دانشکده کشاورزی

گروه باغبانی

پایان نامه

برای دریافت درجه دکتری (Ph.D.) در رشته باغبانی (گرایش میوه کاری)

عنوان

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور استان آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ارتباط آنها با صفات زراعی

استادان راهنما

دکتر سید ابوالقاسم محمدی　　دکتر علی ناظمیه

استادان مشاور

دکتر وازگین گریگوریان　　دکتر محسن مردی

پژوهشگر

حامد دولتی بانه

۱۳۸۷/۲/۸

شهریور ۱۳۸۶

۹۴۱۳۷

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

تقدیم به

همسر دلسوز و مهربانم

سروه

به پاس لطف و مهر بی پایانش

و تقدیم به

گل زندگی ام

ژیوار

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس بیکران خداوند بزرگ و مهربان که جهان را بر اساس علم، عدل و حکمت آفرید و به بشر آموخت که نیل به سعادت در گرو دانش، تفکر و پیمودن راه راست است و او را سپاس می گویم که به من توفیق انجام این پژوهش را در محضر اساتید بزرگوار عنایت فرمود.

حال که نگارش این رساله به پایان رسیده است بر خود واجب می دانم از تمامی سرورانی که در این راه بنده را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

از استاد گرانمایه جناب آقای دکتر علی ناظمیه به خاطر راهنمای ها و ارشادات گوهر بارشان در طی اجرای تحقیق و تدوین رساله صمیمانه تشکر می نمایم.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سید ابواقاسم محمدی که از راهنمای ها و کمک های بی شائبه علمی و عملی در تمامی مراحل انجام کارهای مولکولی، تجزیه های آماری و نگارش پایان نامه بهره مند بودم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از مشاورین محترم آقایان دکتر وازگین گریگوریان و دکتر محسن مردی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند صمیمانه قدردانی می نمایم.

از آقایان دکتر ذبیح اله زمانی، دکتر رسول جلیلی و دکتر جعفر حاجی لوکه داوری رساله را بر عهده داشته و نظرات ارزشمندی ارائه نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای دکتر علیرضا مطلبی، مدیر محترم گروه باغبانی، به خاطر مساعدت های بیکران صمیمانه تشکر می نمایم.

از اساتید محترم و بسیار عزیز گروه بیوتکنولوژی دانشگاه میلان ایتالیا، آقایان پروفسور سرجیو اسگورباتی، ماسیمو لابرا، دکتر فابریسیو گراسی و فابریسیو دی ماتیا به خاطر همکاری های فراوانشان تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید محترم گروه باغبانی آقایان دکتر سیروس مسیحا، دکتر طباطبایی، مهندس دادپور، مهندس کاظم نیا، مهندس پناهنده، دکتر مهنا و دکتر بلند نظر تشکر می نمایم

از کارشناسان زحمت کش آزمایشگاه اصلاح مولکولی، آقای امیر کهنمویی و سرکار خانم شکویی به خاطر کمکهایشان از صمیم قلب تشکر می نمایم.

از دوستان بسیار گرامی آقایان صادق ثابت، امید سفالیان، محمد حاجی زاده، هژیر خرم، مهدی طاهری، عزیز مجیدی، حسن محمود زاده، مشهید هناره، قاسم حسنی، عباس حسنی، سرکار خانم مهندس بدخشان، خانواده محترم خلیل محمدی و همچنین روسای مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آقایان مهندس عارف امیری و مهندس علی محسن پور که در تمامی مراحل اجرای پژوهش مرا یاری نمودند. بینهایت سپاسگذارم.

در پایان از مادر فداکار و پدر دلسوزم که موفقیتهام را مدیون زحماتشان می دانم، از صمیم وجودم تشکر می نمایم.

از همسر مهربان و دختر عزیزم که در مدت طولانی تحصیل مشکلات فراوانی را متحمل شده و همواره مشوق و همراه بنده بوده اند از ته قلب تشکر و قدردانی می نمایم.

از خواهران و برادران عزیزم و همچنین مادر و پدر زن دلسوزم به خاطر حمایت های بیدریغشان تشکر می نمایم.

نام خانوادگی: دولتی بانه | نام: حامد

عنوان پایان نامه: ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ارقام انگور استان آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ارتباط آنها با صفات زراعی

استادان راهنما: دکتر سید ابوالقاسم محمدی و دکتر علی ناظمیه

استادان مشاور: دکتر وازگین گریگوریان و دکتر محسن مردی

مقطع تحصیلی: دکتری | رشته: علوم باغبانی | گرایش: میوه کاری | دانشگاه: تبریز

دانشکده: کشاورزی | تاریخ فارغ التحصیلی: شهریور ۱۳۸۶ | تعداد صفحه: ۱۲۷

کلید واژه ها: انگور، تنوع ژنتیکی، آمپلوگرافی، ریزماهواره، AFLP ، کلروپلاست

چکیده:

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط انگورهای زراعی و وحشی استان آذربایجان غربی و ارتباط بین داده‌های مولکولی و صفات مهم زراعی از روش آمپلوگرافی همراه با روش‌های مولکولی مختلف شامل نشانگرهای ریزماهواره هسته‌ای، کلروپلاستی و AFLP استفاده شد. از نظر صفات زراعی تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. براساس روش آمپلوگرافی مشخص شد که اشتباه در نامگذاری ارقام الحقی و شاهرودی و همچنین خلیلی سفید و قرمز صورت گرفته است. از ۱۰ جایگاه ریزماهواره کلروپلاستی فقط دو مکان cpmp۳ و cpmp۱۰ در ارقام زراعی و جایگاه cpmp۳ در انگورهای وحشی چند شکلی نشان دادند. از ترکیب آلل‌های این جایگاه‌ها چهار نوع هاپلوتیپ بدست آمد که هر چهار تای آنها در ارقام انگور وجود داشتند در حالیکه در انگورهای وحشی فقط دو نوع هاپلوتیپ مشاهده شد. با توجه به اینکه این دو نوع هاپلوتیپ در اغلب ارقام انگور و ژنوتیپ‌های وحشی نیز وجو داشت، احتمال می‌رود که انگورهای وحشی اجداد تعدادی از ارقام بومی ایران باشند. با استفاده از ۲۹ جفت آغازگر ریزماهواره هسته‌ای، مجموعاً ۱۹۹ آلل در ارقام زراعی با متوسط ۸/۶ آلل و ۱۸۲ آلل در ژنوتیپ های وحشی انگور با میانگین ۷/۹ آلل تکثیر شد. هتروزیگوتی مورد انتظار از ۰/۷۰ در انگورهای زراعی تا ۰/۷۴ در ژنوتیپ‌های وحشی متغیر بود. میزان هتروزیگوتی مشاهده شده در ارقام ۷۳ /۰ و در انگورهای وحشی ۰/۶۹ بود. تجزیه ریزماهواره‌ها نیز حالتهای سینونیمی بین ارقام را نشان داد که از جمله آنها می‌توان به سینونیمی ارقام موسلی و سقل سولیان، رشه و خوشناو، سیاه معمولی و کلکه ریوی، تبرزه سفید و قرمز و نیز سه رقم کشمشی سفید، بیدانه قرمز و رجین اشاره کرد. همچنین با استفاده از این داده‌ها، روابط والد- نتاج بین ارقام رزقی، ریش بابا قرمز و ریش بابا سفید تعیین شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی انگورهای زراعی و وحشی را از هم متمایز کرد. هر چند که در گروه انگورهای زراعی چند نمونه انگور وحشی نیز قرار گرفت. تجزیه‌های مولکولی با استفاده از داده‌های ریزماهواره ژنومی ارتباط نزدیک و مشخص را بین جمعیت‌های وحشی و ارقام انگور نشان نداد. تجزیه ارتباط، ۴۹ آلل مثبت از ۱۸ نشانگر ریزماهواره و نیز ۴۹ نشانگر AFLP مثبت را برای ۱۴ صفت کمی در ارقام انگور شناسایی کرد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
۱- بررسی منابع	۳
۱-۱- شناسایی مورفولوژیکی و اهمیت حفظ ژرم پلاسم انگور	۳
۱-۲- تاریخچه انگور	۴
۱-۳- رده بندی و گیاهشناسی انگور	۵
۱-۴- گونه‌ها و ارقام انگور ایرانی	۶
۱-۵- اهداف اصلاح انگور	۷
۱-۶- جهش‌های سوماتیکی	۸
۱-۷- ژنوم انگور	۹
۱-۸- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن	۹
۱-۹- روشهای بررسی تنوع ژنتیکی	۱۰
۱-۱۰- نشانگرهای مورفولوژیکی	۱۰
۱-۱۱- نشانگرهای مولکولی	۱۲
۱-۱۱-۱- نشانگرهای ریزماهواره هسته‌ای	۱۲
۱-۱۱-۱-۱- پیدایش ریزماهواره	۱۴
۱-۱۱-۱-۲- توسعه نشانگرهای ریزماهواره‌ای در جنس ویتیس	۱۵
۱-۱۱-۱-۳- نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر EST	۱۵
۱-۱۱-۱-۴- نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های نشانمند	۱۶
۱-۱۱-۱-۵- اندازه آلل‌های ریزماهواره	۱۶
۱-۱۱-۱-۶- مزایا و معایب نشانگرهای ریزماهواره‌ای	۱۷
۱-۱۱-۱-۷- کاربرد نشانگرهای ریزماهواره‌ای در انگور	۱۸
۱-۱۱-۱-۷-۱- شناسایی ارقام و پایه‌های انگور	۱۸

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱-۱۱-۱-۷-۲- بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام سینونیم	۱۹
۱-۱۱-۱-۷-۳- تعیین شجره	۲۲
۱-۱۱-۱-۷-۴- ثبت، گواهی و حفاظت ارقام جدید انگور	۲۴
۱-۱۱-۱-۷-۵- مطالعات فیلوژنتیک	۲۵
۱-۱۱-۱-۷-۶- سایر کاربردها	۲۷
۱-۱۱-۲- نشانگرهای ریزماهواره کلروپلاستی	۲۸
۱-۱۱-۳- نشانگرهای AFLP	۲۹
۱-۱۱-۳-۱- مزایا و معایب روش AFLP	۲۹
۱-۱۱-۳-۲- کاربردهای نشانگر AFLP	۳۰
۱-۱۱-۳-۲-۱- بررسی تنوع ژنتیکی	۳۰
۱-۱۱-۳-۲-۲- انگشت نگاری و شناسایی ارقام سینونیم	۳۰
۱-۱۱-۳-۲-۳- بررسی اختلافات کلون‌های انگور	۳۱
۱-۱۲- اهداف پژوهش	۳۲
۲- مواد و روشها	
۲-۱- مواد گیاهی	۳۳
۲-۲- ارزیابی فنوتیپی	۳۳
۲-۲-۱ - صفات رویشی	۳۳
۲-۲-۲- صفات گل و میوه	۳۴
۲-۲-۳- صفات مهم زراعی	۳۴
۲-۲-۴- صفات کیفی میوه	۳۵
۲-۲-۵- ارزیابی ناهنجاری‌های فیزیولوژیک	۳۵
۲-۳- ارزیابی مولکولی	۳۵

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۲-۳-۱- استخراج DNA	۳۵
۲-۳-۲- اندازه‌گیری کیفیت و کمیتDNA	۳۷
۲-۳-۲-۱- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد	۳۷
۲-۳-۲-۲- روش اسپکتوفتومتری	۳۷
۲-۳- ۳- تجزیه ریزماهواره	۳۷
۲-۳- ۳-۱- آغازگرها	۳۷
۲-۳-۳-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	۴۳۹
۲-۳-۳-۳ -الکتروفورز	۴۰
۲-۳-۳-۴ - رنگ‌آمیزی	۴۰
۲-۳-۴ – تجزیهAFLP	۴۱
۲-۴- تجزیه و تحلیل داده‌ها	۴۲
۲-۴-۱- امتیازدهی نوارها	۴۲
۲-۴-۲- معیارهای ارزیابی کارآیی نشانگرهای ریزماهواره	۴۲
۲-۴-۳- تجزیه خوشه‌ای	۴۳
۳- نتایج و بحث	
۳-۱- ارزیابی صفات کمی و کیفی میوه ارقام زراعی انگور	۴۴
۳-۱-۱ – آمپلوگرافی ارقام زراعی انگور	۵۱
۳-۱-۲- گروه بندی ارقام زراعی انگور با استفاده داده‌های مورفولوژیک	۵۴
۳-۲- بررسی تنوع ارقام انگور بر اساس نشانگرهای ریزماهواره هسته‌ای	۵۷
۳-۲-۱- گروه بندی ارقام زراعی انگور بر اساس داده‌های مولکولی ریزماهواره	۶۰
۳-۲-۲- گروه بندی ارقام بر اساس الگوریتم Neibour-Joining و ضریب Shared allele	۶۰
۳-۲-۳- گروه بندی ارقام انگور بر اساس الگوریتم Neibour-Joining و ضریب Kimura ۲parameters	۶۲
۳-۳- بررسی تنوع ارقام انگور بر اساس نشانگرهای ریزماهواره کلروپلاستی	۶۶

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۳-۴- تعیین ارقام سینونیم و شجره انگورها با استفاده از نشانگرهای	۶۸
۳-۵- بررسی تنوع ارقام انگور با استفاده از نشانگرهایAFLP	۷۳
۳-۵-۱- تجزیه خوشه‌ای	۷۴
۳-۶- بررسی تنوع انگورهای وحشی	۷۹
۳-۶-۱- تجزیه ریزماهواره هسته‌ای	۸۰
۳-۶-۱-۱- آلل‌های اختصاصی برای انگورهای وحشی مناطق مختلف	۸۲
۳-۶-۱-۲- تجزیه واریانس مولکولی	۸۲
۳-۶-۱-۳- گروه بندی انگورهای وحشی بر اساس داده‌های ریزماهواره	۸۳
۳-۶-۲- تجزیه ریزماهواره‌های کلروپلاستی	۸۷
۳-۷- تنوع ارقام زراعی و ژنوتیپ های وحشی انگور	۸۷
۳-۷-۱- نشانگرهای ریزماهواره کلروپلاستی	۸۷
۳-۷-۲- نشانگرهای ریزماهواره هسته‌ای	۸۹
۳-۷-۳ - گروه بندی ارقام زراعی و ژنوتیپ‌های وحشی انگور	۸۹
۳-۸- تجزیه ارتباط بین داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی در ارقام انگور	۹۴
۳-۸-۱- ارتباط نشانگرهای ریزماهواره‌ای و صفات زراعی	۹۴
۳-۸-۲- ارتباط نشانگرهای AFLP و صفات زراعی	۹۸
نتیجه گیری نهایی	۱۰۴
پیشنهادات	۱۰۵
منابع مورد استفاده	۱۰۶
ضمایم	۱۱۵

فهرست جدول ها

نام جدول	صفحه
جدول ۲-۱: نام و مشخصات آغازگرهای ریزماهواره هسته‌ای و کلروپلاستی	۳۸
جدول ۲-۲: اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر جایگاه های ریزماهواره	۳۹
جدول ۲-۳: نام و توالی آغازگرهای تجزیه AFLP	۴۲
جدول۳-۱: تجزیه واریانس صفات کمی و کیفی میوه ارقام زراعی انگور	۴۵
جدول ۳-۲:. مقایسه صفات مورد ارزیابی در ارقام زراعی انگور بر اساس میانگین ۳ سال	۴۷
جدول ۳-۳: پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در ارقام زراعی انگور	۵۸
جدول۳-۴ : اسامی ارقام انگور زراعی مورد مطالعه و نوع هاپلوتیپ آنها بر اساس دو نشانگر	۶۸
جدول ۳-۵: اندازه آلل، فراوانی و تنوع ژنی جایگاه های ریزماهواره کلروپلاستی در ارقام انگور	۶۸
جدول۳-۶ : اندازه آللهای ریزماهواره در۲۳ جایگاه ریزماهواره هسته ای و دو جایگاه کلروپلاستی	۷۱
جدول۳-۷ : اندازه آللهای ریزماهواره در ۲۳ جایگاه ریزماهواره هسته ای و دو جایگاه کلروپلاستی	۷۲
جدول ۳-۸: تعداد کل قطعات و تعداد قطعات چند شکل، تنوع ژنی و تعداد آلل موثر به ازای هر جفت	۷۳
جدول ۳-۹: لیست جمعیت انگور وحشی، کد و تعداد نمونه های مورد مطالعه با موقعیت جغرافیایی	۷۹
جدول ۳-۱۰: پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در بررسی انگورهای وحشی	۸۱
جدول ۳-۱۱ :آلل های اختصاصی شناسایی شده یرای انگورهای وحشی مناطق مختلف	۸۲
جدول ۳-۱۲: تجزیه واریانس مولکولی برای تفکیک واریانس مولکولی کل به اجزاء بین و درون	۸۳
جدول۳-۱۳: تعداد و فراوانی هاپلوتیپ های ریزماهواره کلروپلاستی در ژنوتیپ های انگورهای وحشی	۸۷
جدول ۳-۱۴: تجزیه واریانس رگرسیون برای آزمون ارتباط ژنوتیپ	۹۵
جدول ۳-۱۵: نام و و ضریب رگرسیون نشانگرهای ریزماهواره مثبت شناسایی شده برای صفات زراعی	۹۶
جدول ۳-۱۶: تجزیه واریانس رگرسیون برای آزمون ارتباط ژنوتیپ (بر اساس نشانگرهای AFLP)	۹۹
جدول ۳-۱۷: نام و ضریب رگرسیون نشانگرهای AFLP مثبت شناسایی شده برای صفات زراعی	۱۰۰
جدول ۳-۱۸: روابط مثبت و منفی نشانگرهای حاصله از هر ترکیب آغازگری AFLP با صفات مختلف	۱۰۲
جدول۴-۱: صفات مورفولوژیکی اندازه گیری شده در ارقام زراعی انگور	۱۱۵
جدول ۴-۲: اسامی ارقام زراعی و ژنوتیپ های وحشی انگور مورد مطالعه	۱۲۶

فهرست شکلها

عنوان شکل	صفحه
شکل ۱-۱. شجره ۹ رقم انگور اروپایی بر اساس تجزیه ریزماهواره	۲۳
شکل۳-۱: نمودار فراوانی تعدادی از صفات مورفولوژیک در ارقام انگور زراعی مورد بررسی	۵۲
شکل ۳-۲: گروه بندی ارقام زراعی انگور مورد مطالعه بر اساس داده های آمپلوگرافی با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله Juke Cantor	۵۶
شکل ۳-۳: الگوی نواری تعدادی از آغازگرهای ریزماهواره هسته ای در ارقام زراعی و ژنوتیپ های انگور	۵۷
شکل ۳-۴: گروه بندی ارقام انگور زراعی مورد مطالعه با استفاده داده های ریزماهواره و بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب Shared allele	۶۳
شکل ۳-۵: گروه بندی ارقام انگور زراعی مورد مطالعه بر اساس داده های ریزماهواره با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله Kimura 2parameters	۶۵
شکل ۳-۶: روابط والد – نتاج احتمالی بین ارقام انگور ایرانی مورد مطالعه	۶۶
شکل۳-۷: گروه بندی ارقام انگور مورد مطالعه بر اساس داده های AFLP با استفاده از الگوریتم Nieghbor-Joining با ضریب Juke Cantor	۷۸
شکل ۳-۸: گروه بندی انگورهای وحشی مورد مطالعه با استفاده از داده های ریزماهواره و بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب راجر	۸۵
شکل۳-۹: گروه بندی انگورهای وحشی مورد مطالعه با استفاده از داده های ریزماهواره و بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب P-distance	۸۶
شکل ۳-۱۰: گروه بندی انگورهای زراعی و وحشی مورد مطالعه با استفاده از داده های ریزماهواره و بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining با ضریب Shared allele	۹۱
شکل ۳-۱۱:گروه بندی انگورهای زراعی و وحشی مورد مطالعه با استفاده از داده های ریزماهواره و بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining با ضریب Juke cantor	۹۳

مقدمه

مقدمه

انگور به علت داشتن مصارف متعدد به عنوان یک منبع مهم غذایی همیشه مورد توجه بوده است و بدلیل تنوع ارقام و اهمیت اقتصادی آن مطالعات وسیعی در شناسایی ارقام و گونه‌ها و بهبود خصوصیات کمی و کیفی، مقاومت به آفات و بیماریها و تنش‌ها از طریق اصلاح ژنتیکی انجام گرفته است.

بر اساس آمارهای موجود تاکنون در حدود ۱۵۰۰۰-۵۰۰۰ رقم و چندین گونه مختلف انگور در سرتاسر دنیا شناسایی، نامگذاری و ارزیابی شده‌اند. ایران به عنوان یکی از مراکز پیدایش و پراکنش انگور در جهان از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. بطوریکه در مناطق مختلف، از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب، ارقام مختلف انگور وجود دارند. سابقه کشت انگور در ایران بسیار قدیمی است (کرمی، ۱۳۷۴).

در میان ارقام انگور ایرانی، فقط ارقامی با کیفیت مطلوب برای مصارف تازه خوری، تهیه کشمش و صنایع فرآوری نظر باغداران را به خود جلب کرده است و بقیه ارقام کمتر مورد توجه و کشت و کار قرار گرفته‌اند. چه بسا این ارقام احتمالاً دارای ژن‌های مفیدی باشند که همراه با گونه‌های مختلف انگور می توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود. شناسایی دقیق ارقام و گونه‌های موجود در کشور، یکی از اهداف اولیه و در واقع قدم اول در شروع برنامه‌های اصلاحی انگور است. بدلیل توسعه کشت ارقام مشهور داخلی مانند بیدانه در حال حاضر ایران با مشکل فرسایش ژرم پلاسم بومی روبرو می‌باشد. گرچه این فرسایش از خیلی وقت پیش روی داده است. منشاء ارقام انگور ایرانی هنوز مشخص نیست، اما با توجه به وجود جمعیت‌هایی از انگورهای وحشی در شمال و شمال غرب ایران، احتمال دارد که تعدادی از ارقام زراعی مستقیما از طریق اهلی شدن انگورهای وحشی حاصل شده باشند (ارقام بومی)[1]. همچنین تعدادی ارقام نیز ممکن است از مناطق دیگر وارد شده (ارقام غیر بومی)[2] و یا از تلاقی این دو منبع حاصل شده باشند (کارینو و همکاران، ۲۰۰۴).

شناخت دقیق و قابل اعتماد ارقام در مدیریت صحیح ژرم پلاسم، گواهی نهال توسط خزانه‌داران، ایجاد باغات یکدست، انتخاب والدها برای تلاقی‌های کنترل شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعه روابط بین انگورها از لحاظ اهلی شدن و تکامل و همچنین از بعد فیلوژنتیک در چند دهه گذشته بیشتر از طریق آمپلوگرافی[3] و نشانگرهای بیوشیمیایی (چند شکلی پروتئین، آنتوسیانین) انجام گرفته است. ولی بواسطه تاثیر عوامل طبیعی، مکان، نوع امور داشت و مراحل نموی گیاه روی این صفات، شناسایی های انجام گرفته زیاد دقیق و قابل اعتماد نمی‌باشند (کریسپان و همکاران، ۱۹۹۹). از طرف دیگر امروزه ارقام زیادی به علل مختلف مانند مهاجرت از منشاء اصلی خود جدا شده و در جاهای دیگر با اسامی

---

[1] - Autochthonous cultivars
[2] - Alochthonous cultivars
[3] - Ampelography

متفاوت کاشته شده‌اند که مشکل ارقام هم نام با ساختار ژنتیکی متفاوت[1] و یا ارقام یکسان با اسامی مختلف[2] را به وجود آورده است که در عمل، کارهای تحقیقاتی و گواهی نهال را دچار مشکل کرده است. همچنین شناسایی و متمایز کردن ارقام بسیار نزدیک به هم و یا کلون از همدیگر عملاً از طریق صفات گیاه شناسی امکان پذیر نیست. امروزه با بکارگیری نشانگرهای DNA [3] (که تفاوت افراد را در سطح مادهٔ ژنتیکی نشان داده و تحت تاثیر عوامل محیطی قرار نمی‌گیرد) بهمراه داده‌های مورفولوژیک، امکان شناسایی دقیق ارقام و متمایز کردن ارقام بسیار نزدیک به هم را میسر کرده است. همچنین امروزه بر اساس اطلاعات حاصله از روش‌های مولکولی تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام، شناسایی والدین برای تلاقی، تهیه نقشه های ژنتیکی و تعیین ارتباط ژنتیکی بین انگورهای وحشی و زراعی امکان پذیر شده است.

استان آذربایجان غربی دارای تنوع بالایی از انگورهای زراعی و وحشی می‌باشد. شناخت و ارزیابی صفات مختلف آنها چه از بعد گیاهشناسی، باغبانی و ژنتیکی و بررسی ارتباط ژنتیکی انگورهای وحشی و زراعی از بعد برنامه های بهزراعی و بهنژادی و گواهی نهال بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

به منظور شناسایی دقیق ارقام انگور، تعیین تنوع ژنتیکی آنها، شناسایی انگورهای وحشی و ارتباط آنها با ارقام زراعی این تحقیق در سه بخش به اجرا درآمد.

بخش اول) شناسایی انگورهای زراعی و وحشی منطقه بر اساس دیسکریپتور جدید و یافتن ارقام هم نام

بخش دوم) ارزیابی صفات مهم زراعی

بخش سوم) مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام و روابط تکاملی آنها با انگورهای وحشی از طریق نشانگرهای ریزماهواره هسته‌ای، کلروپلاستی و AFLP. همچنین ارتباط داده‌های حاصله از مطالعات مولکولی با صفات زراعی مهم انگور

---

[1]- Homonym
[2] - Synonym
[3] - DNA markers

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- شناسایی مورفولوژیکی و اهمیت حفظ ژرم پلاسم انگور

روش‌های مرسوم شناسایی و متمایز کردن ارقام انگور بر اساس آمپلوگرافی(اندازه گیری کیفی) و آمپلومتری[1](اندازه گیری کمی) می‌باشند که بر اساس تفاوتهای مورفولوژیکی بین ارقام عمل می‌کنند. شناسایی ارقام انگور با روش آمپلوگرافی کاملاً قابل اعتماد و دقیق نمی‌باشد و در برخی موارد اشتباهاتی رخ می‌دهد. زیرا صفات گیاهشناسی و مواد شیمیایی اندازه‌گیری شده در گیاه علاوه بر ساختار ژنتیکی گیاه بسته به عوامل محیطی، محل، داشت و مرحله نموی تفاوت می‌کند بطوریکه گاهی کارشناسان آمپلوگرافی روی شناسایی یک گیاه با هم اختلاف نظر دارند. در حالیکه شناسایی بر پایه ژنوم گیاه از طریق نشانگرهای DNA بسیار دقیقتر بوده و تحت تاثیر عوامل فوق‌الذکر قرار نمی‌گیرد. همچنین این روش‌ها تشخیص ارقام بسیار نزدیک به هم و یا کلون ها را از همدیگر امکان پذیر می‌سازند.

با توجه به اینکه در اغلب کلکسیون‌های نگهداری انگور در دنیا علاوه بر ارقام مختلف گونه وینیفرا سایر گونه‌های انگور نیز نگهداری می‌شوند، بنابراین، برای اینکه این کلکسیون‌ها یک منبع قابل اعتماد و دقیق ژرم‌پلاسم انگور برای برنامه‌های اصلاحی و زراعی باشند، شناسایی ارقام و گونه‌های موجود ضروری می‌باشد.

یک برنامه منطقی اصلاحی نیاز به اطلاعاتی جامع از ژنوتیپ‌هایی دارد که به عنوان والد انتخاب می شوند به عبارت دیگر ارقام یک ژرم‌پلاسم زمانی برای اصلاحگران بیشتر مثمر ثمر خواهند بودکه اطلاعات مربوط به صفات و خصوصیات آنها در دسترس باشند. یافته‌های اخیر در مورد انگور قدیمی Heunisch weiss ارزش بالای حفظ ژرم‌پلاسم را نشان داد. این انگور به طور وسیعی در اروپای مرکزی پراکنده است و مشخص شده که به طور مستقیم (به عنوان والد) یا غیر مستقیم به صورت جد ۷۶ رقم انگور امروزی می‌باشد. این انگور همراه با انگور Pinot والد حداقل ۱۶ رقم انگور مشهور از جمله شاردونی می‌باشد (دیتویلر و ایباچ، ۲۰۰۳).

از ۶۰۰۰ رقم انگور ثبت شده در دنیا فقط ۴۰۰ رقم از ارزش اقتصادی برخوردار هستند و بقیه در کلکسیونها نگهداری می‌شوند. انگور بدلیل تکثیر رویشی آسان به راحتی در مناطق مختلف جهان انتشار و توسعه یافته است و یک رقم در جاهای مختلف اسامی جدیدی دریافت کرده است. به طوری که در حال حاضر تعدادی از ارقام بیش از ۱۰۰ اسم دارند و یا یک اسم به چندین رقم تعلق گرفته است (WWW.genres.de/idb/vitis/). شناسایی دقیق ارقام انگور یک نیاز اصلی و با اهمیت برای مدیریت منطقی و استفاده از ژرم پلاسم است. مشخص کردن سینونیم‌ها، همونیم‌ها و نامگذاری‌های اشتباه جزء مشکلات اساسی کلکسیون‌های انگور در جهان می‌باشد (دیتویلر و ایباچ، ۲۰۰۳).

---

[1] - Ampelometery

بدلیل اینکه ژرم‌پلاسم انگور از لحاظ تاریخی همراه مهاجرت‌های انسان نیز به حرکت در آمده است، تنوع ژنتیکی این گیاه نیز روند خاصی ندارد و منشاء جغرافیایی تعداد زیادی از ارقام هنوز مشخص نیست. علاوه بر این، هم نامی‌های شناخته شده و ناشناس در انگورهایی که به مناطق با زبان مختلف وارد شده‌اند، اتفاق افتاده است. بطوریکه در برخی موارد اسامی از لحاظ تلفظ اندکی تغییر کرده در حالیکه در برخی حالات رقم، یک نام کاملا جدید در مکان مستقر شده جدید دریافت کرده است. مثلا انگور سلطانی، در آمریکا Thampson seedless ، در استرالیا Sultana و در اروپا Sultanina خوانده می شوند وکشمشی نیز جزو اسامی است که گاها" به این انگور بیدانه اطلاق می‌شود اما دانگل و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای مشخص کردندکه همنامی بین کشمشی و این ارقام وجود ندارد و این گروه از انگورها به صورت ارقام جدا و در گروه‌های متفاوتی قرار دارند.

امروزه بدلیل وجود بیماریهای خطرناک مانند فیلوکسرا، بلایای طبیعی و همچنین انتخاب ارقام با صفات مطلوب، سایر ارقام بومی و قدیمی به تدریج از بین رفته‌اند و یا در حال حذف شدن می‌باشند. فرسایش ژنتیکی و کاهش تنوع جزء مشکلات اساسی اغلب کشورها می‌باشد. بر این اساس شناسایی و حفظ آنها از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از مشکلات عدیده در باغات کلکسیون انگور، عدم اطمینان از شبیه به اصل بودن ارقام است. برای حل این مشکل ارگانهای مختلف جهانی از طرق مختلف گام در حل این مشکل گذاشته‌اند. موسسه اصلاح انگور گایلرهوف آلمان از سال ۱۹۸۳ و با حمایت بانک ژن جهانی شروع به جمع آوری گونه‌ها، ارقام و ژنوتیپ های انگور از سراسر دنیا کرده است و بانک اطلاعاتی شامل خصوصیات گیاهشناسی بر اساس توصیف‌نامه IPGRI [1]، ارزیابی صفات مختلف و پروفیل ژنتیکی بر اساس شش جفت نشانگر ریزماهواره معروف به Genres تهیه کرده است. در سایت اینترنتی (http://www.dainet.de/genres/idb/vitis) امکان یافتن اسامی مختلف یک رقم وجود دارد (دیتویلر و ایباچ، ۲۰۰۳).

۱-۲- تاریخچه انگور

در حال حاضر منشاء اغلب ارقام انگور موجود مورد بحث کارشناسان می‌باشد. بویژه هیچ توافقی در مورد مرکز اولیه اهلی شدن انگور از انگور وحشی و یا مراکز ثانویه وجود ندارد. زوهاری و هوفس (۱۹۹۳) بر اساس مطالعات جغرافیای گیاهی و باستان شناسی، ناحیه خاور نزدیک را به عنوان مرکز اولیه انگور در نظر گرفتند. براساس مطالعات باستان شناسی گیاهی پیشنهاد شده است که اهلی شدن انگور ابتدا در نیمه دوم هزاره چهارم قبل از میلاد مسیح در دو ناحیه هم جوار، ناحیه مزوپوتامیا [2] (شامل جنوب آناتولی، سوریه، شمال لبنان، کردستان و غرب ایران) و جنوب دریای خزر اتفاق افتاده است. در ابتدا

[1] - International Plant Genetic Resources Institute

[2] - Mezopotamia

انگورهای اهلی به نواحی جنوب شرقی مدیترانه (فلسطین و اردن) توسعه یافت پس از آن انگورهای اهلی در نیمه اول هزاره سوم در آسیای صغیر، جنوب یونان و قبرس دیده شدند. در شروع هزاره دوم انگور در بالکان و در نیمه دوم همین هزاره در جنوب ایتالیا و در نیمه دوم هزاره اول در شمال ایتالیا، جنوب فرانسه، اسپانیا و پرتغال ظاهر شده است (لابرا و همکاران، ۲۰۰۲).

درباره منشاء و نحوه پراکنده شدن ارقام زراعی انگور دانسته‌های موجود بسیار کم می‌باشد. کلیه ارقام قدیمی انگور از اجداد وحشی خود اهلی شده‌اند. توزیع انگور وحشی در جنوب غربی آسیا، قسمت‌های شمالی آفریقا، مرکز وجنوب اروپا می‌باشد. بر طبق تئوری واویلوف اهلی شدن انگور وینیفرا ابتدا در ناحیه دریای خزر اتفاق افتاده است که در آنجا بالاترین تنوع ژنتیکی مشاهده شده است. اطلاعات باستان شناسی شامل پیدا شدن بذور انگورهای زراعی مربوط به هزاره چهارم قبل از میلاد در خاورمیانه و همچنین شواهدی مربوط به تولید شراب در ایران در هزاره ششم قبل از میلاد، نیز تاحدودی این نظر را تائید می‌کنند (مک گورن، ۲۰۰۳). در حال حاضر سه احتمال قابل بحث در مورد اهلی شدن انگور وجود دارد: ۱) انگور ویتیس وینیفرا در جنوب غربی آسیا اهلی شده است و سپس در ناحیه مدیترانه و اروپا پراکنده شده است، ۲) اهلی شدن چندین بار در مناطق مختلف اتفاق افتاده است و ۳) بعد از ورود ویتیس به اروپای غربی انگورهای اهلی شده با انگورهای وحشی سیلوستریس آن نواحی تلاقی یافته و ارقام جدیدی حاصل شده اند. در مورد انگورهای موجود در هر منطقه نیز چندین احتمال وجود دارد:۱) به طور مستقیم از طریق اهلی شدن انگورهای وحشی همان ناحیه حاصل شده‌اند، ۲) یا از سایر مناطق دیگر منتقل شده‌اند و یا ۳) از تلاقی دو منبع یاد شده حاصل شده‌اند (مانن و همکاران، ۲۰۰۳). توسعه روش‌های مولکولی بر اساس تجزیه DNA ابزارهای مناسبی برای مطالعات فیلوژنتیکی فراهم کرده است.

۱-۳- رده بندی و گیاهشناسی انگور

انگور متعلق به تیره تاکسانان[1] است که بیش از ۱۳ جنس و ۷۰۰ گونه دارد. گیاهان این تیره علفی یا چوبی هستند که از طریق برگهای مقابل پیچک که امکان ایجاد خوشه در همان موقعیت نیز هست، شناخته می‌شوند. گلها در این تیره کامل بوده و یا به صورت تک جنس نر و ماده دیده می‌شوند. در اغلب جنسهای انگور، گلها دو جنسه و اندازه و شکل برگها در داخل یک بوته می تواند متغیر باشد. جنسهای Vitis, Ampelopsis و Parthenocissus در نواحی معتدله رشد می‌کنند و مابقی جنس‌ها در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده می‌باشند (دولتی بانه، ۱۳۸۰).

مهمترین جنس این خانواده از لحاظ اقتصادی و غذایی جنس ویتیس است که شامل دو زیر جنس Euvitis با ۳۸ کروموزوم و زیر جنس Muscadinea با ۴۰ کروموزوم می‌باشد. زیر جنس موسکادین در

[1] - Vitacea

قاره آمریکا پراکنده است در حالیکه زیر جنس ایوویتیس دارای تعداد زیادی گونه در مناطق مختلف جهان می‌باشد (جانیک و جیمس، ۱۹۹۶).

۱-٤- گونه‌ها و ارقام انگور ایرانی

بر اساس گزارشات موجود در حدود ۱۰۰۰-۸۰۰ رقم انگور در ایران وجود دارد که تعدادی از این ارقام از اهمیت اقتصادی بالایی بویژه برای مصارف تازه خوری و تهیه کشمش برخوردار می‌باشند (زاهدی، ۱۳۷۵). از جمله ارقام مهم ایرانی می‌توان به کشمشی سفید، بیدانه قرمز، عسکری، یاقوتی، شاهرودی، شاهانی، ریش بابا، پیکانی، فخری، سیاه سردشت، صاحبی و چندین رقم دیگر اشاره کرد. تمامی انگورهای خوراکی ایران از انگورهای گونه وینیفرا می‌باشند. در ایران علاوه بر این گونه، دو نوع انگور شامل گونه لابروسکا در شمال کشور و انگورهای وحشی از زیر گونه سیلوستریس در جنگلهای شمال و مناطق مرطوب دامنه کوههای زاگرس نیز وجود دارند. انگور وحشی در جنگلهای شمال از گرگان تا ارسباران و دورود و سفید دشت لرستان شناسایی شده است. همچنین دو زیر گونه انگور وحشی *Vitis sylvestris* Gmelin Subsp anebophylla و *V.sylvestris* Gmelin Subsp trichophylla به ترتیب در جنگلهای بندر گز، گرگان، دشت نظیر، و دومی در دره چالوس و دشت نظیر گزارش شده است (ثابتی، ۱۳۵۰). پشت برگهای زیر گونه anebophylla دارای کرکهای بلند عنکبوتی که بعداً صاف می شوند ولی در زیر گونه trichophylla پشت برگ دارای کرکهای ساده است. ارزیابی صفات مورفولوژیک در این انگورها بسیار کم انجام شده است و هیچگونه اطلاعاتی در مورد تشابهات و یا اختلافات ژنتیکی این انگورها با انگورهای زراعی در ایران وجود ندارد. با این وجود، انگورهای وحشی به عنوان اجداد انگورهای زراعی امروزی بدلیل داشتن آلل‌های منحصر بفرد، یک منبع بالقوه برای اصلاح انگور می‌باشند. انگورهای وحشی بدلیل تحمل بسیار بالا به تنش های محیطی و مقاومت به برخی از آفات و بیماریها یک منبع مهم ژنتیکی به حساب می‌آیند.

انگور وحشی در طی زمان در معرض تغییرات شدید آبهوایی، بیماریهای مختلف و تنش‌های مختلف بوده‌اند و توانسته‌اند با سازگاری یک حاشیه امنیت طبیعی در خودشان بوجود آورند. بنابراین، احتمالا ژن‌های مربوط به مقاومت‌های مختلف را دارا می‌باشند. انگورهای وحشی با اسامی Ampeloargia, Lambrusca یا Landraces نیز نامیده می‌شوند. این انگورها از لحاظ صفات مختلفی از جمله جنسیت گل متفاوت از انگورهای زراعی می‌باشند (زوگلامی و همکاران، ۲۰۰۳).

اینچگلو و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی دانه‌های گرده دو نمونه از انگور وحشی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی نشان دادند که دو نمونه مورد آزمایش از لحاظ مورفولوژی گرده شبیه هم بودند و فقط یک اختلاف جزئی در شکل گرده (۳۰ گرده از هر نمونه) آنها وجود داشت. اوسته و

همکاران (۲۰۰۲) خصوصیات گیاهشناسی، وضعیت سلامتی و موقعیت اکولوژیکی جمعیت های انگور وحشی را در اسپانیا مورد مطالعه قرار دادند. از هر جمعیت چندین نمونه انگور از لحاظ صفات گیاهشناسی با استفاده از توصیف‌نامه IPGRI و آلودگی به آفات و بیماریها بررسی شدند. نتایج حاصله از آمپلوگرافی وجود تنوع ژنتیکی بالایی را نشان داد که این تنوع در میزان شدت آلودگی به آفات و بیماریها نیز مشاهده کردند که کلیدی برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی و شروع برنامه های اصلاحی مقاومت به آفات و بیماریها می‌باشند.

۱-۵- اهداف اصلاح انگور

تفاوت زیاد بین خصوصیات میوه ارقام مختلف انگور آنها را برای اصلاح گران جالب توجه کرده است. هدف عمده اغلب کارهای اصلاحی انگور، تولید ارقامی سازگار با مناطق مختلف با عملکرد بالا و کیفیت میوه مطلوب بسته به نوع مصرف انگور و نیز مقاومت به آفات و بیماریها می‌باشند. به عنوان مثال، برای انگورهای ویژه تازه خوری، صفاتی مانند زودرسی یا دیر رسی، اندازه بزرگ، رنگ و شکل حبه و ظاهر خوب با اهمیت است ولی برای نگهداری طولانی مدت در سردخانه و یا حمل و نقل، ارقامی با گوشت بسیار سفت، پوست ضخیم و اتصال قوی حبه به چوب خوشه مد نظر می‌باشند. ارقام مناسب برای تهیه کشمش و یا تولید آب میوه و سایر صنایع تبدیلی نیز باید صفات خاصی داشته باشند. بنابراین در برنامه های اصلاحی بسته به هدف، ارقام دارای صفات مورد نظر به عنوان والدین انتخاب خواهند شد.

انگور معمولا" در نیمکره شمالی بین عرضهای جغرافیایی ۲۰ و ۵۱ شمالی و در نیمکره جنوبی بین عرضهای ۲۰ و ۴۰ درجه جنوبی پرورش می‌یابد. عامل اصلی محدود کننده تولید انگور وینیفرا در این مناطق طول دوره فصل رشد و سرمای شدید زمستان است. در مناطق استوایی عامل محدود کننده کشت انگور وجود بیماریها، کافی نبودن سرما برای القا و یا شکستن خواب و همچنین دمای بالا در طی فصل رشد است.

بیشتر آفات انگور، بومی آمریکا هستند و بنابراین ارقام وینیفرا نسبت به آنها حساس می‌باشند و یا اینکه مقاومت اندکی دارند. از بیماریهای خسارت زا، سفیدک داخلی و سطحی هستند که در بین سالهای ۱۸۰۰ تا ۱۸۵۰ از آمریکا به اروپا منتقل شدند. تولید مواد فیتوآلکسین[1] در انگور با مقاومت آنها به سفیدک دروغی ارتباط دارد. بررسی تنوع تولید این مواد مانند وینیفرین[2] و استیلبن[3] در ارقام مختلف برای برنامه‌های اصلاحی انگور حائز اهمیت می‌باشد (جانیک و جیمس ۱۹۹۶).

---

[1] - Phytoalexine
[2] - Viniferin
[3] - Stilben