونی هم بارز واقعی RBIP می‌باشد. یک راه جهت غلبه بر ماهیت غالب سایر نشانگرها استفاده از مواد ژنتیکی هموزیگوس می‌باشد. ایده‌ال‌ترین منبع ژنتیکی برای نقشه‌یابی جمعیت‌ها، هاپلوئیدهای مضاعف می‌باشند. از جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف در نقشه‌یابی‌های متنوعی استفاده شده است. از جمعیت‌های هاپلوئیدهای مضاعف در نقشه‌یابی نشانگرهای رتروترانسپوزونی و در نقشه‌یابی ژن‌ها با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزون، به طور گسترده‌ای استفاده شده است (صفایی و همکاران، ۱۳۸۹).

### ۱-۳-۶- توسعه و کاربرد نشانگرهای رتروترانسپوزون

نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌های دارای LTR، برای محدوده وسیعی از موجودات نظیر غلات و گراس‌ها، نارگیل، گوجه فرنگی، نخود، درختان میوه، قارچ‌ها و حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این نشانگرها جهت بررسی رتروترانسپوزون‌ها و تحرک‌پذیری آنها، تا مطالعات تنوع زیستی و تکامل ژنوم، نقشه-یابی ژن‌ها و تخمین فاصله ژنتیکی، ارزیابی و تشخیص اشتقاق واریته‌ها استفاده می‌شود. از آنجایی که رتروترانسپوزون‌های LTR به صورت گسترده در ژنوم گیاهان وجود دارند، لذا استفاده از این نوع نشانگرها در گیاهان عمومیت دارند. همچنین در گیاهان از تکنیک‌هایی با رتروترانسپوزون‌های غیر LTR، به‌خصوص عناصر SINE[1] (نوعی دیگر از رتروترانسپوزون‌های یوکاریوتی) استفاده شده است (پری‌یتو[2] و همکاران، ۲۰۰۵). الگوی الحاق قطعه *Alu* انسانی، یکی از متداول‌ترین ترانسپوزون‌ها در ژنوم انسانی می‌باشد که نه تنها به‌عنوان یک وسیله در بیشتر مطالعات ساختار جمعیتی عمل می‌کند، بلکه با بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی نیز پیوستگی دارد. *Alu* توالی‌هایی از نوع رتروترانسپوزون‌های SINE می‌باشند که چون دارای جایگاه

1- Short interspersed elements
2- Prieto

تشخیص برای آنزیم برشی *AluI* می‌باشند، به این نام خوانده می‌شوند. در واقع، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروویروس‌ها یا رتروترانسپوزون‌ها می‌توانند در حیوانات شامل پستانداران و پرندگان نیز مفید واقع شوند (شولمن و همکاران، ۲۰۰۴).

استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی در گونه‌هایی که این نشانگرها قبلاً در آنها استفاده نشده‌اند، نیازمند شناسایی رتروترانسپوزون و یا توالی‌های دوطرف آنها (در تکنیک *RBIP*) جهت طراحی آغازگرهای PCR نیاز می‌باشد. در اکثر مطالعات صورت گرفته، آغازگرهای LTR می‌توانند به صورت مشترک در لاین-های گونه‌ها، در میان جنس‌های نزدیک به هم و حتی بعضی از اوقات بین خانواده‌های گیاهی استفاده شوند. در گونه‌های مختلف، یکسری رتروترانسپوزون‌ها شناسایی شده‌اند که می‌توانند توسط آغازگر هترولوگ تکثیر شوند. این رتروترانسپوزون‌ها از اعضای خانواده‌های قدیمی رتروترانسپوزون‌های موجود قبل از اشتقاق گیاه، مورد مطالعه می‌باشند. خانواده‌های قدیمی‌تر ترانسپوزون‌ها نسبت به خانواده‌های جدیدتر، در ایجاد الحاق-های جدیدتر تمایل بیشتری به خاموشی و سکون دارند. از طرفی هم، اگر شخصی بخواهد که واریته‌های نسبتا نزدیک به هم یا لاین‌های اینبرد را مطالعه کند، باید از یک سیستم رتروترانسپوزون بومی[1] (رتروترانسپوزون‌هایی که براساس ژنوم ارقام بومی طراحی شوند) استفاده نمایید. این فرآیند نیازمند همسانه‌سازی و توالی‌یابی ترانسپوزون‌ها از گونه‌های جدید می‌باشد. بدین منظور، ابتدا بایستی قطعات بین نواحی رتروترانسپوزونی که دارای توالی حفاظت شده می‌باشند تکثیر و همسانه‌سازی شوند و سپس از روی آنها آغازگرهای جدید اختصاصی جهت شناسایی خانواده‌های رتروترانسپوزون طراحی گردیده و در نهایت کارایی این آغازگرها به عنوان یک نشانگر مورد بررسی قرار گیرد. در نشانگرهای IRAP، S-SAP و REMAP باندهای تفکیک شده در الکتروفورز، حاصل تکثیر از یک سمت الحاق رتروترانسپوزون می‌باشند. توالی‌یابی باندهای استخراج شده، اطلاعات زیادی را به همراه داشته و با استفاده از آنها می‌توان یک آغازگر PCR مطابق با DNA ژنومی مجاور یک طرف الحاق طراحی کرد. به هر حال لازم است که توالی ژنومی طرف دیگر رتروترانسپوزون‌ها جهت نمره‌دهی جایگاه خالی مشخص شود. بدین منظور می‌توان ژرم‌پلاسم‌ها را برای باند

1- Native

اصلی[1] چندشکل غربال کرد و سپس تکنیک S-SAP را روی آنها انجام داد که در این تکنیک آغازگر LTR با یک آغازگر طراحی شده برای سمت شناخته شده‌ای که جایگاه الحاق را به سمت جلو پیش می‌برد، جایگزین شده است (شیراسو[2] و همکاران، ۲۰۰۰).

بسیاری از ویژگی‌های رتروترانسپوزون‌ها آنها را برای توسعه سیستم‌های نشانگرهای مولکولی کاربردی مناسب ساخته است. رتروترانسپوزون‌ها فراگیر و فراوان بوده و در ژنوم یوکاریوتی پراکنده شده‌اند. از طرف دیگر ژنوم‌های گیاهی در مقایسه با سایر ژنوم‌های یوکاریوتی شامل دامنه متفاوت و وسیعی از رتروترانسپوزون‌های مختلف هستند. در گیاهانی با ژنوم‌های بزرگ، رتروترانسپوزون‌ها ۶۰ الی ۴۰ درصد از کل ژنوم را شامل می‌شوند. رتروترانسپوزون‌ها شامل نواحی محفوظ، مشخص و طولانی بوده که می‌توانند برای تکثیر نشانگرهای ویژه و توالی‌های مجاور آنها و طراحی آغازگر استفاده شوند. اعضای فعال خانواده‌های رتروترانسپوزون‌ها، الحاق‌های جدید و پایداری را در ژنوم ایجاد می‌کنند که منجر به چندشکلی در بین و داخل گونه‌های گیاهی می‌شوند. درج رتروترانسپوزون‌ها در داخل همدیگر نیز صورت می‌گیرد (حالت آشیانه-ای)[3] که این حالت در رتروترانسپوزون‌های فعال بیشتر دیده می‌شود (ویسنت[4] و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ سابت[5] و شولمن، ۲۰۰۷). منحصر به فرد بودن، تعداد زیاد کپی‌های رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم، توزیع وسیع و تصادفی آنها در کروموزوم‌های گیاهی و چندشکلی درجی[6] و پایداری آنها در بین و داخل گونه‌های گیاهی، استفاده از آنها را به عنوان نشانگرهای مولکولی بسیار ایده‌آل می‌سازد (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ شولمن و همکاران، ۲۰۰۴ ؛ آ و ب ؛ سابت و شولمن، ۲۰۰۷ ؛ شولمن، ۲۰۰۷).

فعالیت هم‌زمان آنها منجر به تنوع ژنوم شده و راه‌هایی برای آشکارسازی آنها فراهم ساخته است. رتروترانسپوزون‌ها طویل هستند و موجب یک تغییر ژنتیکی بزرگی در نقطه الحاق می‌شوند، بنابراین توالی-

1- Original
2- Shirasu
1- Nested
4- Vicient
5- Sabot
6- Insertional polymorphism

های حفاظت شده‌ای را فراهم می‌کنند که می‌تواند برای آشکارسازی جایگاه‌های الحاق آنها استفاده شود. این رخداد، مرتبط با خارج ساختن عنصر قابل جابجایی از سایر جایگاه‌ها نیست، چیزی که در ترانسپوزون‌های DNA وجود دارد. حتی از دست رفتن ناحیه مرکزی یک رتروترانسپوزون توسط نوترکیبی LTR-LTR برای نشانگرهایی که از آغازگرهای LTR به سمت خارج استفاده می‌کنند، قابل مشاهده نیست (شیراسو و همکاران، ۲۰۰۰). جایگاه اولیه الحاق رتروترانسپوزون به وضوح یک جایگاه خالی می‌باشد، که این حالت در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی و شجره‌ای خیلی مفید می‌باشد. یکی از مشکلات SNPها و روش‌هایی که بر پایه به‌دست آوردن یا از دست دادن جایگاه‌های برشی استوار می‌باشند، عدم هدفمند بودن تغییراتی است که آنها آشکار می‌شود. برای مثال SINEها ریشه‌های انسان را به افریقا ربط می‌دهند و برای تعیین ارتباط‌های بین گونه‌های برنج وحشی به‌کار می‌روند. الحاق‌های رتروترانسپوزونی که چندشکلی‌های مفیدی را فراهم می‌کنند، آنهایی هستند که به‌صورت همسانه‌سازی وارد سلول‌های تخم و گرده شده‌اند. بنابراین می‌توان رتروترانسپوزون را به عنوان یک عنصر انتقالی جنینی در نظر گرفت که به جای حرکت خارج سلولی، از طریق مسیر حرکت داخل سلولی در داخل یک میزبان جدید حرکت می‌کند (شولمن، ۲۰۰۷).

## ۱-۴- چندشکلی در تعداد تکرارهای پشت سر هم (ISSR)

### ۱-۴-۱-نشانگر ISSR

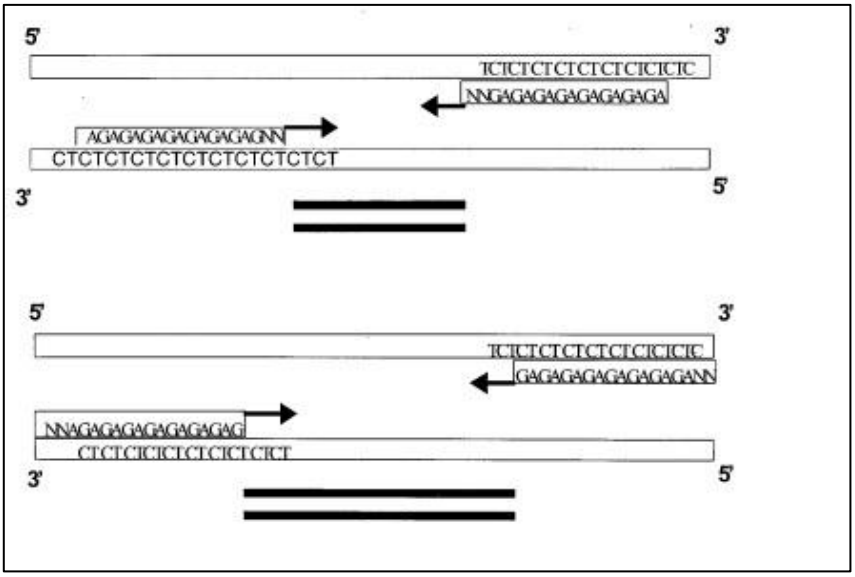
ISSR-PCR تکنیکی است که از توالی‌های ریزماهواره به عنوان آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ایجاد نشانگرهای چندژنی استفاده می‌کند. این تکنیک، آسان و سریع است و اغلبِ مزایای ریزماهواره‌ها (SSRها) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) را با عمومیت DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی (RAPD[1]) در هم می‌آمیزد. نشانگرهای ISSR بسیار چندشکل هستند و در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی سودمند هستند (ردی[2] و همکاران، ۲۰۰۰).

1- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

2- Reddy

امروزه توالی‌های تکراری ساده داخلی (ISSR) مبتنی بر PCR با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر تکرارهای دی نوکلئوتید، تترانوکلئوتید یا پنتانوکلئوتید، در میان محققان به صورت یک روش متداول درآمده است (شکل ۱-۶) (زایتکویچ[1] و همکاران، ۱۹۹۴).

بر اساس تکنیکISSR، مکان‌های ژنی چندگانه SSR ممکن است با الگوی مشابه آن آشکار شوند. برای این روش آغازگری طراحی می‌شود که توالی آن دارای قسمتی از توالی SSR و قسمتی از توالی آن، بازهای اختیاری مورد استفاده باشد. بر طبق مکان‌های نسبی این دو قسمت، دو نوع آغازگر متصور است که اگر بازهای اختیاری آغازگر در انتهای ′5 باشند یک نوع آغازگر و در صورتی که در انتهای ′3 باشند آغازگر دیگری حاصل می‌شود. PCR به طور هم‌زمان، قطعات مختلف بخش‌های نزدیک به SSRها را که دارای چندشکلی بالایی هستند، تکثیر خواهد کرد. این تکنیک کاربرد جالبی در ژنتیک گیاهی دارد (گودوین[2] و همکاران، ۱۹۹۷)، خصوصا برای مطالعات تنوع و مطالعات ژنتیکی جمعیت در گونه‌های گیاهی که هیچ گونه اطلاعی از توالی آن در دسترس نمی‌باشد (بابائیان جلودار و همکاران، ۱۳۸۷).




شکل-۱-۶: شمایی از روش ISSR، در این نشانگر قسمتی از توالی آغازگری که طراحی می‌شود را توالی SSR و قسمتی را بازهای اختیاری ′5 یا ′3 تشکیل می‌دهند (اسکارنو و همکاران، ۲۰۰۲).

1- Zietkiewicz
2- Godwin

## ۱-۵- ضرورت تحقیق

همانطور که در بالا اشاره شد انگور یکی از محصولات مهم باغی به دلیل موارد مصارف متعدد قرن‌هاست که مورد توجه بشر قرار گرفته است. استفاده از انگور محدود به میوه رسیده آن نیست بلکه، برگ و میوه نارس آن هم بـه صورت غوره مصرف غذایی دارند. به علاوه از عصاره آن به صورت آب یا شیره انگور، از خشک شده آن به صورت کشمش، از محصولات تخمیری یا تقطیری آن به صورت شراب، الکل و سرکه، از روغن هسته انگور و پوسته حاصل از استخراج روغن هسته انگور در تهیه تانن، از کنجاله حاصل از استخراج روغن هسته انگور برای خوراک دام و در نهایت مصارف طبی و غذایی دیگر استفاده می‌شود (تفضلی و همکاران، ۱۹۹۴). میوه انگور در میان دیگر میوه‌های درختی به واسطه داشتن متابولیت‌های ثانویه و تنوع مصرف (تازه‌خوری، کنسروی و خشکباری) منحصربه 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 (کامب[1]، ۱۹۹۲). ایران به علت برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، از مراکز مهم تولید و پرورش انگور در جهان محسوب می‌شود و بر اساس گزارش وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۸ هفتمین کشور تولید کننده‌ی این محصول در جهان به شمار می‌آید (بی نام[2]، ۲۰۰۹).

تولید جهانی انگور در سال ۲۰۱۱ حدود ۶۹/۶ میلیون تن برآورد شده است که کشور چین با تولید ۹/۱ میلیون تن در صدر تولیدکنندگان انگور قرار دارد. کشورهای ایتالیا و امریکا به ترتیب با تولید ۷/۱ و ۶/۶ میلیون تن در رتبه‌های بعدی قرار دارند. کشور ایران با تولید ۲/۲ میلیون تن در رتبه نهم دنیا قرار دارد که در مقایسه با کشورهای اصلی تولید کننده دارای عملکردی پایین می‌باشد (فائو، ۲۰۱۱).

بوته انگور ، به دلیل سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی در گستره وسیعی از اقلیم‌ها کشت می‌شود. در ایران نیز در استان‌های مختلفی تولید این محصول صورت گرفته است و موجب اشتغال افراد زیادی شده است. مو از نظر اقتصادی نیز به دلیل اینکه یکی از محصولات صادراتی (عمدتا به صورت

1- Commbe
2- Anonymous

کشمش) می‌باشد، در ارزآوری و افزایش صادرات غیرنفتی نقش زیادی دارد. از سوی دیگر، انگور محصولی است که در صنایع تبدیلی نیز نقش به‌سزایی دارد طوری که سابقه آن به صورت سنتی در ایران به هزاران سال می‌رسد. بنابراین، می‌توان با ایجاد صنایع تبدیلی مرتبط با این محصول، از این طریق ارزش محصولات را بالا برده و ایجاد شغل نمود. 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 هدف خاص می‌باشد. تعداد ژنوتیپ‌های انگور در جهان بیش از ۱۰۰۰۰ گونه می‌باشد که در بین آنها هم‌نام‌ها[1] و دگرنام‌های[2] زیادی دیده می‌شوند که به برنامه‌ی جامعی جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها در سطح جهانی می‌باشد (گالتا[3] و همکاران، ۱۹۸۹). این مشکل در بین ژنوتیپ‌های انگور ایران نیز مشاهده شود به طوری که یک ژنوتیپ انگور در مناطق مختلف دارای نام‌های متفاوت بود 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 (نیکخواه و همکاران، ۱۳۸۹).

از طرف دیگر آگاهی از تنوع ژنتیکی، نقش مهمی در به‌نژادی دارد. در واقع اساس کار اکثر برنامه‌های اصلاح‌نباتات و میزان موفقیت آنها، به وجود تنوع ژنتیکی قابل قبول و متعاقب آن، گزینش وابسته است (کومار[4] و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ شولمن، ۲۰۰۷). لذا تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه‌ی اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (لاوی، ۱۹۹۴).

1- Homonyms
2- Synonyms
3- Galletta
4- Kumar

## ۱-۶- هدف تحقیق

تا کنون بررسی و ارزیابی تنوع زیادی از خانواده رتروترانسپوزونی برای استفاده به عنوان نشانگر مولکولی در انگور و حتی دیگر گیاهان انجام نگرفته است. با توجه به اینکه استان‌های سمنان و کهگیلویه و بویراحمد هر دو دارای انگورهای مرغوب بوده ولی از قرابت ژنتیکی آنها اطلاعاتی در دست نیست، و از طرفی تاکنون گزارشی دال بر استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه در کشور موجود نمی‌باشد و با توجه به کارایی این نشانگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی و به منظور بهره‌برداری از آنها در برنامه‌های اصلاحی و تولید محصول بهتر، این پژوهش با اهداف زیر طراحی شد:

۱) بررسی تنوع ژنتیکی انگورهای منطقه شاهرود (واقع در استان سمنان) و سی‌سخت (ولقع در استان کهگیلویه و بویر احمد) با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP و نشانگر ISSR.

۲) بررسی تنوع ژنتیکی انگورهای منطقه شاهرود و سی‌سخت با استفاده از صفات مورفولوژیک.

۳) مقایسه گروه بندی های مختلف توسط انواع نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی و بررسی ارتباط بین آن ها.

در فصل بعد پژوهش‌های انجام شده روی گیاه انگور با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف را مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

# فصل دوم

# مروری بر منابع

تا به امروز در نقاط مختلف دنیا از نشانگرهای مختلفی برای ارزیابی روابط ژنتیکی بین ارقام مختلف انگور استفاده شده و بر اساس این نشانگرها ارقام مختلف در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند که در این بخش سعی داریم به چند تا از این تحقیقات بپردازیم.

مطالعات انجام شده روی ژنوم انگور نشان داد که عناصر جابه‌جا شونده به فراوانی در ژنوم انگور حضور دارند. علاوه براین مشخص شد که فراوانی رتروترانسپوزون‌های LTR بیشتر از رتروترانسپوزون‌های غیر LTR می‌باشد(جی‌لون[1] و همکاران، ۲۰۰۷ ؛ ولاسکو[2] و همکاران، ۲۰۰۷).

اولین توالی رتروترانسپوزونی شناسایی شده از ژنوم انگور رتروترانسپوزون Gret1 (رتروترانسپوزون شماره ۱ انگور) نام دارد که متعلق به گروه *Ty3-gypsy* می‌باشد (کوبایاشی[3] و همکاران، ۲۰۰۴). قبل از این فقط دو بخش از توالی‌های دو رتروترانسپوزون انگور که از گروه *Ty1-Copia* هستند شناسایی شده بودند که یکی از آنها *Vine1* ( عناصر شماره یک *V.vinifera*) (وریز[4] و همکاران، ۲۰۰۰) و دیگری *Tvv1* نام داشت (پلزای[5] و همکاران، ۲۰۰۲).

## ۲-۱- مروری بر پژوهش‌های انجام شده در گیاه انگور با استفاده از نشانگرهای مختلف

در قرن گذشته بیشتر از مدارک تاریخی در ترکیب با داده‌های مورفولوژیک برای بررسی منشاء و روابط بین ارقام مختلف انگور استفاده شده است. امروزه با توسعه روش‌های مولکولی امکان بررسی دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ارقام انگور و ارتباط آنها با ژنوتیپ‌های وحشی فراهم شده است (کارپ[6] و همکاران، ۲۰۰۳). لذا بررسی تنوع ژنتیکی انگور با استفاده از نشانگرهای مختلفی انجام شده است.

1- Jaillon
2- Velasco
3- Kobayashi
4- Verriès
5- Pelsy
6- Karpe

کرمی (۲۰۰۶) در مطالعه بیش از یکصد صفت روی اندام‌های مختلف ارقام انگور استان کردستان با استفاده از دیسکریپتور، تعداد ۵۹ رقم انگور را شناسایی کرد که ۱۷ رقم از آنها به صورت دیم بودند. نامبرده گزارش داد که همه ارقام دیم در این استان دانه‌دار و دارای تنوع رنگ میوه بودند و در هشت گروه مشابه قرار گرفتند که ارقام خوشناو و سیاوه تا ۸۰ درصد تشابه داشتند. مطالعات سه ساله دولتی بانه و همکاران (۲۰۱۰) در شناسایی و ارزیابی صفات مختلف ۵۰ رقم انگور محلی موجود در استان آذربایجان غربی براساس توصیف نامه IBPGR، تفاوت معنی‌داری را از نظر کلیه صفات زراعی مانند درصد تشکیل میوه، جوانه زنی گرده، اجزاء عملکرد، سیستم باردهی و زمان رسیدن میوه نشان داد و تنوع بسیار زیادی در صفات گیاه-شناسی نظیر شکل برگ، تعداد لوب برگی، رنگ برگ جوان، شکل سینوسی دمبرگی، شکل دندانه حاشیه پهنک، اندازه، شکل و رنگ پوست حبه و میزان رشد رویشی بین ارقام مشاهده شد.

از نشانگرهای ریزماهواره‌ی هسته‌ای وکلروپلاستی در مطالعات فیلوژنتیک، شناسایی ارقام و پایه‌ها، روابط والد و نتاج، تشخیص دورگ‌ها، جریان ژنی و فرایند اهلی شدن انگور استفاده شده است (سفسی[1] و همکاران، ۲۰۰۱). در سال‌های گذشته روش‌های شناسایی ارقام انگور بر پایه صفات مورفولوژیکی بود که این صفات خود تحت تاثیر فاکتورهای رشدی و محیطی هستند و باعث کاهش کارایی این شاخص‌ها می‌شود. نشانگرهای بیوشیمیایی مانند آیزوزایم‌ها هم برای شناسایی رقم‌های انگور مورد استفاده قرار گرفتند (اهمی[2] و همکاران، ۱۹۹۳).

مطالعه تنوع ژنتیکی بر پایه تنوع آیزوزایم‌ها به علت کم بودن تعداد آیزوزایم‌های قابل ثبت و مشاهده پایین بودن چندشکلی قابل ثبت در آنها، محدود می‌باشد. در همین راستا، نهایتا نشانگرهای مبتنی بر DNA که چندشکلی وسیعی را در سطح DNA نشان می‌دهند و یک روش مطلوب برای تشخیص گونه‌های خویشاوند نزدیک به‌هم هستند، مورد استفاده قرار گرفتند.

1- Sefc
2- Ohmi

در تحقیقی با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD و ۱۱ آغازگر ISSR ارقام انگور بومی شیلی با یکدیگر و همچنین دو رقم Merlot بومی شیلی و فرانسه با هم مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از آن تحقیق دو رقم همنام بومی شده در شیلی و فرانسه خویشاوندی ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر نداشته و دو ژنوتیپ متفاوت، از نظر ژنتیکی مشابه بودند (هررا[1] و همکاران، ۲۰۰۲).

در تحقیق دیگری از ۲۴ آغازگر RAPD برای مطالعه تنوع در بین ۳۶ رقم انگور بومی رومانی استفاده شده و آنها را در سه گروه بزرگ دسته‌بندی کردند (بودا[2] و همکاران، ۲۰۰۹).

تنوع و روابط ژنتیکی بین تعدادی از ژنوتیپ‌های انگور استان اصفهان با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دوگروه قرار گرفتند. در این گروه‌بندی، دامنه تشابه بین ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۸۸-۰/۳۴ بود. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های کشمشی سفید قزوین و کشمشی قرمز قزوین و با ضریب تشابه ۰/۸۸ و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های شاهانی و مادر و بچه با ضریب تشابه ۰/۳۴ بود. (قبادی و همکاران، ۲۰۰۸).

جداری کوهی و همکاران (۱۳۹۰)، در تحقیقی تنوع مولکولی و تعیین فواصل ژنتیکی ۲۱ رقم مهم انگور بیدانه با روش RADP را مورد بررسی قرار دادند. ارقام مورد مطالعه به سه گروه و دو گروه بیرونی طبقه بندی شدند. گروه اول شامل رقم کشمشی قرمز ۱ و کشمشی قرمز ۲ بود. گروه دوم شامل ارقام عسگری قوچان، عسگری نر قوچان، خلیلی بی دانه، کشمشی سفید، بی دانه قرمز قزوین، بی دانه سفید قزوین، عسگری تبریز، عسگری مشکین شهر و عسگری قرمز بود. گروه بیرونی اول شامل رقم بی دانه قوچان بود .گروه سوم شامل ارقام سرخک قرمز کشمشی قرمز، کشمشی جرتوده، کشمشی تبریز، کشمشی مشکین شهر، سرخک قوچان، عسگری بیرجند و عسگری نیشابور بود .گروه بیرونی دوم شامل رقم بی دانه جرتوده بود.

1- Herrera
2- Bodea

کریمی شهری و همکاران (۱۳۹۱)، تحقیقی با هدف بررسی امکان کاربرد دو نشانگر ISSR و RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ۸ رقم انگور غیر بومی، ۶ رقم انگور بومی خراسان رضوی و یک رقم انگور غیربومی از گونه *Vitis muscadinia* و تعیین میزان قرابت و خویشاوندی ارقام مذکور انجام دادند، که بر اساس تجزیه کلاستر داده‌های تلفیقی RAPD و ISSR، ارقام مورد مطالعه در دو گروه بزرگ دسته‌بندی شدند، در این گروه‌بندی هشت رقم غیربومی ترکمن در یک گروه و رقم موسکات به همراه ارقام کلاهداری و صاحبی نیشابور در یک زیر گروه قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای، ۶ رقم از ارقام انگور سیستان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت ژنوتیپ‌های به سه گروه تقسیم شدند (محمود سلوکی و همکاران، ۱۳۸۴).

در بررسی که بین ۴۱ رقم از انگورهای زراعی ترکیه از دو ناحیه قیصریه و اسکی شهیر به همراه دو رقم کنترل با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریز ماهواره به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی، سینونیمی و همونیمی انجام شد نتایج حاصله از داده‌های مولکولی ۴ مورد شباهت بین ارقام انگور شامل سیاه فسد یکن (از منطقه اسکی شهیر) و جوکلیک (قیصریه)، سیاه اوزوم و کویون گوزی (اسکی شهیر)، حانیم دوداغی و کارا اولک و کارالیک (قیصریه)، سیاه بوزگولو و بوزگولو (اسکی شهیر) و و یک مورد همونیم به نام نارینجی با ۵۷ درصد تشابه ژنتیکی به دست آمد و مشخص شد که این دو رقم با ژنتیک متفاوت دارای یک اسم بودند (مینا شیدفر و همکاران، ۱۳۸۸).

مطالعه سینونیمی و روابط والد و نتاج موجود در ۷۲ رقم از ارقام انگور ایرانی موجود در استان آذربایجان‌غربی با استفاده از ۱۹ جفت نشانگر ریزماهواره انجام شد. بر اساس تجزیه داده‌های ریزماهواره، سینونیمی در انگورهای کشمشی سفید و بی‌دانه قرمز، رجین و سفید شخ شخ، کشمشی سفید و سفید شخ شخ، کشمشی سفید و رجین، تبرزه سفید و تبرزه قرمز، رشه و خوشناو، موسلی و سقل سولیان، فخری و دیزماری مشخص شدند (حامد دولتی بانه و همکاران، ۱۳۸۸).

در تحقیقی با استفاده از تجزیه ریزماهواره، روابط بین انگورهای وحشی و زراعی سه ناحیه ایتالیا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج وجود فاصله ژنتیکی بسیار بالا را بین دو دسته انگور نشان داد اما دو رقم انگور موجود در جزیره ساردینیا شباهت بسیار زیادی را با انگورهای وحشی نشان دادند. این دو رقم احتمالا از انگورهای وحشی همان ناحیه حاصل شدند که بر این اساس، این ناحیه جزء مراکز ثانویه اهلی شدن انگور معرفی شد (گراسی[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

در تحقیق دیگری روابط ژنتیکی تعدادی از انگورهای زراعی با گل‌های ماده فیزیولوژیک (شبیه انگورهای وحشی) و انگورهای وحشی زیر گونه Silvestris مناطق شمالی اسپانیا و جنوب غربی فرانسه با نشانگرهای ریزماهواره مطالعه گردید. نتایج اختلاف بالایی بین انگورهای وحشی و زراعی را نشان داد. بر اساس این مطالعه، گزارش شد که نمونه‌های انگور وحشی اجداد انگورهای زراعی مورد مطالعه نبودند (کارنو[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

ساختار ژنتیکی ۲۲۲ رقم انگور گونه Vinifera به همراه ۲۲ نمونه انگور وحشی فرانسه با استفاده از ۸ جایگاه ریز ماهواره مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج چندشکلی و هتروزیگوتی بالایی را بین انگورها نشان داد. همچنین رابطه بسیار نزدیکی بین انگورهای شرابی فرانسه و انگورهای وحشی همان کشور گزارش گردید (آرادهیا[3] و همکاران، ۲۰۰۳).

در ترکیه، از نتایج تحقیقی که درمجموعه تاکستان دانشکده کشاورزی دانشگاه آدنا برای بررسی صفات ژنتیکی ۵۹ رقم از ارقام انگور این مجموعه انجام شد، از نشانگر مولکولی ریزماهواره برای نگهداری این ارقام و مشکلات مربوط به شناسایی این ارقام استفاده کردند (تانگولار[4] و همکاران، ۲۰۰۸).

1- Grassi
2- Carreno
3- Aradhya
4- Tangolar

انگشت‌نگاری انگورهای نواحی فارس و خراسان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام و کارآیی ریزماهواره‌ها در شناسایی ارقام، شناسایی مترادف‌ها، جهت مدیریت کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم، بررسی خزانه-های ژنی انگور و طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم به کمک داده‌های مولکولی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی بررسی گردید، دندروگرام حاصل ژنوتیپ‌ها را به ۸ گروه اصلی تقسیم کرد: گروه اول متشکل از ۱۳ ژنوتیپ شامل دو رقم اروپایی و اکثر ژنوتیپ‌های با نام عسکری از نقاط مختلف بود بنابراین ممکن است از یک رقم عسگری کلونی‌های مختلفی به وجود آمده باشد. بیشتر ارقام ایرانی این خوشه، منشأ خراسانی داشتند.گروه دوم ۵۱ رقم را در بر گرفت که یک رقم از اروپا و بقیه ارقام ایران بودند. در این خوشه نیز ارقام با نام‌های مشابه نظیر خلیلی دانه دار قوچان، خلیلی دیر رس مشهد و خلیلی بیدانه رضوان قرار داشت. چنین شرایطی برای ارقام سبزک، غلامی و رجبی نیز صادق بود. گروه سوم با ۱۰ عضو شامل اکثر ارقام از منطقه خراسان بود و ژنوتیپ-های با نام روچه در این گروه قرار گرفتند. در این مورد نیز می‌توان مانند آنچه در مورد رقم عسگری بیان شد استدلال مشابهی نمود. گروه چهارم فقط شامل یک رقم اروپایی به نام Corinto-Bianco بود. گروه پنجم فقط رقم تنگ‌لیرهای شیراز را در بر گرفت. گروه ششم ۷ رقم اروپایی را در خود جای داد. گروه هفتم شامل دو رقم به نام‌هایCorinthe و Altesse بود. گروه هشتم از ۴ رقم اروپایی و رقم ایرانی گل برطبق مشهد تشکیل شد. از میان ارقام ایرانی، این رقم بیشترین تشابه ژنتیکی را با ارقام اروپایی داشت (عالی‌پناه و همکاران، ۱۳۸۵).در مطالعه‌ای که لابرا[1] و همکاران (۲۰۰۴) برای بررسی روابط ژنتیکی بین ۵۰ رقم وحشی، ارقام و کلون‌های مختلف انگور با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی S-SAP و مقایسه‌ی آن با نشانگر AFLP داشتند، در نهایت مشخص شد که نشانگر رتروترانسپوزونی تنوع موجود بین ارقام را بهتر نشان می‌دهد.

نیوین[2] و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی سه رقم انگو مصر را با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند. که در نهایت ارقام مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند. و به این نتیجه رسیدند که نشانگر ISSR برای شناسایی ارقام انگور مناسب می‌باشد.

1- Labra
2- Neveen

استاجنر[1] و همکاران (۲۰۰۹) پس از ارزیابی ۱۴ کلون Syrah و ۲۲ کلون Malbe با استفاده از نشانگرهای S-SAP و AFLP به این نتیجه رسیدند که نشانگر S-SAP حاوی اطلاعات مفیدتری برای ارزیابی مورد نظر می‌باشد و این نشانگر تعداد باند چندشکل بیشتری در هر دو گروه نسبت به AFLP تکثیر می‌کند. در این مطالعه مشخص شد که کلون‌های Malbe دست خوش موتاسیون‌های بیشتری نسبت به کلون‌های Syrah قرارگرفتند.

در تحقیقی مقایسه‌ای بین نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP، IRAP و SSAP با دیگر نشانگرهای غیر مبتنی بر رتروترانسپوزون مثل ISSR، SSR و AFLP برای مشخص کردن مفیدترین نشانگر برای شناسایی و بررسی تکامل گونه‌ها، واریته‌ها و کلون‌های انگور انجام شد. بر اساس دندروگرام بدست آمده ازماتریس تشابه REMAP ظاهرا گونه‌های *Vitis* و واریته‌های *V. vinifera* دارای بیشترین شباهت خویشاوندی هستند. در درخت فیلوژنی حاصل از این نشانگر همه‌ی گونه‌های امریکایی در یک شاخه قرار گرفتند (کلودیو[2] و همکاران، ۲۰۱۰).

در تحقیقی کاسترو[3] و همکاران (۲۰۱۱) تنوع ژنتیکی ۴۱ رقم مختلف انگور و ۳۷ کلون را با استفاده از AFLP و سه نشانگر رتروترانسپوزونی IRAP، REMAP و S-SAP بررسی کردند. در این مطالعه از ۱۸ آغازگر مبتنی بر توالی‌ها LTR رتروترانسپوزون‌های Vine-1، Tvv1 و Gret1 استفاده کردند، این آغازگرها تولید ۵۷۱ باند کردند که ازین تعداد باند ۴۲۹ باند (۸۳٪) چندشکلی نشان دادند و برای نشانگر REMAP آغازگر Tvv1fa-UBC890-2 بیشترین تعداد باند (۲۸ باند)، برای S-SAP آغازگر Gret1Fa-M36 بیشترین باند (۷۸ باند )، برای AFLP آغازگر E34-M36 بیشترین تعداد باند (۹۰ باند) و برای IRAP فقط آغازگر Tvv1Fa باند تکثیر کرده بود.

تا کنون تنوع ژنتیکی ارقام انگور موجود در کشور با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا هدف این تحقیق، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی ارقام مختلف انگور موجود در

1- Stajner
2- Claudio
5- Castro

منطقه شاهرود (واقع در استان سمنان) و سی‌سخت (واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP، همچنین نشانگر ISSR و صفات مورفولوژیک می‌باشد تا در آینده بتوان جهت شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مطلوب در انگور اقدام کرد.

# فصل سوم

# مواد و روش‌ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، تهیه‌ی نمونه‌های گیاهی، صفات مورد بررسی، مراحل استخراج DNA به روش CTAB[1]، محلول‌های مورد نیاز، روش‌های بررسی کمیت و کیفیت DNA، تکثیر DNA با استفاده از PCR، الکتروفورز افقی و تجزیه و تحلیل داده‌ها می‌باشد که در ادامه به توضیح مراحل ذکر شده در بالا می‌پردازیم.

## ۳-۱- مواد و روش‌های بخش مورفولوژیک

در این مطالعه ۲۵ واریته انگور مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ضمیمه ۱) که شامل ۲۲ واریته از شهرستان شاهرود (واقع در استان سمنان) و ۳ واریته از شهر سی سخت (واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد) که واریته‌های شاهرود از مرکز تحقیقات شهرستان شاهرود و واریته‌های سی سخت از باغات شهر سی سخت تهیه شدند.

### ۳-۱-۱- نمونه‌برداری و صفات مورد بررسی

به منظور بررسی تنوع مورفولوژیک ارزیابی صفات ظاهری در ۲۵ گونه مختلف انگور انجام شد. نمونه‌برداری‌ها در تابستان سال ۱۳۹۱ از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان شاهرود و باغات شهر سی‌سخت انجام شد. صفات مورد بررسی عبات بودند از: برگ کامل (شکل پهنک، تعداد لوب، طول دندانه، شکل دندانه، عمق بریدگی‌های بالایی جانبی و طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی)، خوشه (اندازه خوشه بدون دم، تراکم خوشه و طول دم) و حبه (اندازه، شکل حبه، آبدار بودن گوشت، تشکیل دانه و رنگ پوست حبه) (جدول ضمیمه ۲).

### ۳-۱-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مورفولوژیک بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS[2] نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل‌های قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی صورت پذیرفت.

1- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
2- Statistical package for social science

جهت گروه‌بندی ارقام مشابه بر اساس صفات مورفولوژیک از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد[1] و بر اساس مربع فاصله‌ی اقلیدوسی[2] استفاده شد.

## ۳-۲- مواد و روش‌های بخش مولکولی

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل: dNTP، $MgCl_2$، 10× PCR Buffer، Taq DNA Polymerase، DNase Free Deionized water، Ribonuclease A، Agaros، Loading Buffer، DNA Leadder 100bp که از شرکت Sinaclon (تهران، ایران) خریداری شد. β- Mercaptoethanol، CTAB، PVP، Tric-HCL، EDTA، NaCl، Chloroform، IsoAmyl Alcohol، Ethanol، Isopropanole، Boric Acid از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد و پرایمرهای REMAP، IRAP و ISSR از شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) تهیه شد.

### ۳-۲-۱- تجهیزات آزمایشگاهی

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، آون و انکوباتور GFL (هانوآ، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکلر PCR-MJ Mini-BIO RAD (نورنبرگ، آلمان)، سانتریفیوژ Sigma (اُتسو، ژاپن)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، مایکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل‌داک QUANTUM ST4 (سوبیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور Zhihat Teb Azma (تهران، ایران)، سمپلر ۱۰µl، ۱۰۰µl و ۱۰۰۰µl Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، pH متر Hanna (مجارستان)، یخچال، فریزر ۴۰- (پرولیلین، آلمان) و ترازو Bell (بنگالورو، هند) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

1- Ward
2- Euclidean Squared Distance

### ۳-۲-۲- استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB

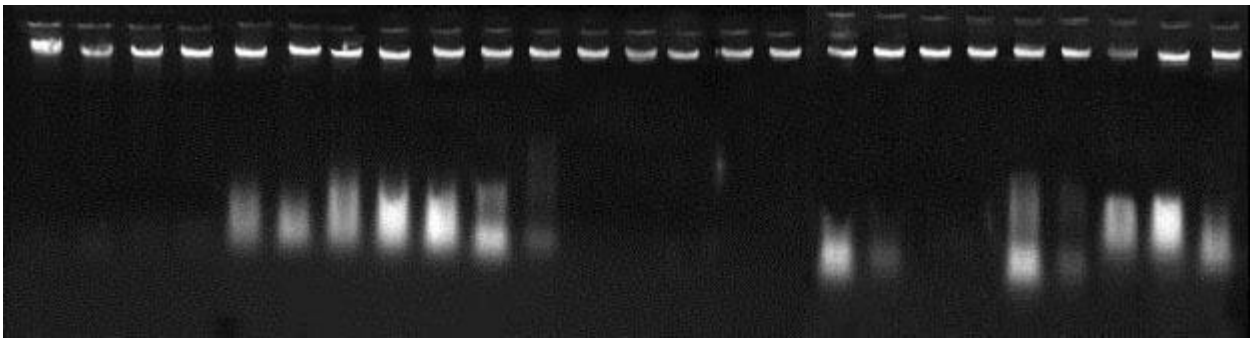
مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج DNA شامل: بافر استخراج CTAB، تیوب های ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتری، سرسمپلر، سمپلر، هاون و دسته هاون، نیتروژن مایع، سانتریفیوژ یخچال‌دار، اتانول ۹۶٪ و ۷۰٪ سرد، آمونیوم استات ۷/۵ مولار، حمام آب گرم، کلروفرم[۱]- ایزوآمیل[۲] الکل (به نسبت ۱:۲۴)، آب مقطر استریل[۳] و ایزوپروپانول سرد[۴] می‌باشند.

#### ۳-۲-۲-۱-مراحل استخراج DNA

۰/۲گرم نمونه برگی تازه از برگ‌های جوان انگور گونه‌های مختلف که در تابستان سال ۱۳۹۱ جمع-آوری شده و پس از آن تا زمان استفاده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند را وزن کردیم، نمونه برگی درحضور ازت مایع در هاون چینی پودر شد، نمونه پودر شده به میکروتیوب ۲ میلی لیتری انتقال داده شده و ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (جدول ۳-۱) به آن اضافه گردید، ۲/۵ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر تیوب اضافه گردید و سپس به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد که در این مدت نمونه‌ها چندین مرتبه تکان داده شدند (هر۱۰ دقیقه یک‌بار سر و ته شدند)، میکروتیوب‌ها از حمام آب گرم خارج و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خنک شوند، هم حجم مایع نمونه (۸۰۰ میکرولیتر) کلروفرم- ایزوآمیل الکل سرد (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه شد و مخلوط به آرامی و به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (این عمل بسته به درجه شفافیت مایع رویی چندین مرتبه تکرار شد). مایع شناور رویی به میکروتیوب جدید منتقل و به اندازه نصف حجم آن، آمونیوم استات ۷/۵ مولار و به اندازه دوسوم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شده و به آرامی مخلوط گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا DNA به صورت غیر محلول در آید. به منظور رسوب دادن DNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز محلول رویی دور ریخته شد و سپس ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به رسوب اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

1- Chloroform
2- Isoamyl alcohol
3- Dionized Water
4- Cold Isopropanol

اتاق قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۱ دقیقه در rpm ۹۵۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس رسوب حاصل سه بار با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد، به رسوب سفید DNA که در ته لوله رسوب کرده بود، اجازه داده شد تا در هوای آزاد خشک شود. در نهایت ۱۰۰- ۵۰ میکرولیتر TE بافر یا آب دو بار تقطیر استریل به آن اضافه گردید و در دمای فریزر (دمای $^{o}C$ ۴۰-) تا زمان استفاده نگهداری شد (شکل ۳-۱).



شکل ۳- ۱: DNAهای استخراج شده از ۲۵ رقم انگور مورد مطالعه، به ترتیب از چپ به راست شامل ارقام: ۳- رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، ۹- طرقی 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- هایه میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و c - عسکری

**جدول ۳- ۱: مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج**

| در ۱۰۰ میلی‌لیتر | غلظت (M) | مواد لازم | نیاز به اتوکلاو |
|---|---|---|---|
| 100 mM | 1 | Tris-HCl pH= 8 | بله |
| 20 mM | 0.5 | EDTA | بله |
| 1.4 mM | 5 | NaCl | بله |
| 2% | --- | CTAB | خیر |
| 0.2% | --- | mercaptoethanol | خیر |
| 1% | ---- | PVP40 | خیر |

در نهایت حجم بافر با آب مقطر دوبار تقطیر استریل، به ۱۰۰ میلی‌لیتر و pH آن با استفاده از HCl به ۵ رسانده شد.

### ۳-۲-۳- محلول‌های مورد نیاز

#### ۳-۲-۳-۱- محلول تریس اسید کلریدریک ۱ مولار (Tris-HCl 1M pH = 8):

مقدار ۱۲۱/۱ گرم تریس را در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، حل کرده بعد از حل شدن کامل pH محلول که تقریبا ( ۱۱-۱۰/۵) می باشد به ۸ رسانده شد. تنظیم pH با استفاده از اسید کلریدریک غلیظ و در زیر هود انجام شد. در موقع تنظیم pH باید به این نکته توجه شود که اضافه کردن HCl باعث افزایش دما و کاهش pH محلول می‌شود، باید صبر کرد تا دمای محلول به دمای محیط برسد، اضافه کردن HCl را باید تا زمانی ادامه داد که pH محلول در دمای محیط به ۸ برسد. بعد از این مرحله، حجم محلول با آب دوبار تقطیر استریل به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در یخچال نگهداری شد.

#### ۳-۲-۳-۲- محلول اتیلن‌دی‌آمین‌ترا استیک‌اسید ۰/۵ مولار (EDTA, 0.5M) pH= 8):

مقدار ۱۸/۶۱۲گرم EDTA در ۷۵ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل شد و با استفاده از یک همزن مغناطیسی بهم زده شد تا کاملا حل شود. pH محلول با استفاده از سود ۱۰ مولار به ۸ رسانده شد، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در یخچال نگهداری شد.

#### ۳-۲-۳-۳- محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl 5M)

مقدار ۲۹/۲ گرم NaCl در ۶۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد و سپس به حجم ۱۰۰میلی لیتر رسانده، سپس آن را اتوکلاو کرده و در دمای اتاق نگهداری شد.

#### ۳-۲-۳-۴- بافر Tris-HCl– EDTA (TE):

مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Tris–HCl یک مولار، با pH =8 و ۲۰۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار با pH=8 به ۹۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر اضافه کرده، حجم را با آب دوبار تقطیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در دمای اتاق نگهداری شد.

#### ۳-۲-۳-۵- بافر TBE:

ببافر TBE (بافر الکتروفورز) به صورت استوک ×5 تهیه و نگهداری و به صورت ×1 مصرف می گردد. برای تهیه استوک ×5، مقدار ۵۴ گرم Tris base، ۲۷/۵ گرم اسیدبوریک، ۲۰ میلی لیتر از استوک (pH= 8

EDTA 0.5M) را با هم مخلوط کرده به حجم ۷۵۰ میلی لیتر رسانده شد. pH محلول به ۸ رسانده، سپس با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

### ۳-۲-۴- بررسی کمیت و کیفیت DNA

#### ۳-۲-۴-۱- بررسی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری

راحت‌ترین روش بررسی کیفیت و غلظت DNA، استفاده از اسپکتروفتومتر است. حداکثر جذب نوری اسید های نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر است. روش کار به این صورت است که اگر اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) در بافر TE یا آب مقطر حل شده باشد، ابتدا با محلول TE یا آب مقطر به عنوان شاهد دستگاه را صفر می کنیم. سپس جذب نمونه را می خوانیم. محلولی که نمونه در آن حل شده بایستی شفاف و یک‌نواخت باشد. بین غلظت DNA یا RNA و جذب نوری آن در ۲۶۰ نانومتر این رابطه وجود دارد:

جذب برابر با یک برابر است با غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای RNA یا DNA تک رشته‌ای (RNA or ssDNA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای DNA دو رشته‌ای (dsDNA) می‌باشد. شرط لازم در این موارد، آن است که کیفیت DNA استخراج شده (نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به جذب در طول موج ۲۸۰ ) بین ۱/۸-۱/۶ میکروگرم بر میلی لیتر و کیفیت RNA استخراج شده بین ۲-۱/۸ میکروگرم در میلی لیتر باشد.

#### ۳-۲-۴-۲- الکتروفورز ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز افقی

در این تحقیق، جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی و قطعه قطعه شدن و بررسی DNA تکثیر شده حاصل از PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. به این منظور ۱ گرم آگارز به ۱۰۰ میلی لیتر بافر ×1 TBE[1] اضافه کرده سپس تا زمان حل شدن در ماکروویو قرار داده شد. تانک الکتروفورز، شانه و صفحه نگهدارنده ژل[2] با آب مقطر استریل شسته شدند. دو وجه آزاد صفحه ژل مسدود شده و صفحه ژل در سطح صاف و تراز ثابت قرارداده شد. محل شانه در صفحه ژل تنظیم گردید بطوری که لبه پایینی شانه ۱ میلی‌متر از کف صفحه ژل فاصله داشته باشد. با توجه به حجم صفحه ژل میزان معینی از آگارز را توزین

1- Tris Borate Ethylene Di-amin Tetra Acetate (TBE)
2- Gel Tray

کرده و ژل در بافر مربوطه تهیه شد. زمانی که ژل کمی خنک شد، درون صفحه ژل ریخته شد. بعد از سرد شدن و بستن ژل، شانه ژل به آرامی بیرون کشیده شد. ژل درون تانک حاوی بافر TBE 1× قرار می‌گیرد. باید توجه کرد بافر باید مشابه و هم غلظت بافری باشد که برای تهیه ژل استفاده شده است. بافر باید حدود یک میلی‌متر روی سطح ژل را بپوشاند. نمونه‌ای که با بافر بارگذاری[1] مخلوط شده است، درون چاهک‌های ژل آگارز با دقت بارگذاری شد. محفظه پوشش تانک الکتروفورز بسته شده و جریان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ و به مدت ۱۲۰ دقیقه برقرار گردید.

### PCR-۵-۲-۳

برای انجام واکنش PCR، از دستور العمل ویلیامز[2] و همکاران (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. مخلوط ۲۵ میکرولیتر PCR محتوی: ۱ میکرولیتر، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگوی تهیه شده، ۱/۵میکرولیتر، $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت unit/µl ۵، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت 10 ppm، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 1× دارای غلظت 10× (بافر 10X PCR شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCL 1× با اسیدیته ۸/۳، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم (KCl)، ۱۵ میلی‌مولار منیزیم کلرید ($MgCl_2$) و ۰/۰۱٪ (حجمی/ وزنی) ژلاتین[3] ( موجب پایداری Taq پلیمراز و افزایش تکثیر) می‌باشد) و ۱۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل بود.

در این تحقیق تعداد ۲۱ آغازگر مورد استفاده از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. آغازگرها طبق فرمول مربوط به هر یک که شرکت تولیدکننده روی هرکدام ذکر کرده رقیق شده و در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آغازگرهای مورد استفاده در این پایان نامه با بررسی‌های انجام شده در بانک ژن و مرور مقالات، طراحی و انتخاب گردیدند و سعی شد تا آغازگرهایی که در مطالعات قبلی چندشکلی در ژنوم انگور نشان داده بودند استفاده گردد. جدول (۳-۲) اسامی آغازگرها و توالی آنها را نشان می‌دهد.

1- Loading dye
2- Williams
3- Gelatin

برای انجام واکنش PCR ابتدا یک مخلوط اولیه[1] از تمامی مواد PCR (به جز DNA) بر اساس تعداد واکنش ها با در نظر گرفتن یک کنترل منفی (بدون DNA) تهیه گردید. تهیه مخلوط اولیه این مزیت را دارد که موجب کاهش خطاهای مربوط به پیپت نمودن حجم های کم می شود. سپس آنزیم Taq DNA polymerase را اضافه کرده و آن را به هم می‌زنیم. پس از آن با تقسیم مخزن مخلوط براساس تعداد نمونه مورد بررسی، تکثیر PCR را انجام می دهیم.

جدول ۳- ۲:توالی آغازگرهای مورد استفاده

| آغازگر | توالی (5' -> 3') | آغازگر | توالی (5' -> 3') |
|---|---|---|---|
| Gret1Fa | RtgcgtccRgacaccctgt | UBC815 | ctctctctctctctt |
| Tvv1Fa | tccaRcttcaggggagtgt | Ms3 | caccaccaccaccaccaccact |
| Vine1Fa | ttcagcactcttcatcaataaa | Ms4 | cacacacacacacacacag |
| A7 | agagagagagagagagagagt | Ms7 | agagagagagagagagagagg |
| 848 | cacacacacacacacaRg | Ms8 | agagagagagagagagagagc |
| 857 | acacacacacacacacYg | Ms11 | ctctctctctctctctctg |
| 840 | gagagagagagagagaYt | Ms12 | tctctctctctctctctcc |
| 825 | acacacacacacacact | Ms13 | gtgtgtgtgtgtgtgtgtc |
| UBC812 | gagagagagagagagaa | Ms14 | tgtgtgtgtgtgtgtgtgc |
| UBC849 | gtgtgtgtgtgtgtgtcg | R= Purine (A/G) | Y=Pyrimidine (C/T) |

### ۳-۲-۵-۱- الگوی دمایی

ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق ساخت کمپانی BIORAD بود. ابتدا دمای اتصال بهینه هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادیانت بدست آمد. در این تحقیق، برنامه دمایی همه آغازگرها مشابه هم تنظیم شد و تنها بخش متغیر آن دمای اتصال[2] آغازگر به DNA تک رشته بود.

1- Master mix
2- Anealling tempretuer

پروتکل PCR با ۹۴ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۴ سیکل (۹۴ درجه سانتی گراد: ۳۰ ثانیه، ۵۵-۵۰ درجه سانتی گراد: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد: ۵۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد: ۱۰ دقیقه ادامه یافت.

### ۳-۲-۵-۲- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز

محصول PCR برای هر آغازگر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد (W/V) در (1×) TBE جدا شدند. برای تهیه ژل، پس از مخلوط کردن ۱/۳ گرم آگارز با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر (1× TBE) نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه با جریان ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق، از نوع الکتروفورز افقی مدل E132 بود. آنگاه ژل درون دستگاه عکسبرداری[1] تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل عکس تهیه شد. نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰bp) به میزان ۴ µl در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۲-۶- تجزیه داده ها

الگوی باندی حاصل براساس وجود یا عدم وجود باند، به صورت یک و صفر امتیاز دهی[2] شد. سپس بر اساس ماتریس صفر و یک، فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد با استفاده از ضرایب مختلف محاسبه گردید. مقدار عددی ضرایب تشابه بین صفر و یک است که مقدار صفر، بیانگر عدم وجود باندهای مشترک (عدم شباهت ژنتیکی) و مقدار یک، بیانگر الگوهای باندی یکسان (تشابه ژنتیکی کامل) است. داده‌های این ماتریس سپس توسط نرم‌افزارهای NTSYS 2.02e[3] (رولف[4]، ۲۰۰۰)، (GenAlEx6.5[5] (پیکال و اسموس[6]، ۲۰۰۶) و PopGene 1.32[7] ( یه و همکاران، ۱۹۹۹) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

---

1- Gel Documentaion
2- Scoring
3- Numerical Taxonomy and Multivariance Analysis System
4- Rohlf
5- Genetic Analysis in Excel
6- Peakall and Smouse
7- Population Genetic Analysis

تست منتل[1]، آزمونی ریاضی برای بررسی همبستگی میان دو ماتریس است که این دو ماتریس باید رتبه مشابهی داشته باشند. این تست در سال ۱۹۶۷ توسط منتل ارائه گردید و در علم اکولوژی برای تخمین فاصله میان گونه‌های یک موجود به کار برده می‌شود. ماتریس‌های تشابه دایس ، جاکارد و تطابق ساده را ابتدا با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02e اندازه گرفتیم و سپس به بررسی کوفنتیک[2] و همبستگی میان ماتریس‌های حاصله با استفاده از تست منتل پرداخته شد. همچنین از این نرم افزار برای رسم دندروگرام با استفاده از روش کلاستربندی UPGMA ماتریس کوفنتیک و تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده کردیم.

از نرم‌افزار GenALEx 6.5 برای اندازه‌گیری شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، تعداد آلل‌های موثر، تعداد آلل‌های متفاوت استفاده شد. برای اندازه‌گیری درصد چندشکلی و تعداد باندهای چند شکل از نرم افزار PopGene 1.32 استفاده شد.

### ۳-۲-۷-تجزیه‌های چند متغیره آماری

#### ۳-۲-۷-۱-ضریب تشابه جاکارد

تشابه جاکارد و یا ضریب تشابه جاکارد که اغلب شاخص جاکارد نامیده می‌شود، یک روش آماری برای مقایسه تشابه و تنوع بین تعداد نمونه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد (جاکارد، ۱۹۱۲).

#### ۳-۲-۷-۲- تجزیه خوشه‌ای

یکی از روش‌های آماری چند متغیره است که برای تعیین تنوع بین جوامع مختلف گیاهی و جانوری و دسته‌بندی آنها به گروه‌های مختلف براساس فاصله یا تشابه ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (صبوری و همکاران، ۲۰۰۸). این روش در دو مورد می‌تواند به به‌نژادگر کمک کند: یکی پیدا کردن گروه‌های واقعی

1- Mantel Test
2- Cophenetic

افراد براساس تشابه ژنتیکی بین آنها و دیگری کاهش داده‌ها و افراد محدودی از هر گروه یا دسته انتخاب می‌شوند (جابسون[1] و همکاران، ۱۹۹۲).

### UPGMA[2] -۳-۷-۲-۳

یک روش ساده برای خوشه‌بندی نمونه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد، و برای رسم درختچه‌های کوفنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد که منعکس‌کننده‌ی ساختار موجود در یک ماتریش تشابه است (لگندر و همکاران، ۱۹۹۸).

### ۳-۲-۷-۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی

یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را می‌توان برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین مؤلفه های نشان دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشند.

### ۳-۲-۷-۵- شاخص شانون

شاخص تنوع یک معیار ریاضی برای نشان دادن تنوع گونه‌ها می باشد که به زیست شناسان برای پی بردن به ساختار جامعه و تنوع موجود در آن کمک می‌کند. شاخص تنوع شانون یکی از شاخص‌های مـورد استفاده برای توصیف تنوع گونه‌ها در جامعه می‌باشد. جامعه‌ی با تنوع بالا دارای شاخص تنوع شانون بالا و جامعه با تنوع کم شاخص شانون پایینی دارد (بیگن و همکاران، ۱۹۹۶).

1- Jabson
2- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

### ۳-۲-۷-۶- هتروزیگوستی

برای یک جایگاه ژنی به صورت فراوانی افراد هتروزیگوس برای آن جایگاه نسبت به کل افراد جمعیت تعریف می شود. مقدار آن با افزایش تعداد آلل ها، افزایش یافته و زمانی که فراوانی آللی یکسان باشد ماکزیمم می شود (فالکونر، ۱۹۹۶).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار($H_e$)، نسبت برآورد شده افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که به صورت تصادفی انتخاب شده است. یک جایگاه ژنی اگر هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۱ باشد، چند شکل است و اگر این مقدار بیش ار ۰/۷ باشد، به شدت چند شکل است (جوثی، ۲۰۰۸).

# فصل چهارم

# نتایج و بحث

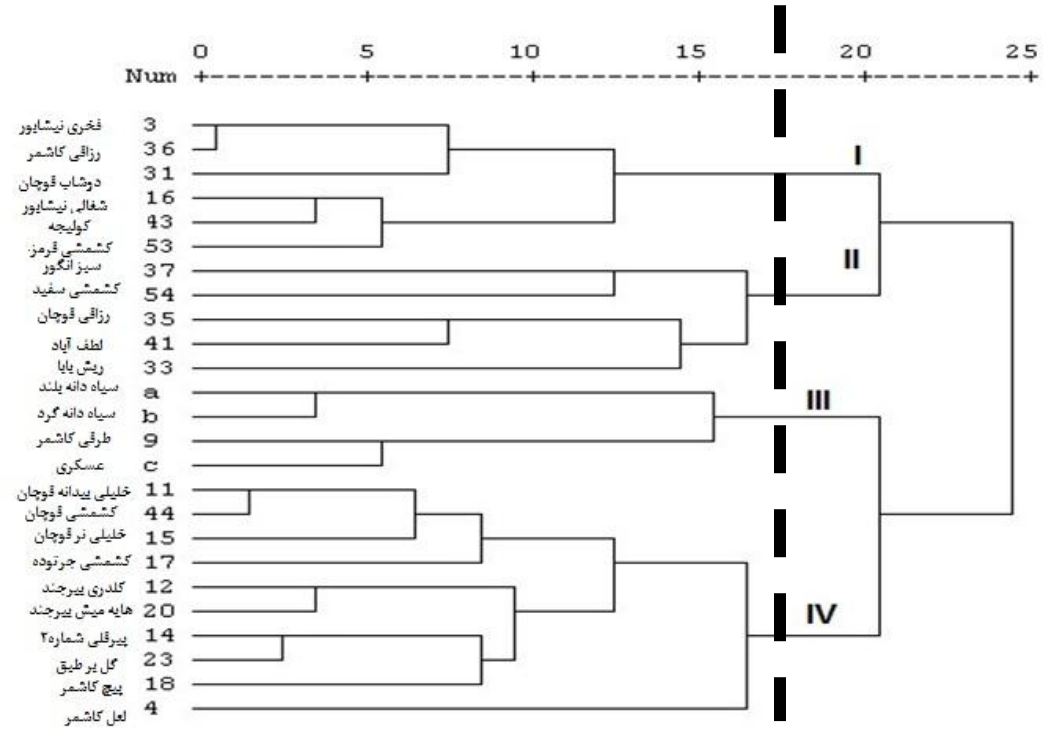
## ۴-۱- تجزیه خوشه‌ای ارقام مختلف انگور براساس داده‌های مورفولوژیکی

به منظور گروه‌بندی ارقام براساس صفات مورفولوژیک، با استفاده از داده‌های استاندارد شده، از تجزیه خوشه‌ای به روش‌های وارد و دورترین همسایه‌ها مبتنی بر فاصله اقلیدوسی انجام گرفت که از هر دو نتایج مشابهی حاصل گردید. دندروگرام حاصل از تجزیه در فاصله ۱۶ بر اساس برش داده شد و چهار گروه به دست آمد که حاکی از وجود تنوع بالای مورفولوژیکی در بین ارقام مورد مطالعه است. خط برش بر استفاده از آزمون اف بیل[1] تعیین شد (دهداری و همکاران، ۱۳۸۰). در آزمون مذکور گروه‌ها به عنوان تیمار و افراد داخل آنها به عنوان تکرار (طرح کاملا تصادفی نامتعادل) در نظر گرفته شدند و پس از تجزیه واریانس، در صورت معنی‌دار شدن F برای حداقل ۵۰ درصد صفات اندازه‌گیری شده‌هاستنباط می‌شود که شمار گروه‌ها به طرز درستی برگزیده شده‌اند.

بر اساس این گروه‌بندی، رقم‌های فخری نیشابور، رزاقی کاشمر، دوشاب قوچان، شغالی نیشابور، کولیجه و کشمشی قرمز در خوشه اول قرار گرفتند، در این گروه، رقم‌های فخری نیشابور، رزاقی کاشمر، دوشاب قوچان، شغالی نیشابور مربوط به یک اقلیم هستند. این ارقام از نظر شکل پهنک و تشکیل دانه در میوه مشابه بودند، شکل پهنک سه‌گوش و دانه در آنها رشد کاملی داشت. ارقام سبز انگور، کشمشی سفید، رزاقی قوچان، لطف‌آباد و ریش‌بابا در خوشه دوم قرار گرفتند. ارقام سیاه دانه‌بلند، سیاه دانه‌گرد، طرقی کاشمر و عسکری در خوشه سوم قرار گرفتند، در این خوشه رقم‌های سیاه دانه‌بلند، سیاه دانه‌گرد و عسکری مربوط

1- F Beele's

به شهر سی‌سخت و واقع در یک اقلیم هستند. برگ کامل در این ارقام پنج لوب دارد و حبه‌ی آنها کم آب بود. ارقام خلیلی بیدانه قوچان، کشمشی قوچان، خلیلی نر قوچان، کشمشی جرتوده، کلدری بیرجند، هایه میش بیرجند، پیرقلی شماره ۲، گل بر طبق، پیچ کاشمر و لعل کاشمر در خوشه ۴چهارم قرار گرفتند، ارقام خلیلی بیدانه قوچان، کشمشی قوچان و خلیلی نر قوچان مربوط به یک منطقه هستند، در اعضای این گروه برگ کامل پنج لوب، طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی کمی کوتاه‌تر، دندانه ترکیبی از هر دو طرف راست و برآمده، دم خوشه کوتاه و دانه رشد کاملی داشت. همچنین ارقام کلدری بیرجند و هایه میش بیرجند مربوط به یک منطقه هستند، در اعضای این گروه طول دندانه متوسط، شکل دندانه از هر دو طرف راست، اندازه خوشه متوسط، دم خوشه کوتاه، اندازه حبه متوسط، شکل حبه بیضی و دانه رشد کامل دارد. در این گروه، ارقام پیچ کاشمر و لعل کاشمر نیز مربوط به یک منطقه هستند، این دو رقم دارای پهنک پنج - وجهی، طول دمبرگ کمی بزرگ‌تر از رگبرگ میانی، اندازه خوشه کوچک و دانه با رشد کامل هستند.




شکل-۴- ۱: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم‌های مختلف انگور به روش ward براساس صفات مورفولوژیکی بر اساس این دندروگرام ارقام مورد مطالعه به ۴ گروه تقسیم شدند که سه رقم سی سخت در یک گروه قرار گرفتند، - رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، ۹- طرقی 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- هایه

میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و c - عسکری

با توجه به قرارگیری رقم‌های فخری نیشابور و شغالی نیشابور در گروه اول، سیاه دانه‌بلند و سیاه دانه-گرد در گروه سوم، خلیلی بیدانه قوچان، کشمشی قوچان و خلیلی نر قوچان در گروه چهارم، و کلدری بیرجند و هایه میش بیرجند در گروه چهارم به نظر می‌رسد رقم‌هایی که مربوط به یک منطقه خاص هستند، در گروه‌های مشابه قرار گرفتند (شکل۴-۱).

بر اساس ماتریس تشابه بین صفات مورفولوژیک، بیشترین ضریب تشابه ۰/۷۱ و کمترین ضریب تشابه ۰/۰۱۴ بود، که دو رقم رزاقی کاشمر و فخری نیشابور بیشترین تشابه و از طرف دیگر دو رقم خلیلی بیدانه قوچان و کشمشی قرمز کمترین تشابه را با هم داشتند. بنابراین دو رقم خلیلی بیدانه قوچان و کشمشی برای تلاقی در کارهای اصلاحی مناسب هستند.

## ۴-۲- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های مورفولوژیک

برای تعین سهم صفات در میزان تنوع و تعیین متنوع‌ترین صفات، گروه‌بندی صفات و کشف روابط پنهانی بین آنها، از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده می‌گردد. مؤلفه‌های اصلی می‌توانند به عنوان معیارهایی برای نشان دادن روابط درونی داده‌ها جالب توجه باشند. دانستن این موضوع که امکان کاهش تعداد متغیرهای اولیه وجود دارد حائز اهمیت است زیرا اکثر این متغیرها ممکن است موارد مشابهی را اندازه‌گیری نمایند. با این‌حال تجزیه به مؤلفه‌های اصلی لزوماً نمی‌تواند تعداد زیادی از متغیرهای اولیه را به تعداد کمتری از متغیرهای تبدیل شده کاهش دهد. در واقع، اگر متغیرهای اولیه همبستگی نداشته باشند، این تجزیه دستاوردی نخواهد داشت. بهترین نتایج زمانی حاصل می‌گردد که متغیرهای اولیه دارای همبستگی شدید مثبت و یا منفی باشند (آقایی و همکاران، ۱۳۸۹). در این تحقیق در هر مؤلفه اصلی و مستقل، ضرایب بزرگتر از ۰/۵ به عنوان عامل معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. علامت ضرایب در داخل هر عامل نشان دهنده ارتباط موجود در میان این صفات می‌باشد. از بزرگترین ضرایب عاملی یا مجموعه‌ای از

صفات معنی‌دار در یک عامل که از نظر مورفولوژیکی متمایز و مهم بودند، برای نام‌گذاری عامل‌ها استفاده شد. با وجود این که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای کاهش تعداد متغیرها به تعدادی عامل پنهانی، گروه-بندی صفات بر اساس روابط داخلی بین آنها، شناسایی اجزای اصلی عملکرد و بررسی تنوع ژنتیکی کاربرد دارد، لیکن نتایج حاصل از آن به صفات و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و شرایط محیطی بستگی دارد (مجیدی و ارزانی، ۱۳۸۸).

براساس نتایج حاصل از این بررسی، ۵ مؤلفه اصلی اول بیش از ۶۸/۸۶ درصد از تنوع موجود در بین ارقام را توجیه کردند، که ضرایب مربوط به این مؤلفه‌ها در جدول ۴-۱ نشان داده شده است.

جدول ۴- ۱: مقادیر مؤلفه‌های اصلی

| مؤلفه های اصلی | مقادیر ویژه | ٪ واریانس توجیه شده | ٪ واریانس تجمعی |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۲/۷۷ | ۱۹/۷۸ | ۱۹/۷۸ |
| ۲ | ۲/۴۱ | ۱۷/۲۳ | ۳۷/۰۲ |
| ۳ | ۱/۸۲ | ۱۳/۰۴ | ۵۰/۰۶ |
| ۴ | ۱/۴۵ | ۱۰/۳۸ | ۶۰/۴۴ |
| ۵ | ۱/۱۷ | ۸/۴۱ | ۶۸/۸۶ |

در این بررسی اولین مؤلفه ۱۹/۷۸درصد از تغییرات کل داده‌ها را بیان کرد. این مؤلفه همبستگی مثبت بالایی با صفات تعداد لوب (۰/۶۲۹) و عمق بریدگی‌های بالایی در برگ (۰/۵۹۴) و نیز شکل حبه (۰/۵۸۱) و آبدار بودن گوشت حبه (۰/۵۸۱) داشت. با توجه به مقادیر ضرایب مذکور در این مؤلفه شاید بتوان گفت که این صفات تحت تاثیر ژن‌های مشابهی بوده‌اند (جدول ۴-۲). دومین مؤلفه با ۱۷/۲۳درصد از تغییرات کل، همبستگی مثبت بالایی با صفات اندازه حبه (۰/۸۴۳)، تراکم خوشه (۰/۶۷۷) و اندازه خوشه بدون دم (۰/۵۶۷) داشت، مؤلفه دوم را می‌توان به عنوان مؤلفه عملکرد نام‌گذاری کرد. سومین مؤلفه با ۱۳/۰۴ درصد از تغییرات کل همبستگی مثبت بالایی با صفت رنگ پوست حبه (۰/۵۷۱) نشان داد. همچنین این مؤلفه با صفت طول دم خوشه (۰/۵۵۴) همبستگی منفی بالایی را نشان داد. مؤلفه چهارم با ۱۰/۳۸

درصد از تغییرات کل، همبستگی مثبت بالایی با صفات شکل پهنک (۰/۵۴۸)، آب‌دار بودن گوشت حبه (۰/۵۱۷) و نیز طول دندانه (۰/۵۴۸) نشان داد. مؤلفه پنجم ۸/۴۱ درصد از تغییرات کل، همبستگی مثبت بالایی با طول دندانه (۰/۶۰۲) نشان داد. ارقامی که از نظر صفات اندازه حبه، تراکم خوشه و اندازه خوشه بدون دم به عنوان ارقام برتر شناخته شدند شامل: فخری نیشابور، طرقی کاشمر، دوشاب قوچان، ریش بابا، رزاقی قوچان، رزاقی کاشمر، لطف آباد و کشمشی سفید، از نظر مؤلفه‌ی دوم جزو ارقام برتر و مطلوب محسوب می‌شوند، بنابراین اگر هدف محقق در کارهای اصلاحی تکیه بر صفاتی باشد که در مؤلفه دوم بیشترین ضریب را دارند، می‌تواند از ارقام مذکور به عنوان یک رقم مناسب استفاده نماید.

جدول ۴- ۲: ضرایب عاملی صفات مختلف در پنج مؤلفه اصلی برآورد شده

| | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ |
|---|---|---|---|---|---|
| شکل پهنک | ۰/۲۹۵ | -۰/۴۰۵ | ۰/۳۳۱ | ۰/۵۴۸ | -۰/۳۹۶ |
| تعداد لوب | ۰/۶۹۵ | -۰/۲۷۸ | ۰/۲۳۰ | ۰/۱۶۸ | ۰/۲۹۵ |
| طول دندانه | -۰/۳۰۲ | -۰/۳۵۸ | -۰/۲۰۲ | ۰/۴۸۶ | ۰/۶۰۲ |
| عمق بریدگی های بالایی برگ | ۰/۵۹۴ | -۰/۲۲۵ | ۰/۴۷۸ | -۰/۱۲۱ | ۰/۲۹۵ |
| طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی | ۰/۳۳۸ | -۰/۱۱۵ | -۰/۴۲۱ | ۰/۱۲۶ | ۰/۲۵۶ |
| شکل دندانه | ۰/۴۴۳ | -۰/۲۰۹ | -۰/۳۸۲ | ۰/۲۴۱ | ۰/۱۰۸ |
| اندازه خوشه بدون دم | ۰/۴۲۹ | ۰/۵۶۷ | ۰/۱۶۳ | -۰/۱۲۹ | ۰/۱۱۳ |
| تراکم خوشه | -۰/۰۱۷ | ۰/۶۷۷ | ۰/۴۹۶ | ۰/۱۹۷ | ۰/۱۱۱ |
| طول دم خوشه | ۰/۳۹۶ | ۰/۱۲۸ | -۰/۵۵۴ | -۰/۴۳۷ | ۰/۲۲۴ |
| اندازه حبه | ۰/۰۴۰ | ۰/۸۴۳ | ۰/۰۹۴ | ۰/۲۴۹ | ۰/۱۴۳ |
| شکل حبه | ۰/۵۸۱ | ۰/۲۳۵ | ۰/۰۳۳ | ۰/۳۱۹ | ۰/۰۷۹ |
| رنگ پوست حبه | -۰/۴۵۸ | -۰/۱۸۷ | ۰/۵۷۱ | ۰/۱۱۴ | ۰/۴۹۶ |
| آبدار بودن گوشت حبه | ۰/۵۸۱ | ۰/۳۰۱ | -۰/۱۱۹ | ۰/۵۱۷ | -۰/۱۴۶ |
| تشکیل دانه در حبه | -۰/۴۶۷ | ۰/۴۸۴ | -۰/۳۷۵ | ۰/۳۳۲ | ۰/۱۹۵ |

در به‌نژادی گیاهی، معمولاً برای ایجاد تنوع ژنتیکی یا انتقال صفات مطلوب از یک والد به والد دیگر و به عبارت دیگر، بهبود بخشیدن و اصلاح یک گیاه، از تلاقی بین دو یا چند والد مختلف استفاده می‌شود. بنابراین هر چه افرادی که دارای تشابه کمتری هستند با هم تلاقی داده شوند، نتاج دارای صفات متنوع‌تری ایجاد خواهند شد. همچنین برای استفاده از پدیده هتروزیس بایستی از افرادی استفاده کرد که از نظر ژنتیکی فاصله بیشتری با هم دارند. تجزیه خوشه‌ای این امکان را فراهم می‌سازد که افراد بر اساس صفات مختلف، طوری گروه‌بندی شوند که افراد با شباهت بیشتر، در گروه‌های نزدیک به هم و افراد با شباهت کمتر با فاصله بیشتر در گروه‌های دور از هم قرار گیرند و بر اساس آن می‌توان برای اهداف مورد نظر، افراد مناسب را برای تلاقی یا سایر کارهای اصلاحی انتخاب کرد (فرشادفر، ۱۳۷۴).

## ۴-۳- تجزیه داده های مولکولی

برای بررسی چند شکلی DNA بین ارقام مختلف انگور مناطق شاهرود (واقع در استان سمنان) و سی‌سخت (واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد)، ۲۱ آغازگر REMAP، IRAP و ISSR روی ۲۵ رقم مختلف انگور با خصوصیات متفاوت مورد آزمایش قرار گرفتند. با بررسی تعداد باندهای چند شکل، آغازگرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند.

از ۲۱ آغازگر تعداد ۶ مورد از آنها هیچ گونه باندی تولید نکردند و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرار پذیری کافی نداشتند. ۱۵ آغازگر دارای باندهای چندشکل و تکرارپذیر بودند (جدول ۴-۳).

۱۵ترکیب آغازگر فوق، مجموعا ۱۵۶ باند تولید کردند که از این تعداد ۱۴۴ باند، چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. به عبارت دیگر ۹۲/۳٪ باندها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چندشکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود، بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۱۶ عدد و مربوط به آغازگرهای ۸۲۵ و ۸۴۰ و کمترین آن ۶ عدد و مربوط به آغازگرهای Vine1Fa+ Ms3 و 857 بود.

جدول ۴- ۳: لیست آغازگرهایی چندشکل و تکرار پذیر به همراه دمای بهینه اتصال

| اسم آغازگر | نوع نشانگر | دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) |
|---|---|---|
| Gret1Fa | IRAP | ۵۵ |
| Tvv1Fa | IRAP | ۵۵ |
| Vine1Fa | IRAP | ۵۵ |
| Vine1Fa+ Ms3 | REMAP | ۵۵ |
| Gret1Fa +Ms7 | REMAP | ۵۵ |
| Gret1Fa+ Ms8 | REMAP | ۵۵ |
| Tvv1Fa+ Ms11 | REMAP | ۵۵ |
| Tvv1Fa+ Ms7 | REMAP | ۵۵ |
| Tvv1Fa+ Ms8 | REMAP | ۵۵ |
| UBC849 | ISSR | ۵۰ |
| UBC812 | ISSR | ۵۰ |
| 825 | ISSR | ۵۰ |
| 840 | ISSR | ۵۰ |
| 848 | ISSR | ۵۰ |
| 857 | ISSR | ۵۰ |

## ۴ -۳-۱-نتایج آنالیز خوشه ای

به منظورگروه‌بندی ارقام براساس داده‌های REMAP، IRAP و ISSR، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V.PC 2/02، سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای ارقام مورد مطالعه محاسبه گردید، بعد از

آن با مقایسه ضریب کوفنتیک هر سه ماتریس با ضریب کوفنتیک حاصل از مقایسه میزان همبستگی میان ضرایب تشابه، ضریب تشابه جاکارد به عنوان مناسب‌ترین ضریب برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید.

براساس ماتریس تشابه حاصله روش‌های مختلف کلاستربندی مورد مقایسه قرار گرفت که با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های تشابه و ماتریس خروجی دندروگرام، کلاستر بندی براساس روش UPGMA مناسب‌ترین گروه بندی را ایجاد نمود.

هر چند که به دلیل عدم دسترسی، تمام ارقام انگورهای موجود در کشور ایران در این مطالعه به کار گرفته نشده‌اند، ولی با این وجود ارقام به کار گرفته شده در این پژوهش نشان از وجود تنوع ژنومی قابل توجهی در ارقام مورد بررسی دارد. نتایج حاصل از گروه‌بندی ارقام مختلف نشان دادند، ارقام فخری نیشابور و کولیجه در یک گروه قرار می‌گیرند که ممکن است جد مشترکی داشته باشند. نکته قابل توجه عدم تشابه ژنومی ارقام جمع آوری شده از منطقه سی‌سخت می‌باشد، در خیلی از این گروه‌بندی‌ها ارقام سیاه دانه‌بلند، سیاه دانه‌گرد و عسکری که هر سه از منطقه سی‌سخت جمع‌آوری شدند در گروه‌های جدا از هم قرار گرفتند، این موضوع مبین این است که تنوع بین ارقام انگور در این منطقه زیاد است.

### ۴-۳-۱-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP

در این تحقیق از ۱۳ آغازگر رتروترانسپوزونی (3 آغازگر IRAP و ۱۰ آغازگر REMAP) استفاده شد که مبتنی بر توالی‌های رتروترانسپوزونی LTRدار Vin1، Tvv1 و Gret1 هستند که قبلا از انگور شناسایی شدند. از میان سه آغازگر Tvv1Fa، Vin1Fa و Gret1Fa برای IRAP همگی تولید باند کردند. این درحالی بود که قبلا پریرا و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه که روی چهار رقم انگور پرتغالی با استفاده از نشانگرهای REMAP و IRAP با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر توالی رتروترانسپوزونی Gret1Fa برای شناسایی ارقام مذکور داشتند گزارش کردند که Gret1Fa در انگور تولید باند نکرده است. ولی لابرا و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که آغازگر رتروترانسپوزونی Vin1 در انگور تولید باند کرده است. کلودی و همکاران (۲۰۱۰) و کاسترو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که آغازگر Tvv1Fa در انگور تکثیر شد.

۳ آغازگر رتروترانسپوزونی IRAP به کار برده شده، در مجموع ۳۵ باند در ۲۵ رقم انگور تولید کردند. در نهایت ۳۳ مورد از این باندها چندشکلی نشان دادند. آغازگر Vin1Fa با ۱۲ لوکوس بیشترین تعداد لوکوس دارای چندشکلی و آغازگر Gret1Fa با ۱۰ لوکوس کمترین لوکوس دارای چندشکلی را نشان داد، که در مجموع آغازگرهای Vin1Fa و Gret1Fa با ۱۰۰ درصد، بیشترین درصد چندشکلی و آغازگر Tvv1Fa با ۸۴/۶۲ درصد، کمترین چندشکلی را داشتند. الگوی باندی حاصل از آغازگر Tvv1Fa از سری آغازگرهای IRAP در شکل۴-۳ نشان داده شده است.

تمامی آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف انگور را نشان دادند و دندروگرام رسم شده با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA برای هر آغازگر به صورت جداگانه ترسیم شد (شکل۴-۴). بر اساس این دندروگرام رقم‌های فخری نیشابور، لعل کاشمر، رزاقی قوچان، خلیلی بیدانه قوچان، سبز انگور، پیرقلی شماره۲، کشمشی جرتوده، کولیجه، کشمشی قوچان، طرقی کاشمر، کلدری بیرجند، لطف آباد، ریش بابا و رزاقی کاشمر در گروه اول، هایه میش بیرجند، دوشاب قوچان و کشمشی سفید در گروه دوم، خلیلی نر قوچان، پیچ کاشمر، گل بر طبق و کشمشی قرمز در گروه سوم، سیاه دانه بلند و سیاه دانه گرد در گروه چهارم، شغالی نیشابور در گروه پنجم و عسکری در گروه ششم قرار گرفتند. که از نکات قابل توجه در این گروه بندی این است که دو رقم انگور سیاه دانه بلند و سیاه دانه گرد که از منطقه سی‌سخت جمع‌آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند که نشان می‌دهد این دو رقم احتمالا از نظر ژنتیکی با هم تفاوتی ندارند و در واقع یک رقم هستند.

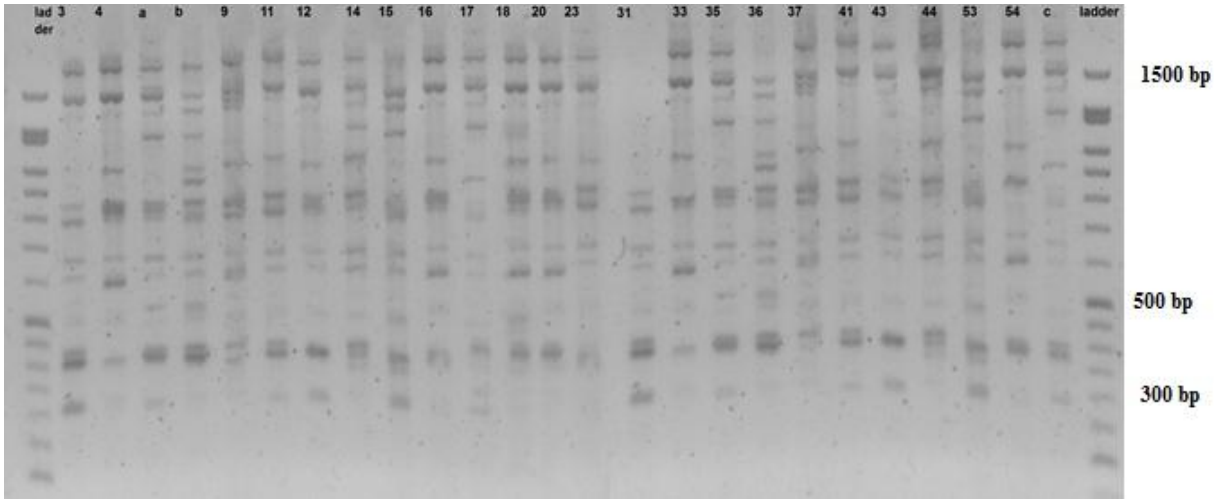
جدول ۴- ۴: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهایIRAP

| ترکیب پرایمری | نوع آغازگر | تعدادکل باندها | تعداد باندهای چندشکل | درصد چندشکلی | شاخص شانون (SI) | هتروزیگوسیتی مورد انتظار | تعداد آلل‌های موثر (Ne) | تعداد آلل‌های متفاوت (Na) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gret1Fa | IRAP | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰۰ | ۰/۵۷ | ۰/۳۹ | ۱/۶۶ | ۲ |
| Tvv1Fa | IRAP | ۱۳ | ۱۱ | ۸۴/۶۲ | ۰/۵۱ | ۰/۳۵ | ۱/۶۴ | ۱/۸۴ |
| Vine1Fa | IRAP | ۱۲ | ۱۲ | ۱۰۰ | ۰/۵۱ | ۰/۳۴ | ۱/۶۰ | ۲ |

از نظر تعداد آلل‌های موثر (Ne)، آغازگر Vine1Fa با مقدار ۱/۶۰ کمترین مقدار و آغازگر با مقدار ۱/۶۶ بیشترین مقدار را داشتند. همچنین از نظر هتروزیگوسیتی موردانتظار آغازگر Vin1Fa با میزان ۰/۳۴ کمترین و Gret1Fa با میزان ۰/۳۹ بیشترین مقدار را داشتند. آغازگر Gret1Fa بیشترین مقدار شاخص شانون را به خود اختصاص داد. بنابراین این آغازگر تنوع بین ارقام مورد مطالعه را نسبت به سایر آغازگرهای IRAP بهتر نشان می‌دهد.

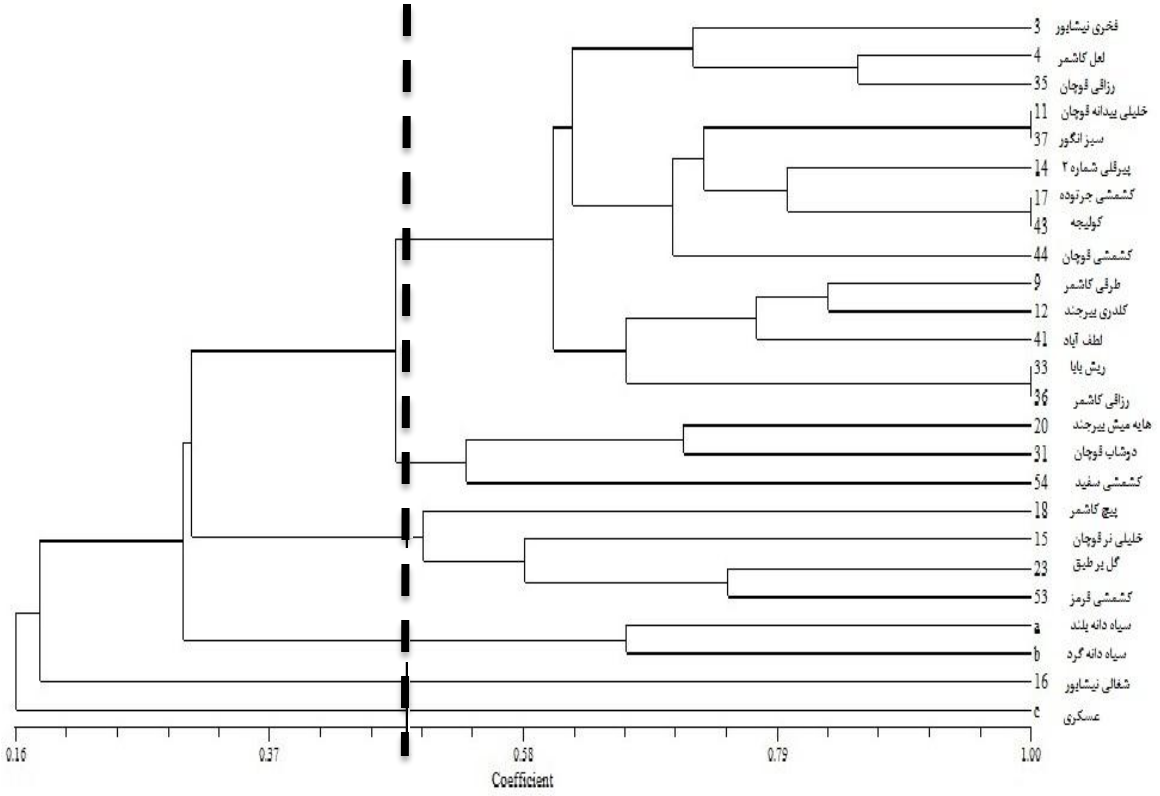
در دندروگرام حاصل از داده‌های IRAP رقم‌های خلیلی بیدانه قوچان با لطف آباد، رزاقی قوچان با سیاه دانه بلند از سی‌سخت، کشمشی قوچان با سبز انگور و پیچ کاشمر با هایه میش بیرجند بیشترین تشابه ژنتیکی را دارند. که به نظر می‌رسد این رقم‌ها که از نظر ژنتیکی بیشترین شباهت را به هم دارند در اصل بومی یک منطقه بودند ولی به دلیل انتقال توسط محققین به مناطق مختلف اسامی متفاوتی را بر خود گرفتند.همچنین در طبقه‌بندی با استفاده از دندروگرام، رقم‌های لعل کاشمر، طرقی کاشمر و رزاقی کاشمر همگی از کاشمر در یک گروه، رزاقی قوچان، خلیلی بیدانه قوچان و کشمشی قوچان از قوچان در یک گروه و سیاه دانه بلند و سیاه دانه گرد هردو از سی سخت در یک گروه قرار گرفتند که با توجه به شرایط اقلیمی یکسان توجیه پذیر است. از طرف دیگر، طبقه‌بندی رقم‌ها بر اساس دندروگرام نشان می‌دهد که بیشتر این رقم‌ها بومی یک منطقه نبودند و از مناطق مختلف در کنار هم جمع‌آوری شدند. جهت تعیین همبستگی و مقایسه ماتریس‌های تشابه بین نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگر IRAP از آزمون منتل استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین ماتریس‌های تشابه حاصل از دو نوع نشانگر مورد استفاده وجود دارد. بنابراین هر دو نشانگر ارزیابی نسبتا یکسانی از روابط ژنتیکی توسط هر دو گروه را نشان داده‌اند.

در هر دوگروه بندی رقم‌های فخری نیشابور، رزاقی کاشمر و کولیجه در یک گروه، ارقام رزاقی قوچان، لطف آباد و ریش بابا در یک گروه و ارقام سیاه دانه بلند و سیاه دانه گرد نیز در یک گروه قرار گرفتند. به نظر می-رسد این ارقام دارای جد مشترکی باشند.




شکل-۴- ۲: الگوی باندی حاصل از آغازگر Tvv1Fa از سری آغازگرهای IRAP

تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۳ درصد، با ولتاژ ۱۰۰ ولت و مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد، کد ارقام: ۳- رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، c- عسکری ۹- طرقی 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- هایه میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و ۵۴- کشمشی سفید




شکل-۴- ۳: دندروگرام حاصل از داده‌های IRAP برای ارقام مورد مطالعه و مقایسه ارقام شاهرود با ارقام استفاده شده از شهر سی سخت، دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود ۳ رقم سی سخت در ۲ شاخه‌ی جداگانه قرار گرفتند که دو رقم سیاه دانه بلند و سیاه دانه گرد در یک خوشه و رقم عسکری به تنهایی در خوشه‌ی جداگانه‌ای قرار گرفته است .

### ۴-۳-۱-۲- نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر REMAP

برای نشانگر REMAP ابتدا تمامی آغازگرهای ISSR روی تک نمونه DNA ارزیابی شد و آنهایی که دارای الگوی نواری مشخص و واضح بودند، در ترکیب با آغازگرهای رتروترانسپوزونی استفاده شدند. در این تحقیق از ۱۰ ترکیب آغازگری REMAP استفاده کردیم که ۴ ترکیب (Vin1Fa+Ms4، Vin1Fa+Ms11، Tvv1Fa+Ms12 و Tvv1Fa+ Ms14 ) باند واضح و آشکاری تولید نکردند. این در حالی بود که کلودی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که Tvv1Fa+ Ms12 و Tvv1Fa+ Ms14 در انگور چندشکلی نشان دادند.

از مجموع ۶ آغازگر تکثیر یافته، مجموعا ۵۲ باند تکثیر شد که ۴۶ باند چندشکل نشان دادند. میانگین تعداد کل باندها، ۸/۶۶ و میانگین باندهای چندشکل ۷/۶۶ باند بود. پرایمر Gret1Fa+ Ms8 با ۱۱ لوکوس چندشکل بیشترین و پرایمر Tvv1Fa+Ms11 با ۴ لوکوس کمترین لوکوس چندشکل را نشان دادند، که در مجموع، آغازگرهای Gret1Fa+Ms7، Tvv1Fa+Ms11 و Vin1Fa+Ms3 با ۱۰۰ درصد، بیشترین درصد چندشکلی و آغازگر Tvv1Fa+Ms8 با ۷۵ درصد، کمترین چندشکلی را داشتند. الگوی باندی حاصل از آغازگر Gret1Fa+Ms8 از سری آغازگرهای REMAP در شکل۴-۵ نشان داده شده است. آغازگر Vin1Fa+Ms3 از سری آغازگرهای REMA بیشترین مقدار SI (شاخص شانون) و آغازگر Tvv1Fa+Ms8 از سری آغازگرهای REMAP کمترین مقدار SI را داشتند. از نظر تعداد آلل‌های موثر (Ne) نیز ترکیبات آغازگری Gret1Fa+Ms7 و Tvv1Fa+Ms8 با مقدار ۱/۵۲، کمترین مقدار Ne و ترکیب آغازگری Vine1Fa+ Ms3 با مقدار ۱/۸۲، بیشترین مقدار Ne را داشتند. همچنین از نظر هتروزیگوسیتی مورد انتظار، آغازگر Tvv1Fa+Ms8 با میزان ۰/۲۹ کمترین و آغازگر Vin1Fa+Ms3 با میزان ۰/۴۴ بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار را داشتند.

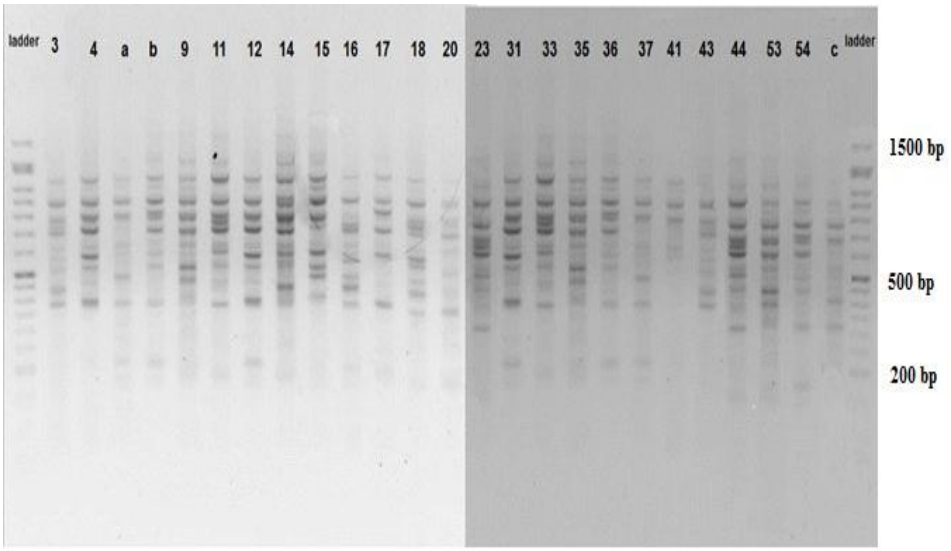
بنابراین آغازگر Vin1Fa+Ms3 نسبت به سایر آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف انگور را بهتر نشان داد. که دندروگرام‌های مربوطه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA برای هر آغازگر به صورت جداگانه ترسیم شد (شکل۴-۶).

جدول ۴- ۵: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای REMAP

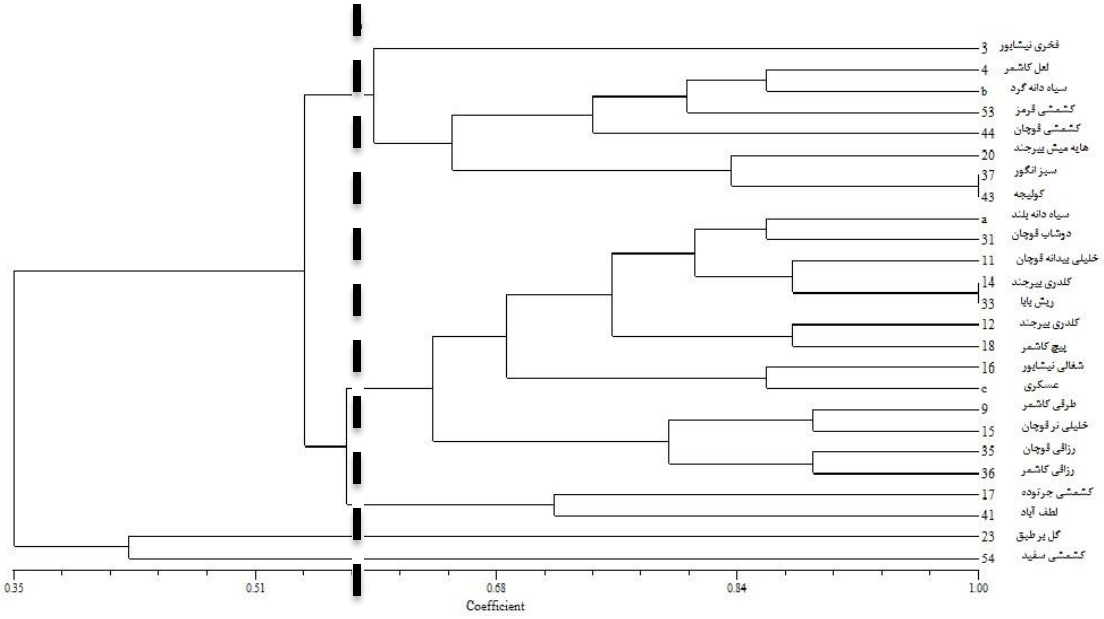
| ترکیب پرایمری | نوع آغاگر | تعدادکل باندها | تعداد باندهای چندشکل | درصد چندشکلی | شاخص شانون (SI) | هتروزیگوسیتی مورد انتظار | تعداد آلل‌های موثر (Ne) | تعداد آلل‌های متفاوت (Na) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vine1Fa+ Ms3 | REMAP | ۶ | ۶ | ۱۰۰ | ۰/۶۳ | ۰/۴۴ | ۱/۸۲ | ۲ |
| Gret1Fa +Ms7 | REMAP | ۹ | ۹ | ۱۰۰ | ۰/۴۹ | ۰/۳۲ | ۱/۵۲ | ۲ |
| Gret1Fa+ Ms8 | REMAP | ۱۲ | ۱۱ | ۹۱/۶۷ | ۰/۵۱ | ۰/۳۴ | ۱/۵۹ | ۱/۹۱ |
| Tw1Fa+ Ms11 | REMAP | ۴ | ۴ | ۱۰۰ | ۰/۶۱ | ۰/۴۲ | ۱/۷۴ | ۲ |
| Tw1Fa+ Ms7 | REMAP | ۹ | ۷ | ۷۷/۷۸ | ۰/۴۸ | ۰/۳۳ | ۱/۵۹ | ۱/۷۷ |
| Tw1Fa+ Ms8 | REMAP | ۱۲ | ۹ | ۷۵ | ۰/۴۳ | ۰/۲۹ | ۱/۵۲ | ۱/۷۵ |

بر اساس این دندروگرام رقم‌های فخری نیشابور، لعل کاشمر، سیاه دانه بلند، کشمشی قرمز، کشمشی قوچان، هایه‌میش بیرجند، سبز انگور و کولیجه در گروه اول، سیاه دانه گرد، دوشاب قوچان، خلیلی بیدانه قوچان، پیرقلی شماره۲، ریش بابا، کلدری بیرجند، پیچ کاشمر، شغالی نیشابور، عسکری، طرقی کاشمر، خلیلی نر قوچان، رزاقی قوچان، رزاقی کاشمر، کشمشی جرتوده و لطف آباد در گروه دوم، گل بر طبق در گروه سوم و کشمشی سفید در گروه چهارم قرار گرفتند. در دندروگرام حاصل از داده‌های ترکیبات آغازگری REMAP، رقم ریش‌بابا با پیرقلی شماره ۲ و سبز انگور با کولیجه بیشترین تشابه ژنتیکی را با هم داشتند، به نظر می‌رسد این ارقام منشاء یکسانی داشتند و در اثر منتقل شدن به مناطق مختلف و شرایط محیطی مختلف اسامی متفاوتی بر آنها نهادند. همچنین رقم گل برطبق با رزاقی قوچان و شغالی نیشابور با کشمشی سفید کمترین تشابه ژنتیکی را با هم داشتند. در این طبقه بندی، کشمشی قرمز و کشمشی قوچان در یک گروه قرار گرفتند که احتمالا بومی یک منطقه باشند و به دلیل قرار گرفتن تحت شرایط مختلف محیطی اسامی مختلفی را در بر گرفتند. گروه‌بندی رقم‌ها تا حدی با منطقه جغرافیای آنها هم‌خوانی داشت به طوری که رقم‌های پیچ کاشمر، طرقی کاشمر و رزاقی کاشمر از کاشمر در یک گروه و از طرف دیگر رقم‌های دوشاب قوچان، خلیلی بیدانه قوچان، خلیلی نر قوچان و رزاقی قوچان از قوچان در یک گروه قرار گرفتند که با توجه به شرایط اقلیمی یکسان توجیه پذیر است.

بر اساس گروه‌بندی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی REMAP، ارقام فخری نیشابور، کولیجه و کشمشی قرمز در یک گروه، شغالی نیشابور و دوشاب قوچان در یک گروه، سیاه دانه گرد، عسکری و طرقی کاشمر در یک گروه و همچنین ارقام خلیلی بیدانه قوچان، خلیلی نر قوچان، کشمشی جرتوده، کلدری بیرجند، پیرقلی شماره ۲ و پیچ کاشمر در یک گروه قرار گرفتند. که قرار گرفتن ارقام خلیلی بیدانه قوچان و خلیلی نر قوچان در یک گروه با توجه به شرایط اقلیمی یکسان دور از انتظار نبود. این در حالی بود که از نظر آماری معنی‌دار نبود.




شکل-۴- ۴: الگوی باند ی حاصل از آغازگر Gret1Fa+Ms8 از سری ترکیبات آغازگرهای REMAP، تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۳ درصد، با ولتاژ ۱۰۰ ولت و مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد، کد ارقام: ۳-رقم فخری نیشابور، ۴-لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، c- عسکری ۹-طرقی 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-هایه میش بیرجند، ۲۳-گل برطبق، 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 و ۵۴-کشمشی سفید




شکل-۴- ۵: دندروگرام حاصل از داده‌های REMAP برای ارقام مورد مطالعه و مقایسه ارقام شاهرود با ارقام استفاده شده از شهر سی سخت، دنروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود ۳ رقم سی سخت در ۳ شاخه‌ی جداگانه قرار گرفتند.

### ۴-۳-۱-۳-نتایج آنالیز خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR

چندین محقق گزارش کردند که نشانگر ISSR برای شناسایی ارقام انگور مفید می‌باشد. به این دلیل که این روش RAPD آسان‌تر بوده، به مقدار کمی از DNA الگو نیاز داریم و نیازی به شناسایی ژنوم نداریم (زایتکیویچ و همکاران، ۱۹۹۴). تامهانکار و همکاران (۲۰۰۸)، از ISSR برای بررسی خصوصیات و شناسایی ۱۴۳ رقم انگور استفاده کردند و آن را مفید ارزیابی کردند. همچنین نیوین و همکاران (۲۰۱۱) از نشانگرهای مورفولوژیک و ISSR با هم استفاده کردند و استفاده‌ی از آن را برای شناسایی ارقام توصیه کردند.

در این تحقیق ۸ آغازگر ISSR استفاده کردیم که ۲ آغازگر (A7 و UBC815) باندهای واضح تکثیر نکردند.۶ آغازگری که تولید باند کردند در مجموع ۶۹ باند در ۲۵ رقم انگور تولید کردند که ۶۵ باند پلی‌مورف و ۴ باند مونومورف بودند. بانددهی توسط همه آغازگرها، چندشکلی بین رقم‌ها را نشان داد (شکل۴-۲). میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر آغازگر ۱۱/۵ باند و میانگین باندهای پلی-مورف ۱۰/۸۳ باند بود، که بیشترین باند چندشکل مربوط به آغازگر ۸۲۵ با ۱۶ باند و کمترین باند مربوط به آغازگر ۸۵۷ با ۶ باند بود. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها ۹۴/۱۱ درصد بود. آغازگرهای ۸۲۵ و ۸۵۷ با میزان چندشکلی ۱۰۰درصد بیشترین درصد چندشکلی و آغازگرهای UBC812 و UBC849 با چندشکلی ۹۰ درصد کمترین درصد چندشکلی را داشتند.

در این تحقیق میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و میانگین ضریب شانون (SI) برای این آغازگرها به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۵۴ بود و بیشترین مقدارضریب شانون ۰/۶۱ و همچنین بیشترین تعداد آلل‌های موثر (۱/۷۵) و تعداد آلل‌های متفاوت (۲) مربوط به آغازگر ۸۲۵ بود و کمترین ضریب تنوع شانون ۰/۴۸ و مربوط به آغازگر UBC849 بود بنابراین آغازگر ۸۲۵ تنوع بین ارقام مورد بررسی را بهتر نشان می‌دهد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۲ و مربوط به آغازگر ۸۲۵ بود. بنابراین ۸۲۵ نسبت به سایر آغازگرهای ISSR چندشکل‌تر و تنوع را بهتر نشان می‌دهد.

بر اساس ضریب تشابه دو رقم پیچ کاشمر و ریش بابا و همچنین سیاه دانه بلند و طرقی کاشمر بیشترین تشابه را به هم داشتند. بنابراین برای استفاده در کارهای اصلاحی دو رقم پیچ کاشمر و ریش بابا مناسب‌تر هستند.

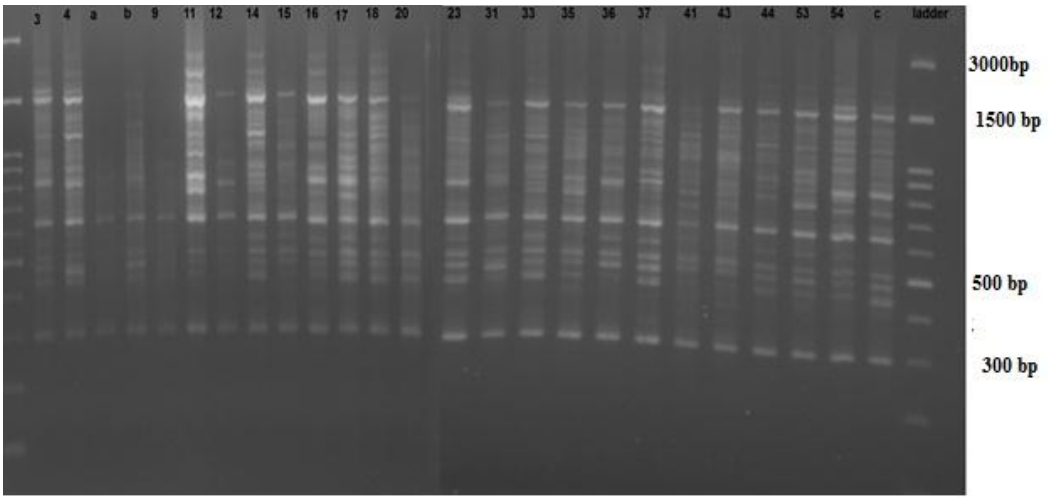
بر اساس دندروگرام حاصل از داده‌های آغازگر ISSR، ۲۵ رقم انگور در ۳ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل۴- ۳)، گروه اول به دو زیر گروه تقسیم شد که در زیر گروه الف: فخری نیشابور، لعل کاشمر، خلیلی بیدانه قوچان، پیچ کاشمر، ریش بابا، سبز انگور، پیرقلی شماره ۲، کشمشی سفید، شغالی نیشابور، گل بر طبق، کشمشی قرمز، کشمشی جرتوده، عسکری، سیاه دانه گرد، رزاقی قوچان و کشمشی قوچان، در زیر گروه ب: لطف آباد و کولیجه، در گروه دوم: خلیلی نر قوچان، رزاقی کاشمر، دوشاب قوچان و هایه میش بیرجند و در گروه سوم: سیاه دانه بلند، طرقی کاشمر و کلدری بیرجند قرار گرفتند.

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 دارای جد مشترک باشند که به خاطر انتقال آنها به مناطق مختلف و تاثیر شرایط مختلف محیطی اسامی متفاوتی را به خود گرفتند.

جدول ۴- ۶: داده‌های حاصل از آنالیز نشانگرهای ISSR

| ترکیب پرایمری | نوع آغازگر | تعدادکل باندها | تعداد باندهای چندشکل | درصد چندشکلی | شاخص شانون (SI) | هتروزیگوسیتی مورد انتظار | تعداد آلل- های موثر (Ne) | تعداد آلل- های متفاوت (Na) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UBC 849 | ISSR | ۱۰ | ۹ | ۹۰ | ۰/۴۸ | ۰/۳۲ | ۱/۵۳ | ۱/۹۰ |
| UBC 812 | ISSR | ۱۰ | ۹ | ۹۰ | ۰/۵۱ | ۰/۳۴ | ۱/۵۹ | ۱/۹۰ |
| 825 | ISSR | ۱۶ | ۱۶ | ۱۰۰ | ۰/۵۶ | ۰/۳۸ | ۱/۶۶ | ۲ |
| 840 | ISSR | ۱۶ | ۱۵ | ۹۳/۷۵ | ۰/۵۳ | ۰/۳۶ | ۱/۶۴ | ۱/۹۳ |
| 848 | ISSR | ۱۱ | ۱۰ | ۹۰/۹۱ | ۰/۵۷ | ۰/۴۰ | ۱/۷۴ | ۱/۹۰ |
| 857 | ISSR | ۶ | ۶ | ۱۰۰ | ۰/۶۱ | ۰/۴۲ | ۱/۷۵ | ۲ |

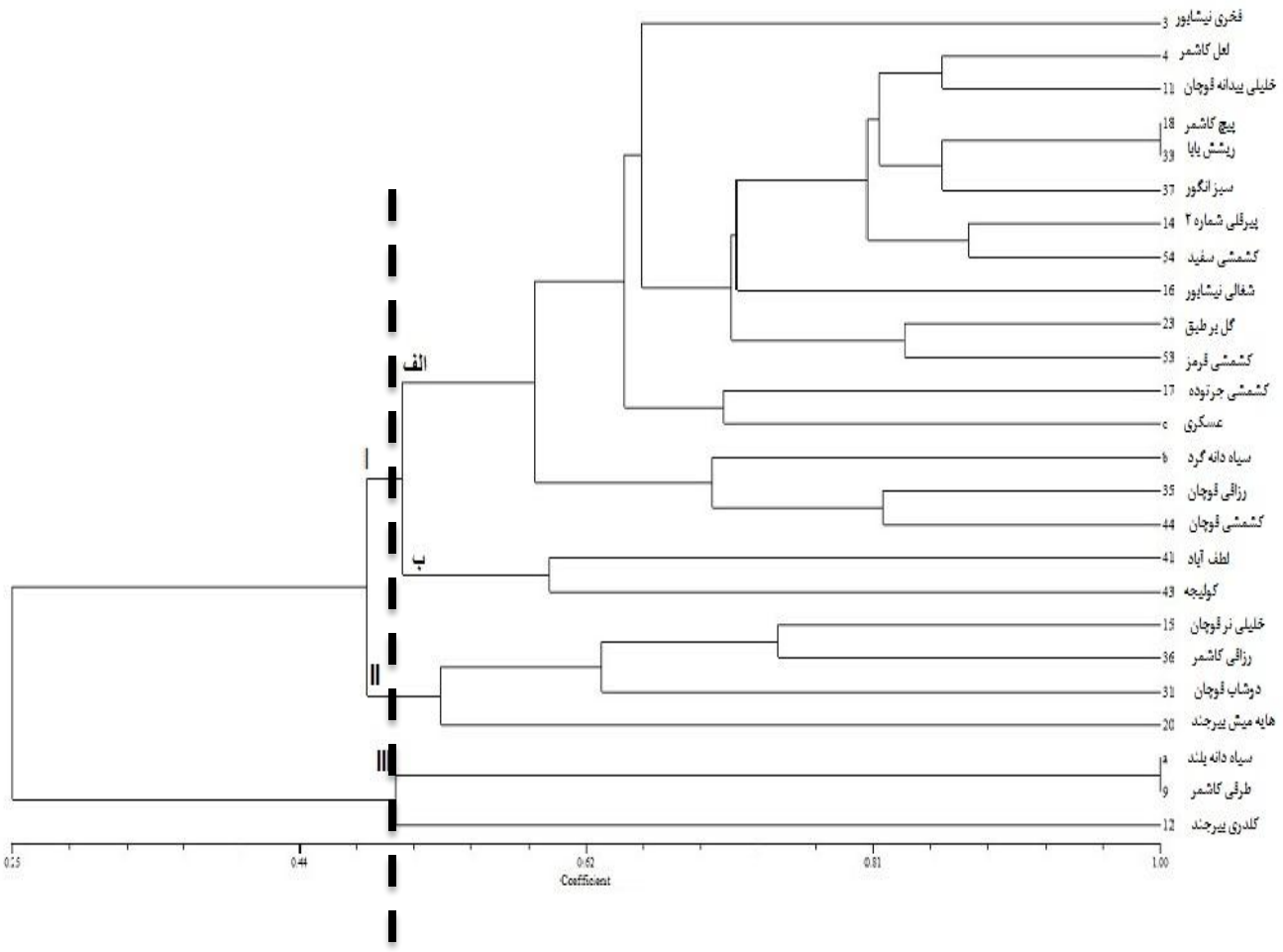
جهت تعیین همبستگی و مقایسه ماتریس‌های تشابه از آزمون منتل استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین ماتریس‌های تشابه حاصل از دو نوع نشانگر ISSR و مورفولوژیک وجود ندارد. دلیل این امر را می‌توان به ماهیت ژنتیکی نشانگرهای ISSR به کار برده شده در این تحقیق نسبت داد، به طوری که مناطقی از DNA که توسط نشانگرهای ISSR تکثیر و نمونه‌برداری شدند، مربوط به نواحی از ژنوم باشند که ترجمه نشده و در کنترل صفات مورفولوژیک نقشی ندارند(غفاریان و همکاران، ۱۳۸۸). بنابراین هر دو نشانگر ارزیابی نسبتا متفاوتی از روابط ژنتیکی توسط هر دو گروه را نشان داده‌اند.




شکل-۴- ۶: الگوی باندی حاصل از آغازگر ۸۲۵ از سری آغازگرهای ISSR، تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۳ درصد، با ولتاژ ۱۰۰ ولت و مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد، کد ارقام: ۳- رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، ۹- طرقی 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- هایه میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و c - عسکری

ولی با این حال مقایسه بین گروه‌بندی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی ISSR تا حدی مشابه است. در هر دوگروه‌بندی، رقم‌های رزاقی و دوشاب در یک گروه، فخری نیشابور، شغالی نیشابور، و کشمشی قرمز در یک گروه، سبز انگور، کشمشی سفید، رزاقی قوچان و ریش بابا، خلیلی بیدانه قوچان، کشمشی قوچان، پیرقلی شماره ۲، گل بر طبق، پیچ کاشمر و

کشمشی جرتوده در یک گروه و خلیلی نر قوچان و هایه میش بیرجند در یک زیر گروه قرار گرفتند. در مواردی رقم‌ها از نظر مولکولی در یک گروه ولی از نظر مورفولوژیکی در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند که این می‌تواند ناشی از اثر محیط در بروز صفات مورفولوژیکی باشد و یا اینکه رقم‌هایی که از نظر ژنتیکی در یک گروه قرار گرفتند در پاسخ گویی به شرایط محیطی متفاوت عمل کرده‌اند.




شکل-۴- ۷: دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR برای ارقام مورد مطالعه و مقایسه ارقام شاهرود با ارقام استفاده شده از شهر سی سخت، دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود ۳ رقم سی سخت در ۲ شاخه‌ی جداگانه قرار گرفتند که دو رقم سیاه دانه گرد و عسکری در یک خوشه و رقم سیاه دانه گرد به تنهایی در خوشه‌ی دیگری قرار گرفته است.

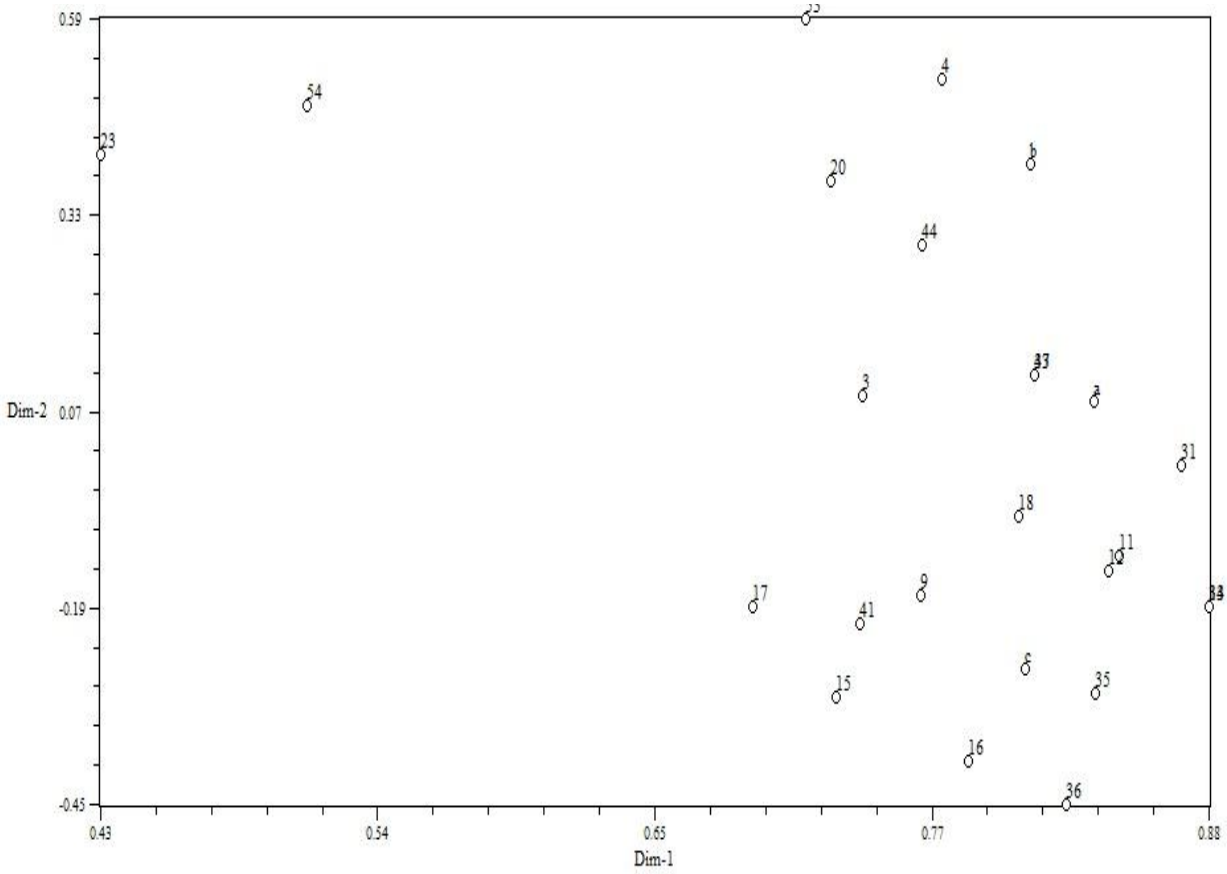
## ۴-۴- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی

تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCOA) براساس داده های مولکولی یکی دیگر از تکنیک های چند متغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را می توان برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین مؤلفه های PCOA نشان دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می باشند. بر اساس نتایج حاصل، دو مؤلفه اول یعنی PCOA1 و PCOA2 به ترتیب ۵۹/۸۹ و ۷/۴۰ (مجموعا ۶۷/۲۹٪) از واریانس کل را بیان کردند (جدول۴-۸). یعنی نشانگر های مورد استفاده دارای توزیع نسبتا مناسبی در سطح ژنوم بوده اند و در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام انگور مورد مطالعه، مناسب عمل کرده اند (شکل ۴-۷).

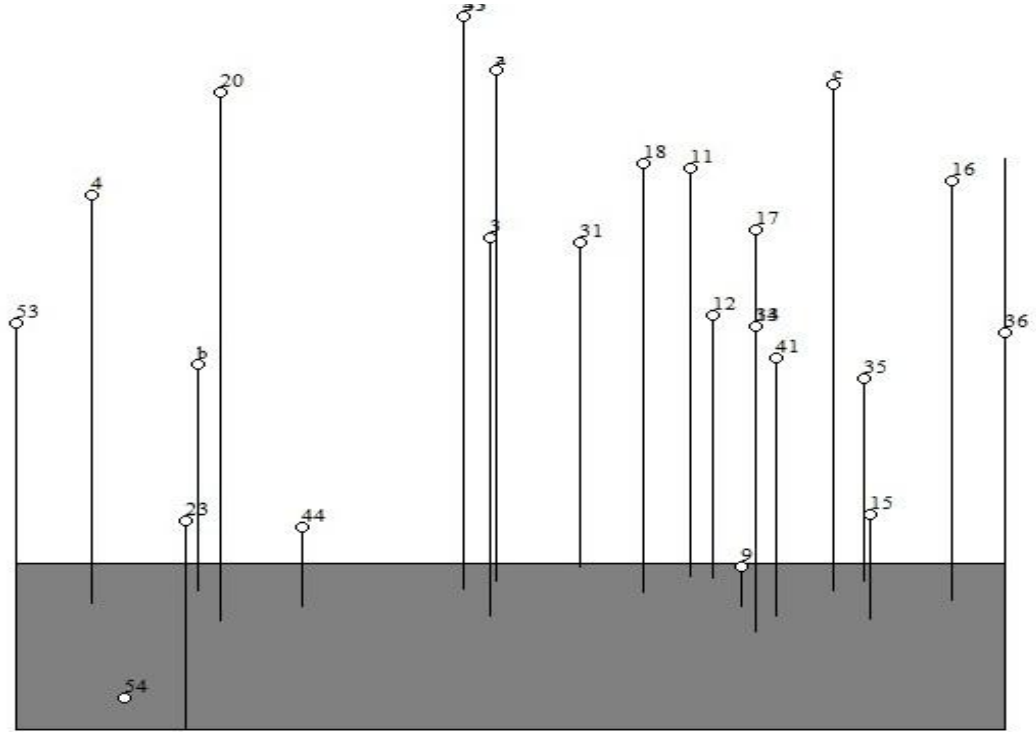
جدول ۴- ۷: مقادیر مؤلفه‌های اصلی برای بخش مولکولی

| مؤلفه ها | مقادیر ویژه | درصد مقادیر ویژه | درصد تجمعی |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۱۴/۹۷ | ۵۹/۸۹ | ۵۹/۸۹ |
| ۲ | ۱/۸۵ | ۷/۴۰ | ۶۷/۲۹ |
| ۳ | ۱/۰۹ | ۴/۳۸ | ۷۱/۶۸ |

همچنین آرایش تجمعی ارقام انگور با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر REMAP در شکل (۴-۸) نشان داده شده است. توزیع ارقام در این نمودار مطابق با توزیع توده‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل در این مطالعه می‌باشد. به طور مثال، ارقام گل بر طبق و کشمشی سفید نسبت به دیگر ارقام فاصله گرفته است و در یک نقطه تجمع یافته‌اند. در واقع نمودار دو بعدی مؤلفه‌ها ابزار دیگری جهت نشان دادن پراکنش ارقام است که می تواند به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به شمار رود.




شکل-۴- ۸: پلات تجزیه به مؤلفه های اصلی برای نشانگر REMAP ارقام انگور مورد مطالعه، کد ارقام: ۳- رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، c- عسکری ۹- طرقی 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- هایه میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و ۵۴- کشمشی سفید، در این پلات ارقامی که از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری دارند در کنار همدیگر قرار می‌گیرند.




شکل-۴- ۹: نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی، کد ارقام: ۳- رقم فخری نیشابور، ۴- لعل کاشمر، a- سیاه دانه بلند، b- سیاه دانه گرد، c- عسکری ۹- طرقی 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- هایه میش بیرجند، ۲۳- گل برطبق، 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 و ۵۴- کشمشی سفید در این پلات ارقامی که از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری دارند در کنار همدیگر قرار می‌گیرند.

## ۴-۵- نتیجه گیری

ارزیابی تنوع در ژرم پلاسم های گیاهی گامی مهم در برنامه های اصلاحی و نیز مدیریت ژرم پلاسم به حساب می آید. در این راستا، برآورد تنوع ژنتیکی در یک جامعه گیاهی به شکل قابل‌توجهی به در دسترس بودن ابزار و تکنیک‌هایی برای یک محقق و اینکه چطور این ابزار و تکنیک ها با برنامه های اصلاحی مورد نظر همسو باشند، بستگی دارد. از طرف دیگر انتخاب ژنوتیپ ها نیز نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه محدوده‌ی انتخاب هم در طبیعت و هم به طور مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی در آن، رابطه مشابهی بین کارآیی اصلاح یک جامعه و تنوع ژنتیکی موجود است. بنابراین شناسایی و حفظ و نگهداری ذخائر ژنتیکی در گیاهان اهلی شده ضروری است (عبدی و مداح عارفی[1]، ۲۰۰۲ ; کانگلو[2]، ۲۰۰۷).

همچنین از اقدامات اساسی که قبل از انجام هر برنامه اصلاحی باید مورد توجه قرار گیرد دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود است تا به نژادگر به نحو مطلوبی به خصوصیات ذخایر ژنتیکی آگاهی کامل حاصل نماید. در به‌نژادی، تنوع و انتخاب دو رکن اساسی هستند. برای اینکه بتوان انعکاس صحیحی از شباهت واقعی در بین ریخته ارثی ارقام به دست آورد، می بایست تنوع ژنتیکی موجود در بین ارقام را از لحاظ کلیه صفات مهم گیاهی مورد تجزیه قرار داد تا این ارزیابی بتواند به عنوان یک ابزار در اختیار به نژادگر قرار گیرد (فرشادفر، ۱۳۷۴). شناخت گیاهان مختلف و بررسی تنوع موجود در آنها و بررسی امکان کشت و تولید آن ها در سطوح وسیع و وضعیت گونه‌های تشکیل دهنده از لحاظ عوامل مختلف محیطی و غیرمحیطی که در استقرار و بهره گیری هر چه بی‌ش‌تر دخیل هستند، جزء اولین گام هایی است که می تواند برای تولید انبوه این گیاهان برداشته شود. بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان از جمله مطالعات کاربردی و بنیادی در مدیریت استفاده از گیاهان است.

1- Abdi and Maddah-Arefi
2- Kongolo

این تحقیق اولین مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام انگور ایران با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد.

در این تحقیق مشخص شد که رتروترانسپزون‌ها در سرتاسر ژنوم ارقام انگور مورد مطالعه حضور دارند و برای بررسی تنوع ژنتیکی این ارقام مناسب هستند، این درحالی است که قبلا نیز کاسترو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که این عناصر در ژنوم انگور حضور دارند. و به احتمال زیاد رتروترانسپوزون‌ها نقش مهمی در ساختار و سازماندهی ژنوم ارقام مختلف انگور دارند. این نتایج همچنین با توجه به سن رتروترانسپوزون‌های استفاده شده قابل تایید می‌باشد. منشا رتروترانسپوزون‌های Vin1، Tvv1 و Gret1 به ترتیب به Myr ۱۶/۷، Myr ۵/۱۸ و Myr ۲/۴۹ پیش برمی‌گردد، این در حالی است که منشا زیرگونه‌های *V. vinifera spp sylvestris* و *V. vinifera spp sativa* به ترتیب به ۱۰۰۰۰ و ۳۰۰۰ سال پیش برمی‌گردد. همچنین نشانگر IRAP با میانگین ۹۴/۸۷ درصد بیشترین چندشکلی را داشتند که نشان دهنده‌ی حضور بیشتر این نوع LTRها در ژنوم انگور می‌باشد. از طرف دیگر با بررسی تنوع ژنتیکی بدست آمده از این تحقیق و بررسی فواصل جغرافیایی و دوری و نزدیکی افراد این نتیجه بدست آمد که بطور کلی فواصل جغرافیایی دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی افراد نمی باشد. یعنی بعضی از ژنوتیپ های مربوط به اقلیم های شمال شرق درون گروه‌های با ژنوتیپ‌های اقلیم جنوب غرب و برعکس قرار می گیرند. پژوهش حاضر نشان داد که بین ارقام انگور تنوع مطلوبی وجود دارد به طوری که 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 نشانگرهای REMAP، IRAP و ISSR مفید هستند.

## ۴-۶- پیشنهادات

با توجه به پراکنش قابل توجه انگور در ایران، برای کارهای تحقیقاتی تکمیلی پیشنهادات زیر ارائه می شوند:

- بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور با استفاده از تعداد بیشتر نشانگرهای رتروترانسپوزون به منظور پوشش بیشتر و بهتر ژنوم این ارقام اجرا گردد.

- جهت بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای دیگر نیز استفاده شود و نتایج حاصل از آنها را با نتایج به دست آمده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی مقایسه شوند و نشانگرهای برتر برای بررسی روابط بین ارقام مختلف معرفی شوند.

- تنوع ژنتیکی، ارقام دیگر موجود در کشور نیز با استفاده از نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق مورد بررسی قرار گیرند.

- با توجه به وجود ارقام زیاد انگور در سرتاسر کشور ایران، لزوم تحقیقات بیشتر و شناسایی جنبه‌های ژنتیکی این درخت در تحقیقات گسترده‌تر و کامل‌تر حس می‌شود.

- با توجه به انتقال ارقام به شهرهای مختلف در تحقیقی توده‌های یک رقم را در شهرهای مختلف مورد بررسی قرار دهیم تا مشخص شود که از نظر ژنتیکی چه تغییری کردند.

- از نشانگرها برای پیدا کردن ژن‌های مطلوب و استفاده از آنها در برنامه‌ی به‌نژادی کمک بگیریم.

# ضمائم

**جدول ضمیمه ۱: ارقام انگور مورد مطالعه**

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

توجه: رقم‌های a، b و c ارقامی هستند که از شهر سی‌سخت جمع‌آوری شده‌اند.

**جدول ضمیمه ۲: لیست صفات مورد بررسی و چگونگی امتیازدهی به آنها(براساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در انگور)**

| شماره صفت | نام صفت | حالت تظاهر | امتیاز |
|---|---|---|---|
| **۱** | | قلبی | ۱ |
| | برگ کامل: | سه‌گوش | ۲ |
| | شکل پهنک | پنج‌وجهی | ۳ |
| | | مدور | ۴ |
| | | قلوه‌ای | ۵ |
| **۲** | | ندارد | ۱ |
| | برگ کامل: | سه | ۲ |
| | تعداد لوب | پنج | ۳ |
| | | هفت | ۴ |
| | | بیشتر از هفت | ۵ |
| **۳** | | کوتاه | ۳ |
| | برگ کامل: | متوسط | ۵ |
| | طول دندانه | بلند | ۷ |
| **۴** | برگ کامل: | خیلی کم | ۱ |
| | | کم | ۳ |
| | عمق بریدگی‌های جانبی بالایی | متوسط | ۵ |
| | | زیاد | ۷ |
| | | خیلی زیاد | ۹ |
| **۵** | برگ کامل: | خیلی کوتاه‌تر | ۱ |
| | | کمی کوتاه‌تر | ۲ |
| | طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی | مساوی | ۳ |
| | | کمی بلندتر | ۴ |
| | | خیلی بلندتر | ۵ |

**جدول ضمیمه ۲: لیست صفات مورد بررسی و چگونگی امتیازدهی به آنها(براساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در انگور)**

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۶ | برگ کامل: شکل دندانه | هر دو طرف فرورفته | ۱ |
| | | هر دو طرف راست | ۲ |
| | | هر دو طرف برآمده | ۳ |
| | | (یک طرف برآمده، یک طرف فرورفته) | ۴ |
| | | (ترکیبی از هر دو طرف راست و هر دو طرف برآمده ) | ۵ |
| ۷ | خوشه: اندازه بدون دم | خیلی کوچک | ۱ |
| | | کوچک | ۳ |
| | | متوسط | ۵ |
| | | بزرگ | ۷ |
| | | خیلی بزرگ | ۹ |
| ۸ | خوشه: تراکم | خیلی باز | ۱ |
| | | باز | ۳ |
| | | متوسط | ۵ |
| | | فشرده | ۷ |
| | | خیلی فشرده | ۹ |
| ۹ | خوشه: طول دم خوشه | خیلی کوتاه | ۱ |
| | | کوتاه | ۳ |
| | | متوسط | ۵ |
| | | بلند | ۷ |
| | | خیلی بلند | ۹ |
| ۱۰ | حبه: اندازه | خیلی کوچک | ۱ |
| | | کوچک | ۳ |
| | | متوسط | ۵ |
| | | بزرگ | ۷ |
| | | خیلی بزرگ | ۹ |

**جدول ضمیمه ۲: لیست صفات مورد بررسی و چگونگی امتیازدهی به آنها(براساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در انگور)**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **۱۱** | | مستطیل | ۱ |
| | | بیضی | ۲ |
| | | بیضی پهن | ۳ |
| | حبه: | گرد | ۴ |
| | شکل حبه | تخت | ۵ |
| | | تخم مرغی | ۶ |
| | | تخم مرغی باز | ۷ |
| | | واژتخم مرغی | ۸ |
| | | مخروطی | ۹ |
| **۱۲** | | سبز- زرد | ۱ |
| | | سرخ (گلی) | ۲ |
| | حبه: | قرمز | ۳ |
| | | قرمز - خاکستری | ۴ |
| | رنگ پوست (بدون لایه سفید و مومی) | بنفش | ۵ |
| | | سرمه‌ای | ۶ |
| **۱۳** | | کم آب | ۱ |
| | حبه: | کمی آبدار | ۲ |
| | آبدار بودن گوشت | خیلی آبدار | ۳ |
| **۱۴** | | ندارد | ۱ |
| | حبه: | رشد ناقص | ۲ |
| | تشکیل دانه | رشد کامل | ۳ |

## منابع:


باقری، ا. یزدی صمدی، ب. تائبف م. احمدی، م. (۱۳۸۰) " بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی گلرنگ ایران" مجلع علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۲، شماره ۲: ص ۲۹۵-۳۹۷.

جداری کوهی، ب.، گروسی ق.، حسینی ر. (۱۳۹۰). " بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی دانه انگور توسط نشانگر ملکولی RAPD" مجله سلول و بافت، جلد ۲، شماره ۲، ص ۱۰۶-۹۹.

دشتی ح. (۱۳۷۹)، رساله دکتری :" بررسی ارتباط کروموزوم‌ها و مارکرهای مولکولی با صفات کمی در گندم با استفاده از رگه‌های جایگزین شده کروموزومی و هاپلوئیدهای دوبرابر شده"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۶۸ صفحه.

دولتی بانه ح.، محمدی س. ا.، لابرا م. (۱۳۸۹). "روابط ژنتیکی و حال تهای همنامی و دگرنامی بین ارقام انگور استان آذربایجان غربی"، مجله به نژادی نهال و بذر، جلد ۱-۲۶، شماره ۴، صفحات ۵۲۹-۵۲۷.

سلوکی م.، ریگی‌نژاد ن.، کمال الدینی ح.، سیاه سر ب.، ویگنانی ر. (۱۳۸۴). "بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انگور سیستان با استفاده از مارکر مولکولی RAPD"، چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان.

شیدفر م.، سویلمز اوغلو گ. (۱۳۸۸). "بررسی روابط ژنتیکی بین تعدادی از ارقام انگور ترکیه با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره"، ششمین کنگره علوم باغبانی ایران، دانشگاه گیلان.

صفایی، ن. سیفی نبی آباد، ح. امینی، م. (۱۳۸۹). "نشانگرهای مولکولی در بیوتکنولوژی" کشاورزی (چاپ اول) نشر حق شناس.

عالی‌پناه ل.، حجت ح.، قره‌یاضی ب.، غلامی م.، محمدی ا.، نجفی ج. (۱۳۸۵). "تعیین تنوع ژنتیک انگورهای استان‌های فارس و خراسان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره"، مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۷ ، شماره ۳، صفحات ۵۱۷-۵۲۷.

عبدالهی، ب. بی همتا، م. شولمن، آ. زالی، ع. نقوی، م. (۱۳۸۸). "ارزیابی رتروترنسپوزون ها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم" مجله ژنتیک نوین، دوره چهارم، شماره ۱: ص ۲۵-۱۷.

عبدمیشانی، س. و شاه نجات بوشهری، ع. ا. (۱۳۷۷). اصلاح نباتات تکمیلی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه

فرشادفر ع. (۱۳۷۴). "کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات". جلد اول، انتشارات طاق بستان دانشگاه رازی، صفحات ۲۷۵-۳۰۲.

قره یاضی، ب. (۱۳۷۵). کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۳۸۰-۳۲۸.

قنادها م.، زهراوی م.، وحدتی ک. (۱۳۸۲). " اصلاح گیاهان باغبانی" چاپ اول، نشر موسسه فرهنگی هنری دیباگران، تهران، ص ۳۴۴.

کریمی شهری م.، دهواری و.، حاجیان شهری م.، مختاریان ع. (۱۳۹۰). " تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی را بر اساس نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR"، مجله به نژادی نهال و بذر، جلد ۱-۲۸، شماره ۲، ۱۵۹-۱۷۲.

گروسی ق. و وجدانی پ. (۱۳۷۱) " بررسی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی نخودهای ایرانی در رابطه با اقالیم مختلف کشور" مجله تحقیقات کشاورزی نهال و بذر، جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۱۵-۷.

مجیدی، م. ارزانی، ا. (۱۳۸۸) " مطالعه روابط بین صفات مورفولوژیک، زراعی و کیفی در توده‌های اسپرس" مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد شانزدهم، شماره دوم: ۱۵۲-۱۷۲.

نقوی، م. ر. قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۷. نشانگرهای مولکولی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۴۲ صفحه.

نیکخواه ر. (۱۳۸۹). رساله دکتری، " شناسایی کلون‌های ارقام انگور عسکری، بیدانه سفید، بیدانه قرمز و خلیلی با نشانگرهای ریزماهواره و مورفولوژیک"، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران.

Anonymous, (2009), Statistics of Agricultural Crop, Center of Statistics and Information, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran.

Aradhya, M. K., Dangl, G. S., Prins, B. H., Boursiquot, J. M., Walker, M. A., Meredith, C. P. and Simon, C. J. (2003). Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera L.* Genetical Research, 81, 179–192.

Begon, M,. Harper, JL. and Townsend, C.R. (1996). Ecology: Individuals, Populations, and Communities, 3rd edition. Blackwell Science Ltd., Cambridge, MA.

Bodea, M., Pamfil, D., Pop, R. and Pop, I. F. (2009). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity among Romanian local vine (*Vitis vinifera L.*) cultivars. Bulletin UASVM Horticulture 66 (1): 17-22.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. The American Journal of Human Biology,32:314-331.

Carreno, E., Lopez, M. A., Labra, M., Rivera, D., Sancha, J., Ocete, R. and Martinez de Toda, Y. F. (2004). Genetic relationship between some Spanish *Vitis vinifera L.* subsp. sativa cultivars and wild grapevine populations (*Vitis vinifera L subsp. silvestris*), a preliminary study. Plant Genetic Resources Newsletter, 137, 42-45.

Castelo, J., Branco, S., Eduardo, A., Vieira, G., Malone, H., Mauricio, M,. Kopp, F., Emilia, M., Albina, B., Claudete, C., Mistura, F., Fernando, I.F., Carvalho, H., Costa, A. and Oliveira, G. (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice., J Appl Genet 48(2), pp. 107–113.

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

Commbe, B.G, (1992), Research on development and ripening of the grapberry, Am. J. Enol. Vitic, 43:101-110.

Dombroski, BA., Feng, Q., Mathias, SL., Sassaman, DM., Scott, AF., Kazazian, HHJr. and Boeke, JD. (1994), An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol. 1994 Jul;14(7):4485-92.

Doulati, Baneh, H., Grassi, F., Mohammadi, A., Nazemieh, A., De Mattia, F., Imazio, S., and Labra, M. (2007a). The use of AFLP and morphological markers to study Iranian grapevine germplasm to avoid genetic erosion. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82(5): 745-752.

Errika, RH,. Gao, X. and Voytas, DF. (2004). The diversity of LTR retrotransposons. Genome Biology. Vol(5):225-231.

Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman, London.

FAO. (2011). Food Agriculture Organization statistics on line. http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq2/en.

Flavell, A-J., Knox, M-R., Pearce, S-R., Ellis, T-H-N. (1998) Retrotransposonbased insertional polymorphism (*RBIP*) for high throughput marker analysis. Plant J 16:643–650.

Foisset, N., Deloume, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S. and Renard, M. (1990). Molecular mapping analysis in Brassica napus using isozime, RAPD and RFLP markers on a double haploid progeny. Theoretical and Applied Genetics, 93:1011-1025.

Galet, P. (1998). Cépages et Vignobles de France, Tome 1. Les Vignes Américaines, 2nd end. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France. Galet, P. Dictionnaire Encyclope´dique des Ce´pages. Hachette for reversible genome expansion. Genome Res 10: 908–915.

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

Ghareyazi, B. (1998). The application of DNA markers in plant breeding. Proceedings of the Fourth Conference on Agronomy and Plant Breeding. Sanati Isfahan University.; 42(2): 328-381.

Ghasemi, K. (1999). Investigation on genetic diversity in cotton genotypes by RAPD markers. MSc thesis in plant breeding, Tehran University.

Ghobadi, C., Khoshkho, M., and Seyed Tabatabaei, B. I. (2008). Gentetic relatedness and variation of some grape genotypes (Vitis vinifera L.) in Isfahan province using RAPD markers. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 45 (2): 627-635 (in Persian).

Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. and Smith, L.W. (1997). Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics.Electrophoresis 18: 1524–1528.

Godwin, ID, Aitken, EA. and Smith, LW. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18 : 1524-1528

Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Scienza, A. and Sala, F. (2003). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. Theoretical and Applied Genetic,107, 1315-1320.

Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Scienza, A. and Sala, F. (2003).Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. Theoretical and Applied Genetic,107, 1315-1320.

Herrera, R.., Cares, V., Wilkinson, M. J., and Caligari, P.D.S. (2002). Characterisation of genetic variation between Vitis vinifera cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. Euphytica 124: 139- 145.

Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. New Phytologist 11(2):37-50.

Jaillon, O. Aury, J., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N. and Aubourg, S. (2007). The French–Italian public consortium for grapevine genome characterization the grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449:463–467.

Jobson, J.D. (1992). Applied Multivariate Data Analysis. Volum H, Categorical and Multivariate Methods. Springer-Verlag, New York. 23: 65-86.

Jothi, M.P. (2008) Genetic distance and phylogenic inference, Course notes, University of Putra Malaysia.

Kalendar, R,. Flavell, AJ, Ellis,. THN,. Sjakste, T,. Moisy, C,. and Schulman, AH. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity, 106, 520–530.

Kalendar, R. Grob, T. Regina, M. Suoniemi, A. and Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques., Theor Appl Genet, 98:704–711.

Kalendar, R., Flavell, AJ., Ellis, THN., Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman, AH. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, Heredity, 106:520–530.

Karami, M.J. (2006). Introduction and description of major characteristics of non- irrigated grape cultivars grown in Kurdistan. Seed and Plant 22 (4): 577-596.

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

Kimar, L.S. (1999). DNA markers in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances, 17:143-182.

Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 304:982.

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

Kumar, S. (1999), DNA markers in plant improvement, An overview. Biotechnology Advances, 17: 143-182.

Kuykendall, D., Shao., J, Trimmer, K. (2009). A Nest of LTR Retrotransposons Adjacent the Disease Resistance-Priming Gene NPR1 in Beta vulgaris L. U.S. Hybrid H20. International Journal of Plant Genomics,Volume, Article ID 576742, 8 pages.

Labra, M., Failla, O., Forni, G., Ghani, A., Scienza, A. and Sala, 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(1), 11-20.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature; 409: 860-921.

Legendre, P. and Legendre, L. (1998). Numerical Ecology. Second English Edition. Developments in Environmental Modelling 20. Elsevier, Amsterdam.

Levadoux, L. (1956) Les populations sauvages et cultive´es de Vitis vinifera L. Ann. Ame´lior. Plantes 6, 59–117.

Li, W., Zhang, P., Fellers, JP, Friebe, B. and Gill BS. (2004). Sequence composition, organization and evolution of the core Triticeae genome. The Plant J 40:50-511.

Lodish, H,. Berk, A,. Zipursky, AL,. Matsudaira, P,. Baltimor, D. and Darnell, J. (2003). Molecular Cell Biology. 5th editions,W.H.Freeman . New york.

Martinez, L., Caragnaro, P., Masuekki, R. and Rodriguez, J. (2003). Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*vitis vinifera L.*) varieties using morphological data and AFLP markersJournal of Biotechnology, 6(3): 241-250.

Mc Govern, P. E. (2003). Ancient wine: the search of the origin of viticulture Princeton. University Press, New Jersey.

Mcharo, M., Labonte, D.R., Oard, J.H., Kays, S.J. and Mclaurin, W.J. (2004). Linking quantitative traits with AFLP markers in sweetpotatos using discriminant analysis, Acta Hort., Nucleic Acids Research, 637: 258-293.

Murry, H.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA . Nucleic Acids Research, 8:4321-4325.

Neveen, A., Hassan, A., El-Homosany., Amina, H., Gomma and Mohamed A.S. (2011), Morphological and Issr Polymorphisms in Some Egyptian Grapes (Vitis vinefera L.) Collection. World Applied Sciences Journal 15 (10): 1369-1375.

Ohmi, C., Wakana, A. and Shiraishi, S. (1993).Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI- 2 and PGM-2 isozymes. Euphytica 65: 195-202.

Ohta, T. (1992). The nearly neutral theory of molecular evolution. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 23:263-286.United States of America

Pelsy, F. (2007). Untranslated leader region polymorphism of *Tvv1*, a retrotransposon family, is a novel marker useful for analyzing genetic diversity and relatedness in the genus Vitis. Theor Appl Genet 116:15–27.

Prieto, JL., Pouilly, N., Jenczewski, E., Deragon, JM. and Chevre, AM. (2005). Development of crop-specific transposable element (SINE) markers for studying gene flow from oilseed rape to wild radish. Theor Appl Genet 111: 446–455.

Rasoulzadegan, Y. (1991). Fruit Tree Cultivation in Moderate Cilmates. 1th Ed. Sanati Isfahan University publications.

Reddy, M.P., N. Sarla, C.N. Neeraja and Siddiq, E.A. (2000). Assessing genetic variation among Asian A-genome Oryza species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. Fourth International Rice Genetics Symposium, 22–27 October 2000, IRRI, Philippines. Abstracts p. 212.

Rogstad, S.H. (1996). Assessing genetic diversity in plants with synthetic tandem repetitive DNA probs. Stadler Genetics Symposium Series, 21:1-14.

rotransposon-based sequence-specific amplified polymorphism for *Vitis vinifera L*. genotyping. Plant Breed. 123, 180-185.

Sabot, F. and Schulman, AH. (2007). Template switching can create complex LTR retrotransposon insertions in Triticeae genomes. BMC Genomics, 8:247.

Saburi, H., Nahvi, M., Torabi, A. and Kanoni, M.(2008). Classification of rice varieties at different levels from the osmotic potential of sorbitol based on cluster analysis and fisher linear functions. Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding, August, Karadj, Iran, Crop Science Societ., 7: 327-340.

SanMiguel, P. J. L. (1988). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergen retrotransposons., Annals of Botany, 37-44.

Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Sauer, S., Gelfand, D.H., Boussicault, F., Bauer, K., Flachmeier, C., Kidd, K.K., Berrettini, W.H. and Church, G.M. (2000). A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res. March 1; 28(5): e13.

Scarano, T., Abbate, L., Ferrante, S., Tusa, N. and Lucretti, S. (2002). ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. Plant Cell Rep 20:1162–1166.

Schulman, AH,. Flavell, AJ. and Ellis, THN. (2004a), The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants, Methods Mol Biol, 260: 145–173.

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

Schulman, AH., Gupta, PK. and Varshney, RK. (2004b). Organisation of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, in Cereal Genomics (eds. P.K. Gupta and R.K. Varshney), 83–118.

Schulman, AH., Gupta, PK. and Varshney, RK. (2004b). Organisation of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes., in Cereal Genomics (eds. P.K. Gupta and R.K. Varshney), 83–118 (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H. and Thomas, M. R. (2001). Microsatellitemarkers for grapevine: A state of the art. In: Roubclaki

Shirasu, K., Schulman, AH., Lahaye, T. and Schulze-Lefert, P. (2000). A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theor Appl Genet 110: 819–831.

Spagnoletti, P.L. and Qualset, C. O. (1987). Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. Crop Science, 27: 235-241.

Stagner, N., J Akes, J., J Avorink, B., M Asueile, R.W. and M Artizne, L. E. (2011). Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of 'Malbec' and 'Syrah' clones. Vitis 48 (3), 145–150.

Stajner, N., Jakse, J., Javornik, B., Masuelli, R. W. and Martı´nez, L. E. (2009). Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of 'Malbec' and 'Syrah' clones. Vitis, 48, 145–150.

Tafazzoli E, Hekmati J and Firoozeh P, (1994)," Grapes", University of Shiraz Publications. Shiraz, Iran, 343 pp.

Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien MA (2005). Comparative analyses of genetic

Tangolar, S. G., Ünlü, G., Tangolar, S., Daşgan, Y. and Yılmaz, N. (2008). use of in vitro method to evaluate some grapevine varieties for tolerance and susceptibility to sodium bicarbonate-induced chlorosis. In Vitro Cell. Dev.Biol- Plant. 44, 233-237.

Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, DA., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, LM,, Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, TM., Facci, M., Mitchell, JT., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C.,

Dematttè, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, JA., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, MS., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, SK., Fontana, P., Gutin, A., Vande, Y., Salamini, F. and Viola, R. (2007). High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2(12):e1326.

Verriès, C., Bès, C., This, P. and 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.

Vicient, C.M., Kalendar, R, Anamthawat-Jonsson, K., Suoniemi, A. and Schulman A. (1999). Structure, functionality, and evolution of the BARE-1 retrotransposon of barley, Genetica 107: 53–63.

Wang, Z,. Weber, J-L,. Zhong, G,. Tanksley, S-D. (1994). Survey of plant short tandem DANN repeats. Theor Appl Genet 88:1–6.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerasechain reaction amplification. Genomics 20: 176–183.

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

## Abstract

Recognition the genetic diversity of grape was helped the breeding of this plant. The purpose of the study is investigation of genetic diversity in 25 different grape variety by using morphological data, retrotransposon markers REMAP and IRAP and also ISSR markers. In order to doing this research, sampling and evaluation of morphological traits was done in Shahrood's researches center and Sisakht gardens during the summer of 2012. In this study 14 morphological traits related with leaf shape, bunch and berry shape was investigated. In molecular part, 21 retrotransposon and ISSR primers were used. On the basis of bond formation rate, polymorphism and repeatability of bands, 15 primers were selected. This 15 primers produced 156 bands so 144 bands showed acceptable polymorphism. The number of replicated fragments by different primers were varied, the highest number of fragments was 16 belong to "825" and "840" primers and the lowest of them was 6 belong to "vine1fa+Ms3" (REMAP) primer combination and "857" (ISSR) primer. Mean of polymorphic bonds number for each primer, was 9.6 bonds. The highest Shannon's variation coefficient and observed heterozygosis belong to *Gret1Fa* primer from IRAP primers so that probability indicated IRAP marker with regard to other studied markers was better. Cluster analyses were done using UPGMA algorithm and Jacard similarity matrices. The results of this research indicate a molecular and morphological diversity among grape varieties and also showed the efficiency of retrotransposon markers, REMAP and IRAP, and so ISSR marker for determine genetically diversity of grape varieties that were studied.

**Key words**: grape, REMAP, IRAP, genetic diversity and morphological traits.

**Shahrood University of Technology**

**Faculty: Agronomy plant breeding**

# Analysis of diversity and genetic relationship of different grape cultivars in Shahrood region based on Retrotransposon-based molecular marker REMAP

**Mohammadghasem Keshavarz-khub**

Supervisor(s):

**Dr. Shahrokh Gharnnjik**

**Dr. Asad Masumi asl**

**November 2013**