Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Evaluation of genetic diversity among Iranian apple cultivars using ISSR-markers

Fatemeh Moghbeli Mehni
Graduated MSc student, Department of Horticultural Biotechnology, Islamic Azad University, Jiroft Branch, Jiroft, Iran.

Fatemeh Hasanzadeh Davarani
* Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Islamic Azad University, Rafsanjan Branch, Rafsanjan, Iran and Young Researchers and Elite Club, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran. Tel: +989132907622, Email: hasanzadeh.fatemeh1662@gmail.com

Abstract

Objective

Apple (*Malus domestica* Borkh) from Rosaceae family is one of the most important fruit trees in the world. Evaluation of genetic diversity is one of the basic steps for plant breeding and preserving of germ plasm through gene banks.

Materials and methods

The aim of this study was evaluation of the genetic diversity of 22 varieties of apples collected from Khorasan Aagricultural Research Center and some region of Jiroft using ISSR markers based on the polymerase chain reaction (PCR).

Materials and methods

DNA extraction was done and then PCR conducted by five ISSR-primers.

Results

Apple cultivars had 81.48% polymorphism. Cluster analysis classified them into six groups. The first group had five apple cultivars from Khorasan Razavi including Mohali Gonabad, Tabasi number3, Ghasemabai, Mohamadi and Golshahi Oghaz as well as Golab Esfehan, Sibe Ghermez and Gerani Esmith from Jiroft. Genotypes of Zard Lobnan, Sib Ghermez Khoni, Mohali Sardo, Golab Sardo from Jiroft and Mashali, Morabei Mashhad, Ali Mori Dovom Ras, Arbabi, SIB number3 from Khorasan Razavi categorized into the second group. Genotypes of Shaikh Ahmad Tabriz and Shafiabadi were placed in

the third and forth group respectively. The fifth and sixth groups include Gol Mashhad and Abasi Azghade, Atlasi Tabas from Khorasan Razavi. Also, ISSR primer 842 showed the highest polymorphism among apple cultivars. There is no correlation between the geographical origin and genetic grouping of apple cultivars. Probably, setting of different regions genotypes in the same genetic group is due to transport of genotypes among regions in past.

Conclusions

Results indicated that ISSR is an effective technique for identification of polymorphism, genetic distance and germplasm management among apple cultivars.

Keywords: Apple, Genetic Diversity, ISSR, Molecular Marker

Citation: Moghbeli Mehni F, Hasanzadeh Davarani F (2019) Evaluation of genetic diversity among Iranian apple cultivars using ISSR-markers. Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 35-54.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 35-54.
DOI: 10.22103/jab.2019.2248
Received: August 23, 2018; Accepted: November 3, 2018
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام سیب ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR

فاطمه مقبلی مهنی
دانش آموخته گروه بیوتکنولوژی باغبانی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران.

فاطمه حسن‌زاده داورانی
* نویسنده مسئول. استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران و باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۲۹۰۷۶۲۲، ایمیل: hasanzadeh.fatemeh1662@gmail.com

چکیده

هدف: سیب با نام علمی *Malus domestica* Borkh از تیره گلسرخیان (Rosaceae) یکی از مهمترین درختان میوه در جهان است. تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک-های ژنی و اجرای برنامه‌های بهنژادی است. هدف این تحقیق تعیین تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم سیب جمع آوری شده از کلکسیون مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی خراسان رضوی و برخی ارقام موجود در شهرستان جیرفت با استفاده از نشانگر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ISSR بود.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج DNA از گیاهان مورد مطالعه، PCR با پنج آغازگر انجام شد.

نتایج: کولتیوارهای سیب ۸۱/۴۸ درصد چندشکلی داشتند. با آنالیز خوشه ای ارقام در شش گروه طبقه بندی شدند. در گروه اول ارقام محلی گناباد، طبسی شماره ۳، قاسم آبادی، محمدی، گلشاهی اوغاز، گلاب اصفهان، سیب قرمز دماوند و گرانی اسمیت قرار گرفتند. گروه دوم شامل ارقام زرد لبنان، سیب قرمز خونی لبنان، محلی ساردو، گلاب ساردو، مشعلی، مربایی مشهد، علی موری دوم رس، اربابی و سیب شماره ۳ بود. گروه سوم و چهارم به ترتیب شامل ارقام شیخ احمد تبریز و شفیع‌آبادی بودند. گروه پنجم گل مشهد و گروه ششم عباسی ازغده و اطلسی طبس را شامل شدند. در این مطالعه آغازگر ۸۴۲ بیشترین چند شکلی را در بین ارقام نشان داد و بین گروهبندی ژنتیکی و مناطق جغرافیایی ارقام رابطه‌ای وجود نداشت. قرار گرفتن ژنوتیپ‌های مناطق مختلف در گروه‌های یکسان می‌تواند احتمالا به دلیل انتقال ژنوتپ‌ها بین مناطق در زمان گذشته باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه کارآمد بودن نشانگرهای ISSR برای شناسایی نواحی چند شکلی، تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم پلاسم ارقام سیب را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، سیب، نشانگر مولکولی، ISSR

مقدمه

سیب[1] از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین درختان میوه در جهان است (Martinelli et al. 2008). میوه سیب معطر و ارزش غذایی بالایی دارد و به دلیل داشتن مواد آنتی‌اکسیدان از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و خطر ابتلا به بیماری قلبی را کاهش می‌دهد (Janick and Moore, 1991). سیب از تیره گلسرخیان[2] واز زیر تیره پومواید[3] می‌باشد (Coart et al. 2006). این جنس شامل ۱۵ گونه اولیه می‌باشد، که شامل دو گونه از اروپا، چهار گونه از آمریکای شمالی و بقیه از آسیا می‌باشند. این میوه ارزش و محبوبیت خاصی در بین مردم دارد و دارای بیشترین مصرف تازه خوری در بین تمام میوه‌ها است و در کشورهای اروپای غربی، اروپای شرقی، آمریکا، کانادا، ژاپن، چین، استرالیا و بسیاری کشورهای دیگر کشت و تولید می‌شود (Ghasemi 2001). طبق آمار سازمان جهانی (FAO) در سال ۲۰۱۴، ایران با تولید ۱۷۰۰۰۰۰ تن سیب مقام هفتم را در بین کشورهای تولید کننده دارد (FAO, 2014).

در دهه های اخیر بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط بین جمعیت های مختلف این گونه، به عنوان یکی از گام های پایه و اساسی جهت به کار بردن راهکارهای مدیریتی مناسب و صحیح تر برای حفظ ژرم پلاسم گونه ها و شناسایی منابع مقاومت در راس اولویت های تحقیقاتی قرار گرفته اند. استفاده از روش های سنتی در ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه های گیاهی بر پایه ویژگی ها مورفولوژی و فنولوژی به دلیل اینکه تا حد زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی می باشد و قادر به شناسایی پایه های نزدیک نیستند، محدود شده است. نشانگرهای DNA نسبت به نشانگرهای مولکولی و آیزوزایم ها فراوان ترند و کل محتوای ژنوم را می توان با این روش بررسی نمود. روش های مولکولی در دسترس، امکان تشخیص ساختار ژنتیکی واریته هایی را که با یکدیگر ارتباط خویشاوندی نزدیک دارند را فراهم نموده است (Agarwal et al. 2008). برخی از این روش ها شامل RFLP[4]، AFLP[5]، RAPD[6]، SSR[7] و SCARs[8] برای مشخص کردن خصوصیات ژنتیکی و تنوع گونه سیب به کار برده شده است (Farrokhi et al, 2011; Nasiri et al. 2015; Pereira-Lorenzo et al. 2007; Goulao and Cristina 2001). در میان نشانگرهای مختلف نشانگر بین ریز ماهواره ای یا ISSR[9] یک روش مبتنی بر PCR است که شامل تکثیر یک قطعهDNA حاضر در فاصله تکثیر پذیر میان دو ناحیه تکراری ریز ماهواره منحصر به فرد با جهات مخالف می باشد (Zamani et al. 2015). این تکنیک، معمولا از میکروساتلیت‌ها (ریزماهواره‌های) با طول ۱۶–۲۵ جفت باز، بعنوان آغازگر یک واکنش تک آغازگری که لوکوس‌های چندگانه ژنومی را برای تکثیر توالی های بین ریزماهواره‌ای با اندازه‌های مختلف، هدف می‌گیرد بهره

[1] *Malus domestica* Borkh
[2] Rosaceae
[3] Pomoideae
[4] Restriction Fragment Length Polymorphism
[5] Amplified Fragment Length Polymorphism
[6] Random Amplified Polymorphic DNA
[7] Simple Sequence Repeat
[8] Sequence Characterized Amplified Region
[9] Inter Simple Sequence Repeat

می‌برد (Ghasemi et al. 2010). تکرارهای ریزماهواره مورد استفاده به عنوان آغازگر، می توانند دو، سه، چهار یا پنج نوکلئوتیدی باشند (Zamani et al. 2011). آغازگرهای مورد استفاده می‌توانند به هر نقطه‌ای از DNA متصل شوند اگرچه معمولا در انتهای ۳َ یا ۵َ خود به یک تا چهار باز متصل بوده و براساس آنها، گسترش می یابند (Askari et al. 2011). این تکنیک بیشتر مزایای AFLP و ریز ماهواره را با جامعیت RAPD ترکیب کرده است (Mohammadabadi et al. 2017). تکرارپذیری بالای ISSRs احتمالا به سبب استفاده از آغازگرهای طولانی‌تر در مقایسه با آغازگرهای کوتاه‌تر RAPD می باشد که این امر امکان استفاده از دمای بالای اتصال را فراهم می کند که منجر به افزایش احتمال اتصال آغازگر به نقاط مشخصی از DNA (تکرار پذیری بیشتر) می شود (Bahador et al. 2016). ISSRs عمدتا بعنوان مارکرهای غالب، تابع توارث پذیری ساده مندلی شناخته می‌شوند (Askari et al. 2010) اما، آنها همچنین در برخی موارد بعنوان مارکرهای همبارز شناخته شده‌اند چرا که قادر به تمایز میان هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها بوده‌اند (Reddy and Sarla., 2002). در پژوهشی Goulao and Cristina (2001) با بهره گیری از نشانگرهای ریزماهواره و ISSR، انگشت نگاری و تعیین درجه شباهت بین ۴۱ رقم تجاری سیب را انجام دادند و نشان دادند که SSR و ISSR برای شناسایی ارقام و ارزیابی روابط ژنتیکی سودمندتر از دیگر روش‌های مبتنی بر PCR هستند. در پژوهشی دیگر Smolik et al. (2004) هشت رقم سیب را با استفاده از ۳۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار دادند و در مجموع ۴۱۴ باند تکثیر شد که ۳۴۲ (۸۳٪) آنها پلی مورفیسم بودند. در تحقیقی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ سیب زمینی با استفاده از مارکرهای ISSR و رابطه این نشانگر با برخی صفات وابسته به عملکرد مورد بررسی قرار گرفت (Kianiferiz et al. 2013). از ۱۶ آغازگر ISSR، ۶ آغازگر توانستند الگوی باندی مناسبی را تکثیر نمایند و به طور کلی این آغازگرها ۶۱ باند چندشکل تولید کردند که بیشترین باند چندشکل متعلق به نشانگر UBC827 ISSR بود. شاخص اطلاعات شانون و نی در این پژوهش به ترتیب برابر ۵۰٪ و ۳۳٪ بود که نشان دهنده تنوع مناسب بین ارقام مورد بررسی بود. با استفاده از مارکرهای بین‌ریزماهواره‌ای Shahsavar et al. (2007) به بررسی روابط فیلوژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ مرکبات شامل چندین واریته بومی و محلی و همچنین انواع شناخته شده مرکبات در استان فارس پرداختند. نتایج حاصل از مطالعات آنها نشان داد که این مارکرها به عنوان یک ابزار قوی می‌توانند تمایز بین گونه‌های نزدیک بهم را تشخیص دهند. همچنین Kumar et al. (2010) پلی‌مورفیسم را در پرتقال‌های وحشی هندی و Marak and Laskar (2010) روابط فنوتیپی مرکبات را با استفاده از مارکرهای ISSR بررسی کردند. از مطالعات آنها دو یافته مهم بدست آمد: اول این‌که محدوده وسیعی از تغییرات در روابط ژنتیکی *Citrusindica* و دیگر گونه‌های انتخاب شده‌ی مرکبات مشاهده شد. دوم اینکه باندهای ISSR مختص *Citrusindica* شناسایی شدند. در پژوهشی دیگر Lisek and Rozpara (2009) از روش ISSR برای تعیین شباهت ژنتیکی ۱۸ رقم آلبالو، ۲۴ رقم گیلاس و ۹ نوع پایه گیاهان این نوع گونه‌ها از ۳۵ پرایمر استفاده کردند. ۲۳۰ قطعه DNA چند شکل برای پایه گیاهان و همچنین ۱۴۴ قطعه چند شکل برای ارقام آلبالو و ۹۸ تا برای گیلاس بدست آمد. بالاترین درجه پلی‌مورفیسم DNA در پایه‌های پیوندی (۷۱/۲ درصد) مشاهده شد. برای آلبالو این مقدار ۵۰/۷ درصد و برای گیلاس ۳۹/۵ درصد بود و نشان دادند که نشانگرهای

ISSR اجازه شناسایی ژنوتیپ های آزمایشی و همچنین خصوصیات دقیق‌تر آنها را می‌دهند. در مطالعه‌ای Najafzadeh et al. (2014) تنوع ژنتیکی آلبالوهای جدید ایرانی (که ویژگی های رشد و کیفیت میوه برتر داشتند) را با استفاده از ۲۳ مارکر ISSR مشخص کردند. نتایج سطح بالایی از پلی مورفیسم ژنوتیپ‌ها بر اساس این مارکرها را نشان دادند. نتایج آن‌ها همچنین تایید کرد که ISSR یک نشانگر DNA معتبر است که می‌تواند برای مطالعات ژنتیکی دقیق در برنامه‌های اصلاحی آلبالو استفاده شود. تنوع ژنتیکی ۱۹ رقم پسته ایران با استفاده از پرایمرهای ISSR و RAPD توسط Tagizad et al. (2010) مورد بررسی قرار گرفت و ۱۱۴ قطعه تولید کردند که ۷۳ تای آنها پلی‌مورفیک بودند. متوسط میزان اطلاعات پلی‌مورفیسم (PIC) برای هر کدام از سیستم‌های مارکری (۰/۳۹ برای ISSR و ۰/۳۹ برای RAPD) نشان داد که سیستم‌های مارکری به‌طور یکسانی در تعیین پلی مورفیسم‌ها دخیلند. در مجموع در پژوهش‌های مختلف از نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام زراعی و باغی مختلف بکار گرفته شده است که از جمله می‌توان به سیب زمینی (Kianiferiz et al. 2013)، شمشاد (Ghandhari et al. 2013)، لاله واژگون (Lin et al. 2010) ، جنس گلابی (Safarpoor Shorbbakhlo et al. 2015) ، پنبه (Bilval et al. 2017)، رز (Yi et al. 2017)، کلزا (Farhadi et al. 2012)، پسته (Arjmand Ghahestani et al. 2015)، انگور (Keshavarz-Khoob et al. 2015)، گندم (Abdel-Lateif et al. 2018)، مرکبات (Shahsavar et al. 2007) اشاره کرد. لذا، هدف این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم سیب جمع آوری شده از کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و بعضی مناطق شهرستان جیرفت، از جمله روستای ده دیوان و شهر درب بهشت با استفاده از نشانگرهای ISSR بود.

مواد و روش‌ها

برگ ۲۲ رقم سیب مورد مطالعه از کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و بعضی مناطق شهرستان جیرفت، ازجمله روستای ده دیوان و شهر درب بهشت جمع‌آوری گردید (جدول ۱) و از هر جمعیت، برگ‌های جوان و سالم به طور مجزا در پاکت نایلونی زیپ‌دار قرار داده شد، سپس نام آن بر روی پاکت درج گردید و بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و بلافاصله به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شد. DNA ژنومی از بافت تازه برگ با استفاده از روش CTAB[1] (Doyle and Doyle, 1987) استخراج گردید. به منظور بررسی DNAهای استخراج شده، از ژل اگارز با غلظت یک در صد استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز روی ژل، با دستگاه مستند ساز (ژل داک) مشاهده و عکسبرداری باندها انجام گرفت و غلظت تقریبی نمونه‌ها با مقایسه شدت باند حاصله با قطعات نشانگر اندازه انجام شد.

[1] cetyl trimethyl ammonium bromide

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۱. اسامی ارقام سیب و محل جمع‌آوری نمونه‌های مورد بررسی در این آزمایش.

Table 1. Name of apple cultivars and their origin of samples used in this study

ردیف Row	نام رقم Cultivar name	محل نمونه گیری Collection Site	ردیف Row	نام رقم Cultivar name	محل نمونه گیری Collection site
1	گلشاهی اوغاز Golshahi Oghaz	خراسان رضوی Khorasan Razavi	12	محمدی Mohamadi	خراسان رضوی Khorasan Razavi
2	سیب گل مشهد Sib Gol Mashhad	خراسان رضوی Khorasan Razavi	13	گلاب اصفهان Golab Esfehan	روستای ده دیوان Deh DivanVillage
3	اطلسی طبس Atlasi Tabas	خراسان رضوی Khorasan Razavi	14	شفیع‌آبادی Shafiabadi	خراسان رضوی Khorasan Razavi
4	شیخ احمد تبریز Shailk Ahmad Tabriz	خراسان رضوی Khorasan Razavi	15	عباسی ازغده Abasi azhgae	خراسان رضوی Khorasan Razavi
5	قاسم آبادی Ghasembadi	خراسان رضوی Khorasan Razavi	16	گلاب ساردوئیه Golab Sardoeih	روستای ده دیوان Deh DivanVillage
6	محلی گناباد Mohali Gonabad	خراسان رضوی Khorasan Razavi	17	سیب قرمز خونی لبنان Sib Ghermez Khoni	روستای ده دیوان Deh DivanVillage
7	طبسی شماره ۳ Tabasi Number 3	خراسان رضوی Khorasan Razavi	18	گرانی اسمیت Gerani Esmith	روستای ده دیوان Deh DivanVillage
8	مشعلی Mashali	خراسان رضوی Khorasan Razavi	19	سیب قرمز دماوند Sib Ghermez Damavand	روستای ده دیوان Deh DivanVillage
9	زرد لبنان Zard Lonan	روستای ده دیوان Deh DivanVillage	20	اربابی بجنورد Arbabi Bojnord	خراسان رضوی Khorasan Razavi
10	مربای مشهد Moraba Mashhad	خراسان رضوی Khorasan Razavi	21	علی‌موری دوم رس Ali Mori Dovom Ras	خراسان رضوی Khorasan Razavi
11	سیب شماره ۳ Sib Number 3	خراسان رضوی Khorasan Razavi	22	محلی ساردو Mohali Sardo	روستای ده دیوان Deh DivanVillage

با توجه به این که آغازگرهای ISSR زیادی در دنیا برای مطالعه گیاهان استفاده شده است و بسیاری تک شکل و بعضی نیز چندشکل بودند، سعی شد در این مطالعه آغازگرهایی انتخاب شوند که در مطالعات گذشته بیشترین چندشکلی را نشان داده اند. آغازگرهای مورد استفاده (جدول ۲) توسط شرکت سیناژن سنتز و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده رقیق و مورد استفاده قرار گرفت و سپس در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. سپس PCR با برنامه دمایی استاندارد انجام شد (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. ISSR primers used in this study

کد پرایمر Primer code	توالی آغازگر Sequence (5´- 3´)	دمای اتصال (ºC) Annealing Temprature	منابع References
811	$CAC(CA)_6AT$	35	Smolik – 2004
810	$(GA)_8T$	30	Smolik – 2004
827	$(AC)_8GG$	42	Smolik – 2004
842	$(GA)_6CCCGGG$	45	Smolik – 2004
FM931	$(AGC)_5$	50	Smolik – 2004

جدول ۳. مواد لازم جهت واکنش ISSR-PCR

Table 3. The components of ISSR-PCR reaction conditions

غلظت نهایی Final concentration	مقدار مورد استفاده برای یک واکنش (µl) Material used for one reaction (µl)	نام ماده Name of material
1 x	2.5	10 x PCR buffer
1.5 mM	1.5	MgCl2
0.2 mM	1.5	DNTP
2.5 unit	0.5	Taq DNA polymerase
0.5 uM	4	Primer
200 ng	1	Template DNA
20 mg/ml	3	BSA
To achieve final volume	6	Distilled Water

پس از اتمام واکنش PCR، به هر میکروتیوب ۳ میکرولیتر رنگ اضافه شد و سپس در ژل اگارز یک در صد الکتروفورز شد. الگوی باندی بر اساس حضور و عدم حضور باند، به صورت یک و صفر امتیازدهی شد. بعد از تشکیل ماتریس یک و صفر، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و دندروگرام بر اساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA بدست آمد. تجزیه داده‌ها در نرم افزار NTSYS v.pc-2.02e و نرم افزار PopGene 3.2 آنالیز شد.

جدول ٤. برنامه زمانی و دمایی انتخاب شده برای انجام مراحل واکنش ISSR-PCR

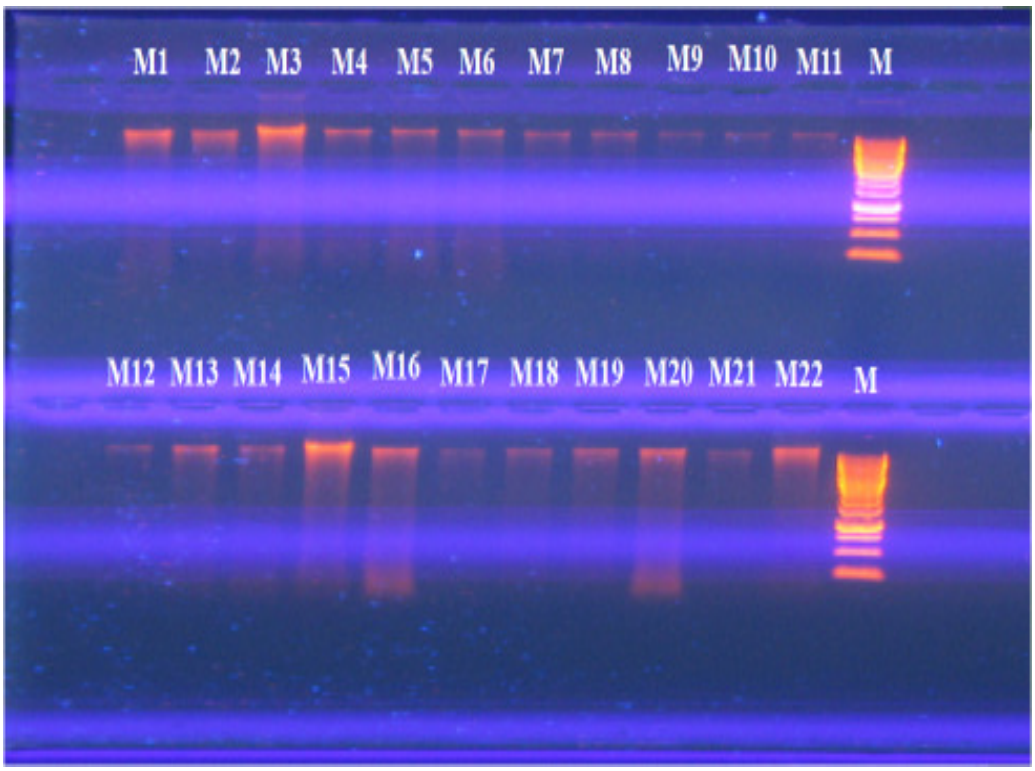
Table 4. Thermocycling program choosed for doing of ISSR-PCR reaction conditions

زمان (دقیقه) Time (minute)	دما (درجه سانتیگراد) Temperature (°C)	نام مرحله Name of step	تعداد سیکل Number of cycle	مرحله Step
5	94	Initial Denaturation واسرشت سازی اولیه	1	1
0.67	94	Denaturation واسرشت سازی		
1.5	متفاوت* Different*	Annealing اتصال آغازگر	35	2
2	72	Extention بسط آغازگر		
10	72	Final Extension بسط نهایی	1	3

*** دمای اتصال پرایمرها متفاوت و بین ۵۰ – ٤۲ درجه سانتیگراد تعریف شد.**

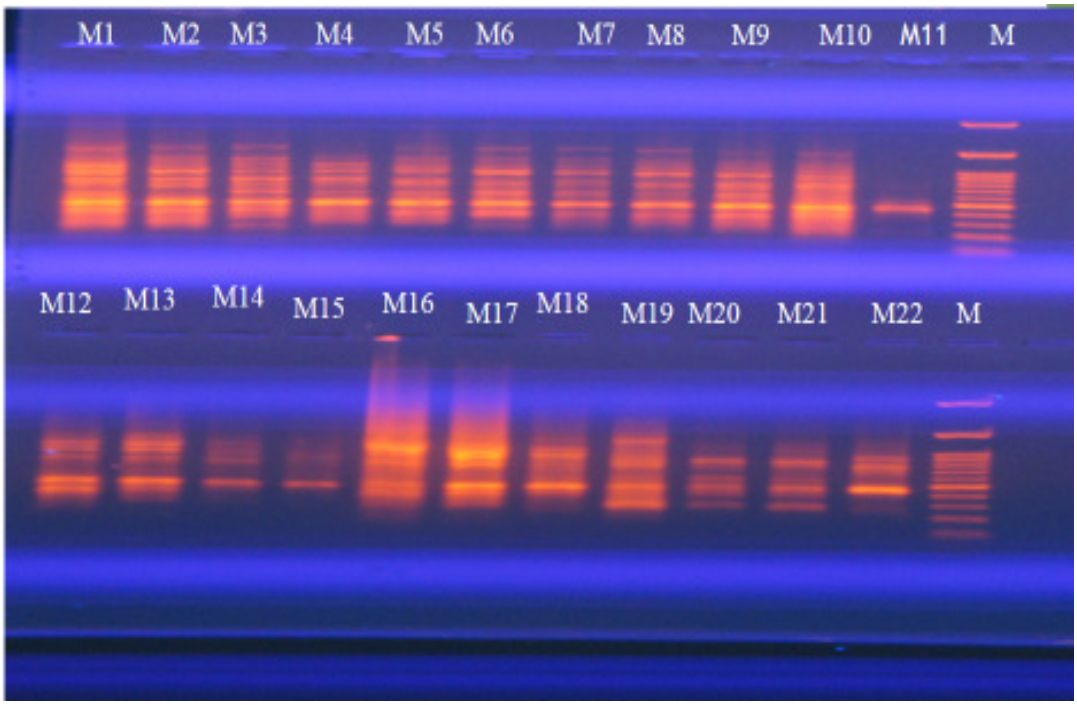
نتایج و بحث

باندهای DNA ژنومی کاملاً واضح و بدون کمترین کشیدگی بودند، که این نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA استخراج شده است (شکل ۱). از پنج آغازگر مورد استفاده سه آغازگر 827،FM93 و 842 در تمامی نمونه‌های مورد بررسی تکثیر و پلی-مورفیسم نشان دادند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند (شکل‌های ۲ و ۳ و ۴). دندروگرام حاصل از سه آغازگر ISSR قادر به تمایز و گروه بندی ارقام سیب گردید و ارقام مورد مطالعه را به شش گروه طبقه-بندی نمود (شکل ۵). در گروه اول ارقام محلی گناباد، طبسی شماره ۳، قاسم آبادی، محمدی، گلشاهی اوغاز، گلاب اصفهان، سیب قرمز دماوند و گرانی اسمیت قرار گرفتند. گروه دوم شامل ارقام زرد لبنان، سیب قرمز خونی لبنان، محلی ساردو، گلاب ساردو، مشعلی، مربایی مشهد، علی موری دوم رس، اربابی و سیب شماره ۳ بود. گروه سوم و چهارم به ترتیب شامل ارقام شیخ احمد تبریز و شفیع‌آبادی بودند. گروه پنجم گل مشهد و گروه ششم عباسی ازغده و اطلسی طبس را شامل شدند.



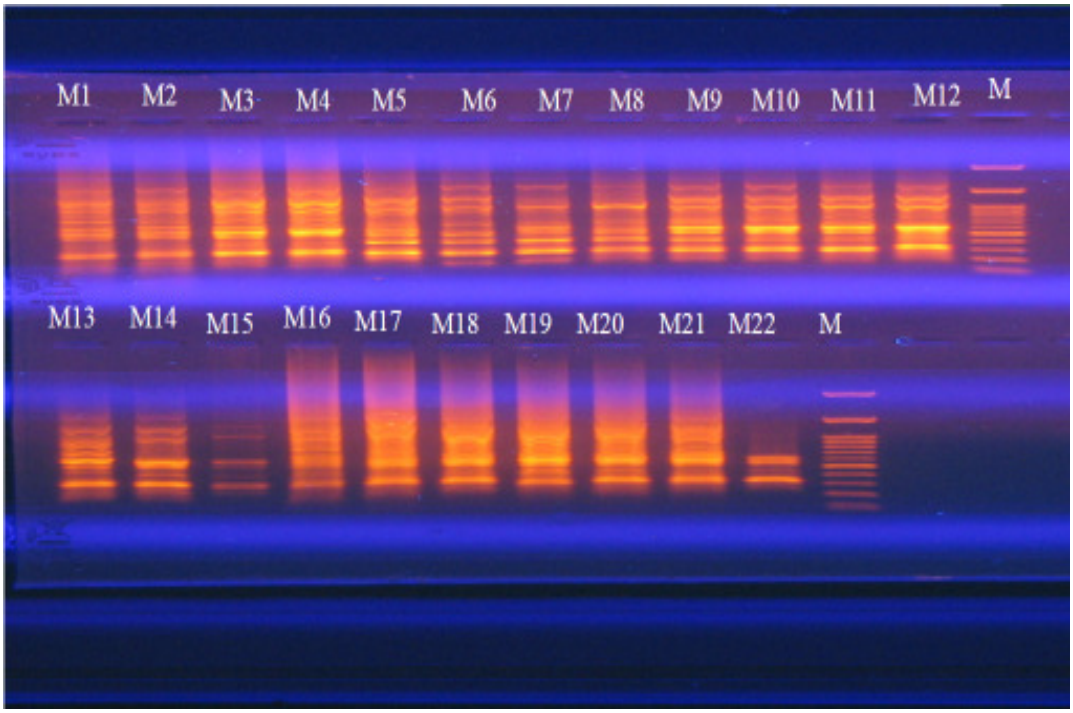
شکل ۱. DNA استخراج شده از برگ ارقام و ژنوتیپ های مختلف سیب روی ژل آگارز یک درصد:M1: اطلسی طبس، M2: گلاب اصفهان، M3: عباسی ازغده، M4: گلشاهی اوغاز ، M5: محمدی، M6: طبسی شماره ۳، M7: شیخ احمد تبریز، M8: مربایی مشهد، M9: سیب شماره ۳، M10: مشعلی، M11: زرد لبنان، M12: گرانی اسمیت، M13: سیب قرمز دماوند، M14: سیب قرمز خونی لبنان، M15: اربابی، M16: گل مشهد، M17: علی موری دوم رس، M18: قاسم آبادی، M19: شفیع آبادی، M20: محلی گناباد، M21: محلی ساردو، M22: گلاب ساردو، M: نشانگر اندازه

Figure 1. Extracted DNA from various apple cultivars and genotyps on Agarose gel 1%:M1: Atlasi Tabas, M2: Golab Esfeha, M3: Abasi Azghadeh, M4: Golshahi Oghaz, M5: Mohamadi, M6: Tabasi Number 3, M7: Shaikh Ahmad Tabriz, M8: Morabaei Mashhad, M9: Sib Number3, M10: Mashali, M11: Zard Lobnan, M12, Gerani Esmith, M13: Sib Ghermez Damavand, M14: Sib Ghermez Khoni Lobnan, M15: Arbabi, M16: Gol Mashhad, M17: Ali Mori Dovom Ras, M18: Ghasemabadi, M19: Shafiabadi, M20: Mohali Gonabad, M21: Mohali Sardo, M22: Golab Sardo, M: Size Marker



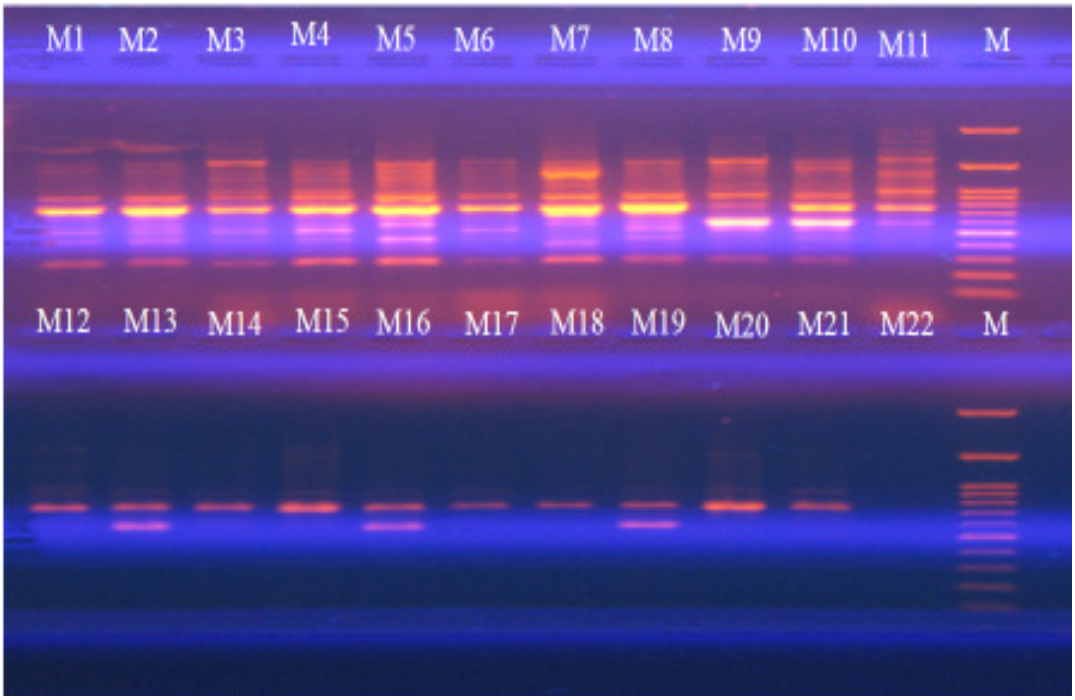
شکل ۲. باند های حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگرFM931 در ۲۲ رقم سیب در ژل آگارز یک در صد. M1: علی موری دوم رس ،M2: مشعلی، M3: گل مشهد ، M4: اربابی ، M5: سیب قرمز خونی لبنان، M6: سیب قرمز دماوند، M7 :گرانی اسمیت، M8: زرد لبنان، M9: محلی ساردو، M10: سیب شماره۳، M11: اطلسی طبس، M12: محلی گناباد، M13: شفیع ابادی ، M14: گلاب ساردو، M15: محمدی، M16: عباسی ازغده ، M17: گلاب اصفهان ، M18: قاسم ابادی، M19: مربایی مشهد، M20: شیخ احمد تبریز، M21: طبسی شماره ۳، M22: گلشاهی اوغاز، دی ان ای سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز

Figure 2. ISSR band-patterns of 22 apple cultivars on agarose gel 1% using FM931 primer: M1: Ali Mori Dovom Ras, M2: Mashali, M3: Gol Mashhad, M4: Arbabi, M5: Sib Ghermez Khoni Lobnan, M6: Sib Ghermez Damavand, M7: Gerani Esmith, M8: Zard Lobnan, M9: Mohali Sardo, M10: Sib Number3, M11: Atlasi Tabas, M12: Mohali Gonabad, M13: Shafiabadi, M14: Golab Sardo, M15: Mohamadi, M16: Abasi Azghadeh, M17: Golab Esfeha, M18: Ghasemabadi, M19: Morabaei Mashhad, M20: Shaikh Ahmad Tabriz, M21: Tabasi Number 3, M22: Golshahi Oghaz. M: Size Marker



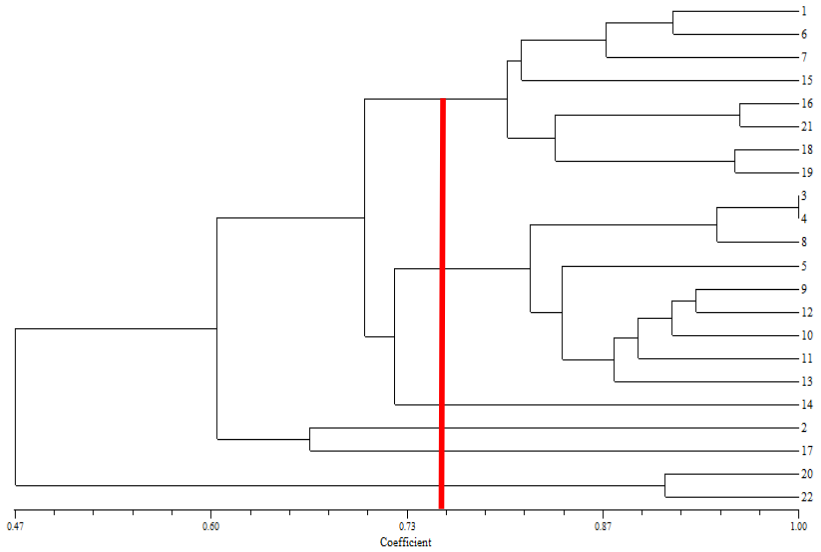
شکل ۳. باند های حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگر827 ارقام و نمونه های سیب در ژل آگار یک در صد. M1محلی گناباد، M2 شفیع ابادی، M3 علی موری دوم رس، M4 اربابی، M5 سیب قرمز خونی لبنان، M6 سیب قرمز دماوند، M7 گرانی اسمیت، M8 زرد لبنان، M9 محلی ساردو، M10گلاب ساردو، M11مشعلی، M12 سیب شماره ۳، M13 مربای مشهد، M14 شیخ احمد تبریز، M15طبسی شماره ۳، M16 قاسمی آباد، M17 گل مشهد، M18 محمدی، M19 گلشاهی اوغاز،M20 عباسی ازغده،M21گلاب اصفهان ،M22اطلسی طیس. M، دی ان ای سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز

Figure 3. ISSR band-patterns of 22 apple cultivars on agarose gel 1% using 827 primer: M1: Mohali Gonabad, M2: Shafiabadi, M3: Ali Mori Dovom Ras, M4: Arbabi, M5: Sib Ghermez Khoni Lobnan, M6: Sib Ghermez Damavand, M7: Gerani Esmith, M8: Zard Lobnan, M9: Mohali Sardo, M10: Golab Sardo, M11: Mashali, M12: Sib Number3, M13: Morabaei Mashhad, M14: Shaikh Ahmad Tabriz, M15: Tabasi Number 3, M16: Ghasemabadi, M17: Gol Mashhad, M18: Mohamadi, M19: Golshahi Oghaz, M20: Abasi Azghadeh, M21: Golab Esfehan, M22: Atlasi Tabas. M: Size Marker



شکل ٤. باند های حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگر 842ارقام و نمونه های سیب. M1: عباسی ازغده، M2: گلشاهی اوغاز، M3: محلی گناباد، M4: شفیع ابادی، M5: علی موری دوم رس، M6: قاسم ابادی، M7: گل مشهد، M8: اربابی، M9: سیب قرمز خونی لبنان، M10: سیب قرمز دماوند، M11: زرد لبنان، M12: گرانی اسمیت، M13: محلی ساردو، M14: گلاب ساردو، M15: مشعلی، M16: سیب شماره ۳، M17: مربایی مشهد، M18 :شیخ احمد تبریز، M19: طبسی شماره ۳، M20: محمدی، M21: گلاب اصفهان، M22: اطلسی طبس، M: دی ان ای سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز

Figure 4. ISSR band-patterns of 22 apple cultivars on agarose gel 1% using 842 primer: M1: Abasi Azghadeh, M2: Golshahi Oghaz, M3: Mohali Gonabad, M4: Shafiabadi, M5: Ali Mori Dovom Ras, M6: Ghasemabadi, M7: Gol Mashhad, M8: Arbabi, M9: Sib Ghermez Khoni Lobnan, M10: Sib Ghermez Damavand, M11: Zard Lobnan, M12: Gerani Esmith, M13: Mohali Sardo, M14: Golab Sardo, M15: Mashali, M16: Sib Number3, M17: Morabaei Mashhad, M18: Shaikh Ahmad Tabriz, M19: Tabasi Number 3, M20: Mohamadi, M21: Golab Esfehan, M22: Atlasi Tabas. M: Size Marker



شکل ٥. دندروگرام حاصل از سه آغازگر ISSR با استفاده از روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار NTSYS v.pc-2.02e. ۱. محلی گناباد، ۲. شفیع آبادی، ۳. علی موری دوم رس، ٤. اربابی، ٥. سیب قرمز خونی لبنان، ٦. سیب قرمز دماوند، ۷. گرانی اسمیت، ۸. زرد لبنان، ۹. محلی ساردو، ۱۰. گلاب ساردو، ۱۱. مشعلی، ۱۲. سیب شماره ۳، ۱۳. مربای مشهد، ١٤. شیخ احمد تبریز، ۱۵. طبسی شماره۳، ١٦. قاسمی آباد، ۱۷. گل مشهد، ۱۸. محمدی،۱۹. گلشاهی اوغاز، ۲۰. عباسی ازغده، ۲۱. گلاب اصفهان، ۲۲. اطلسی طبس

Figure 5. The dedrogram of resulted from three ISSR primers using UPGMA method by NTSYS version 2/11. 1- Mohali Gonabad, 2- Shafiabadi, 3- Ali Mori Dovom Ras, 4- Arbabi, 5- Sib Ghermez Khoni Lobnani, 6- Sib Ghermez Damavand, 7- Gerani Esmith, 8- Zard Lobnan, 9- Mohali Sardo, 10- Golab Sardo, 11- Mashali, 12- Sib Number 3. 13- Moraba Mashhad, 14- Shaikh Ahmad Tabriz, 15- Tabasi Number 3, 16- Ghasemabadi, 17- Gol Mashhad, 18- Mohamadi, 19- Golshahi Oghaz, 20- Abasi Azghade, 21- Golab Esfehan, 22- Atlasi Tabas

داده‌های حاصل از نرم افزار PopGen نشان داد که تعداد مکانهای چندشکل حاصل از سه آغازگر ISSR، بیست و دو عدد می‌باشد و در صد مکانهای پلی‌مورف حاصل از سه آغازگر ISSR، ۸۱/۴۸ در صد می‌باشد. آگاهی از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه ها، ابزاری مفید در بیان استراتژی های کارآمد حفاظتی در اکوسیستم های طبیعی به شمار می رود. از فاکتورهای اصلی گوناگونی تنوع ژنتیکی در بسیار از گونه های گیاهی می توان به سیستم تکثیر و تولید مثل گونه، نحوه گرده افشانی،

مکانیسم پراکنش، دامنه جغرافیایی و مرحله تکاملی اکوسیستم اشاره کرد. در بین این فاکتورها عامل اصلی تنوع ژنتیکی جمعیت های متفاوت گونه، سیستم تولید مثلی آن می باشد (Hamrick et al. 1992). نتایج مطالعه حاضر در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم مختلف سیب از مناطق با عرض جغرافیایی متفاوت بیانگر درصد بالای تنوع (۸۱/۴۸٪) بین ارقام جمع آوری شده بود. مشابه نتیجه این مطالعه در گزارش Goulao and Cristina (2001) در ارزیابی روابط ژنتیکی ۴۴ رقم سیب با استفاده از مارکرهای ISSR و SSR و همچنین پژوهش (Dhyani et al. 2015) جهت ارزیابی تنوع درون جمعیت ارقام مختلف سیب با پراکندگی-های مختلف جغرافیایی با نشانگر ISSR حاکی از وجود تنوع بالای درون جمعیتی (۷۰٪) برای گونه سیب می باشد. در همین راستا .Smolik et al (2004) هشت رقم سیب را با استفاده از مارکرهای ISSR مورد بررسی قرار دادند و نتاج آن‌ها نشان داد که از ۴۱۴ بابد تکثیر شده ۳۴۲ باند چندشکل بودند (۸۳٪) و دندروگرام با استفاده ازروش UPGMA سه خوشه مجزا رانشان داد. البته یک گروه جداگانه ای متفاوت از سایر ارقام نیز تشکیل شد. در پژوهشی دیگر (Khalkhali et al. 2014) ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۲ واریته سیب با استفاده از مارکرهای ISSR انجام شد و تجزیه خوشه‌ای با دو نرم افزار PopGene و SPSS صورت گرفت که با هر دو نرم افزار واریته‌ها در ۵ گروه مجزا قرار گرفتند که درصد پلی مورفیسم ٪۹۶ و تعداد لوکوس پلی مورف ۴۸ بود و در مجموع ۲۲۶ باند توسط این نشانگرها تولید شد که اندازه باندها بین ۲۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز متغییر بود. در واقع نبود موانع تولید مثلی بین گونه ای، خود ناسازگاری و کشت سیب در نواحی که جوامع وحشی آن به طور طبیعی مستقر شده اند و گرده افشانی گسترده توسط حشرات در داخل جمعیت های سیب سبب افزایش جریان ژنی و در نتیجه افزایش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی شده است(Larsen et al. 2006). همه مطالعات اخیر بیانگر طبیعت فوق العاده متنوع این نشانگرها و نیز پتانسیل آن‌ها برای مطالعه سطوح مختلف جمعیتی می‌باشد که همه تایید کننده نتایج پژوهش حاضر هستند. در مجموع، بررسی انجام شده بر روی ارقام مورد مطالعه نشان داد که نشانگرهای مورد نظر می‌توانند تنوع ژنتیکی بین ارقام را به خوبی نشان دهند این امر نشان می‌دهد که این ارقام برای به نژادی و بررسی منابع مقاومت و مطالعات دیگر مفید هستند و به عنوان یک مخزن ژنی باید حفاظت شوند. در مجموع دندروگرام حاصل از سه آغازگر نشان داد که ارقام علی موری دوم رس و اربابی صددرصد شباهت ژنتیکی دارند. این امر نشان می‌دهد که این آغازگر برای بررسی این ارقام کاربردی ندارد و لذا بهتر است از آغازگرهای دیگری برای مطالعه آنها استفاده شود. در این بررسی ارقام سیب با پراکنش جغرافیایی متفاوت در گروه های ژنتیکی مشابهی قرار گرفتند که احتمالا به دلیل جریان ژنی (مهاجرت بذرها) باشد که گاهی این مهاجرت سریعتر از حد انتظار می باشد (Hamrick et al. 1992). قرار گرفتن ژنوتیپ ها در بین خوشه های مناطق دیگر احتمالا این نکته را بیان می کند که انتقال ژنوتیپ های برتر از یک منطقه به منطقه دیگر در گذشته صورت گرفته است و تاییدی بر انجام انتخاب و حفاظت از ژنوتیپ های برتر می باشد. مطالعات نشان می دهد آغازگرهای ISSR دارای تکرارهای GA، AG، CT، TC، AC و CA چند شکلی بالاتری از سایر تکرارهای دی، تری و تترا نوکلئوتیدی نشان می دهند (Reddy et al. 2002). در این مطالعه آغازگر 6 CC (GA) بیشترین چند شکلی را در نمونه ها نشان داد که نتایج این مطالعه با این فرضیه مطابقت داشت.

در مجموع بر اساس این مطالعه مشخص شد که نشانگر ISSR از قابلیت بالایی در شناسایی نواحی چند شکلی و تخمین فاصله ژنتیکی، امکان بررسی تنوع و مدیریت ژرم پلاسم ارقام سیب برخوردار است. لازم به ذکر است که در مطالعات بعدی می-توان ارتباط این آغازگر را با صفات مختلف بررسی نمود تا اگر ارتباطی بین این نشانگر و صفت خاصی وجود دارد شناسایی شود.

.

منابع

ارجمند قهستانی رامین، توسلیان ایرج، محمدی نژاد قاسم (۱۳۹۴) ارزیابی تنوع ژنتیکی۲۵ ژنوتیپ پسته ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷(۳)، ۱۸-۱.

بهادر یاسر ، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین ، اسدی مهدیه، مدحتی لیلا (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشان‌گرهای ISSR. ۷(۱۳)، ۵۶-۴۹.

صفرپور شورباخلو مریم، حسینی منفرد روح اله، پایدار سولماز، مستانه شریفی (۱۳۹۴) تعیین تنوع ژنتیکی ارقام گلابی با استفاده از نشانگرهای ISSR. ۷(۱)، ۱۳۲-۱۱۵.

عسکری ناهید ، باقی زاده امین ، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) بررسی تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی رائینی با استفاده از لوکوس های بین ریزماهواره (ISSR). ۵(۲)، ۵۶-۴۹.

کشاورزخوب محمدقاسم، قرنجیک شاهرخ، معصومی اصل اسد، عبدالهی مندولکانی بابک (۱۳۹۴) بررسی تنوع و روابط ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انگور (Vitis vinifera L) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. ۷(۴)، ۱۴۲-۱۲۹.

References

Abdel-Lateif KS, Hewedy OA (2018) Genetic diversity among Egyptian wheat cultivars using SCoT and ISSR Markers. SABRAO J Breed Genet 50, 36-45.

Agrawal M, Shrivastavata N, Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep 27, 617-631.

Arjmand Ghahestani R, Tavasolian I, Mahammadi Nejad GH (2015) Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers. Agric Biotechnol J 7, 1-18.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5, 49-56 (in Persian).

Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222-229.

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7, 186-192 (in Persian).

Bilval BB, Vadodariya KV, Rajkumar BK, Lahane GR (2017) Genetic diversity of parents using RAPD, ISSR and SSR molecular markers in upland cotton (Gossypium hirsutum L.). Bull Environment Pharm Life Sci 6, 51-57.

Coart E, Van Glabeke S, De Loose M et al. (2006) Chloroplast diversity in genus Malus: New insights into the relationship between the Europen wild apple (Malus sylvestris (L.) Mill) and the domesticated apple (Malus domestica Borkh.). Mol Echol 15, 2171-2182

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11–15.

FAO (2014) Food and Agriculture Organization of the United Nations Database (Apple Crop). Available at: http://faostat.fao.org.

Farrokhi J, Darvishzadeh R, Naseri L et al. (2011) Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (Malus × domestica Borkh) cultivars and landraces using Simple Sequence Repeat Markers. Aust J Crop Sci 5, 815-821.

Ghandehari V, Ahmadikhah A, Payamnoor V (2013) Genetic diversity of Buxus hyrcana populations in north of Iran using ISSR. Iran Genet Res Breed Rangeland plant 21, 1-12

Ghasemi AA (2001) Study of physiological characteristics and dwarfing effect of two Iranian apple genotype 'Azayesh and Gami almasi' on commercial apple cultivars. Annu Project Rep (In Farsi).

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4, 5758-5760.

Goulao L, Cristina M (2001) Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus´ damestica* Borkh) using microsatellite (SSR and ISSR) Markers. Euphytica 122, 81-89.

Hamrick JL, Godt, MJD, Sherman-broyles SL (1992) Factor influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forest 5, 95-124.

Janick J, Moore JN (1999) Fruit Breeding (vol. I). Tree and tropical fruit. John Wiley & Sons publishing, New York.

Keshavarz-Khoob MGh, Gharanjik Sh, Masoumiasl, A, Abdollahi-Mandoalkani B (2015) Evaluation of diversity and genetic relationships among some grapevine cultivars using ISSR markers. Agric Biotechnol J 7, 129-142 (in Persian).

Khalkhali F, Abaspour H, Sinki, JM, Khalkhali, A (2014) Investigation of genetic diversity 12 apple cultivars (Malus domestica Borkh) by ISSR markers. The 1st International Conferences on Environmental Engineering with Focus on Sustainable Development.

Kiani F, Asghari A, Malekzadeh Shafaroudi S, Sakhdari A (2013) Association analysis of agronomical traits using ISSR Markers in Twenty potato cultivars. 8 th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran and 4th Biosafety congress

Kumar S, Narayan JS, Nair Narayanan K (2010). ISSR polymorphism in Indian wild orange (Citrus indica Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. Scientia Horticulturae 123, 350–359.

Larsen AS, Asmussen CB, Coart E et al. (2006) Hybridization and genetic variation in Danish populations and Eropean crab apple (Malus sylvestris). Tree Genet Genomes 2, 86-97.

Lin XC, You YF, Liu J et al. (2010) Crossbreeding of Phyllostachys species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. Genet Mol Res 27, 209-220.

Lisek A, Roz Para E (2009) Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique. J Fruit Ornament Plant Res 17, 95-106.

Marak, C. K., & Laskar, M. A. (2010) Analysis of phenetic relationship between Citrus indica Tanaka and a few commercially important citrus species by ISSR markers. Scientia horticulturae 124, 345-348.

Martinelli F, Matteo B, Fabiano C et al. (2008). Ancient Pomoideae (*Malus domestica* Borkh. and Pyrus communis L.) cultivars in "Appenino Toscano" (Tuscany, Italy): molecular (SSR) and morphological characterization. Caryologia 61, 320-331.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Dev 5, 154.

Najafzadeh R, Arzani K, Bouzari N, Saei A (2014) Genetic Diversity Assessment and Identification of New Sour Cherry Genotypes Using Intersimple Sequence Repeat Markers. Int J Biodiver 10, 1-8.

Nasiri M, Yari R, Abedini A (2015) The study of genetic variation of Malus orientalis plant using RAPD-PCR in Lorestan province. Int J Rev Life Sci 5, 192-202.

Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Diaz-Hernandez MB (2007) Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (Malus 9 domistica Borkh.) from spain using microsatellite markers. Genet Resour Crop Ev 54, 405-420.

Reddy MP, Sarla N, Siidiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeing. Euphytica 128, 9-17.

Safarpoor Shorbbakhlo M, Hosseini Monfared R, Paydar S, Sharifi M (2015) Determination of genetic diversity in pear genotypes using ISSR markers. Agric Biotechnol J 7, 115-132 (in Persian).

Shahsavar AR, Izadpanah K, Tafazoli E et al. (2007) Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 112, 310–314.

Smolik M, Rzepka-Plevneš D, Stankiewicz I et al. (2004) Analysis of genetic similarity of apple tree cultivars. Folia Horticulturae 16, 87-94.

Tagizad A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi M (2010) A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iran J Genet Plant Breed 1, 1-10.

Yi QY, Yi SW, Qin TF, Li CY (2017) Using RAPD and ISSR molecular markers to analyza genetic iversity of Rose Scented Pelargonium population. Flavour Frager 33, 75-81.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of inter simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumint Res 132, 123-127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812-1817.