



دانشگاه گورگان و منابع طبیعی گورگان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و نهم، شماره دوم، ۱۳۹۸

۱۴۳-۱۵۵

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2019.14866.2328

تجزیه ارتباط و ساختار بخشی از ژرمپلاسم انگور (*Vitis vinifera* L.) با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهورهای (ISSR)

*میترا رازی^۱، محمداسماعیل امیری^۲، رضا درویش‌زاده^۳، حامد دولتی‌بانه^۴ و پدرو مارتینز گومز^۵

^۱دانشجوی دکتری گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران، ^۲استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران،

^۳استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران، ^۴دانشیار پژوهشی، بخش تحقیقات باغبانی، مرکز

تحقیقات آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران،

^۵استاد مؤسسه تحقیقات CEBAS، اسپانیا

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: چگونگی اعمال انتخاب برای چندین صفت به‌منظور حصول حداکثر ارزش اقتصادی همواره موردنظر به‌نژادگران بوده است. از این‌رو اطلاع دقیق از رفتار ژنتیکی و شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات مهم اقتصادی به اصلاح ارقام کمک خواهد نمود. در این مطالعه ارتباط و پیوستگی بین نشانگرهای ISSR با برخی صفات مهم پومولوژیک مانند عملکرد و صفات کیفی ارقام انگور آذربایجان غربی از طریق مدل ارتباط‌یابی MLM مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از ۴۵ رقم انگور زراعی موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی استفاده گردید. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش دوپیل و دوپیل (۱۹۸۷) انجام شد و از ۱۷ نشانگر ISSR در واکنش PCR استفاده گردید. الگوی بانندی حاصل، بر اساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها، به‌صورت یک و صفر امتیازدهی شدند و ماتریس حاصل برای بررسی تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید. تجزیه مؤثر ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure و شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مورد ارزیابی، بر اساس مدل MLM با استفاده از نرم‌افزار TASSEL انجام گرفت.

یافته‌ها: بر اساس ۱۷ نشانگر ISSR مورد استفاده در این مطالعه، ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیر جمعیت فرعی ($K=2$) تقسیم گردید. بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات ۲۰ رقم (۴۴/۴۴ درصد) به ساختار اول، ۱۷ رقم (۳۷/۷۸ درصد) به ساختار دوم و بقیه ارقام (۱۷/۷۸ درصد) به گروه با ساختار مخلوط تعلق داشتند. در این بررسی از ۲۷۷۵ جفت مقایسه نشانگر ISSR، ۰/۷۲ درصد، LD معنی‌داری نشان دادند ($P \leq 0/01$). نتایج همچنین نشان داد که ۱۲ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0/01$) با صفات مورد ارزیابی نشان دادند که از این تعداد یک مکان (UBC825-4) برای TSS، یک مکان (UBC890-2)

* مسئول مکاتبه: razi.mitra@znu.ac.ir

برای pH، ۲ مکان (UBC817-2 و UBC825-5) برای وزن تک‌بذر، ۲ مکان (UBC836-7 و UBC855-2) برای تعداد بذر، ۳ مکان (UBC812-3، UBC817-4 و UBC864-2) برای عرض خوشه، ۲ مکان (UBC817-4 و UBC864-2) برای وزن خوشه و یک مکان (UBC826-4) برای درصد تشکیل میوه در حالت گرده‌افشانی کنترل‌شده شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر کارایی استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی و مدل MLM در ارقام انگور مورد مطالعه را نشان می‌دهد. برخی از مکان‌ها بین صفات مختلف مشترک بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند. مناطق ژنومی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات موردنظر در این مطالعه می‌توانند برای انتخاب به کمک نشانگر به‌منظور توسعه برنامه‌های مختلف اصلاح انگور استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، ساختار جمعیت، عدم تعادل پیوستگی، نشانگر *Vitis vinifera*، ISSR

مقدمه

انگور یکی از مهم‌ترین محصولات باغی است که به‌دلیل ارزش اقتصادی، دارویی و غذایی آن به‌طور گسترده کشت می‌شود. اصلاح ارقام انگور برای صفات ویژه مانند مقاومت به سرما، خشکی و همچنین عملکرد بالا همواره مورد توجه به‌نژادگران بوده است. اندازه ژنوم انگور با ۳۸ کروموزوم در حدود 4.75×10^8 جفت باز است. این ژنوم ترکیبی از توالی‌های تکراری و غیرتکراری می‌باشد که DNA تکراری بیش از ۹۵ درصد کل ژنوم را تشکیل می‌دهد (۲۱). با توسعه فن‌آوری نشانگرهای مولکولی، کالبد شکافی دقیق اساس ژنتیکی صفات کمی امکان‌پذیر شده است (۴۲ و ۴۶). ISSR یک روش بر پایه ریزماهوره‌ها است که به اطلاعات اولیه در زمینه ژنوم و طراحی آغازگرها نیاز ندارد و به‌دلیل سرعت و سادگی کار به‌عنوان ابزاری با ارزش در تجزیه ژنوم گیاهان مطرح است (۲). این نشانگر به‌طور گسترده در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی استفاده می‌شود (۳۸).

شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی^۱ معمولاً به دو روش اصلی نقشه‌یابی پیوستگی^۲ و تجزیه ارتباطی^۳ یا نقشه‌یابی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی انجام می‌گیرد. با وجود موفقیت نقشه‌یابی پیوستگی در شناسایی QTL^۴ برای صفات متعدد در بسیاری از گونه‌ها (۱۱، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲ و ۳۴)، اخیراً کاربرد این روش به‌علت محدودیت‌های متعدد کم‌تر شده است. به‌خصوص در گیاهان چندساله و درختان میوه به‌واسطه نیاز به زمان طولانی برای تولید جمعیت‌های مصنوعی و حساسیت برخی از گونه‌ها به خویش‌آمیزی، استفاده از این روش عملی به‌نظر نمی‌رسد. در حال حاضر تجزیه ارتباطی به‌عنوان یک روش جایگزین و یا مکمل جهت شناسایی ارتباطات بین نشانگر و صفت زیاد استفاده می‌شود (۷ و ۴۹).

در نقشه‌یابی ارتباطی مکان‌یابی QTLها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد و گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم از اهمیت اساسی برخوردار است (۱). ساختار جمعیت، اندازه نمونه و

- 1- QTL mapping
- 2- Linkage mapping
- 3- Association analysis
- 4- Quantitative Trait Locus

شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم زراعی به اصلاح‌گران در طراحی برنامه‌های اصلاح مبتنی بر گزینش به کمک نشانگر کمک می‌نماید. هر چند کارهای زیادی در خارج از کشور در این زمینه صورت گرفته است و عملاً بیشتر گزینش‌های مربوط به اصلاح انگور، بر پایه نشانگرهای مولکولی شناسایی شده صورت می‌گیرد ولی در ایران در این زمینه کار خاصی انجام نگرفته است. همان‌طور که ذکر گردید در بررسی‌های مربوط به تجزیه ارتباط، ساختار جمعیت بر ارتباط نشانگر- صفت تأثیرگذار است و حتماً باید در تجزیه ارتباط لحاظ شود. هدف از این پژوهش، بررسی ساختار جمعیت و نقشه‌یابی ارتباطی برای خصوصیات مهم کیفی مرتبط با ارقام انگور و شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با این صفات است که در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی انگور به اصلاح‌گران کمک خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و صفات مورد ارزیابی: در این پژوهش از ۴۵ رقم انگور (جدول ۱) موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی استفاده گردید. از هر کدام از این ارقام ۱۲ بوته ۱۴ ساله انتخاب شدند و صفات مواد جامد محلول میوه، pH، وزن تک‌بذر، تعداد بذر، عرض خوشه، طول خوشه، وزن خوشه، درصد تشکیل میوه در حالت گرده‌افشانی آزاد و کنترل شده و درصد جوانه‌زنی دانه گرده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

فراوانی آلی نیز ممکن است توانایی این روش در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات را تحت تأثیر قرار دهد و موجب ارتباطات دروغین نشانگر- صفت شود^۱ (۵۳). به‌منظور به حداقل رساندن نتایج دروغین در مطالعات مرتبط با تجزیه ارتباط لازم است ابتدا ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد استفاده، مطالعه شده و در تجزیه ارتباط لحاظ شود (۴۹). یو و همکاران (۲۰۰۵) کارایی روش‌های مختلف نقشه‌یابی ارتباطی را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که مدل خطی مخلوط^۲ (MLM) به همراه ماتریس‌های K و Q برای تصحیح ساختار و روابط خویشاوندی موجود در جمعیت، وضوح نقشه‌یابی را نسبت به دیگر روش‌ها تا حد زیادی افزایش می‌دهد (۴۸).

چندین مطالعه تجزیه ارتباط در انگور در مورد شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات پوست حبه (۲۰ و ۲۷)، ترکیب پروآنتوسیانیدین حبه (۲۵) و بی‌گوشی حبه^۳ (۲۴) که با QTL طعم در انگور موسکات هم‌مکان است (۱۵) گزارش شده است. مطالعاتی در زمینه تجزیه ارتباط انگور روی چندین ژن کاندید مهم مانند ژن‌های *Myb* (۱۹ و ۴۵)، *VvDXS* (۱۵)، *VvPel* (۵۱)، *VvGAI* (۵۰)، *VvTFL1A* (۱۸ و ۵۲) و ۱۸۳ ژن کاندید مرتبط با ساختار خوشه (۴۴) انجام گرفته است. چیت وود و همکاران (۲۰۱۴) برای اولین بار نقشه‌یابی ارتباطی بر اساس پویش کل ژنوم^۴ (GWAM) را برای ژنتیک شکل برگ در انگور با استفاده از ۶۱۱۴ نشانگر SNP گزارش کردند (۱۰).

- 1- False marker- trait associations
- 2- Mixed Linear Model
- 3- Fleshless berry
- 4- Genome wide association mapping

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

Table 1. Characteristic of grape genotypes utilized in investigating genetic diversity using ISSR.					
ژنوتیپ	استفاده به صورت	بذر دار	ژنوتیپ	استفاده به صورت	بذر دار
Genotype	Use	Seed	Genotype	Use	Seed
رزقی	رومیزی	بله	کلاتی	رومیزی	بله
Rezghi	Table	Yes	Kalati	Table	Yes
حسینی	رومیزی	بله	مام برایمه	رومیزی، کشمش	بله
Hosseini	Table	Yes	Mam Braima	Table, Raisin	Yes
تبرزه سفید	رومیزی	بله	بول مازو	آب میوه	بله
Tabarze Sefid	Table	Yes	Bol Mazu	Juice	Yes
سقل سولیان	رومیزی	بله	لعل قرمز	رومیزی	بله
Saghal Solian	Table	Yes	Lal Qermez	Table	Yes
ات اوزوم	میوه	بله	سفید شخ شخ	آب میوه	خیر
At Ouzum	Juice	Yes	Sefid Shakh Shakh	Juice	No
لعل سیاه	رومیزی	بله	الحقی	رومیزی	بله
Lal Seyah	Table	Yes	Alhaghi	Table	Yes
سیاه سردشت	رومیزی، کشمش	بله	عسکری	رومیزی	خیر
Seyah Sardasht	Table, Raisin	Yes	Askari	Table	No
گرمیان	رومیزی	بله	بیدانه سفید	رومیزی، کشمش	خیر
Garmian	Table	Yes	Bidane Sefid	Table, Raisin	No
مایه مو	آب میوه	بله	رجین	آب میوه	خیر
Maiemo	Juice	Yes	Rejin	Juice	No
ریش بابا قرمز	رومیزی	بله	سرقوله	رومیزی	بله
Rishbaba Qermez	Table	Yes	Sarghola	Table	Yes
طائفی	رومیزی	بله	چاوه گا	آب میوه	بله
Taifi	Table	Yes	Chava Ga	Juice	Yes
بیدانه قرمز	رومیزی	خیر	یاقوتی	رومیزی	بله
Bidane Qermez	Table	No	Yaghoti	Table	Yes
فخری	رومیزی، کشمش	بله	قره گندمه	آب میوه	بله
Fakhri	Table, Raisin	Yes	Qara Gandoma	Juice	Yes
شاهرودی	رومیزی	بله	گزن دایی	رومیزی	بله
Shahroudi	Table	Yes	Gazandaii	Table	Yes
قره شانی	آب میوه	بله	قزل اوزوم	رومیزی	بله
Qara Shani	Juice	Yes	Qzl Ouzum	Table	Yes
صاحبی قرمز	رومیزی	بله	آق شانی	آب میوه	بله
Sahebi Qermez	Table	Yes	Agh Shani	Table	Yes
اینه امجه ای	رومیزی	بله	جیغ جیغا	آب میوه	بله
Inah Amjai	Table	Yes	Jig Jiga	Table	Yes
تبرزه قرمز	رومیزی	بله	لعل سفید	رومیزی	بله
Tabarze Qermez	Table	Yes	Lal Sefid	Table	Yes
دسترچین	آب میوه	بله	کلکه ریوی	آب میوه	بله
Dastarchin	Juice	Yes	Klkarevi	Juice	Yes
ریش بابا سفید	رومیزی	بله	ساجاخ	آب میوه	بله
Rishbaba Sefid	Table	Yes	Sachakh	Juice	Yes
آق ملخی	آب میوه	بله	شیرازی	رومیزی	بله
Agh Melhi	Juice	Yes	Shirazi	Table	Yes
گوی ملکی	رومیزی	بله	انگوتکه	آب میوه	بله
Goi Melki	Table	Yes	Angotka	Juice	Yes
سایانی	رومیزی	بله			
Sayani	Table	Yes			

(شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومول از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler 5331, Eppendorf) انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت: 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 به مدت ۱۰ دقیقه بود. به منظور تفکیک محصولات PCR مربوط به نشانگرهای ISSR از ژل آگارز ۱/۷ درصد استفاده شد. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه (1 kb DNA ladder) استفاده شد.

ارزیابی مولکولی: استخراج DNA ژنومی به روش CTAB بر اساس روش دوپیل و دوپیل (۱۹۸۷) انجام شد (۱۴). پس از استخراج DNA کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۵ درصد در بافر TBE ۰/۵x و کمیت آن‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. محلول‌های پایه DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ثبت ژنوتیپ^۱ از ۱۷ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP، ۱/۱ واحد آنزیم تگ پلی‌مراز

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی انگور با نشانگرهای ISSR.

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

آغازگر Primer	فرمول توالی Sequence formula	توالی (5'→3' Primer sequence)	دمای اتصال 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

هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه گردید (۴۳). مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیش‌تر از آن باشد و در صورتی که درصد عضویت کم‌تر از ۰/۶۹ باشد به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود.

شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی با نرم‌افزار TASSEL و بر اساس مدل MLM^3 (جدول ۳) وابسته به به مدل Q+K (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر- صفت انجام گرفت. میزان عدم تعادل لینکاژی (LD) نیز با استفاده از نرم‌افزار TASSEL محاسبه گردید.

نتایج و بحث

ارزیابی ساختار ژنتیکی: تجزیه مؤثر ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب انجام گردید. نمودار دوطرفه تعیین بهینه K با نشانگر ISSR نشان داد که بهترین K با توجه به آغازگر ISSR دو می‌باشد یعنی دو زیرجمعیت احتمالی ($K=2$) در ارقام مورد مطالعه شناسایی شد و $K=2$ به‌عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد.

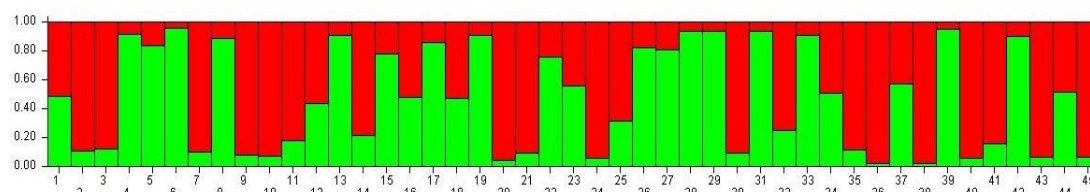
بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۱)، از کل ۴۵ رقم انگور مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ISSR، ۲۰ رقم (۴۴/۴۴ درصد) به ساختار اول (قرمز)، ۱۷ رقم (۳۷/۷۸ درصد) به ساختار دوم (سبز) و ۸ رقم (۱۷/۷۸ درصد) ساختار مختلط داشتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: الگوی باندی حاصل، براساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها، به‌صورت یک و صفر امتیازدهی شدند و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. به‌منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ارقام مورد مطالعه به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ارقام مختلط، ارزیابی ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure (۳۵) انجام گرفت. در این روش، هر یک از ژنوتیپ‌ها با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌گردند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد (۳۹). در این مطالعه، بین ۱ تا ۱۰ زیر جمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار $MCMC^2$ استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها (K)، با استفاده از دو روش برآورد شد. یکی بر اساس معیار انتخابی در Structure یعنی $LnP(D)$ که احتمال پسین داده‌ها را با در نظر گرفتن K فرضی محاسبه می‌کند و دیگری بر اساس روش ایوانو و همکاران (۲۰۰۵) (۱۶). این روش بر آماره ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی $LnP(D)$ را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. پس از تعیین تعداد K، ماتریس Q بر اساس آن تشکیل گردید و برای انجام تجزیه ارتباط وارد نرم‌افزار TASSEL (۵) گردید. انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها نیز مطابق روش اسپاتارو و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد و برای

1- Mixed cultivars

2- Markov Chain Monte Carlo

3- Mixed Linear Model



شکل ۱- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian ۴۵ ژنوتیپ انگور مورد مطالعه بر اساس نشانگر ISSR (K=2). هر رنگ یک زیرجمعیت را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Cluster analysis based on Bayesian model in 45 genotypes of grape with ISSR (K=2). Each color represents a different subpopulation.

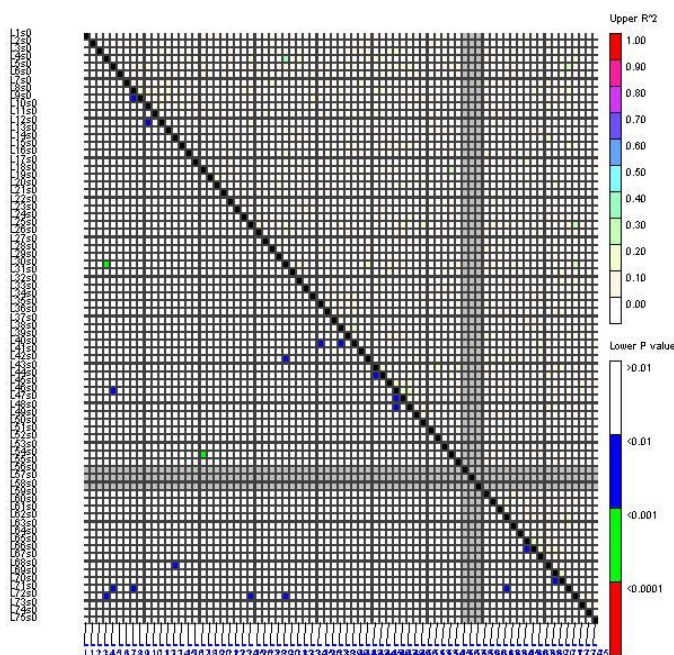
پیوستگی هستند. از عوامل افزایش دهنده مقدار LD می‌توان به سیستم اتوگامی، اپیستازی، نوآرایی‌های ژنومی، رانده شدن ژنتیکی، ایزولاسیون ژنتیکی، ساختار جمعیت، اندازه کوچک جمعیت، انتخاب و درجه خویشاوندی اشاره کرد، در حالی که عواملی مانند آلوگامی، تبدیل ژنی، مقادیر بالای نوترکیبی و موتاسیون از عوامل کاهش دهنده مقدار LD می‌باشند (۱، ۲۲ و ۳۳).

توصیف LD اولین بار در انگور وحشی فرانسوی توسط بارناود و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است (۴). *Vitis vinifera subsp. silvestris* جزو انگورهای دوپایه است و به دلیل میزان بالای نوترکیبی دارای LD پایینی است، هر چند که به دلیل کاهش اندازه جمعیت در نتیجه کاهش اندازه رستگاه و بیماری‌ها به احتمال زیاد LD افزایش پیدا کرده است (۴). در مقایسه با انگورهای بومی زیر گونه *Sativa* که میزان LD در آن‌ها بیش‌تر از ۱۶/۸ سانتی‌مورگان گزارش شده است (۳) در انگورهای وحشی زیرگونه *Silvestris* میزان LD حدود ۱/۴ سانتی‌مورگان گزارش شده است (۴). میزان LD در انگورهای بومی ۱۲ برابر بیش‌تر از انگورهای وحشی گزارش شده است.

تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Structure امکان شکستن کل جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با ساختارهای متفاوت محتمل را فراهم می‌سازد. ساختار یک جمعیت، حاصل انتخاب و در سطوح بالاتر اختلاط در آن جمعیت می‌باشد و منجر به افزایش عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای غیرپیوسته می‌شود (۹ و ۴۱). آگاهی از ساختار جمعیت به‌عنوان یک پیش‌نیاز در نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند به‌منظور اجتناب از شناسایی ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد استفاده گردد (۳۶).

عدم تعادل پیوستگی^۱ (LD): عدم تعادل پیوستگی (LD) به‌عنوان ارتباط غیرتصادفی مکان‌های متفاوت روی یک کروموزوم است و اخیراً از آن در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی و مکان‌یابی صفات کمی و ژن‌های عمده استفاده می‌شود (۳۷). عدم تعادل پیوستگی به‌وسیله دو آماره D' و r^2 اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه ارزش r^2 بین صفر الی ۰/۳۸ و میانگین این مقدار ۰/۰۳ بود. در این بررسی از ۷۵ جفت نشانگر ISSR، ۰/۷۲ درصد r^2 ها معنی‌دار و بزرگ‌تر از ۰/۱ بودند ($P\text{-value} \leq 0.01$, $r^2 \geq 0.1$) (شکل ۲). به‌عبارتی دیگر ۰/۷۲ درصد از جفت مکان‌ها در عدم تعادل

1- Linkage disequilibrium



شکل ۲- پلات عدم تعادل لینکاژی (LD plot) بر اساس نشانگر ISSR. قسمت بالای قطری نشان‌دهنده میزان عدم تعادل لینکاژی با استفاده از آماره r^2 و قسمت پایین قطری P -value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Fig. 2. LD plot generated by ISSR marker pairs. The upper diagonal shows r^2 among each pair of markers. The lower diagonal shows the levels of significance between each pair of markers.

بر اساس نتایج به‌دست آمده برخی از مکان‌ها بین صفات مختلف مشترک بودند از جمله می‌توان به نشانگر UBC817-4 و UBC864-2 اشاره کرد که با صفات وزن خوشه و عرض خوشه مرتبط بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک برای صفات بررسی‌شده می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (۲۶). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (۴۷ و ۲۳). مطالعات کمی در مورد تجزیه ارتباط و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ریخت‌شناسی در ارقام انگور گزارش شده است. در مطالعه تجزیه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای SSR، پیوستگی نزدیکی بین دو نشانگر SSR (VVIB23 و VVMD34) و لوکوس مربوط به جنسیت گل در انگور شناسایی شده است (۵، ۲۸ و ۴۰). نتایج حاصل از بررسی QTL‌های مؤثر در باروری انگور نشان داد

مکان‌یابی ارتباطی: در این مطالعه، بر اساس مدل MLM در سطح احتمال یک درصد، در مجموع ۱۲ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه شناسایی شدند (جدول ۳). از این تعداد ۱ مکان (UBC825-4) با ژن‌های کنترل‌کننده مواد جامد محلول میوه^۱ (TSS)، ۱ مکان (UBC890-2) با ژن‌های کنترل‌کننده pH، ۲ مکان (UBC817-2 و UBC825-5) با ژن‌های کنترل‌کننده وزن تک‌بذر، ۲ مکان (UBC836-7 و UBC855-2) با ژن‌های کنترل‌کننده تعداد بذر، ۳ مکان (UBC812-3، UBC817-4 و UBC864-2) با ژن‌های کنترل‌کننده عرض خوشه، ۲ مکان (UBC817-4 و UBC864-2) با ژن‌های کنترل‌کننده وزن خوشه و ۱ مکان (UBC826-4) با ژن‌های کنترل‌کننده درصد تشکیل میوه در حالت گرده‌افشانی کنترل‌شده ارتباط بسیار معنی‌داری نشان دادند.

1- Total Soluble Solids

که یک QTL بزرگ اثر در گروه لینکازی ۵ پایداری بالایی در نسل‌های بعدی دارد. به‌علاوه سه QTL دیگر در گروه لینکازی ۵ و دو QTL در گروه لینکازی ۱۴ شناسایی شدند که در نسل‌های بعدی فقط در برخی نتایج فعال بودند (۱۳). QTL‌هایی برای وزن حبه، تعداد بذر و وزن بذر در انگور گزارش شده است که یکی از این QTL‌ها یک QTL بزرگ اثر برای بی‌دانگی می‌باشد و گزارش شده است که نشانگر ریزماهواره VMC7F2 با این QTL پیوستگی نزدیکی دارد (۸). تجزیه QTL در ارقام بی‌دانه انگور نشان داد که دو منطقه ژنومی وزن حبه را کنترل می‌کنند که در گروه لینکازی ۱۸ و ۱۴ قرار دارند (۸، ۱۲ و ۱۷). در ارقام دانه‌دار چهار منطقه ژنومی برای وزن حبه گزارش شده است که در گروه‌های لینکازی ۱۱، ۵، ۱۳ و ۱۵ قرار دارند (۸). هوئل و همکاران

(۲۰۱۰) نشانگرهای SNP پیوسته با ژن بی‌گوشی حبه را در ارقام *V. vinifera* cv. Chardonnay و *V. vinifera* cv. Ugni Black mutant شناسایی کردند. آن‌ها گزارش کردند که این نشانگرها با وزن حبه نیز مرتبط هستند (۲۴). نتایج مطالعه حاضر کارایی استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی و مدل MLM در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورد بررسی در ارقام انگور مورد مطالعه را نشان می‌دهد. لازم است نشانگرهای شناسایی شده در جمعیت‌های بزرگ نیز مورد بررسی قرار گیرد تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی انگور افزایش یابد.

جدول ۳- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ارقام انگور مورد مطالعه با استفاده از مدل MLM.

Table 3. Markers identified for the studied morphological traits in the studied grapevine cultivar using mixed linear model (MLM) procedure.

صفت Trait	آغازگر Primer	مکان ژنی Locus	MLM	
			F-marker	P-marker
مواد جامد محلول میوه TSS	UBC825	4 (948bp)	12.650	0.00098
بی‌اچ pH	UBC890	2 (550bp)	7.283	0.01
وزن تک بذر Seed Weight	UBC817	2 (1112bp)	11.372	0.0017
وزن تک بذر Seed Weight	UBC825	5 (797bp)	9.399	0.0039
تعداد بذر Seed Number	UBC836	7 (284bp)	10.205	0.0027
تعداد بذر Seed Number	UBC855	2 (1029bp)	7.368	0.0097
عرض خوشه Cluster Width	UBC812	3 (1174bp)	14.026	0.00058
عرض خوشه Cluster Width	UBC817	4 (698bp)	10.865	0.0021
عرض خوشه Cluster Width	UBC864	2 (753bp)	10.621	0.0024
وزن خوشه Cluster Weight	UBC817	4 (698bp)	7.575	0.0089
وزن خوشه Cluster Weight	UBC864	2 (753bp)	13.683	0.00068
درصد تشکیل میوه با گرده‌افشانی کنترل شده Fruit set in Control Pollination	UBC826	4 (1085bp)	8.956	0.0049

نتیجه‌گیری کلی

با استفاده از تجزیه ارتباط مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه به خوبی مشخص شدند. نتایج نشان داد که تجزیه ارتباط با استفاده از مدل MLM می‌تواند از ارتباط دروغین نشانگر- صفت جلوگیری کند و این نشان‌دهنده وضوح و قدرت نقشه‌یابی ارتباطی در جمعیت انگور مورد مطالعه می‌باشد. برخی نشانگرها برای بیش‌تر از یک صفت مشترک بودند. این نشانگرهای مشترک در برنامه‌های اصلاحی

بعدی مانند انتخاب به کمک نشانگر بسیار مفید می‌باشند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی به‌دلیل فراهم کردن نمونه‌های گیاهی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به‌خاطر تامین امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

1. Al-Maskri, A.H., Sajjad, M. and Khan, S.H. 2012. Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *Int. J. Agric. Biol.* 14: 153-160.
2. Ammiraju, J., Dholakia, B., Santra, D., Singh, H., Lagu, M., Tamhankar, S., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupa, V.S. and Ranjekar, P. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102: 5. 726-732.
3. Barnaud, A., Lacombe, T. and Doligez, A. 2006. Linkage disequilibrium in cultivated grapevine, *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 112: 708-716.
4. Barnaud, A., Laucou, V., This, P., Lacombe, T. and Doligez, A. 2010. Linkage disequilibrium in wild French grapevine, *Vitis vinifera* L. subsp. *Silvestris*. *Heredity.* 104: 431-437.
5. Battilana, J., Lorenzi, S., Moreira, F.M., Moreno-Sanz, P., Failla, O., Emanuelli, F. and Grando, M.S. 2013. Linkage mapping and molecular diversity at the flower sex locus in wild and cultivated grapevine reveal a prominent SSR haplotype in hermaphrodite plants. *Mol. Biotechnol.* 54: 1031-1037.
6. Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinform.* 23: 2633-2635.
7. Buckler, E.S. and Thornsberry, J.M. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5: 107-111.
8. Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Ruiz-Garcia, L., Carreño, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome.* 49: 1572-85.
9. Cardon, L.R. and Palmer, L.J. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet.* 361: 598-604.
10. Chitwood, D.H., Ranjan, A., Martinez, C.C., Headland, L.R., Thiem, T., Kumar, R., Covington, M.F., Hatcher, T., Naylor, D.T., Zimmerman, S., Downs, N., Raymundo, N., Buckler, E.S., Maloof, J.N., Aradhya, M., Prins, B., Li, L., Myles, S. and Sinha, N.R. 2014. A modern ampelography: a genetic basis for leaf shape and venation patterning in grape. *Plant Physiol.* 164: 259-272.
11. Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Genet.* 3: 1. 43-52.
12. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C.P., Edwards, J. and This, P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor. Appl. Genet.* 105: 780-95.

13. Doligez, A., Bertrand, Y., Dias, S., Grolier, M., Ballester, J., Bouquet, A. and This, P. 2010. QTLs for fertility in table grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genet. Genom.* 6: 413-422.
14. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
15. Emanuelli, F., Battilana, J., Costantini, L., Le Cunff, L., Boursiquot, J.M., This, P. and Grando, M.S. 2010. A candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol.* 10: 241.
16. Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
17. Fanizza, G., Lamaj, F., Costantini, L., Chaabane, R. and Grando, M.S. 2005. QTL analysis for fruit yield components in table grapevines (*Vitis vinifera*). *Theor. Appl. Genet.* 111: 658-664.
18. Fernandez, L., Le Cunff, L., Tello, J., Lacombe, T., Boursiquot, J.M., Fournier-Level, A., Bravo, G., Lalet, S., Torregrosa, L., This, P. and Martinez-Zapater, J.M. 2014. Haplotype diversity of *VvTFLIA* gene and association with cluster traits in grapevine (*V. vinifera*). *BMC Plant Biol.* 14: 209.
19. Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Gomez, C., Doligez, A., Ageorges, A., Roux, C., Bertrand, Y., Souquet, J.M., Cheyner, V. and This, P. 2009. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genet.* 183: 1127-1139.
20. Fournier-Level, A., Huqueney, P., Verries, C., This, P. and Ageorges, A. 2011. Genetic mechanisms underlying the methylation level of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol.* 15: 11. 179.
21. Grassi, F., Labra, M., Scienza, A. and Imazio, S. 2002. Chloroplast SSR markers to assess DNA diversity in wild and cultivated grapevine. *Vitis.* 41: 157-158.
22. Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant. Mol. Biol.* 57: 461-485.
23. Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Shashidhar, H.E., Zhuang, J.Y., Zheng, K.L., Liu, G.F., Wang, G.C., Sidhu, J.S., Srivantaneeyakul, S., Singh, V.P., Bagali, P.G., Prasanna, H.C., McLaren, G. and Khush, G.S. 2003. Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107: 679-90.
24. Houel, C., Bounon, R., Chaib, J., Guichard, C., Peros, J.P., Bacilieri, R., Dereeper, A., Canaguier, A., Lacombe, T.N., Diaye, A., Le Paslier, M.C., Vernerey, M.S., Coriton, O., Brunel, D., This, P., Torregrosa, L. and Adam-Blondon, A.F. 2010. Patterns of sequence polymorphism in the fleshless berry locus in cultivated and wild *Vitis vinifera* accessions. *BMC Plant Biol.* 10: 284-299.
25. Huang, Y.F., Doligez, A., Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Bertrand, Y., Canaguier, A., Morel, C., Miralles, V., Veran, F., Souquet, J.M., Cheyner, V., Terrier, N. and This, P. 2012. Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping. *BMC Plant Biol.* 12: 30-59.
26. Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.H. and Walker, D.R. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica.* 62: 179-191.
27. Lijavetzky, D., Ruiz-Garcia, L., Cabezas, J.A., De Andres, M.T., Bravo, G., Ibanez, A., Carreno, J., Cabello, F., Ibanez, J. and Martinez-Zapater, J.M. 2006. Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Mol. Genet. Genom.* 276: 5. 427-35.
28. Lowe, K.M. and Walker, M.A. 2006. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) × Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theor. Appl. Genet.* 112: 1582-1592.

29. Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Corneti, S., Ortega, J.L.A., Ben Salem, M., Bort, J., DeAmbrogio, E., del Moral, L.F.G., Demontis, A., El-Ahmed, A., Maalouf, F., Machlab, H., Martos, V., Moragues, M., Motawaj, J., Nachit, M., Nserallah, N., Ouabbou, H., Royo, C., Slama, A. and Tuberosa, R. 2008. Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability. *Genet.* 178: 489-511.
30. Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Demontis, A., El-Ahmed, A., Garcia del Moral, L., Maalouf, F., Nachit, M., Nserallah, N., Ouabbou, H., Rhouma, S., Royo, C., Villegas, D. and Tuberosa, R. 2011. Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *J. Exp. Bot.* 14: 287-293.
31. Mackay, T.F., Stone, E.A. and Ayroles, J.F. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 10: 8. 565-577.
32. Mauricio, R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nat. Genet.* 2: 5. 370-381.
33. Oraguzie, N.C., Wilcox, P.L., Rikkerink, E.H.A. and de Silva, H.N. 2007. Linkage disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer. New York. NY. Pp: 11-39.
34. Pasam, R.K., Sharma, R., Malosetti, M., Van Eeuwijk, F.A., Haseneyer, G., Kilian, B. and Garner, A. 2012. Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. *BMC. Plant. Biol.* 12: 1. 16.
35. Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet.* 155: 945-959.
36. Pritchard, J.K. and Donnelly, P. 2001. Casecontrol studies of association in structured or admixed populations. *Theor. Popul. Biol.* 60: 227-237.
37. Rafalski, A. and Morgante, M. 2004. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends. Genet.* 20: 103-111.
38. Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 128: 1. 9-17.
39. Rezaeizad, A., Wittkop, B., Snowdon, R., Hasan, M., Mohammadi, V., Zali, A. and Friedt, W. 2011. Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. *Euphytica.* 177: 335-342.
40. Riaz, S., Krivanek, A.F., Xu, K., and Walker, M.A. 2006. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V. arizonica*. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1317-29.
41. Rostok, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L. and Bhat, P.R. 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *PNAS.* 103: 18656-18661.
42. Semagn, K., Bjørnstad, A. and Xu, Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Elec. J. Biotech.* 13: 5. 1-45.
43. Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti, Z.P. and Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1281-1291.
44. Tello, J., Torres-Perez, R., Grimplet, J. and Ibanez, J. 2016. Association analysis of grapevine bunch traits using a comprehensive approach. *Theor. Appl. Genet.* 129: 227-242.
45. This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M. and Owens, C.L. 2007. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theor. Appl. Genet.* 114: 4. 723-730.
46. Tuberosa, R., Gill, B.S. and Quarrie, S.A. 2002a. Cereal genomics: Ushering in a brave new world. *Plant. Mol. Biol.* 48: 744-755.

47. Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Landi, P., Maccaferri, M. and Conti, S. 2002b. Mapping QTLs regulating morphophysiological traits and yield in droughtstressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Ann. Bot.* 89: 941-963.
48. Yu, J., Arbelbide, M. and Bernardo, R. 2005. Power of *in silico* QTL mapping from phenotypic, pedigree and marker data in a hybrid breeding program. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1061-1067.
49. Yu, J. and Buckler, E.S. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 155-160.
50. Vargas, A.M., Fajardo, C., Borrego, J., De Andrés, M.T. and Ibanez, J. 2013a. Polymorphisms in *VvPel* associate with variation in berry texture and bunch size in the grapevine. *Aust. J. Grape. Wine Res.* 19: 193-207.
51. Vargas, A.M., Le Cunff, L., This, P., Ibanez, J. and Teresa de Andres, M. 2013b. *VvGAI1* polymorphisms associate with variation for berry traits in grapevine. *Euphytica.* 191: 1. 85-95.
52. Ward, J.A., Bhangoo, J., Fernandez-Fernandez, F., Moore, P., Swanson, J.D., Viola, R., Velasco, R., Bassil, N., Weber, C.A. and Sargent, D.J. 2013. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC Genom.* 14: 2.
53. Zhang, Q., Wu, C., Ren, F., Li, Y. and Zhang, C. 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Aust. J. Crop. Sci.* 6: 1131-1138.

