Archive of SID.ir

Shahid Bahonar University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Iranian Biotechnology Society

Investigating the genetic diversity of native varieties of Iranian watermelon using the ISSR molecular marker

Amin Arjmand

PhD Student, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail address: amin.arjmand@ut.ac.ir

Mohsen Ebrahimi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail address: mebrahimi@ut.ac.ir

Abstract

Objective

The purpose of this research is to investigate the efficiency of the ISSR molecular marker in distinguishing the studied watermelon populations, to determine the degree of similarity and genetic distance of the populations in order to use the phenomenon of heterosis and to select suitable parents in watermelon hybrid seed production programs.

Materials and methods

In this research, the genetic diversity of 24 different watermelon populations from all over Iran was investigated using 10 ISSR primers. DNA extraction was done using the CTAB method. After PCR, molecular data were scored as zero and one. Indexes related to markers include total number of bands, number of polymorphic bands, polymorphic percentage, marker index (MI), resolution strength index (RP) and polymorphic information content (PIC). It was measured. In order to perform cluster analysis, NTSYS and Excel software were used, and GenALEx software was used to analyze the molecular variance and to analyze the main coordinates.

Results

In this research, a total of 202 bands were produced, of which 184 were polymorphic bands. The average number of total bands and polymorphic bands in this study was 20.2 and 18.4, respectively. The highest percentage of polymorphism was related to the ISSR6 primer with 100%

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

and the lowest polymorphism was related to the ISSR5 primer with 80%. The average percentage of polymorphism in this study was also 0.90. The value of PIC index in this research varied between 0.26 and 0.44 and the average PIC was 0.35. After cluster analysis, the studied populations were divided into five groups at a similarity level of 55%. The results of molecular variance analysis in the studied populations showed that 14% of the variation is between the studied populations and 86% of the variation is within the studied populations. The results of analysis to main coordinates also confirmed the results of cluster analysis.

Conclusions

According to the obtained results, the ISSR molecular marker has the necessary efficiency to distinguish the studied populations, and on the other hand, considering the considerable genetic diversity between and within the studied populations, the genotypes used in this research can be considered as the population The first one was used in watermelon hybrid seed production programs and also Faryab and Minab populations can be used as cross parents considering that they had the least genetic similarity in order to use heterosis in watermelon hybrid seed production projects.

Keywords: Genetic distance, Genetic similarity, Heterosis, Hybrid

Paper Type: Research Paper.

Citation: Arjmand A, Ebrahimi M (2024) Investigating the genetic diversity of native varieties of Iranian watermelon using the ISSR molecular marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 1-18.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 1-18. DOI: 10.22103/jab.2023.22199.1514

Received: August 20, 2023. Received in revised form: October 14, 2023.

Accepted: October 15, 2023. Published online: February 20, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

بررسی تنوع‌ژنتیکی جمعیت‌های بومی هندوانه ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

امین ارجمند

دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: amin.arjmand@ut.ac.ir

محسن ابراهیمی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: mebrahimi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳

چکیده

هدف: هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی نشانگر مولکولی ISSR در تمایز جمعیت‌های هندوانه مورد مطالعه، تعیین میزان تشابه و فاصله‌ژنتیکی جمعیت‌ها به منظور استفاده از پدیده هتروزیس و انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تنوع‌ژنتیکی ۲۴ جمعیت مختلف هندوانه از سراسر ایران با استفاده از ۱۰ پرایمر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام گرفت. پس از انجام PCR امتیاز دهی داده‌های مولکولی به صورت صفر و یک داده شد. شاخص‌های مرتبط با نشانگر شامل تعدادکل‌نوارها، تعداد نوارهای‌چندشکل، درصدچندشکلی، شاخص‌نشانگری (MI)، شاخص قدرت‌تفکیک (RP) و محتوای‌اطلاعات‌چندشکلی (PIC) اندازه‌گیری شد. به منظور انجام تجزیه‌خوشه‌ای، از نرم‌افزار NTSYS و Excel و به منظور تجزیه واریانس مولکولی و تجزیه به مختصات اصلی نیز از نرم‌افزار GenALEx استفاده شد.

نتایج: در این تحقیق در مجموع ۲۰۲ نوار تولید شد که از این تعداد ۱۸۴ نوار چندشکل بود. میانگین تعداد کل نوار و نوارهای چندشکل در این مطالعه به ترتیب ۲۰/۲ و ۱۸/۴ به‌دست آمد. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR6 با ۱۰۰ درصد و کمترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR5 با ۸۰ درصد بود. میانگین درصد چندشکلی در این مطالعه نیز ۰/۹۰ به‌دست آمد. مقدار شاخص PIC در این تحقیق بین ۰/۲۶ تا ۰/۴۴ متغییر و میانگین PIC نیز ۰/۳۵ بود. پس از انجام تجزیه‌خوشه‌ای جمعیت‌های

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مورد مطالعه در سطح تشابه ۵۵ درصد در پنج گروه قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس‌مولکولی در جمعیت‌های مورد مطالعه نتایج نشان داد ۱۴ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌های مورد مطالعه و ۸۶ درصد از تنوع مربوط به درون جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. نتایج تجزیه به مختصات‌اصلی نیز نتایج حاصل از تجزیه‌خوشه‌ای را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده نشانگر مولکولی ISSR کارایی لازم جهت تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه را دارد و از طرفی با توجه به تنوع‌ژنتیکی قابل ملاحظه بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه از ژنوتیپ‌های استفاده از شده در این تحقیق می‌توان به عنوان جمعیت اولیه در برنامه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه استفاده کرد و همچنین از جمعیت‌های فاریاب و میناب با توجه به اینکه بیشترین فاصله‌ژنتیکی را داشتند به منظور استفاده از هتروزیس در پروژه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه به عنوان والدین تلاقی می‌توان استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: تشابه‌ژنتیکی، فاصله‌ژنتیکی، هتروزیس، هیبرید.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ارجمند امین، ابراهیمی محسن (۱۴۰۳) بررسی تنوع‌ژنتیکی جمعیت‌های بومی هندوانه ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۱)، ۱-۱۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

هندوانه با نام علمی *Citrullus Lanatus*، متعلق به جنس *Citrullus* و خانواده *Cucurbitaceae* می‌باشد (Dane et al. 2007). طبق آمار فائو در سال ۲۰۲۱ ایران با تولید حدود ۲/۷ میلیون تن هندوانه، پس از کشورهای چین، ترکیه و هند در جایگاه چهارم قرار داشته است (FAO 2021). در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ طبق آمار وزارت کشاورزی، بیش از ۶۳ هزار هکتار از زمین های زراعی ایران به تولید هندوانه اختصاص داشته است که حدود ۶۰ هزار هکتار آن به صورت آبی بوده و میانگین عملکرد در واحد سطح نیز در کشت آبی ۳۳ تن در هکتار بوده است. طبق آمار وزارت کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ استان سیستان‌وبلوچستان با سطح زیر کشت ۱۶۴۹۰ هکتار و میزان تولید ۴۸۵ هزار تن در جایگاه اول قرار داشته است. هندوانه تاریخ طولانی از کشت در آفریقا، خاورمیانه و ناحیه نیل از دو قرن قبل از میلاد دارد (Romao et al. 2000). در قرن دهم پس از میلاد این گیاه در چین و جنوب روسیه کشت شد و در قرن ۱۶ میلادی توسط مهاجرین به دنیای جدید منتقل گردید و به سرعت مورد توجه بومیان آمریکا قرار گرفت (Magss et al. 2003). تصور می‌رود منشأ هندوانه جنوب آفریقا باشد به‌دلیل آن‌که بیشترین گونه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

وحشی این جنس در این منطقه رشد می‌کند و اسناد پیدا شده گواه کشت آن در ۴۰۰۰ سال قبل در این ناحیه است. پس از این منطقه بیشترین تنوع در غرب آفریقا، چین و مناطقی از هند یافت می‌شوند. خاورمیانه و کشورهای نزدیک مدیترانه نیز نواحی مناسبی برای پیدا کردن خویشاوندان و اجداد هندوانه هستند (Szamosi et al. 2009). گونه‌ها و رقم‌های مختلف هندوانه در آغاز رشد شبیه هم بوده ولی در ادامه تنوع زیادی برای شکل میوه و دیگر صفات از خود نشان می‌دهند (Mujaju et al. 2010). تنوع گسترده فنوتیپی از نظر کیفیت میوه (شکل و اندازه، رنگ پوست و گوشت، عطر، بو و طعم میوه) در میان ارقام هندوانه وجود دارد (Levi et al. 2008). آگاهی از میزان تنوع‌ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار است. شناخت دقیق میزان تنوع‌ژنتیکی واقعی موجود و پتانسیل به‌نژادی در گزینش و ایجاد ژنوتیپ‌های مطلوب، بهره‌مندی از هتروزیس در تولید بذور هیبرید، ضمانت مالکیت ارقام و ژنوتیپ‌های بومی برای کشور یک اقدام مهم و اساسی به شمار می‌آید. تنوع‌ژنتیکی با افزایش هتروزیگوسیتی باعث افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها می‌شود و از فرسایش ژن‌ها جلوگیری می‌کند (Bekheet et al. 2008). تنوع و انتخاب دو رکن اصلی و اساسی هر برنامه اصلاحی بوده و موفقیت انتخاب منوط به وجود تنوع‌ژنتیکی زیاد و مطلوب می‌باشد. تخمین میزان تنوع‌ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژن و اجرای برنامه‌های به‌نژادی است. جهت دستیابی به ارقام با عملکرد بالا، کیفیت بیشتر، تحمل بهتر به تنش‌های زیستی و غیر زیستی از قبیل مقاومت به آفات و بیماری‌ها، وجود تنوع ژنتیکی ضروری است (Laurentine 2009). به طور کلی می‌توان گفت ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، پروتئینی و مولکولی مبتنی بر DNA انجام می‌گیرد و از معایب نشانگرهای مورفولوژیکی، پروتئینی و فیزیولوژیکی می‌توان تاثیرپذیری از محیط به دلیل وجود اثرات متقابل بین ژنوتیپ و محیط را نام برد (Mohammadi et al. 2020). مهم‌ترین مزیت نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA عدم تاثیرپذیری از محیط، قابلیت توارث و تکرار پذیری آن‌ها است (Ghasemi et al. 2010). نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد و به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت آغازگرها به وفور استفاده می‌شود (Bahador et al. 2016). در این روش از آغازگرهای مبتنی بر توالی‌های SSR که در سراسر ژنوم گیاه پراکنده‌اند استفاده می‌شود (Wang et al. 2013). ماهیت ISSR به گونه‌ای است که از مزایای ریزماهواره ها (SSR ها) و نشانگرهای تصادفی مانند AFLP و RAPD شامل چندشکلی زیاد و تکرارپذیری بالا بهره می‌برد (Mohammadabadi et al. 2021). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است (Zamani et al. 2015). اما نسبت به RAPD تکرار پذیری و تنوع پذیری بالاتری داشته، سریع بوده و روشی آسان است (Mohammadabadi and Askari 2012). این نشانگرها به DNA الگوی کمی نیاز دارند (Askari et al. 2011). همچنین تکرارپذیری نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) را به دلیل طویل بودن آغازگرهای‌شان دارند (Askari et al. 2010). در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهواره‌ها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Zamani et al. 2011) و از طرفی نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi et al. 2017). این تکنیک به‌صورت گسترده در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند،

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع‌ژنتیکی (Askari et al. 2010; Ghasemi et al. 2010; Askari et al. 2011; Zamani et al. 2011; Mohammadabadi and Askari 2012; Zamani et al. 2015; Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021) توسط پژوهشگران مورد استفاده واقع گردیده است. البته مطالعات مختلفی در بررسی تنوع‌ژنتیکی گیاه هندوانه با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای تنوع‌ژنتیکی توده‌های بومی هندوانه زیمباوه با ده پرایمر RAPD و نه پرایمر SSR مشخص شد که نشانگرهای RAPD بهتر از SSRقادر به تفکیک توده‌ها است (Mujaju et al. 2010). در تحقیق دیگری از مجموع ۳۰۳ توده جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی ترکیه، ۵۶ توده انتخاب و با ۳۵ آغازگر RAPD در مجموع ۲۲ آغازگر تولید باند کردند. تجزیه و تحلیل داده‌ها متوسط ضریب تنوع‌ژنتیکی ۰/۹۴ را نشان داد که تنوع‌ژنتیکی کم هندوانه‌های ترکیه را نشان می‌دهد (Solmaz et al. 2010). هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی نشانگر مولکولی ISSR در تمایز توده‌های هندوانه موردمطالعه، تعیین میزان‌تشابه و فاصله‌ژنتیکی توده‌ها به منظور استفاده از پدیده هتروزیس و انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

اجرای پژوهش در سال ۱۴۰۱ در گلخانه تحقیقاتی، آزمایشگاه زراعت و گیاهان دارویی، آزمایشگاه مرکزی و آزمایشگاه ژنومیکس در دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان (دانشگاه تهران) واقع در شهرستان پاکدشت (ایران) با طول جغرافیایی ۵۱ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه شمالی و ارتفاع ۱۰۱۳ متری از سطح دریا و در فاصله ۳۶ کیلومتری جنوب شرقی تهران انجام گرفت. در این تحقیق ارزیابی تنوع‌ژنتیکی 24 جمعیت هندوانه بومی ایران که از سراسر کشور جمع آوری شد (جدول ۱). ارزیابی تنوع مولکولی با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR انجام گرفت (جدول ۲). به منظور استخراج DNA پس از کشت بذور جمعیت‌ها در گلخانه و یک‌ماه پس از کشت از برگ‌های جوان نمونه‌برداری صورت گرفت. ابتدا ۰/۱ تا ۰/۱۵ گرم برگ فریز شده توسط ازت مایع کوبیده شده و به تیوب‌های ۲ سی‌سی منتقل شدند. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول بافر CTAB که قبلاً به مدت ۱۰ دقیقه در بنماری با دمای ۶۵ درجه گرم شده بود، به همراه ۵ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول را به داخل تیوب حاوی بافت کوبیده شده اضافه کرده و سپس تیوب‌ها به مدت ۴۵– ۳۰ دقیقه در بنماری با دمای ۶۵ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد و در همین حال هر ۱۰ دقیقه تیوب‌ها را از داخل بنماری خارج کرده و به مدت ۱ دقیقه آنها را به آرامی تکان داده و دوباره به بنماری منتقل شدند. تیوب‌ها را از بن ماری خارج کرده و زیر هود ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ۲۴ – ایزوآمیل[1] ۱، به هر تیوب اضافه کرده و به آرامی برگردانده شد (تقریبا ۳۰ دقیقه) که یک رنگ سبز تیره حاصل شد. تیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۳ هزار در دقیقه، در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند.

[1] CIA (Chloroform: Isoamyl Alcohol ; 24:1)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۱. مشخصات و محل جمع‌آوری جمعیت‌های هندوانه مورد مطالعه

Table 1. Characteristics and collection location of the studied watermelon populations

Population جمعیت	Height ارتفاع	Latitude عرض جغرافیایی	Longitude طول جغرافیایی
رودبارجنوب South Rudbar	487	27.8872°	58.5544°
منوجان Manujan	342	27.3992°	57.4968°
بم Bam	1060	29.0963°	58.3561°
شهداد Shahdad	430	30.4169°	57.7065°
جوین Jovin	1100	36.5561°	57.3723°
مشهد Mashhad	1050	36.2972°	59.6067°
تربت‌جام Turbat Jam	928	35.2431°	60.6248°
سبزوار Sabzevar	975	36.2152°	57.6678°
گناباد Gonabad	1100	34.3530°	58.6838°
چابهار Chabahar	7	25.2927°	60.6496°
زاهدان Zahedan	1380	29.4519°	60.8842°
شیراز Shiraz	1490	29.5926°	52.5836°
نیک‌شهر Nikshahr	510	26.2351°	60.2284°
زابل Zabol	480	31.0302°	61.4901°
ایرانشهر Iranshahr	590	27.2030°	60.6853°
جیرفت Jiroft	720	28.6792°	57.7445°
فاریاب Faryab	915	28.0977°	57.2320°
بندرعباس Bandar Abas	12	27.1963°	56.2884°
رودان Rudan	180	27.4416°	57.1909°
میناب Minab	15	27.1372°	57.0675°
بشاگرد Bashagard	740	26.4479°	58.1893°
حاجی‌آباد Haji Abad	940	28.3097°	55.9052°
جهرم Jahrum	1050	28.5177°	53.5744°
اقلید Eghlid	2200	30.8932°	52.6893°

سپس مایع رویی هرتیوب برداشته و به تیوب‌های جدید منتقل شد. ۹۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به مایع رویی اضافه و سپس تیوب‌ها چند بار به آرامی برگردانده و در دمای ۲۰- به مدت ۲۵ دقیقه نگهداری شدند. تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی دور ریخته شد. ۹۰۰ میکرولیتر مخلوط استات آمونیوم ۲/۵ مولار به هر تیوب اضافه گردید و پس از اینکه تیوب‌ها چند بار به آرامی و با دقت هم زده شدند، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- نگهداری شدند. در این مرحله تیوب‌ها با سرعت ۱۳ هزار دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

تیوب‌ها دور ریخته شد و سپس ۷۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به هر تیوب اضافه شد و بعد از چند بار هم زدن، با سرعت ۷ هزار دور در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و سپس تیوب‌ها به مدت ۲ الی ۴ ساعت روی کاغذ صافی به صورت وارونه قرار داده شد، پس از خشک شده کامل، ۵۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و یاTE[۲] اضافه شد پس از اینکه تیوب‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شدند، DNA به طور کامل حل شده و تیوب‌ها به دمای ۲۰- انتقال داده شدند. به منظور بررسی کیفیت DNA بافر TAE[۳] تهیه و در داخل تانک دستگاه الکتروفورز ریخته شد. مقدار نیم گرم پودر آگارز را در ۴۹ میلی‌لیتر آب مقطر، به همراه ۱ میلی‌لیتر TAE، در یک بالن حجمی ریخته و در داخل دستگاه ماکروویو قرار داده شد (در سه بازه زمانی ۳۰ ثانیه‌ای).

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع‌ژنتیکی جمعیت‌های هندوانه مورد مطالعه

Table 2. The primers used in studying the genetic diversity of the studied watermelon populations

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	دمای اتصال Tm (°C)	منبع Source
ISSR1	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYC-3'	51	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR2	5'-CTCTCT CTCTCTCTCTG-3'	43	(Meimberg et al. 2006)
ISSR3	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'	48	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR4	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	53	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR5	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	46	(Rostami-Ahmadvandi et al. 2013)
ISSR6	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTYC-3'	50	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR7	5'-CACACACACACACACARG- 3'	44	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR8	5'-GACACGACACGACAC-3'	39	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR9	5'-ACACACACACACACACG-3'	46	(Meimberg et al. 2006)
ISSR10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	52	(Rodrigues et al. 2013)

پس از هر ۳۰ ثانیه بالن به منظور حل شدن پودر آگارز تکان داده شد، در مرحله بعد اطراف سینی داخل تانک به منظور بستن ژل چسپ زده شد و پس از خنک شدن محلول ژل، به داخل سینی تانک به منظور آماده‌سازی ژل انتقال داده شد. پس از آماده

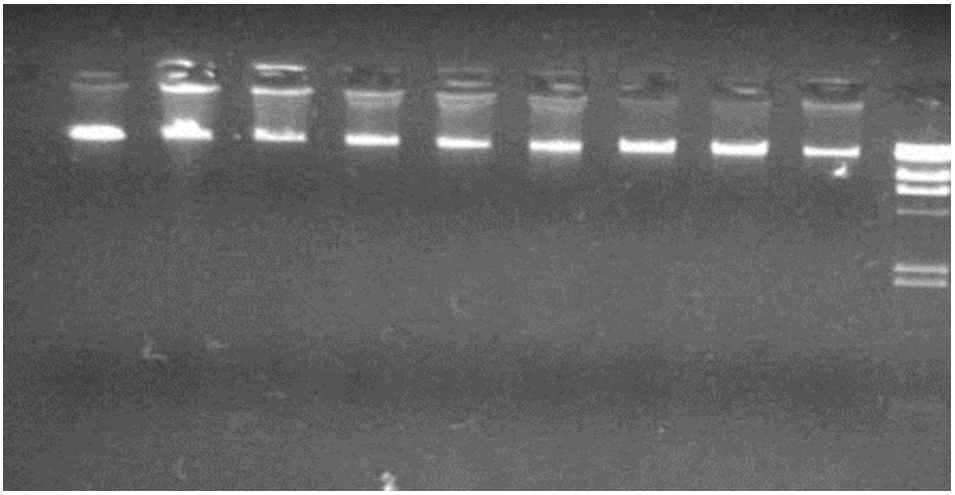
[۲] Tris-EDTA

[۳] Tris-acetate-EDTA

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

شدن و به اصطلاح بستن ژل، چسب‌های اطراف سینی ژل را جدا کرده و در داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد، در مرحله بعد محلول رنگ آمیزی DNA بر روی یک سطح تمیز، مانند یک نوار چسپ، بسته به تعداد نمونه‌ها تقسیم و در هر نقطه، یک ماکرولیتر قرار داده شد. نمونه‌های مربوطه از فریزر خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در بنماری قرار داده شدند. پس از باز شدن یخ نمونه‌های منجمد از هر نمونه DNA به میزان یک ماکرولیتر برداشته و با DYE (رنگ) مخلوط شد. با کمک سمپلر، مخلوط برداشته و در داخل چاهک ریخته شد. اینکار با نهایت دقت به منظور عدم اتلاف DNA صورت گرفت. پس از بارگزاری کلیه نمونه‌ها در داخل چاهک ها، تانک از طریق سیم جریان برق به الکتروفورز متصل، و با ولتاژ ۷۰ و به مدت یک ساعت شروع به کار کرد. پس از یک ساعت، جریان برق قطع شده و نمونه ژل به داخل محلول اتیدیوم بروماید، به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شد. در پایان ژل با دستگاه ژل‌داک که بر اساس تابش نور UV کار می‌کند منتقل شد، پس از روشن کردن دستگاه و مشاهده ژل و باندهای DNA یا RNA، از آن عکس‌برداری انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱. باندهای حاصل از بررسی کیفیت DNA استخراج شده از جمعیت‌های هندوانه مورد مطالعه

Figure 1. The bands obtained from the DNA quality check extracted from the studied watermelon populations

به منظور انجام PCR، حجم واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر، که حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی و ۳ میکرولیتر آغازگر بود، تیوب ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و با توجه به دمای اتصال و پروتکل مربوط به هر پرایمر شرایط PCR به دستگاه تعریف شد. به طور کلی چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ – ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام شد. در پایان جهت بسط نهایی کلیه رشته‌ها یک مرحله ۷ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد را طی کردند. پس از انجام PCR نمونه‌ها در ژل آگارز ۲/ ۱ درصد با

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

ولتاژ ۷۰ و به مدت ۲ الی ۲,۳۰ ساعت الکتروفورز شدند و پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۵ الی ۲۵ دقیقه در محلول رقیق اتیدیوم‌بروماید غوطه‌ور شده و پس از آن توسط دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از امتیازدهی نوارهای تکثیر شده، معیارهای کارایی آغازگر شامل تعدادکل نوارها، درصد چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص‌نشانگری، نسبت چندشکلی موثر و قدرت تفکیک با استفاده از نرم‌افزار Powermarker3.25 و برنامه آنلاین محاسبه‌گر کارایی نشانگر (Marker Efficiency Calculator: iMEC) محاسبه شدند. به منظور انجام تجزیه‌خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYSpc2.02 و به منظور تجزیه واریانس‌مولکولی و تجزیه به مختصات‌اصلی نیز از نرم‌افزار GenAlEx6.41 استفاده شد.

نتایج و بحث

آغازگرهای موردمطالعه در مجموع ۲۰۲ باند تولید کردند که از این تعداد ۱۸۴ باند چندشکل بود (جدول ۳). میانگین تعداد کل باند و باندهای چندشکل در این مطالعه نیز به ترتیب ۲۰/۲ و ۱۸/۴ به‌دست آمد. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR6 با ۱۰۰ درصد و کمترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR5 با ۸۰ درصد بود. میانگین درصد چندشکلی در این مطالعه نیز ۰/۹۰ به‌دست آمد. مقدار شاخص PIC در این تحقیق بین ۰/۲۶ تا ۰/۴۴ متغییر و میانگین PIC نیز ۰/۳۵ بود. محتوای‌اطلاعات‌چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت‌تمایز آن‌ها به شمار می‌آید. مقادیر بالای این شاخص بیانگر چندشکلی زیاد در یک جایگاه‌نشانگری است که در تمایز جمعیت‌ها نقش مهمی دارد. بنابراین نشانگرهایی با محتوای‌اطلاعات‌چندشکلی بالا برای تمایز جمعیت‌هایی با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Singh et al. 2014). در این مطالعه آغازگر ISSR3 با PIC برابر با ۰/۴۴ بیشترین مقدار را از نظر این شاخص نسبت به سایر آغازگرها داشت و قابل استفاده برای سایر محققین جهت تمایز ژنوتیپ‌های مختلف هندوانه است. شاخص دیگر برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت‌تفکیک (RP) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آلل‌ها تاثیر می‌پذیرد (Nazem et al. 2019). در این تحقیق میزان این شاخص که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد در آغازگر ISSR6 دارای بیشترین مقدار بود که نشان می‌دهد این آغازگر نسبت به سایر آغازگرهای مورد مطالعه، قدرت تفکیک بیشتری دارد. شاخص‌نشانگر (MI) نیز از تعداد مکان‌های ژنی چندشکل حاصل از آغازگرها استفاده می‌کند و زیاد بودن میزان آن نشان‌دهنده تعداد بیشتر نوار چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است (Song et al. 2010). در این مطالعه میزان شاخص MI بین ۳/۹ تا ۹/۲۴ متغیر و میانگین آن ۶/۷۲ به‌دست آمد. میانگین شاخص های نسبت چندگانه موثر و قدرت تفکیک نیز در این مطالعه به ترتیب ۱۷/۰۳ و ۲۰/۶۳ به‌دست آمد. در مطالعه‌ای از نشانگر AFLP به منظور بررسی ۳۰ ژنوتیپ هندوانه استفاده شد و میزان چندشکلی بین ۱۳ تا ۳۹ درصد متغیر بود (Che et al. 2012). در پژوهش دیگری از نشانگر ISSR به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

هندوانه استفاده شد و نتایج نشان داد که نشانگر مذکور کارایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی هندوانه دارد (Levi et al. 2004). در مجموع می‌توان بیان داشت که نتایج این تحقیق با گزارش‌های محققان گذشته مبنی بر کارایی نشانگر ISSR در تمایز و نمایان‌سازی تنوع‌ژنتیکی جمعیت‌های مختلف هندوانه مطابقت داشت (Mujaju et al. 2010).

جدول ۳. شاخص‌های تنوع‌مولکولی اندازه‌گیری شده در آغازگرهای ISSR مورد مطالعه

Table 3. Molecular diversity indices measured in the studied ISSR primers

نام آغازگر Primer name	تعداد کل باندها The total number of bands	تعداد باندهای چندشکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphic percentage	محتوای پلی‌مورفیسم نسبی PIC	شاخص‌نشانگری Marker index (MI)	نسبت چندگانه موثر (EMR)	قدرت تفکیک (RP)
ISSR1	23	20	0.86	0.42	8.4	17.2	21.4
ISSR2	20	19	0.95	0.41	7.79	18.05	19.2
ISSR3	24	21	0.87	0.44	9.24	18.27	23.5
ISSR4	19	16	0.84	0.32	5.12	13.44	18.5
ISSR5	21	17	0.80	0.30	5.1	13.6	18.7
ISSR6	22	22	100	0.43	9.46	22	25.2
ISSR7	17	15	0.88	0.26	3.9	15.84	17.9
ISSR8	18	17	0.94	0.29	4.93	15.98	18.9
ISSR9	22	21	0.95	0.42	8.82	19.95	24.7
ISSR10	16	16	100	0.28	4.48	16	18.3
میانگین Average	**20.2**	**18.4**	**0.90**	**0.35**	**6.72**	**17.03**	**20.63**

میزان تعداد آل مشاهده شده، تعداد آلل‌موثر، نسبت تعداد آلل‌موثر به تعداد آلل مشاهد شده، شاخص نی و شاخص شانون نیز در این تحقیق محاسبه شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده میانگین تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل‌موثر در این تحقیق به ترتیب ۱۵/۵ و ۱۳/۱ بود. در این تحقیق نشانگر ISSR9 با بیشترین نسبت تعداد آلل‌های‌موثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده برابر با ۰/۹۰ یکنواخت ترین نشانگر شناخته شد. در این مطالعه کمترین و بیشترین شاخص نی مربوط به نشانگرهای ISSR10 با ۰/۲۲ و ISSR3با ۰/۴۹ به‌دست آمد. میانگین شاخص شانون برای آغازگرهای مورد مطالعه نیز ۰/۵۶ به‌دست آمد (جدول ۴). با توجه به

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نتایج به‌دست آمده، آغازگر ISSR3 بیشترین مقادیر شاخص‌های شانون و نی را داشت، بنابراین در بین آغازگرهای مورد مطالعه این آغازگر بیشترین سهم را در بین در تمایز ژنوتیپ‌ها از یکدیگر داشته است.

جدول ٤. ارزیابی جمعیت‌های مورد مطالعه هندوانه بر اساس شاخص‌های تنوع

Table 4. Evaluation of studied populations of watermelon based on diversity indices

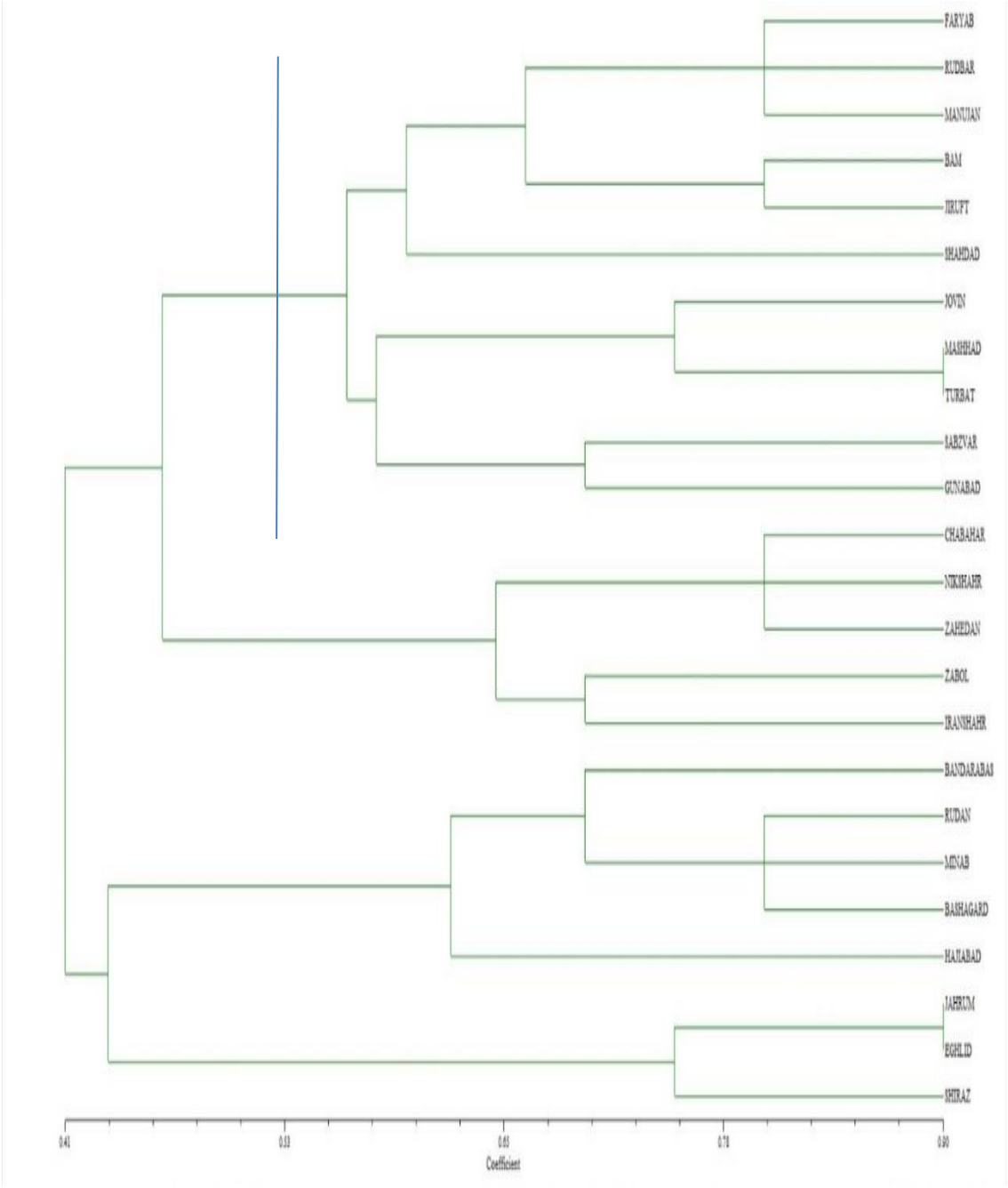
شاخص شانون Shannon index	شاخص نی Nei index	Ne/Na	تعداد آلل موثر Number of effective allele	تعداد آلل مشاهده شده Number of observed allele	آغازگر Primer
0.62	0.43	0.89	15.2	17	**ISSR1**
0.65	0.46	0.88	16.8	19	**ISSR2**
0.68	0.49	0.86	18.1	21	**ISSR3**
0.52	0.27	0.69	9.7	14	**ISSR4**
0.66	0.44	0.86	16.5	19	**ISSR5**
0.57	0.42	0.81	12.2	15	**ISSR6**
0.48	0.39	0.85	11.1	13	**ISSR7**
0.46	0.33	0.80	9.6	12	**ISSR8**
0.59	0.40	0.90	14.5	16	**ISSR9**
0.41	0.22	0.81	7.3	9	**ISSR10**
0.56	**0.38**	**0.83**	**13.1**	**15.5**	**میانگین Average**

پس از انجام آزمون‌های مانتل و کوفنتیک، تجزیه‌خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب‌تشابه JACARD و روش کلاستربندی UPGMA انجام و دندروگرام آن رسم گردید. پس از تجزیه‌خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت های مربوط به محیط جغرافیایی مشابه و استان های مشابه در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲). جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس تجزیه‌خوشه‌ای در سطح‌تشابه ۵۵ درصد به پنج گروه تقسیم شدند. جمعیت‌های فاریاب، رودبارجنوب، منوجان، بم، جیرفت و شهداد که همگی متعلق به استان کرمان بودند در گروه اول، جمعیت‌های مربوط به استان خراسان رضوی شامل جوین، مشهد، تربت جام، سبزوار و گناباد در گروه دوم قرار گرفتند. گروه سوم مربوط جمعیت‌های استان سیستان و بلوچستان شامل جمعیت‌های چابهار، نیکشهر، زاهدان، زابل و ایرانشهر بود. جمعیت‌های رودان، میناب، بشاگرد و حاجی آباد که متعلق به استان هرمزگان بودند نیز در گروه چهارم قرار گرفتند. در گروه پنجم جمعیت‌های متعلق به استان فارس شامل جهرم، اقلید و شیراز قرار گرفت. بیشترین تشابه‌ژنتیکی بین جمعیت‌های مشهد و تربت با ۹۰ درصد تشابه و کمترین تشابه‌ژنتیکی بین جمعیت میناب از استان هرمزگان با جمعیت فاریاب از استان کرمان با ۱۰درصد تشابه بود. اگرچه نوع گرده‌افشانی نقش مهمی در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

گیاهی دارد، شرایط درونی و بیرونی گوناگون دیگری نیز مانند دوره رویشی، شرایط اقلیمی و تنش‌های محیطی مانند تنش‌های غیرزیستی، خاک و اقلیم می‌توانند روی ساختار، تنوع و شباهت‌ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی اثر بگذارند (Moshrefi et al. 2019). انتخاب طبیعی سبب می‌شود جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اقلیمی مشابه رشد می‌کنند در مقایسه با جمعیت‌هایی که در شرایط متفاوت رشد می‌کنند، شباهت‌ژنتیکی بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (Selseleh et al. 2019).



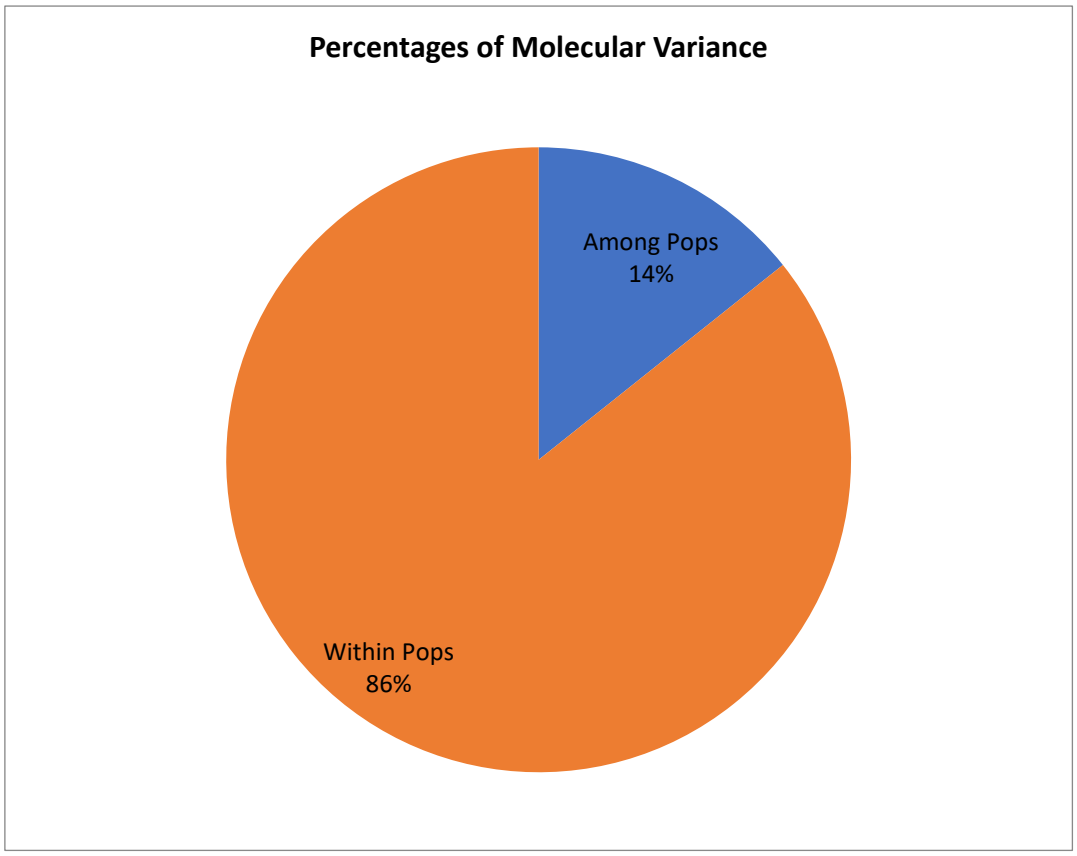
شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه‌خوشه‌ای جمعیت‌های هندوانه موردمطالعه با استفاده از روش UPGMA

Figure 2. Denogram obtained from the cluster analysis of studied watermelon populations using the UPGMA method

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بنابراین قرار گرفتن ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مربوط به هر استان در گروه‌های مشابه، با توجه به شرایط اقلیمی یکسان ژنوتیپ‌هایی که در یک استان قرار دارند، منطقی به نظر می‌رسد. در مجموع می‌توان گفت تنوع بالا و قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت. در مطالعه‌ای توسط Ipek Uluturk et al. (2011) تنوع ژنتیکی و ارتباط ۹۰ جمعیت هندوانه با استفاده از ۳۰ نشانگر SRAP مورد بررسی قرار گرفت.۵۰ جمعیت از ترکیه و مابقی از سایر نقاط جهان به‌وسیله دپارتمان کشاورزی آمریکا جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل شدند. در تحقیق یاد شده تجزیه خوشه‌ای داده‌ها به روش UPGMA نمونه ها را در ۵ دسته مجزا قرار داد بطوریکه خوشه‌بندی جمعیت ها با پراکنش جغرافیایی جمعیت ها مطابقت داشت. نتایج این مطالعه با تحقیق Ipek Uluturk et al. (2011) مطابقت داشت. تجزیه واریانس‌مولکولی و تجزیه به مختصات‌اصلی در جمعیت‌های مورد مطالعه انجام شد و نتایج نشان داد که ۱۴ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌های موردمطالعه و ۸۶ درصد از تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد (شکل ۳). نتایج تجزیه به مختصات‌اصلی نیز نتایج حاصل از تجزیه‌خوشه‌ای را تایید کرد (شکل ۴).

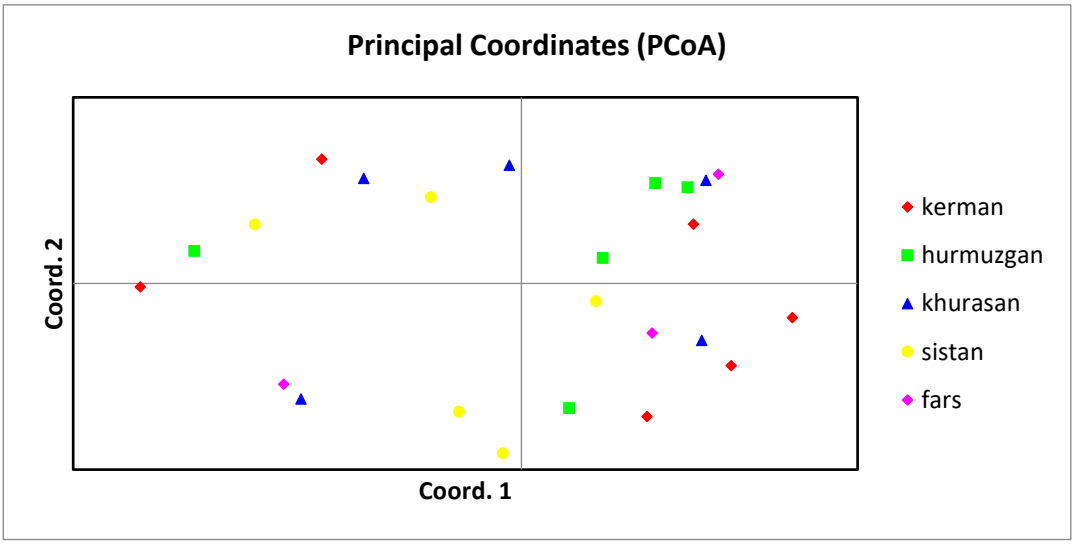


شکل ۳. تجزیه واریانس‌مولکولی در جمعیت‌های هندوانه مورد مطالعه

Figure 3. Analysis of molecular variance in the studied watermelon populations

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ٤. تجزیه به مختصات‌اصلی در جمعیت‌های هندوانه موردمطالعه

Figure 4. Decomposition into principal coordinates in the studied watermelon populations

نتیجه‌گیری: توجه به نتایج به‌دست آمده نشانگر مولکولی ISSR کارایی لازم جهت تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه را دارد و از طرفی با توجه به تنوع‌ژنتیکی قابل ملاحظه بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه از ژنوتیپ‌های استفاده از شده در این تحقیق می‌توان به عنوان جمعیت اولیه در برنامه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه استفاده کرد و همچنین از جمعیت‌های فاریاب و میناب با توجه به اینکه بیشترین فاصله‌ژنتیکی را داشتند به منظور استفاده از هتروزیس در پروژه‌های تولید بذر هیبرید هندوانه به عنوان والدین تلاقی می‌توان استفاده کرد.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از داوران محترم مجله بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگذاری نمایند.

منابع

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

References

Amani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Bio 10, 1812–1817.

Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 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, MR Mohammadabadi, A Khezri, et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7 (13), 186-192 (In Persian).

Bekheet SA, Taha HS, Hanafy MS, Solliman ME (2008) Morphogenesis of sexual embryos of date palm cultured in vitro and early identification of sex type. J Appl Sci Res 4, 345-352.

Che K, Liang C, Wang Y, et al. (2012) Genetic assessment of watermelon germplasm using the AFLP technique. Hort Sci 137, 311-315.

Dane F , Liu J (2007) Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). Genet Resour Crop Evol 54(6), 1255-1265.

FAO. 2021. FAOSTAT. Available http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E

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

Ipek Uluturk Z, Frary A, Doganlar S (2011) Determination of genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*). Jour Crop Sci 5, 1832-1836.

Laurentin H (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genet Resour Crop Evol 56(2), 277-292.

Levi A, Thomas CE, Newman M, et al. (2004) ISSR and AFLP markers differ among American watermelon cultiva rs with limited genetic diversity. J Am Soc Hortic Sci 129(4), 553-558.

Levi A, Wechter P, Davis A (2009) EST-PCR markers representing watermelon fruit genes are polymorphic among watermelon heirloom cultivars sharing a narrow genetic base. Plant Gen Res Char Utl 7(1), 16-32.

Maggs K, Christiansen JL (2003) Variability in namibian landraces of watermelon (*Citrullus lanatus*). Euphytica 132(3), 251-258.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Meimberg H, Abele T, Bräuchler C, et al. (2006) Molecular evidence for adaptive radiation of Micromeria Benth.(*Lamiaceae*) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. Mol Phylogenet Evol 41, 566-578.

Mohammadabadi M, Askari N (2012) Characterization of Genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany 120pp.

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.

Mohammadabadi MR, Oleshko V, Oleshko O, et al. (2021) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Guppy fish. Turk J Fish Aquatic Sci 21, 603-613.

Mohammadi R, Panahi B, Amiri S (2020) ISSR based study of fine fescue (*Festuca ovina L.*) highlighted the genetic diversity of Iranian accessions. Cytol Genet 54, 257-263.

Moshrefi-Araghi A, Nemati H, Azizi M, et al. (2019) Assessment of phytochemical and agromorphological variability among different wild accessions of Mentha longifolia L. cultivated in field condition. Ind Crops Prod 140, 111698.

Mujaju C, Sehic J, Werlemark G, et al. (2010) Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. Hereditas 147(4), 142-153.

Nazem V, Sabzalian MR, Saeidi G, et al. (2019) Essential oil yield and composition and secondary metabolites in self-and open-pollinated populations of mint (*Mentha spp.*). Ind Crops Prod 130, 332-340.

Rodrigues L, van den Berg C, Póvoa O, et al. (2013) Low genetic diversity and significant structuring in the endangered Mentha cervina populations and its implications for conservation. Biochem Syst Ecol 50, 51-61.

Romão RL (2000) Northeast Brazil: A secondary center of diversity for watermelon (*Citrullus lanatus*). Genet Resour Crop Evol 47(2), 207-213.

Rostami-Ahmadvandi H, Cheghamirza K, Kahrizi D, et al. (2013) Comparison of morphoagronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among (*Cuminum cyminum L*). accessions. Aust J Crop Sci 7, 361.

Selseleh M, Hadian J, Ebrahimi SN, et al. (2019) Metabolic diversity and genetic association between wild populations of Verbascum songaricum (*Scrophulariaceae*). Ind Crops Prod 137, 112-125.

Singh AK, Rana MK, Singh S, et al. (2014) CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. J Plant Biochem Biot 23, 175–183.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Solmaz I, Sari N, Aka Y, Mendi N (2010) The genetic characterization of Turkish watermelon (*Citrullus lanatus*) accessions using RAPD markers. Genet Res Crop Evol 57(5), 763-771.

Song Z, Li X, Wang H, Wang J (2010) Genetic diversity and population structure of Salvia miltiorrhiza Bge in China revealed by ISSR and SRAP. Genet 18(4), 241–249.

Szamosi C, Solmaz I, Sari N, Barsony C (2009) Morphogical characterization of Hungarian and Turkish watermelon (*Citrullus lanatus*) Matsum. et Nakai) genetic resources. Genet Res Crop Evol 56, 1091-1105.

Wang Z, Liao L, Yuan X, et al. (2013) Genetic diversity analysis of Cynodon dactylon (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. Bioc syst ecol 46, 10 8115.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumin Res 132, 123–127.

Archive of SID.ir