نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۱۵۸-۱۵۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 2, Summer 2014, P. 154-158
ISSN: 2008 - 4730

بررسی کارایی مارکر اسکار SCC8 درشناسایی ارقام و نتاج بیدانه انگور

مصطفی عالی‌فر[1*]- علی عبادی[2]- محمدرضا فتاحی‌مقدم[3]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۳/۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۳/۷

چکیده

بیدانگی مهم‌ترین صفتی است که از دیر باز مورد توجه اصلاح‌کنندگان انگورهای تازه‌خوری و کشمشی قرار داشته است. اصلاح انگورها توسط روش‌های سنتی منجر به تولید تعداد پایین نتاج بیدانه می‌شود و انتخاب آن‌ها نیازمند مدت زمان طولانی می‌باشد. بنابراین انتخاب به‌کمک نشانگر همراه (MAS) می‌تواند بر مشکلات انتخاب فائق آید و هزینه‌های بالای نگهداری نتاج را طی چندین سال کاهش دهد. در این تحقیق، کارایی مارکر اسکار Scc8 برای شناسایی زود هنگام نتاج بیدانه و تشخیص وضعیت ژن *sdI* در ارقام مهم بیدانه و دانه‌دار انگورهای ایرانی بررسی شد. بدین منظور، ۱۱ نتاجی که توسط تست پنل به عنوان بیدانه مشخص شده بودند توسط مارکر اسکار Scc8 ارزیابی شدند. بر طبق نتایج، مارکر اسکار Scc8 ۱۰ عدد از نتاج را بیدانه هموزیگوت و فقط یکی از آن‌ها را به عنوان بیدانه هتروزیگوت مشخص کرد. این مارکر همچنین قادر به تشخیص ارقام دانه‌دار هموزیگوت موسکات سیاه هامبورگ، دسته‌چین، شاهانی، صاحبی، خلیلی، علی بابا، قزل اوزوم، دیزماری، پیک‌می و شیرازی قرمز و ارقام دانه‌دار هتروزیگوت شاهرودی، اتابکی و تولوقی بود. می‌توان به این نتیجه رسید که مارکر اسکار Scc8 قادر است ارقام و نتاج بیدانه را به خوبی تشخیص و وضعیت ژن *sdI* آن‌ها را در اکثر موارد به درستی مشخص نماید (۸۷/۵ درصد).

واژه‌های کلیدی: اصلاح انگور، بیدانگی، مارکر اسکار، شناسایی زودهنگام نتاج بی‌دانه

مقدمه

ایران دارای ژرم پلاسم بسیار غنی از ارقام انگور می‌باشد. با این حال از آنجائی که در ایران ارقام بیدانه حبه درشت برای مصارف تازه‌خوری وجود ندارد، لذا این امر ضرورت انجام کارهای اصلاحی را دو چندان می‌کند. بیدانگی مهمترین صفتی است که از دیر باز مورد توجه اصلاح کنندگان انگورهای تازه‌خوری و کشمشی قرار داشته‌است (۸). برای تولید ارقام جدید بیدانه، اصلاح‌کنندگان در تلاقی‌ها رقم دانه‌دار را به عنوان والد مادری و رقم بیدانه را به‌عنوان والد پدری در نظر می‌گیرند، لذا نتاج بیدانه حاصل از این تلاقی‌ها نمی‌تواند بیش از ۱۰ تا ۱۵ درصد باشد (۳). از طرف دیگر، برای بدست آوردن ارقام جدید بیدانه باید جمعیت‌های بزرگ مورد ارزیابی و گزینش قرار گیرند و با توجه به اینکه ارزیابی یک بوته هیبرید انگور به ۴-۳ متر مربع زمین به مدت هفت سال نیاز دارد (۱۲) که بسیار پر هزینه و وقت گیر می‌باشد، بنابراین در سال‌های اخیر مطالعات مولکولی به‌منظور استفاده از مارکرها برای گزینش زود هنگام نهال‌های حاوی صفت مورد نظر مد نظر قرار گرفته است. بیدانگی در انگور به صورت پارتنوکارپی و استنواسپرموکارپی می‌باشد. در پارتنوکارپی، بدون انجام لقاح، میوه تشکیل شده و رشد می‌کند، اما در استنواسپرموکارپی گرده افشانی و لقاح صورت می‌گیرد ولی جنین پس از مدتی سقط می‌شود (۴).

بر طبق نظریه بوکوت و دانگلوت (۵) بیدانگی استنواسپرموکارپی در انگور توسط سه ژن مغلوب که توارث آن‌ها به صورت مستقل است و نیز یک ژن غالب تنظیم کننده [5](*sdI*)، کنترل می‌شود. بر اساس این فرضیه سه ژن a1، a2 و a3 به صورت مغلوب بیدانگی را کنترل می‌کنند و این در صورتی است که ژن تنظیم کننده به صورت غالب (هموزیگوت I/I یا هتروزیگوت I/i) باشد. اما وقتی ژن تنظیم کننده به صورت هموزیگوت مغلوب (i/i) باشد، از بیان ژن‌های بیدانگی ممانعت می‌شود و همه ژنوتیپ ها به صورت فنوتیپ دانه‌دار ظاهر می‌شوند.

تاکنون تلاش‌های زیادی در جهات مختلف به منظور یافتن مارکرهای مولکولی پیوسته به ژن تنظیم کننده صفت بیدانگی انجام گرفته است که در نهایت منجر به معرفی سه مارکر اسکار مشتق شده

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: (Email: M.aalifar65@yahoo.com

5- Seed development inhibitor

از پرایمرهای رپید[1] به نام‌های SCC8 (۷)، SCP18 (۲) و SCF27 (۱۰) که به موقعیت ژن تنظیم کننده صفت بیدانگی نزدیک بودند، شده است. شناسایی این مارکرها در جمعیت‌های در حال تفرق (نتاج حاصل از تلاقی بین دو رقم نسبتاً بیدانه) و از طریق غربال آغازگرهای رپید و با استفاده از آنالیز توده‌های در حال تفرق (BSA) صورت گرفته‌است (۱۱).

استریم و همکاران (۱۳) با استفاده از هفت آغازگر رپید توانستند ۴۴ درصد از ژنوتیپ‌های دانه‌دار را از بین ۸۲ ژنوتیپ حاصل از تلاقی بین رقم فلیم سیدلس (والد پدری) و ارلی موسکات (والد مادری) شناسایی کنند.

لاهوک و همکاران (۷) گزارش کردند که مارکر SCC8 با ژن تنظیم کننده صفت بیدانگی ۰/۷ سانتی مورگان فاصله دارد. ژنوتیپ‌هایی که بعد از کاربرد آنزیم برشگر، محصول PCR آن‌ها برش نیافت (یک باند)، به عنوان بیدانه هموزیگوت ($SCC8^{+}SCC8^{+}$) و آن‌هایی که فقط دو قطعه کوتاه‌تر را ایجاد کردند به عنوان دانه‌دار هموزیگوت ($SCC8^{-}SCC8^{-}$) و آن‌هایی که هر سه قطعه را دارا بودند به عنوان هتروزیگوت ($SCC8^{+}SCC8^{-}$) شناخته شدند.

آدام–بلاندن و همکاران (۲) گزارش کردند که مارکر SCP18 حدود ۳/۵ سانتی مورگان با ژن تنظیم کننده بیدانگی در انگور فاصله دارد و استفاده از آن تولید سه باند متفاوت به نام های a، b و c می‌کند که این امر موجب پیچیده شدن نمره‌دهی شده و عدم کارایی این مارکر گردید. با این حال گزارش آن‌ها در مورد نتایج مربوط به استفاده از نشانگر SCC8 خصوصاً در جمعیت حاصل از تلاقی دو رقم بیدانه حاکی از مطلوب بودن استفاده از این مارکر بود.

یانگ و همکاران (۱۴) ژن HIT[2] را مسئول ایجاد استنواسپرموکارپی و مارکر AY327513 را پیوسته به صفت بیدانگی معرفی نمودند. اما در سال ۲۰۱۰ زیچیان و همکاران (۱۵) مشخص نمودند که این ژن در ایجاد پدیده استنواسپرموکارپی در انگور نقشی ندارد و مارکر مربوطه نیز برای تشخیص افراد بی‌دانه فاقد کفایت می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی استفاده از مارکر اسکار در شناسایی زود هنگام نتاج بیدانه و همچنین شناسایی و معرفی ارقام بیدانه هموزیگوت و ارقام دانه‌دار هتروزیگوت به منظور استفاده از آن‌ها در کارهای اصلاحی برای افزایش تولید هر چه بیشتر نتاج بیدانه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ۲۴ رقم انگور (*V.vinifera*) و ۲۲ نتاج سه ساله حاصل از تلاقی *V.vinifera* × *V.vinifera* و دو ژنوتیپ از انگورهای *V. rotundifolia* و *V. riparia* از کلکسیون انگور ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران برای انجام آزمایشات انتخاب و اتیکت زده شدند (جدول۱). در خرداد ماه از برگ‌های جوان و بالغ نمونه گیری انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت داخل زیپ کیپ‌های شماره دار و درون پلاستوفوم دستی که حاوی یخ خرد شده بود قرار گرفتند. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه حمل و در فریزر با دمای $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش لودهی و همکاران (۹) انجام گرفت. تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز با غلظت یک درصد و روش اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید و در ادامه نمونه‌های DNA به غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

تعداد یک جفت آغازگر اختصاصی SCC8-F و SCC8-R در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. توالی این آغازگرها به صورت زیر بود (۷):

5' GGTGTCAAGTTGGAAGATGG 3' : SCC8-F

5' TATGCCAAAAACATCCCC 3' :SCC8-R

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با حجم ۲۵ µl، شامل ۱۲/۵ µl از بافر واکنش PCR به صورت ۱X (شرکت سینا ژن ایران)، ۱/۵ pmol آغازگر رو به جلو، ۱/۵ pmol آغازگر معکوس، ۲۰ ng از DNA الگو و ۷/۵ µl آب مقطر بود.

چرخه حرارتی PCR شامل یک چرخه در دمای $94^{\circ}C$ به مدت چهار دقیقه برای واسرشته‌سازی DNA ژنومی و تعداد ۳۵ چرخه حرارتی به صورتی که در هر چرخه یک دقیقه دمای $94^{\circ}C$ برای واسرشته‌سازی، یک دقیقه دمای $60^{\circ}C$ به منظور اتصال آغازگر و یک دقیقه دمای $72^{\circ}C$ برای تکثیر و بسط DNA هدف، بود و در نهایت ۳۰ دقیقه دمای $72^{\circ}C$ به منظور تکمیل بسط با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل I-Cycler انجام گردید. به منظور هضم محصول PCR از آنزیم برشی *Bgl*II استفاده شد. به این منظور ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۰ واحد از آنزیم *Bgl*II، دو واحد بافر آنزیم (طبق دستور کارخانه سازنده) و نیز پنج میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شد. پس از انجام واکنش هضم، به محتویات هر لوله مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه شد و ۲۰ میکرولیتر از مخلوط نهایی در چاهک‌های ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE ریخته شد. نمونه‌ها به مدت یک

1- RAPD
2 - Histidine triad protein

ساعت با جریان ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از این مرحله رنگ آمیزی ژل آگارز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید µg/l ۰/۵انجام شد. قطعات مربوطه تحت نور ماوراء بنفش مشاهده و سپس توسط دستگاه، عکسبرداری از ژل صورت گرفت (شکل۱).

نتایج و بحث

باندهای اسکار SCC8 در تمام ژنوتیپ‌ها و نتاج مورد بررسی از طریق واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی آن بدست آمد. با این حال در گونه‌های *V. rotundifolia* L. و *V. riparia* L. این باند تکثیر نشد. تاکنون مشاهده باند اختصاصی مربوط به وضعیت دانه تنها در گونه *V. vinifera* گزارش شده است (۷). همچنین باند SCC8 در دو رقم دسته چین و صاحبی به صورت دو باندی مشاهده شد و از آن جایی که دو باند مذکور بسیار به یکدیگر نزدیک بودند ممکن است این امر ناشی از ایجاد جهش ژنی باشد.

پس از مشاهده باند اسکار SCC8 در تمام ارقام و نتاج، چندشکلی آن‌ها در رابطه با صفت بیدانگی از طریق هضم محصول PCR به‌وسیله آنزیم برشگر *Bgl*II بررسی گردید (شکل۱).

بررسی وضعیت آلل‌های SCC8 در ژنوتیپ‌ها نشان داد که تمام ارقام بیدانه ایرانی (بیدانه قرمز، کشمشی، بیدانه سفید، یاقوتی و عسکری) و ارقام اصلاح شده فلیم سیدلس، پرلت، کریمسون سیدلس و سوپریور سیدلس با تولید باند ۹۴۰ جفت بازی در مکان SCC8 برای صفت بیدانگی هموزیگوت ($SCC8^{+}SCC8^{+}$) بودند. برخی از ارقام دانه‌دار مانند تولوقی، اتابکی و شاهرودی با تولید باندهای ۲۴۵، ۶۹۵ و ۹۴۰ جفت‌بازی در مکان SCC8 به صورت هتروزیگوت ($SCC8^{+}SCC8^{-}$) بودند اما سایر ارقام دانه‌دار مانند صاحبی، دیزماری، شاهانی، دسته چین، علی بابا، شیرازی قرمز، موسکات سیاه هامبورگ، قزل اوزوم، پیک می و خلیلی دانه‌دار قوچان با تولید باندهای ۲۴۵ و ۶۹۵ جفت‌بازی در مکان SCC8 به صورت دانه‌دار هموزیگوت ($SCC8^{-}SCC8^{-}$) تشخیص داده شدند (جدول ۱).

در این تحقیق از نشانگر SCC8 جهت شناسایی برخی نتاج حاصل از تلاقی ارقام مرغوب دانه‌دار ایرانی با ارقام بیدانه خارجی نیز استفاده شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. نتاج R80, L125, A119, S55, B98, R84, I21 R16, K93 که قبلاً توسط تست پنل بیدانه قلمداد شده بودند (۱)، در این تحقیق نیز بیدانگی آن‌ها توسط نشانگر اسکار SCC8 تایید شد. کورپس و همکاران (۶) نیز نشان دادند، که استفاده از مارکر اسکار به خوبی قابلیت تشخیص ارقام بیدانه، در بین ارقام انگورهای اروپای مرکزی را داشت.

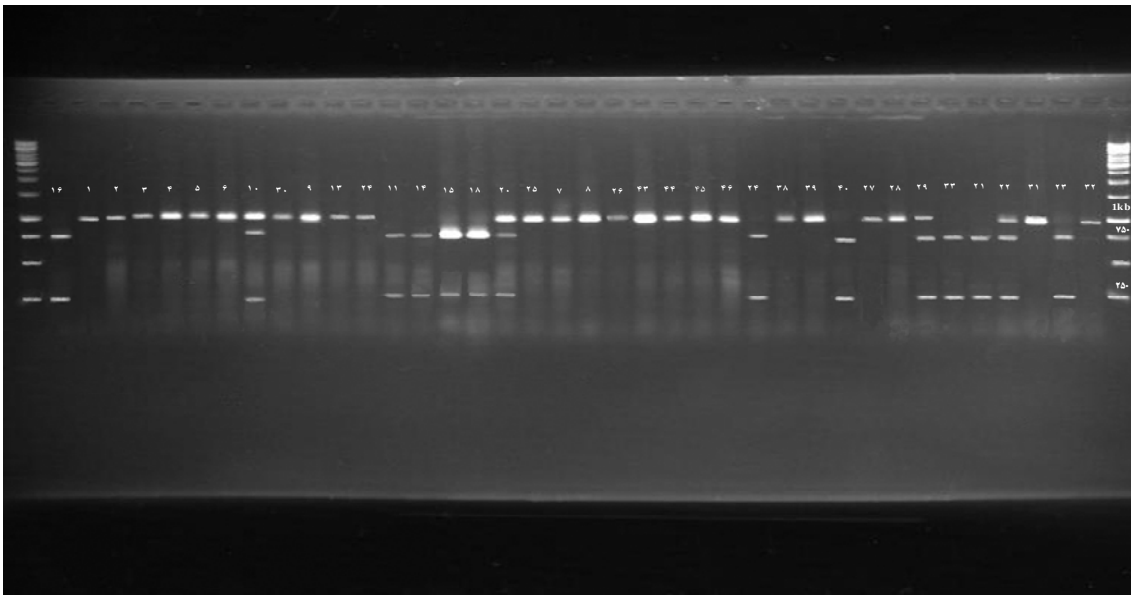
سه رقم ایرانی ریش بابا سیاه، تبرزه سفید و حسینی که از ارقام دانه‌دار نسبتاً خوب محسوب می‌شوند نیز برای صفت بیدانگی در مکان SCC8 هموزیگوت بودند و یک باند تولید نمودند و به نظر می‌رسد احتمالاً نوعی نوترکیبی بین مکان ژنی *sdI* و SCC8 به وجود آمده است.

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که استفاده از این مارکر جهت گزینش ژنوتیپ‌های بیدانه در مراحل اولیه رشد گیاه، می‌تواند کمک فراوانی به تسریع برنامه‌های اصلاحی و کاهش هزینه‌ها نموده و می‌توان از آن در گزینش زود هنگام دانهال‌های بیدانه استفاده نمود. بوکوت و دانگلوت (۵) بیان کردند که کنترل صفت بیدانگی توسط یک مکان ژنی اصلی تنظیم‌کننده و سه مکان ژنی مغلوب و مستقل می‌باشد و با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که مارکر SCC8 با ژن غالب تنظیم‌کننده (*sdI*) پیوسته است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از مارکر SCC8 توانست ارقام بیدانه و دانه‌دار را از یکدیگر تمیز دهد به‌طوری که این مارکر، وضعیت دانه را در ۸۷/۵ درصد از ارقام مورد بررسی به درستی مشخص نمود. بنابراین به‌منظور کاهش درصد خطا توصیه می‌شود از مارکرهای دیگری مانند SCF27 به عنوان مکمل در کنار این مارکر استفاده شود.

از آن‌جایی‌که ارقام کاملاً بیدانه مانند بیدانه قرمز، کشمشی قرمز، بیدانه سفید، یاقوتی و عسکری و ارقام اصلاح شده خارجی فلیم سیدلس، پرلت، کریمسون سیدلس و سوپریور سیدلس در مکان ژنی *sdI* به صورت هموزیگوت می‌باشند، بنابراین می‌توان از این ارقام جهت تولید نتاج بیدانه جدید در تلاقی با ارقام دانه‌دار مرغوب ایرانی استفاده کرد. از طرف دیگر می‌توان والد مادری را از بین ارقامی انتخاب نمود که در مکان ژنی *sdI* به صورت هتروزیگوت باشند و از این طریق تعداد نتاج بیدانه را افزایش داد که در این تحقیق رقم تولوقی، شاهرودی و اتابکی واجد این خصوصیت بودند. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود برای تولید ارقام بیدانه از طریق تکنیک نجات جنین، والدین بیدانه‌ای انتخاب شوند که در مکان ژنی *sdI* به صورت هموزیگوت بیدانه ($SCC8^{+}SCC8^{+}$) باشند.



شکل۱- نتایج هضم محصولات PCR حاصل از بکارگیری مارکر SCC8 توسط آنزیم *BglII* در تعدادی از ارقام و نتاج دانه‌دار و بیدانه انگور

جدول۱- ارقام و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش

شماره	نام	تعداد باند	وضعیت دانه	شماره	نام	تعداد باند	وضعیت دانه
۱	یاقوتی (Yaghooti)	۱	بیدانه	۲۶	L125	۱	بیدانه
۲	فلیم سیدلس (Flame Seedless)	۱	بیدانه	۲۷	A119	۱	بیدانه
۳	پرلت (Perlette)	۱	بیدانه	۲۸	E10	۱	بیدانه
۴	عسکری (Askari)	۱	بیدانه	۲۹	S55	۲	دانه دار
۵	بیدانه‌قرمز (Bidaneh Qermez)	۱	بیدانه	۳۰	B98	۱	بیدانه
۶	کریمسون سیدلس (Crimon Seedlees)	۱	بیدانه	۳۱	R84	۱	بیدانه
۷	بیدانه سفید (Bidaneh Safid)	۱	بیدانه	۳۲	I21	۱	بیدانه
۸	سوپریور سیدلس (Superior Seedless)	۱	بیدانه	۳۳	L131	۲	دانه دار
۹	دست چین (Dastechen)	۲	دانه دار	۳۴	Q45	۱	بیدانه
۱۰	شاهرودی (Shahroudi)	۳	دانه دار	۳۵	R16	۱	بیدانه
۱۱	صاحبی (Sahebi)	۲	دانه دار	۳۶	K93	۱	بیدانه
۱۲	ریش بابا (Rishbaba)	۱	دانه دار	۳۷	A1	۱	–
۱۳	تبرزه سفید (Tabarzeh)	۱	دانه دار	۳۸	A2	۱	–
۱۴	دیزماری (dizmarri)	۲	دانه دار	۳۹	A3	۱	–
۱۵	حسینی (Hoseini)	۱	دانه دار	۴۰	A4	۲	–
۱۶	شاهانی (Shahani)	۲	دانه دار	۴۱	A5	۱	–
۱۷	شیرازی قرمز(Shirazi Qermez)	۲	دانه دار	۴۲	A6	۱	–
۱۸	علی بابا (Alibaba)	۲	دانه دار	۴۳	A7	۲	–
۱۹	کشمشی قرمز (Keshmeshi Qermez)	۱	دانه دار	۴۴	A8	۱	–
۲۰	تولوقی (Toloqhi)	۳	دانه دار	۴۵	A9	۱	–
۲۱	موسکات (Muscat of Hamburg)	۲	دانه دار	۴۶	A10	۱	–
۲۲	اتابکی (Atabake)	۳	دانه دار	۴۷	*V.rotundifolia*	–	
۲۳	خلیلی (Khalili)	۲	دانه دار	۴۸	*V.riparia*	–	
۲۴	قزل اوزوم (Ghezel Ozum)	۲	دانه دار	۴۹	پیک‌می(Pick Me)	۲	دانه دار
۲۵	R80	۱	بیدانه				

منابع

۱- عرفانی‌مقدم ج.، عبادی ع.، فتاحی‌مقدم م. و حدادی‌نژاد م. ۱۳۸۷. معرفی ژنوتیپ‌های بدست آمده از تلاقی برخی ارقام بیدانـه و دانـه‌دار انگـور. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۹ (۲): ۴۱۹-۴۰۹.

2- Adam-Blondon A.F., Lahogue-Esnaul T.F., Bouquet A., Boursoquot J.M. and This P. 2001. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. Vitis, 40:147-155.

3- Aguero C., Riquelme C. and Tizio R. 2000. Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. Plant Growth Regulation, 30(1): 9–16.

4- Bharathy P.V., Karibasappa G.S. and Patil S.G. 2005. In Ovule rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. Scientia Horticulturae, 106:353-356.

5- Bouquet A. and Danglot Y. 1996. Inheritance of seedlessness in grapevine (*V. vinifera* L.). Vitis, 35(1): 35-42.

6- Korpas A., Baranek M., Pidra M. and Hradilik J. 2009. Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within Central European varieties of grapevine. Vitis, 48(1): 33–42.

7- Lahogue F.P., This A. and Bouquet A. 1998. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. Theoretical and Applied Genetics, 97: 950-959.

8- Ledbetter C.A. and Ramming D.W. 1989. Seedlesness in grape. Horticultural Reviews, 11: 159-184.

9- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F. and Reisch B.J. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant molecular Biology, 12:6–13.

10- Mejia N. and Hinrichsen P. 2003. A new, highly assertive SCAR marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. Acta Horticulturae, 603:559-564.

11- Michelmore R.W., Paran I. and Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88: 9828-9832.

12- Mullines M.G., Bouguet A. and Williams L.E. 1991. Biology of the Grapevine. Cambridge University press. United Kingdom.

13- Striem M.J., Ben-Hayyim G. and Spiegel-Roy P. 1996. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. Journal of the American Society for Horticultural Sciences, 121:758-763.

14- Yang K.Q., Wang Y.J., Zhang J.J., Wang X.P., Wan Y.Z. and Zhnag J.X. 2006. Analysis of restriction sites and Southern blotting of two molecular markers linked to grape seedless gene. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 3:13–17.

15- Zhijian T. Li., Dhekney S.A. and Gray D.J. 2010. Molecular characterization of a SCAR marker purportedly linked to seedlessness in grapevine (*Vitis*). Molecular breeding, 25:637-644.