

چند شکلی ادغامی رتروترانسپوزون‌ها و تنوع ژنتیکی در ارقام زراعی و ژنوتیپ- های وحشی انگور

Retrotransposon insertional polymorphism and genetic diversity in cultivated and wild grape genotypes

معصومه فرخ نیا^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۱*}، حامد دولتی بانه^۲، ایرج برنوسی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

Farokhnia M¹, Abdollahi Mandoulakani B^{*1}, Dolati Baneh H², Bernousi I¹

1. MSc Student, Associate professors, Urmia University

2. Associate professor, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

به منظور مطالعه چند شکلی ادغامی خانواده‌های رتروترانسپوزونی Tv1، Edel، Vine1، Huben و Gentil و تنوع ژنتیکی در ۶۷ رقم زراعی و ژنوتیپ‌های وحشی انگور (*Vitis vinifera* L.) از نشانگرهای IRAP و REMAP استفاده شد. در مجموع ۱۰۳ مکان با استفاده از دو آغازگر IRAP و ۱۳ ترکیب آغازگری REMAP تولید شد که از این تعداد، ۸۳ مکان (۸۰/۵۸ درصد) چندشکل بودند. مقادیر شاخص تنوع نی برای آغازگرها از صفر (آغازگر Gentil-A7) تا ۰/۳۸ (آغازگر Tv1-808) متغیر بود. میانگین شاخص تنوع نی در کل ارقام مطالعه شده ۰/۲۷ بود. دامنه ضرایب تشابه ژنتیکی دایس بین ارقام از ۰/۵۷ (رقم H6 با دسترجین) تا یک (رقم رشه اصل با سیاه معمولی) متغیر و میانگین آن ۰/۷۸ بود. بیشترین مقادیر شاخص تنوع نی، تعداد ال‌های موثر (Ne) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) مربوط به خانواده رتروترانسپوزونی Tv1 و به ترتیب ۰/۳۲، ۱/۵۴ و ۰/۴۷ بود که بیانگر تحرک و چند شکلی زیاد این خانواده در ارقام مطالعه شده می‌باشد. تجزیه کلاستر براساس ضریب تشابه Dice و الگوریتم UPGMA ارقام مورد مطالعه را در شش گروه اصلی قرار داد و نمونه‌های زراعی و وحشی را از هم متمایز کرد. شباهت و تمایز ارقام براساس نتایج حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، به وسیله روش‌های مبتنی بر مدل با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.1 تایید شد. نتایج نشان داد خانواده‌های رتروترانسپوزونی مورد استفاده به ویژه Tv1 در ژنوم انگور به لحاظ انتقالی فعال بوده و می‌توان از نشانگرهای مبتنی بر این خانواده در تمایز ارقام و ژنوتیپ‌های انگور استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

انگور
تنوع ژنتیکی
رتروترانسپوزون
IRAP
REMAP

مقدمه

انگور با نام علمی (*Vitis vinifera* L.) و از تیره Ampelidaceae که آن را Vitaceae می‌نامند شامل هفده جنس و ۷۰۰ گونه می‌باشد (Jedari kouhi et al. 2011). انگور یکی از مهمترین میوه‌هایی است که از زمان‌های بسیار قدیم مورد استفاده بشر قرار گرفته است. بر طبق نظر متخصصین، کشت و تولید انگور در ایران حداقل دو هزار سال پیش از میلاد متداول بوده است (Tafzili et al. 1994). در میان ارقام انگور ایرانی، فقط ارقامی با کیفیت مطلوب برای مصارف تازه‌خوری، تهیه کشمش و صنایع فرآوری نظر باغداران را به خود جلب کرده است و بقیه ارقام کمتر مورد کشت و کار قرار گرفته‌اند (Carreno et al. 2004). براساس آمارهای موجود تاکنون در حدود ۱۵۰۰۰-۵۰۰۰ رقم و چندین گونه مختلف انگور در سراسر دنیا شناسایی، نام‌گذاری و ارزیابی شده‌اند. ایران به عنوان یکی از مراکز پیدایش و پراکنش انگور در جهان از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است به طوری که در مناطق مختلف، از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب، ارقام انگور وجود دارند (Karami 1995). بنابراین تعیین میزان تنوع ژنتیکی در انگور با روش‌های موثر و کارا علاوه بر حفاظت گیاهی، در برنامه‌های به‌نژادی نیز حائز اهمیت می‌باشد (Martinez et al. 2006).

درختچه انگور دیپلوئید بوده و سیستم تولید مثلی آن خودگشن می‌باشد. اندازه ژنوم انگور با ۳۸ کروموزوم در حدود $4/75 \times 10^8$ جفت باز است. این ژنوم ترکیبی از توالی‌های تکراری و غیر تکراری است که DNA تکراری بیش از ۹۵ درصد کل ژنوم را تشکیل می‌دهد (Grassi et al. 2002). تعیین توالی انگور نشان داد که عناصر جابه‌جا شونده حدود ۴۱/۴ درصد (Jaillon et al. 2007) و رتروترانسپوزون‌ها ۲۴-۱۷ درصد از کل ژنوم انگور را تشکیل می‌دهند (Velasco et al. 2007). رتروترانسپوزون‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند که از طریق یک RNA حد واسط و تولید کپی‌های cDNA جدید در ژنوم جابه‌جا می‌شوند و نسخه‌های قبلی آن‌ها در نواحی قبلی پایدار می‌مانند (Flavell et al. 1998). این عناصر ژنتیکی متحرک هم در نواحی هتروکروماتینی و هم در نواحی یوکروماتینی جابه‌جا شده و با ادغام متفاوت در نواحی

مختلف باعث ایجاد چند شکلی می‌شوند. تجزیه و تحلیل توالی‌ها در گیاهان نشان داده که رتروترانسپوزون‌ها در نزدیکی توالی‌های ریزماهواری در ژنوم به وفور دیده می‌شوند (Kalendar et al. 1999). مسئله حضور فعال رتروترانسپوزون‌ها در یک ژنوم کوچک مانند انگور جالب و بحث برانگیز است چرا که رتروترانسپوزون‌ها اندازه ژنوم را افزایش می‌دهند و با ادغام در نواحی مختلف ژنومی در افراد متفاوت باعث ایجاد چندشکلی و تنوع می‌شوند و می‌توان از آنها به عنوان نشانگر ملکولی در مطالعات مختلف استفاده کرد (Ramallo et al. 2008; Abdollahi et al. 2012).

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی انگور، نشانگرهای مولکولی مختلفی مانند نشانگرهای RFLP (Bowers and Meredith 1996)، RAPD (Grando and Frisinghelli 1998)، AFLP (Cervera et al. 1998) و SSR (Martinez et al. 2006) استفاده شده است. اخیراً از نشانگرهای ملکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها به طور گسترده‌ای در مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان استفاده می‌شود (Vukich et al. 2009; Abdollahi Mandoulakani et al. 2012; Nasri et al. 2013). (Pereira et al. 2005) گزارش کردند که خانواده رتروترانسپوزونی Gret1 فراوانی بالایی در ژنوم ارقام انگور دارد و حتی در نواحی یوکروماتینی نیز به وفور دیده می‌شود. هم‌چنین در این تحقیق نشان داده شد که نشانگرهای IRAP¹ و REMAP² مبتنی بر این رتروترانسپوزون، دارای چندشکلی ادغامی کافی برای تمایز ارقام مختلف انگور می‌باشند و می‌توانند به عنوان نشانگر ملکولی برای مطالعات مرتبط با ژنتیک گیاهی از جمله تعیین تغییرپذیری ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها در انگور استفاده شوند. (D'Onofrio et al. 2010) از چندشکلی ادغامی رتروترانسپوزون‌های Vine1 و Tvvl1 از گروه Copia و رتروترانسپوزون Gret1 از گروه Gypsy برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۹ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس *Vitis* استفاده و گزارش کردند که این رتروترانسپوزون‌ها به وفور در ژنوم گونه‌های مختلف این جنس حضور داشته و در تکامل این جنس نقش عمده‌ای داشتند. هم‌چنین در این تحقیق نشانگرهای S-SAP،

¹ Inter retrotransposon amplified polymorphism

² Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism

پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر اپندروف انجام شد. الگوی دمایی واکنش‌های PCR شامل واسرشت سازی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۶ چرخه به صورت واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد (جدول ۳) به مدت ۴۰ ثانیه، بسط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سرانجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت ۳-۴ ساعت انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم بروماید استفاده شد و عکسبرداری با استفاده از نور UV با دستگاه ژل داکيومنت مدل Carestream Gel logic212 pro انجام گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها

امتیازدهی باندهای حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP به صورت وجود (۱) یا عدم وجود (صفر) باند برای هر آغازگر انجام گرفت. ماتریس تشابه ژنتیکی بین افراد با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نسخه ۲/۰۲ (Rohlf, 2000) و براساس ضریب تشابه ژنتیکی Dice تشکیل شد. برای گروه‌بندی افراد تجزیه کلاستر به روش‌های UPGMA، Minimum evolution و Neighbor joining با نرم افزار Mega4 انجام گرفت. جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و انتخاب روش مناسب گروه‌بندی از بین سه روش استفاده شده و تایید آن، از روش‌های مبتنی بر مدل در نرم‌افزار Structure 2.3.1 (Pritchard et al. 2000) در حالت No admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K (از ۱ تا ۲۰ و ۱۰ تکرار برای هر K) استفاده شد. عدد K بهینه براساس روش ΔK با استفاده از نرم‌افزار Structure Harvester تعیین شد. ماتریس ضریب تعلق افراد به هر گروه نیز با استفاده از همین نرم‌افزار محاسبه شد. پارامترهای مقادیر تنوع نی، تعداد کل مکان‌ها، تعداد مکان‌های چندشکل، درصد چندشکلی، تعداد آل‌های موثر (Ne) و شاخص اطلاعاتی شانن (I) برای آغازگرها و برای هر خانواده رتروترنسپوزونی با استفاده از نرم‌افزار GenALEX 6.4 (Peakall and Smouse 2006) محاسبه شد.

IRAP و REMAP مبتنی بر این رتروترنسپوزون‌ها با نشانگرهای SSR، ISSR و AFLP مقایسه و گزارش شد که نشانگرهای رتروترنسپوزونی REMAP بهتر از نشانگرهای دیگر روابط ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه را نمایان می‌سازد. بنابراین با توجه به کارایی بالای نشانگرهای رتروترنسپوزونی و اینکه تاکنون از این نشانگرها برای مطالعه تنوع ژنتیکی در انگورهای ایرانی استفاده نشده، هدف از این تحقیق مقایسه فعالیت و چندشکلی ادغامی خانواده‌های رتروترنسپوزونی Tvvl، Vine1، Gentil، Hubben و Edal (از *V. vinifera* L. جداسازی شدند) در ژنوم انگور و امکان استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP مبتنی بر این خانواده‌ها برای مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در ۶۷ رقم زراعی و وحشی انگور کشور بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق ۶۷ ژنوتیپ انگور شامل ۵۵ رقم زراعی و ۱۲ ژنوتیپ وحشی موجود در باغ کلکسیون ایستگاه تحقیقات باغبانی کهزیز وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی استفاده شد (جدول ۱). برگ‌های جوان (۵-۲ سانتی‌متری) از هر رقم برداشت شده و در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان به روش CTAB (Ausubel et al. 1995) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA ژنومی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد.

واکنش‌های PCR برای نشانگرهای IRAP و REMAP در این تحقیق از ۱۰ آغازگر IRAP و ۳۰ آغازگر REMAP استفاده شد (جدول ۲ و ۳). ابتدا آغازگرها بر روی ۶ ژنوتیپ ارزیابی و آغازگرهایی که الگوی باندهای واضح و قابل اسکوردهی تولید کردند بر روی همه نمونه‌ها استفاده شدند. واکنش‌های PCR برای نشانگرهای IRAP و REMAP در حجم ۲۰ میکرولیتری حاوی ۴۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR یک برابر (۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مول KCL، pH=۸/۳)، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرومول از هر کدام dNTP، ۰/۵ واحد Taq پلیمرز (شرکت سیناکلون، تهران، ایران) و ۱۰

جدول ۱- مشخصات ارقام و ژنوتیپ‌های انگور استفاده شده در این تحقیق. همه ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متعلق به گونه *Vinifera* می‌باشند.

کدرقم	رقم	منشاء	کد رقم	رقم	منشاء
C1	رزقی	ایران	C43	آغ شانی	ایران
C2	حسینی	ایران	C44	جیغ جیغا	ایران
C3	تبرزه سفید	ایران	C45	لعل سفید	ایران
C4	قره ملحی	ایران	C46	کلکه ریوی	ایران
C6	ات اوزوم	ایران	C47	سیاه معمولی	ایران
C7	لعل سیاه	ایران	C49	شیرازی	ایران
C8	سیاه سردشت	ایران	C50	انگوتکه	ایران
C9	گرمیان	ایران	C51	لاپروسکا	آمریکا
C10	مایه مو	ایران	C53	گلین بارماقی	ایران
C11	ریش باباقرمز	ایران	C54	اکوز گوزی	ایران
C13	کشمش قرمز	ایران	C56	موسکات	آفریقا
C14	فخری	ایران	C57	خلیلی شیرازی	ایران
C15	شاهرودی	ایران	C59	رابی سیدلس	آمریکا
C17	صاحبی	ایران	C60	پرلت	آمریکا
C20	تبرزه قرمز	ایران	C62	رشه اصل	ایران
C21	دسترچین	ایران	C63	بلاک سیدلس	آمریکا
C22	ریش باباسفید	ایران	C64	فیلم سیدلس	آمریکا
C25	خلیلی سفید	ایران	C65	تامسول سیدلس	ایران
C26	گوی ملکی	ایران	C67	H6*	هیبرید بین گونه
C27	سایانی	ایران	C68	یاقوتی اصل	ایران
C28	کلاتی	ایران	C70	سوپریور	آمریکا
C29	مام برایمه	ایران	C30	لعل قرمز	ایران
C30	بول مازو	ایران	C31	سفید شیخ شیخ	ایران
C32	قره شیره	ایران	W73	وحشی پیرانشهر ۳	ایران-پیرانشهر
C33	الحقی	ایران	W74	وحشی پیرانشهر ۴	ایران-پیرانشهر
C34	عسگری	ایران	W75	وحشی پیرانشهر ۵	ایران-پیرانشهر
C35	بیدانه سفید	ایران	W76	وحشی پیرانشهر ۶	ایران-پیرانشهر
C37	سرقوله	ایران	W77	وحشی پیرانشهر ۷	ایران-پیرانشهر
C38	چاوه گا	ایران	W78	وحشی پیرانشهر ۸	ایران-پیرانشهر
C39	یاقوتی	ایران	W81	وحشی سردشت ۱	ایران-سردشت
C40	قره گندمه	ایران	W82	وحشی سردشت ۲	ایران-سردشت
C41	گزن‌دایی	ایران	W83	وحشی سردشت ۳	ایران-سردشت
W71	وحشی پیرانشهر ۱	ایران-پیرانشهر	W84	وحشی سردشت ۴	ایران-سردشت

(* H6 هیبرید بین Kober Fbb و قره اوزوم)

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	نوع آغازگر	توالی آغازگر (۳'-۵')
Vine1	رتروترنسپوزون	TTCAGCACTCTTCATCAATAA
Tvv1	رتروترنسپوزون	ATTCTTCTATCCTTGCCCGTGG
Gentil	رتروترنسپوزون	CTGTACATGACGAATGAA
Huben	رتروترنسپوزون	TTTTGCTCTCTGTGTATAT
Edel	رتروترنسپوزون	CGAACCACGTAAATACTGT
A7	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC808	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC840	ISSR	ACACACACACACACACC
UBC820	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGY*T
UBC849	ISSR	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
UBC867	ISSR	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
UBC857	ISSR	ACACACACACACACACYT

* Y معرف پیریمیدین (C/T) می‌باشد.

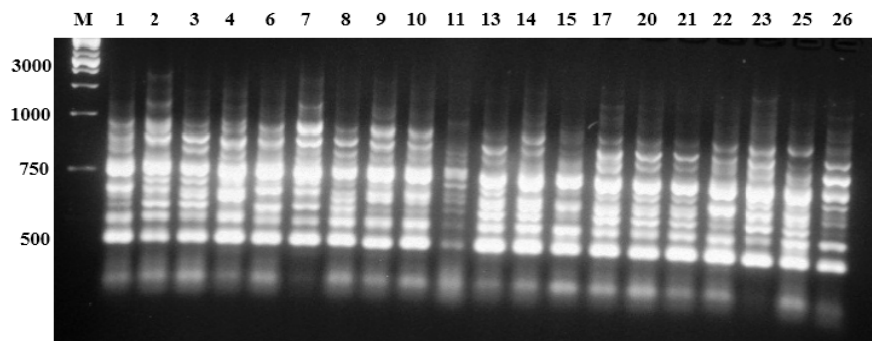
جدول ۳- آغازگرهای IRAP و REMAP مورد استفاده و خصوصیات آن‌ها

آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	تعداد مکان‌های تکثیری	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چند شکلی	تنوع نی	تعداد آلل‌های موثر	شاخص شانون	دامنه باندی (جفت باز)
Tvv1	۵۵	۷	۶	۸۵	۰/۳۳	۱/۵۵	۰/۴۹	۵۰۰-۲۰۰۰
Tvv1+Edel	۵۶	۵	۴	۸۰	۰/۳۱	۱/۵۱	۰/۴۵	۱۵۰-۱۵۰۰
Tvv1+UBC820	۵۰	۵	۴	۸۰	۰/۲۷	۱/۴۲	۰/۴۲	۷۵-۱۵۰۰
Tvv1+UBC849	۶۰	۷	۶	۸۵	۰/۳۸	۱/۷۰	۰/۵۴	۷۵-۲۰۰۰
Tvv1+UBC840	۵۳	۱۰	۹	۹۰	۰/۲۷	۱/۴۲	۰/۴۱	۷۵-۲۰۰۰
Tvv1+UBC808	۵۳	۱۰	۹	۹۰	۰/۳۸	۱/۶۹	۰/۵۸	۷۵-۲۰۰۰
Tvv1+A7	۵۵	۶	۵	۸۳	۰/۲۸	۱/۴۵	۰/۴۲	۵۰۰-۲۰۰۰
Vine1+UBC820	۶۰	۶	۵	۸۳	۰/۲۶	۱/۴۱	۰/۴۱	۷۵-۲۰۰۰
Vine1+A7	۵۶	۸	۷	۸۷	۰/۳۴	۱/۴۷	۰/۴۶	۵۰۰-۲۰۰۰
Gentil+A7	۶۰	۶	۰	۰	۰	۱/۰۰	۰	۱۵۰-۱۵۰۰
Gentil+UBC849	۵۰	۷	۶	۸۵	۰/۱۸	۱/۲۷	۰/۲۹	۱۰۰-۲۰۰۰
Edel+UBC867	۵۰	۶	۵	۸۳	۰/۲۶	۱/۳۹	۰/۴۰	۱۰۰-۱۵۰۰
Edel+A7	۵۶	۷	۶	۸۵	۰/۲۶	۱/۴۸	۰/۴۴	۱۵۰-۲۰۰۰
Edel+UBC857	۵۰	۶	۵	۸۳	۰/۲۱	۱/۳۶	۰/۳۲	۷۵-۱۵۰۰
Huben+A7	۶۳	۷	۶	۸۵	۰/۳۲	۱/۵۲	۰/۴۷	۵۰۰-۲۵۰۰
کل	-	۱۰۳	۸۳	۱۱۸۴	-	-	-	-
میانگین	-	۶/۸۶	۵/۵۳	۷۸/۹۳	۰/۲۷	۱/۴۴	۰/۴۰	-

نتایج و بحث

در بررسی تنوع ژنتیکی بین ۵۵ رقم زراعی و ۱۲ ژنوتیپ وحشی انگور از ۴۰ آغازگر منفرد و ترکیبی IRAP و REMAP استفاده شد. از بین آغازگرهای مورد استفاده، ۲ آغازگر IRAP و ۱۳ آغازگر REMAP الگوی بانندی واضح و قابل امتیازدهی تولید

کردند (جدول ۳). ۱۵ آغازگر رتروترنسپوزونی در مجموع ۱۰۳ مکان چند شکل در ۶۷ ژنوتیپ انگور تکثیر کردند که از این تعداد ۸۳ مکان (۸۰/۵۸ درصد) چندشکل (شکل ۱) بودند. دامنه باندهای تولید شده از ۷۵ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغیر بود. میزان



شکل ۱- الگوی بانندی تکثیر شده توسط آغازگر M.Vine1-A7 (نشانگر اندازه (جفت باز)؛ ۱) رزقی؛ ۲) حسینی؛ ۳) تبرزه سفید؛ ۴) قره ملخی؛ ۶) ات اوزوم؛ ۷) لعل سیاه؛ ۸) سیاه سردشت؛ ۹) گرمیان، ۱۰) مایه مو؛ ۱۱) ریش بابا قرمز؛ ۱۳) کشمش قرمز؛ ۱۴) فخری؛ ۱۵) شاهرودی؛ ۱۷) صاحبی؛ ۲۰) تبرزه قرمز؛ ۲۱) دسترچین؛ ۲۲) ریش بابا سفید؛ ۲۳) خلیلی سفید؛ ۲۵) گوی ملکی؛ ۲۶) سایانی.

نشان داد. هم‌چنین انگور رشه اصل و کلون آن یعنی رقم خوشناو (سیاه معمولی) در یک گروه قرار گرفتند. ارقام خارجی انگور در گروه دوم قرار گرفتند. در این گروه تشابه ژنتیکی بالایی بین ارقام پرلت و سوپریور مشاهده شد. میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام از ۰/۵۷ (رقم H6 با دسترچین) تا یک (رقم رشه اصل با سیاه معمولی و کشمش قرمز با بیدانه سفید) متغیر و میانگین آن ۰/۷۸ بود.

به منظور تعیین و تایید گروه‌های متمایز حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تجزیه ساختار ژنتیکی ارقام مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.1 انجام گرفت. بر این اساس سه گروه احتمالی ($K=3$) در بین ارقام مورد مطالعه شناسایی شد و مقدار $K=3$ مناسب‌ترین عدد برای محاسبه متوسط شاخص تثبیت (Fst) برای هر گروه برآورد شد (شکل ۳). متوسط شاخص تثبیت برای گروه‌های احتمالی I، II و III به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۱۸ و ۰/۴۱ بود. هر چند تعداد گروه‌های حاصل با تعداد گروه‌های حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA متفاوت بود ولی تشابه ژنتیکی و مجاورت ارقام براساس دو روش مطابقت بالایی داشت. در همه گروه‌ها مقادیر متوسط Fst نسبتاً بالا بود که نشان‌دهنده متمایز بودن ارقام مورد مطالعه در سه گروه احتمالی است. ماتریس سهم عضویت افراد در این گروه‌ها (جدول ۵) نیز نشان داد که ارقام با ضرایب بالایی به یک گروه تعلق دارند.

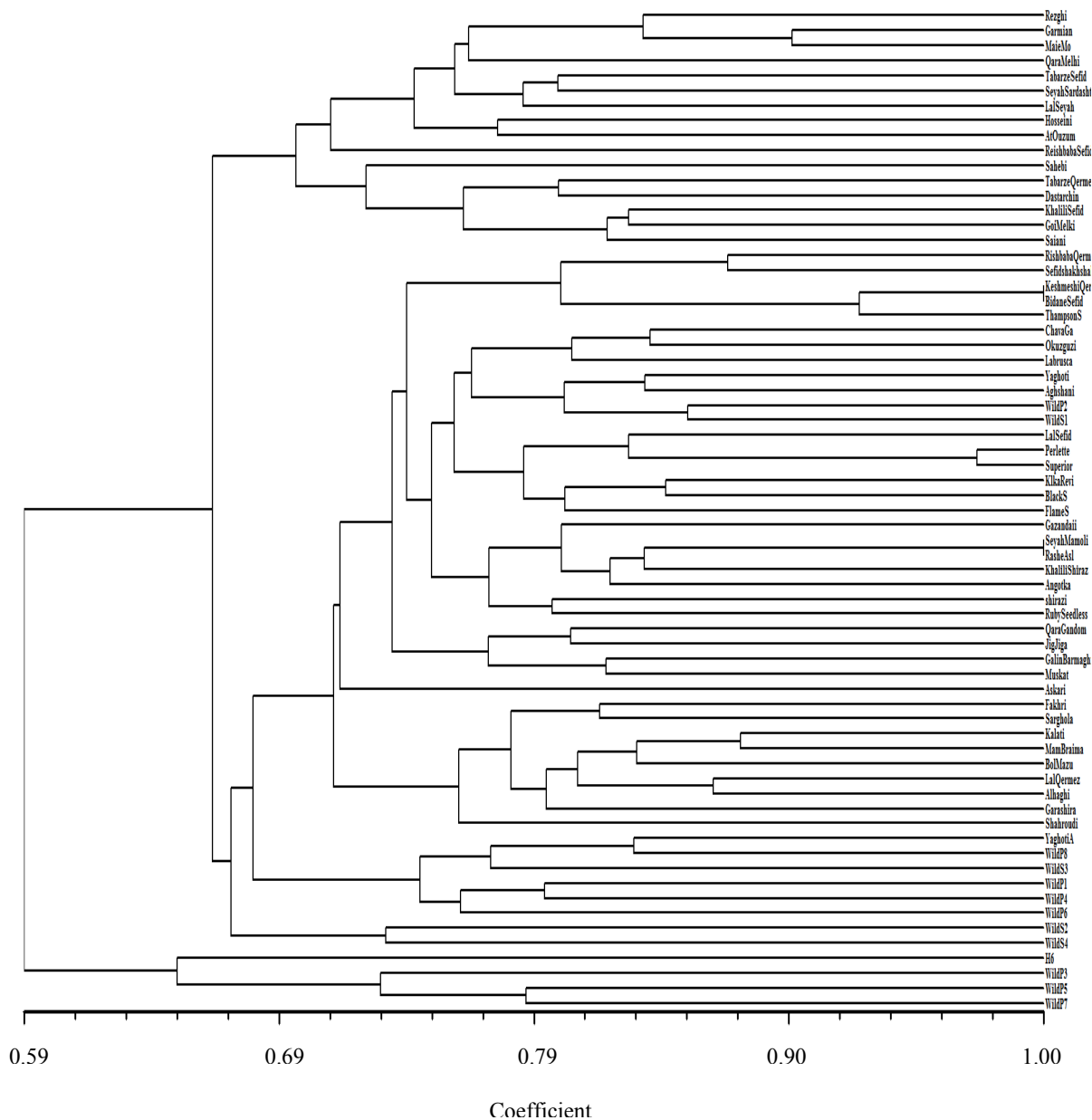
شاخص تنوع نی برای آغازگرها از صفر (آغازگر Gentil-A7) تا ۰/۳۸ (آغازگر TvV1-808) متغیر و میانگین آن ۰/۲۷ بود. دامنه شاخص اطلاعاتی شانون نیز برای آغازگرها از صفر (آغازگر Gentil-A7) تا ۰/۵۷ (آغازگر TvV1-808) متغیر و میانگین آن ۰/۴۰ محاسبه شد.

مقایسه خانواده‌های رتروترنسپوزونی به لحاظ میزان چندشکلی در ارقام مورد مطالعه نشان داد بیشترین تعداد مکان تکثیر شده (۵۰) مربوط به خانواده TvV1 و کمترین تعداد مکان تکثیر شده (۷) مربوط به خانواده Huben بود. میانگین تعداد مکان به ازای هر خانواده رتروترنسپوزونی، ۲۱/۶ بود. بیشترین و کمترین درصد مکان‌های چندشکل به ترتیب مربوط به خانواده‌های TvV1 (۸۶) و Gentil (۴۶/۱۵) بود. میانگین شاخص تنوع نی در خانواده‌های رتروترنسپوزونی از ۰/۱ (Gentil) تا ۰/۳۲ (TvV1) متغیر و میانگین آن برابر ۰/۲۵ بود (جدول ۴). تجزیه کلاستر به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس براساس داده‌های مربوط به هر خانواده (دندروگرام‌های مربوط به هر خانواده ارائه نشده‌است) نشان داد که خانواده‌های Edl و Huben نسبت به خانواده‌های دیگر ارقام زراعی و وحشی را بطور موثرتری از همدیگر متمایز می‌سازند.

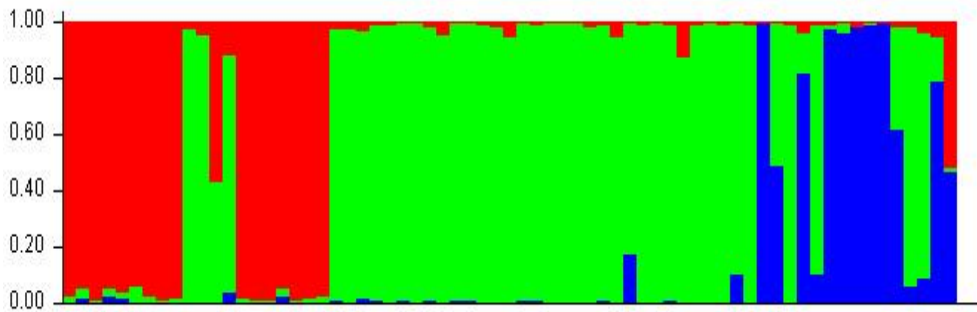
تجزیه کلاستر براساس ضریب تشابه Dice و الگوریتم UPGMA (شکل ۲) ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در شش گروه قرار داد و ارقام زراعی و نمونه‌های وحشی را از هم متمایز کرد. انگور بی-دانه سفید و کشمش قرمز با انگور تامسون سیدلس تشابه بالایی

جدول ۴- مقایسه خانواده‌های رتروترنسپوزونی به لحاظ میزان تنوع در ژنوتیپ‌های انگور

خانواده رتروترنسپوزون	تعداد آغازگر	تعداد مکان	درصد چندشکلی	میانگین تنوع نی	تعداد آل‌های موثر	شاخص شانون
Tvv1	۷	۵۰	۸۶	۰/۰۲ ± ۰/۳۲	۰/۰۵ ± ۱/۵۴	۰/۴۷ ± ۰/۰۳
Vine1	۲	۱۴	۸۵/۷۱	۰/۰۴ ± ۰/۲۸	۰/۰۷ ± ۱/۴۴	۰/۴۳ ± ۰/۰۶
Edel	۴	۲۴	۸۳/۳۳	۰/۰۳ ± ۰/۲۶	۰/۰۷ ± ۱/۴۳	۰/۴۰ ± ۰/۰۵
Gentil	۲	۱۳	۴۶/۱۵	۰/۰۴ ± ۰/۰۹	۰/۰۷ ± ۱/۱۴	۰/۱۵ ± ۰/۰۶
Huben	۱	۷	۸۵/۷۱	۰/۰۶ ± ۰/۲۸	۰/۱۳ ± ۱/۴۵	۰/۴۵ ± ۰/۰۹
میانگین	-	۲۱/۶	۷۷/۳۸	۰/۲۵ ± ۰/۰۴	۱/۴۰ ± ۰/۰۷	۰/۳۸ ± ۰/۱۱



شکل ۲- دندروگرام ۶۷ ژنوتیپ انگور با استفاده از ضریب تشابه Dice و الگوریتم UPGMA براساس نشانگرهای (WildP.REMAP+IRAP) وحشی پیرانشهر؛ (WildS) وحشی سردشت؛ (BlackS) بلک سیدلس؛ (TampsonS) تامسون سیدلس؛ (FlameS) فلم سیدلس.



شکل ۳- بارپلات رسم شده توسط نرم‌افزار Structure 2.3.1 در مقدار $K=3$ بر مبنای داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP+REMAP در ۶۷ رقم انگور. هر رنگ نشان دهنده یک گروه احتمالی بوده و اعداد روی محور عمودی میزان تعلق افراد هر گروه به گروه احتمالی مربوطه را نشان می‌دهد.

آغازگری Vine1+A7 از بین ترکیبات آغازگری REMAP بیشترین تعداد باند و ۸۷ درصد چندشکلی در ارقام مورد مطالعه ایجاد کرد که بیانگر حضور زیاد رتروترنسپوزون Vine1 در نزدیکی موتیف‌های ریزماهورهای مربوط به آغازگر A7 (AG) در ژنوم انگور می‌باشد. خانواده‌های رتروترنسپوزونی دیگر نیز در ترکیب با موتیف‌های ریزماهورهای الگوی باندهای واضح و چند-شکل ایجاد کردند که بیانگر حضور و درج این عناصر رتروترنسپوزونی در نزدیک توالی‌های ریزماهورهای در ژنوم انگور می‌باشد. حضور خانواده‌های رتروترنسپوزونی مختلف در نزدیکی مایکروستلایت‌ها در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Smykal et al. 2011; Abdollahi Mandoulakani et al. 2012; Nasri et al. 2013). معمولا نشانگرهای REMAP چندشکلی بیشتری نسبت به نشانگرهای IRAP تولید می‌کند و تعداد تکرار توالی‌های رتروترنسپوزونی موجود در ژنوم را بهتر نشان می‌دهند (Kalendar et al. 1999). در مطالعه حاضر نیز تعداد بیشتری از آغازگرهای REMAP در مقایسه با آغازگرهای IRAP الگوی باندهای واضح و چندشکل تولید کردند.

دامنه ضریب تشابه ژنتیکی دایس بین ارقام مورد مطالعه از ۰/۵۷ تا یک متغیر و میانگین آن ۰/۷۸ بود. میانگین شاخص تنوع نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۴۰ بود که نشان-دهنده تنوع ژنتیکی مناسبی بین ژنوتیپ‌های انگور مورد مطالعه است. (Kocsis et al. 2008). در مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۲ رقم انگور با استفاده از نشانگرهای RAPD ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۴۱ تا ۰/۶۴ را گزارش کردند. تفاوت‌های مشاهده شده بین این

در این تحقیق از ۱۵ آغازگر IRAP و REMAP برای مطالعه الگوی توزیع و چندشکلی ادغامی برخی خانواده‌های رتروترنسپوزونی و همچنین تنوع ژنتیکی در ۶۷ رقم زراعی و وحشی انگور استفاده شد. آغازگر مبتنی بر خانواده TvV1 هم در حالت منفرد و هم در ترکیب با خانواده Edel، الگوی باندهای واضح و قابل امتیازدهی ایجاد کرد که نشان‌دهنده نزدیکی و درج عناصر این خانواده در مجاورت همدیگر و همچنین ادغام آن در نزدیکی خانواده رتروترنسپوزونی Edel در ژنوم انگور می‌باشد. در مقایسه خانواده‌های مطالعه شده به لحاظ درصد چندشکلی، خانواده TvV1 بیشترین تعداد مکان به ازای هر آغازگر و بیشترین درصد چندشکلی (۸۶ درصد) را تولید کرد. این امر نشانگر تعداد بالای کپی این خانواده و همچنین فعالیت و چندشکلی ادغامی زیاد این خانواده در ژنوم انگورهای ایرانی می‌باشد. (D'Onofrio et al. 2010). در مطالعه چندشکلی ادغامی دو رتروترنسپوزون Vine1 و TvV1 در ۲۹ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس Vitis، گزارش کردند که این رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم گونه‌های مختلف جنس Vitis فراوانی بالایی داشته و قبل از واگرایی گونه-های مختلف این جنس، فعال و در تکامل گونه‌های آن نقش عمده‌ای داشته‌اند. در این مطالعه نشانگرهای مبتنی بر این دو خانواده قادر بودند ارقام و گونه‌های مختلف را از هم متمایز کنند. آغازگرهای مبتنی بر خانواده‌های رتروترنسپوزونی Gentil، Huben، Edel و Vine1 در حالت منفرد نتوانستند الگوی باندهای واضحی ایجاد کنند در حالی که در ترکیب با آغازگرهای ISSR باندهای واضح و چندشکل ایجاد کردند به طوری که ترکیب

جدول ۵- ماتریس سهم عضویت ارقام انگور در هر کلاستر براساس محاسبات نرم افزار Structure 2.3.1 در $K=3$

کد	ارقام			کد	گروه			ارقام	کد
	۱	۲	۳		۱	۲	۳		
۱	۰/۹۷۸	۰/۰۱۵	۰/۰۰۸	۴۳	آغ شانی	۰/۰۰۵	۰/۹۸۶	۰/۰۰۹	رزقی
۲	۰/۹۴۵	۰/۰۳۵	۰/۰۲۱	۴۴	جیغ جیغا	۰/۰۰۹	۰/۹۷۹	۰/۰۱۳	حسینی
۳	۰/۹۹۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۴۵	لعل سفید	۰/۰۰۵	۰/۹۸۹	۰/۰۰۶	تبرزه سفید
۴	۰/۹۴۶	۰/۰۳۰	۰/۰۲۴	۴۶	کلکه ریوی	۰/۰۰۵	۰/۹۸۹	۰/۰۰۶	قره ملخی
۶	۰/۹۶۴	۰/۰۲۰	۰/۰۱۷	۴۷	سیاه معمولی	۰/۰۰۶	۰/۹۹۰	۰/۰۰۴	ات اوزوم
۷	۰/۹۳۶	۰/۰۵۹	۰/۰۰۶	۴۹	شیرازی	۰/۰۲۱	۰/۹۷۳	۰/۰۰۶	لعل سیاه
۸	۰/۹۷۳	۰/۰۲۰	۰/۰۰۷	۵۰	انگوتکه	۰/۰۱۰	۰/۹۷۸	۰/۰۱۲	سیاه سردشت
۹	۰/۹۸۷	۰/۰۱۰	۰/۰۰۳	۵۱	لابروسکا	۰/۰۵۲	۰/۹۴۴	۰/۰۰۴	گرمیان
۱۰	۰/۹۸۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۳	۵۳	گلین بارماقی	۰/۰۰۶	۰/۸۲۲	۰/۱۷۱	مایه مو
۱۱	۰/۰۲۶	۰/۹۶۹	۰/۰۰۶	۵۴	اکوز گوزی	۰/۰۱۰	۰/۹۸۴	۰/۰۰۶	ریش بابا قرمز
۱۳	۰/۰۴۳	۰/۹۵۵	۰/۰۰۲	۵۶	موسکات	۰/۰۰۴	۰/۹۹۰	۰/۰۰۶	کشمش قرمز
۱۴	۰/۵۶۶	۰/۴۲۱	۰/۰۰۵	۵۷	خلیلی شیراز	۰/۰۱۰	۰/۹۷۸	۰/۰۱۲	فخری
۱۵	۰/۱۱۵	۰/۸۴۷	۰/۰۳۸	۵۹	رابی سیدلس	۰/۱۲۶	۰/۸۶۸	۰/۰۰۶	شاهرودی
۱۷	۰/۹۸۱	۰/۰۱۳	۰/۰۰۶	۶۰	پرلت	۰/۰۰۹	۰/۹۸۶	۰/۰۰۵	صاحبی
۲۰	۰/۹۹۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۶۲	رشه اصل	۰/۰۰۴	۰/۹۹۱	۰/۰۰۴	تبرزه قرمز
۲۱	۰/۹۹۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۶۳	بلاک سیدلس	۰/۰۰۹	۰/۹۸۴	۰/۰۰۷	دسترچین
۲۲	۰/۹۴۹	۰/۰۲۷	۰/۰۲۵	۶۴	فیلم سیدلس	۰/۰۰۶	۰/۸۹۰	۰/۱۰۵	ریش بابا سفید
۲۳	۰/۹۸۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۶۵	تامسون سیدلس	۰/۰۱۱	۰/۹۸۵	۰/۰۰۴	خلیلی سفید
۲۵	۰/۹۸۵	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	۶۷	H6	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۹۹۵	گوی ملکی
۲۶	۰/۹۷۴	۰/۰۲۰	۰/۰۰۶	۶۸	یاقوتی اصل	۰/۰۰۵	۰/۵۰۷	۰/۴۸۸	سایانی
۲۷	۰/۰۲۲	۰/۹۷۰	۰/۰۰۸	۷۰	سوپیور	۰/۰۰۸	۰/۹۸۶	۰/۰۰۶	کلاتی
۲۸	۰/۰۲۳	۰/۹۷۰	۰/۰۰۸	۷۱	وحشی پیرانشهر ۱	۰/۰۳۸	۰/۱۴۷	۰/۸۱۶	مام برایمه
۲۹	۰/۰۳۱	۰/۹۵۳	۰/۰۱۶	۷۲	وحشی پیرانشهر ۲	۰/۰۰۸	۰/۸۸۵	۰/۱۰۷	بول مازو
۳۰	۰/۰۰۸	۰/۹۸۱	۰/۰۱۱	۷۳	وحشی پیرانشهر ۳	۰/۰۰۸	۰/۰۱۵	۰/۹۷۷	لعل قرمز
۳۱	۰/۰۰۸	۰/۹۸۷	۰/۰۰۵	۷۴	وحشی پیرانشهر ۴	۰/۰۰۷	۰/۰۲۹	۰/۹۶۴	سفید شخ شخ
۳۲	۰/۰۰۵	۰/۹۸۴	۰/۰۱۲	۷۵	وحشی پیرانشهر ۵	۰/۰۱۵	۰/۰۰۶	۰/۹۷۹	قره شیره
۳۳	۰/۰۰۷	۰/۹۸۹	۰/۰۰۴	۷۶	وحشی پیرانشهر ۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۸	۰/۹۸۸	الحقی
۳۴	۰/۰۱۹	۰/۹۷۱	۰/۰۱۰	۷۷	وحشی پیرانشهر ۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۹۹۲	عسگری
۳۵	۰/۰۴۶	۰/۹۵۱	۰/۰۰۲	۷۸	وحشی پیرانشهر ۸	۰/۰۱۶	۰/۳۶۵	۰/۶۱۹	بیدانه سفید
۳۷	۰/۰۰۷	۰/۹۸۴	۰/۰۰۸	۸۱	وحشی سردشت ۱	۰/۰۱۶	۰/۹۲۰	۰/۰۶۴	سر قوله
۳۸	۰/۰۰۶	۰/۹۸۶	۰/۰۰۸	۸۲	وحشی سردشت ۲	۰/۰۴۲	۰/۸۶۷	۰/۰۹۱	چاوه گا
۳۹	۰/۰۱۱	۰/۹۸۳	۰/۰۰۶	۸۳	وحشی سردشت ۳	۰/۰۵۴	۰/۱۶۰	۰/۷۸۶	یاقوتی
۴۰	۰/۰۱۹	۰/۹۷۵	۰/۰۰۵	۸۴	وحشی سردشت ۴	۰/۰۲۰	۰/۰۱۵	۰/۴۶۵	قره گندمه
۴۱	۰/۰۵۶	۰/۹۴۱	۰/۰۰۳						گزنندایی

ریزماهواره هسته‌ای گزارش کردند که تشابه ژنتیکی زیادی بین انگور سیاه معمولی و انگورهای وحشی منطقه وجود ندارد. این نتایج نشان می‌دهد با وجود این‌که دندروگرام حاصل، ارقام مورد مطالعه را از هم تفکیک کرد ولی گروه‌بندی ارقام تحت‌تاثیر مبدا جغرافیایی قرار نگرفت، بنابراین به نظر می‌رسد که در برنامه‌های دورگ‌گیری انگور از فاصله ژنتیکی به جای فاصله جغرافیایی استفاده شود. در تحقیق حاضر براساس نتایج حاصل از نشانگرهای رتروترنسپوزونی مورد استفاده، حالت سینونیمی (یک رقم با دو اسم) بین ارقام رشه و سیاه معمولی (خوشناو) در بین انگورهای مورد بررسی مشخص شد. هم‌چنین حالت‌هایی نیز از همونیمی (ارقام متفاوت با اسامی یکسان) بین انگورهای ریش بابا سفید و ریش بابا قرمز مشاهده شد که احتمال کلون بودن آن‌ها فرض می‌شد. این ارقام در دندروگرام حاصل کاملاً مجزا از هم بوده و در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند. Dolati Baneh et al. (2007) براساس نشانگرهای SSR و براساس نتایج حاصله از روابط والد-نتاج گزارش کردند که انگور ریش بابا قرمز یکی از والدین احتمالی انگور ریش بابا سفید بوده‌است.

در کل اطلاعات حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP در جهت شناسایی و گروه‌بندی ارقام انگور مفید می‌باشد و تنوع نسبتاً خوبی در کلکسیون ارقام انگور مطالعه شده وجود دارد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی انگور مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این‌که هر خانواده رتروترنسپوزونی الگوی توزیع و تاریخچه ادغامی متفاوتی در ژنوم دارد و هر خانواده در نواحی ژنومی متفاوتی اعم از یوکروماتینی و هتروکروماتینی ادغام می‌شوند توصیه می‌شود که از خانواده‌های رتروترنسپوزونی مختلف در مطالعات مرتبط در انگور و گیاهان دیگر استفاده شود تا پوشش ژنومی مناسبی حاصل شود. همچنین با توجه به اتمام توالی‌یابی ژنوم انگور و کارایی بالای نشانگرهای IRAP و REMAP بهتر است خانواده‌های رتروترنسپوزونی دیگر نیز در ژنوم این گیاه شناسایی شده و کارایی آن‌ها به عنوان نشانگر ملکولی مورد بررسی قرار گیرد. البته جهت پیشرفت اساسی در روش‌های انتخاب و استراتژی به‌نژادی توصیه می‌شود تجزیه و تحلیل این نشانگرها همراه با نشانگرهای ژنی و داده‌های فنوتیپی صورت گیرد. براساس نتایج حاصل از

تحقیق و مطالعه حاضر را می‌توان به تفاوت در تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نوع نشانگرهای مورد استفاده نسبت داد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ضریب تشابه دایس ارقام مورد مطالعه را در شش گروه اصلی قرار داد (شکل ۲). تمامی ارقام انگور بی‌دانه (به غیر از یاقوتی) در یک گروه (گروه ۲) قرار گرفتند. در این گروه که بزرگترین گروه حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مورد مطالعه بود ارقام بی‌دانه سفید و کشمش قرمز با فاصله ژنتیکی کم در مجاورت هم واقع شدند که می‌تواند نمایانگر وجود روابط ژنتیکی بین آن‌ها باشد. هم‌چنین ارتباط ژنتیکی نزدیکی بین این دو انگور و انگور تامسون سیدلس مشاهده شد. انگور تامسون سیدلس کلونی پر بار و زودرس از انگور بی‌دانه سفید است که در اثر وقوع جهش‌های اتفاقی به‌دست آمده است (Dolati Baneh et al. 2007). بنابراین قرارگیری این ارقام در یک گروه در مجاورت هم قابل انتظار می‌باشد. رقم رشه اصل با سیاه معمولی (خوشناو) در این کلاستر در مجاورت هم قرار گرفته‌اند. رقم سیاه معمولی یا خوشناو کلونی پر بار از انگور رشه اصل است (Dolati Baneh et al. 2007). هم‌چنین این ارقام تشابه ژنتیکی نزدیکی با رقم خلیلی شیراز نشان دادند. در تحقیق Dolati Baneh et al. (2007) با نشانگرهای AFLP نیز رقم‌های رشه و خوشناو در یک کلاستر با فاصله کم در مجاورت هم قرار گرفتند. هم‌چنین در این گروه دو رقم پرلت و سوپریور تشابه بسیار بالایی نشان دادند. دندروگرام حاصل، انگورهای زراعی و وحشی مورد مطالعه در پژوهش حاضر را از هم متمایز کرد. هر چند که در گروه انگورهای زراعی چند نمونه انگور وحشی نیز قرار گرفت. در این گروه نیز ارتباط نزدیکی بین انگور سیاه معمولی و انگوتکه و ژنوتیپ وحشی SI دیده شد. این سه نمونه متعلق به منطقه سردشت هستند. (Renger et al. 2004) به منظور بررسی تغییرات ژنتیکی در ۸۷ نمونه از انگورهای وحشی و زراعی از نشانگرهای SSR و مورفولوژیک استفاده کردند. نتایج آن‌ها رابطه نزدیکی بین انگورهای وحشی و ارقام زراعی نشان نداد ولی تنوع ژنتیکی بالایی در نمونه‌های انگور وحشی مشاهده شد. Dolati Baneh et al. (2007) نیز براساس نشانگرهای ریزماهواره کلروپلاستی گزارش کردند که رقم سیاه معمولی و ژنوتیپ‌های وحشی منطقه سردشت دارای هاپلویتپ مشترک هستند. اما براساس نتایج

سپاسگزاری

از پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر تامین امکانات آزمایشگاهی و از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی به دلیل فراهم کردن نمونه‌های گیاهی قدردانی می‌شود.

تحقیق حاضر خانواده TvV1 دارای بیشترین فعالیت و تعداد کپی در ژنوم انگور بود. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مبتنی بر این خانواده جهت مطالعه روابط تکامل بین گونه‌های مختلف در جنس *Vitis* استفاده کرد.

منابع

Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012) Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 286-296

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons New York.

Bowers JE, Meredith CP (1996) Genetic Similarities among wine grape cultivars revealed by Restriction Fragment-length polymorphism (AFLP) analysis. *Journal of American Society for Horticultural Sciences* 121: 620-624.

Carreno E, Lopez MA, Labra M, Rivera D, Sancha J, Ocete R, Martinez de, Toda YF (2004) Genetic relationship between some Spanish *Vitis vinifera* L. subsp. *Sativa* cultivars and wild grapevine populations (*Vitis vinifera* L subsp. *Silvestris* (Gmelin) Hegi): a preliminary study. *Plant Genetic Research Newsletter* 137: 42-45.

Cervera MT, Cabezas JA, Sancha JC, Martinez F, Martinez JM (1998) Application of AFLP to the Characterization of grapevine *vitis vinifera* genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 51-59.

D'Onofrio C, DeLorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genetics and Genomes* 6: 451-466.

Dolati Baneh H, Grassi F, Mohammadi SA, De Mattima f, Imazio S, Labra M (2007) 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.

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

Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis THN (1998) Retrotransposon based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16: 643-650.

Grando M, Frisinghelli C (1998) Grape microsatellite markers: sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. *Vitis* 37: 79-82.

Grassi F, Labra M, Scienza A, Imazio S (2002) Chloroplast SSR markers to assess DNA diversity in wild and cultivated grapevine. *Vitis* 41: 157-158.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choise N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.

Jedari Kouhi B, Garoosi GA, Hosseini R (2011) Investigation on genetic variation in seedless grapevine cultivars using RAPD molecular marker. *Journal of Cell and Tissue* 2: 99-106 (In Farsi).

Kalendar R, Grob T, Regina M, Souiniemi A, Schulman AH (1999) IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711.

Karami MJ (1995) Identification of grapes of Kordestan province. MSc Dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran (In Farsi).

Kocsis M, Romi LJ, Putnoki, Kozma P, Borhidi A (2005) Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. *Vitis* 44: 87-91.

Martinez LE, Cavagnaro PF, Masuelli RW, Zuniga M (2006) SSR-based assessment of genetic diversity in south American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science* 170: 1036-1044.

Nasri S, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R, Bernoosi I (2013) Retrotransposon insertional polymorphism in Iranian bread wheat cultivars and breeding lines revealed by IRAP and REMAP markers. *Biochemical Genetics* 51: 927-943

Peakall R, Smouse P (2006) GenA1Ex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

Pereira HS, Barao A, Delgado M, Morais-Cecilio L, Viegas W (2005) Genomic analysis of grapevine retrotransposon 1 (Gret1) in *Vitis vinifera*. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 871-878.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-954.
- Ramallo, E, Kalendar R, Schulman AH, Martinez JA (2008) Reme1, a Copia retrotransposon in melon is transcriptionally induced by UV light. *Plant Molecular Biology* 66: 137-150.
- Regner F, Hack R, Gangl H, Leitner G, Mandl K, Tiefenbrunner W (2004) Genetic variability and incidence of systemic diseases in wild vines (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) along the Danub. *Vitis* 43: 123-130.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and multivariate analysis System, version 2.1. Exeter Software, New York.
- Smykal P, Bacova-Kerteszova N, Kalendar R, Corander J, Schulman AH, Pavelek M (2011) Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 122:1385-1397
- Tafzili A, Hekmati J, Firouzeh P (1994) Grape. University of Shiraz Publication, Iran (In Farsi).
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2: e1326.
- Vukich M, Schulman AH, Giordani T, Natali L, Kalendar R, Cavallini A (2009) Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1027-1038.