التنوع الوراثي عند الماعز الشامي السوري باستخدام تقانة SSR-PCR

Analysis of Genetic Diversity in Syrian Shami Goat by SSR-PCR Technique.

م. علي كنعان[1] د. بسام عيسى[1] د. سلام لاوند[2-3]

S. Lawand B. Issa A. Kanaan

(1) قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(2) قسم المحاصيل، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(3) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد).

الملخص

يُعد الماعز الشامي في سورية من الحيوانات الزراعية المحلية المهمة، ورغم ذلك مازال هذا الحيوان بعيداً عن ساحة البحث العلمي، فضلاً عن تعرضه لعملية خلط عشوائي مع الماعز الجبلي من قبل مربي الماعز، ما سيؤدي وعلى المدى الطويل إلى ضياع مصدر وراثي حيواني محلي مهم لم تكتشف كل مزاياه. نفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق (سورية) بهدف دراسة التنوع الوراثي عند مجموعات من الماعز الشامي النقي باستخدام تقانة SSR-PCR.

أظهرت النتائج وجود تنوع وراثي بين عينات الماعز المدروسة، إذ تراوحت نسبة التشابه بين 0 و 100 %، أما فيما يتعلق بالتعددية الشكلية فقد بلغت 100 %.

الكلمات المفتاحية: ماعز شامي سوري، التنوع الوراثي، SSR-PCR.

Abstract

Shami goats in Syria is one of the most important domestic animals. In spite of that, this animal is still far away from the scientific research, moreover, it was exposed to random crossbreeding with Mountain goat by goat breeders, which will lead in the long tern to the loss of an important domestic animal genetic source, some of its' characterizes were not detected yet. The research was executed in Biotechnology Lab. (Faculty of Agriculture – Damascus University/Syria).

In this research, the genetic diversity among samples of pure Shami goats by using (SSR-PCR) was studied.

The results indicated that there is a genetic diversity among the studied samples of goats that we studied, and there was similarity ranged from (0% to 100%), however (Polymorphic rate was 100%).

Keywords: Shami goat, Genetic diversity, SSR-PCR.

©2017 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF(NSP)-316

المقدمة

إن صيانة وتطوير الموارد الوراثية الحيوانية المحلية تعد من أولويات العمل للمؤسسات العلمية لما تمتلكه هذه الموارد الوراثية من أهمية اقتصادية وعلمية، ويبرز الماعز الشامي كأحد هذه الثروات الوراثية المحلية في سورية، رغم قلة نسبة ما يشكله من إجمالي الماعز، وذلك لما يمتلكه من مزايا وصفات جعلته مرغوباً إقليمياً وعالمياً، إلا أن الدراسات المنفذة على هذا الحيوان الزراعي المهم ما تزال دون مستوى الطموح وقاصرة عن تقديم البرامج والمناهج الكفيلة بتطويره.

تعد تقانة الوراثة الجزيئية أسلوباً حيوياً مهماً يسهم في التعرف على هذه الحيوانات بطريقة غير تقليدية، لأنه يكشف عن أحد أهم مواقع تطويرها وهو موروثها الجزيئي. فمع تحسن طرائق البحث العلمي وتطور تقانات التجارب، انتقلت دراسة المجين (Genome) من المستوى الشكلي والخليوي والفيزيولوجي والكيمياحيوي إلى المستوى الجزيئي، الذي يدرس الحمض النووي بشكل رئيس.

تتنوع التقانات التي تستخدم في الكشف عن التنوع الوراثي داخل وبين الأنواع المختلفة، ومنها تقنية التوابع البسيطة الترادفية Simple Sequence Repeats (SSR)، إذ يلاحظ في هذه التقنية أن مستوى التعددية الشكلية عال إلى متوسط، وطبيعة التوريث سائد إلى متنحي، والقدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة، كما أن جهد تنفيذها منخفض (Van Der Nestوزملاؤه، 2000). وبين Wang وزملاؤه (1994) أن التوابع البسيطة الترادفية عبارة عن تسلسلات متكررة من توليفات مختلفة من أربع وحدات تشكل قواعد DNA هي الأدينين والسيتوزين والغوانين والتيامين والمؤلفة من 1 إلى 6 أزواج نيكليوتيدية تتوالى مراراً وتكراراً من طرفيها. ولوحظ أن التابع البسيط الترادفي يكون محاطاً بتتال نيكليوتيدي معين وثابت ووحيد في تواجده في أمشاج النوع الواحد (Wang وزملاؤه، 1994)، ومعلماتها ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسة علم الوراثة العرقي، وتقييم التنوع الوراثي، وتحديد الأصناف (Jain وزملاؤه، 1999)، وتعد هذه التقانة مهمةً بسبب ارتفاع معدل تطفيرها، ولعل كسب أو فقد تكرار واحد بين جيل وآخر يفوق عشرة آلاف مرة احتمال حدوث طفرة تصيب قاعدة آزوتية واحدة في مورثة ما في الأحوال العادية (Sweigart وزملاؤه، 1999).

أشار Wang وزملاؤه (1994) و Dayanandan وزملاؤه (1998) و Qian وزملاؤه (2007) إلى أهمية استخدام هذه التقانة في دراسة الثدييات، ورسم الخرائط الوراثية للإنسان، كما أن التوابع الترادفية البسيطة تمتلك إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة المشتركة (Rafalski وزملاؤه، 1994). وأشار Powell وزملاؤه (1996) إلى أن الاختلاف في عدد الأزواج النيكليوتيدية المتكررة ينتج عن التباين بين أنواع البادئات قليلة النيكليوتيدات (Oligonucleotide) المستخدمة والمحيطة بالتسلسل النيكليوتيدي للتابع الترادفي البسيط. وبين Yu وزملاؤه (1994) أن المؤشرات الجزيئية من التوابع البسيطة الترادفية تحوي طاقةً كامنةً في الثدييات كما في النباتات.

وأوضح Tautz وRens (1984) أن التوابع البسيطة الترادفية (SSR) متوفرة وتتوزع بإطراد لتعكس معلومات وراثية كثيرة، إذ أنها عكست في الثدييات عدداً كبيراً من التعددية الشكلية (Polymorphisms) في القطع الترادفية (Microsatallites). وتستخدم هذه الطريقة في زيادة دقة دراسة المجاميع الوراثية السكانية (Schlötterer و Pemberton، 1994). وفي مجال استخدام SSR عند الماعز تمكن Wang وزملاؤه (2009) من استخدام 10 بادئات من SSR لتحديد الاختلاف الوراثي الجزيئي في صفة ارتفاع التصالب الحوضي بين أفراد الماعز التيبيتي التي تعيش في مناطق مختلفة الارتفاع.

يتجلى الهدف الرئيس لهذا البحث في استخدام تقانة SSR-PCR من أجل تحليل التنوع الوراثي في مجتمع الماعز الشامي في سورية، والاستفادة من هذا التنوع لوضع لبنة يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي لهذا الحيوان، وعدم إهمال هذه المادة الوراثية وحفظها من الضياع.

مواد البحث وطرائقه

المادة الحيوانية و استخلاص الحمض الريبي النووي:

تم الحصول على عينات من دم الماعز الشامي النقي (غير الخليط) (عينات الدم من محطات بحوث ذات سجلات موثقة في قرحتا)، إذ تم اختيار 20 عينة من الماعز الشامي الخالي من الأمراض (حسب معطيات المحطة البحثية) (10 إناث + 10 ذكور ذات الفك العادي) (العينات من 1 إلى 10 هي إناث ومن 11 إلى 20 ذكور) من الوريد الوداجي، وتم استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) وذلك وفق الخطوات التالية :

1 ـ جُمعت عينات الدم في أنابيب مخلاة من الهواء تحوي EDTA كمانع تخثر، وخُزنت في درجة حرارة أقل من 4° م.

2 ـ فُصلت الخلايا بالمزج اليدوي قبل الاستخلاص.

3 ـ وضع 1 مل من الدم الكامل في أنبوب، ثم أضيف 1 مل من محلول دارئ حال للخلايا [0.32 مم سكروز، 10 مم Tris-Hcl، PH=7.6 ، 5 مم $Mgcl_2$، 1 % (Triton® x-100)] إلى الأنبوب.

4 ـ تُفل الأنبوب بسرعة 4000 rpm لمدة 5 دقائق، وأعيدت هذه الخطوة مرةً ثانيةً.

5 ـ أضيف 500 µl من محلول دارئ هضم البروتين (10مم Tris-HCl، PH=8، 10مم NaCl، 10مم EDTA) إلى الأنبوب .

6 ـ تُفلت الأنابيب بسرعة 4000 rpm لمدة 5 دقائق.

7 ـ أضيف 225 µl من محلول دارئ هضم البروتين، و 25 µl من محلول البروتيناز k (10 ملغ/ميكرو لتر) إلى الأنبوب.

8 ـ وضعت الأنابيب في درجة حرارة 65 °م في حمام مائي، وحُضنت لمدة ساعتين.

9 ـ تُفلت محتويات الأنابيب لمدة دقيقتين بسرعة 10000 rpm، ثم تم ترسيب الحمض الريبي النووي DNA باستخدام 0.6 ميكرو ليتر من محلول الإيزوبروبانول، وبعدها غُسل DNA بالإيثانول (70 %)، وتم حله بـ 50 µl من TE، وخُزنت عينة DNA بدرجة حرارة أقل من 20 - ° م حتى الاستخدام.

تضخيم الحمض الريبي النووي باستخدام تقانة Polymerase Chaine Reaction (PCR):

تمت عملية حل الحمض الريبي النووي DNA للوصول إلى تركيز الحمض الريبي النووي، وتم تضخيم DNA في محلول نهائي (25 µl) متضمناً : 12.5 µl (Master Mix) من شركة (Promega الكندية)، و 6.5 µl ماءً مقطراً معقماً، و 2 µl من محلول البادئتين المستخدمتين تركيز 10 µm، والحمض الريبي النووي DNA بتركيز 40 ng/ml.

وتم استخدام 54 بادئةً (27 زوجاً) لتقانة SSR-PCR لعينات من إناث وذكور الماعز الشامي العادي، كما هو موضح في الجدول 1.

الجدول 1 . رموز البادئات المستخدمة في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، وتسلسلها النيكليوتيدي ودرجات حرارة التهجين لكل منها.

رقم البادئة	التسلسل النيكليوتيدي (3 ' - 5 ')	درجة حرارة التهجين (°)
2-1	GGGTGTGACATTTTGTTCCC CTGCTCGCCACTAGTCCTT	63
4-3	ACCTGGGAAGCCTCCATATC CTGCAGGCAGATTCTTTATCG	56.9
6-5	AGTTGAACCTGGGTCTCCTG TGCAATGGCAGTGAAAAAAG	64
8-7	GAATTCCCATCACTCTCTCAGC GTTCTCCATTGAACCAACTTCA	64
10-9	TGGTTTAGCAGAGAGCACATG GCTCCTAGCCCTGCACAC	58
12-11	GCTACAGCCCTTCTGGTTTG GAGCTAATCACCAACAGCAAG	63
14-13	TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC AACACCGCAGCTTCATCC	63
16-15	ATGCACCCTTAACCTAATCCC GCACTTTATAAGCACCACAGC	54
18-17	GAGAATCACCTAGAGAGGCA CTTTCTCTTTAAATTCTATATGGT	55.6
20-19	ATCCTCACCCTTCAAACAG CTGGGGAGTTTTCTCTGAC	62
22-21	ATCTTACTTACCTTCTCAGAGCT GGGACAAAATTTTACATATACACTT	59.6
24-23	TGCGGTCTGGTTCTGATTTCAC CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG	55
26-25	AGCAAGAAGTGTCCACTGACAG TCTAGGTCCATCTGTGTTATTGC	55
28-27	CTTTACTTCTGACATGGTATTTCCC TGCCACTCAATTTAGCAAGC	55

45	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	30-29
45	TTATCTTGGCTTCTGGGTGC ATCTTCACTTGGGATGCAGG	32-31
45	TGAACGGGTAAAGATGTG TGTTTTTAATGGCTGAGTAG	34-33
45	TCAGTCTCCAGGAGAGAAAAC CTCTGCCCTGGGGATGATTG	36-35
45	TGATGAGGATGGATGCTAACT CTGCAAATAAGAAAACTGAATAAA	38-37
55	GTTTCTTTTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC GCTTGGAAATAACCCTCCTGCATCCC	40-39
55	GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC	42-41
55	ACAGAGGTGAAGAATAAGGAGAGTG GATAGTTTCAGAAGACCCAGTTGAG	44-43
55	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	46-45
55	TGTTTTGATGGAACACAGCC TGGATTTAGACCAGGGTTGG	48-47
50	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	50-49
50	CAATCTTGCTCCCACTATGC CTCCTAAAACACTCCCACACTA	52-51
50	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	54-53

التحطم الحراري:

تمت مضاعفة الـ DNA في جهاز التدوير الحراري (TC-512 Techen) وفق البرنامج التالي:

- دورة تحطيم حراري واحدة لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 95° م.
- سلسلة من 40 دورة تشمل المراحل التالية:

1 - مرحلة تحطيم حراري جديدة لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة 95° م.

2 - مرحلة تهجين البادئات لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة حسب الجدول1.

3 - مرحلة استطالة لمدة دقيقة واحدة وبدرجة حرارة 72° م.

تُركت العينات بعد ذلك في الجهاز لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 72 °م، لإتمام جميع التفاعلات المطلوبة.

تمت عملية فصل نواتج التضخيم ضمن جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة الميتافور آغاروز (4 %)، ومحلول الفصل الكهربي (TBE 1x) (108g Tris، 55g Boric Acid، 9.3g EDTA ،PH=8).

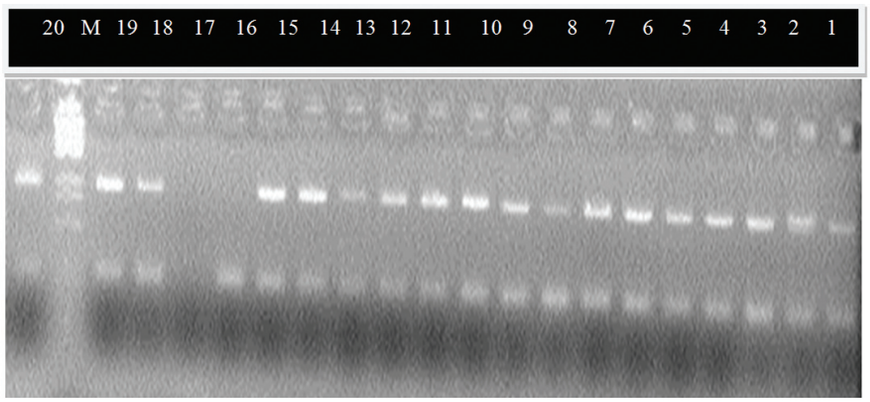
أضيف للهلامة إيثيديوم بروماید بمقدار 5 ml/mg لكل100 ml من هلامة الآغاروز، وذلك لإظهار الحزم بشكل واضح عند التعريض للأشعة فوق البنفسجية (Weising وزملاؤه، 1995). استخدم كمؤشر للوزن الجزيئي 10 ميكرو ليتر من (1kb ladder) للكشف عن مواقع وأحجام الحزم المختلفة باستخدام التصوير بالأشعة فوق البنفسجية (UV).

التحليل الإحصائي:

تمت دراسة التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية اعتماداً على بياناتها الجزيئية، وحُللت باستخدام البرنامج الإحصائي PopGen32، كما رسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على هذا البرنامج.

النتائج والمناقشة

طُبقت تقانة SSR التي تعتمد على تقانة PCR باستخدام 54 بادئة (27 زوجاً)، حيث أعطى 15 زوجاً من البادئات المستخدمة نتائج تضخيم، في حين لم تعط البادئات الأخرى أي نتائج تضخيم. ويلاحظ أن البادئات (31-32) و(37-38) و(51-52) أعطت حزمة واحدة كما هو موضح في الشكل 1. وأعطت البادئات (7-8) و(23-24) و(25-26) و(35-36) و(41-42) حزمتين. كما أعطت البادئات (1-2) و(9-10) و(11-12) و(30–29) و(33-34) و(39-40) و(49-50) ثلاث حزم. وبلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن هذه البادئات 34 حزمة، أي بمعدل 2.3 حزمة لكل بادئة، وبلغ عدد الحزم ذات التعددية الشكلية 34 حزمةً، أي بمعدل 2.3 حزمة للبادئة الواحدة، وقُدرت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 100 %، كما هو موضح في الجدول 2.



الشكل 1. نتائج الـ PCR عبر الرحلان الكهربائي على هلامة ميتافورأغاروز 4 % باستخدام زوج من البادئات (31-32). علماً أن حجم الحزم الناتجة هو 300 bp.

الجدول 2. الحزم الناتجة عن البادئات المستخدمة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية.

اسم البادئة	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتعدد شكلياً	النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً
2-1	3	3	100
8-7	2	2	100
10-9	3	3	100
12-11	3	3	100
24-23	2	2	100
26-25	2	2	100
30-29	3	3	100
32-31	1	1	100
34-33	3	3	100
36-35	2	2	100
38-37	1	1	100
40-39	3	3	100
42-41	2	2	100
50-49	3	3	100
52-51	1	1	100
المجموع	34	34	---
المعدل	2.3	2.3	100

التحليل العنقودي للعينات المدروسة باستخدام تقانة SSR-PCR (شجرة القرابة):

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها باستخدام برنامج التحليل الإحصائي PopGen32، وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة (Dendrogram)، لتحديد درجة القرابة فيما بينها، وقد لوحظ من الشكل أن العينات المدروسة قُسمت إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها بناءاً على موطنها الأصلي، أو على نسبها وأصلها، وبيانات المعلمات الجزيئية التي قامت بتمييز العينات المدروسة على المستوى الجزيئي (الشكل 2).

يلاحظ عند دراسة شجرة القرابة الناتجة من التحليل الإحصائي لنتائج الرحلان لعينات الإناث والذكور العادية أن هذه الشجرة ضمت عنقودين رئيسين: ضم الأول العينات (1،2 ، 10، 8، 3، 9، 4، 11،7،6، 5)، وهذا منطقي كونها عينات إناث باستثناء العينة 11، التي جاءت ضمن هذا العنقود وهي عينة ذكور. ويعزى ظهور هذه العينة (11) ضمن هذا العنقود إلى أن عملية الفصل جاءت بالاعتماد على صفات وراثية جسمية لا جنسية. أما العنقود الثاني فضم العينات (12، 13، 14، 15، 20، 16،17،18 ، 19)، وهذا منطقي أيضاً كونها جميعاً عينات ذكور عادية. يمكن من خلال شجرة القرابة ملاحظة أن العينتين (4 و 6) تمتلكان درجة قرابة تصل إلى 98 %، وبعد وراثي بحدود 2 % لأنها إناث. وبالتالي يمكن اختصار عدد الحيوانات المستخدمة في عمليات التحسين الوراثي، ما يساعد على الاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي.

ويلاحظ أن النتائج التي تم الحصول عليها تتشابه مع الدراسات التي قام بها بعض الباحثين في المجال نفسه ولكن بتقانات أخرى، فقد استخدمت تقانة ISSR عند الماعز، إذ تمكن Wang وزملاؤه (2009) من استخدام 10 بادئات من ISSR لتحديد الاختلاف الوراثي الجزيئي في صفة ارتفاع التصالب الحوضي بين أفراد الماعز التيبيتي التي تعيش في مناطق مختلفة الارتفاع.

كما استخدم Wang وزملاؤه(2010) هذه التقانة لتحليل التنوع الوراثي عند مجتمعات الماعز التيبيتي في منطقة ريتو كونتي، إذ اختيرت 10 بادئات من بين 93 بادئة ISSR، ثم استخدمت للكشف عن التنوع الوراثي في 107 عينات من الماعز التيبيتي، وأعطت هذه البادئات العشر 112 حزمة DNA، من ضمنها 75 حزمة متعددة شكلياً، وتراوح حجم القطع المضخمة بين 219 و 2534 bp، ما يؤكد نوعية هذه البادئات التي استطاعت إنتاج حزم متعددة شكلياً فقط، كما أكدت النتائج أيضاً أن مجتمع الماعز المدروس يبدي مستوى عال من التنوع والاختلاف الوراثي الموجود ضمن الأفراد.

ووجد كنعان وزملاؤه (2012) أن تقانة الـ SSR-PCR أظهرت تعددية شكلية في إظهار التباينات بين عينات ذكور الماعز العادية والذكور طويلة الفك (الكزمة)، إذ بلغت التعددية الشكلية 100 %، كما وجدوا أنه يمكن التمييز بين العينات المدروسة (ذكور عادية وذكور كزمة) فيما إذا كانت أخوة أو توائم.

الشكل 2. التحليل العنقودي للعينات المدروسة الناتجة عن استخدام تقانة SSR-PCR.

الاستنتاجات

يُستنتج من خلال هذه الدراسة أن تقانة SSR-PCR قد أظهرت تعددية شكلية في إظهار التباينات بين عينات الماعز، فقد بلغت التعددية الشكلية 100 %. كما أمكن التمييز بين العينات المدروسة فيما إذا كانت إخوة أو توائم.

ولكي تكون هذه الدراسة شاملة يجب إجراء دراسات مستفيضة تتناول أعداداً من الماعز الشامي من كل مناطق وجوده في سورية، والتوسع في أبحاث التنوع والبيولوجيا الجزيئية في مجال الإنتاج الحيواني.

كما يجب البحث عن معادلات وعلاقات ارتباطيه بين الصفات الشكلية والإنتاجية والوراثية في الماعز الشامي، والعمل على تحديد مواقع بعض المورثات باستخدام الوراثة الجزيئية المسؤولة عن الصفات المهمة (الإنتاجية وغيرها)، للاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي الحيواني، واستخدامها آباءً في عمليات التهجين.

المراجع

- كنعان، علي ولاوند، سلام، وعيسى بسام. 2012. تحليل التنوع الوراثي عند ذكور الماعز الشامي السوري باستخدام تقانة SSR. مجلة عين شمس للكيمياء البيولوجية والعلوم البيئية، 7(1).
- Dayanandan.S., O.P. Rajora., and K.S.Bawa. 1998. Isolation and characterisation of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theoretical and Applied Genetics, 96: 950-956.
- Jain.A., C. Apparanda, and .PL.Bhalla, 1999.Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR. Genome, 42: 714-719.
- Powell. W., M. Morgante, J.J. Doyle, J. Mcnical, S.V. Tingey, and A.J. Rafalski, 1996. Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites. Genetics,144:793-803.
- Qian .Z., D. Hong, and Z. Dong Hang. 2007.SSR Molecular Marker and its application in plant researches. Molecular Plant Breeding, 5(6):123-129.
- Rafalski. A., E. Zietkiewicz, and D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchoredpolymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.
- Schlötterer. C., and J. Pemberton. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: Schierwater B, Streit B, Wagner GP, DeSalle R (eds.). Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland: 203-214
- Sweigart. A., K. karoly, A. Jones, and H. J.Willis. 1999.Thedistribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relateness in population of Mimulus guttalus. Heredity, 83: 625-632.
- Tautz. D, and M. Renz, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12:4127-4138.
- Van der Nest, M.A., E.T. Steenkamp, B. D. Wigfield, and M .J. Wingfield, 2000. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed, 119:433-436.
- Wang. Z., J.L.Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor Appl Genet, 88: 1-6.
- Wang. Jie., Wang Yong, Xu Qi-shu, Gao Guang yu, Ouyang Xi, and Liu Lu-shu. 2009. The research of Tibetan goat height at withers functional gene.
- Wang.Y., J. Xu, Wang, Q. ZI. X, Ouyang, L. XI Liu and Y. Xiao. 2010_ Analysis of genetic diversity in Ritu Tibetan goats by ISSR. Chinese Journal of Applied Ecology, 41(9):1208-1212.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., London.
- Yu, Y.G., M.A Saghai, G.R. Buss, P.J. Maughan and S.A. Tolin. 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. Phytopathology, 84: 60-64.

Nº Ref: 332