Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (197-207)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.253391.1411

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص ۲۰۷-۱۹۷)

ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های بومی مختلف انگور (*Vitis vinifera*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

میترا رازی[۱]، محمد اسماعیل امیری[۲*]، رضا درویش‌زاده[۳]، حامد دولتی بانه[٤] و پدرو مارتینز گومز[٥]

۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳. استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

٤. دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ارومیه، ارومیه، ایران

۵. استاد، مؤسسه تحقیقات CEBAS، اسپانیا

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۵)

چکیده

انگور یکی از مهمترین محصولات باغی است که به‌دلیل ارزش اقتصادی و غذایی آن به‌طور گسترده کشت می‌شود. به‌منظور دست‌یابی به ارقام جدید با عملکرد بالا و صفات کیفی بهتر، شناسایی ارقام موجود ضروری است. برخی از گونه‌های وحشی انگور در معرض فرسایش ژنتیکی قرار دارند؛ لذا تعیین تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های وحشی انگور به‌منظور توسعه برنامه‌های اصلاحی آینده انگور دارای اهمیت بالایی می‌باشد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۷۵ رقم و ژنوتیپ‌های وحشی انگور (*Vitis vinifera* L.) با استفاده از ۱۷ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۳۲ باند با استفاده از ۱۷ نشانگر ISSR تولید شد که از این تعداد ۷۵ باند (۵۷/۵۸٪) چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکل از ۲ در آغازگر UBC873 تا ۷ در آغازگر UBC836 متغیر بود. تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) از ۱/۷۲ در آغازگر UBC880 تا ۱/۱۸ در آغازگر UBC873 متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) آغازگرها بین ۰/٤۲ در آغازگر UBC880 و ۰/۱٤ در آغازگر UBC873 با میانگین ۰/۳۲ برآورد شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به‌روش تجزیه خوشه‌ایی بر اساس ماتریس تشابه Dice و با استفاده از الگوریتم Complete ارقام مورد مطالعه را در چهار گروه قرار داد. بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۷۳) بین ارقام جیغ‌جیغا و بلک‌سیدلس و همچنین بین آلفونسو و بلک‌سیدلس و کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۱) بین ارقام دسترچین و لعل‌سیاه مشاهده گردید. بر اساس شاخص شباهت ژنتیکی Nei، بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های خارجی و وحشی بود. آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون جمعیت‌ها و بین‌جمعیتی را به‌ترتیب ٦۱ درصد و ۳۹ درصد از کل تنوع نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنومی، تجزیه خوشه‌ای، نشانگرهای مولکولی.

Evaluation of genetic diversity in local cultivars and genotypes of grape (*Vitis vinifera*) using ISSR Markers

Mitra Razi[1], Mohammad Esmaeil Amiri[2*], Reza Darvishzadeh[3], Hamed Doulati Baneh[4] and P. Martinez-Gomez[5]
1, 2. Former Ph.D. Student and Professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4. Associate Professor, Horticulture Crop Research Department, Research and Education Centre of West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Centre, AREEO, Urmia, Iran
5. Professor, Research Center of CEBAS, Spain
(Received: Feb. 26, 2018 - Accepted: May 5, 2018)

ABSTRACT

Grape (*Vitis vinifera* L.) is an important fruit crop and widely cultivated because of its nutritional and economical values. For getting new cultivars with higher yield and better quality, it is essential to characterize the cultivars. Some wild species faced to genetic erosion, so determination of genetic diversity of grape cultivars and genotypes is an important task for improving breeding programs in the future. In this research genetic diversity among 75 cultivars and wild genotypes (*Vitis vinifera* L.) of grape with 17 ISSR primers was investigated. 132 bands were produced by 17 primer pairs, out of which 75 bands (57/58%) were polymorphic. The polymorphic bands ranged from 2 in locus UBC873 to 7 in locus UBC836. Effective number of allele (Ne), varied from 1.72 in locus UBC880 to 1.18 in UBC873. To identify the high informative retrotransposon primer combination, the amount of PIC were estimated for each primer which ranged from 0.14 for locus UBC873 to 0.42 for locus UBC880 with an average value of 0.32. Cluster analysis using Dice similarity coefficients and complete algorithm put the 75 studied genotypes in four different groups. The most genetic similarity (0.73) was observed between Jig Jiga and Black Seedless and also between Alphonse Lavallee and Black Seedless and the least genetic similarity (0.11) observed between Dastarchin and Lal Seyah. The maximum Nei genetic distance was belong to Foreign and Wild populations. The AMOVA result indicated that the within and among population diversity were 61% and 39% respectively.

Keywords: Cluster analysis, genomic diversity, molecular markers.

* Corresponding author E-mail: m-amiri@znu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انگور گیاهی از خانواده *Vitaceae* و از جنس *Vitis* است. تعداد گونه‌های انگور زیاد بوده و یکی از گونه‌های مهم این جنس، گونه *V. vinifera* می‌باشد. در ایران علاوه بر این گونه، دو نوع انگور شامل گونه *V. Labrusca* در شمال کشور و انگورهای وحشی از زیر گونه *V. vinifera* subsp.*sylvestris* در جنگل‌های شمال و مناطق مرطوب دامنه کوه‌های زاگرس نیز وجود دارند (Sabeti, 1976). انگور یکی از مهمترین میوه‌هایی است که از زمان‌های بسیار قدیم مورد استفاده بشر قرار گرفته است و جزو محصولات مهم باغبانی در جهان به‌شمار می‌رود. بر اساس مطالعات باستان‌شناسی مشخص شده است که ایران یکی از مراکز اهلی‌شدن انگور بوده است (McGovern, 2003). منشأ ارقام ایرانی هنوز مشخص نیست، احتمال دارد که تعدادی از ارقام بومی مستقیماً از طریق اهلی‌شدن انگورهای وحشی زیر گونه سیلوستریس (*V. vinifera* subsp.*sylvestris*) حاصل شده باشند یا به‌صورت ارقام غیربومی از مناطق دیگری وارد شده و یا از تلاقی ارقام بومی و غیربومی حاصل شده باشند (Doulati Baneh *et al.*, 2007a). بر اساس گزارش‌های موجود بین ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ ژنوتیپ انگور در ایران وجود دارد که تعدادی از آنها از اهمیت اقتصادی بالایی به‌ویژه برای مصارف تازه‌خوری و تهیه کشمش برخوردار هستند (Zahedi, 1996). به‌دلیل تنوع ارقام انگور و اهمیت اقتصادی آن، مطالعات وسیعی در شناسایی ارقام و گونه‌های جدید، بهبود خصوصیات مورفولوژیکی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و تنش‌ها از طریق به‌نژادی انجام گرفته است (Karami, 1996). نشانگرهای مولکولی به‌طور مستقیم قادرند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را مشخص نمایند (Ferguson *et al.*, 1995). برای ارزیابی تنوع ژنتیکی انگور، نشانگرهای مولکولی مختلفی مانند نشانگرهای RFLP (Bowers & Meredith, 1996)، RAPD (Grando & Frisinghelli, 1998)، AFLP (Cervera *et al.*, 1998)، SSR (Martinez *et al.*, 2006) و ISSR (Jing & Wang, 2013) استفاده شده است. در بین نشانگرهای موجود، نشانگر ISSR برای تجزیه‌وتحلیل تنوع ژنتیکی به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است (Sicard *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1990). این روش به DNA الگوی کمی نیاز داشته و به‌علت طول زیاد آغازگرها، دمای بالای اتصال، سرعت و سادگی کار به‌عنوان ابزاری با ارزش در تجزیه ژنوم گیاهان مطرح است (Ammiraju *et al.*, 2001).

در مطالعه‌ای Tamhankar *et al.* (2008) تنوع ژنتیکی ۱۴۳ رقم و پایه انگور را با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای، ارقام گونه‌های *V. vinifera* و *V. Labrusca* را از هم متمایز نمود و ۲۶ پایه انگور بررسی‌شده در این مطالعه نیز بر اساس گونه‌هایی که منشأ گرفته بودند به ۳ گروه مجزا گروه‌بندی شدند. در این مطالعه ارقام گونه *V. vinifera* تنوع بیشتری از ارقام گونه *V. Labrusca* نشان دادند. در مطالعه دیگری، ارزیابی روابط ژنتیکی ۴۳ رقم انگور در هند با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد و بر اساس نتایج به‌دست آمده ۱۳۹ باند با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR تولید شد که از این تعداد ۹۶ باند چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای ISSR نیز توانست ارقام گونه *V. vinifera* و *V. labrusca* را از هم متمایز نماید (Dhanorkar *et al.*, 2005). ۴۳ واریته انگور بی‌دانه (*Vitis vinifera*) نیز با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR ارزیابی شدند و از مجموع ۱۱۹ باند تولیدشده، ۷۹ درصد از باندها چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ایی بر اساس UPGMA تشابه ژنتیکی بالایی را بین ارقام مورد مطالعه نشان داد. گروه‌بندی کلی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و شجره‌نامه بود که ثابت‌کننده سودمندی مارکرهای ISSR برای ارزیابی روابط ژنتیکی در میان ارقام انگور بود (Argade *et al.*, 2009). Choudhary *et al.* (2014) نیز از ۱۰ نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۴ رقم انگور استفاده کردند، در کل ۸۶ باند تولیدشد که ۵۶ باند چندشکل بودند، نتایج آنها همچنین نشان داد که قدرت حل و فصل پرایمرهای ISSR مابین ۳ و ۱۰، ارزش PIC از ۰/۷۸ تا ۰/۸۸ و شاخص نشانگر (MI) از ۳/۸۹ تا ۸/۸۰ با ارزش متوسط ۶/۱۴ و ۶/۸۸ به‌ترتیب قرار گرفته‌اند. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم انگور شهرستان شاهرود و ۳ رقم انگور شهر سی‌سخت با استفاده از ۶

www.SID.ir

Archive of SID

آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۶۹ باند تولید شد که از این تعداد ۶۵ باند چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها ۹۴/۱ درصد برآورد گردید (Keshavarz Khoob *et al.*, 2016).

تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه و اساسی برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی است و اهمیت زیادی در پژوهش‌های ژنتیک و برنامه‌های به‌نژادی دارد. با توجه به مطالب فوق و اینکه استفاده از نشانگرهای ISSR یک روش بر پایه ریزماهواره‌ها است و به اطلاعات اولیه در زمینه ژنوم و طراحی آغازگرها نیاز ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چند جایگاهی و چند شکل می‌شود (Askari *et al.*, 2011; Ghasemi *et al.*, 2010; Zamani *et al.*, 2015; Zamani *et al.*, 2011) تحقیق حاضر با هدف بررسی کارایی نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ۷۵ ژنوتیپ انگور منطقه آذربایجان‌غربی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

در این تحقیق از ۷۵ رقم و ژنوتیپ بومی انگور شامل ۵۰ رقم زراعی و ۱۴ رقم خارجی و ۱۱ ژنوتیپ وحشی موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی استفاده گردید. از هر رقم و ژنوتیپ انگور یک بوته انتخاب شده و تعداد ۱۰-۵ برگ جوان (۵-۲ سانتی‌متر) بدون دمبرگ برداشته شدند و در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ارقام انگور مورد مطالعه در این بررسی از گونه *V. vinifera* و یا از دورگ بین‌گونه‌ای *V. berlandieri* × *V. rupestris* یا *V. berlandieri* × *V. riparia* و ژنوتیپ‌های وحشی نیز از گونه *V. vinifera* subsp.*sylvestris* هستند. خصوصیات ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات نمونه‌های انگور مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای ISSR

Table 1. Characteristic of grape genotypes employed in investigating genetic diversity using ISSR markers

Genotype	Species	Origin	Use	Seed	Genotype	Species	Origin	Use	Seed
Rezghi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Klkarevi	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes
Hosseini	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Sachakh	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes
Tabarze Sefid	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Shirazi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes
Saghal Solian	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Angotka	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes
At Ouzum	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Khoshnav	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes
Lal Seyah	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Rasha	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes
Seyah Sardasht	*V. Vinifera*	Iran	Table,Raisin	Yes	Khalili Shiraz	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes
Garmian	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Paykani	*V. Vinifera*	Iran	Table, Raisin	Yes
Maiemo	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Ekozgozi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes
Rishbaba Qermez	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Paulsen	*V. berlandieri*×*V. rupestris*	Australia	Rootstock	-
Taifi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Ruby Seedless	*V. Vinifera*	America	Table	No
Keshmeshi Qermez	*V. Vinifera*	Iran	Table	No	Superior	*V. Vinifera*	America	Table	No
Fakhri	*V. Vinifera*	Iran	Table, Raisin	Yes	Thompson Seedless	*V. Vinifera*	Iran	Table, Raisin	No
Shahroudi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Muscat of Alexandria	*V. Vinifera*	Africa	Table	Yes
Qara Shani	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Labrusca	*V. Labrusca*	America	Table	Yes
Sahebi Qermez	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	5 BB Kober	*V. berlandieri*×*V. riparia*	America	Rootstock	-
Inah Amjai	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Perllete	*V. Vinifera*	America	Table	No
Tabarze Qermez	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Flame Seedless	*V. Vinifera*	America	Table	No
Dastarchin	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Alphonse Lavallee	*V. Vinifera*	France	Table	Yes
Rishbaba Sefid	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Black Seedless	*V. Vinifera*	America	Table, Raisin	No
Agh Melhi	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Fiesta	*V. Vinifera*	America	Raisin	No
Goi Melki	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	*H6	*V. Vinifera* × Kober 5BB	Hybrid	Rootstock	-
Sayani	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	*H4	*V. Vinifera* × *V. riparia*	Hybrid	Rootstck	-
Kalati	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Piranshahr-1	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Piranshahr-Iran	Wild	-
Mam Braima	*V. Vinifera*	Iran	Table, Raisin	Yes	Piranshahr-2	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Piranshahr-Iran	Wild	-
Bol Mazu	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Piranshahr-3	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Piranshahr-Iran	Wild	-
Lal Qermez	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Piranshahr-4	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Piranshahr-Iran	Wild	-
Sefid Shakh Shakh	*V. Vinifera*	Iran	Juice	No	Sardasht-1	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Alhaghi	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes	Sardasht-2	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Askari	*V. Vinifera*	Iran	Table	No	Sardasht-3	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Bidane Sefid	*V. Vinifera*	Iran	Table, Raisin	No	Sardasht-7	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Rejin	*V. Vinifera*	Iran	Juice	No	Sardasht-15	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Sarghola	*V. Vinifera*	Iran	Raisin	Yes	Sardasht-16	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Ghavaga	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes	Sardasht-17	*V. vinifera* subsp.*sylvestris*	Sardasht-Iran	Wild	-
Yaghoti	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes					
Qara Gandoma	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes					
Gazandaii	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes					
Qzl Ouzum	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes					
Agh Shani	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes					
Jig Jiga	*V. Vinifera*	Iran	Juice	Yes					
Lal Sefid	*V. Vinifera*	Iran	Table	Yes					

هیبرید H4: جیغ‌جیغا × ریپاریا گلویر، هیبرید H6: قره‌اوزوم × کوبر.

*: H4: (*V. vinifera* cv. "Jig jiga" × "Riparia Gloire"), H6: (*V. vinifera* cv. "Qara Ouzum" × "Kober 5BB")

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA

استخراج DNAی ژنومی به‌روش CTAB بر اساس روش Doyle & Doyle (1987) انجام شد. پس از استخراج DNA کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۵ درصد در بافر ۰/۵TBE x و کمیت آنها با استفاده از روش اسپکترفتومتری تعیین شد. محلول‌های پایه DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این پژوهش از ۱۷ آغازگر سنتزشده توسط شرکت سیناکلون استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۳۰ نانوگرم DNAی ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۰/۷ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP، ۱/۱ واحد آنزیم تگ‌پلی‌مراز (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومول از هر آغازگر به‌همراه آب دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler 5331, Eppendorf) انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌صورت: ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (جهت واسرشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (جهت اتصال آغازگر) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود (Zietkiewicz *et al*., 1994).

الکتروفورز فرآورده های PCR

به‌منظور تفکیک محصولات PCR مربوط به نشانگرهای ISSR از ژل آگارز ۱/۷ درصد استفاده شد. نمونه‌ها با ولتاژ ثابت ۷۰ به‌مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوی باندی حاصل، براساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها، به‌صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزارهای NTSYS-pc (Rohlf, 2000) و GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به‌منظور بررسی تمایز و تفکیک جمعیت‌های انگور (ژنوتیپ‌های وحشی، ارقام زراعی داخلی و ارقام زراعی خارجی) با استفاده از نشانگرهای ISSR، تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenALEx انجام گرفت. فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها (ژنوتیپ‌های وحشی، ارقام زراعی داخلی و ارقام زراعی خارجی) بر اساس ضریب فاصله نی[1] محاسبه گردید.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های انگور با نشانگرهای ISSR

Table 2. Primer used for the ISSR analysis in investigating genetic diversity of grape cultivars and genotypes

Primer	Sequence formula	(5′→3′ Primer sequence)	Annealing temperature (C°)
UBC 807	(AG)8T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
UBC 809	(AG)8G	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52
UBC 812	(GA)8A	GAGAGAGAGAGAGAGAA	45
UBC 816	(CA)8T	CACACACACACACACAT	47
UBC 817	(CA)8A	CACACACACACACACAA	47
UBC 825	(AC)8T	ACACACACACACACACT	50
UBC 826	(AC)8C	ACACACACACACACACAC	50
UBC 827	(AC)8G	ACACACACACACACACG	50
UBC 834	(AG)8YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52
UBC 836	(AG)YA	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	50
UBC 855	(AC)8YT	ACACACACACACACACYT	54
UBC 857	(AC)8YG	ACACACACACACACACYG	52
UBC 864	(ATG)6	ATGATGATGATGATGATG	52
UBC 873	(GACA)4	GACAGACAGACAGACA	52
UBC 880	(GGAGA)3	GGAGAGGAGAGGAGA	48
UBC 890	VHV(GT)7	VHVGTGTGTGTGTGTGT	52
A12	(GA)6CC	GAGAGAGAGAGACC	45

1. Nei

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

مشاهده الگوهای باندی ISSR

با ۱۷ آغازگر گزینش‌شده در این تحقیق، در کل ۱۳۲ مکان تکثیر شدند که ۷۵ مکان چند شکل بودند. الگوی نواری نشانگر UBC855 در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین تعداد باندهای تکثیرشده به‌ازای هر آغازگر ۷/۷۶ و میانگین تعداد باندهای چند شکل برای هر آغازگر ۴/۴۱ بود. بیشترین و کمترین مکان چندشکل به‌ترتیب مربوط به آغازگر UBC 836 با ۷ مکان و آغازگر UBC 873 با ۲ مکان بود (جدول ۳). در تحقیقی از ۸ آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۵ ژنوتیپ انگور استفاده گردید که در بین آغازگرهای مورد استفاده بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر UBC825 گزارش شد (Keshavarz Khoob *et al.*, 2016). آغازگرهایی که دارای بازهای لنگر[1] در انتهای ´۳ می‌باشند، اختصاصی عمل کرده و الگوی باندی با تعداد کمتر ولی با وضوح بالاتر تولید می‌کنند (Reddy *et al.*, 2002). گزارش شده است که آغازگرهای با باز اضافی (AG)، (GA)، (CT)، (TC)، (AC) و (CA) چندشکلی بالاتری از آغازگرهای با باز اضافی (AT) آشکار می‌نمایند (Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Tsumura *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). در مطالعه‌ای با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی ارقام انگور بررسی شد و میزان چندشکلی ۵۳/۹۳ درصد گزارش گردید (Hassan *et al.*, 2011). در مطالعه Jing & Wang (2013) روی ۷۰ رقم انگور، میزان چندشکلی با استفاده از نشانگرهای ISSR برابر ۹۹/۱۶ درصد بود. در آزمایش دیگری از ۱۰ آغازگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۴ رقم انگور ناناصاحب، سوناکا، تامسون سیدلس و گانش استفاده شد و از میان ۸۶ باند تکثیرشده ۵۶ باند (۶۵/۱۱ درصد) چندشکلی نشان دادند (Choudhary *et al.*, 2014).

در این مطالعه به‌منظور ارزیابی کارآیی این نشانگر، معیارهای مختلفی از قبیل تعداد باندهای چندشکل، تعداد آلل مؤثر، ارزش شانون و شاخص اطلاعات محاسبه گردید. در مجموع با آغازگرهای مورد استفاده ۳۳ نشانگر مشاهده شد و میانگین تعداد نشانگر به‌ازای هر آغازگر ۱/۹۵ محاسبه گردید. تعداد آلل مؤثر از ۱/۷۲ در آغازگر UBC880 تا ۱/۱۸ در آغازگر UBC873 متغییر و با میانگین ۱/۵۲ بود. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) بین ۰/۴۲ (UBC880) و ۰/۱۴ (UBC873) متغییر و با میانگین ۰/۳۲ به‌دست آمد. PIC بالاتر برای هر آغازگر، بیانگر کارآیی بالای آن در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق می‌باشد و نشان‌دهنده سودمندی آنها برای بررسی تنوع ژنتیکی انگور می‌باشد. ضریب شانون بیانگر میزان پلی‌مورفیسم در بین ژنوتیپ‌ها است (Shannon, 1948). در این تحقیق آغازگر UBC 880 با شاخص شانون برابر با ۰/۶۱دارای بیشترین مقدار بود که نشان‌دهنده این است که آغازگر فوق می‌تواند تنوع ژنتیکی درون‌جمعیتی را بهتر توجیه نماید.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۶۱ درصد تنوع برآوردشده مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها و ۳۹ درصد مربوط به بین جمعیت‌های انگور مورد مطالعه می‌باشد (جدول ۴). تنوع ژنتیکی زیاد درون‌توده‌ای می‌تواند ناشی از خصلت دگرگرده افشانی تعدادی از ارقام ماده فیزیولوژیک و همچنین ژنوتیپ‌های وحشی که به‌صورت تک‌پایه هستند باشد. این نتایج نشان می‌دهد که به‌منظور یافتن منابع تنوع در برنامه‌های به‌نژادی انگور، می‌توان انتخاب را درون جمعیت‌ها انجام داد.

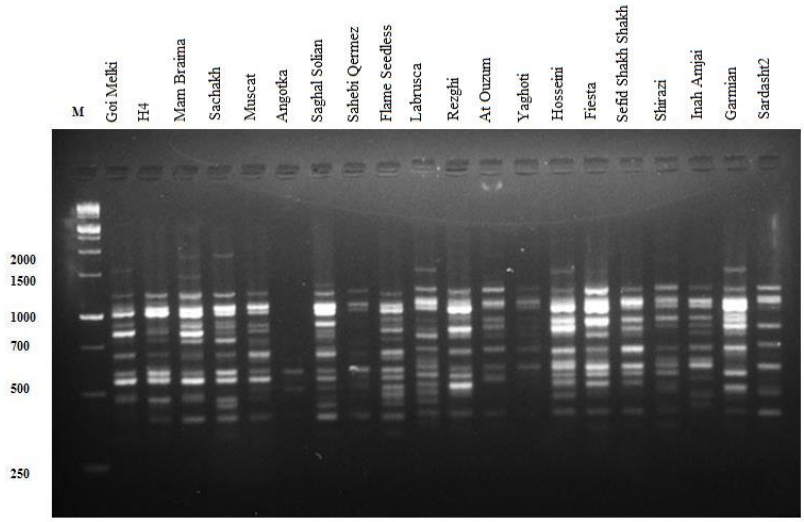
حداقل فاصله ژنتیکی (۰/۰۱۸) بین جمعیت‌های بومی و خارجی مشاهده شد که می‌تواند ناشی از جریان بالای ژنی بین توده‌های ژنی مذکور باشد. از سوی دیگر حداکثر فاصله ژنتیکی (۰/۰۳۹) بین جمعیت‌های خارجی و وحشی مشاهده گردید که می‌تواند به‌دلیل ناچیز بودن جریان ژنی بین آنها باشد (جدول ۵). فاصلهٔ ژنتیکی میان جمعیت‌ها یک پارامتر با ارزش برای حفاظت ژرم‌پلاسم و نیز برای برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ارقامی که کمترین تشابه را دارند (بیشترین فاصله)، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های در حال تفکیک (در درختان میوه همچون انگور نسل F1) خواهد داشت. به‌خوبی اثبات شده است که تلاقی

1. Anchor

www.SID.ir

Archive of SID

بین والدین غیر مرتبط و از نظر ژنتیکی دور، قدرت هیبریدی بیشتری را نسبت به تلاقی بین ژنوتیپ‌های نزدیک مرتبط نشان می‌دهد (Reif *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2007).



شکل ۱. الگوی باندی DNA تولیدشده در ارقام انگور با استفاده از آغازگر UBC 855.
نشانگر وزن مولکولی kb 1 (شرکت سیناژن، تهران، ایران) بر حسب bp

Figure 1. The pattern of DNA amplified bands in grape cultivars using UBC855 primer.
M: 1 kb DNA ladder (Cinagene Co., Tehran, Iran) in base pairs

جدول ۳. میزان چندشکلی، تعداد نشانگرهای مشاهده‌شده (Na)، تعداد آلل های مؤثر (Ne)، شاخص اطلاعات (PIC) و ارزش شانون (I) در ارقام و ژنوتیپ‌های انگور مورد مطالعه بر اساس نشانگر ISSR

Table 3. Number of bands, number of polymorph bands and number of effective alleles, polymorphism information content and Shannon's information index in cultivars and genotypes of grape based on ISSR primers

Primer	Total number of Bands	Number of polymorphic bands	Polymorphism (%)	Na	Ne	PIC	I
UBC 807	6	4	66.67	1.83	1.61	0.35	0.52
UBC 809	7	4	57.14	2	1.64	0.37	0.55
UBC 812	9	6	66.67	2	1.68	0.39	0.57
UBC 816	10	6	60.00	1.89	1.59	0.35	0.53
UBC 817	6	4	66.67	2	1.66	0.38	0.55
UBC 825	6	5	83.33	2	1.43	0.29	0.46
UBC 826	9	5	55.56	1.87	1.44	0.28	0.44
UBC 827	11	6	54.55	1.89	1.51	0.32	0.49
UBC 834	9	4	44.44	2	1.34	0.24	0.40
UBC 836	10	7	70.00	2	1.57	0.35	0.53
UBC 855	10	4	40.00	2	1.65	0.38	0.57
UBC 857	5	3	60.00	2	1.49	0.31	0.48
UBC 864	6	4	66.67	2	1.43	0.30	0.47
UBC 873	5	2	40.00	1.67	1.18	0.14	0.26
UBC 880	6	3	50.00	2	1.72	0.42	0.61
UBC 890	10	4	40.00	2	1.47	0.30	0.47
A12	7	4	57.58	2	1.47	0.30	0.41
Total	132	75					
Mean	7.76	4.41		1.95	1.52	0.32	0.49

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای تفکیک تنوع کل به اجزاء تنوع در ارقام و ژنوتیپ‌های انگور مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for partitioning total variations to its components in grape cultivars and genotypes by using ISSR markers

Source	Degrees of freedom (df)	Sum of squares	Mean sum of squares	Estimated variance	Percentage of variation (%)	Stat	Value	P (rand>= data)
Among Pops	2	24.806	12.403	0.612	39	PhiPT	0.390	0.040
Within Pops	72	68.754	0.955	0.955	61			
Total	74	93.560		1.566	100			

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵. تمایز ژنتیکی و فاصله ژنتیکی نی بین جمعیت‌های انگور با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 5. Nei's unbiased pair-wise measures of genetic distance among populations of grape

Population X	Population Y	*Nei GD	Nei ID	*PhiPT	LinphiPT	P (rand>=data)
Local	foreign	0.018	0.982	0.339	0.513	0.010
Local	Wild	0.018	0.982	0.442	0.794	0.010
foreign	Wild	0.039	0.962	0.000	0.000	0.100

* Nei GD: Nei's genetic distance; * PhiPT: Pairwise population genetic distance

* Nei GD: فاصله ژنتیکی نی؛ * PhiPT: تمایز ژنتیکی

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های انگور

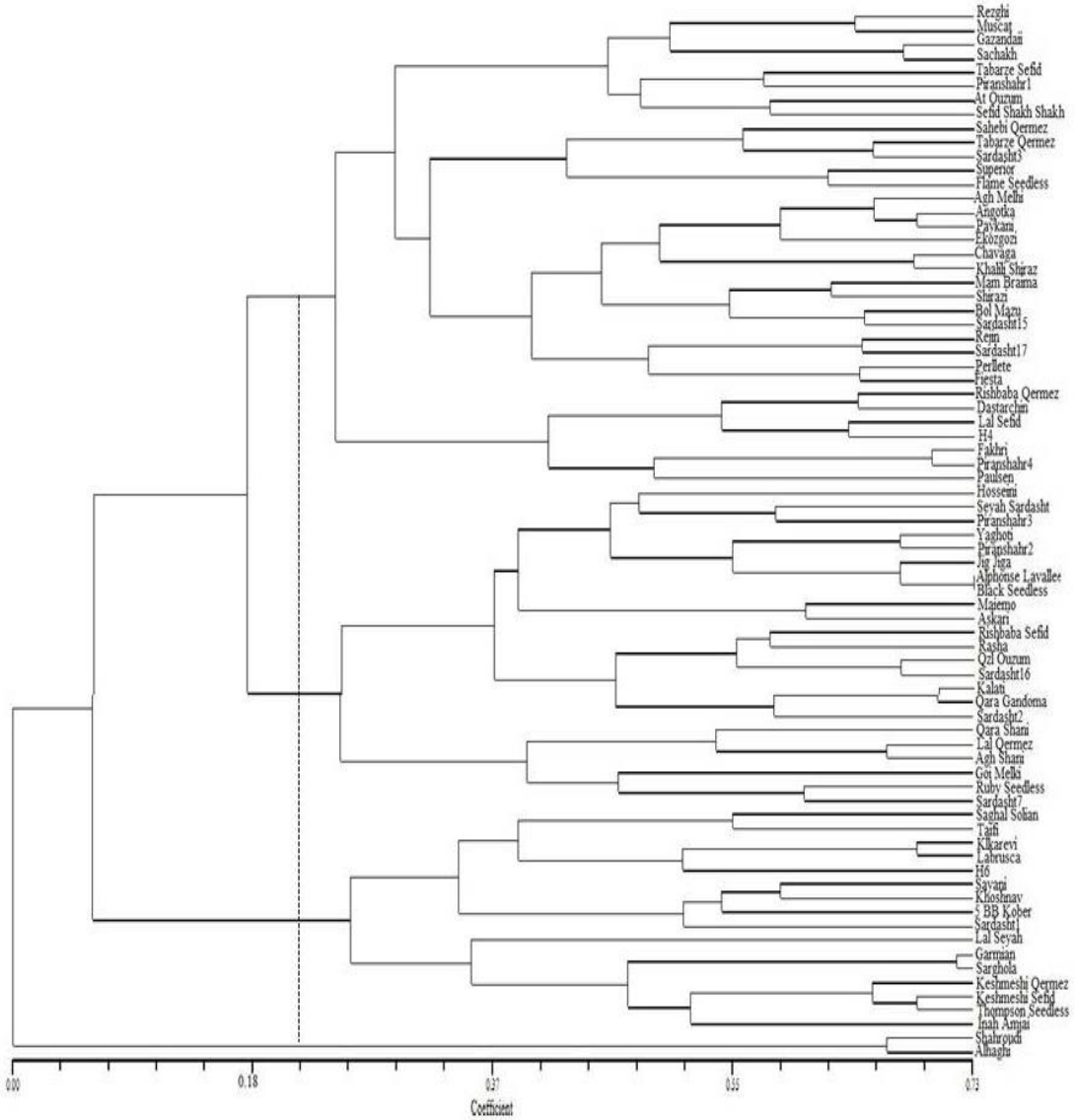
دامنه ضریب تشابه ژنتیکی Dice بین ارقام مورد مطالعه از صفر تا ۰/۷۳ متغیر بود. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، بیشترین ضریب‌تشابه ژنتیکی (۰/۷۳) بین ژنوتیپ‌های جیغ‌جیغا و بلک‌سیدلس و همچنین بین آلفونسو و بلک‌سیدلس مشاهده شد. کمترین ضریب تشابه (۰/۱۱) نیز بین ارقام دسترچین و لعل‌سیاه مشاهده گردید. فاصله زیاد نشان از فاصله ژنتیکی زیاد بین این ارقام می‌باشد. در مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۲ رقم انگور با استفاده از نشانگرهای RAPD ضریب‌تشابه ژنتیکی بین ۰/۴۱ تا ۰/۶۴ مشاهده گردید (Kocsis *et al.*, 2005). تفاوت‌های مشاهده‌شده بین این تحقیق و مطالعه حاضر را می‌توان در تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نوع نشانگرهای مورد استفاده نسبت داد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه Dice و الگوریتم Complete ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در ۴ گروه قرار داد (شکل ۱). ۳۴ ژنوتیپ در گروه اول قرار گرفتند. اکثر اقام بی‌دانه از جمله ارقام سفیدشخ‌شخ، سوپریر، فلیم سیدلس، رجین، پرلت و فیستا در این گروه قرار گرفتند. دسترچین به احتمال زیاد یکی از والدین ارقام سفیدشخ‌شخ، رجین، تبرزه سفید و تبرزه قرمز می‌باشد (Doulati-Baneh *et al.*, 2013). در این تحقیق نیز ارقام ذکرشده در یک گروه قرار گرفتند. در این گروه بیشترین میزان ضریب‌تشابه ژنتیکی (۰/۷۰) بین ژنوتیپ‌های فخری و پیرانشهر۴ و کمترین میزان آن (۰/۲۴) بین رجین و پیرانشهر۴ مشاهده گردید. در گروه دوم ۲۳ ژنوتیپ، از جمله ارقام با رنگ پوست رنگی مانند سیاه سردشت، یاقوتی، جیغ‌جیغا، بلک‌سیدلس، رشه، قزل‌اوزوم، قره‌گندمه، قره‌شانی، لعل‌قرمز و رابی‌سیدلس قرار گرفتند. تعدادی از ارقام ماده فیزیولوژیک از جمله قره‌گندمه، قزل‌اوزوم، چاوه‌گا و گوی‌ملکی در این گروه قرار گرفتند. این ارقام دارای گل‌هایی با مادگی توسعه‌یافته و پرچم واژگون با گرده‌های فاقد قدرت جوانه‌زنی هستند که برای تشکیل میوه نیاز به گرده‌زای مناسب دارند. در این گروه بیشترین میزان ضریب‌تشابه ژنتیکی (۰/۷۳) بین جیغ‌جیغا و بلک‌سیدلس و کمترین میزان آن (۰/۲۵) بین گوی‌ملکی و بلک‌سیدلس مشاهده شد. در گروه سوم ارقام دیررس از جمله ارقام سقل‌سولیان، لعل‌سیاه، گرمیان، طائفی، اینه امجه‌ای، سرقوله، کلکه‌ریوی و خوشناو قرار گرفتند. کشمشی سفید، کشمشی قرمز و تامسون‌سیدلس نیز در این گروه قرار گرفتند. انگور کشمشی سفید و کشمشی قرمز با انگور تامسون‌سیدلس تشابه بالایی نشان داد. انگور بی‌دانه قرمز، کلون رنگی انگور بی‌دانه سفید است که در رنگ پوست حبه با هم اختلاف دارند. انگور تامسون‌سیدلس نیز کلونی پربار و زودرس از انگور بی‌دانه سفید است که در اثر وقوع جهش‌های اتفاقی به‌دست آمده است (Doulati Baneh *et al.*, 2007b). بنابراین قرارگیری این ارقام در یک گروه در مجاورت هم قابل‌انتظار می‌باشد. در این گروه بیشترین میزان ضریب‌تشابه ژنتیکی (۰/۷۰) بین کشمشی سفید و تامسون‌سیدلس و کمترین میزان آن (۰/۲۶) بین لعل‌سیاه و سایانی مشاهده شد. در گروه چهارم دو رقم شاهرودی و الحقی قرار گرفتند این دو رقم از لحاظ مورفولوژیکی شباهت زیادی به‌هم دارند. الحقی دارای گل‌های دوجنسی، گرده فعال و میوه با زمینه قرمزرنگ است که بسیار شبیه به انگور شاهرودی می‌باشد (Doulati Baneh *et al.*, 2010). در این تحقیق، حالت‌هایی از همونیمی (ارقام متفاوت با اسامی یکسان) بین انگورهای ریش بابا سفید و ریش بابا قرمز مشاهده شد. این ارقام در دندروگرام حاصل در گروه‌های مجزا از هم قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله از روابط والد- نتاج با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش شد که

www.SID.ir

Archive of SID

انگورریش بابا قرمز یکی از والدین احتمالی انگور ریش بابا سفید بوده است (Doulati-Baneh *et al.*, 2013). تنوع بین ارقام *V. vinifera* مرکز شیلی و همچنین دو رقم Merlot بومی شیلی و فرانسه نیز به‌وسیله دو نشانگر RAPD و ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، دو رقم همنام بومی‌شده در شیلی و فرانسه خویشاوندی ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر نداشته و دو ژنوتیپ متفاوت و همنام بودند (Herrera *et al.*, 2002).

در تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) سه مؤلفه اول مجموعاً ۱۹/۸۴ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. مؤلفه اول ۷/۶۹ درصد و مؤلفه دوم ۶/۲۱ و مؤلفه سوم ۵/۹۵ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کرد. نمودار دو بعدی پراکنش جمعیت‌ها براساس ۲ مؤلفه اول در شکل ۳ نشان داده شده است. تجزیه به مختصات اصلی (PcoA) کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل می‌باشد. بر اساس درصد تجمعی واریانس، ۲ مؤلفه اول درصد کمی از واریانس کل را توجیه نمودند و می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه، توزیع مناسبی در سطح ژنوم داشته و جاهای مختلف از سطح ژنوم را پوشش و تکثیر کرده‌اند.

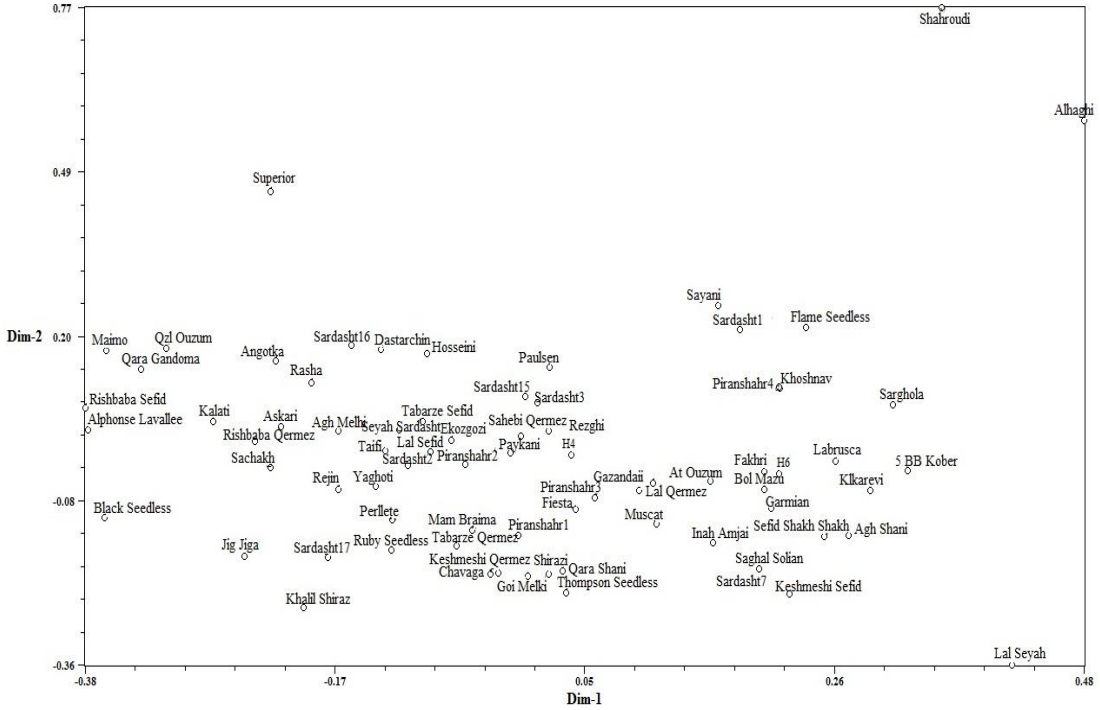


شکل ۲. دندروگرام ۷۵ رقم و ژنوتیپ انگور با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR

Figure 2. Dendrogram of 75 cultivars and genotypes of grape using ISSR data

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. نمودار دوبعدی مربوط به تجزیه به مختصات اصلی ارقام و ژنوتیپ‌های انگور بر اساس نشانگرهای ISSR

Figure 3. Two-dimensional graph from the principal coordinate analysis of culivars and genotypes of grape based on ISSR markers

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای UBC 807، UBC 809، UBC 812، UBC 816، UBC 817، UBC836، UBC 855 و UBC 880 با مقادیر تعداد آلل مؤثر، PIC و شاخص شانون بالا کارآمدترین نشانگرها در بین نشانگرهای به‌کار رفته هستند و این نشانگرها می‌توانند بهتر از سایر ترکیب‌های استفاده‌شده فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کنند. حداکثر شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۰/۷۳ و حداقل آن ۰/۱۱ بود که نشان داد تنوع زیادی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد. با توجه به فاصله ژنتیکی زیاد بین ارقام دسترچین و لعل‌سیاه، این ارقام به‌عنوان والدین بالقوه در تولید هیبرید و سایر برنامه‌های اصلاحی انگور معرفی می‌شود.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی به‌دلیل فراهم‌کردن نمونه‌های گیاهی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به‌خاطر تامین امکانات آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Ammiraju, J. S. S., Dholakia, B. B., Santra, D. K., Singh, H., Lagu, M. D., Tamhankar, S. A., Dhaliwal, H. S., Rao, V. S. & Ranjekar, P. K. (2001). Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 726-732.
2. Argade, N., Tamhankar, S., Karibasappa, G., Patil, S. & Rao, V. (2009). DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India, using ISSR markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1), 45-51.
3. Askari, N., Mohammad, A. M. & Baghizadeh, A. (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9, 222-229.
4. Bowers, J. E. & Meredith, C. P. (1996). Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(4), 620-624.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Cervera, M. T., Cabezas, J., Sancha, J., De Toda, F. M. & Martinez-Zapater, J. (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 51-59.
6. Choudhary, R., Zagade, V., Khalakar, G. & Singh, N. (2014). ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Bioscan-an International Quarterly Journal of Life Sciences*, 9(2), 823.
7. Dhanorkar, V., Tamhankar, S., Patil, S. & Rao, V. (2005). ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. *Vitis*, 44(3), 127.
8. Doulati Baneh, H., Grassi, F., Mohammadi, S. A., Nazemieh, A., De Mattia, F., Imazio, S. & Labra, M. (2007a). The use of AFLP and morphological markers to study Iranian grapevine germplasm to avoid genetic erosion. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 745-752.
9. Doulati Baneh, H., Mohammadi, S. A., Labra, M., Nazemieh, A., De Mattia, F. & Mardi, M. (2007b). Chloroplast microsatellite markers to assess genetic diversity in wild and cultivated grapevines of Iran. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10, 1855-1859.
10. Doulati Baneh, H., Nazemia, A., Mohammadi, S., Hassani, G. & Hanareh, M. (2010). Identification and evaluation of west Azarbaijan grape cultivars by ampelography and ampelometery. *Plant Production Technology*, 10(1), 13-24. (in Farsi)
11. Doulati-Baneh, H., Mohammadi, S. & Labra, M. (2013). Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 160, 29-3.
12. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
13. Ferguson, A., Taggart, J., Prodöhl, P., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. & Hynes, R. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. *Journal of Fish Biology*, 47(sA), 103-126.
14. Ghasemi, M., Baghizadeh, A. & Abadi, M. (2010). Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(12), 5758-5760.
15. Grando, M. S. & Frisinghelli, C. (1998). Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. *Vitis*, 37(2), 79-82.
16. Hassan, N. A., El-Homosany, A., Gomma, A. H. & Shaheen, M. (2011). Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinefera* L.) collection. *World Applied Sciences Journal*, 15(10), 1369-1375.
17. Herrera, R., Cares, V., Wilkinson, M. & Caligari, P. (2002). Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica*, 124(1), 139-145.
18. Jing, Z. & Wang, X. (2013). Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European cultivars based on ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 120-126.
19. Karami, M. J. (1996). *Identification of grapevines of Kurdistan state*. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture Tabriz University, Iran. (in Farsi)
20. Keshavarz Khoob, M., Gharanjik, S., Masoumiasl, A. & Abdollahi, M. B. (2016). Evaluation of diversity and genetic relationships among some grapevine cultivars using ISSR markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 7 (4), 129-141. (in Farsi)
21. Kocsis, M., Jaromi, L., Putnoky, P., Kozma, P. & Borhidi, A. (2005). Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. *Vitis*, 44(2), 87-91.
22. Martinez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R. & Zuniga, M. (2006). SSR-based assessment of genetic diversity in South American Vitis vinifera varieties. *Plant Science*, 170(6), 1036-1044.
23. McGovern, P. E. (2003). *Ancient Wine: the Search for the Origin of Viniculture.* Princeton University Press, Princeton and Oxford, UK.
24. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 288-295.
25. Ratnaparkhe, M., Tekeoglu, M. & Muehlbauer, F. (1998). Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(4), 515-519.
26. Reddy, M. P., Sarla, N. & Siddiq, E. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.
27. Reif, J. C., Gumpert, F. M., Fischer, S. & Melchinger, A. E. (2007). Impact of interpopulation divergence on additive and dominance variance in hybrid populations. *Genetics*, 176, 1931-1934.
28. Rohlf, F. (2000). *NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate system*, version 2.1 Applied Biostatistics Inc. New York.
29. Sabeti, H. (1976). *Forests, Trees and Shrubs of Iran*. Agriculture and Natural Resources Research Organization Press, Tehran, Iran. (in Farsi)

www.SID.ir

Archive of SID

30. Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
31. Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D. & Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124(5), 464-472.
32. Solomon, K., Labuschagne, M. & Viljoen, C. (2007). Estimates of heterosis and association of genetic distance with heterosis in durum wheat under different moisture regimes. *The Journal of Agricultural Science*, 145(3), 239-248.
33. Tamhankar, S., Argade, N., More, M., Dhanorkar, V., Patil, S., Rao, V., Karibasappa, G & Agrawal, D. (2008). DNA profiling of the grape varieties grown in India using ISSR markers. *Acta Horticulturae*.
34. Tsumura, Y., Ohba, K. & Strauss, S. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92(1), 40-45.
35. Wang, G., Mahalingam, R. & Knap, H. (1998). (CA) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1086-1096.
36. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.
37. Zahedi, B. (1996). *Identification of grapevines of Lorestan state*. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture Tehran University, Iran. (in Farsi)
38. Zamani, P., Akhondi, M., Mohammadabadi, M. R., Saki, A. A., Ershadi, A., Banabazi, M. H. & Abdolmohammadi, A. R. (2011). Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(10), 1812-1817.
39. Zamani, P., Akhondi, M. & Mohammadabadi, M. (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*, 132, 123-127.
40. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

www.SID.ir