

## بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انگور سیستان با استفاده از مارکر مولکولی RAPD

محمود سلوکی<sup>۱</sup>، نفیسه ریگی نژاد<sup>۱\*</sup>، حسین کمال الدینی<sup>۲</sup>، براتعی سیاه سر<sup>۱</sup>، ریتا ویگناتی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> ایران، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

<sup>۲</sup> ایران، دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

<sup>۳</sup> ایتالیا، دانشگاه سیانا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

\*ارائه دهنده و نویسنده مسئول مکاتبات [nafisehri@yaho.com](mailto:nafisehri@yaho.com)

### چکیده:

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی ارقام انگور در سطح مولکولی از نشانگر رپید استفاده شد. در این تحقیق ۶ ژنوتیپ انگور متعلق به مناطق مختلف سیستان با ۳۱ آغازگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ۳۱ پرایمر تست شده روی DNA ژنومیک، ۲۱ پرایمر برای آنالیز ژنتیکی انتخاب شدند. پرایمرهای انتخاب شده ۴۹۷ باند واضح و آشکار تولید کردند. تکثیر حاصله باعث ایجاد باندهای در محدوده اندازه های بین ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز شد. این باندها به صورت ماتریس (۱ و ۰) که به ترتیب حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) امتیاز بندی شدند. ماتریس حاصله به روش UPGMA تجزیه گردید. برای رسم دندوگرام فواصل ژنتیکی ارقام بوسیله تجزیه کلاستر بکار گرفته شد و در نهایت ارقام مطالعه شده در ۴ گروه اصلی طبقه بندی شدند که ارقام یاقوتی قرمز و سفید دارای بیشترین تشابه (۰/۶۷۲) و ارقام قرمز و لعل دارای کمترین تشابه (۰/۴۱۱) بودند. در این تحقیق با توجه به باندهای چند شکل کارایی نشانگر رپید جهت گروه بندی ارقام تأیید شد. واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، تشابه ژنتیکی، پرایمر تصادفی، UPGMA، ماتریس تشابه، RAPD

## Study of Genetic variation in some grape cultivars genotypes from sistan by RAPD technique

RAPD Marker was used in order to study the genetic variations and assessment of the characters of the grape fruit on the molecular level. For this research 6 genotypes related to the different areas of season were assessed by 31 primers. Out of these 31 primers which were tested on the genetic DNA, 21 primers were selected for the genetic analysis. Selected primers produced 497 evident bands. Resulted proliferations lead to the formation of bands ranging in size from 300-3500 base pairs. These bands were grades in the form of (0 & 1) matrix that were in the order of presence of band 1 and the absence of band 0. Product matrix was analyzed by the method of UPGMA. To draw the dendrogram of the genetic distances of the characters with the help of analysis of clusters were classified in 4 principle groups in which ruby red and white ruby had the maximum similarity and ruby red and lal had the minimum. Considerations multishape bands, efficiency of RAPD marker for the classification of characters has been confirmed in this research.

### مقدمه:

تکثیر انگور بوسیله قلمه صورت میگیرد که در نتیجه آن جمعیت های از کلونهای مشابه (به جز موتاسیونهای سوماتیک) که کاملاً مشابه هم و مشابه پایه مادری هستند ایجاد می شود. (Vignani et al., 2001). متدهای سنتی شناسایی رقم های انگور بر پایه صفات مورفولوژیک بودند که این صفات خود تحت تاثیر فاکتورهای رشدی و محیطی هستند و باعث کاهش کارایی این شاخص ها می شود. نشانگر های بیو شیمیایی مانند ایزوزایم ها هم چنین برای شناسایی رقم های انگور (Ohmi et al., 1993) مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعه تنوع ژنوتیپی بر پایه تنوع روی ایزوزایم ها به علت کم بودن تعداد ایزوزایم ها فابل ثبت و مشاهده و پایین بودن چند شکلی و تفاوت قابل ثبت در آنها، محدود می باشد. در همین راستا نهایتاً مارکر های مولکولی مبتنی بر DNA بوجود آمد که پلی مورفیسم وسیعی را در سطح DNA نشان داد و یک روش مطلوب برای تشخیص گونه های خویشاوند نزدیک بهم است. با پیدایش تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) تکنیک های مولکولی مطلوب و جدیدی مبتنی بر آن گسترش یافت که عبارت است از تکثیر قطعات تصادفی DNA یا RAPD بواسطه مزایای تکنیکی، مارکر های RAPD بطور وسیعی در ژنتیک جمعیت ها، تجزیه تنوع زیستی و مطالعات و بررسی خویشاوندی در میان گونه ها در سطوح مختلف بکار رفته است (Williams et al., 1990). در تحقیق حاضر هدفی دنبال شد که عبارتست از بررسی تنوع ژنتیکی و یا پلی مورفیسم ژنتیکی در میان کولتورهای انگور و نهایتاً تجزیه و تحلیل آماری داده ها جهت گروه بندی ارقام بوده است

### مواد گیاهی:

ژنوتیپ های مورد بررسی در این تحقیق شش رقم انگور (فخری، لعل، سنگک، یاقوتی قرمز، یاقوتی سفید، چشم گاوی) بومی منطقه سیستان که از سطح مناطق مختلف شهرستان زابل استان سیستان و بلوچستان در نیتروژن مایع یا روی یخ جمع آوری شد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰ °C - نگهداری شده و در نهایت توسط روش RAPD آنالیز شدند

## استخراج DNA:

۰/۵ گرم از برگهای جوان جمع آوری شده توسط هاون در حضور نیتروژن مایع آسیاب شدند و DNA ژنومیکي آنها از طریق پروتکل (Lodhi *et al.*, 1994) استخراج شد. در این روش از بافر استخراج (20mMEDTA CTAB 2%، 1.4 M Nacl، 100mMTris PH=8) استفاده شده و هم چنین از PVP برای برداشتن پلی فنل ها و از Nacl برای حذف پلی ساکاریدهای استفاده می کنیم. سپس پلیت DNA بدست آمده را در بافر TE حل نموده، کیفیت و کمیت DNA ژنومی از طریق بیوفومتری (جذب نور) انجام شد. به این ترتیب محلول های پایه ای که این نسبت در آنها بین ۱/۸-۲ بود انتخاب شدند پس از آن محلول کاری یا DNA ی به غلظت ۱۰ نانو گرم در میکرو لیتر تهیه و از این غلظت DNA در آزمایشها استفاده گردید.

## شرایط RAPD و تکثیر:

DNA ژنومیکي با استفاده از ۳۱ پرایمر تکثیر شد. پرایمرها توسط شرکت سیناژن آماده شدند. شرایط آزمایش به شرح زیر بود ( 200microM dNTPs . 2unit Taq DNA . 40 mM Kcl . 10mMTris PH=8 . 2mMMgcl2 . 0.4 microM primer . Triton x-100 %0/110 ng DNA و در پایان حجم واکنش ۲۵ میکرو لیتر خواهد بود.

تکثیر در یک دستگاه ترمو سایکلر مدل mastercycler gradient با شرایط ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه ، ۳۵ °C برای یک دقیقه و ۷۲ °C برای یک دقیقه و ۴۵ ثانیه با تعداد ۳۸ سیکل صورت گرفت، و در پایان سیکل ها نمونه ها را به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ °C نگه داشتیم و آنگاه تا دمای ۴ °C سرد کردیم و تا زمان استفاده در یخچال نگه داری نمودیم . محصولات PCR بوسیله ژل آگاروز ۱/۴ % و بافر TAE 0.5 X توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

## آنالیز RAPD:

DNA ژنومیکي هر رقم حداقل دو بار توسط هر یک از پرایمر ها تکثیر شدند. اکثریت نشانگرها بطور واضح قابل تکرار و اندازه گیری هستند. باندهای پلی مورفیک برای تشکیل ماتریس جفتی (۰ و ۱) بر مبنای حضور و عدم حضور رتبه بندی شدند. و بر اساس آن ماتریس تشابه بر مبنای ضریب تشابه دایس (DICE، ۱۹۴۵) تشکیل شد. برای گروه بندی ارقام از روش UPGMA استفاده شد. و نتایج حاصل به صورت یک دندوگرام توسط نرم افزار SPSS رسم شد.

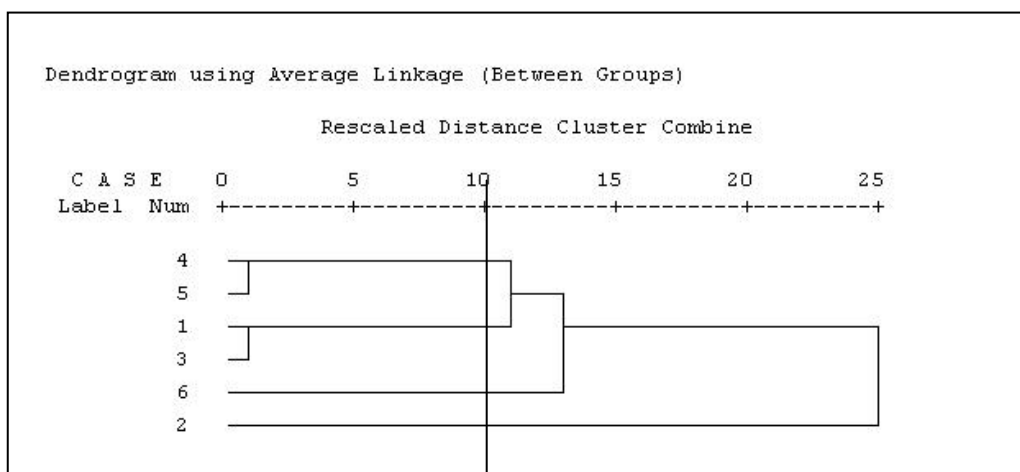
## نتایج و بحث:

به طور کلی از ۳۱ پرایمر بکار گرفته شد. ۲۱ پرایمر پروفیل های الکتروفوریتیکی مشخص را نتیجه دادند که براحتی قابل دسته بندی بودند که در شکل ۱ نشان داده شده است در ضمن تمامی پرایمرهای بکار رفته حاوی ۸۰-۶۰ درصد (C+G) بودند و هیچ کدام از توالی پرایمرهای، دارای انتهای خود مکملی نبودند و علاوه بر این مساله پرایمرهای اختیاری و تصادفی بوده است مجموع ۴۹۷ باند با ۲۱ پرایمر امتیاز بندی شدند. باندهای هر پرایمر از طول ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز متغیر بودند. بیشتر از دو سوم باندها بزرگتر از ۲۰۲۷ جفت باز و کمتر از ۹۸۳ جفت باز بودند و اکثرًا متوسط بودند. ۸۸/۹۷% باندهای پلی مورفیک بودند (شکل ۱). از ۳۱ پرایمر استفاده شده در این مطالعه تنها چهار تا از پرایمرها در تکثیر موفق نبودند و باندهای تولید شده توسط دو تا از پرایمر ها مناسب برای امتیاز بندی نبودند و چهار تا از پرایمرها نسبت به سایر آغازگرها این توانایی را داشته اند که باندهایی یک شکل برای تمامی ژنوتیپها تولید نمایند. بطور مثال آغازگر B341 در لوکوس ۲۰۲۷ جفت بازي و ۱۵۸۴ جفت بازي برای تمام ژنوتیپها باندهایی واضح را تکثیر نمود. بعضی از آغازگرها این توانایی را داشته اند که با اکثر ارقام باندهای واضح با اندازه ۳۵۳۰-۲۰۰ جفت بازي تولید نمایند. همچنین این آغازگرها نسبت به سایر آغازگرها باندهایی با اندازه بیشتر تولید نموده است. با توجه به دي ان اي تکثیر شده و باندهای حاصل و تجزیه و تحلیل داده ها میزان تشابه بین ارقام محاسبه گردید. بیشترین تشابه بین ارقام یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید می باشد که معادل ۰/۶۷۲ است و کمترین میزان تشابه را ارقام یاقوتی قرمز و لعل دارا بودند که برابر ۰/۴۱۱ می باشد. برش دندوگرام حاصل ژنوتیپ ها را به چهار گروه تقسیم نمود. گروه اول شامل ژنوتیپ های یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید. گروه دوم شامل ژنوتیپ های فخری و سنگک. گروه سوم شامل ژنوتیپ لعل. گروه چهارم شامل ژنوتیپ چشم گاوی. با رجوع به شکل (۲) می توان دید که در گروه اول ابتدا ژنوتیپ های یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید تشکیل یک زیرگروه را دادند و همچنین ژنوتیپ های فخری و سنگک با هم تشکیل یک زیر گروه مجزای دیگر را دادند که در فاصله ژنتیکی بالاتر، این دو زیر گروه به هم پیوستند. سپس ژنوتیپ چشم گاوی و در نهایت ژنوتیپ لعل وارد مدل شد. نتایج نشان می دهد که ژنوتیپ لعل حداکثر فاصله ژنتیکی را با ژنوتیپ های یاقوتی قرمز و سفید و ژنوتیپ های فخری و سنگک داشت. در مرحله بعدی ژنوتیپ چشم گاوی بیشترین فاصله را با ژنوتیپ های یاقوتی قرمز و سفید و ژنوتیپ های فخری و سنگک داشت.

در این تحقیق ژنوتیپ های ۴ و ۵ با ژنوتیپ ۶ و ژنوتیپ ۲ نسبت به سایر ژنوتیپها فاصله ژنتیکی بیشتری دارند لذا می توان با مطالعات تکمیلی و شناسایی بیشتر این ژنوتیپها، از آنها به عنوان والدین در تلاقیها جهت تولید واریته های

## منابع

- Lodhi, Muhammad A., Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch. (1994).** A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars , Vitis species and Ampelopsis . Plant Molecular Biology Reporter **12(1)**: 6-13.
- Ohmi C, Wakana A, Shiraishi S (1993).** Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isozymes. Euphytica **65**: 195-202
- Vignani R, Scali M , Masi E, Cresti M( 2001) .** Genomic variability in vitis vinifera l. " sangiovest" assessed by microsatellite and non- radioactive AFLP test.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. **18**:6531-6535.



شکل (۲) دندروگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌هایی‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس بوسیله نرم افزار SPSS که به چهار گروه تقسیم می‌شود

Surf and download all data from SID.ir: [www.SID.ir](http://www.SID.ir)

Translate via STRS.ir: [www.STRS.ir](http://www.STRS.ir)

Follow our scientific posts via our Blog: [www.sid.ir/blog](http://www.sid.ir/blog)

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: [www.sid.ir/workshop](http://www.sid.ir/workshop)