مقاله پژوهشی

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام محلی انگور بر اساس خصوصیات برگی و نشانگرهای مولکولی در منطقه بجنورد استان خراسان شمالی

مژگان حشمتی[۱]، مهدی رضائی[۱]*، حسن قربانی‌قوژدی[۲] و علی دادار[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۹- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۳)

چکیده

استان خراسان شمالی از جمله مناطق مهم انگورکاری دیم ایران می باشد. تنوع ارقام انگور این منطقه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۲۵ انگور از ارقام محلی با ویژگی برگی و نشانگر ISSR و RAPD مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین ضریب تغییرات به میزان ۹۹/۳۱ و ۸۶/۰۳ درصد به ترتیب در صفات تراکم کرک بین رگبرگ روی برگ و زیر برگ مشاهده شد. انگورها در تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات برگی به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند. نتایج نشان داد که ارقام محلی کج‌انگور و یاقوتی، عسگری‌سفید و گلین‌بارماقی، قزل‌اوزم و خلیلی‌قرمز ویژگی‌های برگی نسبتاً مشابهی باهم دارند. در ۲۵ رقم انگور از ۱۰ آغازگر ISSR و ۱۰ آغازگر RAPD در مجموع به ترتیب ۱۰۳ و ۱۱۳ باند بدست آمد. آغازگر UBC888 از ISSR با ۱۳ باند و OPK از RAPD با ۱۴ باند بیشترین تعداد باند را داشتند. فاصله ژنتیکی در ماتریس عدم تشابه در نشانگرهای RAPD بین ۰/۴ تا ۰/۹ و در نشانگرهای ISSR از ۰/۲۳ تا ۰/۷۸ متغیر بود. بیشترین شباهت بین ارقام محلی کج انگور با سبز انگور، یسرقین و فخری و خلیلی‌قرمز با سیاه دیررس دیده شد. تجزیه کلاستر و تجزیه به مولفه اصلی با هر دو نشانگر، ارقام را به چهار گروه مجزا تقسیم نمود. طبق نتایج هر دو نشانگر، دو رقم خوش ناو و خلیلی زرد در فاصله دورتری نسبت به سایر ارقام قرار داشتند. ارقام محلی انگور مورد مطالعه از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار بودند که می‌توان از آنها در کارهای اصلاحی و حفظ ژرم‌پلاسم بهره برد.

کلمات کلیدی: انگور، تنوع ژنتیکی، رقم، صفات مورفولوژیکی، نشانگر ژنتیکی

۱-به ترتیب فارغ‌التحصیل کارشناسی‌ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود

۲- مربی گروه مهندسی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی گناباد، گناباد

۳- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان شمالی، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، بجنورد

* پست الکترونیک: Mhrezaei@shahroodut.ac.ir

مقدمه

انگور با نام علمی *Vitis vinifera* یکی از محصولات مهم باغی در ایران می‌باشد. کشت و کار انگور در مناطق مختلف ایران قدمت زیادی دارد و این موجب شده است که تنوع بالایی از لحاظ ارقام محلی در مناطق مختلف وجود داشته باشد (رازی و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به اهمیت تنوع ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاهی برای نسل آینده، لازم است تا رقام محلی در مناطق مهم انگورکاری ایران قبل از فرسایش ژنتیکی مورد ارزیابی قرار بگیرند. شناخت توان ژنتیکی نهفته موجود در توده گیاهی، محققین را در انتخاب صحیح صفات مؤثر در تولید و معرفی ارقام برتر یاری خواهد کرد.

ارقام انگور معمولاً براساس ۱۳۰ صفت مورفولوژیکی و معیارهای تاک‌نگاری در مراحل فنولوژیکی خاص در گیاهان بالغ ارزیابی، شناسایی و گروه‌بندی می‌شوند (اخوایا و آخالکاتسی[1]، ۲۰۱۰). صفات مورفولوژیکی، ارزیابی‌های مولکولی و مطالعات سیتوژنتیک، روش‌های معتبری هستند که در برآورد تنوع ژنتیکی ارقام مختلف می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (نوسیس[2] و همکاران، ۲۰۱۹).

با وجود اهمیت، دقت و سرعت روش‌های مولکولی در تفکیک ژنوتیپ‌ها، بررسی‌های مورفولوژیک همچنان به عنوان مبنا و اولین مرحله در طبقه‌بندی‌های ژرم‌پلاسم مورد استفاده قرار می‌گیرند (نوسیس و همکاران ۲۰۱۹). مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جهت مطالعه ژرم‌پلاسم، تهیه برنامه‌های اصلاحی، بررسی روند تکامل گونه، رده‌بندی و بسیاری مسائل دیگر اهمیت دارد. پژوهش‌های متعددی با نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی بر روی انگور در سال های اخیر انجام شده است (رازی و همکاران، ۱۳۹۸؛ الهوماسونی[3] و همکاران، ۲۰۱۲؛ عبیری[4] و همکاران، ۲۰۲۰؛ چودهاری[5] و همکاران ۲۰۱۴). پزارسکی[6] و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره (SSR) و آنالیز شکل برگ ارقام انگور قزاقستان را با واریته‌های اروپایی و آسیایی را بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۷ شاخصه مورد بررسی در شکل برگ انگور، تنوع بالا و طبیعت بسیار پیچیده‌ای دارند و بررسی ژنوم ژنوتیپ‌ها در سطح DNA نشان داد که اکثر ارقام قزاقی به لحاظ ژنومی مخلوطی از ارقام آسیایی و اروپایی است. در پژوهشی ۵۵ رقم محلی از کلکسیون انگور در شاهرود با ۳۳ صفت مورفولوژیکی مربوط به برگ، خصوصیات رشدی و میوه مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع مورفولوژیکی بسیار بالایی در این ارقام بومی وجود دارد (عبیری و همکاران، ۲۰۲۰). خدیوی‌خوب[7] و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ۱۶ ویژگی‌های میوه ۲۳ رقم انگور نشان دادند که به لحاظ ویژگی‌های میوه تنوع بالایی در ارقام انگور ایرانی وجود دارد. در پژوهشی دیگر ارقام انگور بومی شیلی و رقم 'Merlot' بومی شیلی و رقم 'Merlot' فرانسه با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD و ۱۱ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق دو رقم Merlot شیلی و فرانسه خویشاوندی ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر نداشته و دو ژنوتیپ متفاوت دیگر، از نظر ژنتیکی مشابه بودند (هرارا[8] و همکاران، ۲۰۰۲). از ۲۴ آغازگر RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بین ۳۶ رقم انگور بومی رومانی استفاده شده و آنها را در سه گروه بزرگ دسته‌بندی کردند (بدئا[9] و همکاران، ۲۰۰۹). روابط ژنتیکی بین تعدادی از واریته‌های انگور کشور هند در پژوهشی با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت و این تکنیک را به عنوان یک روش مولکولی مناسب و قابل اطمینان برای آنالیز ژنتیکی واریته‌های انگور معرفی شد (دهانورکار[10] و همکاران، ۲۰۰۵). در پژوهشی دیگر با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR تنوع ژنتیکی بین تعدادی از ارقام انگور را مورد بررسی قرار گرفت و گزارش کردند که نشانگر ISSR به خوبی روابط ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه را نشان می‌دهد (سبیر[11] و همکاران، ۲۰۰۹). تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام انگور کشور مصر نیز با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده از این تحقیق نشان داد که تکنیک ISSR برای تعیین تنوع ژنتیکی و کشف روابط ژنتیکی ارقام انگور کارآمدتر از نشانگرهای مورفولوژیک می‌باشد (الهوماسونی و همکاران، ۲۰۱۲). رازی و همکاران (۱۳۹۸) تنوع ژنتیکی ۷۵ رقم انگور را با استفاده

1. Ekhvaia and Akhalkatsi
2. Nwosisi
3. El-Homosany
4. Abiri
5. Choudhary
6. Pozharskiy
7. Khadivi khub
8. Herrera
9. Bodea
10. Dhanorkar
11. Sabir

از ۱۷ نشانگر ISSR بررسی کردند. ارقام مورد بررسی به چهار گروه اصلی تقسیم شدند و بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۷۳) بین ارقام جیغ جیغا و بلک سیدلس و همچنین بین آلفونسو و بلک سیدلس و کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۱) بین ارقام دسترچین و لعل سیاه را گزارش کردند. در یک پژوهش ۲۱ نمونه انگور از مناطق غرب و شمال غرب ایران با نشانگرهای ISSR و DAMD بررسی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد، شباهت ژنتیکی بین ارقام ۰/۲۱ تا ۰/۸۶ با نشانگر ISSR و ۰/۱۲ تا ۰/۶۷ با نشانگر DAMD متغیر است و این نشانگرها قادرند تا پلی‌موفیسم بین ژنوتیپ‌های انگور را تشخیص دهند (سیدمرادی[1] و همکاران، ۲۰۱۲).

انگورکاری در مناطق مختلف ایران از جمله خراسان شمالی قدمت زیادی دارد و ارقام محلی متعددی در این منطقه از قدیم کشت و کار می‌شده‌اند که تاکنون بررسی نشده‌اند. هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان قرابت و خویشاوندی ارقام مختلف انگور منطقه بجنورد (واقع در استان خراسان شمالی) با استفاده از صفات مورفولوژیک برگی و نشانگرهای ISSR و RAPD می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این پژوهش بر روی کلکسیون انگور واقع در منطقه بدرانلو استان خراسان شمالی در منطقه بجنورد در سال ۱۳۹۸ انجام گردید. این کلکسیون در طول 57°8'40"E و عرض 37°29'32"N جغرافیایی واقع شده است. ارتفاع از سطح دریا ۱۳۲۵ متر و ۲۵۰ میلی‌متر بارندگی سالیانه دارد. از نمونه‌های این کلکسیون ۲۵ ژنوتیپ مختلف از ارقام محلی منطقه انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱- ارقام محلی استفاده شده از کلکسیون انگور بدارنلور خراسان شمالی

شماره	نام رقم	شماره	نام	شماره	نام رقم
۱	شاهانی قزوینی	۱۰	مام‌پرایم	۱۸	خلیلی‌زرد
۲	سبزعین	۱۱	نیشابوری	۱۹	سیاه دیررس
۳	کج انگور	۱۲	صاحبی	۲۰	کلاهداری
۴	سبز انگور	۱۳	عسگری سفید	۲۱	خوش‌ناو
۵	سبزواری	۱۴	خلیلی قرمز	۲۲	دیوانه
۶	سیاه سردشت	۱۵	فلیم‌سیدلس	۲۳	یاقوتی
۷	دمبار	۱۶	گلین‌بارماقی	۲۴	فخری
۸	خلیلی سیاه	۱۷	لعل	۲۵	یسرقین
۹	قزل‌اوزم				

صفات مورفولوژیکی

۲۱ صفت با توجه به توصیف‌نامه UPOV از برگ‌های کامل انگور اندازه‌گیری شد (UPOV, 2018). اساس امتیازدهی برای صفات کیفی که تغییرات پیوسته دارند (داده‌های رتبه ای) مانند تراکم کرک‌ها، با شماره فرد ۱ تا ۹ و صفات کیفی که تغییرات ناپیوسته دارند (داده‌های اسمی) از قبیل وضعیت اندام‌های جنسی گل و نظایر آن، امتیازدهی با استفاده از اعداد متوالی ۱، ۲، ۳، ۴، ... انجام گردید (جدول ۲).

متوسط سطح برگ برای هر رقم با دستگاه سطح برگ‌سنج (شرکت آرا تجهیز) اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری طول برگ، طول پیچک و طول دمبرگ از خط‌کش استفاده شد. برای صفات کمی اندازه‌گیری شده ۱۰ نمونه برای هر رقم میانگین‌گیری شد.

استخراج DNA، انتخاب نشانگر و واکنش PCR

استخراج DNA از بافت برگی جوان و تازه گیاه انگور به روش دوئل و دوئل[2] (۱۹۹۸) با کمی تغییرات صورت گرفت. برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استخراج از ۱۰ میلی‌لیتر Tris-Hcl، pH=8 یک مولار، ۲۸ میلی‌لیتر EDTA، pH=8، چهار میلی‌لیتر NaCl پنج مولار به همراه PVP-40 یک گرم، CTAB دو گرم، مرکاپتواتانول دو دهم درصد استفاده شد. در نهایت حجم بافر با آب مقطر دو بار تقطیر استریل و به

1. Seyedimoradi

2. Doyle and Doyle

جدول ۲- نحوه اندازه‌گیری ۲۱ صفت مورفولوژیکی مربوط به برگ در ارقام انگور مورد مطالعه

	صفت مورد اندازه‌گیری	علامت اختصاری	واحد	دامنه کد دهی	نحوه اندازه‌گیری
		صفات کمی			
۱	نسبت طول به عرض دندانه	DWL	-	-	میانگین ۱۰ نمونه
۲	طول پیچک	TL	cm	-	میانگین ۱۰ نمونه
۳	اندازه دمبرگ	LT	cm	-	میانگین ۱۰ نمونه
۴	سطح برگ	LA	cm^2	-	میانگین ۱۰ نمونه
۵	طول دندانه	DL	mm	-	میانگین ۱۰ نمونه
		صفات کیفی			
۶	شکل پهنک	LSH	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	قلبی شکل، سه‌گوش، پنج ضلعی، دایره شکل، کلیه مانند
۷	تعداد لوب	LN	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	ندارد، سه، پنج، هفت، بیشتر از هفت
۸	عمق بریدگی جانبی	MD	کد	۱، ۳، ۵، ۷، ۹	خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد
۹	آرایش بریدگی بالایی بین بخش‌های پهنک	WC	کد	۱، ۲، ۳، ۴	باز، بسته، کمی همپوشان، شدیدا همپوشان
۱۰	آرایش بریدگی پهنک در مجاور دمبرگ	CA	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹	باز خیلی گسترده، باز و گسترده، نیمه باز، کمی باز، بسته، کمی همپوشان، نیمه همپوشان، همپوشانی شدید، همپوشانی بسیار شدید
۱۱	طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی	LL	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	خیلی کوتاه‌تر، کمی کوتاه‌تر، مساوی، کمی بلندتر، خیلی بلندتر
۱۲	بریدگی ختم شده با رگبرگ اصلی	CML	کد	۰، ۱	ندارد، دارد
۱۳	شکل دندانه	DSH	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	هردوطرف فرورفته، هردوطرف راست، هردوطرف برآمده، یک طرف برآمده یک طرف فرورفته، ترکیبی از هردو طرف
۱۴	تراکم کرک‌های ایستاده روی رگبرگ اصلی در سطح زیرین پهنک	CDE	کد	۱، ۳، ۵، ۷، ۹	ندارد یا خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد
۱۵	تراکم کرک‌های ایستاده بین رگبرگ	CBE	کد	۱، ۳، ۵، ۷، ۹	ندارد یا خیلی کم، کم، متوسط، زیاد، خیلی زیاد
۱۶	سینوس دمبرگ مضرس‌دار	TPS	کد	۰، ۱	ندارد، دارد
۱۷	سینوس دمبرگ بین رگبرگ‌ها	PSL	کد	۰، ۱	ندارد، دارد
۱۸	شکل سینوس جانبی بالایی	SUL	کد	۱، ۲، ۳، ۴	باز، بسته، کمی همپوشان، شدیداهمپوشان
۱۹	رنگ سطح رویی پهنک برگ جوان	LUA	کد	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	سبزمتمایل به زرد، سبزبالکه‌های آنتوسیانینی، قرمز-مسی روشن، قرمز-مسی تیره، قرمز-جگری
۲۰	میزان بازشدگی نوک شاخه جوان	OAL	کد	۱، ۳، ۵، ۷، ۹	بسته، کمی باز، نیمه باز، بازوگسترده
۲۱	تعداد پیچک‌های متوالی در شاخه جوان	TTN	کد	۱، ۲	کمتر از سه، سه یا بیشتر

حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر و pH آن توسط HCl به ۸ رسید. کیفیت و کمیت DNA روی ژلآگارز ۰/۸ درصد و دستگاه نانو دراپ مدل (N60 UV/Vis) مورد تأیید و اندازه‌گیری قرار گرفت (دوئل و دوئل، ۱۹۹۸). برای انجام PCR از مخلوط واکنش آماده یا کیت (VIRAGENE Co.) با ترکیبات (Tris_HCl (PH=8.5), Ampliqon Taq DNA Polymerase 0.2 units/ul, $(NH_4)_2 SO_4$, $MgCl_2$ 4mM, dNTPs 0.4mM, Tween 20 (0.2%)) که حاوی رنگ قرمز خنثی و تثبیت کننده بود، استفاده شد. نشانگرهای مورد استفاده از شرکت سیناکلون تهیه شد که هر کدام از نشانگرها به نسبت ۱۰ به ۹۰ رقیق‌سازی و مورد استفاده قرار گرفتند. فهرست و توالی نشانگرهای استفاده شده در جدول ۳ ارائه شده است.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه (PCR) واکنش زنجیره-ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده ترموسایکلر (Bio-Rad T100TM) انجام گرفت.

الکتروفورز محصول PCR

محصول PCR برای هر نشانگر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (W/V) در دستگاه الکتروفورز حاوی بافر TBE 0.5X جدا

جدول ۳- توالی، نام تجاری و دمای اتصال ۱۰ آغازگرهای ISSR و ۱۰ آغازگر RAPD مورد استفاده

دمای اتصال (°C)	توالی اغازگر*	نام آغازگر ISSR	دمای اتصال	توالی اغازگر	نام آغازگرRAPD
۵۲	(AC)8C	UBC826	۳۴	GGGAAGCGTC	TIBMBE08
۵۳	(GA)8YT	UBC840	۳۲	GGGAAAAGCC	TIBMBE17
۵۲	(GT)7YC	UBC850	۳۴	CCTCCACCAG	BD12
۵۳	(TC)8RT	UBC853	۳۴	CCTGGCACAG	BC13
۵۰	HBH(AG)7	UBC884	۳۴	AGCGTCACTC	OPN13
۵۲	VDV(CT)7	UBC886	۳۲	AGGTGACCGT	OPA18
۵۱	DVD(TC)7	UBC887	۳۲	CAGCACTGAC	OPO07
۵۲	BDB (CA)7	UBC888	۳۴	GTCTCCGCAA	OPK02
۵۳	VHV(GT)7	UBC890	۳۲	GTAACCAGCC	OPM16
۴۸	(AG)8T	S14	۳۲	TCGCCGCAAA	OPN11

* Y = (C,T); R = (A,G); B = (C,G,T); D = (A,G,T); H=(A,C,T); V=(A,C,G)

شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند، DNA مقیاس به میزان ۶ میکرولیتر در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت. ژل پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیم بروماید در دستگاه ژل داک (Gel Doc Vilber E-box-CX5) اسکن و باندهای واضح و شارپ امتیازدهی شدند. امتیازدهی باندها به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی از نرم‌افزار SPSS 17.0 استفاده شد. همبستگی بین صفات کیفی با ضریب اسپیرمن و صفات کمی با پیرسون انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای با روش وارد[1] و استانداردسازی داده انجام شد. برای داده‌های مولکولی، برای هر آغازگر دامنه باندهای تکثیری، تعداد کل باند، تعداد باندهای چندشکل و درصد چندشکلی، میانگین باندهای و قدرت تفکیک‌کنندگی[2] (Rp) (پروست و ویلکینسون[3]، ۱۹۹۹) تعیین گردید. ماتریس عدم تشابه ژنتیکی و دندروگرام تنوع ژنتیکی به ترتیب توسط روش جاکارد و UPGMA و با نرم‌افزار DARwin 5.0 (پریر و جاکیمندکالت[4]، ۲۰۰۵) انجام پذیرفت. آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی با نرم‌افزار DARwin 5.0 انجام شد.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیکی

مشخصات صفات اندازه‌گیری شده و میزان واریانس و ضریب تغییرات برای هر صفت در جدول (۴) ارائه شده است. ارقام محلی انگور مورد مطالعه در برخی صفات مانند شکل برگ، تعداد لوب، سطح برگ، اندازه دمبرگ، آرایش بریدگی بالایی بین بخش‌های پهنک، طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی، طول دندانه، نسبت طول به عرض دندانه و تراکم کرک‌های ایستاده روی رگبرگ اصلی در سطح زیرین پهنک برگ و تنوع کمتری را نشان دادند. ضریب تغییرات میزان پراکندگی به ازای یک واحد از میانگین را بیان می‌کند. تراکم کرک‌های ایستاده بین رگبرگ با ضریب تغییرات ۹۹/۳۱ بیشترین تنوع و صفات نسبت طول به عرض دندانه و اندازه دمبرگ به ترتیب با شاخص تنوع ۱۲/۶۵ و ۱۸/۷۹ کمترین تنوع را نشان دادند. میانگین ضریب تغییرات، ۴۴ درصد بود که نشان‌دهنده تنوع بالای صفات در ارقام مورد ارزیابی می باشد.

همبستگی بین صفات

ضریب همبستگی پیرسون، برای توصیف همبستگی بین دو متغیر که با استفاده از مقیاس فاصله‌ای یا نسبی اندازه‌گیری شده باشند، به کار برده می‌شود. ضریب همبستگی اسپیرمن صورتی از ضریب همبستگی پیرسون است و زمانی به کار برده می‌شود که نمره‌ها رتبه‌بندی شده باشند یا به جای اعداد، رتبه‌های آن‌ها در دست باشد. نتایج همبستگی صفات نشان‌داد که طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی با شکل برگ (۰/۵۲) و صفت تعداد پیچک‌های متوالی با صفت عمق بریدگی جانبی پهنک (۰/۴۴) همبستگی مثبت

1. Ward
2. Resolving power
3. Prevost and Wilkinson
4. Perrier and Jaqeuemond-Collet

جدول ۴- خصوصیات تشریحی آماری ۲۱ صفت موفولوژیکی مربوط به برگ و شاخه جوان در ۲۵ رقم محلی انگور

	صفت مورد اندازه گیری	نحوه اندازه گیری	کمترین	حداکثر	میانگین	واریانس	ضریب تغییرات
	صفات کمی						
۱	نسبت طول به عرض دندانه	-	۰/۵۷	۱/۰۳	۰/۸۸	۰/۰۱	۱۲/۶۵
۲	طول پیچک	cm	۴/۷۵	۲۴/۱۶	۱۷/۴۳	۱۸/۵۲	۲۴/۶۸
۳	اندازه دمبرگ	cm	۳/۷۵	۱۰/۶۲	۷/۷۶	۲/۱۶	۱۸/۹۴
۴	سطح برگ	cm^2	۱۵۸	۴۲۹	۲۹۸	۴۹۷۸	۲۳/۶۴
۵	طول دندانه	mm	۳/۵۳	۸/۶	۶/۷۸	۱/۶۳	۱۸/۷۹
	صفات کیفی						
۶	شکل پهنک	کد	۲	۴	۳/۰۴	۰/۵۴	۲۴/۱۷
۷	تعداد لوب	کد	۱	۵	۲/۸	۰/۵۸	۲۷/۲۸
۸	عمق بریدگی جانبی	کد	۱	۹	۴/۸۸	۱۰/۸۶	۶۷/۵۳
۹	آرایش بریدگی بالایی بین بخش‌های پهنک	کد	۱	۴	۱/۷۶	۸	۵۲/۵۹
۱۰	آرایش بریدگی پهنک در مجاور دمبرگ	کد	۲	۹	۴/۱۶	۳/۸۹	۴۷/۴۱
۱۱	طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی	کد	۱	۴	۲/۳۲	۰/۶۴	۳۴/۵۷
۱۲	بریدگی ختم شده با رگبرگ اصلی	کد	۱	۹	۵/۱۶	۱۶/۶۴	۷۹/۰۵
۱۳	شکل دندانه	کد	۱	۵	۳/۲۰	۱/۵	۳۸/۲۷
۱۴	تراکم کرک‌های ایستاده روی رگبرگ اصلی در سطح زیرین پهنک	کد	۱	۹	۲/۸۴	۵/۹۷	۸۶/۰۶
۱۵	تراکم کرک‌های ایستاده بین رگبرگ	کد	۱	۹	۲/۶۰	۶/۶۷	۹۹/۳۱
۱۶	سینوس دمبرگ مضرس‌دار	کد	۰	۱	۰/۴۰	۰/۲۵	-
۱۷	سینوس دمبرگ بین رگبرگ‌ها	کد	۰	۱	۰/۶۴	۰/۲۴	-
۱۸	شکل سینوس جانبی بالایی	کد	۱	۴	۱/۸۴	۰/۸۹	۵۱/۲۷
۱۹	رنگ سطح رویی پهنک برگ جوان	کد	۱	۴	۲	۰/۹۲	۴۷/۸۷
۲۰	میزان بازشدگی نوک شاخه جوان	کد	۱	۵	۲/۸۴	۲/۶۴	۵۲/۲۱
۲۱	تعداد پیچک‌های متوالی در شاخه جوان	کد	۱	۲	۱/۶۴	۰/۲۴	۲۹/۸۷

و معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان داد. صفت شکل سینوس جانبی بالایی با صفت تعداد لوب (۰/۴۷-) و صفت میزان بازشدگی نوک در شاخه‌های جوان با صفت بریدگی ختم شده به رگبرگ اصلی (۰/۴۶-) همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشتند. صفت بریدگی ختم شده به رگبرگ اصلی با صفت آرایش بریدگی پهنک در مجاور دمبرگ (۰/۶۳-) و صفت رنگ سطح رویی پهنک با صفت شکل سینوس جانبی بالایی (۰/۵۱-) همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۱ درصد داشت. همچنین صفت تراکم کرک‌های ایستاده بین رگبرگ همبستگی مثبت و معنی‌داری با صفت تراکم کرک‌های ایستاده روی رگبرگ اصلی در سطح زیرین پهنک (۰/۹۳) در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۵).

نتایج همبستگی صفات کمی مورد مطالعه با ضریب پیرسون در جدول-۶ ارائه شده است. با توجه به نتایج ثبت شده طول پیچک با سطح برگ (۰/۴۴) رابطه معنی‌داری در سطح ۵ درصد با هم نشان دادند. همچنین صفات اندازه دمبرگ با سطح برگ، اندازه دمبرگ با طول پیچک، طول دمبرگ با اندازه دمبرگ، نسبت طول به عرض دندانه با طول دمبرگ رابطه مثبت و معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان دادند (جدول ۶). به این معنی که برگ‌های بزرگتر دمبرگ های بزرگتری دارند و هر چه اندازه دمبرگ در یک واریته بزرگتر باشد طول پیچک در شاخه نیز بزرگتر خواهد بود.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیکی برگ

در این مطالعه گروه‌بندی ۲۵ رقم انگور با استفاده از کلیه صفات مورد بررسی به روش وارد صورت گرفت. در فاصله ۱۶، ارقام به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). گروه اول این دندروگرام شامل ارقام محلی کج‌انگور، یاقوتی، سیاه‌سردشت، لعل، خوش‌ناو و سبزعین بود. ارقام این گروه از نظر شکل برگ، تعداد لوب، سطح برگ، اندازه دمبرگ، طول پیچک، عمق بریدگی جانبی، طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی، طول دندانه، نسبت طول به عرض دندانه،

جدول ۵- ضریب همبستگی اسپیرمن بین صفات مورفولوژیکی برگ در ۲۵ رقم محلی انگور

صفت	LSH	LN	MD	WC	CA	LL	CML	DSh	CDE	CBE	TPS	PSL	SUL	LUA	OAL	TTN
LSH	۱															
LN	-۰/۲۱	۱														
MD	-۰/۲۶	۰/۰۶	۱													
WC	-۰/۱۸	-۰/۱۸	۰/۰۱	۱												
CA	۰/۰۱	-۰/۲۲	-۰/۲۲	-۰/۰۸	۱											
LL	۰/۵۲*	-۰/۲۴	-۰/۳۰	۰/۱۷	-۰/۰۴	۱										
CML	-۰/۰۶	۰/۲۲	-۰/۴۶*	-۰/۱۸	۰/۶۳**	۰/۱۷	۱									
DSh	۰/۱۹	-۰/۲۸	-۰/۲۴	-۰/۰۹	۰/۱۷	۰/۰۸	۰/۲۰	۱								
CDE	-۰/۰۹	-۰/۱	-۰/۱۷	۰/۳۰	۰/۰۶	۰/۲۹	۰/۲۰	۰/۱۷	۱							
CBE	-۰/۰۸	-۰/۳۴	-۰/۱۵	۰/۲۴	۰/۱۱	-۰/۳۸	۰/۱۰	-۰/۳۲	۰/۹۳**	۱						
TPS	-۰/۰۵	-۰/۳۰	۰/۲۳	۰/۰۲	-۰/۲۵	۰/۰۴	۰/۲۹	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۰۷	۱					
PSL	۰/۱۶	-۰/۰۷	۰/۲۸	۰/۰۶	-۰/۳۸	۰/۰۹	۰/۲۸	۰/۰۱	-۰/۰۶	-۰/۱۲	-۰/۰۶	۱				
SUL	-۰/۲۷	-۰/۴۷*	۰/۰۲	۰/۳۲	۰/۱۵	۰/۰۱	-۰/۲۰	۰/۰۷	۰/۱۳	۰/۰۹	۰/۱۳	۰/۲۱	۱			
LUA	۰/۱۸	۰/۳۶	-۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۲۵	-۰/۰۸	۰/۰۲	-۰/۰۷	-۰/۰۹	۰/۲۳	-۰/۱۵	۰/۵۱**	۱		
OAL	-۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۹	-۰/۱۶	۰/۲۳	۰/۳۹	۰/۴۹*	۰/۱۹	۰/۰۳	۰/۱۰	-۰/۲۴	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۱۶	۱	
TTN	۰/۳۹	-۰/۱۶	۰/۴۴*	۰/۱۸	-۰/۱۶	۰/۳۲	۰/۱۱	-۰/۰۷	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۲۷	-۰/۴۲	۰/۱۸	-۰/۱۲	-۰/۰۷	۱

* و **: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪. ضرایب بدون علامت غیرمعنی‌دار هستند.

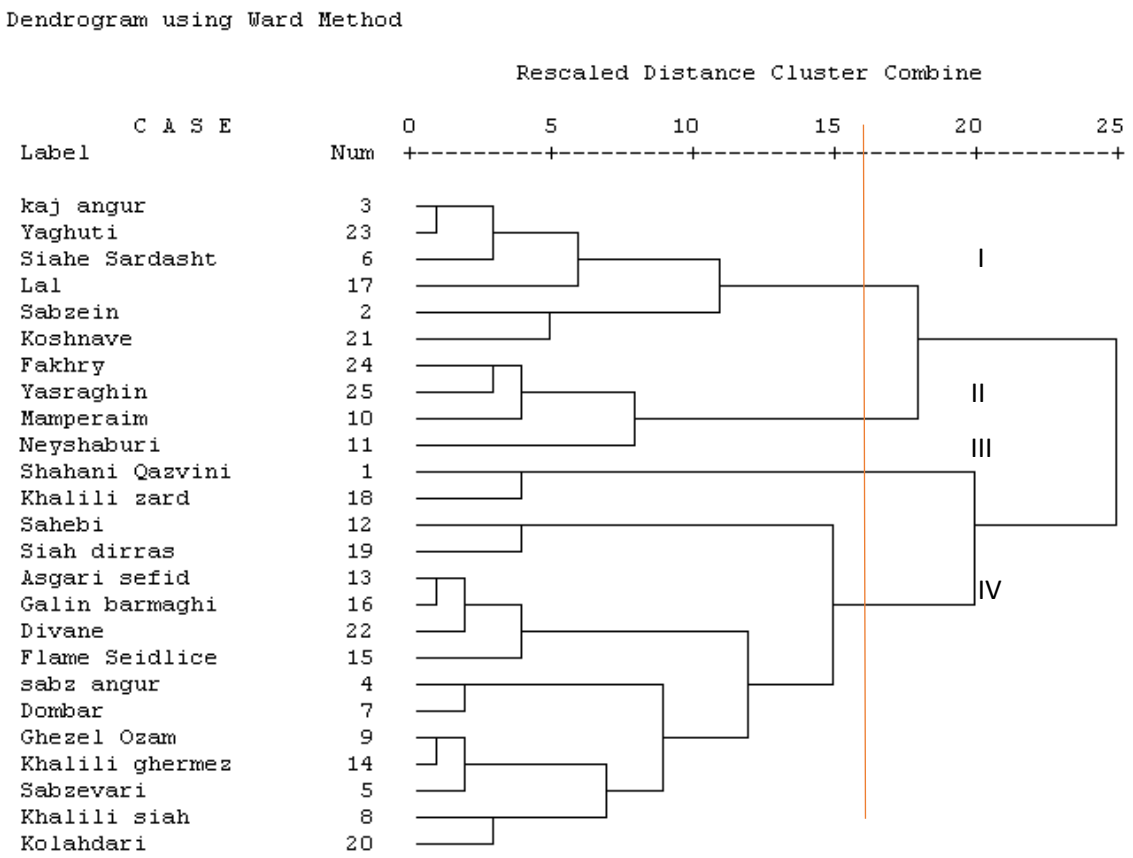
جدول ۶- ضریب همبستگی پیرسون بین صفات موفولوژیکی برگ در ۲۵ رقم محلی انگور

	LA	TL	LT	DL	DWL
LA	۱				
TL	۰/۴۵*	۱			
LT	۰/۵۲**	۰/۵۴**	۱		
DL	۰/۲۳	۰/۴۰*	۰/۶۲**	۱	
DWL	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۱۹	۰/۴۸*	۱

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪. ضرایب بدون علامت غیرمعنی‌دار هستند.

تراکم کرک‌های ایستاده بین رگبرگ، رنگ سطح رویی پهنک از سبز متمایل به زرد تا سبز با لکه‌های آنتوسیانینی، تعداد پیچک‌های متوالی مشابه بودند. از ویژگی‌های منحصر به فرد این گروه بریدگی‌های عمیق لوب برگ‌ها با تعداد لوب بالا می‌باشد. طول دمبرگ در این گروه متوسط بین ۶/۵ تا ۷/۷۵ سانتی‌متر متغیر بود. گروه دوم ارقام فخری، یسرقین، مام‌پرایم و نیشابوری قرار گرفتند. این گروه در صفاتی چون طول پیچک، طول دمبرگ در مقایسه با رگبرگ میانی، طول دندانه، نسبت طول به عرض دندانه، تعداد پیچک‌های متوالی و سینوس دمبرگ محدود شده به رگ شباهت داشتند. برگ‌های ارقام این گروه دارای کمترین طول دمبرگ (۵/۱ تا ۶/۷۵ سانتی‌متر) بودند و سطح برگ آنها نسبت به سایر گروه‌ها کمتر بود و برگ‌های کوچکتری داشتند و حاشیه برگ‌ها دندانه‌های بزرگتری را نشان دادند.

گروه سوم دارای دو رقم محلی شاهانی‌قزوینی و خلیلی‌زرد است که در صفاتی چون سطح برگ، اندازه دمبرگ، طول دمبرگ در مقایسه بارگبرگ میانی، بریدگی ختم شده به رگبرگ اصلی، طول دندانه، نسبت طول به عرض دندانه، سینوس دمبرگ مضرس‌دار، میزان بازشدگی نوک، تعداد پیچک‌های متوالی شباهت نشان دادند. از ویژگی‌های منحصر به فرد این گروه عدم وجود لوب در برگ‌ها و برگ‌های با سطح برگ بزرگ و دمبرگ بلند می‌باشد. گروه چهارم رقم‌های صاحبی، سیاه‌دیررس، عسگری‌سفید، گلین بارماقی، دیوانه، فلیم‌سیدلس، سبز انگور، دمبار، قزل‌اوزم، خلیلی‌قرمز، سبزواری، خلیلی‌سیاه و کلاهداری قرار گرفتند. این گروه بیشترین ژنوتیپ را درخود جای داده و متنوع‌ترین گروه بود. در صفت تراکم کرک‌های ایستاده روی رگبرگ اصلی در سطح زیرین پهنک برگ به هم شباهت داشتند.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۲۵ رقم محلی انگور خراسان شمالی با استفاده از ۲۱ صفت مورفولوژیکی

نسبت طول به عرض دندانه در ارقام این گروه متوسط و بلند بود. شکل برگ اکثر ارقام این گروه سه گوش و برخی هم پنج ضلعی می‌باشد. تعداد لوب برگ‌ها بین دو تا سه و برگ‌ها نسبتاً بزرگ بودند. آرایش بریدگی پهنک در مجاور دمبرگ نسبت به سایر گروه‌ها بسته تر و همپوشانی بیشتری را نشان داد.نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ارقام انگور منطقه خراسان شمالی به لحاظ خصوصیات برگی تنوع بسیار بالایی دارند. نتایج مطالعات دولتی‌بانه و همکاران (۱۳۹۱) تنوع بسیار بالایی در صفاتی نظیر شکل برگ، تعداد لوب برگی، رنگ برگ جوان، شکل سینوس دمبرگی، شکل دندانه، حاشیه پهنک برگ در بین ۵۰ رقم انگور ایران نشان داد. صفات مورفولوژیکی می‌توانند تحت تأثیر شرایط محیطی قرار بگیرند و این باعث بروز خطا در ارزیابی می-شود. با این وجود ویژگی‌های مورفولوژیکی که بیشتر به صورت ژنتیکی کنترل می‌شوند، می‌توانند در تفکیک ارقام انگور مورد استفاده قرار بگیرند (نجاتیان و دولتی‌بانه، ۱۳۹۵). ویژگی های برگی انگور می‌تواند در تشخیص ارقام و بررسی میزان قرابت بین ارقام انگور استفاده شوند.

تجزیه خوشه‌ای این امکان را فراهم می‌کند که افراد بر اساس صفات مختلف، طوری گروه‌بندی شوند که افراد با شباهت بیشتر در گروه‌های نزدیک به هم و افراد با شباهت کمتر با فاصله بیشتر در گروه‌های دور از هم قرار گیرند و بر اساس آن می‌توان برای اهداف مورد نظر، افراد مناسب را برای تلاقی یا سایر کارهای اصلاحی انتخاب کرد. با توجه به نتایج بدست آمده ژنوتیپ‌های کج‌انگور و یاقوتی در گروه اول و ژنوتیپ‌های عسگری سفید وگلین‌بارماقی، قزل‌اوزم و خلیلی‌قرمز قرابت بسیار نزدیکی با هم داشتند. رقم محلی کلاهداری از ارقام مهم منطقه خراسان شمالی در کنار ارقام خلیلی و سبزواری قرار گرفت. رسولی و همکاران (۱۳۹۳) قرابت ژنتیکی از لحاظ صفات مورفولوژی را در ارقام پرلت، عسگری و یاقوتی تأیید کردند.

تنوع ژنتیکی با نشانگرهای ISSR

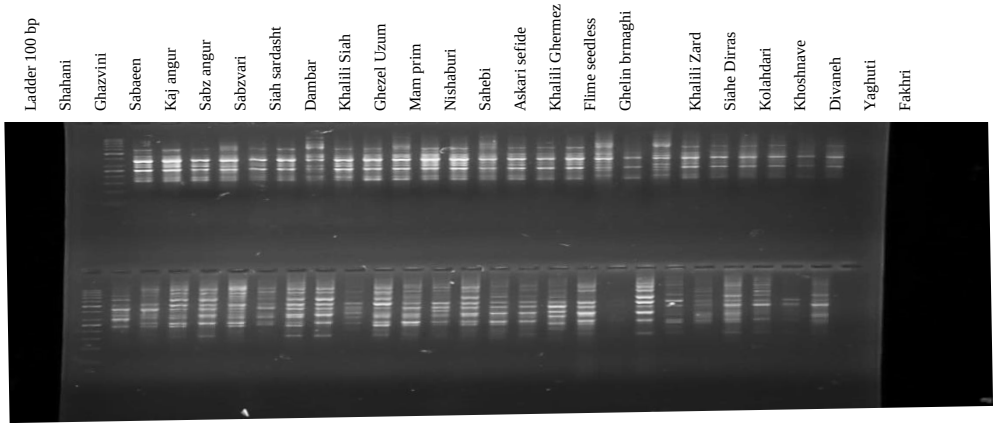
تمام ۱۰ آغازگر ISSR در این پژوهش، تولید باندهای چند

شکل با وضوح قابل قبول داشتند (جدول۷). در شکل۲ نمونه‌ای از ژل حاوی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر S14 نشان داده شده است.

۱۰ نشانگر در مجموع ۱۰۳ باند تولید نمودند. از این تعداد قطعه DNA تکثیر شده، ۹۵ باند در یک یا چند ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند (جدول ۷). اندازه قطعات تکثیر شده از ۱۰۰ جفت‌باز تا ۱۵۰۰ جفت‌باز متغیر بود و میانگین تعداد باندهای تکثیر شده برای هر نشانگر ۱۰/۳ باند بود. نشانگر UBC888 با ۱۳ باند بیشترین تعداد باند و نشانگر UBC850 با ۷ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. میانگین درصد چندشکلی حاصل از تکثیر کل نشانگرها ۹۱/۶۸ درصد و متوسط مکان‌های چندشکل برای هر نشانگر ۹/۵ بود. با توجه به ضریب قدرت تفکیک‌کنندگی محاسبه شده در این مطالعه میانگین قدرت تفکیک ژنی ۴/۹۵ و بیشترین قدرت تفکیک‌کنندگی برای نشانگر UBC826 و کم‌ترین قدرت تفکیک‌کنندگی مربوط به نشانگر UBC824 بود (جدول۶). در ۱۰ رقم مختلف انگور، ۱۸ نشانگر ISSR در مطالعه زینالی و همکاران (۱۳۹۰)، در مجموع ۱۰۸ قطعه تکثیر کردند که ۹۵ قطعه چند شکل بودند، اندازه باندهای تکثیر شده توسط این آغازگرها در محدوده ۳۰۰۰-۱۰۰ جفت‌باز بودند. میانگین شاخص چند شکلی برای هرآغازگر ۸۴/۲۶ درصد بود. کریمی‌شهری و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم مختلف انگور با استفاده از ۷ نشانگر ISSR، ۵۸ باند مشاهده نمودند. از بین باندهای تولید شده ۵۲ باند چندشکلی و ۶ باند همشکلی نشان دادند. بازه باننددهی در محدوده ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌باز بود. میانگین تعداد باند تولید شده برای هر آغازگر ۸/۲ باند محاسبه گردید (کریمی‌شهری و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۷- مشخصات تعداد باندها، میزان چندشکلی و قدرت تفکیک کنندگی پرایمرهای ISSR در بررسی ۲۵ رقم انگور

پرایمر	دامنه	کل باندها	درصدچندشکلی باندها	قدرت تفکیک کنندگی
UBS887	۳۰۰-۱۲۰۰	۱۰	۶۰	۲/۵۶
S14	۳۰۰-۱۵۰۰	۱۲	۱۰۰	۶/۰۸
UBS850	۲۰۰-۱۲۰۰	۷	۱۰۰	۵/۲
UBC886	۱۵۰-۱۰۰۰	۱۰	۱۰۰	۳/۴۴
UBC890	۲۰۰-۱۵۰۰	۱۲	۱۰۰	۷/۲۸
UBC826	۲۵۰-۱۵۰۰	۱۱	۱۰۰	۷/۴۴
UBC840	۲۵۰-۱۵۰۰	۹	۱۰۰	۵/۰۴
UBC853	۱۰۰-۱۵۰۰	۱۱	۸۱/۸۲	۳/۴۴
UBC888	۱۵۰-۱۰۰	۱۳	۱۰۰	۵/۸۴
UBC884	۲۰۰-۱۲۰۰	۸	۷۵	۳/۲۸
کل		۱۰۳	-	-



شکل ۲- باند DNA مربوط به ۲۳ رقم محلی انگور تکثیر یافته با نشانگر S14 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده های نشانگرهای ISSR

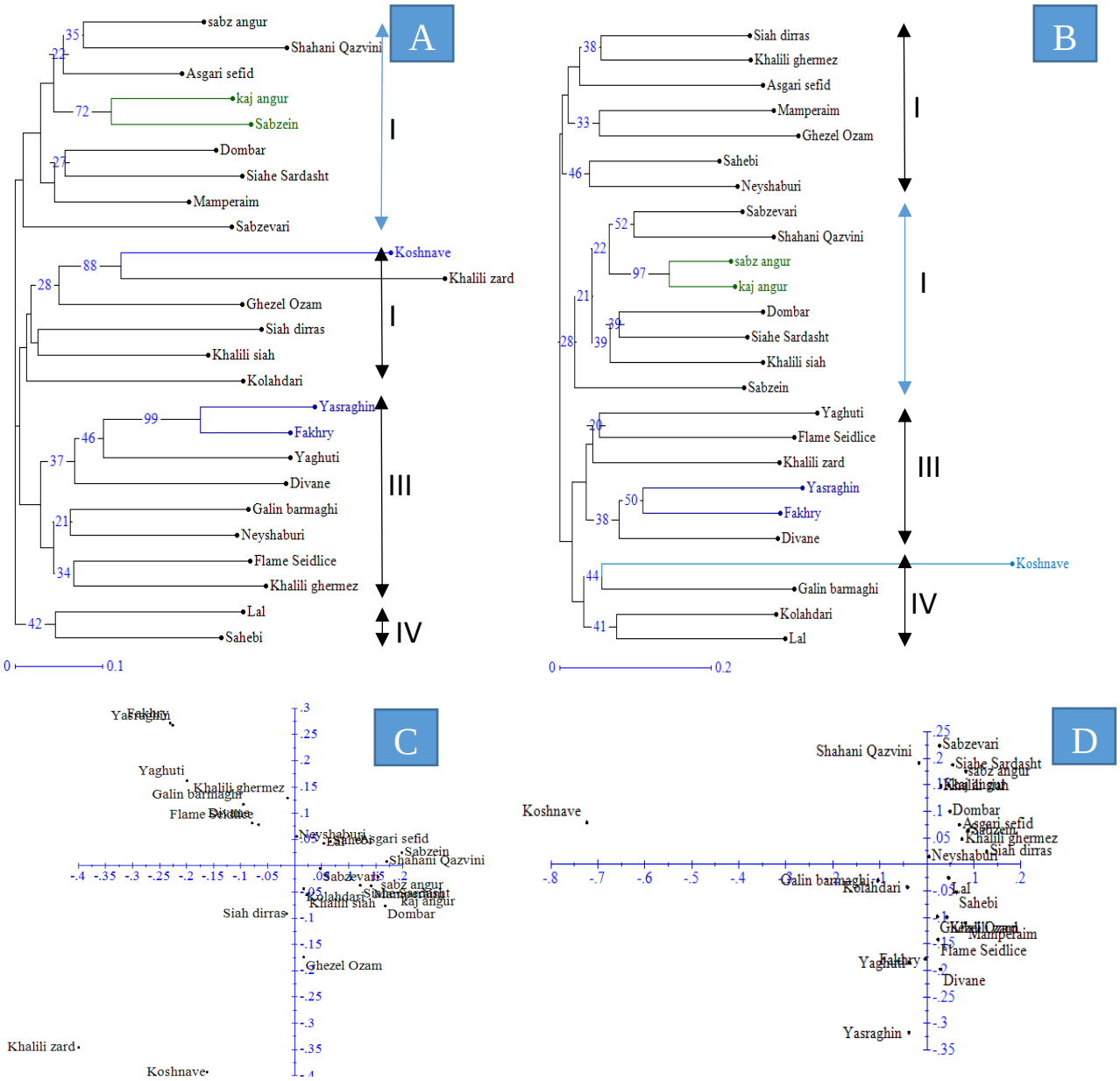
گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های صفر و یک حاصل از امتیازدهی باندهای تولید شده توسط نشانگرهای ISSR، با استفاده از ضریب عدم تشابه جاکارد انجام شد. ضریب عدم تشابه ژنتیکی با میانگین ۰/۵۳ در دامنه‌ای از ۰/۲۳ تا ۰/۷۸ متغیر بود. کمترین میزان عدم تشابه ژنتیکی (بیشترین خویشاوندی) به میزان ۰/۲۳ بین رقم محلی فخری و یسرقین و حداکثر بین رقم محلی خلیلی‌زرد با خلیلی‌قرمز و لعل مشاهده شد. رقم محلی خلیلی‌زرد با اکثر ژنوتیپ ضریب عدم تشابه بالای ۰/۷ نشان داد.

براساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه‌ای خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها به چهار گروه مشخص گروه‌بندی شدند (شکل ۳-A). نتایج دندروگرام نشان داد که واریته‌های خلیلی زرد و خوش ناو در فاصله ژنتیکی زیادی نسبت به سایر واریته‌های قرار گرفتند (شکل ۳-A). رقم خوش‌ناو رقمی با رشد متوسط است که بیشتر به صورت دیم در منطقه غرب کشور کشت و کار می‌شود. این رقم حالت رشد نیمه‌عمودی با عملکرد زیاد دارد. برگ‌های بالغ خیلی کوچک با بریدگی های عمیق دارد و سینوس‌های آن کمی روی هم می‌افتد و دمبرگ کوتاهی دارد (کرمی، ۱۳۸۴). رقم خلیلی دارای جبه‌های بیضوی است و جزوه ارقام دانه‌دار و مناسب تازه خوری می‌باشد (رسولی، ۱۳۹۸). برگ‌های با اندازه متوسط با بریدگی‌های عمیق دارد. در گروه یک ژنوتیپ‌های سبز انگور، شاهانی‌قزوینی، عسگری‌سفید، کج‌انگور، سبزعین، دمبار، سیاه‌سردشت و مام‌پرایم قرار گرفتند. ژنوتیپ شاهانی قزوینی نسبت به سایر ژنوتیپ‌های این گروه در فاصله بیشتری قرار دارد. این رقم رشد خوابیده با عملکرد بالایی دارد (کرمی، ۱۳۸۴). برگ‌های بالغ آن خیلی کوچک به رنگ سبز تیره می‌باشد. در شکل کلی سینوس بالایی برگ‌ها کمی روی هم می‌افتد و دمبرگ خیلی کوتاهی دارد. زیرگروه دوم گروه دو شامل ژنوتیپ‌های خوش‌ناو، خلیلی زرد، قزل‌اوزم، سیاه دیررس، خلیلی‌سیاه با فاصله کم و رقم کلاهداری با فاصله زیادتری در این گروه قرار گرفت. رقم کلاهداری از ارقام مهم منطقه خراسان شمالی محسوب می‌شود که به دلیل ماندگاری بالا، اهمیت اقتصادی بالایی برای منطقه دارد. در این گروه دو ژنوتیپ خوش‌ناو و خلیلی زرد در فاصله زیادتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های گروه قرار گرفتند و می‌توان آنها را به عنوان یک زیر گروه تقسیم نمود. در گروه سوم ژنوتیپ‌های یسرقین، فخری، یاقوتی و دیوانه جای گرفته‌اند که ژنوتیپ یسرقین و فخری به دلیل شباهت زیاد در یک زیر خوشه قرار گرفته‌اند. انگور فخری رشد زیاد با عملکرد بالایی دارد. میوه‌های این انگور بیضوی و دانه‌دار می‌باشد. گروه چهارم نیز شامل دو ژنوتیپ لعل و صاحبی از ارقام معروف ایران می‌باشد. میوه انگور لعل گرد، درشت با رنگ روشن و دانه‌دار است. این رقم بسیار پررشد و با عملکرد بالا می‌باشد.

تجزیه به مختصات اصلی داده‌های مولکولی ISSR

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)، تبدیلی در فضای برداری است که بیشتر برای کاهش ابعاد مجموعه داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سال ۱۹۰۱ توسط پیرسون[1] ارائه شد. این آنالیز شامل تجزیه به مقادیر ویژه ماتریس کوواریانس می‌باشد. این تکنیک براساس داده‌های مولکولی در آنالیز تنوع ژنتیکی نیز کاربرد دارد و می‌توان از آن برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین این آنالیز در مطالعات مولکولی نشان‌دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشد. براساس نتایج بدست آمده، درصد مقادیر ویژه سه مولفه اول یا PCoA1، PCoA2، PCoA3 به ترتیب ۱۵/۶۲، ۱۵/۳۲، ۱۰/۶۴ (مجموعا ۴۱/۵۸ درصد) از واریانس کل بود. چنین استنباط می‌شود، نشانگرهای مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده و در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه، مناسب عمل کرده‌اند. شکل (۳-C) نمودار حاصل از تجزیه به مختصات اصلی داده‌های مولکولی ISSR نشان داده شده است. با توجه به نمودار حاصل ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های سبزعین، شاهانی‌قزوینی، عسگری سفید، لعل، صاحبی و نیشابوری می‌باشد که سه ژنوتیپ آخر با تجزیه کلاستر هم‌خوانی ندارند. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های کلاهداری، خلیلی‌سیاه، سیاه دیررس و قزل‌اوزم می‌باشد که این گروه منطبق بر خوشه دوم از تجزیه کلاستر می‌باشد. در گروه سوم ژنوتیپ‌های یسرقین، فخری، یاقوتی، گلین‌بارماقی، خلیلی‌قرمز، فلیم‌سیدلس و دمبار قرار گرفته که با خوشه سوم از تجزیه کلاستر منطبق

1. Pierson



شکل ۳- آنالیز کلاستر و تجزیه بای پلات ۲۵ رقم محلی انگور.

A- دندوگرام آنالیز کلاستر ۲۵ رقم محلی انگور حاصل از داده‌های ۱۰ پرایمر ISSR؛ B- دندروگرام انالیز کلاستر ۲۵ رقم انگور حاصل از داده‌های ۱۰ پرایمر RAPD ؛ C- توزیع ۲۵ رقم محلی انگور در آنالیز به مولفه‌های اصلی (PCOA) بر اساس داده‌های بدست امده از ۱۰ پرایمر ISSR؛ D- توزیع ۲۵ رقم انگور در آنالیز به مولفه‌های اصلی (PCOA) بر اساس داده‌های بدست امده از ۱۰ پرایمر RAPD

می‌باشد. گروه چهارم شامل دو رقم خوش‌ناو و خلیلی‌زرد می‌باشد که با خوشه دوم از تجزیه کلاستر منطبق می‌باشد و در فاصله دورتری نسبت به سایر ارقام قرار گرفتند. ارقام محلی یسرقین و فخری، کلاهداری و خلیلی‌سیاه، فلیم سیدلس و دمبار با فاصله ژنتیکی کم در کنار هم قرار گرفتند. این نمودار تا حدودی گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست ژنوتیپ‌ها را تفکیک کند.

شایان ذکر است که کم بودن درصد توجیه تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چند متغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مؤلفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرف دیگر توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به‌دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم

است (محمدی و پراسانا[1]، ۲۰۰۳؛ وداگو[2]، ۲۰۱۲).
نشانگر ISSR از جمله نشانگرهای کم هزینه با تکرارپذیری بالا می‌باشد. ثبات این نشانگر در گزارش‌های مربوط به گونه‌های مختلف گیاهی مورد تأیید قرار گرفته است (ایزتولیوا[3] و همکاران، ۲۰۱۴). در گزارشات متعددی نیز نشان داده که نشانگر ISSR نشانگر مفیدی برای شناسایی واریته‌های مختلف گیاهان است (لئو[4] و همکاران، ۲۰۱۱). این نشانگر به دلیل فراوانی و درجه چندشکلی بالا بین افراد برای نقشه‌یابی ژنتیکی و مطالعات جمعیت ایده‌آل است. نتایج این تحقیق نشان داد که برخلاف صفات مورفولوژیک که به دلیل عدم ثبات و تغییرپذیری در اثر عوامل طبیعی نمی‌توانند معیار خوبی برای تشخیص شباهت‌ها و تفاوت‌ها باشند، نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قدرتمندی برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی هستند، چرا که تحت تأثیر محیط قرار نگرفته و در کل ژنوم پراکنده‌اند و می‌توانند تفاوت‌های افراد را در سطح توالی نوکلئوتیدی مشخص نمایند. از جمله مطالعات انجام شده توسط این نشانگر بر روی ارقام مختلف انگور می‌توان به بررسی تنوع بین ۴۳ رقم انگور کشور هند با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR اشاره نمود (دهانوکار و همکاران، ۲۰۰۵). داده‌های آمپلوگرافی و ۲۰ آغازگر مولکولی ISSR به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین ارقام انگور ترکیه، ارقام مورد مطالعه را به دو خوشه، *V. labrusca* و *V. vinifera* تقسیم بندی کردند (سبیر و همکاران، ۲۰۰۹). ارزیابی روابط خویشاوندی بین تعدادی از ارقام انگور کشور مصر با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگر مولکولی ISSR انجام شده است (الهموسانی و همکاران، ۲۰۱۲). در تمامی این پژوهش‌ها مشخص شده که نشانگرهای ISSR یک نشانگر مناسب و قابل اطمینان برای آنالیز ژنتیکی واریته‌های انگور می‌باشد.

تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD

از ۱۰ نشانگر RAPD استفاده شده در این پژوهش در مجموع ۱۱۳ باند در ۲۵ رقم مختلف انگور بدست آمد. تمام نشانگرها چندشکلی را در بین ارقام نشان دادند. میانگین تعداد کل باندها برابر با ۱۱/۳ بود و میانگین درصد چندشکلی باندها در ارقام مختلف برابر با ۱۱/۱ بود و باندهای ایجاد شده در محدوده ۱۵۰۰-۱۰۰ جفت‌باز بودند (جدول۸). با توجه به ضریب Rp محاسبه شده در این مطالعه میانگین قدرت تفکیک ژنی ۶/۵۶۸ بود که بیشترین قدرت تفکیک‌کنندگی مربوط به نشانگر OPA07 (۸/۶۴) و کمترین مقدار قدرت تفکیک‌کنندگی مربوط به نشانگر TIBM17 (۴/۸) بود. کریمی‌شهری و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم انگور توسط نشانگر RAPD، ۵۹ باند در پانزده رقم انگور بدست آوردند. همه آغازگرها چندشکلی را بین ارقام نشان دادند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر آغازگر ۸/۴ باند بود. سلوکی و همکاران (۱۳۸۴) در بررسی انجام شده روی شش ژنوتیپ مختلف انگور استان سیستان با استفاده از ۳۱ نشانگر RAPD، ۴۹۷ باند را امتیازبندی کردند. درصد پلی‌مورفیسم ۸۸/۹۷ درصد بود.

تجزیه خوشه ژنوتیپ‌ها براساس نشانگرهای RAPD

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب عدم تشابه جاکارد انجام شد. ضریب عدم تشابه ژنتیکی با میانگین ۰/۵۵ در دامنه‌ای از ۰/۴تا ۰/۹ متغیر بود. حداکثر و حداقل ضریب عدم تشابه به‌ترتیب برابر با ۰/۸۹ بین رقم محلی سیاه دیررس و خوش ناو و ۰/۱۶ بین رقم محلی کج‌انگور و سبزانگور و میانگین آن ۰/۵۵ بود. سلوکی و همکاران (۱۳۸۴) در مطالعه‌ای بر روی ۶ ژنوتیپ انگور استان سیستان با ۳۱ آغازگر RAPD دریافتند که بیشترین تشابه بین ارقام یاقوتی‌قرمز و یاقوتی‌سفید می‌باشد که معادل ۰/۶۷ بود و کمترین میزان تشابه را ارقام یاقوتی قرمز و لعل دارا بودند که برابر با ۰/۴۱ می‌باشد.
بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه‌ای خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها به چهار گروه مشخص گروه‌بندی شدند (شکل ۳-B). رقم محلی خوش‌ناو با فاصله ژنتیکی زیاد نسبت به سایر ارقام محلی قرار گرفت. گروه اول دارای ژنوتیپ‌های سیاه دیررس، خلیلی‌قرمز، عسگری‌سفید، مام‌پرایم و قزل‌اوزم و ژنوتیپ‌های صاحبی و نیشابوری با فاصله دورتر قرار گرفتند. گروه دوم ژنوتیپ‌های سبزواری، شاهانی‌قزوینی، سبزانگور، کج‌انگور، دمبار سیاه‌سردشت و خلیلی‌سیاه قرار دارد. دو ژنوتیپ کج‌انگور و سبزانگور شباهت نزدیکی به یکدیگر نشان دادند و تک ژنوتیپ سبزعین در فاصله دورتری در این گروه قرار گرفت. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های یاقوتی، فلیم سیدلس، خلیلی‌زرد، یسرقین، فخری، دیوانه می‌باشد و گروه

1. Mohammadi and Prasanna
2. Wodajo
3. Izzatullayeva
4. Luo

جدول ۸- مشخصات تعداد باندها، میزان چندشکلی و قدرت تفکیک‌کنندگی پرایمرهای RAPD در بررسی ۲۵ رقم محلی انگور

پرایمر	دامنه	کل باندها	درصدچندشکلی باندها	قدرت تفکیک‌کنندگی
OPM	۱۲۵-۱۵۰۰	۱۲	۱۰۰	۶/۵۶
OPK	۲۰۰-۱۵۰۰	۱۴	۱۰۰	۷/۲۵
OPN13	۳۰۰-۱۵۰۰	۹	۱۰۰	۴/۳۲
TIMM17	۳۰۰-۱۲۰۰	۹	۸۹	۴/۸
TIBM08	۳۰۰-۱۲۰۰	۹	۱۰۰	۵/۹۲
OPA	۳۰۰-۱۵۰۰	۱۳	۱۰۰	۸/۴۸
BC13	۴۰۰-۱۵۰۰	۱۱	۱۰۰	۵/۲
BD12	۱۰۰-۱۲۰۰	۱۰	۱۰۰	۶/۸
OPN11	۱۰۰-۱۰۰۰	۱۲	۱۰۰	۷/۴۴
OPO07	۲۰۰-۱۵۰۰	۱۳	۹۲	۸/۶۴
جمع		۱۱۳	-	-
میانگین		۱۱/۳	۹۸	۶/۵۶

چهارم شامل ژنوتیپ‌های خوش‌ناو، گلین‌بارماقی، کلاهداری و لعل بود. ژنوتیپ خوش‌ناو در فاصله دورتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفت که نشان‌دهنده خویشاوندی کم آن با سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس داده‌های مولکولی RAPD

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، در مجموع چهار مؤلفهٔ اول ۴۶/۸۷ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. هر چهار مؤلفه به ترتیب ۱۵/۸۱، ۱۲/۷۵، ۹/۷۱، ۸/۶ درصد از کل تغییرات را توجیه نموده‌اند. با توجه به نمودار حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی، ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۳-D). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های سیاه دیررس، خلیلی‌قرمز، عسگری‌سفید، مام پرایم، لعل، نیشابوری و قزل‌اوزم می‌باشد که منطبق بر خوشه‌های اول و دوم تجزیه کلاستر می‌باشد و ژنوتیپ لعل منطبق بر تجزیه کلاستر نمی‌باشد. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های سبزواری، شاهانی قزوینی، سبزانگور، کج‌انگور، دمبار، سیاه-سردشت، خلیلی‌سیاه و سبزعین می‌باشد و منطبق بر خوشه دوم از تجزیه کلاستر است. گروه سوم هم شامل ژنوتیپ‌های گلین‌بارماقی، کلاهداری، فلیم‌سیدلس، فخری، یاقوتی، دیوانه و یسرقین می‌باشد که منطبق بر خوشه چهارم از تجزیه کلاستر است. نتایج حاصل از نمودار تا حدودی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر مطابقت داشت و نتایج حاصل از گروه‌بندی را تأیید نمود.

پژوهش‌های مشابهی برای شناسایی و بررسی میزان تنوع ارقام و ژنوتیپ‌های انگور انجام شده است. جدارکوهی و همکاران (۱۳۹۰) با بررسی ۲۱ رقم انگور بی‌دانه با ۱۱ نشانگر RAPD آنها را به سه گروه اصلی تقسیم نمودند. دامنه ضریب تشابه گزارش شده در بین این ۲۱ رقم انگور بین ۰/۲۱ تا ۰/۷۱ متغیر بود که با مقایسه ضریب عدم تشابه این پژوهش، کمتر می‌باشد که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی بیشتر ارقام مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. البته مطالعه فوق فقط ارقام بی‌دانه را درنظر گرفته که با توجه به این که در این پژوهش هم ارقام دانه‌دار و هم بی‌دانه وجود داشتند به نظر فاصله ژنتیکی بیشتر منطقی می‌آید. سی و شش رقم انگور بومی رومانی با استفاده از ۲۴ نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند و در سه گروه بزرگ دسته بندی شدند (بدیا و همکارن ۲۰۰۹). رحمان[1] و همکاران (۲۰۰۷) با انجام تحقیق روی انبه گزارش دادند که نشانگر RAPD ابزاری مفید جهت بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی است. این نشانگر با آغازگرهای کوتاه و دمای اتصال پایین باعث پوشش سراسری ژنوم می‌شوند ولی با این حال این نشانگر به دلیل تکرارپذیری پایین اغلب نتایج متفاوتی طی آزمایش‌های مکرر می‌دهد. تکرار آزمایش، استفاده از شاهد و بهینه‌سازی شرایط PCR می‌تواند میزان این خطاها را کاهش دهد.

1. Rahman

نتیجه‌گیری

بررسی‌های ویژگی‌های مورفولوژیکی برگ ارقام محلی انگور نشان داده که این صفات دارای تنوع زیادی هستند و می‌توان از ویژگی‌های برگی برای تشخیص ارقام انگور استفاده کرد. صفات تراکم کرک‌ها در قست فوقانی و تحتانی برگ، بریدگی ختم شده با رگبرگ اصلی و عمق بریدگی جانبی برگ‌ها از صفاتی بودند که تنوع بالاتری نشان دادند. تجزیه همبستگی، رابطه بین صفات مورد ارزیابی را نشان داد. در تجزیه خوشه‌ای، ارقام محلی انگور به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند که افراد هر گروه از لحاظ برخی از صفات مورد ارزیابی، شباهت‌هایی را با یکدیگر نشان دادند. در این تحقیق نشانگرهای ISSR و RAPD برای مطالعه تنوع در بین ارقام مختلف انگور خراسان شمالی (شهرستان بجنورد) استفاده شد. اندازهٔ باندها در هر دو نوع نشانگر از ۱۵۰۰-۱۰۰ جفت‌باز متغیر بود. از میان نشانگرهای ISSR، UBC888 و UBC850 بیشترین تعداد باند و میزان تفکیک پذیری بالا و بهتری داشتند و از میان نشانگرهای RAPD، بیشترین تعداد باند و میزان تفکیک‌پذیری مربوط به نشانگرهای OPK و OPO07 بود. در تجزیه کلاستر بر اساس داده های مولکولی رقم محلی خوش‌ناو در فاصله دورتری نسبت به سایر ارقام محلی قرار گرفت. دو رقم کجانگور با سبزانگور فاصله کمی با هم نشان دادند. در تجزیه دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هم که بیشترین درصد تنوع کل در سه مؤلفهٔ اول بود، تا حد نسبتاً زیادی همین نتایج را نشان داد. تطابق نسبی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه دوبعدی می‌تواند برای انتخاب نشانگر در تحقیقات بعدی کمک نماید و از نشانگرهای مولکولی هر کدام نتایج بهتری داشت در مطالعات بعدی استفاده گردد. از نتایج قابل توجه این تحقیق قرار گرفتن رقم کلاهداری به عنوان یک رقم مهم منطقه خراسان شمالی در کنار رقم خلیلی‌سیاه هم در آنالیز کلاستر بر مبنای ویژگی‌های برگی و هم بر مبنای قطعات دی‌ان‌ای تکثیر شده با نشانگر ISSR می‌باشد. البته این نتایج با نشانگر RAPD مورد تأیید قرار نگرفت که می‌تواند در مطالعات بعدی بیشتر مورد توجه قرار گیرد. رقم‌های یسرقین و فخری علیرغم داشتن اسامی متفاوت، هم در تجزیه کلاستر مورفولوژیکی و هم بر اساس آنالیز داده‌های مولکولی با شباهت زیادی در کنار یکدیگر قرار گرفتند که به نظر می‌رسد دو رقم یکی باشند. در تجزیه کلاستر ۲۵ رقم مختلف انگور دو رقم خوش‌ناو و خلیلی‌قرمز در فاصله دورتری نسبت به سایر ارقام قرار گرفتند که می‌توان از آنها برای تولید جمعیتی با تنوع بیشتر در کارهای اصلاحی انگور به عنوان والد استفاده کرد. این گونه تحقیقات برای شناسایی ارقامی که دارای ژنوتیپ‌های یکسان بوده و در مناطق گوناگون کشور با نام‌های مختلف خوانده می‌شوند یا بالعکس ارقام متفاوتی که به صورت یکسان نامگذاری شده‌اند، جهت حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم انگور ایران بسیار کاربردی است. برای بررسی‌های دقیق‌تر می‌توان نمونه‌گیری را از کلیه کلکسیون‌های انگور ایران در مناطق مختلف انجام داده و با استفاده از روش‌های مولکولی دقیق ارقام بومی ایران را به طور صحیح نامگذاری و دسته‌بندی کرد. از اطلاعات به دست آمده از این پژوهش می‌توان در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و در نهایت انتخاب پایه و پیوندک‌های مناسب درجهت اصلاح باغات در سطح کشور بهره برد.

سپاسگزاری

این تحقیق روی ارقام کلکسیون انگور مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان شمالی و امکانات موجود در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شده است که بدین وسیله از این همکاری سپاسگزاری می‌شود.

منابع

جداری‌کوهی، ب.، گروسی، ق. و حسینی، ر. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بی‌دانه انگور توسط نشانگر ملکولی RAPD، مجله سلول و بافت، ۲: ۹۹-۱۰۶.

دولتی‌بانه، ح.، ناظمیه، ع.، محمدی، س.، حسنی، ق. و هناره، م. ۱۳۹۱. شناسایی و ارزیابی ارقام انگور محلی استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های آمپلوگرافی و آمپلومتری. دوفصلنامه فنآوری تولیدات گیاهی، ۲(۱): ۱۳-۲۴.

رازی، م.، درویش‌زاده، ر.، دولتی‌بانه، ح. و مارتینز-گومز، پ. .۱۳۹۸. ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های بومی مختلف انگور (*Vitis vinifera*) با استفاده از نشانگرهای ISSR. علوم باغبانی ایران، ۵۰: ۱۹۷-۲۰۷.

رسولی، م.، محمدپرست، ف. و عینی، م. ۱۳۹۳. ارزیابی تنوع برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های انگور (*Vitis Vinifera* L.) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی. به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی، ۲(۲): ۲۴۱-۲۶۰.

رسولی، و. ا. ۱۳۹۸. بررسی برخی ویژگی‌های ارقام انگور در باغات سنتی باغات قزوین. مجله تریجی انگور، ۱: ۹-۱۴.

زینالی، ر.، رحمانی، ف. و دولتی‌بانه، ح. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی بین رقم‌های انگور براساس نشانگر مولکولی ISSR ، هفتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

سلوکی، م.، ریگی‌نژاد، ن.، کمال‌الدینی، ح. و سیاه‌سر، ب. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انگور سیستان با استفاده از مارکر مولکولی RAPD، چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، کرمان.

کرمی، م.ج. ۱۳۸۴. معرفی و تشریح خصوصیات مهم ارقام انگور دیم در استان کردستان. نهال و بذر، ۲۱(۴): ۵۷۷-۵۹۶.

کریمی‌شهری، م. ر.، دهواری، و.، حاجیان‌شهری، م. و مختاریان، ع. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی بر اساس نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD . مجله به‌نژادی نهال و بذر، (۱): ۱۵۹-۱۷۲.

نجاتیان، م. ع. و دولتی‌بانه، ح. ۱۳۹۵. شناسایی، تمایز و ثبت رقم‌های انگور بومی و تجاری ایران. علوم باغبانی ایران، ۴۷(۳): ۵۸۱-۵۹۴.

Abiri, K., Rezaei, M., Tahanian, H., Heidari, P. and Khadivi, A. 2020. Morphological and pomological variability of a grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm collection. Scintia Horticulture, 266: 109-285.

Bodea, M., Pamfil, D., Pop, R. and Pop, I.F. 2009. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity among Romanian local vine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. Bulletin of university of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture, 66(1): 17-22.

Choudhary, R.S., Zagade, V.S., Khalakar, G.D. and Singh, N.K. 2014. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera* L.). The Bioscan, 9: 823-828.

Dhanorkar, V.M., Tamhankar, S.A. and Patil, S.G. and Rao, V.S. 2005. ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. Vitis -Geilweilerhof , 44(3): 127-131.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19, 11-15.

Ekhvaia, J. and Akhalkatsi, M.2010. Morphological variation and relationships of Georgian populations of *Vitis vinifera* L. subsp. sylvestris (CC Gmel.) Hegi. Flora-Morphology Distribution Functional Ecology of Plant, 205(9): 608-617.

El-Homosany, A., Neveen, H. and Amina, G .2012. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes. 21 Internationale Rebveredlertagung, Geisenheim, Germany: pp. 421-432.

Herrera, R., Cares, V., Wilkinson, M.J. and Caligari, P.D.S. 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.

Izzatullayeva, V., Akparov, Z., Babayeva, S., Ojaghi, J. and Abbasov, M. 2014. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet. Turkish Journal of Biology, 38(4): 429-438.

Khadivi-Khub, A., Salimpour, A. and Rasouli, M. 2014. Analysis of grape germplasm from Iran based on fruit characteristics. Brazilian Journal of Botany, 37(2): 105-113.

Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J., Gao, M.P., Brown, J.S., Tondo, C.T. and Schnell, R.J. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology, 39(4-6): 676-684.

Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.

Nwosisi, S., Dhakal, K., Nandwani, D., Raji, J.I., Krishnan, S. and Beovides-García, Y. 2019. Genetic Diversity in Vegetable and Fruit Crops. In: Genetic Diversity in Horticultural Plants. Springer, pp. 87-125.

Perrier, X. and Jaqeuemond-Collet, J.P. 2005. DARwin-5.0. Dissimilarity analysis and representation for windows, Equipe Mathematique et Informatique, France.

Pozharskiy, A.S., Aubakirova, K.P., Gritsenko, D.A., Tlevlesov, N.I., Karimov, N.Z., Galiakparov, N.N. and Ryabushkina, N.A. 2020. Genotyping and morphometric analysis of Kazakhstani grapevine cultivars versus Asian and European cultivars. Genetics and Molecular Research, 19(1): gmr18482-gmr18482.

Prevost, A. and Wilkinson, M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 98(1): 107-112.

Rahman, M.L., Rabbani, M.G., Siddique, M.N.A., Rahman, M.A., Garvey, E.J. and Rahaman, E. 2007. Molecular characterization of 28 mango germplasm using RAPD. Plant Tissue Culture Biotechnology, 17(1): 71-77.

Sabir, A., Tangolar, S., Buyukalaca, S. and Kafkas, S. 2009. Ampelographic and molecular diversity among grapevine (*Vitis* spp.) cultivars. Czech Jurnal. Genetic and Plant Breeding, 45(4): 160-168.

Seyedimoradi, H., Talebi, R., Hassani, D. and Karami, F. 2012. Comparative genetic diversity analysis in Iranian local grapevine cultivars using ISSR and DAMD molecular markers. Environmental and Experimental Biology, 10: 125-132.

UPOV. 2018. Grapevine upov code(s): vitis guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Geneva TWF/49.

Wodajo, B. 2012. Investigation of Genetic Diversity in Ethiopian Collections of Safflower (*Carthamus tinctorius*) using ISSR Markers. M.Sc. thesis. Addis Ababa University, Ethiopia