بررسی اختلافات ژنتیکی کلون‌های انتخابی انگور (*Vitis vinifera*. L) رقم بی‌دانه سفید با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP

Study of Genetic Differences of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Bidaneh Sefid Clones Using SSR and AFLP Markers

حامد دولتی بانه[۱*] و سید ابوالقاسم محمدی[۲]

چکیده

انتخاب کلونی یکی از مهم‌ترین روش‌های اصلاح کمیت و کیفیت میوه در ارقام انگور می‌باشد. امروزه نیاز به روش‌های دقیق و قابل اعتماد برای تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی بین کلون‌ها برای استفاده خزانه‌داران و اصلاح‌گران وجود دارد. به‌منظور بررسی اختلافات ژنتیکی بین کلون‌های بی‌دانه سفید حاصله از برنامه انتخاب کلونی در استان آذربایجان غربی، از ۲۳ نشانگر ریزماهواره و ۷ ترکیب آغازگر AFLP استفاده شد. تجزیه داده‌های حاصله از نشانگرهای ریزماهواره نتوانست هیچ‌گونه اختلافی را بین این کلون‌ها مشخص نماید در حالی که از ۴۹۹ قطعه DNA به‌دست آمده از آغازگرهای AFLP، هشت عدد چند شکل بودند. تعداد قطعات در محدوه ۴۴ عدد در ترکیب آغازگری E34-M34 تا ۹۷ قطعه در E31-M32 با میانگین ۷۱/۳ بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های AFLP تمامی کلون‌ها را در دو گروه قرار داد. اولین گروه شامل ۹ کلون انگور بی‌دانه سفید بدون اختلاف ژنتیکی و گروه دوم شامل کلون بی‌دانه قرمز بود. روش AFLP فقط توانست کلون بی‌دانه قرمز را از سایر کلون‌های پوست سفید متمایز نماید.

واژه‌های کلیدی: انگور، کلون، اختلاف ژنتیکی و نشانگرهای مولکولی

۱. استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، ارومیه

۲. استاد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

*: نویسنده مسوول Email:ah_dolati@yahoo.com

مقدمه

شرط موفقیت در برنامه توسعه کشت و افزایش تولید انگور نیازمند به‌کارگیری نهال‌های سالم عاری از بیماری‌های ویروسی با عملکرد ذاتی بالا است (Silvestrony *et al.* 1997). با گذشت زمان، بیماری‌های ویروسی، تغییرات اپی ژنتیکی و جهش‌ها سبب ایجاد بوته‌هایی با صفات مختلف می‌شوند؛ که تعدادی از این تغییرات مانند بوجود آمدن بوته-های با رنگ حبه متفاوت یا بی‌دانگی، مطلوب و تجاری بوده و این بوته‌ها توسط باغداران شناسایی و تکثیر شده‌اند (Sensi *et al.* 1996).

برنامه اصلاحی انتخاب کلونی مهم‌ترین روش برای اصلاح و بهبود کمیت و کیفیت میوه در ارقام انگور می‌باشد و امروزه نیاز به روش‌های دقیق و قابل اعتماد برای تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی بین کلون‌ها برای استفاده خزانه‌داران و اصلاح‌گران وجود دارد (Moreno *et al.* 1998). انتخاب و شناسایی کلون‌ها در انگور، همانند شناسایی ارقام و گونه‌ها، به‌طور مرسوم بر اساس روش‌های آمپلوگرافی و آمپلومتری انجام می‌گیرد. در حالت اول صفاتی مانند شکل برگ، شکل دندانه برگ، شکل سینوس دمبرگی، جنسیت گل و ... (بدون سنجش متریک) و در حالت دوم صفات کمی مانند میزان قند، طول پیچک، وزن خوشه و حبه و سایر صفات قابل اندازه‌گیری در بین بوته‌های یک رقم بررسی می‌شوند. در مطالعات انتخاب کلونی با این روش ممکن است اشتباهاتی ناشی از اثرات ویروس، عوامل محیطی و یا سایر عوامل روی این صفات ایجاد شود؛ به عبارت دیگر تغییراتی که بر آن اساس کلون‌ها انتخاب شده‌اند ممکن است ژنتیکی نبوده و ناشی از ویروس یا عوامل محیطی باشند (Imazio *et al.* 2002). این در حالی است که روش‌های مطالعه بر اساس تغییرات در سطح DNA تحت تاثیر عوامل محیطی نمی‌باشند (Bowers *et al.* 1999).

انگور بی‌دانه سفید یکی از مهم‌ترین ارقام انگور مورد کشت و کار در ایران می‌باشد که به‌طور عمده به‌صورت تازه خوری و تهیه کشمش مصرف می‌شود. جهش‌های طبیعی، بیماری‌های ویروسی و حتی اثرات عوامل محیطی باعث ایجاد و ظهور اختلافات زیادی در صفات کمی و کیفی مانند اختلاف در عملکرد، شکل و اندازه حبه و خوشه، رنگ حبه، میزان قند، زمان رسیدگی و سایر صفات دیگر در بین بوته-های یک باغ، منطقه یا کشور شده است که همگی از طریق غیر جنسی تکثیر شده‌اند. در مناطق مختلف ایران این انگور با اسامی دیگری مانند کشمشی، سفید بی‌دانه و سلطانی معروف است (Doulati et al. 2007).

نشانگرهای مولکولی مانند ریزماهوارها (SSR) و AFLP به‌طور وسیعی برای بررسی اختلافات ژنتیکی و شناسایی کلون‌های انگور استفاده شده است (Popescu *et al.* 2002, Kartas *et al.* 2007and Kozjak *et al.* 2003) اما نسبت به نوع رقم مورد بررسی، نوع نشانگر و ترکیبات مختلف آغازگرها، نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است (Cervera *et al.* 1998, Scot *et al.* 2000 and Vignani *et al.* 2002). در این پژوهش امکان یافتن اختلافات ژنتیکی بین کلون‌های انگور بی‌دانه حاصل از یک برنامه انتخاب کلونی در استان آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در طی سال‌های ۱۳۸۳تا ۱۳۸۵ با مراجعات مکرر به تاکستان‌های اطراف شهرستان ارومیه و با اندازه گیری صفات زراعی مختلف، به‌ویژه صفات مناسب برای تهیه کشمش، شامل اندازه و وزن خوشه، اندازه، وزن و شکل حبه، زمان رسیدگی میوه‌ها، یکنواختی رسیدن، میزان رنگ‌گیری حبه‌ها، میزان مواد جامد محلول و عملکرد، تعداد ۲۱ بوته برتر انگور بی‌دانه سفید انتخاب شدند. با استفاده از روش الایسا[1] احتمال آلودگی این بوته‌ها به سه ویروس برگ بادبزنی (GFLV)، ویروس لوله‌ای شدن برگ (GLRV) و آرابیس موزائیک (ARMV) مورد بررسی قرارگرفتند. در این مطالعه نه کلون عاری از ویروس انگور بی‌دانه سفید مناسب برای تهیه کشمش به همراه کلون بی‌دانه قرمز به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین کلون‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP و SSR مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعات SSR و تست ویروس در دانشگاه تبریز و نشانگر AFLP در دانشگاه میلان ایتالیا انجام گرفت.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA، ۱۰-۵ عدد برگ جوان بدون دمبرگ از هر بوته انگور برداشته و پس از اتیکت‌گذاری، در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. استخراج DNA با روش *لابرا* و همکاران (Labra, *et al.* 2001) انجام شد. در این روش نیز همانند

1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

سایر روش‌های استخراج نیم گرم نمونه برگی در حضور ازت مایع پودر و سپس ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB به آن اضافه گردید. در مورد انگور با توجه به زیادی فنل و پلی ساکاریدها در برگ و تاثیرات منفی آن‌ها در واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز و برش‌های آنزیمی از وینیل پلی پیرومیدون (PVP) و نمک کلریدسدیم (NaCl) برای حذف آن‌ها استفاده گردید.

آنالیز ریزماهواره‌ها

در این بررسی از ۲۳ جفت آغازگر ریزماهواره برای تکثیر DNA استخراج شده استفاده شد. برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم ۱۰ میکرو لیتر با اجزای زیر انجام شد. ۲ میکرو لیتر DNA الگو (۲۵ نانوگرم) به اجزای PCR شامل ۱ میکرو لیتر بافر پی-سی‌آر، ۰/۵ میکرو لیتر کلرید منیزیوم، ۰/۱ میکرو لیتر مخلوط نوکلئوتیدها، ۰/۱۳ میکرو لیتر آنزیم polymerase Taq ، ۰/۸ میکرو لیتر آغازگرها و ۵/۴۷ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر شده اضافه گردید. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز به‌صورت زیر بود.

مرحله اول: یک چرخه شامل واسرشته‌سازی[1] اولیه به‌مدت ۴ دقیقه و دمای ۹۴ درجه سلسیوس، یک چرخه. مرحله دوم ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی، ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو[2]، بسته به نوع آغازگرها ۶۲- ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، بسط[3] توسط DNA پلی‌مراز در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و مرحله سوم، بسط نهایی شامل ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه. برای تفکیک محصولات PCR از ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. جهت تعیین اندازه نسبی قطعات تکثیری، از آلل‌های پنج رقم انگور مرجع شامل Barbera، Chardonnay, Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Pinot noir, صورت بارگذاری چند تایی محصول پی‌سی‌آر آن‌ها برای هر نشانگر در طول ژل و استفاده از نشانگر وزن مولکولی، DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11kbp) از شرکت Roche در دو انتها و وسط ژل استفاده گردید. برای الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز عمودی شرکت Bio Rad استفاده شد.

1. Denaturation
2. Annealing
3. Extension

آنالیز AFLP

تجزیه AFLP بر اساس روش *وس* و همکاران (Vos *et al*. 1995) انجام گرفت. بدین ترتیب که DNA (۲۰۰ نانو گرم) به‌مدت سه ساعت با آنزیم‌های برشی *Eco*R1(1U) و *Mse*1(1U) برش و سپس توسط آنزیم T4-DNA-Ligase به آداپتورهای *Eco*R1 (۵pmol) و *Mse*1 (۵pmol) متصل شدند. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت شش ساعت ادامه داشت. این محلول به‌عنوان الگو در واکنش تکثیر اولیه ۴ استفاده شد که حاوی آغازگرهای مکمل توالی ناحیه مرکزی آداپتورهای دو آنزیم به‌کار رفته می‌باشند. اجزای واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر مخلوط DNA برشی/ متصل شده به آداپتور، ۵۰ نانوگرم از آغازگرهای انتخابی، ۲۰۰ میکرومول از هر یک ازdNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Dynazyme Π و ۵ میکرولیتر بافر بود. واکنش تکثیر در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه)، ۲۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه (۴۵ ثانیه)، اتصال در ۶۰ درجه (۳۰ ثانیه) و بسط در ۷۲ درجه (۱ دقیقه) و سپس مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود. محصول تکثیر اولیه به نسبت ۵۰ : ۱ با آب رقیق و برای تکثیر انتخابی[5] استفاده شد. این مرحله با آغازگرهای انتخابی (E31,E32,E34,E38) مکمل آداپتورهای *ECO*R1 و آغازگرهای (M31,M32,M34,M36,M38,M39) مکمل آداپتورهای Mse1 انجام گرفت (جدول۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده در آزمایش AFLP

Table 1: Primer combinations used for AFLP analysis

Name	DNA sequence
M01	5’-GATGAGTCCTGAGTAA-3’
E01	5’-GACTGCGTACCAATTC-3’
E31	5’-GACTGCGTACCAATTCAAA-3’
E32	5’-GACTGCGTACCAATTCAAC-3’
E34	5’-GACTGCGTACCAATTCAAT-3’
E38	5’-GACTGCGTACCAATTCACT-3’
M31	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAA-3’
M32	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAC-3’
M34	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3’
M36	5’-GATGAGTCCTGAGTAAACA-3’
M38	5’-GATGAGTCCTGAGTAAACT-3’
M39	5’-GATGAGTCCTGAGTAAAGA-3’

4. Pre-amplification
5. Selective amplification

آغازگرهای *ECO*R1 با استفاده از ایزوتوپ Y32pATP نشان دار شدند. مخلوط تکثیر انتخابی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرو مخلوط رقیق شده تکثیر اولیه، ۵ نانوگرم از آغازگر *ECO*R1 نشان دار شده، ۳۰ نانو گرم از آغازگر *Mse*I ، ۲۰۰ میکرو مول از هر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Dynazyme Π و ۱ میکرولیتر از بافر آنزیم بود.

چرخه‌های حرارتی در این مرحله نیز شامل دو دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در چرخه اول و کاهش ۰/۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۳ چرخه بعدی و ۵۶ درجه سانتی گراد برای سایر ۲۳ چرخه دیگر در نهایت بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه بود. ۱/۵ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر با حجم مساوی از بافر بارگذاری (۸۰ درصد فرمامید، ۱mg/ml گزیلن سیانول FF ، ۱mg/ml بروموفنل بلو، ۱۰ mMEDTA، ۸ =pH) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد واسرشته شد. ۵ میکرو لیتر از محصول پی سی آر با ۵ میکرو لیتر بافر بارگذاری۱ اضافه و سپس ۱/۵ میکرولیتر از آن روی ژل ۶ درصد پلی آکریل آمید بارگذاری و الکتروفورز به مدت ۳ ساعت با ۸۰ ولت انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در اسید استیک ۱۰ درصد فیکس و پس از شستشو و خشک شدن، ژل به مدت ۲۴ ساعت در تاریک خانه در معرض فیلم عکاسی۲ گذاشته شدند. باندهای ظاهر شده روی اتورادیوگرام ها به صورت مشاهده ای نمره دهی شدند.

تجزیه‌های آماری

اندازه آلل‌های مکان‌های ریزماهواره با استفاده نشانگر وزن مولکولی و مقایسه با آلل ارقام انگور مرجع تعیین گردید (This *et al*. 2004). در روش AFLP هر نوار چند شکل به عنوان یک نشانگر در نظر گرفته شد و باندهای تکثیر یافته به‌صورت وجود (۱) یا عدم وجود نوار(صفر) امتیاز بندی شدند. ماتریس حاصله با استفاده از برنامه آماری GENSTAT V آنالیز شد (پاینی و همکاران، ۱۹۹۳). برای گروه بندی کلون‌ها از تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه Jaccard استفاده شد و دندروگرام براساس روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA۳ تهیه گردید. همچنین آزمون کوفنتیک با نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به اندازه گیری صفات کمی و کیفی کلون های انگور بی‌دانه سفید در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. همچنین در جدول ۳ اندازه آلل‌های بدست آمده برای انگور بی‌دانه در ۲۳ مکان ریزماهواره‌ای گزارش شده است. علیرغم وجود اختلافات در تعدادی از صفات اندازه گیری شده در بین کلون‌ها (جدول ۱)، هیچگونه چند شکلی بین کلون‌های مورد مطالعه انگور بیدانه سفید از طریق نشانگرهای ریزماهواره پیدا نشد و این روش نتوانست آنها را از هم متمایز نماید.

نتیجه حاصله موید این واقعیت می‌باشند که تفاوت-های مشاهده شده در صفات کمی و کیفی این کلون‌ها را نمی‌توان به آسانی بر اساس مکان‌های ریزماهواره، توجیه کرد. نتایج مشابهی توسط تعداد زیادی از محققان مانند *سیلوسترونی* و همکاران، ۱۹۹۷ ؛*ایماتسیو* و همکاران، ۲۰۰۲ در خصوص عدم کارایی نشانگرهای ریزماهواره در مطالعه کلون‌ها گزارش شده است. با این وجود موفقیت‌هایی محدود نیز در خصوص کاربرد این نشانگر در تشخیص کلون‌ها توسط *ریگنر* و همکاران؛ Regner *et al*. 2000) ارائه شده اند اما در بررسی‌های بعدی گزارش شد که این کلون‌ها در واقع منشاء پلی کلونالی داشتند. نبود هیچگونه اختلاف ژنتیکی قابل تشخیص توسط نشانگرهای ریزماهواره در بین کلون‌های انگور بی‌دانه سفید در این تحقیق نشان می‌دهد که همگی متعلق به این رقم بوده و منشاء پلی کلونی ندارند.

در تحقیق ما انتخاب کلون‌ها بر اساس تغییرات در صفاتی مانند مواد جامد محلول، عملکرد، وزن حبه و رنگ پوست حبه انجام گرفت. این تفاوت‌ها در این صفات احتمالا ناشی از تغییرات کوچکی در توالی DNA مناطق رمز کننده ژنوم یا ناشی از اثرات اپی ژنتیکی باشند که توسط مکان‌های ریزماهواره‌ای، که اغلب در ناحیه غیر رمز کننده ژنوم نیز قرار گرفته اند، قابل تشخیص نمی باشند (ویگنانی و همکاران، ۲۰۰۲).

1. Loading buffer
2. X-ray film
3. Un weighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA)

جدول۲: تعدادی از صفات اندازه گیری شده در کلون‌های انتخابی انگور بی‌دانه سفید
Table 2: Denomination and different agronomical traits of Bidane sefid clones

Clone	Cultivar	Cluster Number	Bunch number	Bunch length (cm)	Bunch wideth (cm)	Berry length (cm)	Berry wideth (cm	TSS	TA	Bunch/shoot	Berry color
Kred	Bidaneh Qermez	92	86	26	15	1.4	1.2	22	1.2	1.8	Red
K1	Bidaneh sefid	85	80	29	12	1.2	1.2	20.5	0.98	1.8	Yellow
K3	Bidaneh sefid	96	96	29.5	11	1.5	1.4	21.5	0.96	2	Yellow
K4	Bidaneh sefid	90	81	29.5	12	1.7	1.4	21.5	0.81	1.6	Light yellow
K9	Bidaneh sefid	100	90	25	14	1.5	1.2	22.5	0.97	1.7	Yellow
K12	Bidaneh sefid	80	70	28	12	1.4	1.25	24	0.76	1.9	Yellow
K25	Bidaneh sefid	127	121	25	12.4	1.2	1.1	21	1.05	1.7	Yellow
K35	Bidaneh sefid	80	70	28	14	1.4	1.2	22.2	0.95	1.8	Yellow
K59	Bidaneh sefid	126	115	25	14.2	1.2	1.1	21.4	1.01	1.9	Yellow
GRA1-1	Bidaneh sefid	80	72	26	12.5	1.7	1.2	22	0.95	1.85	Yellow

جدول ۳: اندازه آلل‌های بدست آمده در ۲۳ مکان ریزماهوار در ده کلون انگور مورد بررسی
Table 3: Allele length at 23 SSR loci developed from 10 clones

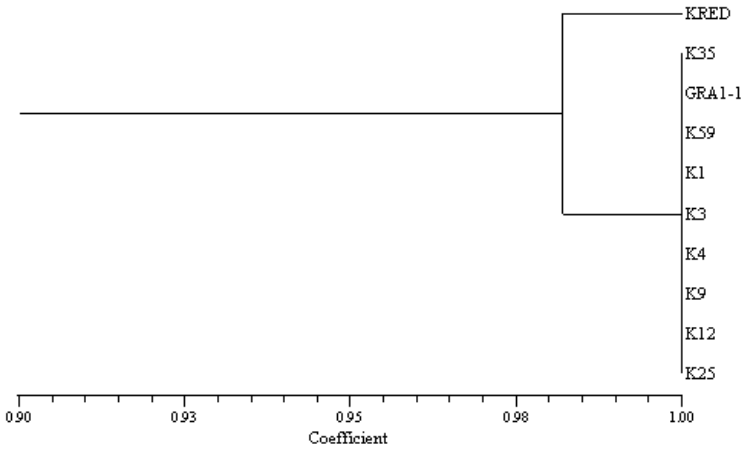
Locus	Alleles	Locus	Alleles	Locus	Alleles
VVMD5	234:234	D12	158:184	VVS3	212:218
VVMD7	240:254	UCH29	211:300	VVS4	174:174
VVMD8	145:152	ISV2	143:143	VrZAG47	159:169
VVMD17	222:222	ISV3	133:139	VrZAG62	188:188
VVMD21	249:258	ISV4	197:197	VrZAG64	143:159
VVMD25	243:253	G7	106:118	VrZAG79	248:260
VVMD26	247:249	G10	149:149	VrZAG83	194:194
VVMD27	181:190	VVS2	145:151		

AFLP

هفت ترکیب آغازگری AFLP در مجموع ۴۹۹ قطعه DNA قابل امتیاز بندی در کلون‌های انگور مورد بررسی ایجاد نمودند که کم‌ترین تعداد قطعه در ترکیب آغازگرهای E34-M34 با ۴۴ قطعه و بیش‌ترین تعداد با ۹۷ قطعه در آغازگر E31-M32 با میانگین کل ۷۶/۳ قطعه در ترکیب آغازگری بدست آمد (جدول ۴). از این ۴۹۹ قطعه حاصله تعداد ۸ قطعه چند شکل بودند. تجزیه خوشه‌ای (شکل ۱) بر اساس این نشانگرهای چند شکل، کلون‌ها را در دو گروه قرار داد: گروه اول شامل ۹ کلون انگور بی‌دانه سفید و بدون هیچگونه اختلاف ژنتیکی بین آنها و گروه دوم فقط شامل کلون انگور بی‌دانه قرمز بود. تشابه ژنتیکی بالای این دو گروه بیانگر منشاء کلونی انگور بی‌دانه قرمز و سفید می‌باشد. ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شده (Cophenetic correlation coefficient) برابر با r =۰/۹۹۹ بود که بیانگر ارتباط بالای داده‌های ورودی و خروجی نرم افزار و مناسب بودن الگوریتم انتخابی است.

جدول ۴: ترکیبات آغازگری، تعداد باندهای قابل تشخیص و تعداد باندهای چند شکل AFLP
Table 4: primer combinations, total bands detected and number of polymorphic bands of AFLP.

Primer combination	Total bands	Polymorphic bands
E32-M38	48	1
E34-M34	44	0
E38-M36	85	1
E34-M38	62	0
E31-M32	97	2
E32-M31	96	4
E34-M39	67	0



شکل ۱: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای کلون‌های انگور بر اساس داده‌های AFLP
Fig 1: Dendrogram of genetic relationships clones based on AFLP data

اختلاف اصلی بین انگور بی‌دانه سفید و قرمز در رنگ پوست حبه آن‌ها است. رنگ حبه ناشی از تجمع آنتوسیانین در پوست میوه است و یک جهش می‌تواند رنگ حبه را تغییر دهد. مطالعات *کوبایاشی* و همکاران (Kobayashi *et al. 2004*) اخیر نشان داده که ژن‌های گروه Myb مانند VvmybA1 بیوسنتز آنتوسیانین را تنظیم می‌کنند و یک رتروترانسپوزان عامل ایجاد جهش در این ژن‌ها با از دست رفتن یا سنتز رنگدانه‌ها در ارقام انگور در ارتباط می‌باشد. جهش جوانه در انگور پوست سفید رقم ایتالیا و ایجاد کلون انگور پوست قرمز Ruby okuyama با حذف یک ترانسپوزان جاگذاری شده در ژن VvmybA1 توسط کوبایاشی و همکاران (Kobayashi *et al*. 2005) گزارش شده است. بنابراین این احتمال وجود دارد که یک رتروترانسپوزان تصادفی عامل جهش در ژن‌های Myb در یک جوانه انگور بی‌دانه سفید باعث سنتز مجدد رنگدانه و در نتیجه ایجاد کلون بی‌دانه قرمز شده است. برای روشن شدن اختلاف بین این دو کلون بایستی مطالعات بر اساس نشانگرهای رتروترانسپوزان انجام گیرد.

نتایج ما نشان داد که نه کلون انگور بی‌دانه سفید (گروه اول) از لحاظ ژنتیکی یکسان بودند و اختلافات مشاهده شده در صفات کمی و کیفی بین آنها را نمی‌توان به آسانی بر اساس تجزیه AFLP بیان نمود. وجود تغییرات فنوتیپی می‌تواند ناشی از عوامل زیادی از جمله جهش، عوامل زراعی و محیطی و یا اپی ژنتیکی باشند. وجود همبستگی بین تغییرات در وضعیت متیلاسیون توالی ژن خاص و تظاهر یک فنوتیپ جدید به روشنی توسط *ایماتسیو* و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده شده است. بعلاوه جهش ممکن است به یک ناحیه یا منطقه بسیار کوچکی از ژنوم محدود شود و یا

یک جهش نقطه‌ای در ناحیه رمز کننده باشد که تشخیص آنها توسط نشانگرهای AFLP ممکن است مشکل باشد. برای کاوش یک قسمت بزرگ‌تر از ژنوم، بایستی از تعداد بیشتری آغازگر استفاده نمود (Fanizza *et al.* 2003).

بسته به تعداد و نوع ترکیب آغازگرها و نوع رقم مورد مطالعه، نتایج متناقضی در خصوص کارایی AFLP درتشخیص تغییرات بین کلون‌های یک رقم گزارش شده است. تعدادی از محققان (Cervera *et al.* 1998 and Fanizza *et al.* 2003) نتوانستند این تغییرات را در بین کلون‌ها با روش AFLP تشخیص دهند در حالیکه تعدادی دیگر (Sensi *et al.* 1996 and Scott *et al.* 2000) تغییرات بین کلون‌ها را بر اساس داده‌های AFLP تشخیص ندادند بر این اساس در مطالعات بعدی به منظور افزایش پوشش ژنومی و احتمال یافتن تغییرات در سطح DNA کلون‌های انگور، استفاده از تعداد ترکیبات آغازگری بیشتر AFLP به همراه نشانگرهای دیگری از جمله ISSR و ترانسپوزان‌ها پیشنهاد می‌گردد.

توالی یابی ژنوم انگور اخیرا کامل شده است (Jaillon *et al*, 2007) و این امکان بهبود روش‌های مطالعه DNA برای آنالیز ژن‌های ویژه مرتبط با صفات مورفولوژیکی را می‌دهد. این روش‌های جدید برای روشن کردن اساس ژنتیکی اختلافات کلونی و حذف هرگونه اشتباه ناشی از مشاهدات بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی مفید خواهند بود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از نتایج طرح خاص استانی تحت عنوان "به گزینی کلونی انگور رقم بی‌دانه سفید جهت بهبود کیفیت و عملکرد کلی میوه و کشمش‌های تولیدی استان آذربایجان‌غربی" می‌باشد که هزینه اجرای آن توسط سازمان جهاد کشاورزی استان تامین گردید و بدین وسیله از مسولین محترم آن سازمان تشکر و قدردانی می گردد.

Study of Genetic Differences of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Bidaneh Sefid Clones Using SSR and AFLP Markers

Doulati Baneh[1], H. and Mohammadi[2], S. A.

Abstract

Clonal selection has become the most important way to improve the quality of grape cultivars. Nowadays, there is a need for reliable and precise methods to characterize of clones for use by nurseries and breeders. To assess the genetic differences among clones of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv Bidaneh sefid, 10 selected clones from a clonal selection program were analyzed by 23 Simple Sequence Repeats (SSR) and seven Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) primer combination. No intra-varietal differences could be detected by SSRs among clones whereas eight out of the 499 AFLP fragments generated by the seven primer combinations were polymorphic. The number of markers ranged from 44 (E34-M34) to 97 (E31-M32) with an average of 71.3 fragments per primer combination. Cluster analysis based on AFLP data were separated all the clones of Bidaneh sefid in two groups. The first group includes nine white berry skin clones, without any genetic differences and the second group with only a red berry skin clone. AFLP could only differentiated the red berry clone from other white berry clones.

Keywords: Grapevine, Clone, Genetic Difference and Molecular markers

References

Bowers, J. E., Dangl, G. S. and Meredith, C. P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. American Journal of Enology and Viticulture 50, 243–246.

Cervera, M.T., Cabezas, J. A., Sancha, J. C., Martinez, F. and Martinez, J. M. 1998. Application of AFLP to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* genetic resources. a case study with accessions from Rioja (Spain). Theoretical and Applied Genetic. 97, 51-59.

Doulati Baneh, H., Mohammadi, S. A., Labra, M., Nazemieh, A., De Mattia, F. and Mardi, M. 2007. Chloroplast microsatallites markers to assess genetic diversity in wild and cultivated grapevines of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (11), 1855-1859.

Fanizza, G., Chaabane, R., Ricciardi, L. and Resta, P. 2003. Analysis of a spontaneous mutant and selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers Vitis 42 (1), 27-30.

Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M. and Scienza, A. 2002. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar Traminer. Plant Breeding 121, 531-535.

Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A. and Clepet, C. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449, 463-467.

Karatas, H., Değirmenci, D., Velasco, R., Vezzulli, S., Bodurand, C. and Sabit Agaoglu Y. 2007. Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. Scientia Horticulturae 114, 164-169.

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

Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H. 2005. Association of VvmybA1 gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. Journal of Japn. Society Horticultural Science. 74, 196-203

Kozjak, P., Korosec-Koruza, Z. and Javornik, B. 2003. Characteristics of cv. Refosk (*Vitis vinifera* L.) by SSR markers. Vitis 42 (2), 83-86.

Labra, M., Carreno-Sanchez, E., Bardini, M., Basso, B., Sala, F. and Scienza, A., 2001b. Extraction and purification of DNA from grapevine leaves. Vitis 40 (2), 101-102.

Moreno, S., Martin, J. P. and Ortiz, J. M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. Euphytica 101: 117-125

Payne, R. W., Lane, P. W., Ainsley, A. E,, Bricknell, K. E, Digby, P. C. N., Harding, S. A., Leech, P. K., Simpson, H. R., Todd, A. D., Verrier, P. J., White, R. P., Gower, J .C. and Tuncliffe, W. G. 1993. Genstat 5 Release 3 Reference Manual, Clarendon Press, Oxford, pp 792.

1. Scientific staff of Agriculture and Natural Resources Research Center of West Azerbaijan, Uromiyeh

2. Associate professor, Department of Horticulture, Tabriz University, Tabriz

∗: Corresponding author Email: ah_dolati@yahoo.com

Popescu, C. F., Flak, A. and Glimelius, K. 2002. Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines. Vitis 41 (4), 177-182.

Regner, F., Wiedeck, E. and Stadlbaur, A. 2000. Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. Vitis 39(3): 103-107

Scott, K. D., Ablett, E. M., Lee, L. S. and Henry, R. J. 2000. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame seedless grape. Euphytica 113 (3), 243-247.

Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W. and Biricolti, S., 1996. Characterization of genetic biodiversity with *V. vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. Vitis 35 (4), 183-188.

Silvestroni, O., Di Pietro, D., Intrieri C., Vignani, R., Filippetti I., Del Casino, C., Scali, M. and Cresti, M., 1997. Detection of genetic diversity among clones of cultivar Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellites DNA polymorphism analysis. Vitis 35, 147-150.

This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G. S., Eisenheld, C., Ferreira-Monterio, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C. P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L. and Maul, E., 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars.Theoretical and Applied Genetic 109, 1448-1458.

Vignani, R., Scali M., Masi, E. and Cresti, M. 2002. Generic variability in *Vitis vinifera* L. "Sangiovese" assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test. Electronic Journal Biotechnology. 5 (1), 120-124.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. And Zabeau, M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23, 4407-4414.