

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انگور با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی

IRAP و REMAP

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

محمدقاسم کشاورزخوب^۱، شاهرخ قرنجیک^{۱*}، اسد معصومی اصل^۲، مهدیه پارسائیان^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^۳

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۳- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

Keshavarz Khoob MGH¹, Gharanjik SH^{*1}, Masoumiasl A², Parsaeyan M¹,
Abdollahi Mandoalkani B³

1- Former MSc Student, Assistant Professors, Department of Plant Biotechnology
College of Agriculture, University of Shahrood, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj

3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of
Agriculture, Urmia University, Urmia

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

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

چکیده

تعیین تنوع ژنتیکی مواد گیاهی، گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر نواری بوده و اهمیت زیادی در اجرای برنامه های اصلاحی دارد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم انگور شهرستان های شاهرود و سی سخت از ۹ آغازگر و ترکیب آغازگری رتروترانسپوزونی شامل سه آغازگر IRAP و شش ترکیب آغازگری REMAP استفاده شد. در مجموع ۸۷ باند تولید شد که ۷۹ باند در بین ارقام چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکل از چهار (Tv1Fa+Ms11) تا ۱۲ باند (Vine1Fa) به ازای هر آغازگر متغیر بود. هتروزیگوسیتی موردانتظار از ۰/۲۹ (Tv1Fa+ Ms8) تا ۰/۴۴ (Vine1Fa+ Ms3) متغیر و میانگین آن ۰/۳۵ به دست آمد. میانگین درصد چندشکلی در بین ارقام مورد مطالعه ۹۵/۸۳ درصد بود. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که پنج مولفه اول توانستند در مجموع، ۶۸/۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه کلاستر به روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد با ضریب همبستگی کوفاکتیک ۰/۸۹، ارقام مورد مطالعه را در شش گروه متفاوت قرار داد به طوری که در گروه اول تا ششم به ترتیب ۱۳، ۴، ۲، ۳ و ۱ رقم از ارقام مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس این گروه بندی سه رقم سیاه دانه بلند، سیاه دانه گرد و عسکری که از شهر سی سخت انتخاب شدند در سه گروه مجزا قرار گرفتند که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این ارقام می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای IRAP و REMAP توسعه یافته بر اساس رتروترانسپوزون های فعال در ژنوم انگور می توانند به عنوان نشانگرهای ملکولی کارا در تسریع برنامه های اصلاحی در انگور مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی

انگور

تنوع ژنتیکی

رتروترانسپوزون

IRAP

REMAP

مقدمه

انگور گیاهی از خانواده Vitacea و از جنس Vitis است. شواهد نشان می‌دهد که انگورهای وحشی قبل از انسان وجود داشته‌اند. از طرف دیگر تعداد ژنوتیپ‌های انگور در جهان بیش از ۱۰۰۰۰ مورد می‌باشد که در بین آن‌ها هم‌نام‌ها^۱ و دگر نام‌های^۲ زیادی دیده می‌شوند که به برنامه جامعی جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها در سطح جهانی نیاز می‌باشد (Galletta et al. 1999). این مشکل در ژنوتیپ‌های انگور ایران نیز مشاهده می‌شود به‌طوری‌که، یک ژنوتیپ انگور در مناطق مختلف دارای نام‌های متفاوت بوده یا چند ژنوتیپ مختلف را به یک نام می‌شناسند. این مسئله موجب بروز مشکلاتی برای تولیدکنندگان در انتخاب ژنوتیپ مناسب برای شرایط آب و هوایی خاص یا نوع مصرف شده‌است. هم‌چنین به دلیل سابقه طولانی مدت کشت انگور در ایران، جهش‌های طبیعی در برخی ارقام آن به وجود آمده است که باعث تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف شده‌است. آگاهی از تنوع ژنتیکی، نقش مهمی در به‌نژادی دارد. لذا تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (Lowe et al. 1994). یکی از دغدغه‌های مهم جوامع گیاهی حفظ تنوع زیستی موجود می‌باشد (Hodgkin and Ramanata 2002; Naghavi et al. 2005). نشانگرهای مولکولی می‌توانند اطلاعاتی در مورد خصوصیات تنوع، نظیر جریان ژنی و الگوی اصلی یک جمعیت در اختیار محقق قرار داده (Hodgkin and Ramanata Roa 2002) و پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (Ferguson et al. 1995). عناصر ژنتیکی متحرک در واقع قطعاتی از ژنوم موجود زنده می‌باشند که قادرند در ژنوم میزبان جابه‌جا شوند. این قطعات ابتدا توسط باربارامک کلینتاک^۳ در دهه ۱۹۶۰، در ذرت کشف شدند (Kumar et al. 1999; Lodish et al. 2003). این عناصر ژنتیکی متحرک به دلیل فراوانی زیاد و حضور در همه جای ژنوم، نقش مهمی را در تکامل گیاهان ایفا کرده و از پتانسیل بالایی جهت بررسی روابط و تنوع ژنتیکی گیاهان برخوردار هستند

(SanMiguel et al. 1998). گروهی از این عناصر را که هنگام جابجایی در مکان اولیه باقی نمی‌مانند (DNA به‌صورت مستقیم جابه‌جا می‌شود) ترانسپوزون گویند که کمتر از ۶۰۰bp طول داشته و تعداد کپی‌های آن‌ها بسیار زیاد است. گروه دیگر که به‌واسطه یک رونوشت RNA و تبدیل آن به cDNA جابه‌جا شده و نسخه اصلی در مکان اولیه در ژنوم باقی می‌مانند را رتروترانسپوزون گویند. رتروترانسپوزون‌ها به ۹ گروه تقسیم شده و از مهم‌ترین آن‌ها، گروه LTR^۴ دار می‌باشد. علت این نام‌گذاری، داشتن یک توالی تقریباً طولانی مشابه در دو انتهای این نوع رتروترانسپوزون-ها می‌باشد. رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند و گاهی میزان آن‌ها به بیش از ۷۵ درصد ژنوم هم می‌رسد (SanMiguel et al. 1998). به‌نظر می‌رسد در گیاهان، رتروترانسپوزون‌های LTR فراوان‌ترین و فعال‌ترین آن‌ها باشند (Li et al. 2004). مطالعات انجام شده روی ژنوم انگور نشان داده که عناصر جابه‌جا شونده به فراوانی در ژنوم انگور حضور دارند. علاوه بر این، مشخص شده که فراوانی رتروترانسپوزون‌های LTR بیشتر از رتروترانسپوزون‌های غیر LTR می‌باشد (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007). اولین توالی رتروترانسپوزونی شناسایی شده از ژنوم انگور، رتروترانسپوزون Gret1 متعلق به گروه Ty3-gypsy می‌باشد (Kobayashi et al. 2004). قبل از این، فقط دو بخش از توالی دو رتروترانسپوزون انگور از گروه Ty1-Copia شناسایی شده بود که یکی از آن‌ها Vine1 (عناصر شماره یک *V. vinifera*) (Verries et al. 2000) و دیگری Tv1 نام داشت (Pelsy et al. 2002). در گذشته برای بررسی منشأ و روابط ما بین ارقام مختلف انگور بیشتر از مدارک تاریخی در ترکیب با داده‌های آمپلوگرافی استفاده شده‌است. امروزه با توسعه انواع نشانگرهای مولکولی، امکان بررسی دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ارقام انگور و ارتباط آن‌ها با ژنوتیپ‌های وحشی فراهم شده است (Karp et al. 1998). از جمله این نشانگرها، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها نظیر IRAP^۵ و REMAP^۶ می‌باشند که در انگور به‌منظور تعیین چند شکلی بر مبنای رتروترانسپوزون‌های vine1 در ارقام *Vitis vinifera* (Labra et al.

^۴ Long-terminal repeat

^۵ Inter retrotransposon amplified polymorphism

^۶ Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism

^۱ Homonyms

^۲ Synonyms

^۳ Barbara McClintock

جدول ۱- ارقام انگور مورد مطالعه

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

* a و b کدهای ارقام جمع‌آوری شده از سی سخت و شماره‌ها کدهای ارقام تهیه شده از مرکز تحقیقات شاهرود را نشان می‌دهد.

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

جدول ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی (۵'→۳')	نوع آغازگر
Gret1Fa	R*TGCGTCCRGACACCCTGT	رتروترنسپوزون
Tvv1Fa	TCCARCTTCAGGGGGAGTGT	رتروترنسپوزون
Vine1Fa	TTCAGCACTCTTCATCAATAAAA	رتروترنسپوزون
Ms3	(CAC) ₇ T	ISSR
Ms7	(AG) ₁₀ G	ISSR
Ms8	(AG) ₁₀ C	ISSR
Ms11	(CT) ₁₀ G	ISSR

R* معرف پورین (A/G) می باشد.

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

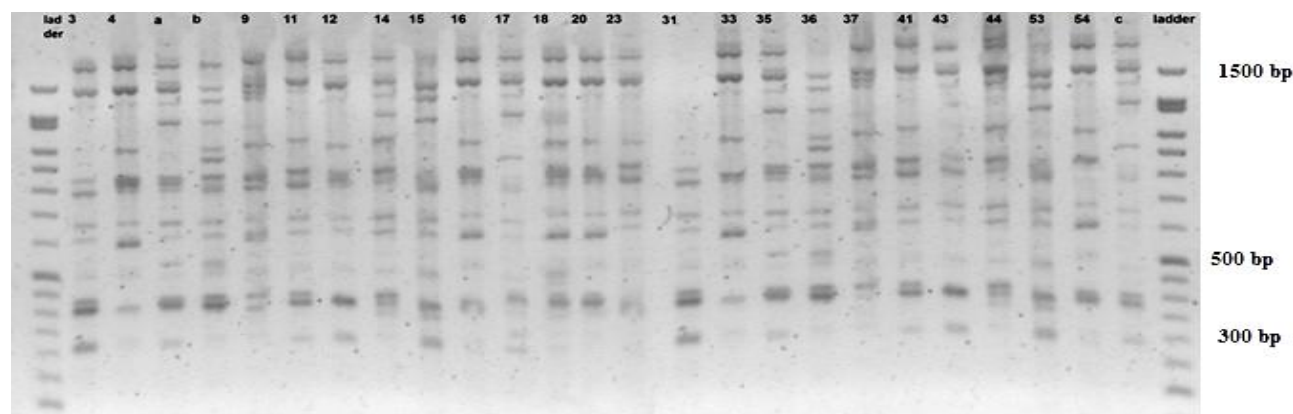
نتایج و بحث

آغازگرهای رتروترنسپوزونی مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۸۷ باند تولید کردند که در نهایت ۷۹ باند چندشکلی نشان دادند. از آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق ترکیب آغازگری Tv1Fa+Ms11 با چهار باند کم‌ترین باند چندشکل و آغازگر Vin1Fa با ۱۲ باند، بیش‌ترین تعداد باند چندشکل را تولید کردند (جدول ۳). لذا به نظر می‌رسد که رتروترنسپوزون-های Vin1Fa در فرایند تکامل ارقام مورد بررسی بیشتر جابجا شده‌اند و تعداد نسخه‌های بیش‌تری را در ژنوم تکثیر کرده‌اند. همچنین این نشانگرها از گروه رتروترنسپوزون‌های Ty1-copia

هستند لذا نتایج این تحقیق این احتمال را تقویت می‌کند که رتروترنسپوزون‌های گروه Ty1-copia بیش‌تر از رتروترنسپوزون-های گروه Ty3-gypsy در گیاه انگور تکثیر و در طی تکامل این گیاه بیش‌تر جابجا شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که رتروترنسپوزون‌های Ty1-copia سطح متفاوتی از چند شکلی را در انگور نشان می‌دهند. وقوع و پراکنش رتروترنسپوزون‌های D'Onofrio, Gret1 و Tv1, Vine-1 در ارقام انگور توسط (2010) نیز نشان داد که رتروترنسپوزون‌های gypsy-like و copia-like در جنس انگور گسترده‌اند. تمامی آغازگرهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، توانستند تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف انگور را به خوبی نشان دادند. از میان سه آغازگر Gret1Fa، Vin1Fa، Tv1Fa برای نشانگر IRAP همگی تولید باند کردند. در واقع تمامی آغازگرهای رتروترنسپوزونی انگور که براساس توالی‌های LTR طراحی شده بودند الگوی نواری واضحی تولید کردند. به نظر می‌رسد که الگوی نواری نشانگرهای رتروترنسپوزونی مخصوصاً نشانگرهای IRAP بستگی به فعال یا عدم فعال بودن خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد استفاده و هم-چنین الگوی قرار گرفتن آن‌ها در ژنوم دارد. معمولاً رتروترنسپوزون‌های فعال در داخل رتروترنسپوزون‌های دیگر بیشتر درج می‌شوند. به عبارت دیگر به حالت آشیانه‌ای دیده می-شوند ولی خودشان توسط رتروترنسپوزون‌ها دیگر قطع نمی‌شوند (Leigh et al. 2003). اگر خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزونی حالت آشیانه‌ای داشته باشند در این صورت می‌توان در نشانگر IRAP از ترکیبات آغازگری استفاده کرد به طوری که هرکدام از آغازگرها به صورت مستقیم و معکوس بر اساس ناحیه LTR یک رتروترنسپوزون طراحی شود. در این تحقیق از تک آغازگرهای IRAP استفاده شد که نتیجه‌ی مطلوبی حاصل شد. اگر رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم نزدیک به هم باشند می‌توان آغازگرها را بر اساس نواحی داخلی تر LTR طراحی کرد ولی در غیر این صورت بهتر است آغازگرها بر اساس نواحی انتهایی LTRها طراحی شوند تا تکثیر مطلوبی حاصل شود (Kalendar et al. 1999; Leigh et al. 2003).

جدول ۳- خصوصیات آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده در این مطالعه

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



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

گزارش شد که آغازگر *Gret1Fa* باندی تولید نکرده است. درصد چندشکلی بدست آمده در بین ارقام در این تحقیق از ۷۵ درصد برای ترکیب آغازگری *Tvv1Fa+Ms8* تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای *Vine1Fa*، *Gret1Fa+Ms7*، *Tvv1Fa+Ms11*، *Gret1Fa* و *Vine1Fa+Ms3* متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی بدست آمده در این تحقیق، ۹۵/۸۳ درصد بود. چندشکلی بالای نشانگرهای رتروترانسپوزونی و توزیع آن‌ها در همه نقاط ژنوم از

وجود و گستردگی عناصر رتروترانسپوزونی در سراسر ژنوم انگور به وسیله (Pelsy 2007) برای توالی رتروترانسپوزونی *LTR*، *Tvv1*، همچنین توسط (Labra 2002) برای توالی رتروترانسپوزونی *LTR*، *Vin1* گزارش شده است. اگرچه در مطالعه (Pereira 2005) که بر روی چهار رقم از انگورهای کشور پرتغال با استفاده از نشانگرهای *REMAP* و *IRAP* و با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر توالی رتروترانسپوزونی *Gret1* انجام شد،

خصوصیاتی است که باعث برتری این نشانگرها نسبت به سایر نشانگرها شده است زیرا نشانگرهای دیگر مانند RAPD و AFLP معمولاً به صورت خوشه‌ای در نواحی خاصی دیده می‌شوند در حالی که خانواده‌های مختلف رتروترانسپوزون‌ها در همه جای ژنوم توزیع شده، به طوری که می‌توان با استفاده از خانواده‌های مختلف، هر کدام با توزیع مخصوص به خود در ژنوم، پوشش مناسبی از ژنوم در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات مختلف ایجاد کرد (Wagh et al. 1997; Yu and Schulman 2007; Queen et al. 2004; Wise. 2000). به منظور تعیین کارایی آغازگرها در نشان دادن چندشکلی، شاخص‌های شانون، هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌های موثر محاسبه شدند. بالاترین میزان شاخص شانون مربوط به ترکیبات آغازگری Vine1Fa+Ms3، Tv1Fa+Ms11 و آغازگر Gret1Fa بود که به ترتیب معادل ۰/۶۳، ۰/۶۱ و ۰/۵۷ بوده و کم‌ترین میزان شاخص شانون مربوط به ترکیب آغازگری Tv1Fa+Ms8 و معادل ۰/۴۳ با میانگین شاخص شانون ۰/۵۲ بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این تحقیق، بین ۰/۲۹ تا ۰/۴۴ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۵ بود که بیشترین مقدار آن مربوط به ترکیب آغازگری Vine1Fa+Ms3 و معادل ۰/۴۴ و کمترین مقدار آن مربوط به ترکیب آغازگری Tv1Fa+Ms8 و معادل ۰/۲۹ بود. هم‌چنین تعداد آلل‌های موثر (Ne) بین ۱/۵۲ تا ۱/۸۲ با میانگین ۱/۶۳ بود (جدول ۳)، که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. از بین این آغازگرها، ترکیب Vine1Fa+ Ms3 کارایی بهتری در نشان دادن تنوع بین ارقام نشان داد.

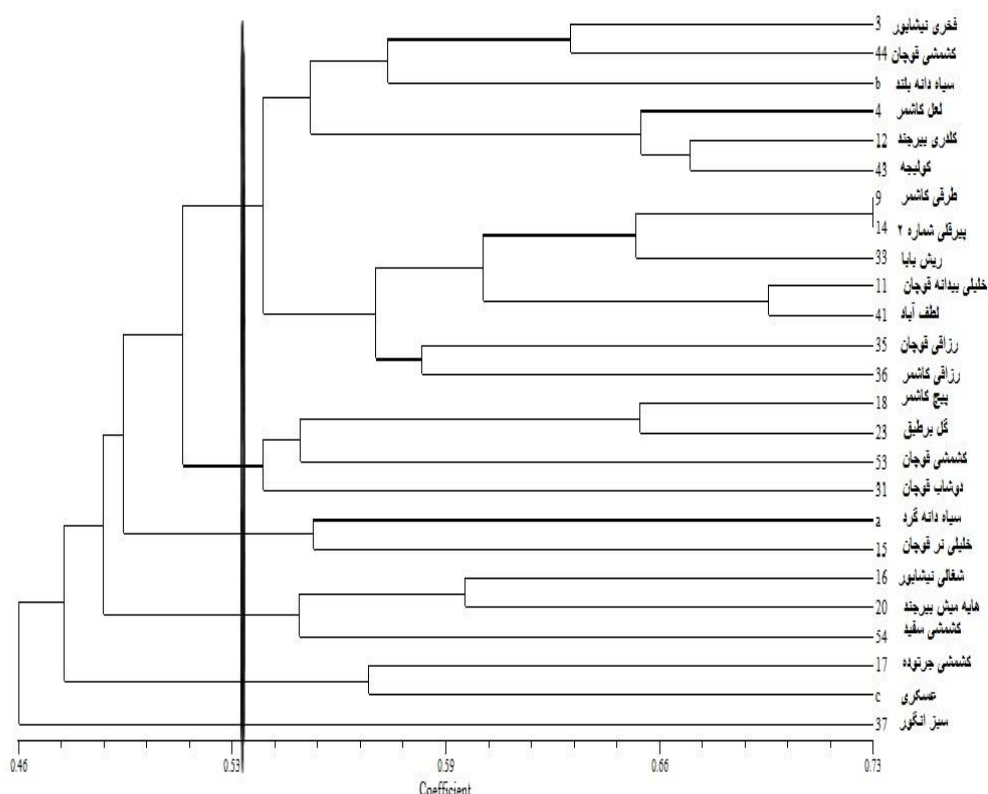
نتایج نشان داد که تجزیه کلاستر به روش UPGMA و براساس ضریب تشابه جاکارد با ضریب کوفاکتیک ۰/۸۹ بهترین روش گروه بندی از بین روش‌های مورد بررسی است. بر اساس دندروگرام حاصل از آغازگرهای مورد استفاده، ارقام مختلف به شش گروه مختلف تقسیم شدند (شکل ۲). در گروه اول، ۱۳ رقم قرار گرفتند که شامل ارقام فخری نیشابور، کشمش قوچان، سیاه‌دانه بلند، لعل کاشمر، کلدی بیرجند، طرقي کاشمر، پیرقلی شماره ۲، ریش بابا، خلیلی بیدانه قوچان، لطف‌آباد، رزاقی قوچان و رزاقی کاشمر هستند. در گروه دوم، چهار رقم پیچ کاشمر، گل برطبق،

کشمش قوچان و دوشاب قوچان قرار گرفتند. در گروه سوم، دو رقم سیاه دانه گرد و خلیلی نر قوچان، در گروه چهارم شغالی نیشابور، هایه‌میش بیرجند و کشمش سفید، در گروه پنجم، دو رقم کشمش جرتوده و عسکری و در گروه ششم رقم سبز انگور به تنهایی قرار گرفت. نکته قابل توجه در این دندروگرام، قرارگرفتن سه رقم مورد مطالعه شهر سی سخت در سه گروه مختلف بود که نشان‌دهنده این است که از نظر ژنتیکی با هم تفاوت دارند. بر اساس آغازگرهای بررسی‌شده، ارقام طرقي کاشمر و پیرقلی شماره ۲، خلیلی بیدانه قوچان و لطف‌آباد، کلدی بیرجند و کولیجه و پیچ کاشمر و گل برطبق به ترتیب با ضریب تشابه ۰/۷۳۰، ۰/۶۹۶، ۰/۶۷۱ و ۰/۶۵۷ بیش‌ترین شباهت را داشتند و ارقام سبز انگور و خلیلی نر قوچان با ضریب تشابه ۰/۳۳۳ کمترین شباهت را با هم داشتند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام، ارقامی که کم‌ترین تشابه و بیش‌ترین فاصله ژنتیکی را دارند، می‌توانند به عنوان والدین بالقوه در تولید ارقام هیبرید و سایر برنامه‌های اصلاحی در انگور استفاده شوند. گروه‌بندی ارقام در برخی از گروه‌ها با منشاء جغرافیایی آن‌ها هم‌خوانی داشت، به طوری که ارقام کشمش قوچان، خلیلی بیدانه قوچان و رزاقی قوچان از قوچان و لعل کاشمر، طرقي کاشمر و رزاقی کاشمر از کاشمر در گروه اول و در کنار هم قرار گرفتند و کشمش قوچان و دوشاب قوچان در گروه دوم در کنار هم بودند. از آنجا که فعالیت رتروترانسپوزون‌ها تابعی از تنش‌هاست و در اثر تنش‌هایی از جمله حمله آفات و بیماری‌ها و یا خشکسالی‌ها فعال می‌شوند (Grandbastien 1992) می‌تواند در توجیه چنین تقسیم‌بندی قابل بیان باشد.

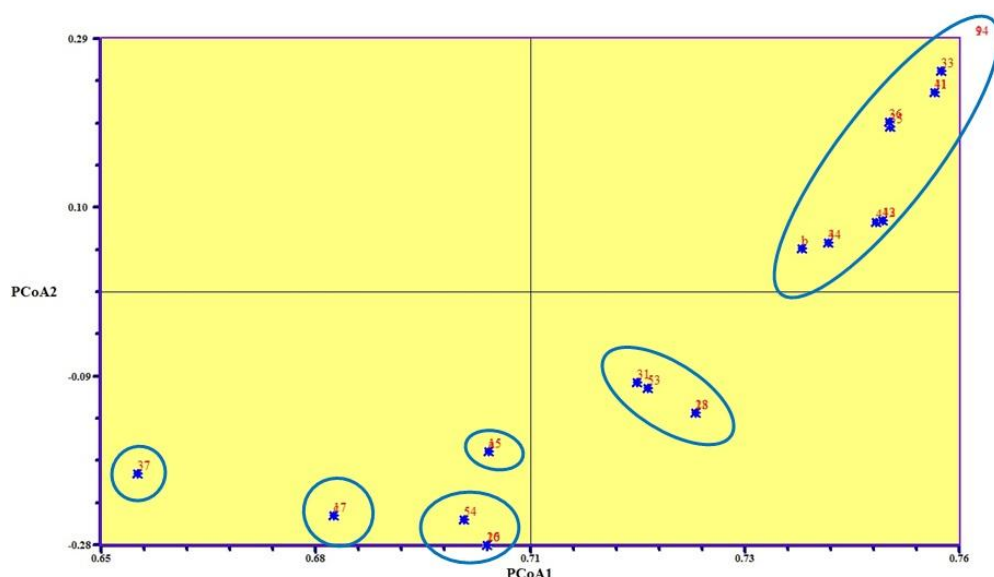
در تجزیه به مختصات اصلی، شش مولفه اول توانستند مجموعاً ۷۱/۵۰ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مولفه اول بیش‌ترین سهم را در توجیه تغییرات دارا بود (۵۳/۰۲ درصد). میزان واریانس نسبی هر مولفه نشان‌دهنده میزان اهمیت آن مولفه در واریانس کل است و به صورت درصد بیان می‌شود. فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله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

REMAP، گونه‌های مختلف *Vitis* و واریته‌های *V. vinifera* دارای بیش‌ترین خویشاوندی بودند و مشخص شد که نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها تنوع و تکامل بین گونه‌های مورد مطالعه را بهتر نشان می‌دهد (Claudio et al. 2010). در تحقیق دیگری در کشور پرتغال تنوع ژنتیکی ۴۱ رقم مختلف انگور و ۳۷ کلون با استفاده از نشانگرهای AFLP و سه نشانگر رتروترنسپوزونی IRAP، REMAP و SSAP مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از ۱۸ آغازگر مبتنی بر توالی‌ها LTR رتروترنسپوزون‌های Vine-1، Tv1 و Gret1 استفاده شد که این آغازگرها در مجموع ۵۷۱ باند تولید کردند که از این تعداد باند ۴۲۹ باند (۸۳ درصد) چندشکلی نشان دادند. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که نشانگرهای رتروترنسپوزونی تنوع ژنتیکی ارقام مورد مطالعه را بهتر نشان دادند (Castro et al. 2011).

پلات دو بعدی رسم شده بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی، نتایج گروه‌بندی بدست آمده از تجزیه کلاستر را تایید نمود (شکل ۳). انتخاب نوع نشانگر از نظر برخی خصوصیات از جمله تکرارپذیری، سهولت انجام، تجزیه و تحلیل نتایج و هزینه آن یکی از مهم‌ترین مراحل در مطالعات مولکولی به حساب می‌آید (Sharma et al. 2008). گزارش‌های متعددی تکرارپذیری، چندشکلی و مناسب بودن نشانگرهای رتروترنسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و شناسایی ارقام مختلف انگور را تایید کردند. در تحقیقی مقایسه‌ای که بین نشانگرهای رتروترنسپوزونی با دیگر نشانگرهای غیرمبتنی بر رتروترنسپوزون مثل AFLP، SSR و ISSR برای مشخص کردن نشانگر مفید برای شناسایی و بررسی تکامل گونه‌ها روی واریته‌ها و کلون‌های انگور انجام شد، نتایج نشان داد که بر اساس نشانگر رتروترنسپوزونی



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



شکل ۳- پلات دویبعی پراکنش ارقام مورد مطالعه بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)

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

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که رتروترنسپوزون‌ها در نواحی گسترده‌ای از ژنوم ارقام انگور مورد مطالعه حضور داشته و می-

توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف انگور مورد استفاده قرار گیرند. از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای IRAP با میانگین ۹۴/۸۷ درصد بیش‌ترین چندشکلی را نشان دادند که تایید کننده فراوانی این نوع LTRها در ژنوم انگور می‌باشد. هم-چنین نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد تعداد مولفه‌های زیاد توجیه کننده درصد کمی از تغییرات کل می‌باشد، لذا آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی بیش‌تری را تحت پوشش قرار داده و نشانگرهای رتروترنسپوزون مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند و این نشانگرها به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را مشخص کردند. هم‌چنین با بررسی تنوع ژنتیکی به‌دست آمده از این تحقیق و بررسی فواصل جغرافیایی و دوری و نزدیکی افراد مشخص شد که فواصل جغرافیایی دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی افراد نمی‌باشد. بالا بودن معیارهای شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تعداد آلل‌های موثر برای ترکیبات آغازگری Vine1Fa+Ms3، Tv1Fa+Ms11 و آغازگر Gret1Fa نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ارقام مختلف انگور مورد بررسی در این تحقیق بود. لذا استفاده از این نشانگرها برای شناسایی ارقامی که دارای ژنوتیپ‌های یکسان بوده و در مناطق گوناگون کشور با نام‌های مختلف خوانده می-شوند یا بالعکس، ارقام متفاوتی که به‌صورت یکسان نامگذاری شده‌اند جهت حفظ و نگهداری ژرم پلاس انگور ایران پیشنهاد

سپاسگزاری

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

منابع

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jaillon O, Aury J, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choise N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, DiGaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D,

می شود. پژوهش حاضر نشان داد که بین ارقام انگور مورد مطالعه تنوع مطلوبی وجود دارد و نشانگرهای IRAP و REMAP توسعه یافته بر اساس رتروترانسپوزون های فعال در ژنوم انگور، می توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی کارا برای بررسی تنوع ژنتیکی و تسریع برنامه های اصلاحی در انگور مورد استفاده قرار گیرند.

Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè M, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon A, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The French Italian public consortium for grapevine genome characterization the grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiospermophyla. Nature 449: 463-467.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lowe KM and Walker MA (2006) Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis Champinii*) x Riparia Gloire (*Vitis riparia*). Theoretical and Applied Genetics 112:1582-1592.

Peakall R, Smouse PE (2006) GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

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

- Pelsy F, Merdinoglu D (2002) Complete sequence of Tvv1, a family of Ty1 copia-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. *Theoretical and Applied Genetics* 105:614- 621.
- Pereira HS, Barao A, Delgado M, Morais-Cecilio L, Viegas W (2005) Genomic analysis of Grapevine Retrotransposon 1 (Gret1) in *Vitis vinifera*. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 871-878.
- Queen RA, Gribbon BM, James C, Jack P, Falvell AJ. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 271:91-97.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.
- SanMiguel PJJ (1988) Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergen retrotransposons. *Annals of Botany* 20:43-45.
- Schulman AH (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.
- Shapiro J (1999) Transposons as the key to a 21st century view of evolution. *Genetica* 107:171-179.
- Sharma A, Namdeo AG and Mahadik KR (2008) Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. *Pharmaceutical Review* 2: 24-34.
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, PrussD, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, MalacarneG, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, MacalmaTM, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, GattoP, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, SegalaC, Davenport C, Dematt L, Mraz A, Battilana J, StormoK, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, PerbostC, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, SterckL, Vandepoele K, Grando MS, Toppo S, Moser, C, LanchburyJ, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar, SK, Fontana P, Gutin A, Vande Y, Salamini F, Viola R (2007) High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2(12).
- Verriès C, Bès C, This P, Tesnière C (2000) Cloning and characterization of Vine-1, a LTR-retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L, and other *Vitis* species. *Genome* 43: 366-376.
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genomics* 253: 687-694.
- Williams JGK, Kubelik R, Livak KA, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ (1999) POPGENE version 1.32, Microsoft Window-based free ware for population genetic analysis. Computer program and documentation distributed by University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.html>.
- Yu GX, Wise RP (2000) An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena. *Genome* 43:736-749.