



## The evaluation of genetic diversity among five *Phalaenopsis* species using IRAP and RAPD molecular markers

Khosro Balilashaki<sup>1</sup> , Hedayat Zakizadeh<sup>2</sup> , Jamal-Ali Olfati<sup>3</sup> ,  
Aboozar Soorni<sup>4</sup> 

1. Department of Horticultural Sciences Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [khosrobali@alumni.ut.ac.ir](mailto:khosrobali@alumni.ut.ac.ir)

2. Corresponding Author, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [Zakizadeh@guilan.ac.ir](mailto:Zakizadeh@guilan.ac.ir)

3. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [jamalaliolfati@gmail.com](mailto:jamalaliolfati@gmail.com)

4. Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: [soorni@iut.ac.ir](mailto:soorni@iut.ac.ir)

Article Info	ABSTRACT
<b>Article type:</b> Research Article	<i>Phalaenopsis</i> is one of the most well-known genera of the orchid family and has relatively good growth due to its high adaptability. The <i>Phalaenopsis</i> breeding program and full investigation of progenies takes three to five years, which can be reduced by using molecular markers. In this research, in order to decrease the process of selecting superior genotypes, progenies obtained from crosses between 5 different cultivars were examined using IRAP and RAPD markers. Among 299 bands produced in RAPD, 86% of the bands were polymorphic. The average number of polymorphic bands was 13.5 bands per primer and the minimum genetic similarity (43%) was obtained between 'Sevilla'×'Sevilla' and 'Manila'×'Bombay' hybrids, while the maximum similarity (72%) was found between 'Sevilla'× 'Okayama' and 'Okayama'×'Sevilla' hybrids based on Nei similarity coefficient. From 6 selected IRAP primer combinations, 83 bands were produced, among them 72 bands were considered polymorphic bands. The highest ratio of polymorphism was obtained by 3'LTR-LTR6150, 3'LTR-3'LTR primers combination and the lowest by Sukkula -3'LTR. The maximum genetic similarity, 82%, using IRAP marker was observed between 'Sevilla'×'Okayama' and 'Sevilla'×'Manila' hybrids and the lowest amount, 32%, was obtained between 'Sevilla'×'Sevilla' and 'Manila'×'Bombay' hybrids, indicating the genetic proximity and distance, respectively, of the studied genotypes. Recombined genotypes obtained in this research, which had different band patterns with their parents, can be used for breeding programs and introducing new cultivars.
<b>Article history:</b> Received: 6 June 2022 Received in revised form: 8 October 2023 Accepted: 27 November 2023 Published online: Spring 2024	
<b>Keywords:</b> <i>Molecular Markers</i> , <i>Retrotransposon</i> , <i>RAPD</i> , <i>Polymorphism</i> .	

**Cite this article:** Balilashaki, Kh., Zakizadeh, H., Olfati, J.A. & Soorni, A. (2024). The evaluation of genetic diversity among five *Phalaenopsis* species using IRAP and RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (1), 21-33. DOI: <https://doi.org/10.22059/IJHS.2023.343479.2030>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/IJHS.2023.343479.2030>

**Publisher:** The University of Tehran Press.

### Extended Abstract

#### Introduction

*Phalaenopsis* orchid is very popular in the floricultural industry due to their unique traits like morphological diversity, color variation, and medicinal properties. Over 90 native species have been categorized into five subgenera, driving diverse cultivar development with vibrant colors and fragrances. Breeding programs, primarily utilizing native species like *Phalaenopsis* spp., aim to enhance traits such as color variation, flower size, and disease resistance.

Understanding genetic diversity is key to advancing breeding strategies. Molecular markers offer advantages in evaluating genetic variation and phylogenetic relationships due to their high variability and co-dominant inheritance. Techniques like RAPD and IRAP serve as cost-effective alternatives, with RAPD's

simplicity and lack of radioactive materials being noteworthy. Studies have demonstrated significant genetic diversity among orchid populations, exemplified by research on Indonesian Sarcanthinae orchids. Retrotransposon-based markers, such as IRAP, further extend marker capabilities, utilizing retrotransposon insertion sites for genetic diversity assessment.

In this research, in order to decrease the process of selecting superior genotypes, progenies obtained from crosses between different cultivars. Current research focuses on extending markers for various orchid species and hybrids to assess polymorphism and infer phylogenetic relationships. These findings contribute to understanding orchid genetics and safeguarding breeders' intellectual property rights.

#### Materials and methods

The study utilized five *Phalaenopsis* orchid cultivars selected based on specific traits like flower longevity, resistance to fungus, and the production of the second flower stalk. Experimental crosses were conducted bidirectionally, with each flower both providing and receiving pollen grains. Capsules were counted five weeks' post-pollination and harvested 120 days later, then sterilized and cultured on a growth medium. DNA extraction from plantlets involved grinding frozen leaves and subsequent extraction using a commercial kit.

Polymerase chain reaction (PCR) with random primers was performed for genetic marker analysis, selecting appropriate primers for diversity assessment. RAPD and IRAP products were visualized on agarose gels. Statistical analysis included estimating seed germination percentage and calculating genetic similarity matrices, similarity coefficients, dendrograms, resolving power, polymorphism information content (PIC), and marker index (MI).

Polymorphic bands in genetic profiles were scored, and genetic likeness matrices were computed using Free Tree software. Dendrograms were generated using iTOL software. The resolving power of primers and PIC were estimated using specific formulas. The MI was calculated based on PIC and an effective multiplex rate, derived from the total numbers of polymorphic gene locations and uniform bands.

### Results and Discussion

**RAPD Analysis:** Of the 50 RAPD primers tested, 22 detected polymorphic bands, with fragment lengths ranging from 300 to 1500 bp. across all genotypes, a total of 299 bands were amplified, of which 257 were polymorphic (86%). The average number of polymorphic bands per primer was 13.5. Primers varied in their polymorphism percentage, with PPB ranging from 50% to 100%. The highest marker index (MI) was 6.54, attributed to the OPT-11 primer. The resolving index ranged from 21.12 to 0.508, with OPAI-13 exhibiting the highest polymorphism information content (PIC) of 0.444. The BB-20 primer showed the highest Shannon's information index (I; 0.635) and the number of effective alleles (Ne; 1.812), indicating its effectiveness in investigating genetic diversity. RAPD analysis of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* and related species demonstrated the technique's utility in discovering relationships among *Phalaenopsis* species.

**IRAP Analysis:** Using IRAP markers, 83 bands were produced, of which 72 were polymorphic (86.74%). Fragment sizes ranged from 200 to 800 bp. The average number of amplified bands per pair of primers was 14.4, with Sukkula-Sukkula, 3'LTR-3'LTR, and LTR6150-LTR6150 showing the highest polymorphic fragments. PIC values ranged from 0.62 to 0.93, with five pairs of primers exceeding 0.80. MI ranged from 5.60 to 13.10, while the Rp index ranged from 4.3 to 8.40. BARE-1 and Sukkula fragments exhibited higher polymorphism, possibly due to their abundance in the genome. The polymorphism percentage varied from 78.57% to 93.33%, with the 3'LTR-3'LTR primer showing the highest MI and Rp values. Primer 3'LTR-LTR150 displayed the highest PIC, I, and Ne indices.

### Conclusion

In conclusion, both RAPD and IRAP analyses demonstrated high levels of polymorphism, indicating their efficacy in assessing genetic diversity within *Phalaenopsis* orchid cultivars. The diverse set of primers utilized in this study revealed varying levels of informativeness, with certain primers exhibiting particularly high polymorphic potential. These findings underscore the value of molecular marker techniques in elucidating genetic relationships and informing breeding strategies within the *Phalaenopsis* genus.



## بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای پنج رقم ارکیده فالانوپسیس شاخه بریده با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و IRAP

خسرو بالی لاشکی<sup>۱</sup> | هدایت زکی زاده<sup>۲</sup> | جمالعلی الفتی<sup>۳</sup> | ابوذر سورنی<sup>۴</sup>

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [khosroballi@alumni.ut.ac.ir](mailto:khosroballi@alumni.ut.ac.ir)
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [Zakizadeh@guilan.ac.ir](mailto:Zakizadeh@guilan.ac.ir)
۳. گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [jamalaliolfati@gmail.com](mailto:jamalaliolfati@gmail.com)
۴. گروه زیست فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: [soorni@iut.ac.ir](mailto:soorni@iut.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	فالانوپسیس یکی از شناخته شده‌ترین جنس‌های تیره ارکیده است که به دلیل قابلیت سازگاری بالا با شرایط محیطی مختلف از رشد نسبتاً مناسبی نیز برخوردار است. برنامه اصلاح فالانوپسیس و بررسی کامل نتایج به طور معمول نیاز به سه تا پنج سال زمان دارد که با استفاده از نشانگرهای مولکولی این زمان را می‌توان کاهش داد. در این تحقیق، نتایج حاصل از تلاقی ۵ رقم مختلف، به منظور کوتاه کردن زمان جهت انتخاب ژنوتیپ‌های برتر با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریپید و آیرپ مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۲۹۹ نوار تولید شده در ریپید، ۸۶ درصد نوارها چند شکل بودند. میانگین تعداد نوارهای چند شکل ۱۳/۵ نوار برای هر آغازگر بود. میزان حداقل تشابه ژنتیکی با استفاده از نشانگر ریپید و ضریب تشابه نی بین هیبریدهای 'Sevilla'×'Sevilla' و '43'×'Bombay'×'Manila' درصد و حداکثر آن بین هیبریدهای 'Sevilla'×'Okayama' و 'Sevilla'×'Okayama' معادل ۷۲ درصد به دست آمد. از ۶ ترکیب آغازگر انتخابی آیرپ، در مجموع ۸۳ نوار تولید شد که از این تعداد ۷۲ نوار چند شکل بودند. بالاترین درصد چندشکلی را ترکیب آغازگرهای 'LTR-3'×'LTR6150' و 'LTR-3'×'LTR3' و پایین‌ترین را 'LTR-3'×'Sukkula' تولید کردند. میزان حداکثر تشابه ژنتیکی با استفاده از نشانگر آیرپ بین هیبریدهای 'Sevilla'×'Okayama' و 'Sevilla'×'Manila' با مقدار ۸۲ درصد و کمترین همسانی بین هیبریدهای 'Sevilla'×'Sevilla' و 'Manila'×'Bombay' در حد تشابه ۳۲ درصد مشاهده شد که به ترتیب حاکی از میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد. با استفاده از نتایج این پژوهش، ژنوتیپ‌های نوترکیب با الگوی بانندی متفاوت از والدین می‌توانند برای برنامه‌های به‌نژادی جهت تولید و معرفی ارقام جدید استفاده شوند.
مقاله پژوهشی	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۶	
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳	
کلیدواژه‌ها:	
چندشکلی، رتروترانسپوزون، مارکرهای مولکولی، ریپید.	

استناد: بالی لاشکی، خسرو؛ زکی زاده، هدایت؛ الفتی، جمالعلی و سورنی، ابوذر (۱۴۰۳). بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای پنج رقم ارکیده فالانوپسیس شاخه بریده با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و IRAP. نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۵ (۱)، ۲۳-۲۱. DOI: <https://doi.org/10.22059/IJHS.2023.343479.2030>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/IJHS.2023.343479.2030>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

در طبیعت، ارکیده فالانوپسیس به دو روش جنسی (بذر) و غیرجنسی (تولید گیاهچه حاصل از رشد جوانه‌های موجود روی دمگل) افزایش می‌یابد (Chugh *et al.*, 2009). ارکیده‌ها تعداد زیادی بذر تولید می‌کنند که بسیار ریز و فاقد مواد ذخیره‌ای و جنین کامل هستند و این خصوصیت مشکل عمده در تکثیر بذری گیاهان این تیره می‌باشد. محققین بیان کرده‌اند که بذور ارکیده در طبیعت برای جوانه‌زنی نیازمند همزیستی با انواع خاصی از قارچ‌های مایکوریزا هستند (Liu *et al.*, 2010). علاوه بر این، تحقیقات بسیاری در مورد جوانه‌زنی بذر گونه‌های مختلف ارکیده در محیط درون شیشه‌ای صورت گرفته که موجب تجاری شدن تولید برخی از آن‌ها شده است (Stewart & Kane, 2006).

یکی از روش‌هایی که برخی کشورها را به عنوان تولیدکنندگان بزرگ فالانوپسیس در جهان معرفی کرده، اصلاح و معرفی ارقام جدید است. ارقام فالانوپسیس که برای اصلاح استفاده می‌شوند به دو دسته، ارقام استاندارد با گل‌های بزرگ، شامل ارقام سفید و صورتی و ارقام جدید با تنوع رنگ زیاد و گاهی معطر تقسیم می‌شوند. به‌طور کلی برنامه اصلاحی فالانوپسیس بر اساس افزایش اندازه گل و ویژگی‌هایی مثل ارتفاع شاخه گل، حالت برگ، سهولت پرورش و مقاومت به آفات و بیماری‌ها می‌باشد که این صفات مهم می‌تواند در انتخاب والدین مؤثر باشد. چرخه تولید فالانوپسیس کمی زمان‌بر است، همین امر باعث شده تا استفاده از روش‌های کلاسیک (دورگه‌گیری سنتی) با هدف تولید ارقام جدید، از زمان انتخاب گونه تا تجاری‌سازی آن به یک فرایند طولانی تبدیل شود، اما با پیشرفت تکنولوژی و استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان حجم و زمان کار اصلاحی این گیاه را کاهش داد (Wen & Hong, 2007).

محققین بیان کرده‌اند که با اطلاع از میزان تنوع منابع ژنتیکی و بهره‌برداری از آن می‌توان ارقام جدید و مطلوب‌تر برای مناطق مختلف ایجاد و توصیه نمود. ساده‌ترین راهی که پیش‌روی به‌نژادگران جهت افزایش عملکرد در واحد سطح وجود دارد، گزینش رگه‌های پرمحصول است (Kumar *et al.*, 2015). لازمه گزینش، تنوع است که در برنامه‌های به‌نژادی، امکان سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد (Omidbakhsh Fard, 2005). اولین ارزیابی‌ها در رابطه با تنوع ژنتیکی در میان افراد و گونه‌های گیاهی با استفاده از نشانگرهای چند شکلی طول قطعات حاصل از برش یا گزارش شد (Becker *et al.*, 1995). این تکنیک که مبتنی بر هیبریداسیون بوده و علاوه بر وقت‌گیر بودن، پرهزینه نیز بود، در نهایت با نشانگرهای مبتنی بر پی.سی.آر جایگزین شد.

## پیشینه پژوهش

هنگامی که اطلاعات ژنوم موجود مورد مطالعه کافی نیست، می‌توان از نشانگرهای مولکولی همچون چند شکلی قطعات دی.ان.ای حاصل از تکثیر تصادفی یا رپید و چند شکلی ادغامی خانواده‌های رتروترانسپوزونی یا رپید، به منظور بررسی ژنوم استفاده کرد (Khadiivi-Khub *et al.*, 2014). در تأیید این موضوع، رابطه فیلوژنتیک ۱۶ رقم ارکیده فالانوپسیس با استفاده از نشانگر رپید بررسی و تنوع ژنتیکی بین این ارقام گزارش شد (Tsai *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری، رابطه‌ی بین برخی توده‌های ارکیده فالانوپسیس بررسی و ارتباط آن‌ها با ارقام تجاری آن با کمک نشانگر رپید ارزیابی شد، نتایج نشان داد که این تکنیک مولکولی می‌تواند گزینه قابل قبولی برای تمایز نمونه‌ها و مشخص کردن رابطه آن‌ها با توده‌های نزدیک این گیاه باشد (Chuang, 2002). در بررسی ۱۴۹ توده از جنس فالانوپسیس با استفاده از نشانگر رپید، ۱۳۳ نوار متفاوت مشاهده شد که با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای مشتق شده از نشانگرهای مولکولی رپید، این توده‌ها در هفت گروه تقسیم‌بندی شدند (Goh *et al.*, 2005). از دیگر نشانگرهای پیشرفته برای ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌توان به سیستم مشتق از رتروترانسپوزون در مطالعات

اخیر اشاره کرد (Kalendar & Schulman, 2006). رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم‌های گیاه به وفور یافت و پراکنده می‌شوند، لذا می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی قدرتمند و پرکاربرد مورد استفاده قرار گیرند (Kilinc *et al.*, 2015). بنابراین، برای بررسی حرکت عناصر قابل انتقال در ژنوم، آیرپ یک روش انتخابی است که توالی‌های رتروترانسپوزون واقع در منطقه ژنومی را بررسی می‌کند (Kilinc *et al.*, 2015). بر همین اساس با هدف گزینش ژنوتیپ‌های برتر ارضیده، در این مطالعه برخی نتایج حاصل از تلاقی‌های ارقام مختلف با استفاده از نشانگرهای مولکولی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. این ارقام سال‌ها در کشور پرورش داده شده‌اند و دارای ویژگی‌های مناسبی مثل بازارپسندی، عمر پس از برداشت بالا، مقاومت به آفات و بیماری‌ها، قابلیت تولید گل ثانویه و تعداد گلچه زیاد در هر شاخه می‌باشند. که پس از شناسایی در گلخانه‌ها جدا شده و با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریپید و ..... مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق می‌تواند مطالعات مکان‌یابی و تجزیه ارتباطی روی ارضیده را تسهیل و تسریع نماید.

## روش‌شناسی پژوهش

### مواد گیاهی

در این تحقیق پنج رقم ارضیده فالانوپسیس ('A:Sevilla', 'B:Annapolis', 'C:Okayama', 'D:Bombay', 'E:Manila') که جزو ارقام شاخه بریده غالب و دارای بیشترین سطح زیر کشت در گلخانه‌های ایران می‌باشند انتخاب و سپس همگی به صورت دو به دو و با گرده‌افشانی دستی با یکدیگر تلاقی داده شدند (یک بار به عنوان والد مادری و بار دیگر به عنوان والد پدری). این بوته‌ها تولید شرکت آنتورا هلند بودند و از شرکت مهر گل نوشهر تهیه شدند. پس از گذشت ۱۲۰ روز از گرده‌افشانی گل‌ها، کپسول‌های بذر (پنج کپسول از هر تلاقی مورد مطالعه قرار گرفت و به غیر از یک تلاقی باقی هیبریدها تولید کپسول بذر نمودند) برداشت شده و برای ضدعفونی ابتدا به مدت ۱۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سدیم هیپوکلریت ۹۹ درصد شرکت مرک با غلظت ۵ درصد قرار داده شدند و در انتها سه بار و در بازه زمانی پنج دقیقه‌ای با آب مقطر استریل آبکشی شدند. در ادامه هر یک از کپسول‌های بذر با اسکالپل شکافته و در محیط کشت یک دوم موراشیگ و اسکوگ کشت شدند و در اتاقک کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۵۰ روز از کشت بذور، گیاهچه‌های تولیدی که دارای اندازه حدود ۸ سانتی‌متر و چهار برگ بودند جهت استخراج دی.ان.ای. به آزمایشگاه منتقل شدند. لازم به ذکر است در بین ۲۵ تلاقی انجام شده، ۲۴ تلاقی منجر به تولید کپسول و بذر شد و در تلاقی B×A هیچ کپسول بذری حاصل نشد. جهت استخراج دی.ان.ای، نمونه‌های برگ با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

### استخراج دی.ان.ای ژنومی و بررسی کمیت و کیفیت

به منظور استخراج دی.ان.ای از کیت شرکت کیاژن مطابق با پروتکل ارائه شده توسط شرکت استفاده شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت دی.ان.ای استخراج شده ابتدا از دستگاه نانودراپ استفاده شد. با توجه به این که این دستگاه از کارایی بالایی برای اندازه‌گیری دقیق مقدار دی.ان.ای در واحد میکرولیتر برخوردار نیست بعد از ارزیابی نرخ ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ برای انتخاب نمونه‌های با کیفیت بالا و دارای نرخ بالاتر از ۱/۷ برای این دو سنجش، از دستگاه کیوبیت برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌ها استفاده شد. خلوص دی.ان.ای نیز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید سنجیده شد.

### مراحل انجام آزمایش ریپد

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ۵۰ آغازگر تصادفی استفاده شد. هر مخلوط واکنش پی.سی.آر شامل ۳ میکرولیتر دی.ان.ای ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۷/۵ میکرولیتر کیت پی.سی.آر با غلظت ۲X بود که در نهایت با اضافه کردن ۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حجم مخلوط واکنش پی.سی.آر به ۱۶ میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه، تعداد ۵ چرخه با دمای ۹۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای واسرشت سازی، ۴۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای اتصال و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات بود که به منظور اتصال بهتر آغازگر به قطعات دی.ان.ای در هر چرخه ۰/۷ درجه سلسیوس دمای اتصال آغازگر کاهش می‌یافت. سپس تعداد ۳۵ چرخه با دمای ۹۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت سازی، ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بسط انجام شد.

### مراحل انجام آزمایش آیرپ

برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ۲۸ ترکیب آغازگری استفاده شد. هر مخلوط واکنش پی.سی.آر شامل ۳ میکرولیتر دی.ان.ای ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۹ میکرولیتر کیت پی.سی.آر با غلظت ۲X بود که در نهایت با اضافه کردن ۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حجم مخلوط واکنش پی.سی.آر به ۱۷ میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه، تعداد ۴۰ چرخه به صورت ۹۴ سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۴۱ تا ۵۳ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (دمای اتصال بسته به نوع آغازگر متغیر بود) و ۷۲ سلسیوس به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل بسط بود.

### الکتروفورز دی.ان.ای محصول پی.سی.آر<sup>۲</sup>

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، به منظور بررسی تکثیر شدن قطعه مورد نظر، مقدار ۸ میکرولیتر از محصول واکنش به همراه ۰/۵ میکرولیتر ماده ژل‌رد و ۲/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در چاهک‌های ژل آگارز ۱ در صد تهیه شده در بافر تی.بی.ای بارگذاری و به مدت ۱۰۰ دقیقه و شدت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه ۱ Kb Plus مربوط به شرکت فرمنتاز در چاهک اول و آخر استفاده شد. سپس در دستگاه ژل داک، تحت نور اشعه فرابنفش نوارهای تکثیر یافته دی.ان.ای مشاهده و عکس برداری شدند.

### تجزیه آماری داده‌ها

در بررسی تنوع ژنتیکی پس از انجام مراحل آزمایشگاهی، برای بررسی چندشکلی بین نمونه‌ها به حضور یک نوار خاص عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار FreeTree (Ver 0.9.1.50) و استفاده از ضریب تشابه نی و به روش نیبر.جونیینگ محاسبه گردید. دندروگرام<sup>۴</sup>

1BioRad, i Cycler, USA

2PCR

3Fermentas

4Neighbor-joining

به دست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار iTOL ترسیم شد. تنوع ژنتیکی برای همه مکان های آللی با کمک آنالیز نی محاسبه شد. قدرت تفکیک نشانگرها (Rp) با استفاده از رابطه های ۱ و ۲ محاسبه شد.

$$Rp = \sum I_b \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|) \quad \text{رابطه (۲)}$$

محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) با استفاده از جمع مربع فراوانی آللی (p) و جمع مربع فراوانی عدم وجود آلل (q) و حذف لوکوس مونومورف از طریق رابطه ۳ محاسبه شد (Khadivi-khub et al., 2014).

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n \frac{P_i^2}{n} + \sum_{i=2}^n \frac{q_i^2}{n} \right) \quad \text{رابطه (۳)}$$

شاخص نشانگری (MI) نیز با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (Powel et al., 1996).

$$MI = PIC \times EMR \quad \text{رابطه (۴)}$$

در این رابطه EMR نسبت چندگانه مؤثر است که بیانگر تعداد جایگاه های ژنی چند شکل موجود در یک ژنوتیپ است و بر حسب رابطه ۵ محاسبه می شود.

$$EMR = np \times \beta \quad \text{رابطه (۵)}$$

در این رابطه np تعداد کل جایگاه های ژنی چند شکل و  $\beta$  از رابطه ۶ به دست می آید.

$$\beta = np / (np + nnp) \quad \text{رابطه (۶)}$$

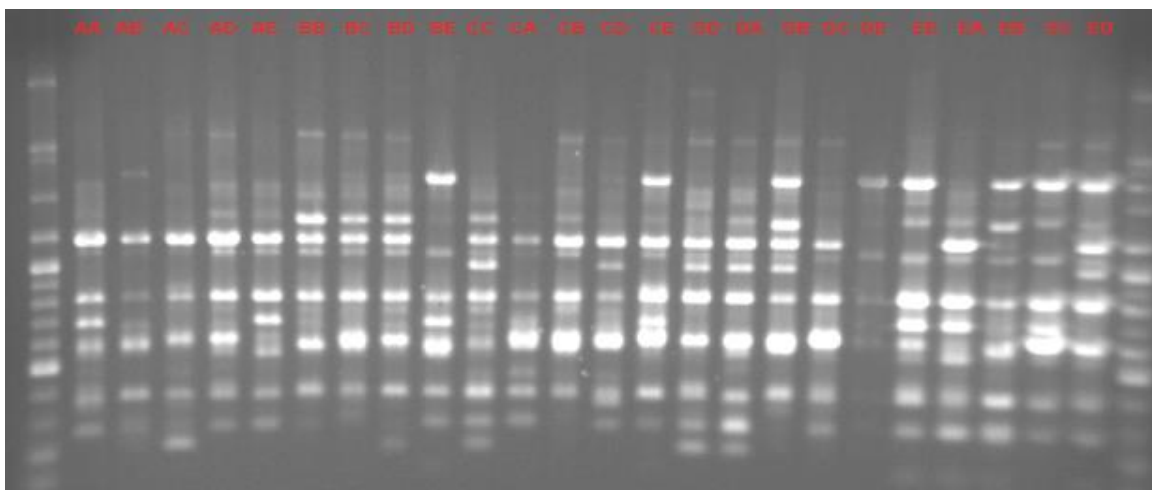
$N_p$  تعداد باندهای چند شکل و  $nnp$  تعداد باندهای یک شکل می باشد (Powel et al., 1996).

## یافته های پژوهش

### نشانگر ریید

#### آغازگرهای مورد استفاده در نشانگر ریید

در بررسی اولیه برای انتخاب آغازگر مناسب که تولید چندشکلی بیشتری نماید، ۵۰ آغازگر تصادفی ریید مورد استفاده قرار گرفت که از این تعداد ۲۲ آغازگر چندشکلی قابل توجهی در بین نمونه های مورد بررسی نشان دادند. بر اساس نتایج از کاربرد ۲۲ آغازگر انتخابی در کل ۲۹۹ نوار دی.ان.ای به دست آمد که از این تعداد ۲۵۷ نوار (به میزان ۸۶ درصد) چندشکلی نشان داده و تنها ۴۲ نوار (۱۴ درصد) یک شکل بودند. میانگین تعداد نوارهای تولید شده توسط هر آغازگر ۱۳/۵ بود. میزان بالای در صد چند شکلی به دست آمده در این پژوهش بیانگر مناسب بودن تکنیک ریید برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان نتایج حاصل از تلاقی ارقام ارکیده است (شکل ۱). تعداد نوارهای چند شکل حاصل از آغازگرهای ریید در بین جمعیت ها از ۶ تا ۲۱ نوار متغیر بود که بیانگر قدرت متفاوت آغازگرها در شناسایی چند شکلی در نمونه های مورد بررسی است. در بین آغازگرها بیشترین نوار تکثیر شده توسط آغازگر OPK-09 با ۲۲ نوار تکثیر شده ایجاد شد که ۲۱ عدد آن ها چند شکل بودند و کمترین نوار تکثیر شده مربوط به آغازگر OPT-04 با ۸ نوار تکثیر یافته بود که ۵ عدد از آن ها چند شکل بودند (جدول ۱). اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۱۵۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد.



شکل ۱. الگوی نواری قطعات حاصل از تکثیر نمونه‌های اریکیده با استفاده از آغازگر ریید. (منبع: یافته‌های تحقیق).

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ریید و توالی آن‌ها.

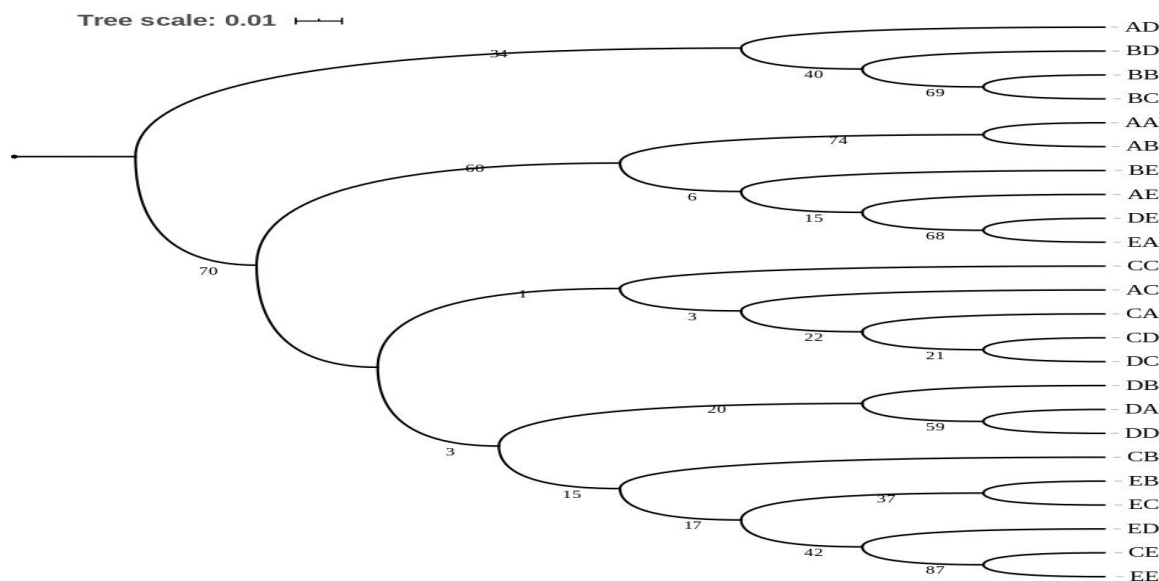
نام آغازگر	توالی	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکل	درصد باندهای چند شکل	قدرت تفکیک	PIC
OPB-09	5'TGGGGGACTC3'	۱۴	۱۰	۷۱	۱۱/۴۱	۰/۳۱۰
OPC-15	5'GACGGATCAG3'	۱۳	۱۰	۷۷	۸/۷۵	۰/۲۸۶
OPD-04	5'TCTGGTGAGG3'	۱۱	۱۰	۹۱	۸/۵۸	۰/۴۳۱
OPI-06	5'AAGGCGGCAG3'	۱۰	۸	۸۰	۸/۴۲	۰/۳۹۴
OPK-09	5'CCCTACCGAC3'	۲۲	۲۱	۹۵	۱۷/۵۳	۰/۲۹۲
OPQ-09	5'GGCTAACCGA3'	۱۸	۱۷	۹۴	۲۰/۹۳	۰/۳۳۲
OPR-13	5'GGACGACAAG3'	۹	۶	۶۷	۷/۴۱	۰/۳۱۳
OPP-20	5'GACCCTAGTC3'	۹	۸	۸۹	۸/۲۵	۰/۳۰۵
OPT-04	5'CACAGAGGGA3'	۸	۵	۶۳	۲/۸۳	۰/۳۰۷
OPT-11	5'TTCCCCGCGA3'	۱۹	۱۶	۸۴	۱۴/۷۵	۰/۴۰۹
OPW-03	5'GTCCGGAGTG3'	۱۹	۱۶	۸۴	۱۶/۱۹	۰/۳۱۵
BC-06	5'CCGTTAGTCC3'	۱۱	۱۰	۹۱	۳/۹	۰/۳۰۳
BE-08	5'CCCAAGGGAA3'	۱۷	۱۶	۹۴	۷	۰/۳۲۳
BE-15	5'GGGAAAAGCC3'	۱۳	۹	۶۹	۵/۶	۰/۳۶۹
BE-13	5'CTGGTGCTCA3'	۱۸	۱۷	۹۴	۶/۵	۰/۳۱۷
BE-20	5'CAAAGGCGTG3'	۱۰	۹	۹۰	۳/۴	۰/۳۳۱
OPAF-07	5'GGAAAGCGTC3'	۱۴	۱۲	۸۶	۶/۶	۰/۲۷۷
OPAI-13	5'ACGCTGCGAC3'	۱۲	۱۱	۹۲	۴/۲	۰/۲۹۹
BE-19	5'TGGACTCGGT3'	۸	۸	۸۹	۳/۳	۰/۴۲۳
BB-20	5'ACCAGGTCAC3'	۱۱	۹	۸۲	۴/۶	۰/۴۴۴
BB-21	5'GGCCGAACA3'	۱۴	۱۲	۸۶	۴/۵	۰/۲۸۸
BA-22	5'TGCTCGGCTC3'	۱۸	۱۷	۹۴	۷	۰/۳۱۱

(منبع: یافته‌های تحقیق)



### تشابه ژنتیکی با استفاده از نشانگر ریید

استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند در جهت شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها در میان نمونه‌های مورد بررسی بسیار مؤثر باشد. میزان حداقل تشابه ژنتیکی در این تحقیق ۴۳ درصد بین نمونه‌های 'Sevilla'×'Sevilla' (AA) و 'Manila'×'Bombay' (ED) و حداکثر آن بین نمونه‌های 'Sevilla'×'Okayama' (AC) و 'Okayama'×'Sevilla' (CA) معادل ۸۷ درصد است. دندروگرام به دست آمده از ماتریس تشابه، تنوع ژنتیکی بالای بین ژنوتیپ‌های حاصل از تلاقی و یکنواختی و شباهت بین ژنوتیپ‌های مادری (والدین) مورد بررسی را تأیید می‌کند (شکل ۲).



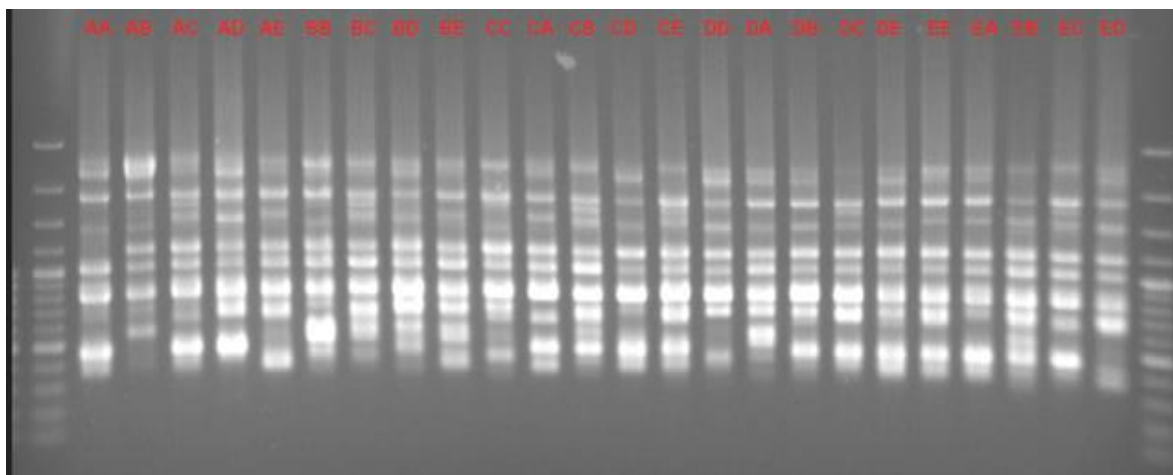
شکل ۲: دندروگرام به دست آمده از نمونه‌های ارکیده با استفاده از نشانگر ریید و ضریب تشابه نی. (منبع: یافته‌های تحقیق).

A: 'Sevilla', B: 'Annapolis', C: 'Okayama', D: 'Bombay', E: 'Manila'

### نشانگر آیرپ

#### سطح چندشکلی در نشانگر آیرپ

برای بررسی تنوع در نتایج حاصل از تلاقی‌های ارقام ارکیده ۶ آغازگر از ۲۸ ترکیب ممکن آغازگرهای LTR انتخاب شدند. این ترکیب‌های آغازگری توانستند قطعاتی بسیار مشخص در اندازه ۸۰۰-۲۰۰ جفت باز تولید کنند (شکل ۳). حاصل این ۶ ترکیب آغازگری، تولید ۷۲ نوار چند شکل از ۸۳ نوار دی.ان.ای تولید شده بود که توانست میانگینی برابر ۸۶/۷ درصد از باندهای چند شکل را به خود اختصاص دهد. ترکیب آغازگرهای 3'LTR- LTR6150 و 33'LTR-3'LTR بالاترین و Sukkula-3'LTR پایین‌ترین درصد چندشکلی را تولید کردند (جدول ۲). گزارش شده است که تعداد قطعات زیاد تولید شده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزون می‌تواند به دلیل تعداد نسخه‌های بالای این قطعات در ژنوم باشد (Kalendar et al., 1999). در این مطالعه ترکیب‌های BARE-1 با Sukkula در مقایسه با Nikita تعداد باندهای بیشتری تولید کردند که نشان‌دهنده نقش اساسی این قطعات در ساختار ژنوم یا وجود تعداد نسخه‌های متعدد آن در ژنوم است (جدول ۳).



شکل ۳. الگوی نواری حاصل از تکثیر نمونه‌های ارکیده با استفاده از آغازگر 3'-LTR-Sukkula. (منبع: یافته‌های تحقیق).

جدول ۲. نام آغازگر، توالی، نوع رتروترانسپوزون و موقعیت آن در نشانگر آیرپ.

آغازگر	توالی	رتروترانسپوزون	مکان
Sukkula	GATAGGGTCGCATCTGGGCGTGAC	Sukkula	AY054376 AY078073 ۴۳۰۱-۴۳۲۶
Nikita	CGCATTGTTCAAGCCTAAACC	Nikita	AY078074 AY078075 ۱-۲۲
LTR6149 3'LTR	CTCGCTCGCCACTACATCAACCGCGTTATT TGTTTCATGCGACGTTCAACA	BARE-1 BARE-1	Z17327 Z17327 ۱۹۹۳-۲۰۱۲ ۲۱۱۲-۲۱۳۸

(منبع: یافته‌های تحقیق)

جدول ۳. آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز IRAP و توالی آن‌ها.

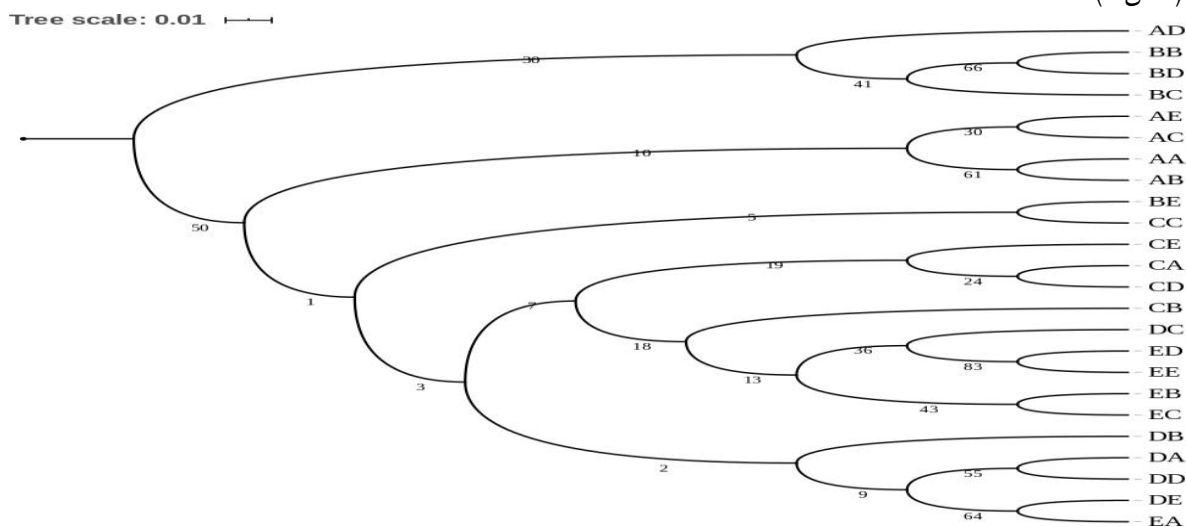
آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکل	درصد باندهای چند شکل	قدرت تفکیک	PIC	شاخص نشانگری
Sukkula- Sukkula	۱۶	۱۴	۸۷/۵	۱۳/۸۵	۰/۳۲۱	۳/۹۳
3'LTR- LTR6150	۱۰	۹	۹۰	۸/۴۱	۰/۳۸۵	۳/۱۲
3'LTR-3'LTR	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳	۱۴/۶۶	۰/۳۸۴	۵/۰۲
Sukkula -3'LTR	۱۲	۷	۵۸/۳۳	۷/۹۵	۰/۲۸۵	۲/۳۷
Sukkula- Nikita	۱۴	۱۱	۸۷/۵۷	۸/۶۶	۰/۳۲۰	۲/۷۶
LTR6150- LTR6150	۱۶	۱۴	۸۷/۵۰	۱۸/۹۳	۰/۳۲۸	۴/۰۲

(منبع: یافته‌های تحقیق).

### دندروگرام ژنوتیپ‌ها در نشانگر آیرپ

بررسی ماتریس تشابه در این مطالعه بیشترین همسانی را در نمونه‌های (AC) 'Sevilla'×'Okayama' و 'Sevilla'×'Manila' (AE) با مقدار ۸۲ درصد و کمترین همسانی در نمونه‌های (AA) 'Sevilla'×'Sevilla' و 'Manila'×'Bombay' (ED) در حد تشابه ۳۲ درصد نشان داد که به ترتیب حاکی از میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد.

دندروگرام به دست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار آیتول در سطح پایداری بالاتر از ۵۰ به چهار گروه اصلی تقسیم شد. (شکل ۴)



شکل ۴. دندروگرام به دست آمده از ۲۶ تالاقی فالانوپسیس با استفاده از نشانگر آیرپ. (منبع: یافته‌های تحقیق).

A: 'Sevilla', B: 'Annapolis', C: 'Okayama', D: 'Bombay', E: 'Manila'

## بحث

در تائید تنوع ژنتیکی مشاهده شده در مطالعه حاضر، سایر محققین نیز با کمک نشانگر ریپید بر روی ارقام فالانوپسیس، تنوع قابل قبولی را گزارش کردند (Tsai *et al.*, 2015). محققین ۴۶ گونه از فالانوپسیس را بر اساس تجزیه و تحلیل ریپید به هفت گروه اصلی تقسیم کردند (Goh *et al.*, 2005) که در بررسی حاضر نیز نمونه‌های مورد ارزیابی به خوبی از طریق تجزیه خوشه‌ای تقسیم شدند. محققین دیگری نیز تنوع ژنتیکی قابل قبولی را با کمک نشانگر ریپید در ارقام فالانوپسیس گزارش کردند (Niknejad *et al.*, 2009) که نتایج مطالعه حاضر نیز در تائید مطالعات سایر محققین بود. مزیت یک نشانگر مولکولی بستگی به محتوای چندشکلی اطلاعات و تعداد نشانگر تولید شده توسط هر آغازگر دارد (Varshney *et al.*, 2007). از طریق محاسبه میزان اطلاعات چندشکلی می‌توان ارزش دو سیستم نشانگری مختلف جهت بررسی چندشکلی ژنتیکی را با یکدیگر مقایسه نمود. در همین راستا محققین میزان بالای قطعات چندشکلی ایجاد شده در گیاه ارکیده با کمک نشانگر آیرپ ناشی از تنوع ژنتیکی بین ارقام این گیاه گزارش کردند (Spooner *et al.*, 2005). این شاخص مستقیماً به تنوع آلی در هر لوکوس وابسته است و می‌تواند در یک مجموعه از افراد مورد بررسی قرار گیرد (Kilinc *et al.*, 2011). همچنین، در بررسی تنوع ژنتیکی ارکیده توسط نشانگر آی.اف.ال.پی در جنس دندروبیوم گزارش شد که ۸۳ درصد از مکان‌های تولید شده در میان ۴۳ هیبرید ارقام مورد مطالعه دارای چندشکلی بودند (Xiang *et al.*, 2003). با این حال در تائید نتایج مطالعه کنونی، سایر محققین نیز وجود تنوع بالای ژنتیکی بین گونه‌های گیاهی ارکیده را گزارش کردند (Bhattacharyya *et al.*, 2013; Bhattacharyya & Kumaria, 2015).

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه تنوع ژنتیکی در میان نتایج حاصل از تالاقی ارقام ارکیده با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریپید و ریپید مورد ارزیابی قرار گرفت. نشانگرهای مورد نظر در این مطالعه تنوع مولکولی مطلوبی را به نمایش گذاشتند که می‌تواند برای

برنامه‌های به‌نژادی سودمند باشد. ریپید در این بررسی بیشترین قدرت تفکیک (۲۱/۱۲) که مربوط به آغازگرهای BE-13 و OPAI-13 بود را نشان داد. همچنین، بالاترین محتوای اطلاعاتی پلی‌مورفیسم ۰/۴۴۴ به‌دست آمد که توسط آغازگر BB-20 مشاهده شد. از طرف دیگر نشانگر آیرپ در این مطالعه بیش‌ترین قدرت تفکیک (۱۸/۹۳) که مربوط به آغازگر-LTR6150 مشاهده شد. بالاترین محتوای اطلاعاتی پلی‌مورفیسم ۰/۳۸۵ به‌دست آمد که مربوط به آغازگر 3'LTR-LTR150 بود، این نتایج نشان‌دهنده کارایی این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در نهایت می‌توان بیان کرد که بالا بودن میانگین چندشکلی در الگوی نواری ریپید و آیرپ، بیانگر مناسب بودن این دو تکنیک برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان نتاج حاصل از تلاقی ارقام ارکیده فالانوپسیس است. این نتایج می‌تواند محققین را در برنامه‌های آتی به‌نژادی و اصلاحی این گیاه ارزشمند یاری دهد. به نظر می‌رسد ذکر این مطلب که آغازگرها می‌توانند نتایج بررسی‌ها را کاملاً از هم تفکیک کنند بسیار دشوار و نادر است زیرا اولاً تشابه یا ارتباط ژنتیکی پارامتری متغیر است و به‌واسطه شاخص‌های زیادی از قبیل تعداد نمونه مورد بررسی، سطح بررسی یا تعداد ژنوم و نوع نشانگرها در نوسان است، و از طرف دیگر تفکیک صفات کمی نیازمند ارزیابی تعداد زیادی از نشانگرهاست تا بتواند پوشش مناسبی در سطح ژنوم ایجاد نماید. در این صورت شناس یافتن آلل یا آللهایی با فراوانی یک (که به‌ندرت اتفاق می‌افتد) یا نزدیک به یک در یک تلاقی و فراوانی صفر یا نزدیک به صفر در دیگری وجود خواهد داشت.

## منابع

- امیدی بخش، محمد. (۲۰۰۵). مطالعه تنوع ژنتیکی گندم دوروم با استفاده از نشانگر SSR. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Kumar, S. & Tandon, P. (2013). Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene*, 529, 21–26.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S. & Tandon, P. (2015). Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid. *Phytochemistry*, 117, 306–316.
- Becker, J., Vos, P. & Kuiper, M. (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics MGG*, 249(1), 65-73.
- Chen, J. & Chang, W.C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(2), 169-173.
- Chen, T.Y., Chen, J.T. & Chang, W.C. (2002). Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(6), 595-597.
- Chuang, H.T. (2002). *Identification of some species in the genus Phalaenopsis to Taiwan and Philippine by using RAPD and ISSR molecular markers*. Master Thesis, Graduate Institute of Agriculture, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan. (Chinese with English abstract)
- Chugh, S., Guha, S. & Rao, I.U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520.
- Goh, M.W.K., Kumar, P.P., Lim, S.H. & Tan, H.T.W. (2005). Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae:Orchidaceae). *Euphytica* 141, 11–22.
- Griesbach, R. (2002). Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 458-465.
- Kalendar, R., Grob, T. & Regina, M. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), 704-711.
- Kalendar, R. & Schulman, A.H. (2006). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocol*, 1, 2478–2484

- Khadivi-Khub A, Soorni A. (2014). Comprehensive genetic discrimination of *Leonurus cardiaca* populations by AFLP, ISSR, RAPD and IRAP molecular markers. *Molecular Biology Reports*, 41(6):4007-16.
- Kilinc, F. M., Süzerer, V., Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, A.A., Tilkat, E, Metin, O.K., Ibrahim, K. & Akdemir, O.F. (2015). Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. *Plant Growth Regulation*, 75, 75–88
- Kumar, R., Singh, M., Kumar, P., Singh, J. (2015). Crop Selection Method to Maximize Crop Yield Rate using Machine Learning Technique. International Conference on Smart Technologies and Management for Computing, Communication, Controls, Energy and Materials1. 0.1109/ICSTM.2015.7225403.
- Liu, B. (2010). Uncertain risk analysis and uncertain reliability analysis. *Journal of Uncertain Systems*, 4(3), 163-170.
- Niknejad, A., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Abdullah, N.A.P. & Sorkheh, K. (2009). Molecular characterization and phylogenetic relationships among and within species of *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on RAPD analysis. *African Journal of Biotechnology*, 8, 5225-5240.
- Omidbakhsh Fard, M. (2005). *Study of genetic diversity in durum wheat using SSR marker'*, MSc Thesis. Tehran University. Tehran, Iran. (in Persian).
- Powel, W., Morgante, M. & Andre, C. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238.
- Puchooa, D. (2004). A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, 3(4), 253-255.
- Spooner, D.M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R. & Bryan, G.J. (2005). Single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 102, 14694–14699.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E. (2006) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147-158.
- Tsai, C.C., Shih, H.C., Wang, H.V., Lin, Y.S., Chang, C.H., Chiang, Y.C. & Chou, C.H. (2015). RNA-Seq SSRs of moth orchid and screening for molecular markers across genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *PLoS ONE*, 10(11), e0141761.
- Xiang, N., Hong, Y. & Lam-Chan, L.T. (2003). Genetic analysis of tropical orchid hybrids (*Dendrobium*) with fluorescence amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 731–735.
- Varshney, R.K., Chabane, K. & Hendre, P.S. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, 173(6), 638-649.
- Wen, W.H., Liu, J.Y. & Qin, W.J. (2007). Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology*, 46(1), 84-94.