

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده مهندسی کشاورزی
گروه علوم باغبانی و گیاه پزشکی
پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انگور منطقه
شاهرود

نگارنده

کبری عبیری

استاد راهنما

دکتر مهدی رضایی

اساتید مشاور

دکتر پرویز حیدری

دکتر حمید رضا طحانیان

آذر ۱۳۹۸

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده



مدیریت تحصیلات تکمیلی

باسمہ تعالیٰ

شماره: ۳۹۲
تاریخ: ۱۳۹۸/۹/۲۷

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم کبری غیری با شماره دانشجویی ۹۵۱۰۱۷۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش باغبانی تحت عنوان بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انگور منطقه شاهرود که در تاریخ ۹۸/۹/۴ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می‌گردد:

☐ مردود		☒ قبول (با درجه: <u>خیلی خوب</u>)	
☒ عملی		☐ نظری	
نوع تحقیق:			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مهدی رستمی	استادیار	
۲- استاد مشاور اول	دکتر پرویز حسینی	استادیار	
۳- استاد مشاور دوم	دکتر حمیدرضا طحتمن	استادیار	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر کامیار جهانبین	دانشیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر زیبا قسمی حق	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه-
های یکتا و زیبای زندگی، مدیون حضور سبز آنهاست....

تقدیم به خانواده عزیزم

روح پدر و مادرم

که الفبای زندگی را به من آموختند

همسرم که در سایه همیاری و همدلی او به این منظور نائل شدم

و فرزندانم که صبورانه و صادقانه من را همراهی نمودند

تشکر و قدردانی

نهال را "باران" باید، تا سیرابش کند از آب حیات و "آفتاب" باید تا بتاباند نیرو را و محکم کند شاخه‌های تازه رویده را...

بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه‌ام تشکر و قدردانی کنم. از استاد اندیشمند و فرهیخته جناب آقای دکتر مهدی رضایی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را برعهده گرفتند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از اساتید مشاور جناب آقای دکتر پرویز حیدری و جناب آقای دکتر حمیدرضا طحانیان به دلیل مشاوره‌های بی‌منت و راهنمایی‌های ارزشمندشان سپاسگزارم. هم‌چنین از اساتید محترم داور سرکار خانم دکتر زیبا قسیمی‌حق و جناب آقای دکتر امین ابراهیمی که زحمت داوری و بازخوانی این پایان‌نامه را متقبل شدند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همدلی و مساعدت‌های همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم بی‌نهایت قدردانی می‌نمایم و برای تمامی عزیزان سلامتی و توفیق در مسیر زندگی از خداوند بلند مرتبه خواستارم.

و در پایان تشکر خالصانه دارم خدمت تمامی کسانی که به نوعی، به قلمی و یا به نگاهی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نمودند. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

کبری عبیری

شهریور ۹۸

تعهدنامه

اینجانب **کبری عبیری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته باغبانی دانشکده‌ی کشاورزی بسطام دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انگور منطقه شاهرود تحت راهنمایی دکتر مهدی رضایی متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه 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 پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
 - کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا «Shahrood University» به چاپ خواهد رسید.
 - حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، 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

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد .
- این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

ایران یکی از کشورهای مهم تولید کننده انگور است که ارقام و ژنوتیپ‌های محلی گوناگونی از انگور خوراکی در آن پرورش می‌یابد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انگور منطقه شاهرود با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و نشانگرهای SSR است. در این تحقیق ۲۶ خصوصیات مورفولوژی در ۵۵ ژنوتیپ انگور مورد ارزیابی قرار گرفت و در بخش مولکولی از هشت جفت آغازگر SSR در ۲۲ ژنوتیپ انتخابی استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی بر مبنای روش الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد. نتایج به‌دست آمده در بخش مورفولوژیکی نشان داد که تنوع بالایی در صفات مورد ارزیابی وجود دارد. بیشترین شاخص تنوع مربوط به صفات‌های آنتوسیانین، طول دمبرگ، شکل برگ، تراکم خوشه و کمترین شاخص تنوع مربوط به صفت زاویه برگ بود. نتایج حاصل از ضرایب همبستگی، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین برخی صفات از جمله زاویه برگ با طول رگبرگ، عرض حبه با طول حبه، عرض خوشه با طول خوشه و رنگ گوشت میوه با آنتوسیانین دمبرگ نشان داد. دندروگرام حاصل از صفات مورفولوژیکی در فاصله کاهشی ۱۵ به ۱۰ ارقام را به شش گروه مشخص تقسیم‌بندی کرد. تمام آغازگرهای SSR مورد بررسی چندشکلی نشان دادند. جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، در ۲۲ ژنوتیپ باندهای دوتایی و تک باند را از خود نشان دادند. در تجزیه کلاستر با نشانگر SSR ارقام در پنج گروه مشخص گروه‌بندی شدند و رقم دیشویی به دلیل آنتوسیانین بالا به تنهایی در یک گروه قرار گرفت. نتایج نشان داد که رقم کاردینال در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به سایر ارقام قرار دارد و رقم عسکری اصفهان به تنهایی در یک گروه قرار گرفت. نتایج این پژوهش، نشان‌دهنده وجود تنوع مولکولی و مورفولوژیکی در بین ارقام انگور کلکسیون شاهرود است.

کلمات کلیدی: انگور، تنوع ژنتیکی، خصوصیات مورفولوژیکی، SSR

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
فصل دوم کلیات و بررسی منابع	۷
۱-۲- تاریخچه انگور	۸
۲-۲- سطح زیر کشت و تولید انگور در دنیا و ایران	۸
۳-۲- شرایط اقلیمی مورد نیاز	۹
۴-۲- خصوصیات گیاه شناسی	۱۰
۱-۴-۲- ریشه	۱۰
۲-۴-۲- ساقه	۱۰
۳-۴-۲- برگ	۱۱
۴-۴-۲- گره ها و جوانه ها	۱۱
۵-۴-۲- پیچک	۱۱
۶-۴-۲- گل	۱۲
۷-۴-۲- میوه	۱۲
۵-۲- اهمیت و مصارف	۱۲
۶-۲- ترکیبات شیمیایی درخت انگور	۱۳
۷-۲- تنوع ژنتیکی	۱۴
۱-۷-۲- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی	۱۶
۲-۷-۲- کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی	۱۶
۸-۲- انواع نشانگرها	۱۶
۸-۲- ۱- نشانگرهای مورفولوژیکی	۱۷
۸-۲- ۲- نشانگرهای بیوشیمیایی	۱۹
۸-۲- ۳- نشانگرهای مولکولی	۱۹
۸-۲- ۴- ویژگی های یک مارکر (نشانگر) مولکولی مناسب	۲۰
۸-۲- ۵- نشانگرهای مولکولی بر پایه هیبریداسیون	۲۱
۸-۲- ۶- نشانگرهای مبتنی بر PCR	۲۲
۹-۲- ماهواره ها	۲۲
۱۰-۲- ماهوارک ها	۲۳
۱۱-۲- ریزماهواره ها یا میکروساتلایت ها یا SSR	۲۳
۱-۱۱-۲- خصوصیات نشانگرهای SSR	۲۴
۲-۱۱-۲- کاربردهای نشانگر SSR	۲۵
۳-۱۱-۲- مزایای ریزماهواره ها	۲۵
۴-۱۱-۲- معایب ریزماهواره ها	۲۶
۱۲-۲- روشه ای آماری تجزیه داده های مولکولی	۲۶
۱-۱۲-۲- اندازه گیری فواصل و تشابه ژنتیکی	۲۶
۲-۱۲-۲- تجزیه های چند متغیره آماری	۲۷

۲۷	تجزیه خوشه ای ۱-۲-۱۲-۲
۲۷	UPGMA ۲-۲-۱۲-۲
۲۷	تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) ۳-۲-۱۲-۲
۲۸	کاربرد نشانگرهای مولکولی در تعیین تنوع ژنتیکی و ایجاد کلید شناسایی و اصلاح ارقام ۱۳-۲
۲۹	۱۴-۲ مروری بر منابع
۳۱	۱-۱۴-۲ مروری بر پژوهش های انجام شده در گیاهان مختلف با استفاده از نشانگر SSR
۳۷	فصل سوم مواد و روش
۳۸	۲-۳ مواد گیاهی
۳۸	۱-۲-۳ صفات مورفولوژیکی مربوط به برگ
۳۹	۲-۲-۳ تجزیه و تحلیل آماری
۴۲	۳-۳ مواد و روش های بخش مولکولی
۴۲	۱-۳-۳ نمونه برداری و استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB
۴۲	۲-۳-۳ مراحل استخراج DNA
۴۳	۴-۳ بررسی کمیت و کیفیت DNA
۴۳	۱-۴-۳ الکتروفورز ژل آگارز متافور با استفاده از الکتروفورز افقی
۴۴	۵-۳ بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلیمرز
۴۷	فصل چهارم نتایج و بحث
۴۸	۱-۴ صفات مورفولوژیکی
۵۲	۱-۱-۴ ضریب همبستگی بین صفات
۵۳	۱-۱-۱-۴ ضریب همبستگی پیرسون بین صفات کمی
۵۵	۲-۱-۱-۴ ضریب همبستگی اسپیرمن بین صفات کیفی
۵۶	۲-۱-۴ تجزیه خوشه های صفات مورفولوژی
۶۰	۳-۱-۴ تجزیه به مؤلفه های اصلی
۶۳	۱-۳-۱-۴ تجزیه تریپلات صفات مورفولوژیکی
۶۵	۲-۴ تجزیه SSR
۶۸	۱-۲-۴ ضریب عدم تشابه
۷۰	۲-۲-۴ تجزیه خوشه های داده های SSR
۷۱	۳-۲-۴ کلید شناسایی بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر SSR
۷۳	۴-۲-۴ تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) نشانگر SSR
۷۴	۵-۲-۴ رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ های انگور با استفاده از نشانگر SSR
۷۶	نتیجه گیری
۷۷	پیشنهادات

فهرست جداول

- جدول ۳-۱- ارقام مورد مطالعه جمع‌آوری شده از مرکز تحقیقات شاهرود ۴۰
- جدول ۳-۲- صفات مورفولوژیکی مربوط به امتیازدهی براساس دیسکریپتور DUI ۴۱
- جدول ۳-۳- مواد و غلظت مورد استفاده جهت تهیه بافر استخراج ۴۳
- جدول ۳-۴- مشخصات نشانگرهای SSR مورد استفاده ۴۴
- جدول ۳-۵- شرایط بهینه سازی برای PCR آغازگرهای مورد آزمایش ۴۵
- جدول ۳-۶- برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه های ریزماهواره ۴۵
- جدول ۴-۱- آمار توصیفی صفات مورفولوژی مورد بررسی ۵۲
- جدول ۴-۲- ضریب همبستگی پیرسون بین صفات مورد بررسی در بین ۵۵ واریته انگور ۵۵
- جدول ۴-۳- ضریب همبستگی اسپیرمن بین صفات مورد بررسی در بین ۵۵ واریته انگور ۵۶
- جدول ۴-۴- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۹ مؤلفه اصلی ۶۲
- جدول ۴-۵- نتایج آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۲۵ صفت مورفولوژیکی در ۵۵ واریته انگور ۶۳
- جدول ۴-۶- صفات به‌دست‌آمده از آغازگرهای SSR در ۲۲ ژنوتیپ انگور ۶۸
- جدول ۴-۷- ماتریس عدم تشابه ۲۲ ژنوتیپ انگور بر اساس داده های ۸ مکان ژنی SSR ۷۰
- جدول ۴-۸- مکان ژنی ژنوتیپ‌های انگور براساس ۸ مکان ژنی SSR ۷۳
- جدول ۴-۹- نتایج حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی از پرایمر SSR ۷۴

فهرست اشکال

- شکل ۳-۱ نقشه شهرستان شاهرود و شهرهای همسایه آن..... ۳۸
- شکل ۳-۲- نمایش کیفیت نمونه DNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۴۶
- شکل ۳-۳- نمایش کیفیت نمونه آغازگرهای ۶، ۴ و ۷ بر روی ژل آگارز متافور..... ۴۶
- شکل ۴-۱-عکس خوشه ۵۵ واریته های انگور مورد مطالعه در این تحقیق ۵۰
- شکل ۴-۲- تنوع شکل برگ در ۵۵ واریته های انگور مورد مطالعه در این تحقیق ۵۱
- شکل ۴-۳- تنوع رنگ و شکل در برش طولی حبه ۵۵ واریته های انگور مورد مطالعه در این تحقیق ۵۴
- شکل ۴-۴- دندروگرام ۵۵ واریته انگور براساس ۲۶ صفت مورفولوژیک ۵۹
- شکل ۴-۵- تجزیه تریپلات (تصویر سه بعدی) پراکنش ۵۵ رقم انگور براساس صفات مورفولوژیکی مؤثر در عاملهای اول، دوم و سوم ۶۵
- شکل ۴-۶- نمودار میانگین فاصله ژنتیکی جاکارد بین ۲۲ رقم انگور حاصل از ۸ جفت پرایمر SSR ۶۹

فصل اول

مقدمه

تولیدات بخش کشاورزی اهمیت خاصی در پویایی اقتصاد هر کشوری دارند. انگور یکی از گیاهان مهم تجاری در ایران است. انگور با نام علمی (*Vitis vinifera* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات باغی جهان است که به لحاظ سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی بالا، مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. ارزش این محصول به دلیل تولید فرآورده‌های متنوع، بسیار بالا بوده و از این لحاظ نقش بسیار مهمی را در اقتصاد کشورهای تولیدکننده آن ایفاء می‌کند (Zohouri, 2006). طبق گزارشات سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید جهانی انگور در سال ۲۰۱۶ تقریباً ۷۵ میلیون تن بوده است که کشور ایران با تولید ۲ میلیون و ۲۵۱ هزار تن، در دنیا جایگاه مهمی داشته است و رتبه نهم را به خود اختصاص داده است (FAO, 2016). از طرف دیگر از لحاظ سطح زیرکشت و میزان تولید در بین سایر محصولات درختی در ایران، انگور در جایگاه اول قرار دارد. یک سوم محصول انگور به عنوان تازه‌خوری مصرف می‌شود و بقیه به صورت خشک استفاده می‌شود (FAO, 2016). استفاده از انگور محدود به میوه رسیده آن نبوده بلکه، برگ و میوه نارس آن هم به صورت غوره مصرف غذایی دارند. به علاوه از عصاره آن به صورت آب یا شیر انگور، از خشک شده آن به صورت کشمش، از محصولات تخمیری یا تقطیری آن به صورت شراب، الکل و سرکه، از 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 (Tafazzoli et al, 1994). این گیاه دارای ۱۱ جنس شناخته شده و حدود ۶۰۰۰ - ۵۰۰۰ واریته می‌باشد (Tassie, 2010). در میان آن‌ها جنس *Vitis* مهم‌ترین و تنها جنسی است که میوه خوراکی دارد و دارای ۶۰ گونه و ۱۰۰۰ رقم نام‌گذاری شده است (کرمی، ۱۳۸۸). جنس *Vitis* دارای بهترین کیفیت محصول است و در اکثر مناطق معتدل جهان کشت و مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. به طوری که در منطقه بزرگی از عرض جغرافیایی ۲۵ تا ۵۰ درجه شمالی در آسیای شرقی، اروپا، آمریکای شمالی، خاورمیانه و به صورت محدود در نواحی گرمسیر مکزیک، گواتمالا، جزایر وابسته به دریای کاریب و شمال آمریکای جنوبی کشت می‌شود (اثنی عشری و همکاران، ۱۳۸۶). گونه *V. vinifera* از

آسیای غربی منشا گرفته و شهرت خاصی در سراسر دنیا دارد. موطن اصلی درخت انگور در دنیا، ناحیه قفقاز و موطن اصلی انواع آمریکایی که نقش مهمی را در احیای موستان‌های اروپا مخصوصاً فرانسه به خاطر مقاوم بودن پایه به آفت فیلوکسرا دارند، آمریکای شمالی می‌باشد (شیرآوند، ۱۳۸۹). مرکز خاورمیانه از جمله ایران به‌عنوان مرکز تنوع، گسترش و ذخایر ژنتیکی ارزشمند بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله انگور مطرح بوده است (Winkler, 1974). از این رو همواره گردآوری و شناسایی رقم‌ها و نژادگان‌ها از اولویت‌های مهم هر کشوری بوده است (Anonymous, 2009; Nejatian, 2006). کشور ما دارای تنوع آب و هوایی و بالطبع تنوع ژنتیکی بسیار بالایی می‌باشد. انگور از تنوع بالایی از لحاظ ژنتیکی برخوردار است. با توجه به تنوع زیاد ارقام و ژنوتیپ‌های انگور در کشور و لزوم شناسایی، جمع‌آوری و ارزیابی ژنوتیپ‌ها به منظور استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی و معرفی ارقام، حفاظت از ژرمپلاسم گیاهی به عنوان ماده اساسی در تحقیقات اصلاح نباتات و به عنوان ذخایر توارثی ملی اهمیت خاصی دارد. در سال ۱۹۵۰ این نظریه قوت گرفت که منابع ژنتیکی به سرعت در حال تخریب می‌باشند، و یا به اصطلاح فرسایش ژنتیکی اتفاق می‌افتد. در حقیقت فرسایش ژنتیکی در طول ده‌ها سال بر اثر سرعت زیادی در تخریب مواد ژنتیکی تداوم یافته است و اگر با همان سرعت پیش می‌رفت تا سال ۲۰۰۰ ژرمپلاسم طبیعی همه نابود شده بودند (هاشم‌زهی و همکاران، ۱۳۹۰). تنوع ژنتیکی در گیاهان و جمعیت گیاهی از نظر کاربردی مورد توجه است. کشاورزی و تولید غذا بستگی به استفاده از ژنوتیپ‌های گیاهی پرمحصول دارد. روش‌های متداول اصلاح گیاهان براساس گزینش ژنوتیپ‌های مورد علاقه از بین تنوع ژنتیکی موجود و دست‌ورزی همه یا تعدادی از صفات ممکن و مورد علاقه در یک ژنوتیپ به منظور تولید یک واریته تجاری می‌باشد (Amini, et al, 2008). تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی اهمیت زیادی دارد و گام اولیه و اساسی برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی است که پایه اساسی برای پژوهش‌های ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی است. برای اصلاح و تولید ارقام جدید نیاز به داشتن قدرت انتخاب دقیق بین گیاهان است که این خود به شناسایی ارقام و تنوع موجود در آن‌ها بستگی دارد. بررسی تنوع، ما را در شناخت توان

ژنتیکی نهفته موجود در توده‌ی گیاهی، انتخاب صحیح صفات مؤثر در تولید و معرفی ارقام برتر یاری خواهد کرد. هم‌چنین مطالعه تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی برای شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های مشابه به منظور ارزیابی و استفاده از ذخایر ژنتیکی و حفظ آن‌ها بسیار مهم است. شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها از همدیگر و هم‌چنین مطالعه تنوع ژرم‌پلاسم وحشی، بومی یا اصلاح شده قبل از شروع برنامه‌های اصلاحی و به منظور رعایت حق معنوی اصلاح‌گران بسیار اهمیت دارد (Nejatian, 2006; FAO, 2007; OIV, 2007). عموماً جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در موجودات مختلف از نشانگرها استفاده می‌شود که نشانگرهای مورفولوژیکی یکی از انواع آن‌ها هستند (Kumar, 1999). این نوع نشانگرها دارای معایب و محدودیت‌هایی می‌باشند اما در عین حال مزیت‌هایی نیز دارند که می‌توان به مواردی از جمله دامنه وسیع ژن‌های کنترل کننده صفات فنوتیپی اشاره کرد. هم‌چنین جزء نخستین نشانگرها به‌شمار می‌آیند. از طرفی هزینه کمی داشته و کاربرد ساده‌ای دارند که این مسئله باعث شده که این نشانگرها جزو متداول‌ترین نشانگرها باشند. بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی اولین قدم برای توصیف و طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های یک مجموعه می‌باشد (Badenes et al, 2000). تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از حیث صفت مورد بررسی می‌باشد (Hajiamiri and Sanei Shariatpanahi, 1997). ژنوتیپ‌های انگور معمولاً براساس مشخصات تاک‌نگاری گیاه بالغ صورت می‌گیرد که تحت تأثیر شرایط محیط قرار دارد. ارقام انگور معمولاً براساس ۱۳۰ صفت مورفولوژیکی و معیارهای سنتی تاک‌نگاری در مراحل فنولوژیکی خاص در گیاهان بالغ، ارزیابی و با استفاده از روش‌های تاک‌نگاری، شناسایی و گروه‌بندی می‌شوند (Ekhvaia and Akhalkatsi 2010; IPGRI, 2008). مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جهت مطالعه ژرم‌پلاسم، تهیه برنامه‌های اصلاحی، بررسی روند تکامل گونه، رده‌بندی و بسیاری مسائل دیگر اهمیت دارد (Naghavi et al, 2007). ارزیابی تنوع ژنتیکی بر مبنای صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و زراعی می‌تواند برای سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم، گزینش والدین مناسب برای دوررگه‌گیری و تولید جمعیت‌های در حال تفرق سودمند باشد (قبادی و همکاران، ۱۳۸۷).

ایران به دلیل گستردگی، تنوع آب و هوا، خاک و سایر مواهب طبیعی امکانات بالقوه بسیار زیادی در عرصه منابع طبیعی و ژرم پلاس‌های گیاهی دارد که با دستیابی به اطلاعات کافی می‌توان با برنامه‌ریزی دقیق و آگاهانه در جهت حفظ، احیا و گسترش آن‌ها گام برداشت. از جمله این که عملکرد باید افزایش یابد، سازگاری و تطابق‌پذیری با ابعاد وسیع‌تری از شرایط محیطی بایستی جستجو شود و محصولاتی با ارزش غذایی بیشتر و مقاوم به آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی باید اصلاح شوند (مختاریان و همکاران، ۱۳۷۸). هم‌چنین نیروهای اقتصادی و اجتماعی فشارهای زیادی جهت تغییر روش‌های تولید در همه بخش‌های صنعت پرورش میوه از جمله مویک‌کاری، اعمال می‌کنند. هزینه تولید مویک‌کاری‌های جدید به صورت متراکم، بالا بوده و مقداری انرژی قابل توجهی را در بر می‌گیرد. حفاظت شیمیایی محصول نه تنها گران است، بلکه موجب نگرانی مصرف‌کنندگان از نقطه‌نظر سلامت عمومی، بهداشت مواد غذایی و خسارت به محیط زیست به جهت باقی مانده‌های سموم می‌گردد. این نگرانی موجب کاهش تولید و مصرف سموم جهت محافظت از گیاهان می‌گردد (اثنی‌عشری و همکاران، ۱۳۸۶). هم‌چنین فرسایش ژنتیکی در اثر گسترش ارقام اصلاح شده، امنیت غذایی در جهان را با تهدید مواجه می‌کند. نیاز به حفظ و بکارگیری منابع ژنتیکی به عنوان محافظی در برابر مشکلات غیر قابل پیش‌بینی در آینده بر همگان آشکار است و چشم نگرانی از تضعیف تنوع منابع ژنتیکی به همراه تقاضای روزافزون به این منابع، آن‌ها را در مرکز توجه جهانی قرار داده است. تنوع، مبنای گزینش فنوتیپی و ژنوتیپی و اساس اصلاح کمی و کیفی محصولات کشاورزی است. آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی ضمن حفاظت ذخایر ژنتیکی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی ممکن می‌سازد (Ghareyazi, 1998). حذف تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی و تولید ارقام یکنواخت، آینده را به خطر می‌اندازد. بنابراین شناسایی تنوع ژنتیکی و حفظ و نگهداری ذخایر توارثی، ضروری و یکی از اولین قدم‌ها در یک برنامه به‌نژادی موفق است (Ghasemi, 1999). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مقاومت‌های ژنتیکی باید جایگزین کنترل شیمیایی شود، به طوری که روش‌های تولید مورد بازنگری قرار گرفته و در آن به اصلاح نباتات اولویت خاص داده شود. به عبارت دیگر موفقیت هر

برنامه اصلاحی مستلزم دسترسی به تنوع ژنتیکی جهت انتخاب گیاهان برتر می‌باشد. کشور ما به عنوان یکی از غنی‌ترین مراکز ذخایر توارثی گیاهان دارای پتانسیل بالایی در زمینه اصلاح نباتات می‌باشد. از این رو ضرورت مطالعه، شناسایی و تفکیک ارقام مختلف می‌تواند ما را در جهت حفظ ذخایر ژنتیکی و پیشبرد برنامه‌های اصلاحی یاری رساند. بنابراین لازم است این ارقام به جامعه تاک‌داری کشور معرفی گردد تا متخصصین به‌نژادی انگور از آن‌ها در جهت برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمایند و متخصصین به‌زراعی انگور با انجام آزمایشات سازگاری این ارقام در مناطق مهم موبکاری کشور، در زمینه‌های ترویج استفاده از این ارقام را فراهم نمایند. در این راستا لزوم توجه بیشتر به افزایش راندمان و کیفیت محصول و گزینش ژنوتیپ‌های برتر ارقام را ضروری می‌نماید (موسی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انگور منطقه شاهرود (واقع در استان سمنان) با استفاده از روابط بین صفات، میزان تنوع هر صفت، روابط خویشاوندی ژنوتیپ‌ها به لحاظ مورفولوژیکی و نشانگر SSR است تا بتوان با استفاده از داده‌های حاصل و اطلاعات بدست آمده در اصلاح انگور استفاده کرد.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۱-۲- تاریخچه انگور

انگور یکی از مهم‌ترین میوه‌هایی است که از زمان‌های قدیم مورد استفاده بشر قرار گرفته است. از نظر اقتصادی و تجاری دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای می‌باشد (Tafazzoli et al, 1994). عده‌ای از محققان معتقدند که انگور حتی پیش از پیدایش غلات مورد استفاده بشر قرار گرفته است. انگور از دوران بسیار قدیم به ما ارث رسیده است. قدیمی بودن آن به وسیله وجود فسیل برگ و بذره‌ای کشف شده در شمال آمریکا و اروپا در لایه‌های رسوبی دوران سوم زمین‌شناسی تایید می‌شود. بذرهایی در دریاچه سوئیس در مناطق جنوبی اروپای مرکزی پیدا شده فرعون‌ها در مصر پیدا شده که نشانگر استفاده انسان از انگور از دوران برنز می‌باشد و این نشان می‌دهد که انگور را از زمان‌های اولیه انسان‌ها به عنوان غذا مصرف می‌کرده‌اند. طبق نوشته‌های کتاب عهد عتیق حضرت نوح به احداث تاکستانی مبادرت کرده است. نقش جزئیات کاشت مو را در موازئیک مصری مربوط به زمان سلسله چهارم یعنی در حدود ۲۴۵۰ سال پیش از میلاد مسیح می‌توان دید. بنابر آنچه گفته شد موطن اصلی درخت انگور دنیا، ناحیه قفقاز و موطن اصلی انواع آمریکایی، آمریکای شمالی می‌باشد (شیرآوند، ۱۳۸۹). انگور یکی از مهم‌ترین میوه‌هایی است که کشت و تولید آن در کشور ما از سابقه بسیار طولانی برخوردار است و ساکنین این مرز و بوم از ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد با کشت و کار انگور آشنایی داشته و سازگاری اقلیم‌های مختلف به خصوص مناطق معتدلی و وجود خاک‌های آهکی و عمیق در این مناطق موجب گسترش آن در سطح وسیعی از مناطق جنوبی کشور تا مرز آذربایجان و از حاشیه کویر تا مناطق غرب در کوه‌های زاگرس شده است (امیرقاسمی، ۱۳۸۳).

۲-۲- سطح زیر کشت و تولید انگور در دنیا و ایران

انگور یکی از میوه‌هایی است که اغلب جزء میوه‌های با بیشترین میزان تولید قرار می‌گیرد. هر سال حدود ۷۵ میلیون تن انگور تولید می‌شود. تولید جهانی انگور در سال ۲۰۱۶ حدود ۷۷/۵ میلیون تن برآورد شده است که کشور چین با تولید ۱۴/۷ میلیون تن در صدر تولیدکنندگان انگور قرار دارد. کشورهای ایتالیا و آمریکا به ترتیب با تولید ۸/۲ و ۷ میلیون تن در رتبه‌های بعدی قرار دارند. کشور

ایران با تولید ۲/۴ میلیون تن در رتبه نهم دنیا قرار دارد که در مقایسه با کشورهای اصلی تولید کننده دارای عملکردی پایین می باشد (FAO, 2016).

۳-۲- شرایط اقلیمی مورد نیاز

انگور از نظر آب و هوایی در منطقه وسیعی پراکنده است و اخیراً در بیشتر مناطق معتدل و گرمسیری دنیا کشت می شود (موسی زاده و همکاران، ۱۳۹۱). در حال حاضر گونه غالب انگور مورد استفاده *Vitis Vinifera* می باشد که از ویژگی های آن حساسیت به سرما است. به دلیل پراکنش نامناسب موکاری در ایران، عمده ترین تاکستان های کشور در مناطق سردسیر قرار گرفته اند. در نتیجه سالیانه در اثر وقوع یخبندان های زمستانه و سرمای بهاره بیش از ۵۰ درصد محصول انگور در این مناطق دچار سرمازدگی شده و از بین می روند و کمیت و کیفیت آن تحت تأثیر این پدیده قرار می گیرد (کرمی، ۱۳۸۸). گونه های آمریکای شمالی مثل *V. labrusca* و *V. riparia* از مقاومت خوبی نسبت به سرما برخوردار هستند (Nejatian, 2006). در یک مقیاس وسیع مناطق اصلی موکاری بین عرض های جغرافیایی ۲۰ تا ۵۰ درجه عرض شمالی و بین ۲۰ تا ۴۰ درجه عرض جنوبی در دو سمت خط استوا واقع گردیده اند. شمالی ترین نقطه پرورش انگور در نیمکره شمالی به آلمان و در نیمکره جنوبی به هندوستان ختم می شود. در مناطق سردسیر بالاتر از عرض جغرافیایی ۵۱ درجه، گیاه قادر به رسانیدن میوه های خود نیست (اثنی عشری و همکاران، ۱۳۸۶). مهم ترین عامل طبیعی مؤثر در رسیدن حبه انگور مقدار دما است. ایران به علت برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، یکی از مهم ترین مراکز تولید و پرورش انگور در جهان محسوب شده است (Anonymous, 2009).

نیاز سرمایی جوانه های انگور ۳۵۰-۱۰۰ ساعت زیر ۷ درجه سانتی گراد است. در دوره استراحت بوته های انگور سرمای ۱۸- الی ۲۰- درجه سانتی گراد را تحمل می کنند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۸). آب اصلی ترین عامل محدود کننده در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به شمار می رود، این

در حالی است که انگور از گیاهان مقاوم به خشکی بوده و در مناطقی که میانگین بارندگی سالانه ۳۰۰ میلی‌متر باشد قادر به رشد می‌باشد.

۴-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی

انگور متعلق تیره Vitacea است و گونه‌هایی که ارزش تجاری دارند از جنس *Vitis* می‌باشند (جداری کوهی و همکاران، ۱۳۹۰). این جنس شامل دو زیرجنس به نام‌های *Muscadinia*، حاوی ۴۰ عدد کروموزوم و *Euvitis*، حاوی ۳۸ عدد کروموزوم می‌باشد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۸). استفاده از انگور محدود به میوه رسیده نیست بلکه، برگ و میوه نارس آن نیز مصرف غذایی دارد (کریمی شهری و همکاران، ۱۳۹۱). کلیه قسمت‌های درخت انگور قابل استفاده دارویی است و دارای خواص بسیاری از جمله دفع سموم بدن، تقویت کبد و مؤثر در درمان می‌باشد (نراقی، ۱۳۸۹).

۱-۴-۲- ریشه

بوته مو دارای ریشه‌های بسیار قوی، طویل، منشعب و فاقد گره و میان‌گره می‌باشد. لذا ریشه با حجم زیادی از خاک تماس دارد و از مقدار زیادی مواد معدنی استفاده می‌کنند. جذب این مواد توسط ریشه‌های موئین انجام می‌گیرد که تعداد آن‌ها خیلی زیاد است و در انتهای ریشه نازک فرعی قرار دارند (شیرآوند، ۱۳۸۹).

۲-۴-۲- ساقه

ساقه انگور از ابتدای تشکیل تا سومین سال پیدایش از نظر گیاه‌شناسی به اسامی گوناگونی معروف می‌باشد که هر کدام مرحله خاصی از رشد و نمو آن را در بر می‌گیرد. جوانه‌های مرکب انگور در ابتدای فصل رشد، شاخه‌های فصل جاری را به وجود می‌آورند. این شاخه‌ها رشد سریعی داشته و در اواسط تابستان به بعد تشکیل ساقه‌های توخالی ماشوره‌ای به نام کین (شاخه یکساله) را می‌دهند. این ساقه‌های توخالی در صورتی که بر روی بوته انگور باقی بمانند. در سال بعد تنه‌ها را تشکیل می‌دهند.

تنه‌های افقی (کوردن‌ها) را به وجود می‌آورند. تنه‌های کوتاهی که ساقه‌های ماشوره‌ای بر روی آن‌ها تشکیل می‌شود بازو نامیده می‌شوند (حقانی، ۱۳۹۰).

۳-۴-۲- برگ

برگ مو دارای ۵ رگبرگ اصلی است که برگ را به ۵ قسمت یا لوب تقسیم می‌کند. شکل برگ در ارقام مختلف متفاوت است و یکی از راه‌های شناسایی ارقام می‌باشد (حقانی، ۱۳۹۰)

۴-۴-۲- گره‌ها و جوانه‌ها

معمولاً در فواصل معین برآمدگی‌هایی روی شاخه مشاهده می‌شود که گره نام دارد و کلیه قسمت‌های فعال و حیاتی بوته مو بر روی گره قرار گرفته است. فاصله بین دو گره متوالی را میانگره می‌نامند که صاف و بدون هر نوع زائده می‌باشد و هیچ‌وقت پس از تشکیل رشد نمی‌کند. جوانه‌های مو به دو دسته جوانه‌های رویشی و جوانه‌های زایشی تقسیم می‌شوند. جوانه‌ی رویشی پس از رشد، به شاخه‌ای تبدیل می‌شود که بر روی آن فقط برگ به وجود می‌آید و از نظر باروری غیرمثمر می‌باشد. جوانه‌ی زایشی که یک جوانه مرکب است، شامل شاخه اولیه که دارای برگ‌های اولیه و خوشه‌های گل می‌باشد (شیرآوند، ۱۳۸۹).

۵-۴-۲- پیچک

وظیفه اصلی پیچک اتصال شاخه مو به قیم است. پیچک‌ها معمولاً دو شاخه‌ای هستند و پس از چیدن میوه ریزش نمی‌کنند. در تمام انواع انگور به جز نوع آمریکایی مرسوم به *V. labrusea*، پیچیک‌ها به صورت غیر متوالی می‌باشند. یعنی در مقابل برگ اول و دوم یک پیچک یا خوشه قرار گرفته و محل برگ سوم خالی می‌باشد. اما در جنس لائروسکا در کنار هر یک از برگ‌ها یک پیچک واقع شده است (شیرآوند، ۱۳۸۹).

اولین آثار تشکیل گل (گل‌انگیزی) در فصل رویش سال پیش آشکار شده و تا اواخر فصل رشد جاری ادامه می‌یابد و اجزای گل‌انگیزی آن‌ها دیر صورت می‌پذیرد، تمام اجزای گل طی فصل جاری تکمیل نمی‌شوند. در این گونه جوانه‌ها، تکمیل اجزای گل به اوایل بهار سال بعد و سپری شدن دوره‌ی استراحت زمستانه موکول می‌شود. گل انگور هم مانند گل سایر گیاهان شامل کاسبرگ، گلبرگ، پرچم‌ها و مادگی می‌باشد. گلبرگ‌ها از بالا به هم پیوسته و یک بخش کلاه مانند به نام کالیپترا را تشکیل می‌دهند که هنگام باز شدن گل می‌افتد. پرچم‌ها حدود سه هفته پس از ظهور برگ‌ها شروع به رشد کرده و میله و بساک آن دیده می‌شود. حدود یک هفته بعد مادگی و اجزای آن که کلاله، خامه و تخمدان می‌باشد قابل رویت خواهند بود. گل انگور دارای دو تا سه برگچه که در هر کدام از آن‌ها یک تا دو تخمک که بعداً تبدیل به بذر خواهد شد، وجود دارد (شیرآوند، ۱۳۸۹).

میوه روی محور اصلی خوشه و شاخه‌های فرعی ظاهر می‌شوند که هریک به چندین دمگل ختم می‌گردند که در انتها هر دمگل یک گل قرار گرفته که به یک حبه تبدیل می‌شود. میوه دارای ۲ تا ۳ تخم بوده که پوست خارجی دانه استخوانی و دارای آلبومن نیز می‌باشد و میوه بر حسب انواع مختلف پایه‌ها دارای اشکال کروی، بیضی، پهن و یا دراز و کشیده و با رنگ‌های مختلف می‌باشند (حقانی، ۱۳۹۰).

۵-۲- اهمیت و مصارف

انگور از نظر ارزش غذایی و خواص بهداشتی، دارای سودمندی‌های بسیاری است. از مهم‌ترین مواد قندی موجود در حبه‌های انگور تازه ساکارز، گلوکز و دکستروز می‌باشد. از اسیدهای آلی اسید فرمیک، اسید مالیک، اسید سیتریک و اسید تارتاریک را می‌توان نام برد. هم‌چنین عناصری مانند منیزیم، آهن، مگنز و سیلیس نیز وجود دارد. مقدار انرژی موجود در هر ۱۰۰ گرم انگور تازه ۶۷ کیلو کالری است.

۶-۲- ترکیبات شیمیایی درخت انگور

کلیه قسمت‌های درخت انگور قابل استفاده دارویی است.

۱. برگ مو: دارای ساکارز، لوولز، اینوزیت، مواد نشاسته‌ای و تعدادی اسیدهای آلی است.
۲. دم خوشه انگور: دارای تانن، مواد رزینی، تارتارات پتاسیم و اسیدهای آلی است.
۳. غوره که میوه سبز رنگ و نارس انگور است که دارای طعم ترش می‌باشد. غوره دارای اسیدهای آلی مانند اسید مالیک، اسید فرمیک، اسید سوکسینیک، اسید اگزالیک، اسید گلوکولیک و قند می‌باشد.

۴. انگور رسیده: در صد گرم حبه انگور مواد زیر موجود است:

آب	۷۵ گرم
پروتئین	۳/۱ گرم
مواد قندی	۲۰ گرم
کلسیم	۱۲ میلی‌گرم
فسفر	۴ میلی‌گرم
آهن	۴ میلی‌گرم
سدیم	۳ میلی‌گرم
پتاسیم	۱۷۵ گرم
ویتامین آ	۱۰۰ گرم
ویتامین ب ۱	۵ میلی‌گرم
ویتامین ب ۲	۳ میلی‌گرم
ویتامین ب ۳	۳ میلی‌گرم
ویتامین ث	۴ میلی‌گرم

پوست انگور دارای تانن، تارتارات پتاسیم، اسیدهای آزاد و مواد معدنی می‌باشد.

۷-۲ هسته انگور: در هسته انگور مقداری روغن و تانن موجود است. روغن هسته انگور به رنگ زرد مایل به سبز است. این روغن فاقد بو و دارای طعمی مطبوع می‌باشد. روغن هسته دارای تری‌گلیسرید، اسید اولئیک، اسید پالمیک، اسید لینولئیک، اسید استئاریک و اسید آراشیک می‌باشد (دولتی‌بانه، ۱۳۸۵).

۷-۲- تنوع ژنتیکی

اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانش و فن‌آوری‌هایی هستند که یکی از اهداف اولیه آن‌ها تغییر ساختار ژنتیکی گیاه در جهت منافع اقتصادی انسان می‌باشد. لازمه هر تغییر و گزینش وجود تنوع است. تنوع ژنتیکی یک صفت، ارزش متفاوت افراد یا ژنوتیپ‌ها برای آن صفت می‌باشد. تنوع اساس کارهای اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی و ماده خام ضروری برای آن است. یک به‌نژادگر در صورتی می‌تواند امید موفقیت زیادی در برنامه‌های خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب برای او وجود داشته باشد. از این رو، منابع ژنتیک گیاهی یکی از مهم‌ترین، پرارزش‌ترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شوند (وجدانی، ۱۳۷۲). ایران یکی از غنی‌ترین مراکز دنیا از نظر ذخایر ژنتیکی گیاهی محسوب می‌شود. به عقیده گیاه‌شناسان ایرانی حدود ۱۰ الی ۱۲ هزار گونه گیاهی در ایران وجود دارد که آن را به عنوان یکی از غنی‌ترین مراکز تنوع ذخایر توارثی گیاهی در جهان ساخته است. گونه‌های وحشی به لحاظ داشتن ژن‌های مفید برای مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده و گسترش سازگاری ژنتیکی در برابر تغییرات محیطی دارای اهمیت می‌باشند. برای استفاده از این منابع، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم‌پلاس، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sharma and Hore, 1993). بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی، حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب والدین جهت رسیدن به هیبرید مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است (Singh, 2003). بررسی تنوع ژنتیکی هم‌چنین از جنبه مدیریت مؤثر و حفظ منابع ژرم‌پلاس دارای اهمیت می‌باشد (Pradeep et al, ۱۴).

2002). روش‌هایی که برای تخمین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند متفاوت می‌باشند. از جمله آن‌ها می‌توان ثبت شجره، خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی را نام برد (Cox et al, 1985). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرمپلاسماها معیاری مناسب برای استفاده از آن‌ها در شناسایی و انتقال ژن‌ها در بهبود گیاهان زراعی می‌باشند (Cox et al, 1985). تنوع ژنتیکی اساس بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از نظر ویژگی‌های گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کنند (Ashrafi Parchin, 2011). تعیین سطح تنوع ژنتیکی یکی از مراحل اساسی در مدیریت مؤثر و استفاده از ذخایر ژنتیکی می‌باشد (Pradeep et al, 2002). منابع ژنتیکی یا ذخایر توارثی به دلیل اهمیت فراوانی که دارند یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی و منابع پایه‌ای در هر کشور محسوب می‌شوند (احتشام‌نیا و همکاران، ۱۳۸۸). یکی از عواقب اصلاح نباتات موفق، افزایش فرسایش یا کاهش منابع ژنتیکی گیاه بوده که تحت برنامه انتخاب قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر عوامل بسیار زیادی در فرسایش ژنتیکی و نابودی ذخایر ژرمپلاسما نقش داشته‌اند (شیرآلی و همکاران، ۱۳۸۸). استفاده از واریته‌های اصلاح‌شده به‌جای واریته‌های بومی، اعمال روش‌های مدرن زراعی مانند استفاده از سموم علف‌کش، پیشرفت شهرها و مراکز صنعتی، مسکونی شدن زمین‌های زراعی و مرتعی، تغییر روش‌های کشت و سایر عواملی که منجر به فرسایش و انقراض مواد با ارزش می‌شوند که به‌طور مستقیم و غیر مستقیم در کشاورزی و اصلاح نباتات قابل استفاده هستند. بنابراین حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی برای بقا و بهبود تولیدات زراعی ضروری بوده و به عنوان نیازی اساسی در توسعه پایدار و کاهش فقر محسوب می‌شود. تنوع ژنتیکی اساس اکثر برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد (Bagheri et al, 2002؛ Kumar, 1999). موفقیت در اصلاح یک گیاه زراعی، در درجه اول به دسترسی تنوع ژنتیکی موجود در آن گیاه بستگی دارد، ضمن این‌که تنوع ژنتیکی یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار است و وجود تنوع ژنتیکی در نظام‌های زراعی با درس گرفتن از طبیعت باید همواره مدنظر قرار گیرد. مدیریت و استفاده صحیح از تنوع موجود در

ارقام محلی و خویشاوندان وحشی یک گونه گیاهی در اجرای برنامه‌های مؤثر اصلاحی بسیار مهم است.

۱-۷-۲- اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی

اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جهت بررسی دو دسته از مشکلات مفید خواهد بود، یکی آزمایش نظریه-های موجود در رابطه با ماهیت عوامل مؤثر بر تنوع ژنتیکی که به آن‌ها اصطلاحاً هسته‌ها و لکه‌های تکامل یافته گفته می‌شود و دیگری استفاده از معیارهای تنوع ژنتیکی به عنوان ابزاری برای شناخت روابط میان ارگانسیم‌ها و هم‌چنین تنوع موجود در داخل و بین آن‌ها. تنوع ژنتیکی آستانه تحمل یک گونه را در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی بالا می‌برد (عبدمیشانی، ۱۳۷۵).

۲-۷-۲- کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی

بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسما یک گونه زراعی هم در طرح‌های به‌نژادی و هم حفاظت از منابع ژنتیکی کاربرد دارد. به‌طور کلی تعیین تنوع ژنتیکی در زمینه اداره مجموعه‌های گیاهی، نگه‌داری و حفاظت، درج مشخصات و استفاده از مجموعه‌های گیاهی به ما کمک می‌کند. و در بعضی از جنبه‌های معمول این کاربردها مانند بررسی‌های فیلوژنتیکی، ژنتیک جمعیت، مدیریت گیاهان وحشی، مدیریت منابع ژنتیکی، روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ژنتیکی و نشانگرهای مورفولوژیک می‌باشد (رحیمی، ۱۳۸۶؛ ارزانی، ۱۳۸۳).

۸-۲- انواع نشانگرها

انواع مختلف نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها، نشانگرهای مورفولوژیک، سیتولوژیک، بیوشیمیایی و نشانگرهای DNA می‌باشند. ارزش این نشانگرها به میزان توارث آن‌ها و سطح پلی‌مورفیسم که نشان می‌دهند بستگی دارد. نشانگرهای DNA، امکان بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی را فراهم کرده و در عین حال مستقل از محیط می‌باشند (Sarkhosh et al, 2009; Semagn et al, 2006).

بر اساس تعریفی که استنزفلد در ۱۹۸۶ ارائه داد، واژه نشانگر معمولاً برای نشانگر لوکاس به کار می‌رود. هر ژنی جایی در طول کروموزوم به نام لوکاس دارد. ژن‌ها می‌توانند از طریق جهش به چندین شکل متفاوت تبدیل شوند که آلل (شکل‌های آللی) نامیده می‌شوند. تمامی شکل‌های آللی یک ژن در یک جایگاه در کروموزوم‌های هومولوگ قرار می‌گیرند. هنگامی که شکل‌های آللی یک لوکاس یکسان باشند، گفته می‌شود که ژنوتیپ، هوموزایگوت (در این لوکاس) است، درحالی که شکل‌های آللی متفاوت، هتروزایگوت را ایجاد می‌نمایند. در موجودات دیپلوئید، ژنوتیپ با دو شکل آللی کروموزوم‌های هومولوگ ایجاد می‌گردد؛ بنابراین نشانگرهای مولکولی شامل تمامی نشانگرهای لوکاس‌های مربوط به DNA می‌باشند که می‌توانند بیوشیمیایی یا مورفولوژیک نیز باشند (Weising et al., 2012).

به‌طور کلی نشانگرها در سه گروه تقسیم می‌شوند:

۱. نشانگرهای مورفولوژیکی، گروهی که براساس تنوعات قابل مشاهده می‌باشند مانند صفات

مورفولوژیکی و صفات زراعی و

۲. نشانگرهای بیوشیمی، گروهی که براساس تنوعات محصول ژن (پروتئین) می‌باشند. که

بازتابی از تنوع موجود در سطح ژنوم می‌باشند

۳. نشانگرهای مولکولی، گروهی که براساس تنوعات تفاوت‌های موجود در ردیف بازی DNA

می‌باشند که در واقع توارث سطح ژنوم را آشکار می‌کنند (Chauhan and Kumar, 2015).

۸-۲-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی

صفات مورفولوژیکی روش معتبری است که در برآورد تنوع ژنتیکی ارقام مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. با وجود اهمیت، دقت و سرعت روش‌های مولکولی در تفکیک ژنوتیپ‌ها، بررسی-های مورفولوژیکی همچنان به‌عنوان مبنا و اولین مرحله در طبقه‌بندی‌های ژرم‌پلاست مورد استفاده قرار می‌گیرد (شمیلی و همکاران، ۱۳۸۹). نشانگرهای مورفولوژیک اولین نشانگرهایی بودند که برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. این نشانگرها در واقع نتیجه جهش‌های قابل رویت در ریخت ظاهری موجود هستند و در صورتی می‌توانند به‌عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند

که بیان آن‌ها در طیف وسیعی از محیط‌های مختلف قابل تکرار باشد (Dvorak et al, 1998). البته تشخیص این‌که آیا این تنوع ناشی از اثرات محیطی است یا تحت تأثیر تفاوت‌های ژنتیکی میان گونه‌های گیاهی قرار دارد تا حدودی دشوار است. آن دسته از صفات مورفولوژیکی که تنها به وسیله یک مکان ژنتیکی کنترل می‌شوند ممکن است به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا تظاهر این دسته از صفات حتی در شرایط محیطی متفاوت نیز نسبتاً ثابت است (Kumar, 1999). در ۲۰ تا ۳۰ سال گذشته، اغلب ژن‌ها و یا نشانگرهای مورد استفاده در مطالعه ژنتیک گیاهان عالی، تک-ژن‌هایی بوده‌اند که روی صفات ظاهری مؤثر بودند. به عنوان مثال ژن‌هایی که باعث تولید ریشک در غلات، پاکوتاهی، نقص‌های کلروفیلی، رنگ گل و صافی و چروکیدگی سطح دانه نخودفرنگی می‌شوند از جمله نشانگرهای مورفولوژیکی محسوب می‌گردند. این نشانگرها اغلب معرف ژنهای ساختاری‌اند و در تهیه نقشه‌های ژنتیکی در موش، مگس سرکه، گوجه‌فرنگی، گندم و غیره مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این نشانگرها معمولاً به راحتی قابل مشاهده‌اند و کمک زیادی به مطالعات و تحقیقات پایه‌ای نموده‌اند. اگرچه نشانگرهای مورفولوژیکی ممکن است به عنوان معیارهایی در پیش‌بینی واکنش ژنتیکی به‌گزینش مفید باشند اما تحت تأثیر عوامل دیگری نیز قرار می‌گیرند (Pop et al, 2013).

این نشانگرها معایب و محدودیت‌های زیادی دارند. بسیاری از پارامترها غالباً تحت تأثیر محیط و سن موجود قرار می‌گیرند و صفتی که عرضه می‌شود ممکن است اساس و توضیح ژنتیکی نداشته باشد. گاهی برای مشاهده و ثبت‌شان باید منتظر ظهورشان ماند که برای گیاهان چند ساله بسیار مشکل است. در تحقیقات عواملی مانند اپیستازی و پلیوتروپی هم می‌توانند روی بیان آن‌ها اثر بگذارند. هم-چنین تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی محدود می‌باشند و آلل‌های آن‌ها به صورت غالب و مغلوب عمل می‌کنند و لذا تشخیص افراد هتروزیگوت از هموزیگوت امکان‌پذیر نیست. از سوی دیگر اغلب این نشانگرها جهش‌یافته هستند و جمع‌آوری آن‌ها در یک لاین نه تنها باعث بروز صفات نامطلوب در گیاهان می‌شوند بلکه انجام چنین کاری دشوار، پرهزینه، و وقت‌گیر است با این وجود به دلیل ساده و کم‌هزینه بودن و عدم نیاز به امکانات پیچیده و گران‌قیمت، هنوز هم محققین بسیاری از این نشانگرها

استفاده می‌کنند (Kumar, 1999). در مجموع در صورتی که این صفات از توارث‌پذیری بالایی برخوردار باشند نشانگرهای مورفولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی به شمار می‌آیند، زیرا توارث این صفات می‌تواند بدون نیاز به روش‌ها و تکنیک‌های پیشرفته مانند تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شود (Pop et al, 2013). مهم‌ترین صفات مورد بررسی در مطالعه تاک-نگاری و شناسایی گونه‌ها و ارقام انگور صفات مورفولوژیکی می‌باشد، که در اکثر کشورها به منظور مطالعات شناسایی ارقام و گونه‌های مو از روش‌هایی که بر مبنای بررسی این صفات تدوین شده‌اند استفاده می‌شود (Valrit et al, 1995).

۲-۸-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی

برای غلبه بر محدودیت‌های نشانگرهای مورفولوژیکی، نشانگرهای دیگر در هر دو سطح پروتئین (فنوتیپ) و سطح DNA (ژنوتیپ) توسعه یافته است. نشانگرهای پروتئینی معمولاً به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی نام‌گذاری می‌شوند (Chauhan and Kumar, 2015). معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی آیزوایم‌ها و آلوزایم‌ها می‌باشند. آیزوایم‌ها به طور کلی شکل‌های مشابه از آنزیم‌ها هستند در حالی که آلوزایم‌ها شکل‌های متفاوت از آنزیم‌های مشابه که این تفاوت نتیجه تنوع آلی موجود در سطح آنزیم-ها می‌باشد (Tanksley et al, 1989). تعداد کم نشانگرهای پروتئینی قابل ثبت و مشاهده و چند شکلی پایین باعث محدودیت استفاده از آن‌ها می‌باشد (Mondini et al, 2009).

۲-۸-۳- نشانگرهای مولکولی

در حال حاضر بهترین راه بررسی تنوع زیستی و ژنتیکی در گونه‌ها، نژادها، جمعیت‌ها، لاین‌ها و سویه-ها جانوری مهنداران و بی‌مهرگان و گیاهان بررسی نشانگرهای مولکولی DNA می‌باشد. نشانگرهای مولکولی DNA فراوان‌ترین و آسان‌ترین نشانگرهای مولکولی می‌باشند و در هر موجود زنده‌ای می‌توان از آن‌ها استفاده نمود. با کمک این نشانگرها ایجاد نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده و همچنین شناسایی ژن‌ها کنترل شده صفات کمی و کیفی امکان‌پذیر شده است (نقوی، ۱۳۸۶). تفاوت‌های بین ردیف‌های DNA یک موجود، که آن را از سایر موجودات جدا می‌کند را نشانگر

ژنتیکی می‌گویند، به عبارتی هر آنچه میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف تفاوت ایجاد کند و سبب تمایز آن‌ها از یکدیگر شود به عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می‌شود (Chauhan and Kumar, 2015).

نشانگرهای مولکولی به خود مولکول DNA مربوط می‌شود و به‌عنوان یک روش اندازه‌گیری عینی می‌باشند. آن‌ها تحت تأثیرات محیط نیستند، آزمایشات می‌تواند در هر زمان در طول توسعه گیاه انجام شود، و از همه مهم‌تر، آن‌ها دارای توانایی موجود در تعداد نامحدود هستند و تمام ژنوم را پوشش می‌دهند. نشانگرهای مولکولی را نباید به‌عنوان ژن‌های طبیعی شناخت، چون آن‌ها آثار بیولوژیکی ندارند، و در عوض می‌توان آن‌ها را به عنوان نقاط خاص پیوسته در ژنوم به حساب آورد. آن‌ها در توالی‌های DNA قابل شناسایی هستند، در نقاط خاصی از ژنوم یافت می‌شوند، و قابل توارث از یک نسل به نسل دیگر می‌باشند (Semagn et al, 2006). این نشانگرها تحت تأثیر محیط، آثار غالبیت، اپیستازی و پلیتروپی قرار نمی‌گیرند. نشانگرهای مولکولی براساس نوع روش آشکارسازی آن‌ها که می‌تواند روش هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک یا روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) یا ترکیبی از هر دو باشد، توانایی ارزیابی یک یا چند مکان ژنومی را دارند، بنابراین توانایی تشخیص حضور یک آلل را برای یک مکان ژنی دارند. تشخیص حالت‌های هتروزیگوت برای آلل‌های مشابه بستگی به نوع نشانگر مولکولی مورد استفاده دارد. نشانگرهایی که توانایی تشخیص مکان‌های هموزیگوت را از هتروزیگوت دارا می‌باشند، نشانگرهای هم‌بارز نامیده می‌شوند (Mondini et al, 2009).

۸-۲-۴ ویژگی‌های یک مارکر (نشانگر) مولکولی مناسب

- ✓ دارای وراثت مندلی باشد.
- ✓ میزان پلی‌مورفیسم در آن بالا باشد: هر قدر تعداد آلل‌های قابل تشخیص در یک لوکوس بیشتر باشد، بهتر است.
- ✓ هم‌بارز بودن: قادر به تمایز افراد هتروزیگوت و هموزیگوت از هم باشد.

- ✓ ژنوتیپ لوکوس تحت تأثیر لوکوس دیگر قرار نگیرد.
- ✓ دارای تکرارپذیری بالا باشد.
- ✓ در ژنوم پراکنده گی و فراوانی بالایی داشته باشد.
- ✓ بیان آن مستقل از محیط باشد.
- ✓ نماینده‌ای از کل ژنوم باشند (به غیر از زمانی که نشانگر مختص به لوکوس خاص است).
- ✓ خنثی: تمام آلل‌ها سازش یکسانی داشته باشند.
- ✓ کم‌هزینه و سریع و راحت باشد.

البته هیچ‌یک از نشانگرهای مولکولی همه این ویژگی‌ها را باهم ندارند. بعضی به دلیل هم باز بودن در اصلاح نژاد به کار می‌روند و بعضی به دلیل این که پلی مورفیسم بالایی دارند در مطالعات تنوع ژنتیکی کاربرد دارند. بعضی نیز به دلیل تکرار پذیر بودن نتایج رایج می‌باشند. لذا باید بنا بر اهداف و امکانات، نشانگر مطلوب انتخاب شود (Ford- Lloyd and painting, 1996).

به طور کلی نشانگرهای مولکولی به دو گروه زیر تقسیم می‌شوند:

۱- نشانگرهای مولکولی بر پایه هیبریداسیون

۲- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR

۸-۲-۵- نشانگرهای مولکولی بر پایه هیبریداسیون

این نشانگرها از اولین نشانگرهایی بودند که در مطالعات گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. چند شکلی طولی قطعات برش یافته (RELP) معروف‌ترین نشانگر مولکولی بر پایه هیبریداسیون است. این نشانگر اولین بار در سال ۱۹۷۵ برای شناسایی چند شکلی توالی DNA، در نقشه ژنتیکی ژن جهش یافته حساس به دما در ویروس adeno-virus serotypes استفاده شد (Grodzicker et al, 1974) سپس برای نقشه‌یابی ژنوم انسان (Botstein et al, 1980) و پس از آن برای ژنوم‌های گیاهی (Helentjaris et al, 1986) استفاده شد. تکنیک آن بر پایه آنزیم‌های برشی است و یک الگوی متفاوت از اندازه‌های

قطعات مختلف DNA را ارائه می‌دهد. این نشانگر به خوبی توانایی آشکارسازی تفاوت‌های بین دو گونه‌ی مشابه را دارا می‌باشند و از توارث هم‌بارز و تکرارپذیری بالایی برخوردار می‌باشند. با این وجود، به دلیل نیاز به DNA با کیفیت بالا (Potte and Jone, 1991 Roy et al, 1992; Young et al, 1992; Yu e tal, 1993) و وقت‌گیر بودن، امروزه به‌طور وسیع مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. این محدودیت‌ها در نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون سبب شده است که روش‌هایی با پیچیدگی کم‌تر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند.

۶-۸-۲ - نشانگرهای مبتنی بر PCR

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 الیگونوکلوئوتیدی به-عنوان آغازگر برای تکثیر قطعه 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 مانند ¹RFLP، ²RAPD، ³AFLP، ⁴ISSR و ⁵SSR (ریزماهواره‌ها) که در این پایان‌نامه از نوع SSR استفاده می‌کنیم.

۹-۲- ماهواره‌ها

در ماهواره‌ها، واحدهای تکرار شونده از چند جفت باز تا چند صد جفت باز تکرار می‌شوند. در پستانداران ممکن است ماهواره‌ها کمتر از ۱۰ درصد (انسان) تا بیش از ۵۰ درصد (کانگاریو) از ژنوم را تشکیل دهند. ماهواره‌ها بیشتر در منطقه هتروکروماتین نزدیک سانترومرها و تلومرها یافت می‌شوند.

¹ - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

² - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

³ - Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

⁴ - Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

⁵ - Simple Sequence Repeat (SSR)

ماهواره‌ها معمولاً نسخه‌برداری نمی‌شوند و تاکنون هیچ عمل مشخصی برای آن‌ها شناخته نشده است. از ماهواره‌ها برای نقشه‌یابی ژنوم انسان به‌عنوان نشانگرهایی که با سانترومر ارتباط دارند استفاده می‌شود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۱۰-۲- ماهوارک‌ها

ماهوارک‌ها واحدهای ۱۰ تا ۶۰ جفت بازی هستند که ممکن است صدها بار تکرار شده باشند. آن‌ها معمولاً یک هسته مشترک ۱۰ تا ۱۵ جفت بازی دارند که احتمالاً در تنوع‌پذیری ماهوارک‌ها مؤثرند. ماهوارک‌ها بیشتر در نواحی یوکروماتین ژنوم پستانداران، قارچ‌ها و گیاهان متمرکز می‌باشند. تنوع-پذیری ماهوارک‌ها در حدی است که گاهی در انگشت‌نگاری DNA انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chambers, 2000).

۱۱-۲- ریزماهواره‌ها یا میکروساتلایت‌ها یا SSR

ریزمماهواره‌ها در دهه ۱۹۷۰ شناخته شدند و برای اولین بار در ژنتیک انسانی جهت تشخیص برخی بیماری‌ها که با تغییر در واحدهای تکراری همراه بود استفاده شدند (Chambers, 2000). یکی از تکنیک‌های قدرتمند در کاوش DNA نشانگرهای SSR می‌باشند. میکروساتلایت‌ها از تکرارهای نوکلئوتیدی ۳ الی ۶ جفت بازی تشکیل شده و آلل‌های آن‌ها معمولاً در تعداد واحدهای تکراری متفاوت می‌باشند. تعداد این نشانگرها در ژنوم بسیار فراوان و جهش‌پذیر بوده و به دلایل چند آلی بودن، هم‌بارزی، تکرارپذیری، تفسیر نسبتاً آسان، توزیع مناسب در ژنوم و قدرت آشکارسازی چندشکلی بالا مهم هستند (Jatoietal, 2006). استفاده از این نوع نشانگرها در مطالعات تکاملی، تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی گیاهان و حتی شناسایی ارقام امکان‌پذیر می‌باشد. اعتقاد بر این است که توالی مجاور مکان ژنی ویژه ریز ماهواره در یک ژنوم و در یک گونه به خصوص حفظ شده است و به ندرت در گونه مرتبط استفاده می‌شود (Varsheni et al, 2002). وجود تعداد زیادی نشانگرها، دلیل قانع‌کننده‌ای برای مقایسه ریزماهواره‌ها با سایر نشانگرهای مولکولی متداول از جمله

RAPD, RELP, AFLP و غیره می‌باشد. این چنین مقایسه‌ای در چندین گیاه زراعی از جمله سویا، ذرت، جو و گندم انجام گرفته است. در سویا محتوای اطلاعاتی (هتروزیگوسی مورد انتظار)، نسبت چندتایی (تعداد مکان‌های ژنی تجزیه شده به‌طور هم‌زمان در آزمایش) و سودمندی ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها صورت گرفته است. برآورد یک پارامتر واحد شاخص نشانگر (حاصل‌ضرب هتروزیگوسی مورد انتظار و نسبت چندتایی) نیز برای ارزیابی سودمندی کلی نشانگر انجام گردید. با استفاده از این روش نشان داده شد که نشانگر ریزماهواره بیشترین هتروزیگوسی مورد انتظار و نشانگر AFLP بیشترین نسبت چندتایی و شاخص نشانگر را داشتند (Gopta and Vershney, 2000). محدودیت این روش در شناسایی گیاهان به‌خاطر سختی همسانه‌سازی و تعیین توالی نواحی مجاور آن‌ها برای طراحی آغازگر می‌باشد. برای هر گونه باید این روش به صورت جداگانه انجام شود زیرا نواحی جفت شونده در گونه‌ها نسبتاً اختصاصی هستند (Bagheri et al, 2002).

۱-۱۱-۲- خصوصیات نشانگرهای SSR

نشانگرهای SSR خاص یک مکان ژنی می‌باشند و به‌صورت هم‌بارز توارث می‌یابند. این نشانگرها علاوه بر تنوع آلی بالایی که نشان می‌دهند، در کل ژنوم نیز پراکنده شده‌اند. اگرچه هزینه استفاده از این نوع نشانگرها زیاد می‌باشد ولی بواسطه پتانسیل بالای آن‌ها در تشخیص پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیته، در یک گونه، در موجودات زنده به فراوانی استفاده می‌گردند (Powell et al, 1996). هرچند که ریزماهواره‌های هر موجودی اختصاصی است ولی توالی‌های احاطه کننده توالی‌های تکراری در گونه‌های خویشاوند حفظ شده می‌باشد، از این‌رو آغازگرهای طراحی شده برای یک گونه قابل استفاده در گونه‌های خویشاوند هستند (Sefc et al, 2001). در SSR نیز مانند نشانگرهای AFLP می‌توان از فرایند چند ترکیبی بهره گرفت. بدین ترتیب تکثیر هم‌زمان (Co-amplification) مکان-های ژنی چندگانه در یک PCR صورت می‌گیرد. چنین ترکیبی هم‌چنین می‌تواند به‌صورت ترکیب قطعات آلی بیش از یک چاهک الکتروفورز باشد (Gopta and Vershney, 2000).

۲-۱۱-۲- کاربردهای نشانگر SSR

امروزه ریز ماهواره‌ها به علت تعداد زیاد و پراکنش این توالی‌ها در ژنوم، یکی از نشانگرهای مولکولی مفید و سودمند در گونه‌های گیاهی می‌باشند (Armour et al, 1999). مهم‌ترین کاربرد ریزماهواره‌ها شامل تنوع ژنتیکی و تکاملی (Sefc et al, 2001)، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مطالعات اکولوژیکی و تکامل جمعیت‌ها و گزینش به کمک نشانگر می‌باشد (Caetano-Analles and Oresshoff, 1997).

۲-۱۱-۳- مزایای ریزماهواره‌ها

همان‌گونه که اشاره شد، ریز ماهواره‌ها گروهی از نشانگرهای مولکولی مفید در بسیاری از گونه‌ها بوده، کاربرد فراوانی در شناسایی جمعیت‌ها دارند. از مزایای این گروه از نشانگرها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ✓ فراوانی در ژنوم و سطح بالای تنوع آلی در مکان‌های ریزماهواره
- ✓ توزیع تصادفی در سراسر ژنوم
- ✓ توارث هم‌بارز
- ✓ از آن‌جا که هر نشانگر ریزماهواره به منزله یک مکان ژنی است. بنابراین هر نوار، یک مکان ژنی به حساب می‌آید. از این خاصیت در مطالعات تکاملی و ژنتیک جمعیت و تجزیه‌های ژنتیکی استفاده می‌شود (Pejic et al, 1998).
- ✓ در این نشانگرها، مشکل همولوگ بودن نوارهای هم‌اندازه که در نشانگرهای RAPD و AFLP اتفاق می‌افتد، وجود ندارد (Yu et al, 2000).
- ✓ اگرچه هزینه استفاده از این نوع نشانگرها زیاد است ولی به واسطه پتانسیل بالای آن‌ها در تشخیص پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیته، به فراوانی قابل استفاده هستند (Powell et al, 1996).

۴-۱۱-۲- معایب ریزماهواره‌ها

مشکل عمده ریزماهواره‌ها طراحی اولیه آغازگرهای آن‌هاست که بسیار پرهزینه و وقت‌گیر است. شناسایی و طراحی اولیه آغازگرها، نیاز به شناسایی توالی‌های تکراری در کروموزوم‌ها و توالی‌های احاطه‌کننده آن‌ها و در نهایت توالی‌یابی دارد. از این رو در گیاهانی که روی آن‌ها کار نشده است بسیار پرهزینه می‌باشد (karp et al, 1997; Chao et al, 2003).

گاهی ممکن است به علت تکرار بیش از یک بار یک مکان خاص در ژنوم، امکان امتیازدهی هم‌بارز الگوی نواری وجود نداشته باشد

به علت ظهور نوارهای Stutter که به دلیل سر خوردن آنزیم Tag پلیمراز در هنگام تکثیر صورت می‌گیرد، امتیازدهی نوارها و همچنین تشخیص هموزیگوت‌ها از هتروزیگوت‌ها مشکل می‌باشد (Pemberton et al, 1995; Narvel et al, 2000).

۱۲-۲- روش‌های آماری تجزیه داده‌های مولکولی

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، وجود و عدم وجود نوار با اعداد یک و صفر مشخص شدند. استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بسیار مؤثر باشد. ضرایب تشابه از صفر تا یک متغیر است. در این ارزیابی زمانی که نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت باشند (Wolfe et al, 1998). داده‌های این ماتریس سپس توسط نرم‌افزارهای آماری نظیر Ntsys و DARwin 05 مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد.

۱-۱۲-۲- اندازه‌گیری فواصل و تشابه ژنتیکی

هر تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری در سطح توالی ژن‌ها یا فراوانی‌هایی آلی که بین افراد، جمعیت‌ها یا گونه‌ها قابل ثبت باشد تفاوت ژنتیکی بوده که تعیین آن و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهی است. فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را

می‌توان بسته به نوع داده‌ها از روش‌های آماری گوناگونی محاسبه کرد. به‌منظور اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بر مبنای داده‌های نشانگرهای مولکولی چندین روش مختلف معرفی گردیده است. معمول-ترین روش‌های اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی که برای داده‌های مولکولی به کار می‌روند شامل ضریب تشابه جاکارد (Jaccard et al, 1912)، تطابق ساده (Sokal et al, 1958) و دایس می‌باشند.

۲-۱۲-۲- تجزیه‌های چند متغیره آماری

۲-۱۲-۲-۱- 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، ۱۳۸۷). این روش در دو مورد می‌تواند به به‌نژادگر کمک کند: یکی پیدا کردن گروه‌های واقعی افراد براساس تشابه ژنتیکی آن‌ها و دیگری کاهش داده‌ها و افراد محدودی از هر گروه یا دسته انتخاب می‌شوند (Jacobson et al, 1992).

۲-۱۲-۲-۲- UPGMA^۶

یک روش ساده برای خوشه‌بندی نمونه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد، و برای رسم درختچه‌های کوفتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد که منعکس کننده ساختار موجود در یک ماتریس تشابه است (Legendre et al, 1998).

۲-۱۲-۲-۳- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی^۷ (PCA)

یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. نقطه آغاز در این روش، داده‌های کمی (فراوانی آلل‌ها) برای چندین نشانگر به دست آمده از دو یا چند تاکسون (تاکسا) یا جمعیت می‌باشد. این روش از معادله‌های چند بعدی برای تجزیه روابط دیده شده استفاده می‌کند. PCA، مؤلفه‌هایی را استخراج می‌کند که در میان مجموعه داده‌های چند بعدی بیشترین

^۶ - Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean (UPGMA)

^۷ - Principal Component Analysis (PCA)

میزان واریانس ممکنه را توجیه می‌نمایند. اگر دو و یا سه مؤلفه اول بخش بزرگی از واریانس را توجیه نمایند، تجزیه موفقیت‌آمیزی بوده است. محورهای اصلی متوالی نشان دهنده نخستین محور اصلی، دومین محور اصلی و ... است که هر کدام نشان دهنده میزان واریانس بوده و به ترتیب میزان واریانس کمتر و کمتر می‌شود. حال داده‌های اصلی را می‌توان در یک محور مختصات (دو یا سه بعدی) پلات نمود و بدین ترتیب میزان تشابه بین نمونه‌ها را از روی نحوه گروه‌بندی و در کنار هم قرار گرفتن آن‌ها درک نمود (Kurt weising et al, 2015).

قبل از انجام هر کار اصلاحی شناخت تنوع ژنتیکی و پتانسیل ژنتیکی هرگونه گیاهی امری ضروری و لازم است و وجود تنوع ژنتیکی در کارهای اصلاحی به‌عنوان یک برتری تلقی می‌شود (احتشام نیا و همکاران، ۱۳۸۸). در شیوه سنتی، ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک صورت می‌گیرد این روش زمان‌بر بوده و به‌خصوص در مورد درختان میوه تعدادی از صفات تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرد. روش‌های مولکولی فرصت جدیدی برای توصیف ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های گیاهی فراهم کرده است (مردی و همکاران، ۱۳۹۳).

۱۳-۲- کاربرد نشانگرهای مولکولی در تعیین تنوع ژنتیکی و ایجاد شناسایی و اصلاح ارقام

روش‌های کلاسیک تخمین تنوع ژنتیکی بین گیاهان بر پایه خصوصیات ریختی استوار بوده ولی این خصوصیات تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند (Ford-Lloy and Painting, 1996). امروزه با استفاده از نشانگرهای مولکولی، روش‌های شناسایی و تشخیص تنوع ژنتیکی، ابعاد جدیدتری یافته و دقیق‌تر شده است از طرفی دیگر این نشانگرها در شناسایی گونه‌ها و ارقام، تخمین تنوع زیستی و اصلاح ارقام کاربرد دارند (Williams et al, 1995).

ظهور تکنولوژی نشانگرهای DNA، به متخصصین و به نژاد گران گیاهی کمک کرد تا بر بسیاری از این مشکلات انتخاب فائق آیند. این نشانگرها بر پایه تفاوت در ترادف‌های نوکلئوتیدی عمل می‌کنند و امروزه استفاده از آن‌ها بسیار رایج شده است (Ebrahimi et al, 2011).

۱۴-۲-مروری بر منابع

صفت‌های ساختار ظاهری تحت تأثیر عامل‌های محیطی واکنش‌های متفاوت داشته و باعث تغییرهایی در ویژگی‌های شاخص می‌شود و به‌نوعی موجب افزایش تنوع در ویژگی‌های ظاهری گیاه می‌شود (Xu et al., 1995; Viljoen et al., 2009). بنابراین لزوم استفاده از شاخص‌هایی که کمتر تحت تأثیر عامل‌های محیطی قرار می‌گیرند و تغییر کمی را در طول سال‌ها نشان می‌دهند اولویت بالایی دارد. در بررسی ساختار ظاهری، بررسی‌های آناتومی می‌تواند کمک شایانی در تمایز رقم‌های گیاهی کند. در درختان میوه تلاقی‌های بین گونه‌ای سبب به وجود آمدن طیف گسترده‌ای از تغییر ساختار ظاهری شده است که در بعضی موارد تنها بررسی آناتومی می‌تواند تمایز را ایجاد کند (Empinotti Ulloa et al., 2002; Duarte, 2008). اوسته و همکاران (۲۰۰۲) خصوصیات گیاه‌شناسی جمعیت‌های انگور وحشی را در اسپانیا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از آمپلوگرافی وجود تنوع ژنتیکی بالایی را نشان داد که کلیدی برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی و شروع برنامه‌های به‌نژادی بود. در تحقیقاتی، بسیاری از محققین از نشانگرهای ریزماهورهای به‌منظور آمپلوگرافی ارقام انگور و شناسایی ارقام سینونیم و همونیم استفاده کردند. نشانگرهای ریزماهورهای در مطالعات آن‌ها قادر به تفکیک و گروه‌بندی ارقام براساس جمعیت از پیش تعیین شده بود (Martinez et al., 2004; Najafi et al., 2001; Dangle et al., 2006). هم‌چنین نجفی و همکاران (۲۰۰۶) با بکارگیری ۱۲ نشانگر ریزماهورهای تنوع ژنتیکی ۱۳۶ رقم انگور مناطق مختلف ایران را همراه با ۳۶ رقم انگور اروپایی مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن‌ها تجزیه واریانس مولکولی اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان تنوع ژنتیکی بین انگورهای نواحی مختلف ایران نشان داد، ولی تفاوت معنی‌داری بین ارقام ایرانی و اروپایی مشاهده نشد. بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ انگور باغ‌های دانشگاه کشاورزی پنجاب با استفاده از صفات مورفولوژیکی انجام شد، که صفات مورد بررسی توانستند تنوع بین ارقام را نشان دهند و ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی و هفت زیرگروه تقسیم بندی کردند (Singh, A. et al. 2019).

استفاده از نشانگرهای SSR برای شناسایی دقیق واریته‌های انگور گسترش یافته است. در یک پژوهش از ۵ مکان SSR جهت تشخیص ۱۱۰ نمونه انگور متشکل از گونه‌های مختلف و چند رقم هیبرید کلکسیون دانشگاه کرنل آمریکا استفاده گردید. مشاهده شد که مکان‌های SSR پلی‌مورفیسم زیادی دارند. به‌طوری‌که به ازای هر مکان متفاوت و از ۰/۹۴۷ تا ۰/۹۸۷ متغیر بود. از آن‌جا که نشانگرهای SSR هم‌بارز، دارای چندشکلی بالا بوده و در بین دامنه‌ای از گونه‌های خویشاوند به‌صورت محافظت شده می‌باشند، این گروه از نشانگرها نه تنها برای شناسایی انگور بلکه برای تفکیکی سایر ژرم‌پلاس‌م‌های ژنتیکی نیز بسیار مناسب توصیه شده است (Laboy and Alpha, 1998).

جهت بررسی یک ژرم‌پلاس‌م انگور در اسپانیا از ۴ مکان SSR استفاده شد. نتایج اصلی از این تحقیق نشان داد که جهت تبادل اطلاعات با سایر آزمایشگاه‌ها و یا بانک‌های ژرم‌پلاس‌م بهتر است از نشانگر SSR استفاده شود. چون نتایج حاصل از آن‌ها ساده و معتبر می‌باشد (Ulanovsky et al, 2002).

در مطالعه ۱۳۷۸ انگور وحشی و کشت شده حوضه مدیترانه و آسیای میانه با ۲۰ نشانگر SSR مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل‌ها سه گروه ژنتیکی را مشخص کردند: گروه اول، ارقام وحشی از کرواسی، فرانسه، ایتالیا و اسپانیا. گروه دوم، ارقام وحشی از ارمنستان، جمهوری آذربایجان و جورجیا و در گروه سوم، ارقام اسپانیا، فرانسه، ایتالیا، جورجیا، ایران، پاکستان و ترکمنستان قرار داشتند (Riaz, s et al. 2018).

در پژوهشی با استفاده از ۴ مکان SSR کار مطالعه بر روی ۲۰ واریته انگور را انجام دادند. از نظر آن‌ها نشانگرهای SSR به‌دلیل مزایایی که دارند (سطوح بالای چندشکلی، هم‌بارز بودن، سادگی تجزیه و تکرار پذیر بودن) امکان تاسیس یک مرکز اطلاع‌رسانی بین‌المللی جهت توصیف واریته‌های انگور را فراهم می‌آورند (Thomas and Scott, 2003).

در آزمایش دیگری قدرت نشانگرهای SSR در متمایز کردن ۷۷ رقم انگور مورد بررسی قرار گرفته است. در این آزمایش از ۴ مکان SSR و روش رنگ آمیزی نقره استفاده شده است. این چهار مکان کار تمایز ارقام را به خوبی انجام داده است (Boeers et al, 1996).

۱-۱۴-۲- مروری بر پژوهش های انجام شده در گیاهان مختلف با استفاده از نشانگر SSR
تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک، می تواند گام مؤثری در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان های صفات کمی، محتمل ترین توجیه برای وجود ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی باشد (Virk et al, 2000).
محمدی و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از نشانگر SSR، ۱۷ نشانگر را در یونجه زراعی شناسایی کردند که رابطه معنی داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیک مطالعه شده نشان می دادند.
در پژوهش چولاستوا و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد که نشانگرهای SSR نسبت به RAPD از کارایی بالاتری در تعیین هویت هیبریدهای ذرت برخوردارند.

عبداللهی مندولکانی و همکاران (۲۰۱۰)، در مطالعه ای، تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای (SSR) را انجام دادند و گزارش کردند که همه مکان های ریزماهواره ای مورد استفاده الگوی نواری چندشکل بین ژنوتیپ های مورد استفاده تولید کردند به صورتی که در مجموع ۸۰ آلل در جمعیت بادام زمینی مورد مطالعه تولید شد. به صورتی که میانگین تعداد آلل ها ۶/۱۱۵ آلل برای هر مکان ریز ماهواره و میانگین میزان اطلاعات چند شکل برای جایگاه ها ۸۰٪ و از ۴۷٪ درصد (برای نشانگر pPGPseq-2c11) تا ۹۵٪ (برای نشانگر PM183) متغیر بود.
نتایج پژوهش مفاخری و همکاران (۱۳۹۴) نشان داد استفاده از ترکیب سیستم نشانگرهای مولکولی و مرفولوژیک در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی و مورفولوژیک لوبیا چشم بلبلی مؤثر می باشد. البته بهتر است جهت افزایش کارایی شناسایی نشانگرهای مرتبط، از نشانگرهای بیشتر و مؤثرتر مانند SNP در کنار SSR در مطالعات تجزیه ارتباط استفاده شود.

در پژوهش خیرالهی و همکاران (۱۳۹۲)، بر روی ۲۵ ژنوتیپ گندم دیم توسط ۲۳ آغازگر SSR انجام شد. از این تعداد ۲۰ آغازگر به طور کامل نوارهای مختلفی را تکثیر کردند. در تمام جمعیت آغازگرها بیش از یک باند و مابقی یک باند چندشکل در ژنوتیپهای متفاوت داشتند. بیشترین و کمترین چندشکلی باندها به ترتیب مربوط به آغازگرهای Xbarc54 بر روی کروموزوم 3A و آغازگر Xcfd40 روی کروموزوم ۵۰ بود، همچنین بیشترین و کمترین PIC به ترتیب مربوط به نشانگرهای Xcfd168 و Xgwm30 بود. نتایج کلی آنها نشان داد که تجزیه و تحلیل SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپهای گندم روشی سودمند می باشد.

در بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپهای گندم نان و دوروم دیم با استفاده از نشانگرهای SSR توسط میردریکوند و همکاران (۱۳۹۴) براساس ضرایب تشابه به دست آمده، ارزشهای تشابه دامنه‌ای از ۰/۱۴ تا ۰/۸۶ را نشان دادند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپهای Seri و Seri82 و کمترین آن بین ژنوتیپهای Baviacora و Sita/chil به ترتیب به میزان ۰/۸۶ و ۰/۱۴ مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای توانست ژنوتیپهای گندم نان و دوروم را از هم تفکیک نماید. و با توجه به تنوع ژنتیکی که با استفاده از نشانگرهای SSR به دست آمد، می توان از فواصل ژنتیکی به طور مطلوب در برنامه‌های به نژادی گندم استفاده کرد.

مصطفی هاما صلیح و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای را بر روی ژنوتیپ های گردو منطقه سلیمانیه عراق انجام دادند. هدف این مطالعه شناسایی روابط ژنتیکی با استفاده از مارکر مولکولی SSR و RAPD بود. ۱۲ ژنوتیپ گردو با استفاده از ۱۰ نشانگر RAPD و ۹ نشانگر SSR بررسی شدند نتایج نشان داد که ۸۵ باند در RAPD ایجاد شد که تنها ۳۶ تا از آنها پلی مورفیک بودند اما در آنالیز SSR ۲۶ باند ایجاد شده که ۲۳ تا پلی مورفیک را نشان دادند. در RAPD تشابه ژنتیکی از ۰/۴ تا ۰/۹۳ و در SSR ۰/۲۷ تا ۱ محاسبه شد. ژنوتیپ های Wazi و kirmashan در هر دو مارکر نزدیک ترین روابط را نشان دادند و ژنوتیپ های Twana و Awesar دورترین ژنوتیپ ها بودند.

دوگان و همکاران (۲۰۱۴) در آزمایشی روابط ژنتیکی گردو را با سه نوع نشانگر مولکولی بررسی کردند. در این تحقیق روابط ژنتیکی بین ۵۹ ژنوتیپ گردو از داخل ترکیه و ارقام بین‌المللی با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD و ۲۵ آغازگر ISSR و ۱۶ جفت آغازگر SSR بررسی شد. نتایج بیان کرد که SSR دارای بالاترین نرخ پلی مورفیسم (۹۹/۱ درصد) بود، درحالی‌که RAPD و ISSR نتایج نسبتاً مشابهی را ایجاد کردند به ترتیب دارای پلی مورفیسم ۷۱/۱ و ۶۹ درصد بودند. طبق نتایج آزمون مندل میزان همبستگی بین RAPD و ISSR بالاترین مقدار ۰/۴۶ و کمترین بین SSR و ISSR به مقدار ۰/۳۲ بود.

در پژوهشی که مردی و همکاران (۱۳۹۳) در زمینه کاربرد نشانگرهای ریز ماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام گردو انجام دادند، از ۵ نشانگر SSR از مجموع ۳۰ نشانگر در ۵ رقم گردوی ایرانی استفاده کردند. نشانگرهای WP-376 و ABR11 و WM-6 در رقم‌های Z63-Z60-Z53-Z30-K72 باندهای چندشکلی اختصاصی را ایجاد کردند. وجود غیریکنواختی ژنتیکی در بین درختان مورد مطالعه باعث عدم توصیه درختان به عنوان والد مادری گردید.

مطالعه‌ای که ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) در ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی انجام دادند ۳۱ ژنوتیپ گردوی ایرانی به همراه ۴ رقم خارجی موردبررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۹ نشانگر SSR استفاده شد که ۳۹ آلل با میانگین ۵/۱۰ آلل در هر آغازگر ایجاد شد. در بعد دیگر این مطالعه از صفات مورفولوژیکی برتر مانند وزن نات که در محدوده‌ی ۷/۵۲ تا ۱۷/۷۳، وزن تخم‌مرغی کل در محدوده ۴ تا ۹/۸۳، درصد مغز در محدوده ۳۸/۷۸ تا ۶۷/۰۵ استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد ژنوتیپ‌های ایرانی تنوع بالایی را هم از لحاظ مورفولوژیک و از لحاظ ژنتیک دارا هستند.

پژوهش دیگری توسط چن و همکاران (۲۰۱۴) بر روی شناسایی ارقام گردوهای اصلی رشد یافته در چین انجام شد. شناسایی مولکولی با استفاده از ۱۲ مارکر SSR و ۲۲ صفت نات بر روی ۳۵ گردو انجام شد. ۳۵ ژنوتیپ گردو بر اساس صفت نات در ۱۱ گروه دسته‌بندی شدند. نتایج نشان داد که هتروزیگوتی مشاهده شده به‌وضوح پایین‌تر از هتروزیگوتی مورد انتظار گردید.

راد و همکاران (۱۹۹۸)، اولین نقشه ژنتیکی ژنوم گندم براساس نشانگرهای ریزماهواره را ترسیم کردند. آنان با استفاده از ۲۷۹ مکان ژنی ریزماهواره (۹۳ مکان ژنی روی ژنوم A، ۱۱۵ مکان ژنی روی ژنوم B و ۷۱ مکان ژنی روی ژنوم D) این نقشه را تهیه کردند.

احمد و همکاران (۲۰۰۲)، از ۴۳ نشانگر ماهواره برای برآورد تنوع ژنتیکی در بین ۱۳ ژنوتیپ گندم از منشأهای متفاوت استفاده کرد که در مجموع ۱۵۶ آلل متفاوت شناسایی شدند. نشانگرها بین ۲ تا ۸ آلل به ازاء هر مکان ژنی و با متوسط ۳/۶ تولید کردند. به طور کلی هیچ کدام از ژنوتیپها رابطه ژنتیکی نزدیکی را نشان ندادند در تحقیق کاربرد نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی در بررسی تنوع انار به این نتیجه رسیدند که مارکر SSR سطوح بالایی از تنوع را حتی در تعداد کمی از انارها نشان می دهد که موید آن است که ابزار قوی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم پلاسماست (جعفری نجف آبادی، ۱۳۹۰).

در پژوهشی جهت تعیین قابلیت تکرارپذیری نشانگرهای مولکولی در میان شبکه آزمایشگاههای اروپا از سه نشانگر RAPD، SSR و AFLP استفاده نمودند و نشان دادند که نشانگر RAPD از قابلیت تکرارپذیری کمتری برخوردار می باشد. در مورد نشانگر AFLP تنها یک باند متفاوت در تکرارهای مختلف در بین آزمایشگاهها مشاهده شد در حالی که همه آللهای نشانگر SSR در میان همه آزمایشگاهها تکثیر گردید (Powell et al, 1996).

کریم و همکاران (Karim et al, 2009) نشان دادند که نشانگرهای ریزماهواره قدرت بیشتری برای آشکارسازی سطح تنوع بین جمعیتها دارند و گزارش نمودند که همبستگی میان نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و ریزماهواره برای برآورد میزان شباهت ژنوتیپهای مختلف، در حد پایینی قرار دارد.

در پژوهشی جهت تعیین تنوع ژنتیکی گندم دیپلوئید وحشی از دو نوع نشانگر SSR و RAPD برای تجزیه کلاستر جمعیت استفاده نمودند که نتایج گروه بندی ژنوتیپها با یکدیگر متفاوت بود، به طوری

که براساس نشانگرهای RAPD جمعیت مذکور به سه گروه و براساس نشانگرهای ریزماهواره جمعیت مورد مطالعه به دو گروه تقسیم شد (Naghavi et al, 2007).

۴۰ واریته سیب مجارستان را با ۶ جفت آغازگر SSR، تعیین هویت نمودند که ۷۱ آلل با میانگین ۱۱/۸ برای هر جایگاه ژنی به دست آمد و میانگین هتروزیگوسیتی برای مارکرها خیلی بالا (۰/۸) بود (Wichmann et al, 2007).

ارتباط بین هتروزیستی در ۶ صفت زراعی (ارتفاع بوته، قطر طبق، وزن هزار دانه، رون، عملکرد دانه در بوته، عملکرد روغن در بوته) و فاصله ژنتیکی بین ۲۳ اینبرد لاین آفتابگردان را توسط ۱۵ پرایمر SSR مورد بررسی قرار دادند. میزان فاصله ژنتیکی بین ۰/۸ تا ۰/۱۳ به دست آمد. آن‌ها نتیجه گرفتند فاصله ژنتیکی همبستگی معنی داری با هتروزیگوسیتی نداشته و بیشترین همبستگی منفی بین درصد روغن و فاصله ژنتیکی وجود دارد (Gvozdenovic et al, 2009).

در آزمایشی، روابط ژنتیکی ۲۴ رقم و پایه سیب ایران را با استفاده از ۵ جفت آغازگر SRR مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق در مجموع ۵۲ آلل پلی مورفیک در ۵ لوکوس ریزماهواره با میانگین ۱۰/۴ به دست آمد (جهرمی شیرازی و همکاران، ۱۳۸۷).

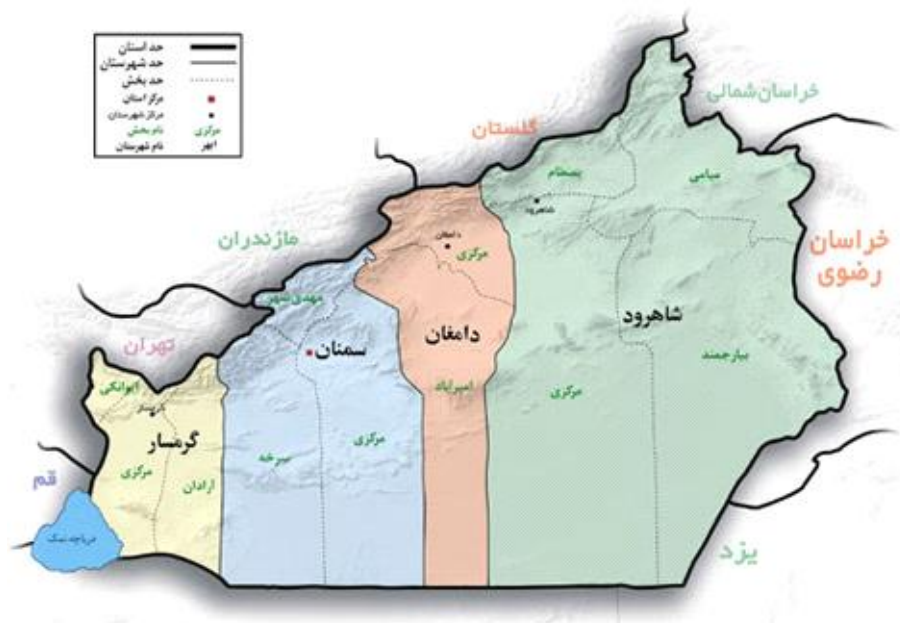
به طور کلی امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی منجر به افزایش سرعت و دقت برنامه‌های اصلاحی شده است (حدادی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). این نتایج می‌تواند حاکی از آن باشد که نشانگرها در ترکیبات ژنتیکی مختلف کارایی متفاوتی را نشان می‌دهند (Leao et al, 2011) و طیف وسیعی از تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده گردید.

فصل سوم

مواد و روش

۳-۱- محل و روش نمونه برداری

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در شهرستان شاهرود (با طول ۵۴ درجه ۵۸ دقیقه شرقی و عرض ۳۶ درجه و ۲۵ دقیقه شمالی) واقع در استان سمنان انجام شد. شاهرود با ارتفاع ۱۳۸۰ متر از سطح دریا دارای آب و هوای سرد و خشک است. همانطور که در تصویر ۳-۱ مشخص شده است شهرستان شاهرود با استان های شمالی مازندران، گلستان و هم چنین از شرق با استان خراسان شمالی و رضوی در همسایگی قرار دارد.



شکل ۳-۱ نقشه شهرستان شاهرود و شهرهای همسایه آن

۳-۲- مواد گیاهی

در این مطالعه ۵۵ واریته انگور (جدول ۳-۱) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارقام مورد مطالعه (شکل ۴-۱) واقع در کلکسیون تحقیقاتی مرکز تحقیقات شاهرود می باشد.

۳-۲-۱- صفات مورفولوژیکی مربوط به برگ

صفات مورد بررسی عبارتند از: برگ کامل (شکل پهنک، تعداد لپ، شکل دندانه، عمق بریدگی لوب ها، آرایش بریدگی پهنک در مجاور دم برگ، طول دم برگ، طول رگ برگ های اصلی، زاویه بین رگ برگ- های اصلی، رنگ آنتوسیانین رگ برگ های اصلی در سطح برگ، رنگ آنتوسیانین در دم برگ، رنگ

آنتوسیانین گره) (شکل ۴-۲). صفات میوه (شکل ۴-۳) شامل: طول حبه، عرض حبه، شکل حبه، رنگ پوست حبه، رنگ گوشت حبه، وجود یا عدم وجود دانه در حبه، غوطه‌وری حبه در درصد های آب نمک مختلف (جرم حجمی حبه)، طول خوشه، عرض خوشه، تراکم خوشه (جدول ۳-۱). طبق دستورالعمل DUS برای ارزیابی تمایز، یکنواختی و پایداری، از صفات و حالت تظاهر آنها استفاده شده است که بر این اساس امتیازدهی صورت می‌گیرد. صفاتی که تغییرات پیوسته دارند امتیازدهی با استفاده از اعداد متوالی ۱، ۲، ۳، ۴... انجام گردید. به‌طور کلی صفات مورد نظر اسمی هستند و کدهای صرفاً جهت تعیین وضعیت صفت، گرفته است.

۲-۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مورفولوژیک حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل تجزیه همبستگی بین صفات، تجزیه خوشه‌ای با روش Ward و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صورت پذیرفت. آنالیز داده‌های کیفی براساس آزمون Sperman و داده‌های کمی براساس آزمون Pearson صورت پذیرفت. روش کلاسه‌بندی با استفاده از Ward Method و براساس فاصله اقلیدوسی است.

جدول ۳-۱- ارقام مورد مطالعه جمع‌آوری شده از مرکز تحقیقات شاهرود

نام رقم	کد ژنوتیپ	نام رقم	کد ژنوتیپ	نام رقم	کد ژنوتیپ
Fakhri Germez	۶۰۸۹	Unknown	۶۰۷۱	Sabz Dargaz	۶۰۰۵
Fakhri Sefide	۶۰۸۸	Perlet	۶۰۷۰	Sefied Dargaz	۶۰۰۶
Lorom	۶۰۸۷	Kandoei	۶۰۶۹	Khalili danedar2	۶۰۰۷
Sahebi	۶۰۸۶	Angosht	۶۰۶۸	Khalili danedar3	۶۰۰۸
Lale	۶۰۸۵	Kardinal	۶۰۶۷	Toroghi Kashmar	۶۰۰۹
Khorasani	۶۰۸۴	Rishbaba	۶۰۶۶	Unknown2	۶۰۱۰
Khali Danedar	۶۰۸۳	Ghochi shahr	۶۰۶۵	Kalili Bidane Kashmar	۶۰۱۱
MirMohamad Jalali	۶۰۸۲	Rishbaba	۶۰۶۴	Kaldari Birjand	۶۰۱۲
Dishiei	۶۰۸۱	Siah	۶۰۶۳	PirGholi 1	۶۰۱۳
Rishbaba	۶۰۸۰	Sahebi2	۶۰۶۲	PirGholi 2	۶۰۱۴
Sefide Fakhri 1	۶۰۷۹	Askari	۶۰۶۱	Khalili nar Ghochan	۶۰۱۵
Sefide Fakhri 2	۶۰۷۸	Siah serke	۶۰۶۰	Shoghali Nishabour	۶۰۱۶
Tabas Shiraz	۶۰۷۷	Sahebi	۶۰۵۹	Keshmeshi Jer Tudeh	۶۰۱۷
Askari Esfahan	۶۰۷۶	Kolahdari	۶۰۵۸	Pich Kashmar	۶۰۱۸
Mehr	۶۰۷۵	Sabzmal Kashmar	۶۰۰۱	Kalili Nar Rezvan	۶۰۱۹
Samarghandi	۶۰۷۴	Shahpasnd	۶۰۰۲	Mayeh Mishi Birjand	۶۰۲۰
Khalili danedar1	۶۰۷۳	Fakfri Nishabour	۶۰۰۳	Askari	۶۰۲۶
Yaghoti	۶۰۷۲	Lale Kashmar	۶۰۰۴	Sarkhak	۶۰۳۰
				Askari	۶۰۴۸

جدول ۳-۲- صفات مورفولوژیکی مربوط به امتیازدهی براساس دیسکریپتور DUS

شماره صفت	نام صفت	نام اختصاری	حالت تظاهر	امتیاز
۱	آنتوسیانین: گره	Ag	ندارد یا خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد	۱،۲،۳،۴،۵
۲	آنتوسیانین: دمبرگ	As	ندارد یا خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد	۱،۲،۳،۴،۵
۳	آنتوسیانین: رگبرگ	Al	ندارد یا خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد	۱،۲،۳،۴،۵
۴	برگ: طول دمبرگ	Ll	-	میلی متر
۵	برگ: تعداد لوب	Nc	برگ کامل، سه لب، پنج لب، هفت لب، بیش از هفت لب	-
۶	برگ: شکل	Sl	قلبی، سه گوش، پنج وجهی، مدور، قلوهای	۱،۲،۳،۴،۵
۷	برگ: هم پوشانی بریدگی	Ol	بسیار گسترده، کاملاً باز، نیمه باز، کمی باز، لوب نیمی هم پوشانی دارد، لوب کامل هم پوشانی دارد، لوب خیلی کامل هم پوشانی دارد	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹
۸	برگ: عمق بریدگی	Cl	خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد	۱،۲،۳،۴،۵
۹	برگ: شکل دندان	St	هر دو طرف فرورفته، هر دو طرف راست، یک طرف برآمده و یک طرف فرورفته، ترکیبی از هر دو طرف راست و هر دو طرف برآمده	۱،۲،۳،۴،۵
۱۰	جرم حجمی حبه	Gd	آب مقطر، آب نمک ۵ درصد، آب نمک ۱۵ درصد، آب نمک ۱۷/۵ درصد	۱،۲،۳،۴،۵
۱۱	طول رگبرگ	LV1	طول رگبرگ اصلی	سانتی متر
۱۲	طول رگبرگ	LV2	طول رگبرگ کناری	سانتی متر
۱۳	طول رگبرگ	LV3	طول رگبرگ نزدیک دمبرگ	سانتی متر
۱۴	زاویه برگ	AL1	زاویه بین رگبرگ اصلی و کناری	درجه
۱۵	زاویه برگ	AL2	زاویه بین رگبرگ کناری و نزدیک دمبرگ	درجه
۱۶	زاویه برگ	AL3	زاویه بین دو رگبرگ مجاور دمبرگ	درجه
۱۷	طول حبه	Gl	-	میلی متر
۱۸	عرض حبه	Ga	-	میلی متر
۱۹	طول خوشه	Bl	-	سانتی متر
۲۰	عرض خوشه	Ba	-	سانتی متر
۲۱	طول دم میوه	Fs	-	سانتی متر
۲۲	تراکم خوشه	H	باز، متراکم، خیلی متراکم	-
۲۳	شکل	Gs	دوک مانندی، بیضوی باریک، بیضوی، گرد، بیضی پهن، تخم مرغی، تخم مرغی باز، تخم مرغی وارونه، طاقدار (قوسی)	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹
۲۴	رنگ پوست	Gb	سبز روشن، سبز مایل به زرد، زرد مایل به سبز، بنفش، دورنگ (بنفش و سبز)، صورتی ملایم، صورتی مایل به سبز، زرشکی	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
۲۵	رنگ گوشت	Gf	بی رنگ، بی رنگ متمایل به زرد روشن، بی رنگ متمایل به سبز روشن، سبز روشن، سبز خیلی روشن، زرد روشن، زرد خیلی روشن	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸
۲۶	بذر	S	دارد، ندارد	-

۳-۳- مواد و روش‌های بخش مولکولی

۳-۳-۱- نمونه‌برداری و استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB

در بهار سال ۹۷ از برگ تازه درختان انگور نمونه‌برداری شد و در فریز ۸۰- نگه‌داری شد.

۳-۳-۲- مراحل استخراج DNA

استخراج DNA از گیاه به روش پایه CTAB طبق روش حیدری و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییرات انجام شد. مقدار یک گرم برگ‌های جوان گیاه با ازت مایع در هاون چینی سترون پودر شد و ۷۵۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده به لوله‌های سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌متری منتقل گردید. به هر لوله، مقدار ۷۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج که از نیم ساعت قبل در حمام بن‌ماری در ۶۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شده بود، اضافه شد. میزان پنج میکرولیتر از بتا-مرکاپتوانول به‌طور مجزا و به سرعت به محتویات هر لوله، در زیر هود اضافه شد و محتویات لوله کاملاً مخلوط شدند.

۱. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس نگه‌داری و طی این مدت نمونه‌ها هر پنج دقیقه ورتکس گردیدند.

۲. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق به هر لوله به میزان هم حجم نمونه کلروفوم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) افزوده شده و لوله‌ها ورتکس شدند.

۳. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه روی شیکر قرار گرفتند و پس از مدت پنج دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۴. مایع بالای هر یک از لوله‌ها به آرامی به لوله‌های جدید منتقل شد و مجدداً به هر لوله، هم حجم محتویات آن، کلروفوم- ایزوآمیل الکل اضافه شد.

۵. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۶. مایع بالایی به آرامی به لوله‌های جدید منتقل گردید و ۰/۱ حجم استات سدیم سه مولار ۵/۲ pH و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد (از اتانول ۱۰۰ درصد جهت رسوب نوکلئیک اسید نیز می‌توان استفاده کرد). محتویات هر لوله به آرامی و با وارونه کردن لوله‌ها کاملاً مخلوط شدند. در این مرحله کلاف DNA قابل مشاهده بود.

۷. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- قرار گرفتند.

۸. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند تا DNA در ته لوله‌ها رسوب کند.

۹. مایع بالایی رسوب به آرامی از لوله‌ها خارج شد و رسوب DNA با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۱۰. فازرویی محتوی اتانول به آرامی از لوله‌ها خارج شد و سپس لوله‌ها به مدت دو ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا رسوب DNA کاملاً خشک شود و اتانول از رسوب DNA تبخیر شود.

۱۱. پس از اطمینان از خشک شدن رسوب، به هر لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا رسوب DNA کاملاً در آب حل شود. پس از پایت کردن نمونه‌ها در فریزر ۲۰- نگهداری شدند.

جدول ۳-۳- مواد و غلظت مورد استفاده جهت تهیه بافر استخراج

مواد	غلظت (مولار)	در ۱۰۰ میلی لیتر	نیاز به اوتوکلاو
CTAB	-	۲٪	خیر
PVP-40	--	۲٪	خیر
NaCl	۵M	۱/۴ml	بله
EDTA ,Ph=8	۰/۵M	۲۰ ml	بله
Tris Hcl ,PH=8	۱M	۱۰۰ ml	بله
Mercaptoethanol	-	-	خیر

در نهایت حجم بافر با آب مقطر دوبار تقطیر استریل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر و pH آن توسط HCL به ۸ رسید

۳-۴- بررسی کمیت و کیفیت DNA

۳-۴-۱- الکتروفورز ژل آگارز متافور با استفاده از الکتروفورز افقی

برای تعیین کیفیت DNA از نظر شکستگی و یا وجود آلودگی DNA و پروتئین، مقداری از نمونه‌های DNA با بافر بارگذاری^۸ مخلوط گردیدند و در چاهک‌های حاصل از ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری شدند. سپس در کنار یک DNA مقیاس^۹ با اندازه‌ی مشخص تحت جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان الکتروفرز، ژل بر

^۸ Loading Buffer

^۹ DNA Ladder

روی دستگاه عکسبرداری^{۱۰} و تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفته و از آن عکسبرداری گردید. وجود باندهای کاملاً واضح^{۱۱} و فاقد کشیدگی^{۱۲} نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA می‌باشد.

جدول ۳-۴- مشخصات و توالی نشانگرهای SSR مورد استفاده در این تحقیق

شماره پرایمر	آغازگر	توالی	دما اتصال درجه سانتی گراد
8	VVS2-(F)	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	55
8	VVS2-(R)	AAATTCAAAATTCTTATTCAACTGG	۵۵
5	VVMD5- (F)	CTAGAGCCTACGCCAATCCAA	55
5	VVMD5-(R)	ATACCAAAAATCATATTCCTAAA	55
6	VVMD7-(F)	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	55
6	VVMD7-(R)	CGAACCTTCACACGCTTGAT	55
7	VVMD25-(F)	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAGG	55
7	VVMD25-(R)	TTGGATTGAAATTTATTATTGAGGGG	55
2	VVMD27-(F)	TACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	58
2	VVMD27-(R)	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	58
3	VVMD28-(F)	ACCAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAG	58
3	VVMD27-(R)	TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG	58
4	VVMD32-(F)	TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG	58
4	VVMD32-(R)	GCAAAGATGGGATGACTCGC	58
1	VrZAG79-(F)	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	58
1	VrZAG79-(R)	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTC	58

۵-۳- بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

بهینه‌سازی واکنش PCR براساس دو عامل میزان غلظت DNA و دمای اتصال انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تمامی نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر مطابق جدول ۳-۵ با غلظت و مقدار مشخصی صورت گرفت.

¹⁰ Gel Documentation

¹¹ Sharp

¹² Smear

جدول ۳-۵- شرایط بهینه‌سازی برای PCR آغازگرهای مورد آزمایش

اجزاء واکنش	غلظت مواد	میزان مورد نیاز
مستر	۱۰-۲X	۵ میکرولیتر
آغازگر (F) SSR	۱۰ پیکومول	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر (R) SSR	۱۰ پیکومول	۰/۵ میکرولیتر
الگو DNA	۲۰-۳۰ نانو گرم	۲ میکرولیتر
آب دیونیزه	۱۰-۲X	۷ میکرولیتر
حجم نهایی	-	۱۵ میکرولیتر

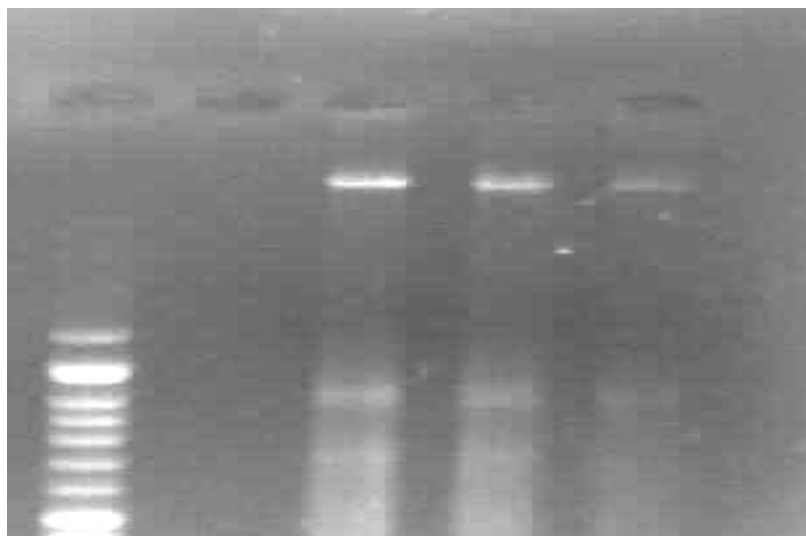
در این پژوهش پس از آزمایش دماها و برنامه‌های مختلف، برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای مورد مطالعه به دست آمد که برای تمامی آغازگرها، برنامه حرارتی یکسان استفاده شد و تنها تفاوت بین آن‌ها در دمای اتصال بود. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای تکثیر جایگاه‌های مورد نظر در جدول ۳-۶ نشان داده شده است.

جدول ۳-۶- برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهوره

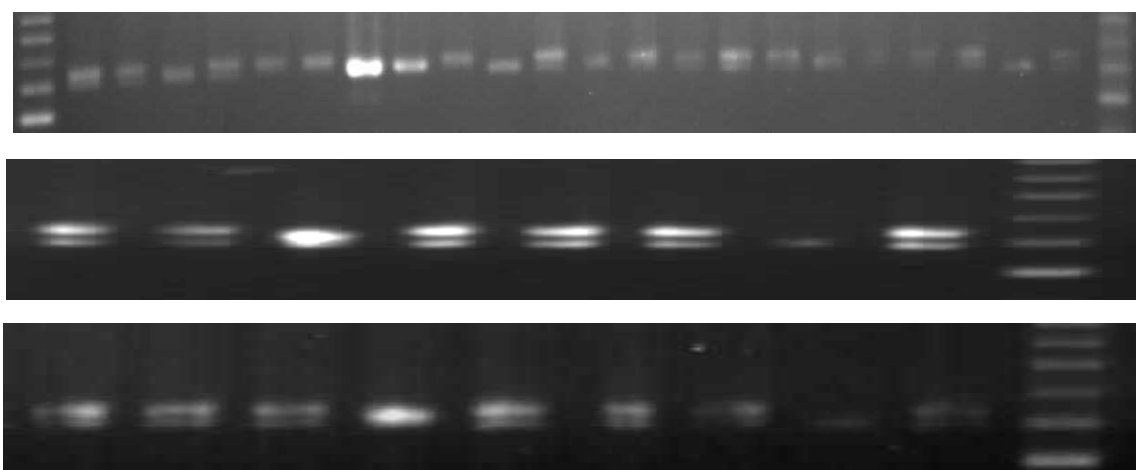
مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه- ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال آغازگرها	۵۵-۶۷/۴	۴۵ ثانیه	۳۵
تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

۳-۶- تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

برای هر آغازگر دامنه باندهای تکثیری، تعداد کل باند، تعداد آلل‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده تعیین گردید. میانگین باندهای دارای اطلاعات نشان‌دهنده رابطه بین وجود یک باند در ژنوتیپ‌های تحت مطالعه است. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها با روش جاکارد و آنالیز باندها براساس (bp) و با نرم‌افزار DARwin 5.0 انجام پذیرفت (Nei and Li, 1979).



شکل ۳-۲- نمایش کیفیت نمونه DNA استخراجی بر روی ژل آگارز



شکل ۳-۳- نمایش کیفیت نمونه آغازگرهای ۶، ۴ و ۷ بر روی ژل آگارز متافور

فصل چہارم

نتایج و بحث

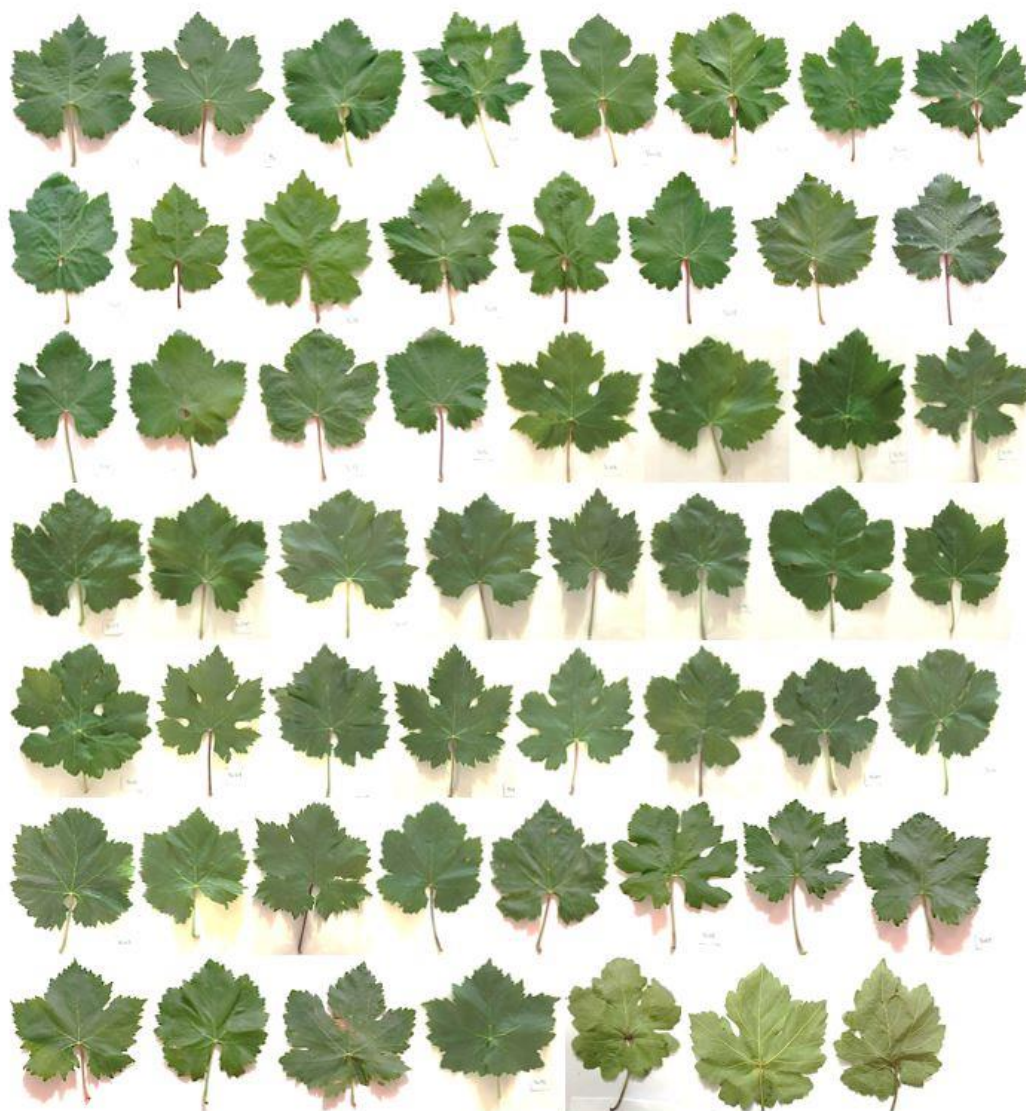
۱-۴- صفات مورفولوژیکی

به منظور بررسی ساختار ژنتیکی انگور از ریخت‌نگاری استفاده می‌شود. ریخت‌نگاری علم تمایز انگور براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی است و براساس آن هزاران رقم انگور بدون استفاده از نشانگرهای ژنتیکی شناسایی می‌شوند (Chitwood et al, 2014). ایران به‌عنوان یکی از مراکز پیدایش و پراکنش انگور در جهان از تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی بالایی برخوردار است (Doulati Baneh et al, 2010). میوه انگور به دلیل دارا بودن انواع فلاونوئیدها از جمله آنتوسیانین از ارزش غذایی بالایی برخوردار است. رقم و شرایط محیطی بر ترکیب و درصد آنتوسیانین‌ها تأثیر دارد (پژمان‌مهر و همکاران، ۱۳۹۴) و ارزش تغذیه‌ای و دارویی آن‌را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Downey et al, 2004). میانگین آنتوسیانین گره در ۵۵ ژنوتیپ مورد مطالعه (شکل ۴-۱) ۲/۲۵ بود به‌طوری‌که بیشترین مقدار در ژنوتیپ‌های دیشویی، بی‌نام، پیرقلی شماره ۱ و پیچ کاشمر به مقدار ۵ بود. افزایش درصد تنوع در صفت رنگ آنتوسیانین رگبرگ‌های اصلی در گیاه انگور توسط موسی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) تأیید شد. در مطالعه پژمان‌مهر و همکاران (۱۳۹۴) به این نتیجه دست یافتند که مقدار آنتوسیانین ارتباط بالایی با رنگ ارقام داشت، که در این تحقیق ارقام بی‌نام و پیچ‌کاشمر این ارتباط را نشان دادند. بیشترین طول دمبرگ با میانگین ۸/۷۹ میلی‌متر بود که در ژنوتیپ‌های ۶۰۱۴، ۶۰۰۴، ۶۰۱۷ و ۶۰۲۰ و کمترین این صفت به مقدار ۴/۸ در ژنوتیپ ۶۰۶۲ مشاهده شد. میانگین طول رگبرگ (LV1) در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش ۱۲/۲۷ میلی‌متر بود که بیشترین آن در ژنوتیپ شغال نیشابور با مقدار ۱۵/۵ و کمترین آن در ژنوتیپ عسگری با مقدار ۷/۵ میلی‌متر ثبت گردید. طول میوه به‌عنوان یکی از صفات مهم در میزان تولید میوه نهایی و بازارپسندی محصول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عرض میوه نیز یک شاخص برای اندازه‌گیری اندازه میوه است (Ershadi, 1997). طول و عرض حبه با میانگین‌های ۲۱/۸۳ میلی‌متر و ۱۷/۲۳ میلی‌متر در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به خود اختصاص دادند. طول و عرض خوشه با میانگین‌های ۱۷/۴ و ۱۱/۰۰ سانتی‌متر بدست آمد. هم‌چنین بیشترین طول دم‌میوه در ژنوتیپ عسگری به مقدار ۷ سانتی‌متر و کمترین آن به مقدار ۱/۳ در ژنوتیپ یاقوتی

(۶۰۷۲) حاصل گردید. بیشترین میزان واریانس با مقدار ۱۳۴/۸۴ و انحراف معیار با مقدار ۲۸/۹۸ در زاویه برگ مشاهده شد. در میان صفات مورد مطالعه، صفتهای آنتوسیانین، رنگ پوست و گوشت حبه، طول دم میوه و همپوشانی بریدگی برگ، بیشترین ضریب تغییرات را داشتند. نتایج تفاوت معنی‌داری را در صفات مورد بررسی نشان داد. هم‌چنین شکل برگ (شکل ۴-۲)، کم‌ترین ضریب تغییرات را ایجاد کرد. با توجه به وجود تنوع در صفات مورد مطالعه، امکان انتخاب برای مقادیر مختلف یک صفت وجود دارد (جدول ۴-۱). نتایج مطالعات دولتی بانه و همکاران (۱۳۸۹) تنوع بسیار بالایی در صفاتی نظیر شکل برگ، تعداد لوب برگ، رنگ برگ جوان، شکل سینوس دمبرگی، شکل دندانه، حاشیه پهنک، اندازه، شکل و رنگ پوست حبه، میزان رشد رویشی، سیستم باردهی و زمان رسیدن را در بین ۵۰ رقم انگور نشان دادند. هم‌چنین نتایج حاضر با برخی نتایج صفات برگ و شاخه در مطالعات کرمی (۲۰۰۹)، نجاتیان (۲۰۰۶) و حشمتی و همکاران (۱۳۹۷) همخوانی دارد. رسولی و همکاران (۱۳۹۳) ضریب تغییرات بالا را در صفات وزن خوشه‌چه، رنگ گوشت میوه، طول دم خوشه، وزن دم حبه، وزن و طول هسته در انگور رسیده گزارش دادند. در مطالعه لئو و همکاران (۲۰۱۱) تنوع ژنتیکی ۱۳۶ انگور تازه‌خوری را در برزیل بررسی کردند و نتیجه گرفتند تنوع بالایی در ارقام انگور وجود دارد. طبقه‌بندی براساس خصوصیات مورفولوژیک اطلاعات مفیدی درباره روابط بین گونه‌ها برای اصلاح‌گران و مدیران بانک‌های ژن گیاهی فراهم می‌نماید (Balmer and Blank, 2005). صفات ظاهری گیاه تحت تأثیر عوامل محیطی بوده و در اکثر اوقات پارامترهای مورفولوژیک به دلیل عدم ثبات و تغییر پذیری زیاد نمی‌توانند معیار خوبی برای تشخیص کامل شباهت‌ها و تفاوت‌های ارقام انگور باشند، با این رویکرد نشانگرهای مولکولی ابزارهای مکمل برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی ارقام انگور می‌باشند. نشانگرهای مولکولی تحت تأثیر شرایط محیط قرار نمی‌گیرند، در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند، دارای پیوستگی با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم کشاورزی هستند و می‌توانند تفاوت‌های افراد را در سطح توالی نوکلئوتیدی ژنوم مشخص نمایند (Baradakci et al, 2002).



شکل ۴-۱- عکس خوشه ۵۵ واریته‌های انگور مورد مطالعه در این تحقیق



شکل ۲-۴ تنوع شکل برگ در ۵۵ واریته‌های انگور مورد مطالعه در این تحقیق

جدول ۴-۱-آمار توصیفی صفات مورفولوژی مورد بررسی

شماره	صفات اندازه گیری شده	واحد	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار	واریانس	ضریب تغییرات (%)
۱	آنتوسیانین: گره	کد	۱	۵	۲/۲۵۴۵	۱/۳۳۶۳۶	۱/۷۸۶	۵۹/۲۸
۲	آنتوسیانین: دم برگ	کد	۱	۵	۲/۸۱۸۲	۱/۳۶۲۰۶	۱/۸۵۵	۴۸/۳۳
۳	آنتوسیانین: رگ برگ	کد	۱	۵	۱/۰۹۰۹	۰/۵۵۳۵۳	۰/۳۰۶	۵۰/۷۴
۴	برگ: طول دم برگ	سانتی متر	۴/۸	۱۶	۸/۷۹۱۱	۲/۴۱۹۷۲	۵/۸۵۵	۲۷/۵۲
۵	برگ: تعداد لوب	کد	۵	۵	۵	-	-	-
۶	برگ: شکل	کد	۳	۴	۳/۱۰۹۱	۰/۳۱۴۶۳	۰/۰۹۹	۱۰/۱۲
۷	برگ: هم پوشانی بریدگی	کد	۲	۸	۳/۲۵۴۵	۱/۳۷۷۳۱	۱/۸۹۷	۴۲/۲۲
۸	برگ: عمق بریدگی	کد	۱	۵	۲/۸	۰/۸۶۹۲۳	۰/۷۵۶	۳۱/۰۴
۹	برگ: شکل دندان	کد	۲	۵	۳/۸۷۲۷	۱/۳۸۸۵	۱/۹۲۸	۳۵/۸۵
۱۰	جرم حجمی حبه	کد	۲	۵	۳/۱۶۳۶	۰/۶۸۷۵۵	۰/۴۷۳	۲۱/۷۳
۱۱	طول رگ برگ	سانتی متر	۷/۵	۱۵/۵	۱۲/۲۷۳	۱/۶۷۰۹۵	۲/۷۹۲	۱۳/۶۱
۱۲	طول رگ برگ	سانتی متر	۷/۵	۱۴/۳	۱۱/۰۱۶۴	۱/۷۱۹۲۶	۲/۹۵۶	۱۵/۶۱
۱۳	طول رگ برگ	سانتی متر	۴/۵	۱۱/۳	۷/۹۶	۱/۴۱۸۲۱	۲/۰۱۱	۱۷/۸۲
۱۴	زاویه برگ	درجه	۳۱	۶۵	۴۷/۱۶۳۶	۶/۷۵۹۸	۴۵/۶۹۵	۱۴/۳۳
۱۵	زاویه برگ	درجه	۲۵	۶۶	۴۹/۲۷۲۷	۸/۶۵۶۹۵	۷۴/۹۴۳	۱۷/۵۷
۱۶	زاویه برگ	درجه	۱۶/۵	۲۱۲	۱۶۴/۵۷۲۷	۲۸/۹۸۵۰۶	۱۳۴/۸۴۰	۱۷/۶۱
۱۷	طول حبه	میلی متر	۱۲/۳۲	۳۱/۸۵	۲۱/۸۳۱۳	۴/۷۱۶۷۰	۲۲/۲۴۸	۲۱/۶۱
۱۸	عرض حبه	میلی متر	۱۰/۵۵	۲۳/۴۵	۱۷/۲۳۵۶	۲/۵۸۸	۶/۶۹۸	۱۵/۰۲
۱۹	طول خوشه	سانتی متر	۶	۲۵	۱۷/۴	۴/۵۷۶۹۱	۲۰/۹۴۸	۲۶/۳۰
۲۰	عرض خوشه	سانتی متر	۳/۹	۱۷	۱۱/۰۰۹۱	۳/۰۶۵۲۳	۹/۳۹۶	۲۷/۸۴
۲۱	طول دم میوه	سانتی متر	۱/۳	۸	۳/۶۸۵۵	۱/۵۸۱۸۹	۲/۵۰۲	۴۲/۹۲
۲۲	تراکم خوشه	کد	۱	۳	۲/۳۲۷۳	۰/۷۹۴۷۶	۰/۶۳۲	۳۴/۱۵
۲۳	شکل حبه	کد	۱	۸	۳/۵۸۱۸	۱/۷۸۱۵	۳/۱۷۴	۴۹/۷۴
۲۴	رنگ پوست	کد	۱	۱۱	۳/۷۰۹۱	۲/۹۷۹۳۹	۸/۸۷۷	۸۰/۲۳
۲۵	رنگ گوشت	کد	۱	۸	۳/۶۳۶۴	۲/۰۱۲۵۹	۴/۰۵۱	۵۵/۳۵
۲۶	بذر	کد	۱	۲	۱/۰۱۸۲	۰/۱۳۴۸۴	۰/۰۱۸	۱۳/۲۴

۱-۱-۴- ضریب همبستگی بین صفات

ضرایب همبستگی، که روابط خطی ساده بین صفات را اندازه گیری می کند، اطلاعاتی را درباره صفات مختلف در اختیار قرار می دهند (Bhat, 1980) و معیاری از ارتباط بین صفات بوده و می تواند به عنوان شاخص های گزینشی مهم مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در شناسایی صفاتی که در برنامه گزینشی دارای اهمیت ناچیز یا فاقد اهمیت می باشند مفید هستند (خورشید و همکاران، ۱۳۷۹).

۱-۱-۴- ضریب همبستگی پیرسون بین صفات کمی

ضریب همبستگی پیرسون، به منظور تعیین میزان رابطه، نوع و جهت تعیین رابطه‌ی بین دو متغیر فاصله‌ای یا نسبی و یا یک متغیر فاصله‌ای و یک متغیر نسبی به کار برده می‌شود. براساس نتایج به-دست آمده از جدول (۴-۲)، همبستگی معنادار بین متغیرهای مربوط به رشد رویشی و صفات دیگر وجود داشت. بین صفت طول رگبرگ و زاویه برگ رابطه معنادار و همبستگی بسیار بالایی در سطح ۱ درصد وجود دارد. بین صفت زاویه برگ (AL1 و AL2) با طول رگبرگ (LV1، LV2 و LV3) همبستگی منفی و رابطه غیرمعنی‌داری مشاهده شد. زاویه برگ (AL3) همبستگی بسیار بالایی و رابطه بسیار معنی‌داری در سطح ۱ درصد با طول رگبرگ (LV1، LV2 و LV3) داشت ولی با زاویه برگ (AL1) همبستگی منفی و رابطه معنی‌دار در سطح ۱ درصد داشت. صفت عرض حبه (شکل ۴-۳) در سطح ۱ درصد (۰/۴۵) و با طول حبه همبستگی مثبت را نشان داد. طول خوشه با زاویه برگ و عرض حبه در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شد. رسولی و همکاران (۱۳۹۳) همبستگی مثبت و معنی‌داری بین قدرت رشد بوته با اندازه خوشه، تراکم خوشه و تراکم حبه در خوشه را گزارش دادند ولی طول حبه با عرض حبه رابطه منفی و معنی‌دار داشت که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت داشت. به-طور کلی اگر همبستگی مثبتی بین دو صفت وجود داشته باشد برنامه اصلاحی برای یک گیاه راحت‌تر صورت می‌گیرد. همچنین صفت عرض خوشه با طول دم‌برگ (۰/۲۷) و با زاویه برگ (۰/۳۲) و عرض حبه (۰/۲۹) در سطح ۵ درصد معنی‌دار شدند و با طول خوشه (۰/۸۵) در سطح ۱ درصد معنی‌دار و همبستگی مثبتی را از خود نشان دادند. صفت طول دم‌میوه (۰/۳۳) در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد در صورتی که با زاویه برگ (AL1 و AL2) رابطه غیرمعنی‌دار و همبستگی منفی را ایجاد کرد. رنگ پوست و بذر نیز با برخی صفات مورد مطالعه رابطه غیرمعنی‌دار و همبستگی منفی از خود نشان دادند. در این بین رابطه خطی بین صفت بذر و عرض خوشه وجود نداشت. برخی از این نتایج با یافته‌های دیگر پژوهشگران مبنی بر وجود ارتباط و همبستگی بین صفات مختلف رویشی و میوه انگور با یکدیگر، مطابقت داشت (Ekhvaia and Akhalkatsi, 2010).



شکل ۳-۴ تنوع رنگ و شکل در برش طولی حبه ۵۵ واریته‌های انگور مورد مطالعه در این تحقیق

جدول ۴-۲- ضریب همبستگی پیرسون بین صفات مورد بررسی در بین ۵۵ واریته انگور

	LL	LV1	LV2	LV3	AL1	AL2	AL3	Gl	Ga	Bl	Ba	Fs	Gb	S
LL	۱													
LV1	۰/۱۷	۱												
LV2	۰/۰۷	۰/۷۶**	۱											
LV3	۰/۰۶	۰/۵۳**	۰/۸۳**	۱										
AL1	-۰/۱۸	-۰/۱۹	-۰/۰۹۶	-۰/۰۵۴	۱									
AL2	-۰/۰۹	-۰/۲۷	-۰/۲۸	-۰/۲۰۴	-۰/۱۶۳	۱								
AL3	۰/۰۹	۰/۳۹**	۰/۳۹۱**	۰/۳۱۲*	-۰/۴۷۱**	-۰/۵۴	۱							
Gl	-۰/۴۰	۰/۱۹	۰/۲۰	۰/۲۳	۰/۰۳	-۰/۱۵	۰/۱۷۷	۱						
Ga	-۰/۰۲	۰/۱۴	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۰۲	-۰/۲۵	-۰/۱۱	۰/۴۵**	۱					
Bl	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۳	۰/۱۳	-۰/۲۰	-۰/۰۸	۰/۳۶**	۰/۲۴۳	۰/۳۰*	1				
Ba	۰/۲۷*	۰/۲۳	۰/۱۶	۰/۱۴	-۰/۱۶	-۰/۱۳	-۰/۳۲*	۰/۲۳۴	۰/۲۹*	۰/۸۵**	۱			
Fs	۰/۲۲	۰/۱۸۸	۰/۲۴۶	۰/۳۳*	-۰/۰۶۲	-۰/۰۳۶	۰/۱۳۶	۰/۱۹۷	۰/۱۵	۰/۱۶۴	۰/۱۸۶	۱		
Gb	-۰/۱۴	۰/۰۸۱	۰/۰۶	۰/۰۶۸	-۰/۰۷۴	-۰/۱۲۷	۰/۱۸۳	-۰/۰۰۶	۰/۰۵۷	-۰/۰۵۱	۰/۰۳۴	-۰/۲۱۵	۱	
S	-۰/۰۵	-۰/۱۴۶	-۰/۱۲۱	-۰/۱۹	-۰/۰۶۴	۰/۰۷۵	۰/۰۰۲	-۰/۱۸	-۰/۱۳۳	۰/۱۰۸	۰/۰۰	۰/۱۱۴	-۰/۰۳۳	۱

* و ** معنی دار به ترتیب در سطح ۵٪ و ۱٪ و ضرایب بدون علامت غیرمعنی دار هستند.

۲-۱-۱-۴- ضریب همبستگی اسپیرمن بین صفات کیفی

ضریب همبستگی اسپیرمن صورتی از ضریب همبستگی پیرسون است و زمانی به کار برده می شود که نمره ها رتبه بندی شده باشند یا به جای اعداد، رتبه های آن ها در دست باشد. با توجه به نتایج ثبت شده صفت آنتوسیانین دمبرگ همبستگی قوی و بسیار بالایی و در سطح ۱ درصد با صفت آنتوسیانین گره دارد. آنتوسیانین رگبرگ همبستگی مثبت و متوسطی در سطح ۵ درصد با صفات آنتوسیانین گره و دمبرگ از خود نشان داد. شکل برگ با آنتوسیانین دمبرگ همبستگی و شکل دندانه با عمق بریدگی برگ در جهت منفی و در سطح ۱ درصد معنی دار شد. هم چنین شکل برگ با تراکم خوشه همبستگی متوسط و در جهت مثبت داشت. صفت رنگ گوشت با آنتوسیانین گره و آنتوسیانین دمبرگ رابطه مستقیم و همبستگی مثبت در سطح ۵ و ۱ درصد به وجود آورد ولی با شکل برگ رابطه معکوس در سطح ۵ درصد از خود نشان داد (جدول ۴-۳). در مطالعات دیگری هم صفت

آنتوسیانین تنوع بین ارقام را نشان داد و تنوع بین ارقام انگور با شاخص‌های مورفولوژیکی مشخص شد (Singh, A. et al. 2019).

جدول ۴-۳- ضریب همبستگی اسپیرمن بین صفات مورد بررسی در بین ۵۵ واریته انگور

	Ag	As	Al	Sl	Ol	Cl	St	Gd	H	Gs	Gf
Ag	۱										
As	۰/۸۱۶***	۱									
Al	۰/۳۲۹*	۰/۲۹۴*	۱								
Sl	-۰/۱۳۵	-۰/۳۰۲*	-۰/۰۶۸	۱							
Ol	-۰/۰۶۸	-۰/۰۶۶	-۰/۱۱۷	-۰/۰۲۷	۱						
Cl	-۰/۰۹۱	۰/۰۷۳	۰/۰۸۶	۰/۰۳۶	۰/۰۷۵	۱					
St	۰/۰۹۹	۰/۰۰۳	-۰/۱۸۹	۰/۰۳۳	۰/۰۱۶	۰/۳۲۹*	۱				
Gd	۰/۱۲۳	۰/۰۵۴	۰/۲۶	۰/۰۱	-۰/۲۴۸	۰/۱۱۸	-۰/۱۲	۱			
H	-۰/۹۲	-۰/۱۰۶	-۰/۲۰۷	-۰/۰۰۴	-۰/۱۰۵	-۰/۰۰۱	۰/۱۶۹	۰/۰۲۸	۱		
Gs	۰/۱۵۹	۰/۱۹۶	۰/۱۰۶	-۰/۱۰۳	-۰/۰۱۴	-۰/۰۷۲	-۰/۱۴۹	۰/۳۳۸*	-۰/۱۷۵	۱	
Gf	۰/۲۶۹*	۰/۳۵۰***	۰/۱۰۷	۰/۲۷۴*	۰/۱۲۵	-۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	-۰/۱۴۷	-۰/۲۰۱	۰/۱۰۴	۱

* و ** معنی‌دار به ترتیب در سطح ۵٪ و ۱٪ و ضرایب بدون علامت غیرمعنی‌دار هستند.

۲-۱-۴- تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژی

تجزیه خوشه‌ای تکنیک آماری چند متغیره‌ای است که طی آن به طور هم‌زمان اندازه‌گیری‌های چندگانه که براساس میزان تشابه (Similarity) صورت گرفته، نمونه‌ها گروه‌بندی شدند و سپس نمونه‌های مشابه در یک خوشه قرار می‌گیرند. به این ترتیب، در تجزیه خوشه‌ای افراد در خوشه بیشترین تشابه را باهم دارند و به لحاظ ژنتیکی قرابت بیشتری را باهم دارند.

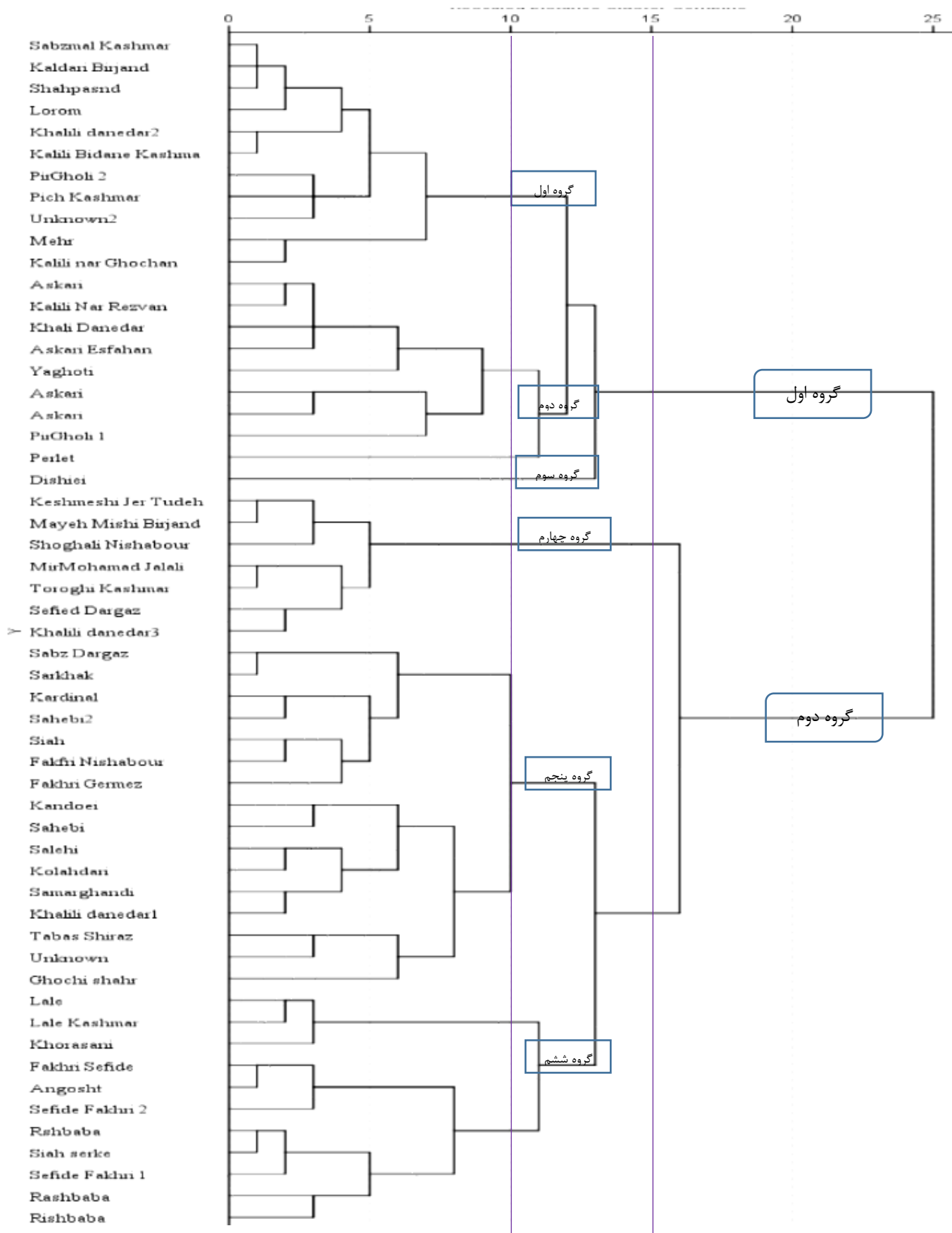
در این مطالعه گروه‌بندی ۵۵ واریته انگور با استفاده از کلیه صفات مورد بررسی به روش وارد صورت گرفت. به‌طور کلی ارقام به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. کاهش فاصله روی مقیاس کلاستر از ۱۵

به ۱۰، ژنوتیپ‌ها و ارقام به ۶ گروه تقسیم‌بندی شدند (شکل ۴-۱). گروه اول شامل سبزمال کاشمر، کالدري بیرجند، شاه‌پسند، لوروم، خلیلی دانه‌دار ۲، خلیلی بی‌دانه کاشمر، پیرقلی ۲، پیچ‌کاشمر، بی‌نام ۲، مهر و خلیلی نر قوچان بود که قرابت نزدیکی باهم داشتند و در کنار هم در یک گروه قرار گرفتند. این گروه در صفاتی هم‌چون آنتوسیانین رگبرگ، تعداد لپ، شکل دندانه، جرم حجمی، طول رگبرگ و طول حبه به هم نزدیک بودند در حالی که رقم سبزمال کاشمر از نظر شکل دندانه و ارقام لوروم و خلیلی نر قوچان از نظر جرم حجمی و طول دم‌برگ در فاصله دورتری نسبت به سایر ارقام قرار داشتند. هم‌چنین رقم لوروم از نظر طول حبه فاصله نسبتاً زیادی با سایر ارقام گروه نشان داد.

گروه دوم شامل عسکری ۱، خلیلی نر رضوان، خلیلی دانه‌دار، عسکری اصفهانی، یاقوتی، عسکری ۲، عسکری ۳، پیرقلی ۱ و پرلت بود. رسولی و همکاران (۱۳۹۳) قرابت ژنتیکی بین صفات مورفولوژی را در ارقام پرلت، عسکری و یاقوتی تایید کردند. این گروه از نظر آنتوسیانین و طول دم‌برگ، شکل دندانه، زاویه برگ (AL2) و تراکم خوشه به هم نزدیک یا مشابه بودند ولی ارقام پیرقلی ۱ از نظر آنتوسیانین گره، عسکری ۱ از نظر طول دم‌برگ، عسکری ۲ و خلیلی دانه‌دار از نظر شکل دندانه، عسکری ۱ از نظر زاویه برگ (AL2) و رقم پرلت از نظر تراکم خوشه نسبت به سایر ارقام فاصله داشتند.

رقم دیشویی به دلیل بالا بودن آنتوسیانین به تنهایی در گروه سوم جای گرفت. گروه چهارم شامل کشمش جرتوده، مایه میشی بیرجندی، شغالی نیشابور، میرمحمد جلالی، ترقی کاشمر، سفید درگز و خلیلی دانه‌دار ۳ بودند. از نظر صفات جرم حجمی، طول رگبرگ، طول و عرض حبه، طول خوشه، رنگ پوست میوه نسبت به هم شباهت یا فاصله نزدیکی داشتند. در حالی که ارقام خلیلی دانه‌دار ۳ و مایه میشی بیرجند از نظر جرم حجمی، رقم کشمش جرتوده از نظر طول حبه، رقم خلیلی دانه‌دار ۳ از نظر عرض حبه و طول خوشه و رقم کشمش جرتوده و مایه میشی و شغالی نیشابور از نظر رنگ پوست در فاصله بیشتری قرار داشتند.

در گروه پنجم ژنوتیپ‌های زیادی قرار گرفتند. این گروه به دو زیر گروه تقسیم شد. زیر گروه اول شامل ارقام سبز درگز، سرخک، کاردینال، صاحبی ۱، سیاه، فخری نیشابور، فخری قرمز و زیر گروه دوم شامل ارقام کندوری، صاحبی ۲، صاحبی ۳، کلاه‌دری، سمرقندی و خلیلی دانه‌دار ۱، طبس شیراز، بی- نام و قوچی شهر می‌باشند. در زیر گروه دوم در صفت رنگ گوشت ارقام به هم شبیه هستند، اما رقم فخری قرمز از بقیه متمایز بود. از نظر تراکم خوشه این زیر گروه به هم شبیه هستند ولی ارقام زیر گروه اول، تراکم خوشه متنوع داشتند. به‌طور کلی ارقام گروه پنجم از نظر طول حبه به هم نزدیک اند ولی رقم فخری نیشابور در فاصله دورتری قرار گرفت. گروه آخر شامل لعل، لعل کاشمر، خراسانی، فخری سفید، انگشت، سفید فخری ۲، ریش‌بابا، سیاه سرکه، سفید فخری ۱، ریش‌بابا ۱ و ریش‌بابا ۲ بود. این گروه از نظر صفات آنتوسیانین، طول رگبرگ، طول خوشه و طول و عرض حبه فاصله نزدیکی به هم داشتند ولی رقم لعل کاشمر در فاصله دورتری نسبت به ارقام قرار داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که بین ژرم‌پلاسماهای انگور از نظر صفات مورفولوژیکی تنوع بالایی وجود دارد و تجزیه خوشه‌ای نشان داد، اگرچه ژرم‌پلاسماها از نظر جغرافیایی مناطق رشد متفاوتی دارند ولی از نظر رفتار رشد، بعضی از آن‌ها در یک گروه مشترک قرار می‌گیرند که با نتایج فتحعلی‌پور و همکاران (۱۳۹۲) در گیاه شوید همخوانی دارد. در تحقیق موسی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) تجزیه خوشه‌ای در فاصله ۵، ارقام را به چهار گروه تقسیم‌بندی کرد که رقم کشمش بی‌دانه قوچان در گروه جداگانه قرار گرفت. که تحقیق حاضر، رقم دیشویی در گروه سوم به‌طور جداگانه و مستقل گروه‌بندی شد. در یک تحقیق نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از صفات مورفولوژیکی و براساس فاصله اقلیدسی و به روش وارد نشان داد که ژنوتیپ‌های گلرنگ مورد بررسی دارای تنوع بالایی در صفات زراعی و مورفولوژیکی بودند که می‌توان از این پتانسیل برای اصلاح خصوصیات گلرنگ استفاده کرد (غلامی و همکاران، ۱۳۹۷).



شکل ۴-۴ دندروگرام ۵۵ واریته انگور براساس ۲۶ صفت مورفولوژیک

۳-۱-۴- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

با توجه به حجم وسیع داده‌های به دست آمده از ارزیابی صفات مختلف مورفولوژیکی در محدوده ژنوتیپ‌های مورد بررسی، با استفاده از تجزیه فاکتور، صفات مختلف می‌توانند در قالب فاکتورها یا مؤلفه‌های اصلی مورد بحث قرار گیرد که هر کدام چند صفت را شامل می‌شود. این توان پژوهش‌گر را برای کار روی تعداد فاکتور یا مؤلفه کمتری نسبت به تعداد زیادی صفت فراهم می‌نماید. جدول (۴-۴) نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را نشان می‌دهد. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل صفات مورد بررسی است و به‌صورت درصد بیان شده است. در این تجزیه ۹ مؤلفه مستقل توانستند مجموعاً ۷۳/۴۱ درصد واریانس کل را توجیه نمایند. تجزیه به عامل-ها، توصیفی از کوواریانس یا همبستگی بین چند متغیر اندازه‌گیری شده توسط تعداد کمی عامل یا متغیر پنهانی است (Guertin and Bailey, 1982). نتایج تجزیه به‌عامل‌ها بیانگر نحوه قرار گرفتن برخی صفات مهم بررسی شده در عامل‌های مختلف با ضرایب عاملی آن‌ها است.

عامل اول ۱۱/۸۱۴ درصد از تغییرات متغیرها را توضیح می‌دهد و بزرگ‌ترین ضرایب عاملی مثبت آن متعلق به طول رگبرگ (LV1, LV2, LV3) می‌باشد.

عامل دوم ۱۰/۲۰۹ درصد از تغییرات داده‌ها را شامل می‌شود در این عامل آنتوسیانین گره، آنتوسیانین دم‌برگ و آنتوسیانین رگبرگ دارای بزرگ‌ترین ضرایب عاملی می‌باشند. همان‌طور که مشاهده می‌شود تمام این صفات با ضرایب مثبت در مدل قرار گرفته‌اند و سه صفت همبستگی مثبت و معنی‌داری دارند.

عامل سوم ۱۰/۲۰۲ درصد از تغییرات متغیرها را توجیه می‌کند و بزرگ‌ترین ضرایب عاملی مثبت آن متعلق به طول خوشه و عرض خوشه می‌باشد. در تحقیق هاشم‌زهی و همکاران (۱۳۹۰) صفاتی مثل عرض خوشه و وزن خوشه با ۲۴/۹۷ درصد از واریانس صفات به‌عنوان عامل دوم در انگور گزارش کردند.

عامل چهارم ۸/۸۳۲ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه می‌کند. این عامل برای صفات هم‌پوشانی بریدگی در برگ، زاویه برگ (AL1 و AL2) دارای ضریب مثبت و معنی‌دار می‌باشند. ضریب عاملی برای (AL3) منفی است.

عامل پنجم ۷/۳۷۲ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه می‌کند. این عامل برای صفت زاویه برگ (AL2) و طول دم‌میوه دارای ضریب مثبت و معنی‌داری می‌باشد. صفت طول حبه دارای ضریب منفی و معنی‌دار می‌باشد.

عامل ششم ۶/۸۴۵ درصد از واریانس کل را توجیه نمود. صفات جرم حجمی حبه و بذریه دارای ضریب عاملی مثبت و معنی‌دار می‌باشند.

عامل هفتم ۶/۶۳۲ درصد از تغییرات متغیرها را نشان می‌دهد. صفت طول دمبرگ در جهت منفی و معنی‌دار براین عامل موثر بود. و طول حبه همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان داد.

بررسی ضرایب هم‌بستگی در عامل هشتم ۶/۰۱ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند به گونه‌ای که صفاتی نظیر عرض و شکل حبه ضرایب عاملی مثبت و همبستگی معنی‌داری را نشان دادند.

عامل نهم با ۵/۵۰۲ درصد از واریانس کل را توجیه نمود. صفاتی همچون شکل دندانه و جرم حجمی حبه همبستگی مثبت و معناداری را نشان دادند و صفت رنگ گوشت همبستگی منفی معنی‌داری را نشان داد.

تجزیه و تحلیل عاملی صفات مورفولوژی انگور توسط رسولی و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد که سه عامل اول نقش مهمی را در این تجزیه داشتند به طوری که طول دم‌میوه، وزن ۱۰۰ حبه و طول حبه را به عنوان عامل اول با ۳۱/۸۶ درصد از واریانس توجیه کردند. نتایج تجزیه به عامل‌ها در آزمایش رفیعی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند صفات مورد بررسی در ۱۳ عامل اصلی قرار گرفتند و در مجموع نزدیک به ۸۵/۳۸ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. ۵ عامل اول که بیشتر مربوط به

صفات میوه و برگ بود. همچنین صفات کمی مربوط به میوه از جمله ویژگی‌های حبه و بذر نقش بیشتری در توجیه واریانس انگور در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود.

جدول ۴-۴- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۹ مؤلفه اصلی برای صفات مورفولوژیکی

مقادیر اولیه			
شماره	مجموع	درصد واریانس	درصد تجمعی
۱	۲/۹۵۳	۱۱/۸۱۴	۱۱/۸۱۴
۲	۲/۵۵۲	۱۰/۲۰۹	۲۲/۰۲۳
۳	۲/۵۵	۱۰/۲۰۲	۳۲/۲۲۴
۴	۲/۲۰۸	۸/۸۳۲	۴۱/۵۵۶
۵	۱/۸۴۳	۷/۳۷۲	۴۸/۴۲۸
۶	۱/۷۱۱	۶/۸۴۵	۵۵/۲۷۳
۷	۱/۶۵۸	۶/۶۳۲	۶۱/۹۰۴
۸	۱/۵۰۲	۶/۰۱	۶۷/۹۱۴
۹	۱/۳۷۶	۵/۵۰۲	۷۳/۴۱۷

جدول ۴-۵ نتایج آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۲۵ صفت مورفولوژیکی در ۵۵ واریته انگور

مؤلفه‌ها									صفات
۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	
-۰/۱۱۱	۰/۸۸۴	-۰/۰۲۲	۰/۰۵۴	۰/۱۰۵	-۰/۰۴۶	-۰/۱۱	۰/۰۴۳	-۰/۰۳۵	Ag
-۰/۰۹۵	۰/۸۴۶	-۰/۰۶۸	-۰/۰۲۸	-۰/۰۷۹	-۰/۰۵۴	-۰/۱۸۶	-۰/۰۴۴	-۰/۲۷۴	As
۰/۲۹۴	۰/۵۸۳	۰/۰۸۷	۰/۱۹۹	-۰/۱۹۹	۰/۳۱۵	۰/۳۶۱	-۰/۰۳۴	۰/۲۱	Al
۰/۰۹۶	۰/۱۱۲	۰/۲۵۷	۰/۰۶۱	۰/۰۰۱	-۰/۰۱۴	-۰/۸۴۲	۰/۰۰۲	۰/۱۶۵	LL
-۰/۰۲۱	-۰/۱۴۵	۰/۱۸۳	-۰/۱۳۴	-۰/۰۴۲	-۰/۱۱۹	-۰/۰۶۴	۰/۰۴۶	۰/۷۷۴	Sl
-۰/۰۴۲	-۰/۲۷۴	۰/۰۲۲	۰/۷۳۶	-۰/۱۵۴	-۰/۲۹۶	-۰/۰۵۲	۰/۰۲۸	-۰/۱۱	Ol
۰/۰۴۸	-۰/۱۱۸	-۰/۰۸۷	۰/۰۴۸	-۰/۷۵۴	۰/۰۶۱	-۰/۱۰۵	-۰/۰۱۸	۰/۰۴۱	Cl
۰/۳۶۳	-۰/۰۱۶	-۰/۰۵۷	۰/۱۳۱	۰/۵۷	۰/۰۸۹	۰/۱۵۹	-۰/۱۹۹	۰/۰۴۷	St
۰/۱۷۲	۰/۱۵۷	-۰/۲۰۶	-۰/۱۵۲	-۰/۰۶۳	۰/۶۹۱	-۰/۰۸۶	۰/۲۴۸	۰/۹۷	Gd
۰/۷۷۱	۰/۰۴۳	۰/۱۲۹	-۰/۲۵۳	-۰/۰۱	-۰/۰۳۹	-۰/۰۶۲	۰/۰۱۲	-۰/۰۱۵	Lv1
۰/۹۳۶	-۰/۰۶۶	۰/۰۴۲	-۰/۱۲۶	-۰/۰۲۷	۰/۰۱۲	۰/۰۳۴	۰/۰۰۱	-۰/۰۲۳	Lv2
۰/۸۸۴	-۰/۰۹۵	۰/۰۴۲	۰/۰۰۲	-۰/۰۰۹	-۰/۰۳۲	۰/۰۳	-۰/۰۰۵	۰/۰۴۲	Lv3
-۰/۰۴۷	۰/۱۷۳	-۰/۲۰۵	۰/۵۴۱	۰/۱۹۴	-۰/۳۴	۰/۰۹۶	۰/۱۰۷	-۰/۰۲۷	Al1
-۰/۲۱۳	۰/۱	۰/۰۹۴	۰/۷۰۷	۰/۰۶۶	۰/۳۰۳	۰/۱۱۲	-۰/۳	-۰/۰۶۴	Al2
۰/۳۲۵	-۰/۲۰۶	۰/۲۶۴	-۰/۷۳۴	-۰/۰۳۶	-۰/۰۳۲	۰/۰۳۲	-۰/۲۰۶	-۰/۱۰۴	Al3
۰/۲۱۳	-۰/۳۵۴	۰/۱۵	-۰/۰۱۴	۰/۲۱۱	-۰/۴۲۳	۰/۵۹۸	۰/۱۱۵	۰/۱۵۱	Gl
۰/۱۳۵	-۰/۱۰۴	۰/۲۲۴	۰/۰۵۶	۰/۰۹۸	-۰/۲۱۶	۰/۲۱۱	۰/۷۴۶	۰/۱۳۵	Ga
۰/۰۷۸	-۰/۰۶۳	۰/۸۹	-۰/۱۶۵	۰/۱۴۹	۰/۰۴۶	۰/۰۷۷	۰/۱۱۹	۰/۱۵۴	Bl
۰/۰۹۴	-۰/۰۷	۰/۸۸۲	-۰/۱۵۲	۰/۱۰۲	-۰/۱۳۷	-۰/۰۷	۰/۱۶۴	۰/۰۴۹	Ba
۰/۳۴۷	-۰/۳۲۱	۰/۰۵۵	۰/۰۱	۰/۶۹۶	۰/۰۵۶	-۰/۲۸۱	۰/۰۶۳	-۰/۰۰۳	Fs
-۰/۰۸۶	-۰/۱۲	-۰/۷۰۶	-۰/۱۶۱	۰/۲۳۱	-۰/۰۸۶	۰/۳۲۴	۰/۰۴۳	۰/۱۳۴	H
-۰/۱۳	۰/۰۸۳	۰/۰۶۵	۰/۰۰۸	-۰/۱۷۹	۰/۲۹۳	-۰/۱۳۵	۰/۷۶	-۰/۱۴۷	Gs
-۰/۰۱۲	-۰/۰۷۴	۰/۰۴۱	-۰/۲۵۵	-۰/۳۴۶	-۰/۰۱۵	-۰/۲۰۷	۰/۲۰۱	-۰/۴۶۲	Gb
.	۰/۳۸۶	۰/۲۸۳	۰/۰۴۸	۰/۱۵۹	-۰/۲۶۳	-۰/۱۸۶	-۰/۰۴۳	-۰/۵۰۲	Gf
-۰/۲۰۴	-۰/۲۱۶	۰/۱۲۱	-۰/۰۱۶	۰/۱۳	۰/۶۲۶	۰/۰۰۳	-۰/۱۰۶	-۰/۱۲	S

* صفات بالای ضریب ۰/۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شده‌اند

۱-۳-۴- تجزیه تری پلات صفات مورفولوژیکی

آزمون‌های پلات قادرند تصویری دو و یا سه بعدی ایجاد نمایند که هر یک از ابعاد آن‌ها یک یا چند عامل اصلی تاثیرگذار محسوب می‌شود. بنابراین پراکنش ژنوتیپ‌ها در محدوده این عوامل اصلی می‌تواند به تعیین بهتر فاصله ژنوتیپ‌ها و تفاوت بین آن‌ها کمک کند. به‌خصوص ژنوتیپ‌هایی که در

یک، دو یا سه عامل به صورت بسیار قوی یا ضعیف هستند در این پژوهش تجزیه تری پلات با استفاده از سه عامل اصلی که ۳۲/۲۲۵ درصد از سهم کل واریانس را به خود اختصاص داده بودند، انجام شد (شکل ۴-۲). پراکنش ارقام و ژنوتیپ‌ها براساس صفات مؤثر در عامل‌های اول، دوم و سوم به کار برده شد و تجمع در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن‌ها است. بنابراین براساس تجزیه تری-پلات ارقامی که در یک محدوده نزدیک به هم قرار دارند، از نظر صفات مؤثر در عامل‌های اول، دوم و سوم شباهت بیشتری نشان داده و در یک گروه قرار می‌گیرند. نتایج تجزیه تری پلات ارقام‌ها را در ۳ گروه ویژه و ۳ رقم مستقل قرار داد. گروه یک شامل ارقام لورم، ترقی کاشمر، شاه‌پسند، پیچ کاشمر، سبزمال کاشمر، میرمحمد جلالی، خلیلی دانه‌دار، ریش بابا، سیاه، سفید درگز، شغالی نیشابور، فخری نیشابور، خلیلی نر رضوان، عسکری اصفهانی، مهر، کشمش‌ی جر توده و کالدری بیرجند می‌باشد. این دسته دارای صفات مطلوب آنتوسیانین و طول و عرض خوشه می‌باشد. گروه دوم شامل عسکری، کاردینال، سمرقندی، خلیلی دانه‌دار ۳، خلیلی دانه‌دار ۱، ریش بابا، صالحی، صاحبی ۲، ریش بابا ۲، عسکری، کندویی، فخری قرمز، فخری سفید، انگشتی، پرلت، طبس شیراز، سبز درگز، خراسانی، یاقوتی، خلیلی بی‌دانه کاشمر می‌باشند. در این دسته برخی از ارقام نسبت به عامل اول قوی و برخی ارقام دیگر نسبت به عامل سوم در انتهای منفی قرار گرفتند. گروه سوم شامل سرخک، خلیلی دانه‌دار ۲، مایه میش بیرجند، پیرقلی ۲ و خلیلی نر قوچان بود. ارقام این گروه از نظر صفات قرار گرفته در عامل دوم قوی و از نظر صفات تشکیل دهنده عامل اول نسبتاً قوی هستند. ارقام دیشویی، پیرقلی ۱ و بی‌نام ۲ در هیچ‌کدام از گروه‌های فوق قرار نگرفتند. رقم دیشویی در منتهی‌الیه منفی عامل ۳ قرار گرفته است. رقم پیرقلی ۱ در وسط عامل‌های ۱ و ۲ قرار گرفته است و از نظر صفات رگبرگ و آنتوسیانین برتری نسبی دارد. همچنین رقم بی‌نام ۲ که در فاصله ۲+ تا ۳+ عامل دوم قرار گرفته است از نظر صفت آنتوسیانین برتری دارد.

آغازگر VVMD7 مشاهده گردید. نتایج مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۸۱) در چهار جفت آغازگر بر روی ۱۸ رقم انگور نشان داد که تعداد آلل‌های مشاهده شده در مورد مکان‌های مختلف از پنج آلل (مکان VVS4) تا ۱۳ آلل (مکان VVS2) متغیر بود. که تعداد کل آلل‌های مشاهده شده ۳۸ بود که متوسط تعداد آلل‌ها به ازای هر مکان ۹/۵ آلل بود. نتایج نشان داد که میانگین شاخص شانون در همه آغازگرها ۰/۱۱۵ بود. بیشترین مقدار این شاخص در آغازگر VVMD27 (۰/۷۵۹) و کمترین مقدار آن در آغازگر VVMD7 (۰/۷۴۰) مشاهده شد. مقدار هتروزیگوستی مورد انتظار و مشاهده شده با نشانگر SSR مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۴-۱) نشان داده شده است. میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار در جمعیت موجود ۰/۶۷۳ بود ولی هتروزیگوستی مشاهده شده در جفت آغازگرهای مورد استفاده بین ۰/۲۲۷ تا ۰/۹۵۵ در مکان ژنی اکثر آغازگرها متغیر بود. میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده ۰/۵۲۸ بود که تقریباً با هتروزیگوستی مورد انتظار برابر بود. محمدی و همکاران (۱۳۸۸) در آزمایش خود سطوح هتروزیگوستی مورد انتظار از ۶۵ درصد (مکان VVS4) تا ۸۹ درصد (مکان VVS2) تغییر داشت و میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار را ۸۱/۵ درصد گزارش دادند. سطوح هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار در مورد مکان‌های VVS2 و VVMD7 تقریباً یکسان بود. در مورد مکان‌های VVS4 و VVMD6 هتروزیگوستی کمتر از مورد انتظار مشاهده شد. بالا بودن تعداد ژنوتیپ‌های هموزیگوس در این مکان‌ها سبب کاهش هتروزیگوستی مشاهده شده در مقایسه با مورد انتظار در ۱۸ رقم انگور شد. شاخص مهم دیگری که در این مطالعه بررسی شد PIC یا محتوای اطلاعات چند شکل بود. در این تحقیق تمام پرایمرها ۱۰۰ درصد پلی‌مورفیسم را نشان دادند و بدین ترتیب همه جفت آغازگرها از بیشترین توانایی در ایجاد چند شکلی در بین ۲۲ ژنوتیپ مورد مطالعه برخوردار بودند.

تعداد آلل‌های تکثیر شده به ازای هر مکان ژنی تأثیر مستقیمی بر بازدهی آن مکان در تظاهر هتروزیگوستی، فراوانی ژنوتیپی و محتوای اطلاعات چند شکل دارد. به‌طوری‌که بالا بودن تعداد آلل‌های تکثیر شده در یک مکان سبب افزایش کارایی و میزان اطلاعات چند شکل دارد. بالا بودن تعداد

آل‌های تکثیر شده در یک مکان سبب افزایش کارایی و میزان اطلاع‌رسانی آن مکان برای تعیین تنوع ارقام می‌شود (Bowers et al, 1996). در تجزیه SSR امکان تعیین ژنوتیپ افراد براساس اندازه آل‌ها در مکان فراهم می‌شود. از آن‌جا که انگور دیپلوئید (2n) است، لذا در صورت هتروزیگوت بودن فرد، دو باند (دو آل) و برای افراد هموزیگوت یک باند در هر مکان ژنی مشاهده خواهد شد. در پژوهشی که توسط رضانی و همکاران (۱۳۸۶) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۱ ژنوتیپ انگور ایرانی و روسی و سه رقم بی‌دانه از کالیفرنیا (آمریکا)، از ۹ نشانگر ریزماهواره استفاده گردید، که نتایج آن‌ها نشان داد در هر جایگاه بین ۶ تا ۱۱ آل (میانگین ۸/۳ آل در هر جایگاه) مشاهده گردید. محتوای اطلاعات چند شکلی نشانگرها نیز بین ۰/۶۵ تا ۰/۸۸ متغیر بود. نشانگرهای استفاده شده در تمام ژنوتیپ‌ها چندشکلی بالایی را نشان دادند. دو جایگاه VVMD27 و SSRVrZAG47 چندشکلی یکسانی را نشان دادند که این احتمال می‌رود که این دو نشانگر در واقع یک جایگاه ریزماهواره را تکثیر نمایند. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی و تمایزات جغرافیایی ۶۰ نمونه نخود را با استفاده از صفات مورفولوژیک و ۱۴ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. نشانگرها سطح بالایی از چندشکلی را در ارقام مورد بررسی نشان دادند. میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها از ۰/۳۱ تا ۰/۸۹ متغیر بود، اغلب نشانگرها پلی-مورفیسم بالایی داشتند که بیانگر کارا بودن این نشانگرها در برآورد تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه بود (Ghaffari et al, 2014).

نتایج حاصل از تجزیه SSR نشان می‌دهد که بکارگیری نشانگرهای SSR با محتوای چند شکلی بالا، در مدیریت کلکسیون‌های ژرم‌پلاسما انگور بسیار مفید است. در مطالعه‌ای با استفاده از چهار مکان SSR، ۲۰ واریته انگور را از هم متمایز کردند. آن‌ها به این نتایج دست یافتند که نشانگرهای SSR به دلیل هم‌بارز بودن، سادگی در تجزیه و تکرارپذیری بالا جهت انجام تحقیقات شجره‌ای، ترسیم نقشه-های ژنتیکی بسیار مناسب هستند. هم‌چنین با استفاده از چهار جفت پرایمر SSR، ۳۹ نمونه انگور را از هم متمایز کردند. دقت بالای نشانگرهای SSR در کارهای بیولوژیکی مولکولی سبب شده تا آن‌ها را

جانشین خوبی برای RFLP بداند، چرا که نشانگرهای SSR از حساسیت بالایی برخوردارند و به کارگیری آنها ساده بوده و حتی قابل اتوماتیک شدن هستند (Ulanovsky et al, 2002).

در مطالعه‌ای روابط ژنتیکی ۲۹ ژنوتیپ انگور با شش نشانگر SSR بررسی شد. آغازگرها توانستند ۶۵ آلل مختلف ایجاد کنند و هتروزیگوستی مشاهده شده بین ۰/۴۸۳ تا ۰/۸۹۷ متغیر بود. نشانگرها توانستند تنوع بین ارقام را به خوبی نشان دهند. (Burçak Işçi, 2019).

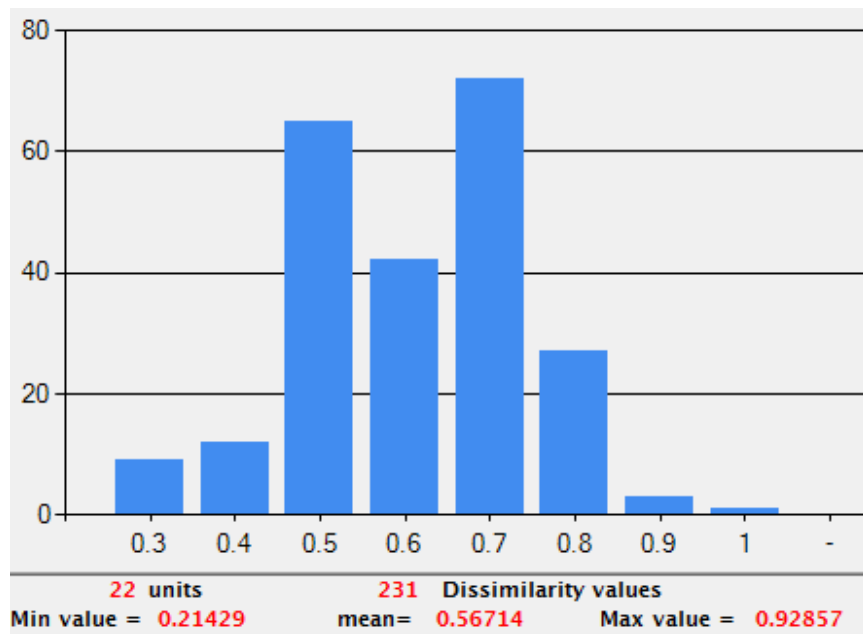
جدول ۴-۶- نتایج به دست آمده از آغازگرهای SSR در ۲۲ ژنوتیپ انگور

پلی مورفیسم	هتروزیگوستی مورد انتظار	هتروزیگوستی مشاهده شده	شاخص شانون	تعداد آلل‌های مؤثر	تعداد آلل‌های مختلف	تعداد ژنوتیپ
۱۰۰	۰/۶۷۶	۰/۳۶۴	۱/۲۸۰	۳/۰۸۳	۵	VrZAG79
۱۰۰	۰/۷۹۳	۰/۷۲۷	۱/۷۵۹	۴/۸۴۰	۷	VVMD27
۱۰۰	۰/۷۵۳	۰/۶۳۶	۱/۵۳۶	۴/۰۵۰	۶	VVMD28
۱۰۰	۰/۷۲۰	۰/۲۲۷	۱/۵۰۲	۳/۵۷۲	۶	VVMD32
۱۰۰	۰/۵۸۲	۰/۹۵۵	۰/۹۸۶	۲/۳۹۰	۴	VVMD
۱۰۰	۰/۴۷۸	۰/۵۰۰	۰/۷۴۰	۱/۹۱۷	۳	VVMD7
۱۰۰	۰/۷۰۴	۰/۳۱۸	۱/۴۴۱	۳/۳۷۳	۶	VVMD25
۱۰۰	۰/۶۷۶	۰/۵۰۰	۱/۳۷۸	۳/۰۸۳	۷	VVS2
۱۰۰	۰/۶۷۳	۰/۵۲۸	۱/۳۲۸	۳/۲۸۸	۵/۵۰۰	(میانگین)
۰/۰۰۰	۰/۰۳۵	۰/۰۸۴	۰/۱۱۵	۰/۳۲۳	۰/۵۵۰	SE

۱-۲-۴- ضریب عدم تشابه

بیشترین ضریب عدم تشابه در واقع بیانگر بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین ضریب عدم تشابه نشان از شباهت بیشترین این ژنوتیپ‌هاست. ضریب عدم تشابه در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش با استفاده از مجموع داده‌های مولکولی نشانگر SSR با میانگین (۰/۵۶) که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی متوسط بین واریته‌های مورد آزمایش بود (شکل ۴-۱). واریته‌ها بین محدوده ۰/۳ تا ۱ قرار گرفتند. بیشترین ضریب عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های خلیلی دانه‌دار با کاردینال (۰/۹۳)، فخری سفید با صاحبی (۰/۸۸)، کاردینال با لعل (۰/۸۶)، سفید فخری ۱ با ریش‌بابا (۰/۸۱) می‌باشد. این ژنوتیپ‌ها نسبت به هم فاصله

ژنتیکی بالایی دارند. می‌توان نتیجه گرفت که این ارقام در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در دورگ‌گیری و برنامه‌های اصلاحی انگور استفاده کرد. کمترین ضریب عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پرلت ۲ با پرلت ۱، پرلت ۲ با عسکری ۳، عسکری ۳ با عسکری ۲ با میانگین (۰/۲۱) و پرلت ۲ با عسکری ۲ (۰/۲۵) مشاهده گردید که نشان دهنده شبیه بودن ژنوتیپ‌های یاد شده به هم است (جدول ۴-۷).



شکل ۴-۶- نمودار میانگین فاصله ژنتیکی جاکارد بین ۲۲ رقم انگور حاصل از ۸ جفت پرایمر SSR

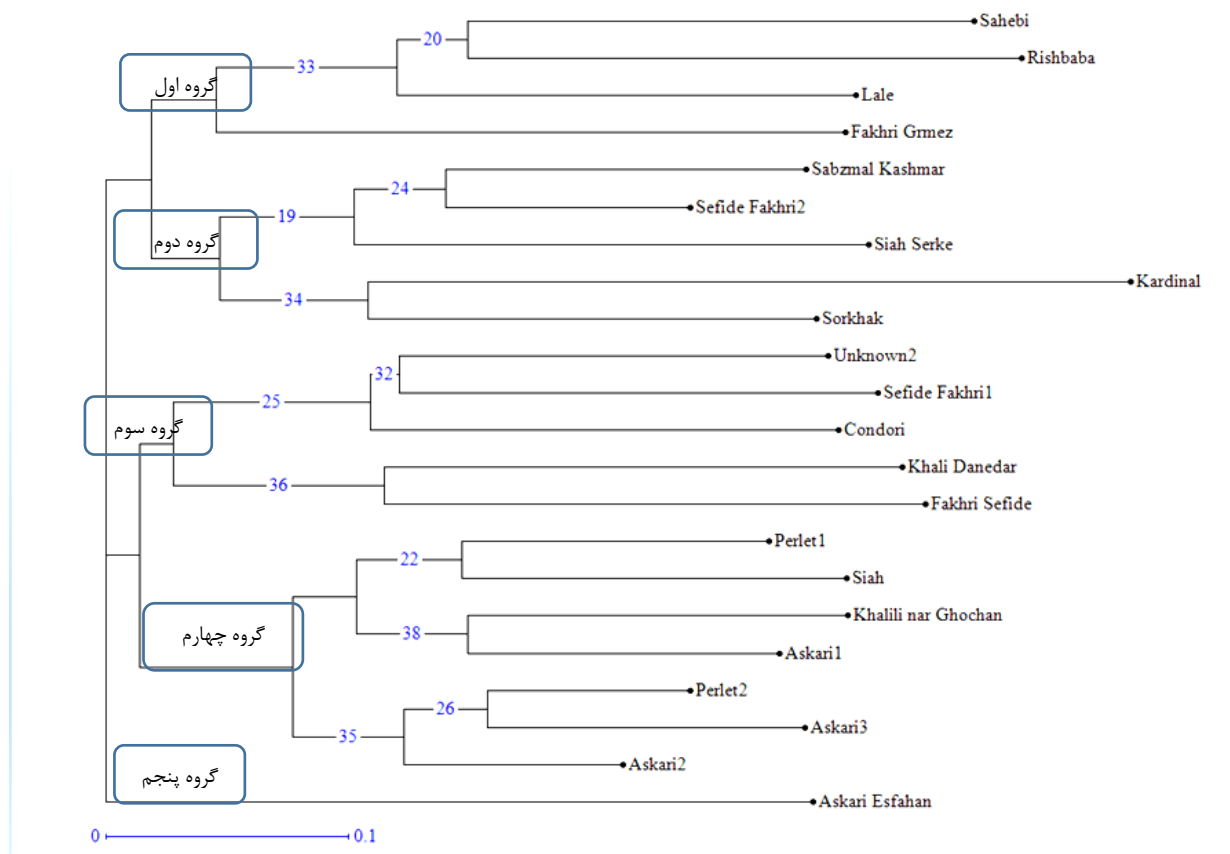
جدول ۴-۷- ماتریس عدم تشابه ۲۲ ژنوتیپ انگور بر اساس داده های ۸ مکان ژنی SSR

کد	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
۲	۰/۴۴																				
۳	۰/۴۴	۰/۴۴																			
۴	۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۴۴																		
۵	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۸۸	۰/۶۹																	
۶	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۶۹	۰/۵۰	۰/۳۱																
۷	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۶۳	۰/۵۰	۰/۶۳	۰/۳۱															
۸	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۶۹	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۲۵	۰/۴۴														
۹	۰/۸۱	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۶۳													
۱۰	۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۳۸												
۱۱	۰/۵۶	۰/۶۹	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۶۳											
۱۲	۰/۷۵	۰/۴۴	۰/۷۵	۰/۶۹	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶۳										
۱۳	۰/۷۱	۰/۸۶	۰/۷۹	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۴۳	۰/۷۱	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۵۰	۰/۹۳									
۱۴	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶۹	۰/۴۴	۰/۶۹	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۷۹								
۱۵	۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶۴	۰/۶۳	۰/۶۳							
۱۶	۰/۶۹	۰/۵۰	۰/۶۳	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۳۸	۰/۵۰	۰/۳۱	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۷۱	۰/۴۴	۰/۳۱						
۱۷	۰/۴۶	۰/۷۱	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۷۱	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۴۳	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۲۹	۰/۳۶					
۱۸	۰/۷۱	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۷۹	۰/۷۱	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۴۳	۰/۵۰	۰/۷۹	۰/۵۷	۰/۳۶	۰/۲۱	۰/۴۳				
۱۹	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۴۳	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۳	۰/۳۶			
۲۰	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۵۰	۰/۲۹	۰/۴۳	۰/۲۹	۰/۴۳	۰/۲۹		
۲۱	۰/۶۴	۰/۵۰	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۴۳	۰/۳۶	۰/۶۴	۰/۴۳	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۴۳	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۶۴	۰/۵۰	
۲۲	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۷۹	۰/۴۴	۰/۳۸	۰/۲۵	۰/۵۰	۰/۲۱	۰/۳۶	۰/۲۱	۰/۵۰

۲-۲-۴ تجزیه خوشه‌ای داده‌های SSR

بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه‌ی خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها به چهار گروه مشخص گروه‌بندی شدند و رقم عسکری اصفهان به صورت جداگانه در یک خوشه قرار گرفت. نمودار حاصل با الگوریتم UPGMA ترسیم شد. نتایج دندروگرام نشان داد که وارسته کاردینال در فاصله ژنتیکی زیادی نسبت به سایر وارسته‌ها قرار می‌گیرد (شکل ۴-۳). در گروه یک، ژنوتیپ‌های صاحبی، ریش‌بابا، لعل، فخری قرمز قرار گرفتند و گروه دوم شامل سبزال کاشمر، سفید فخری ۲، کاردینال و سرخک بودند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های بی‌نام ۲، سفید فخری ۱، کندوری، خلیلی‌دانه‌دار و فخری سفید می‌باشد. ژنوتیپ‌های پرلت ۱، سیاه، خلیلی نرقوچان، عسگری ۱، پرلت ۲، عسگری ۳ و عسگری ۲ در گروه چهارم جای گرفتند. ژنوتیپ عسگری اصفهانی به‌تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت. در تحقیقی که در

ترکیه روی ۲۹ ژنوتیپ انگور انجام شد رقم Buca Razakısı به تنهایی در یک گروه قرار گرفت (Burçak Işçi. 2019).



شکل ۴-۷- دندروگرام حاصل از گروه‌بندی ۲۲ واریته انگور بر مبنای بخش مولکولی

۳-۲-۴- کلید شناسایی بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر SSR

آنالیز مکان ژنی ژنوتیپ‌های انگور براساس ۸ مکان ژنی میکروساتلایت در جدول (۴-۲) ارائه شده است که از طریق این داده‌ها به راحتی می‌توان ژنوتیپ‌ها را در جمعیت‌های مختلف شناسایی کرد. کلید شناسایی در ۲۲ ژنوتیپ به طور کامل نشان داده شده است. در نتیجه استفاده از ۸ جفت نشانگر SSR جهت تکثیر DNA، آغازگر VrzAG79 توانست دو باند را در ژنوتیپ‌های سفید فخری ۱، سرخک، خلیلی دانه‌دار، عسکری، خلیلی نر قوچان، عسکری و کندویی نشان دهند و از ژنوتیپ‌های

دیگر تنها یک باند حاصل گردید. ارقام فخری قرمز، سیاه سرکه، سرخک، کاردینال، عسکری اصفهانی، سیاه و کندویی با به وجود آوردن یک باند، توسط جفت پرایمر VVMD27 و ژنوتیپ‌های دیگر دو باند از خود نشان دادند. همچنین جفت نشانگر VVMD28 در ژنوتیپ‌های ریش‌بابا، لعل، فخری سفید، سفید فخری ۲، سیاه سرکه، سبزمال کاشمر، بی‌نام ۲، خلیلی‌دانه‌دار، عسکری اصفهانی، عسکری، عسکری، کندویی و پرلت تک باند و در ژنوتیپ‌های دیگر دو باند را از خود نشان دادند. جفت آغازگر VMD32 توانست دو باند را در ژنوتیپ‌های ریش‌بابا، سیاه سرکه، عسکری، پرلت ۱ و ۲ را به‌وجود آورد. همچنین در جفت آغازگرهای VVMD و VVMD7 تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های دو باند را از خود نشان دادند که در این بین در پرایمر VVMD تنها ژنوتیپ فخری سفید تک باند را از خود نشان داد. ارقام لعل، صاحبی، فخری قرمز، سیاه سرکه، سفید فخری ۱، بی‌نام ۲ و سیاه توانستند دو باند را توسط جفت آغازگر VVMD25 به وجود آورند. جفت پرایمر VVS2 در ژنوتیپ‌های ریش‌بابا، لعل، فخری سفید، سفید فخری ۲، سیاه سرکه، سبزمال کاشمر، بی‌نام ۲، خلیلی‌دانه‌دار، عسکری اصفهان، عسکری و پرلت دو باند را ایجاد کرد و در ارقام صاحبی، فخری قرمز، سفید فخری ۱، سرخک و عسکری تک باند نشان داده شد اما در ژنوتیپ‌های کاردینال، خلیلی نر قوچان، عسکری، سیاه، پرلت و کندوری هیچ بانندی نشان داده نشد.

جدول ۴-۸ مکان ژنی ژنوتیپ‌های انگور براساس ۸ مکان ژنی SSR

VVS2	VVMD25	VVMD7	VVMD	VVMD32	VVMD28	VVMD27	VrZAG79	
۲۵۰-۲۷۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۷۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۶۰-۲۶۰	ریش بابا
۲۵۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۶۵	۲۵۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۵۰-۲۶۰	۱۹۰-۲۱۰	۲۶۰-۲۶۰	لعل
۲۵۰-۲۵۰	۲۵۵-۲۶۵	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۵۰	۱۸۰-۲۱۰	۲۶۰-۲۶۰	صاحبی
۲۵۰-۲۵۰	۲۵۵-۲۶۵	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۵۰-۲۵۰	۱۹۰-۱۹۰	۲۷۰-۲۷۰	فخری قرمز
۲۵۰-۲۷۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۶۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۲۰	۲۵۰-۲۵۰	فخری سفید
۲۵۰-۲۷۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۶۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۲۰	۲۷۰-۲۷۰	سفید فخری ۲
۲۵۰-۲۷۰	۲۵۵-۲۶۵	۲۵۰-۲۶۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۸۰	۲۶۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۰۰	۲۷۰-۲۷۰	سیاه سرکه
۲۳۰-۲۵۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۴۰-۲۶۰	۲۰۰-۲۲۰	۲۷۰-۲۷۰	سبزمال کشمر
۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۶۵	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۹۰-۲۹۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۱۰-۲۲۰	۲۳۰-۲۵۰	سفید فخری ۱
۲۵۰-۲۹۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۶۰-۲۸۰	۱۹۰-۲۱۰	۲۵۰-۲۵۰	بی‌نام ۲
۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۱۰-۲۵۰	۲۹۵-۲۹۵	۲۶۰-۲۶۰	۲۰۰-۲۰۰	۲۵۰-۲۸۰	سرخک
۲۵۰-۲۷۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۶۰-۲۷۰	۱۹۰-۲۱۰	۲۵۰-۲۸۰	خلیلی دانه‌دار
...	۲۴۰-۲۴۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۹۵-۲۹۵	۲۸۰-۲۸۰	۲۲۰-۲۲۰	۲۷۰-۲۷۰	کاردینال
۲۳۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۴۰-۲۵۰	۲۰۵-۲۰۵	۲۵۰-۲۵۰	عسکری اصفهانی
۲۲۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۸۰	۲۳۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۳۰	۲۵۰-۲۷۰	عسکری
۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۸۰-۲۸۰	۲۴۰-۲۶۰	۲۰۰-۲۳۰	۲۵۰-۲۷۰	عسکری
...	۲۵۰-۲۵۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۳۰	۲۵۰-۲۷۰	خلیلی نر قوچان
...	۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۴۰-۲۶۰	۲۰۰-۲۳۰	۲۵۰-۲۸۰	عسکری
...	۲۵۰-۲۶۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۶۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۲۵۰-۲۵۰	سیاه
...	۲۵۰-۲۵۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۸۰	۲۵۰-۲۵۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۵۰-۲۵۰	پرلت
...	۲۵۰-۲۵۰	۲۷۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۶۰-۲۷۰	۱۹۰-۲۱۰	۲۵۰-۲۶۰	کندوری
۲۴۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۵۰-۲۷۰	۲۰۰-۲۴۰	۲۶۰-۲۸۰	۲۴۰-۲۶۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۵۰-۲۵۰	پرلت

۴-۲-۴- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) نشانگر SSR

تجزیه مؤلفه اصلی (PCoA) تبدیلی در فضای برداری است که بیشتر برای کاهش ابعاد مجموعه داده-ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سال ۱۹۰۱ توسط پیرسون ارائه شد. این آنالیز شامل تجزیه مقادیر ویژه ماتریس کوواریانس می‌باشد، این تکنیک براساس داده‌های مولکولی در آنالیز تنوع ژنتیکی نیز کاربرد دارد ولی می‌توان از آن برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین این آنالیز در مطالعات مولکولی نشان‌دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشد. براساس نتایج به‌دست

آمده درصد مقادیر ویژه پنج مؤلفه اول به ترتیب ۱۶/۶۱، ۱۴/۷۱، ۱۳/۴، ۱۱/۵۵ و ۹/۰۴ (مجموعاً ۶۵/۳۱ درصد) از واریانس کل بود (جدول ۹-۴).

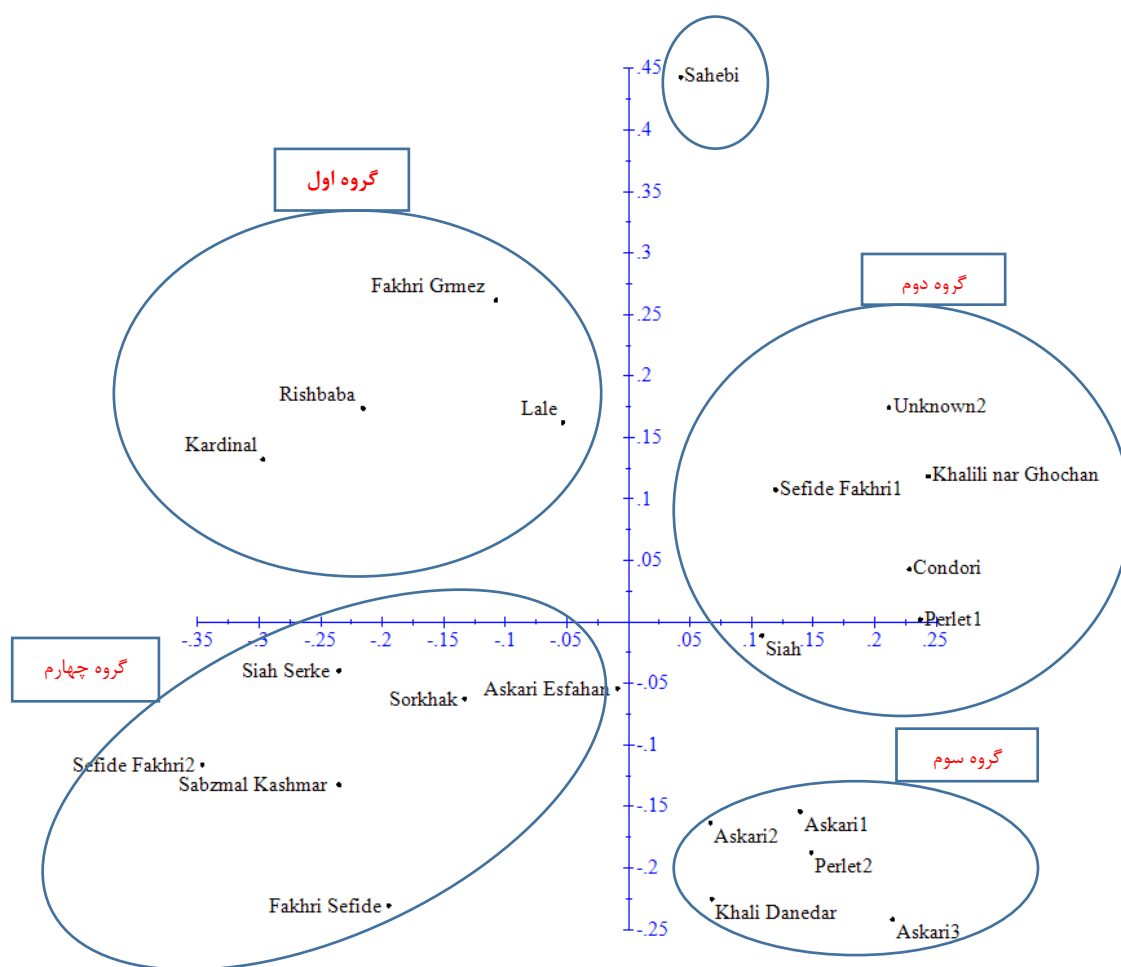
جدول ۹-۴- نتایج حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی از پرایمر SSR

مؤلفه	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه
۱	۰/۰۳۵۱	۱۶/۶۱
۲	۰/۰۳۱۰	۱۴/۷۱
۳	۰/۰۲۸۳	۱۳/۴
۴	۰/۰۲۴۴	۱۱/۵۵
۵	۰/۰۱۹۱	۹/۰۴

۵-۲-۴- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های انگور با استفاده از نشانگر SSR

در شکل (۴-۸) نمودار حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی SSR نشان داده شده است، با توجه به نمودار حاصل از ژنوتیپ‌ها در چهار گروه اصلی و ژنوتیپ صاحبی به تنهایی در یک گروه مجزا قرار گرفت. گروه اول شامل فخری قرمز، لعل، ریش‌بابا و کاردینال می‌باشد. گروه دوم شامل بی‌نام ۲، کندوری، پرلت ۱ خلیلی نر قوچان، سفید فخری ۱ و سیاه می‌باشد. و گروه سوم شامل عسگری ۱، عسگری ۲، پرلت ۲، خلیلی دانه‌دار و عسگری ۳ می‌باشد. و عسگری اصفهانی، سرخک، سیاه سرکه، سفید فخری ۲، سبز مال کاشمر و فخری سفید در گروه چهارم قرار گرفتند.

Factorial analysis: (Axes 1 / 2)



In this study, ۲۶ morphological traits were evaluated in grape genotypes and used in ۵۵ molecular segmentation of selected grape genotypes ۲۲ SSR primer pairs to evaluate. در مقایسه نمودار رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های انگور با استفاده از نشانگر SSR و تجزیه خوشه‌ای داده‌های SSR می‌توان نتیجه گرفت که ارقام فخری قرمز، لعل، ریش‌بابا، بی‌نام ۲، کندوری، سفید فخری ۱، عسکری ۱، ۲ و ۳، پرلت ۲، سبزمال کاشمر، سفید فخری ۲، سرخک به دلیل قرار گرفتن در یک گروه آماری در هر دو دندروگرام می‌تواند نشان از فاصله ژنتیکی نزدیک بین ارقام ذکر شده باشد. همچنین ارقام صاحبی، کاردینال، خلیلی دانه‌دار، فخری سفید، خلیلی نر قوچان، سیاه، پرلت ۱، عسکری اصفهانی، سیاه سرکه احتمال می‌رود به دلیل قرار گرفتن در گروه‌های جداگانه، فاصله ژنتیکی بیشتری داشته باشند. عسکری ۱، ۲ و ۳ و پرلت به دلیل ضریب عدم تشابه پایین و قرار گرفتن در یک گروه‌بندی در هر دو دندروگرام احتمال فاصله ژنتیکی نزدیک‌تر در این ارقام را قوی‌تر می‌کند.

نتیجه گیری

انگور هم به لحاظ سطح زیر کشت و هم ارزش غذایی و اقتصادی از محصولات مهم باغی در دنیا است (حاجی زاده سی سختی و همکاران، ۱۳۹۳). آگاهی از جنبه های مختلف ریخت شناسی، محقق را در تعیین راهکارهای بهره برداری و اهلی سازی گیاهان یاری می کند. ارقام انگور در ایران بسیار زیاد است و این ارقام تفاوت های بارز و زیادی از نظر مشخصات ظاهری و رویشی و دیگر صفات وجود دارد. در این تحقیق، دامنه وسیعی از تغییرات در بین ژنوتیپ ها و یا ارقام مورد آزمایش از نظر صفات اندازه گیری شده، حاصل گردید که نشان دهنده پتانسیل ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ ها می باشد. نیمی از صفات مورفولوژی مورد مطالعه بیشترین درصد تنوع را به وجود آوردند و به آسانی قادر به تفکیک و تمایز ارقام بودند و کمترین ضریب تغییرات به زاویه برگ انگور تعلق داشت. همبستگی مثبت و منفی میان صفات کمی و هم چنین صفات کیفی با توجه به ضرایب همبستگی پیرسون و اسپیرمن در این آزمایش نتایج قابل توجه را نشان دادند. به طوری که صفات طول رگبرگ با زاویه برگ، عرض حبه با طول حبه، طول خوشه با زاویه برگ و عرض خوشه با طول خوشه و هم چنین صفت آنتوسیانین همبستگی مثبت و بسیار بالایی در بین کلیه صفات مورد مطالعه را به خود اختصاص دادند. در مختصات سه عامل اصلی طول رگبرگ، آنتوسیانین و طول و عرض خوشه به عنوان عوامل ضریبی مثبت شناخته شد. دندروگرام کلاستر حاصل از ۸ جفت آغازگر SSR قرابت ژنتیکی را بین ۲۲ واریته انگور نشان داد که ژنوتیپ کاردینال فاصله ژنتیکی زیادی نسبت به سایر ارقام از خود نشان داد. دو ژنوتیپ خلیلی دانه دار با کاردینال فاصله ژنتیکی بالا و ژنوتیپ های پرلت با سیاه فاصله ژنتیکی کمی باهم دارند. رقم دیشویی در تجزیه تری پلات و تجزیه خوشه ای توانست در یک گروه جداگانه قرار گیرد. گروه بندی تا حدودی توانست ژنوتیپ های مختلف انگور را از همدیگر تفکیک نماید. تفکیک ژنوتیپ ها از طریق تجزیه و پلات سه بعدی نیز تقریباً تایید کننده تجزیه خوشه ای بود. همه ۸ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق، چند شکلی بالایی جهت متمایز کردن نمونه ها و قرار دادن آن ها در گروه ها و زیرگروه های معین داشتند. پس می توان نتیجه گرفت که نشانگر SSR در نشان دادن

اطلاعات در یک مکان منفرد از توانایی بالایی برخوردار است. همچنین نشانگر SSR به دلیل توارث هم‌بارز و داشتن آلل‌های چندگانه توانایی بالایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی، روابط شجره‌ای و ترسیم نقشه‌های ژنتیکی دارند، اما نشانگر SSR معایبی نیز دارند که اصلی‌ترین آن‌ها، مراحل جداسازی مکان‌های SSR است. این مراحل شامل تشکیل کتابخانه ژنومی، کلون کردن، تعیین توالی کردن و طراحی پرایمر می‌باشد که هر یک از این مراحل پرهزینه و کاربر می‌باشند.

پیشنهادهای

۱. به‌کارگیری نشانگرهای دیگر جهت شناسایی دقیق و مطمئن.
۲. بررسی شجره‌نامه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش.
۳. استفاده از تعداد بیشتر آغازگر.
۴. تبادل اطلاعات با دیگر مراکز کلکسیون انگور در کشور برای تعیین قرابت ژنتیکی انگورها.

منابع

- اثنی‌عشری، م.، غلامی، و. و الماسی، پ. ۱۳۸۶. زیست‌شناسی تاک. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا همدان.
- احتشام‌نیا، ع.، شریفانی، م.، وحدتی، ک. و عرفانی مقدم، و... ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های گردوی بومی استان گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره، مجله پژوهش تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. - جلد ۱۶ شماره ۴.
- ارزانی، ا. ۱۳۸۳. اصلاح گیاهان زراعی. مرکز نشر جهاد دانشگاهی دانشگاه صنعتی اصفهان.
- امیرقاسمی، ث. ۱۳۸۳. کاشت داشت و برداشت انگور. انتشارات آیندگان.
- پژمان‌مهر، م.، عبادی، ع.، موسوی، ا.، والکر - آماندا، ر. و رحیمی، ع. ر. ۱۳۹۴. مطالعه کمی و کیفی آنتوسیان‌ها و فلاونول‌ها در پوست حبه چند رقم انگور با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). سال چهاردهم، دوره چهارم شماره ۵۶. ۱۳۸-۱۲۳.
- جداری کوهی، ب.، گروسی، ق. و حسینی، ر. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی‌دانه انگور توسط نشانگر مولکولی RAPD. مجله سلول و بافت. جلد دوم، شماره ۲: ۱۰۶-۹۹.
- جعفری نجف‌آبادی، ا. ۱۳۹۰. کاربرد نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی انار. همایش ملی انار. مرکز تحقیقات فردوس. دانشگاه فردوسی مشهد. ۳۱۹-۳۱۵.
- جلیلی‌مرندی، ر. ۱۳۸۸. پرورش میوه‌های مناطق معتدله. انتشارات چهار دانشگاهی ارومیه. ارومیه.
- جهرمی شیرازی، ر. ۱۳۸۷. بررسی روابط ژنتیکی ارقام و پایه‌های سیب با استفاده از نشانگر مولکولی SSR، پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات.
- حدادی‌نژاد، م.، عبادی، ع.، فتاحی مقدم، م. و نجاتیان، م. ع. ۱۳۹۲. غربالگری اولیه مورفولوژیکی ۶۹۸ ژنوتیپ انگور براساس تحمل به خشکی برای انتخاب پایه، علوم باغبانی ایران. ۴۴(۲): ۱۹۳-۲۰۷.
- حشمتی، م.، رضایی، م.، دادار، ع. و قربانی قوژدی، ۱۳۹۷. بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی برخی از ارقام تجاری انگور با نشانگرهای ISSR و RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ۹۹ صفحه.
- حقانی، س. ۱۳۹۰. نشریه داخلی واحد فنی توسعه کشاورزی هزاره سوم. شماره ۳.
- خورشید، ع.، محمود، م. و رنجی، ذ. ا. ۱۳۷۹. بررسی و مقایسه خصوصیات کمی و کیفی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری و خشکی چغندر قند. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد کرج.

دولتی بانه، ح. ۱۳۸۵. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور استان آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ارتباط آن‌ها با صفات زراعی، پایان‌نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

دولتی بانه، ح.، ناظمیه، ع.، محمدی، ا. و حسنی، ق. ۱۳۸۹. شناسایی و ارزیابی ارقام انگور محلی استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های آمپلومتری. فن‌آوری تولیدات گیاهی. جلد دهم. شماره اول.

رحیمی، س. ۱۳۸۶. ارزیابی تنوع ژنتیکی (با استفاده از مارکرهای مولکولی) و فیتوشیمیایی گشنیزهای بومی ایران، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس،
رسولی، م.، محمدپرست، ب. و عینی، م. ۱۳۹۳. ارزیابی تنوع برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های انگور (*Vitis Vinifera L.*) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی

رفیعی، م.، عرفانی‌مقدم، ج. و فاضلی، آ. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی بین همگروه‌های مختلف انگورهای بیدانه و دانه‌دار در شهرستان اراک براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد بیست و سوم، شماره سوم. ۱۳۴-۱۱۵.

شمیلی، م.، طلایی، ا.، فتاحی مقدم، م. و طالبی، م. ۱۳۸۹. بررسی فنوتیپی برخی ژنوتیپ‌های انبه در ایران. مجله علوم باغبانی ایران، جلد ۲، شماره ۴۱، صفحه ۹۵-۱۱۰.

شیرآلی، م.، سلیمانی دشتکی، م.، عالمی سعید، خ. و رضازاده، م. ۱۳۸۸. روش ساده و بهینه استخراج DNA غلات جهت مطالعات ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. همایش منطقه‌ای غذا و بیوتکنولوژی، ۴ صفحه.

شیرآوند، د. ۱۳۸۹. اصول احداث و مدیریت باغ میوه. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی تهران، تهران.

صبوری، ه.، نهویی، م.، تورایی، آ. و کانونی، م. ۱۳۸۷. طبقه‌بندی انواع برنج در سطوح مختلف از پتانسیل اسمزی براساس عملکرد سوربیتول در آنالیز کلاستر، کنگره آگرونومی و گیاهان پرورشی ایران، شماره ۷، صفحه ۳۴۰-۳۲۷.

عبدمیشانی، س.، اشرفی، ح. و فصیحی هرنندی، ا. ۱۳۷۵. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و کاربردهای آن در ژنتیک و اصلاح نباتات ایران، مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۹۴-۲۴۱.

غلامی، م.، صباغ‌نیا، ن.، نورآیین، م.، شکاری، ف و جان محمدی، م. ۱۳۹۷. تجزیه خوشه‌ای برخی از ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده از تعدادی ویژگی‌های زراعی. پژوهش‌نامه اصلاح گیاهان زراعی، سال دهم، شماره ۲۵. ۱۵۹-۱۶۶.

فتحعلی‌پور، ز.، نباتی احمدی، د.، رجبی معماری، ح.، سیاهپوش، ا. و صدیقی دهکردی، ف. ۱۳۹۳. تعیین تنوع گیاهی با استفاده از ویژگی‌های مرفولوژیکی و تجزیه خوشه‌ای در زرم-پلاسم‌های گیاه شوید. تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) جلد ۳۷، شماره ۴، ۵۸-۶۷.

قبادی، س.، خوشخوی، م. و طباطبایی، ب. ا. (۱۳۸۷). تنوع و روابط ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های انگور (*Vitis vinifera* L.) استان اصفهان با استفاده از نشانگر RAPD. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۴۵، ۶۳۵-۶۲۷.

کرمی، م ج. ۱۳۸۸. ارزیابی ارقام انگور آبی استان کردستان. مجله به‌نژادی نهال و بذر، جلد ۱، صفحه ۳۱-۱.

کریمی، شهری، م. ر. دهواری، و. حاجیان شهری، م. و ابراهیم‌پور، ح. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی براساس نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR. مجله به-نژادی نهال و بذر. جلد ۱-۲۸، شماره ۲، ۱۷۲-۱۵۹.

کریمی، شهری، م. ر. دهواری، و. مختاریان، ع. و ابراهیم‌پور، ح. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی بین چند ژنوتیپ فرانسوی و ایرانی انگور با استفاده از نشانگر SSR. اولین کنگره بین‌المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران. صفحه.

محمدی، ح. ر.، بهار، م. و قبادی، س. ۱۳۸۱. تنوع ژنتیکی ارقام انگور ایرانی براساس نشانگرهای RAPD و SSR، پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی. ۸۶ صفحه.

مردی، م.، زین‌العابدینی، م.، حق جویان، ر.، جمالی، ح.، خیام نکویی، م.، کاوند، ع.، احمدی، ک.، صادقی، ل.، لونی، ع. و کرمی، ط. ۱۳۹۳. کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام گردو. مجله علوم باغبانی. جلد ۲۸، شماره ۴ ص ۵۹۳-۵۸۴.

مفاخری، خ.، بی‌همتا، م. ر. و عباسی، ع. ر. ۱۳۹۵. شناسایی نشانگر SSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی، (*Vigna unguiculata* L. Walp) تحت تنش خشکی، مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی، سال پنجم، شماره چهاردهم. ۶۰-۴۳.

موسی‌زاده، ر. ۱۳۹۱. معرفی و تشریح خصوصیات مورفولوژیکی و بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ رقم انگور در خراسان رضوی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

موسی‌زاده، ر.، شور، م.، تهرانی‌فر، ع. دآوری‌نژاد، غ و مختاریان، ع. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور براساس صفات مورفولوژیک. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد بیست و یکم، شماره چهارم.

میر دری‌کوند، ر. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از نشانگر مولکولی SSR. پژوهش‌های حبوبات ایران، جلد ۸، شماره ۱، ۱۳۷-۱۲۷.

نادری، ح.، شکرپور، م.، اصغری، ع.، کانونی، ه. و اسفندیاری، ع. ا. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های نخود با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. علوم گیاهان زراعی ایران. دوره ۴۵، شماره ۴، ۵۱۹-۵۰۹.

نراقی، م. ۱۳۸۹. خوردنی‌های شفا بخش. نشر امیرکبیر. ۱۶۰ صفحه.

نقوی، م. ر.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۳۴.

وجدانی، پ. ۱۳۷۲. نقش بانک ژن و مواد گیاهی در افزایش محصولات زراعی، مقالات کلیدی اولین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج، ۲۹۴-۲۸۵.

هاشم‌زهی، م.، مرادقلی، ا. و کمالی، م. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه به‌عامل‌ها برای صفات مورفولوژیک ارقام انگور، هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، اصفهان، ۱۷-۱۴ شهریور، دانشگاه صنعتی اصفهان.

- Abdollahi Mandoulakani, B., Alami, A. and Esfahani, M. 2010.** Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Iran J Crop Sci. 12 (4): 510-9 (Persian).
- Amini, F. Saeidi, G and Arzani, A. 2008.** Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. Euphytica 163 (1), 21-30.
- Anonymous, 2009.** Statistics of Agricultural Crops. Center of Statistics and Information, Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran (in Persian).
- Armour, J. A.L., Alegre, S. A., Miles, S., Williams, L.J. and Badge, R. M. 1999.** Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA.
- Arzani K. Mansouri Ardakan H. and Vezvaei A. 2008.** Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from central Iran, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 36, pp. 159-168.
- Ashrafi Parchin, R. 2011.** Evaluation of genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using agronomic and morphological characters and molecular markers. M. Sc. Thesis, University of Razi, Kermanshah, Iran (in Persian).
- Badenes, M.L., Martinez-Calvo, J., and Llacer, G. 2000.** Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Euphytica. 114: 187-194.

- Bagheri, A., Darbandi, A. and Malbobi, M .A.2002.** Practical applications of plant molecular biology. Ferdoswsi Mashhad University Publications. 122-124.
- Baradakci, F. 2001.** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turk. J. Bio. 25: 185-196.
- Bhat, K.V. 2008** DNA fingerprinting techniques and cultivar identification, national research center on DNA fingerprinting, NBPGR, New Dehli- 110012.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32 (3), 314-30.
- Bowers, G. E., Dangle, G.S. and Vignani, R. 1996.** Isolation and characterization of new polymorphism simple sequence loci in grapevine (*Vitis vinifera* L.), Genome, Vol. 39, pp. 628-633.
- Burçak Işçi (2019).** Genetic relationships of some local and introduced grapes (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite markers, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33:1, 1303-1310.
- Chalak, L., Chehade, A., and Kadri, A. 2007.** Morphological characterization of cultivated almonds in Lebanon. Fruits. 62: 177-186.
- Chambers, M., Avoy, M. (2000).** Comparision of microsatellite and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1037-1048.
- Chao JA, et al. 2003.** Inherent protein structural flexibility at the RNA-binding interface of L30e. *J Mol Biol* 326(4):999-1004
- Chauhan, P. and Kumar, P. 2015.** Molecular markers: application in plant improvement programme. International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture, 1(7), 74-90.
- Chitwood, D. H., Ranjan, A., et al. 2014.** A modern ampelography: A Genetic basis for leaf shape and venation patterning in grape. *Plant physiol.* 164: 259-272.
- Cholastova, T., Soldanova, M. and Pokorny, R. 2011.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) marker efficacy for amazize hybrid identification. *African Journal of Biotechnology*, 10 (24): 4704-4801.
- Cox, T. S., Lookhart, G. L., Walker, d., Harrell, E. L. G., Albers, L. D. and Rodgers, M. D. 1985.** Genetic relationships among hard red winter wheat cultivars as evaluated by pedigree analysis and gliadin polyacrylamide-gel electrophoretic patterns. *Crop Sci.* 25: 1058-1063.

- Dangle, G. S., Mendum, M. L. and Prins, B. H. 2001.** Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A tool for managing a grape germplasm collection, *Genome*, Vol. 44, pp. 432-438.
- Dogan, Y., Kafkas, S., Sütyemez, M., Akca, Y. and Türemis, N. 2014.** Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. *Scientia Horticulturae*. 168, pp 81–87.
- Doulati Baneh, H., Nazemia, A., Mohammadi, S. A., Hassani, G., and Henareh, M. 2010.** Identification and evaluation of west Azarbaijan grape cultivars by ampelometry and Ampelometry. *Plant Production Technology*, 2(1), 13-24. (in Farsi).
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP. 2004.** The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust J Grape Wine Res* 10: 55–73.
- Durgac, C., Ozgen, M., Simsek, O., Kacar, Y. A., Kıyga, Y., Celebi, S., Gunduz, K. and Serce, S. (2008).** Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 7: 1294-1301.
- Dvorak, J., Lue, M. C., Yang, Z. L., and Zhang, H. B. 1998.** The Structure of the *Aegilops tauschii* genepool and evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet*, 97, pp. 657-670
- Ebrahimi, A., Fatahi, R. and Zamani, Z. 2011.** Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers” *Scientia Horticulturae*. 130, pp. 146–151.
- Ekhvaia, J. and Akhalkatsi, T. M. 2010.** Morphological variation and relationships of Georgian population of *Vitis vinifera* L. Subsp. *Sylvestris* (C.C. Gmel.). *Flora*. 205:608-617.
- Ercisli, S. and E. Orhan. 2008.** Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh Valley revealed by RAPD Markers. *Guleray. Agar. Biochem. Genet*. 46:590-597.
- Ershadi, A. 1997.** Comparative study of effects of commercial apple cultivars grafted on Golabeh Kahanz, Shafi Abadi, Red Delicious, and Golden Smoot on six basic vegetative Malling and Merton. MSc. Thesis, Tehran University, Tehran, Iran. (In Persian).
- Eskandari, S., Hassani, D. and Abdi, A. 2005.** Investigation on genetic diversity of Persian walnut and evaluation of promising genotypes” *Acta Horticulturae*, 705, pp. 159-163.
- FAO. 2016.** FAO statistical yearbook. Agricultural production, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>).
- Ford-Lloyd, B. and Painting, K. 1996.** Measuring genetic variation using molecular markers. IPGRI, Rome

- Gaffari, P., Talebi, R. and Keshavarzi, F. 2014.** Genetic diversity and geographical differentiation of Iranian landrace, cultivars, and exotic chickpea lines as revealed by morphological and microsatellite markers. *Physiology and Molecular and Biology of Plants* 20(2): 225-233.
- 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. *Scientia Horticulturae*. 130, pp. 146–151.
- Gopta, P. K. and Versheney, R.K. 2000.** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat, *Euphytica*, Vol. 113, 163-185 pp.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P and Sambrook, J. 1974.** Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. In *cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*, vol. 39, P. 439-446. New York: cold spring Harbor.
- Guertin, W. H. and Bailey, J. P. 1982.** Introduction to modern factor analysis. Edwards Brothers Inc., Michigan, 405p.
- Gvozdenovic, S., Saftic- Pankovic, D., Jovic S. and Radic, V. 2009.** Odnos između heterozisa i genetske udaljenosti određena SSR markerima kod suncokreta (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural Sciences*. 54: 1-10.
- Hajiamiri, A., and Sanei shariatpanahi, M. 1997.** Identification of local grape cultivars
- Heidari Japelaghi, R., Haddad, R. and Garoosi, G.A. 2011.** RAPD and effective isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol. Biotechnol.* 49: 129-370.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., and Nienhuis, J. 1986.** Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and applied genetics*, 72(6), 761-769.
- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) .2008.** Description list for grape (*Vitis* L.). (www.biodiversityinternational.org). Italy, 72pp
- Jacard, P. 1912.** The distribution of the flora in the alpine zone, *New Phytologist* 11(2), 37-50.
- Jatoi, S. A., Kikuchi, A., San-San-Yi, Naing, K. W, Yamanaka, S., Watanabe, J. A., Watanabe, K. N. 2006.** Use of rice SSR markers as RAPD markers for genetic diversity analysis in Zingiberaceae. *Breeding Science* 56, 107-111.
- Karami, M.J. 2009.** Study of characteristics of irrigated grape cultivars grown in Kurdistan. *Seed Plant*. 25: 1-31 (In Persian).
- Karim, K., Rawda, A. and Hatem, C. M. 2009.** Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis *Biological Diversity and Conservation*, 2(1): 27-35.

- Karp A, Edwards KJ, Bruford M, Funk S, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kermer A, Boursot P, Arctander P, Tautz and Hewitt GM, 1997.** Molecular technologies for biodiversity evaluation; opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*. 15:625-628.
- Kumar, L.S. 1999.** DNA markers in plant improvement. *Biotech. Adv.* 17: 143-153.
- Leao, P. C. D.S., Crus, C. D. and Motoike, S. Y. 2011.** Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits. *Sci. Agr.* 68: 42-49.
- Martinez-Ortega, M. M., Luis, D., Albach, D. C., Elena-Rossello, J. A and Rico, E. 2004.** Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean. *Syst. Botany*, vol. 29. No. 4, P. 965-986.
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L., and Guedes-Pinto, H. 2007.** RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Gen. Resour. Crop Evol.*, 54(1): 117-128.
- Mohammadi, R., Naghavi, M.R., Maali Amiri, R. and Rezaei, M. 2010.** Identification of informative markers of SSR in some of alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions from Iran. *Mod Genet*, 5 (2):57-66 (Persian).
- Mondini, L. Noorani, A. and Pagnotta, M. A. 2009.** Assessing plant genetic diversity by molecular tools, *Diversit*, 1(1), 19-35.
- Mustafa Hama Salieh F. Abdul Razzaki Tahir N. Mahmood Faraj J. 2013.** Assessment of Genetic Relationship among Some Iraqi Walnut Genotypes (*Juglans regia* L.) in Sulaimani Region Using RAPD and SSR Molecular Marker. *Jordan journal of Agricultural Sciences*. 9, pp 351-362.
- Naghavi, M., Gharehyazi, B., and Hoseini Salkadeh, Gh. 2007.** Molecular markers. University of Tehran Press. 324p. (In Persian)
- Najafi, J., Alipanah, L., Ghareyazie, B., Mohammadi, S., Nazari, A. H. and This, P. 2006.** Genetic diversity of Iranian and some of European grapes revealed by microsatellite markers. *Iran J Biotech* 4:36-44
- Narve, J.M. W., Fehr, R., Chn, W. C., Grant, D. and Shoemaker. 2000.** Simple Sequence Repeat Diversity among Soybean Plant Introduction and Elite Genotypes. *Crop Science*, VOL. 40, Septembers- October.
- Nei, N., and W. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)* 76:5269-5273.
- Nejatian, M. A. 2006.** Collection and preliminary evaluation of grapevine cultivars of Qazince. *Seed Plant*, 22, 319-338. (In Persian).
- Ocete, R., Canto, M., Lopez, M.A., Gomez, I., and Troncoso, A. 2002.** Wild grapevine populations in the Ossa-Morena mountain range (Portugal-Spain): location, characterization and sanitary state. *Vitis*. 41: 55-56.
- OIV (Office International de la Vigne et du Vin. 2007.** List of descriptors for grapevine cultivars and species (Vitis L.).

- Pejic, I., Ajmone-Marson, P. and Morgant, M. 1998.** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs, *Theor. Appl. Genet*, Vol. 97, pp. 1248-1255.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. 1995.** Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol*. 4:249–252.
- Pop, I.F., Vicol, A.C., Botu, M.R. Paul, A.R., Vahdati, K. and Pamfil, D. 2013.** Relationships of walnut cultivars in a germplasm collection: comparative analysis of phenotypic and molecular data. *Sci. Hortic*. 153. pp 124–135.
- Potter, R. H. and Jones, M. G. K. 1991.** Molecular analysis of genetic stability. In: Dodds, JH (eds) *In vitro methods for conservation of plant genetic resources*. Chapman and Hall. London pp. 71-91.
- Powell, W., Machray, G. C. and Proven, G. 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends in plant science*, Vol. 1, 215-222 pp.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N and Siddiq, E. A. 2002.** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, vol. 128, no. 1, p. 9-17.
- Riaz, S. De Lorenzis, G. Velasco, D, Koehmstedt, A. Maghradze, D, Bobokashvili, Z, Musayev, M, Zdunic, G, Laucou, V. Andrew Walker, M. Failla, O. Preece, JE. Aradhya, M and Arroyo-Garcia R. 2018.** Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera L.*) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia. *BMC Plant Biology* . 18:137
- Roder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P, Ganai, M. W. 1998.** A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 149(4): 2007-2023.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. and Bousquet, J. 1992.** Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical AND Applied Genetics*, 85, 2-3, pp 173-180.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. and aRanjbar, H. 2009.** Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Sci Hor*. 121: 313-319.
- Sefc, K.M., Lefort, F. and Grando, M.S. 2001.** Molecular biology and biotechnology of grapevine, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Semagn, K., Bjornstam A. and Ndjioudjop, M. N. 2006.** An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5, 25.

- Sharma O. C. and Sharma S. D. 2001.** Correlation between nut and kernel character of Persian walnut seedling trees of Garsa valet in kullu district of Himachal Pradesh. *Acta Horticulturae*. 544, pp 129-132.
- Sharma, B. D. Hore, D. K. 1993.** Multivariate analysis of genetic divergence in upland rice Indian. *Journal of Agricultural Science* 63: 515-517.
- Singh, A. Gill, MI S. Arora, NK., Bedi, S. Bakshi, P and Kumar, K. 2019.** Variability in Grapes (*Vitis vinifera*) Genotypes Using Morphological Traits. 8 (1S): 439-446.
- Singh, G., Singh, O. P., de Lampasona, M. P., Catalan, C., 2003.** *Curcuma amada* Roxb. Chemical composition of rhizome oil. *Indian Perfumer* 47, 143-148.
- Sokal, R. R. and Michner, C. D. 1958.** A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Science Bulletin*. 38, 1409-1438.
- Stanford A.M. Harden R. Parks C.R. 2000.** Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandaceae) based on mATK and ITS sequence data". *Am. J. Botany*. 87, pp 872-882.
- Sun, R.L., Zhao, B.Q. and Zhu, L.S. 2003.** Effects of long-term fertilization on soil enzyme activities and its role in adjusting-controlling soil fertility. *Plant Nutr Fert Sci*. 9:406-410
- Tafazzoli, E., Hekmati, J., and Firoozeh, P. 1994.** Grapes. University of Shiraz Publications. Shiraz, Iran. 343 pp. (in Persian).
- Tanksley, S. D., Young, N. D. Paterson, A.H. and Bonierbale, M. W. 1989.** RFLP in plant breeding: new tools for an old science. *Biotech* 7, 257-264.
- Tassie, L. 2010.** Vine identification- Knowing what you have. Grape and Wine research and Development Corporation.
- Thomas, M.R. and Scott. 2003.** Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence sites (STSs), *Theor. Appl. Genet.*, Vol.86, pp. 985-990.
- Ulanovsky, S., Gogorcena, y., Toda, F. M. and Ortiz, J. M. 2002.** Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 92 (3-4), 241-254.
- Virk, P. S., Zhu, J., Newbury, H. J., Bryan, G. J., Jackson, M. T. and Ford-Lloyd, B.V. 2000.** Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, 112, 275-284.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005.** DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications, 2nd ed. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. [Google Scholar]

- Weising, K. Moeller, S., Wöhrmann, T. and Huettel, B. 2015.** Development of 18 polymorphic microsatellite markers for *Vinca minor* (Apocynaceae) via 454 pyrosequencing Appl Plant Sci.; 3(5).
- Wichmann, B., Galli, Z.S., Molnar, S., Galbacs, Z.S., Kiss, E., Szabo, T. and Heszky, L. 2007.** Molecular identification of old Hungarian apple varieties.
- Williams, J. G., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. and Tingey, S.V. 1995.** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. In Recombinant DNA Methodology. Pp. 849-884.
- Winkler, A.J., J.A. Cook, W.M. Kliewer, and L.A. Lider. 1974.** General Viticulture. 4th ed. University of California Press, Berkeley
- Wolfe, A. D., and Liston, A. 1998.** Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Molecular systematics of plants II(pp. 43-86). Springer, Boston, MA.
- Xu, H., and Wilson, D. 1995.** Sequence specific polymerase chain reaction markers derived from Randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (vitis) rootstocks, J. Amer. Soc. Hort. Sci., Vol. 120 pp.
- Young, N. D., Menancio-Hautea, D., Fatokun, C. A. and Danesh, D. 1992.** RFLP technology, crop improvement, and international agriculture. Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa, pp. 221-230.
- Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, K.P., 1993.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Glick BR, Thompson JE (eds) Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC Press, Boca Raton- Ann Arbor-London-Tokyo, 36
- Zohouri, M. 2006.** Grapevine guide. Agriculture research and Education Organization, Tehran (Persian).

Abstract

Iran is one of the major countries producing grapes that grows varieties and genotypes of various grape varieties..The aim of this study was to evaluate the genetic and morphological diversity of some genotypes in the grape collections in Shahroud Agriculture Research Station by using of morphological and SSR markers. In this study, 26 morphological traits were evaluated in 55 grape genotypes and used in molecular segmentation of 8 SSR primer pairs to evaluate 22 selected grape genotypes. The results obtained from the studied traits showed that there is a high variation in the traits being evaluated. The highest diversity index is related to Anthocyanin, petiole length, leaf shape, cluster density traits and the lowest diversity index is related to leaf angle. The results of correlation coefficients showed positive and significant correlation between some traits such as leaf angle with vein length, cubic width with cubic length, panicle width with panicle length and fruit color with petiole anthocyanin. The dendrogram of morphological traits was divided into four distinct groups at a distance of ۱۵ to ۱۰ cultivars and Dishui cultivar was grouped alone because of high anthocyanin. All SSR markers were polymorphic. The pair of primers used in this study showed binary and single bands in 22 genotypes. The cluster analysis of molecular data was performed based on the UPGMA method and Jaccard similarity coefficient. In cluster analysis with SSR markers, cultivars were categorized and divided into four groups. The results showed that Cardinal cultivar is more distant than other cultivars and Askari Isfahan cultivar was grouped alone. The results of this study indicate the presence of molecular and morphological diversity among Shahrood collection grape cultivars.

Keywords: Grapes, Morphological characteristics, Dendrogram, SSR



**Assessment the morphological and genetic diversity of selected
genotypes from grapes collection in Shahrood**

By:
Kobra Abiri

Supervisor:
Mehdi Rezaei

Advisors:
Parvis Hidari
Hamid Reza Tahanean

November 2019