

JURNAL AGRIVIGOR

ISSN 1412-2286

Jurnal Akreditasi Nasional

SK DIKTI No.: 83/DIKTI/Kep./2009 tgl 9 Juli 2009

KERAGAMAN GENETIK BEBERAPA AKSESI MARKISA BERDASARKAN PENANDA INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Genetic diversity in passion fruit based on
inter simple sequence repeat (ISSR) markers

Muhammad Arif Nasution¹⁾, Bakri Giding Nur and Zulkifli Razak

e-mail : mohammad_arnas@yahoo.co.id

Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas "45" Makassar.
Jl. Urip Sumoharjo Km 4, Makassar Telepon/Fax:(0411)452901/(0411)424568

Jurnal Agrivigor Volume 10, Nomor 2, April 2011, hal. : 158-168

Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin

Makassar

2011

KERAGAMAN GENETIK BEBERAPA AKSESI MARKISA BERDASARKAN PENANDA INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Genetic diversity in passion fruit based on
inter simple sequence repeat (ISSR) markers

Muhammad Arif Nasution¹⁾, Bakri Giding Nur and Zulkifli Razak

e-mail : mohammad_arnas@yahoo.co.id

Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas "45" Makassar.

Jl. Urip Sumoharjo Km 4, Makassar Telepon/Fax:(0411)452901/(0411)424568

Diterima: 12 Januari 2011

Disetujui: 19 Maret 2011

ABSTRAK

Penilaian variasi genetik terhadap 13 belas aksesori markisa yang terdiri atas markisa ungu, merah, dan kuning serta markisa kuning *Passiflora linguaris* telah dilakukan dengan menggunakan marker ISSR (inter-simple sequence repeat). Delapan primer ISSR digunakan untuk mengevaluasi 13 aksesori. Jumlah pita polimorfik per primer bervariasi 4 sampai dengan 9, dengan rata-rata 6,37 pita per primer. Berdasarkan koefisien Dice diperoleh kemiripan genetik berkisar antara 0,06-0,52. Analisis Clustering menggunakan metode UPGMA menghasilkan dua kluster utama. Hasil ini menunjukkan bahwa ISSR dapat digunakan untuk studi keragaman genetik, memberikan informasi praktis untuk seleksi tetua dalam pemuliaan serta strategis untuk kegiatan konservasi.

Kata kunci : markisa, keragaman genetik, penanda ISSR, sumber genetik

ABSTRACT

Genetic variation among purple, and yellow and sweet passion fruit accessions was assessed using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Eight ISSR primers were used to evaluate 13 accessions. The number of polymorphic bands per primer varied from 4 to 9, with 6.37 bands per primer on average. Dice's genetic distance between accessions ranged from 0.06 to 0.52. Clustering using the neighbor-joining method resulted in the formation of two major clusters. The results of this analysis, suggesting that ISSR markers significant correlation with morphology classification. Furthermore, to assess the patterns of variation, principal component analysis have been done using 51 ISSR band pattern. Our results indicate that ISSR can be useful for genetic diversity studies to provide practical information for parental selection and to assist breeding and conservation strategies.

Keywords: Passion fruit, genetic variability, ISSR marker, genetic resources

PENDAHULUAN

Genus *Passiflora*, merupakan tanaman yang berasal dari Amerika selatan dan secara geografis didistribusi ke utara dan tengah Brasil. Genus ini

memiliki sekitar 520 spesies yang merupakan jumlah spesies terbesar dalam famili *Passifloraceae* (Vander-plank, 1996). Namun hanya sekitar 60 spesies menghasilkan buah dengan nilai

Keragaman genetik beberapa aksesori markisa berdasarkan penanda ISSR

komersil (Manica, 1997), dan lainnya untuk keperluan konsumsi atau kesehatan.

Di Indonesia, ada tiga jenis markisa yang telah dibudidayakan, meliputi markisa asam dengan kulit buah berwarna ungu (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims.), markisa asam dengan kulit buah kuning (*P. edulis* Sims f. *flavicarva* Deg), markisa konyal atau markisa manis (*P. ligularis* Juss) dan erbis atau giant granadilla (*P. quadrangularis* L.) (Karsinah et al., 2007).

Markisa merupakan tanaman penting baik secara ekonomi maupun sosial, dan telah banyak dilakukan penelitian untuk mengembangkan varietas yang adaptif terhadap sistem tanam dan kondisi iklim yang berbeda. Oleh karena itu, kegiatan yang berkaitan dengan pengumpulan, konservasi, karakterisasi, dan penggunaan plasma nutfah *Passiflora* perlu dilakukan untuk memastikan bahwa tersedia variabilitas genetik yang dapat dieksploitasi untuk program pemuliaan. Pemanfaatan variabilitas genetik secara efisien dapat digunakan jika penilaian dan pengukuran dilakukan dengan benar. Jadi, karakterisasi terhadap plasma nutfah harus disesuaikan berdasarkan ciri-ciri morfologi (Viana et al., 2010; Crochemore et al., 2003a; Plotze et al., 2005), karakter agronomi (Abreu et al., 2009; Cerqueira-Silva et al., 2008), dan keragaman molekuler (Bellon et al., 2009; Cerqueira-Silva et al., 2009, 2010; Viana et al., 2010) untuk memungkinkan kemajuan dalam deskripsi dari perbedaan genetik antara aksesori.

Penanda molekuler telah digunakan dalam pemuliaan tanaman dan dalam kegiatan yang berkaitan dengan konservasi sumber daya genetik. Pe-

nanda yang paling umum adalah random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Welsh dan McClelland 1990; Williams et al., 1990), amplification fragment length polymorphism (AFLP; Vos et al., 1995), dan restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Botstein et al., 1980), single nucleotide polymorphism (SNP) (Wang et al., 1998), single simple repeat (SSR) (Tautz 1989; Weber and May 1989), and inter-simple single repeat (ISSR) (Zietkiewicz et al., 1994). Di mana penanda ISSR dikembangkan dari kebutuhan untuk mengeksplorasi microsatellite repeats tanpa menggunakan DNA hasil sekuensing (Lagercrantz et al., 1993). Teknik ini didasarkan pada amplifikasi segmen DNA antara dua microsatellite repeated regions (Zietkiewicz et al., 1994). ISSR adalah teknik sederhana, cepat, dan efisien yang menghasilkan panjang produk amplifikasi antara 200-2000 bp.

Teknik ini sangat reproduktif karena penggunaan primer panjang, yang memungkinkan untuk suhu aneling tinggi (Reddy et al., 2002). Teknik ini menggunakan primer yang hanya mengandung pengulangan dari SSR tertentu (di-, tri-, tetra-, atau pentanukleotida), dari 16-25 bp, baik unanchored (Gupta et al., 1994; Meyer et al., 1993.; Wu et al., 1994).

ISSR ini menggabungkan keunggulan dari penanda AFLP dan SSR dengan kemudahan RAPD (Zietkiewicz et al., 1994). Oleh karena itu, teknik ini telah sukses digunakan dalam analisis keragaman beberapa spesies buah, seperti jeruk trifoliata (*Poncirus trifoliata*) (Fang et al., 1997), jeruk (*Citrus spp.*) (Fang dan Roose, 1997), pisang diploid (*Musa acuminata*) (Godwin et al., 1997), lengkung berbulu (*Nephelium ramboutan-*

ake Leenh) (Clyde et al., 2005), dan anggur (*Vitis* spp.) (Moreno et al., 1998; Wu et al., 2009).

Studi pada keragaman genetik dari genus *Passiflora* telah dilakukan dengan menggunakan penanda RAPD (Fajardo et al., 1998; Crochemore et al., 2003b; Viana et al., 2003), isozymes (Segura et al., 2003), dan AFLP (Segura et al., 2002). Penanda SSR telah dikembangkan untuk buah markisa kuning (Oliveira et al., 2005.) dan markisa manis (Pa'dua et al., 2005). Di Indonesia khususnya, penggunaan penanda ISSR belum ada dalam analisis keragaman pada buah markisa manis, kuning, atau ungu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui teknik yang berpotensi untuk mendeteksi adanya tingkat keragaman dalam sampel buah markisa yang ada di Sulawesi Selatan.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Material tanaman yang digunakan sebanyak 13 aksesi markisa (Tabel 1) yang berasal dari Kebun Petani markisa yang ada di Kecamatan Tompobulu Kabupaten Gowa dan analisis DNA

dilakukan di Laboratorium Biologi molekuler PKBT IPB, dari Mei sampai September 2010.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari daun muda yang didasarkan pada prosedur yang diuraikan oleh Doyle and Doyle (1990). Sedangkan pemurniaan DNA menggunakan metode Sambrook et al. (1989).

Amplifikasi PCR dan Elektroforesis

Dari 10 primer yang diuji terhadap 13 aksesi markisa, terdapat delapan primer yang polimorfism dan dipilih untuk analisis lebih lanjut (Tabel 2).

Amplifikasi DNA markisa dilakukan menurut metode Williams et al. (1990). Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan *microtube* volume 0,5 µL yang berisi 25 µL campuran larutan yang terdiri atas: 12,5 µL Go tag mix, 10,5 µL air bebas ion (*ion free*), 1 µL primer acak, dan 1 µL DNA. Volume akhir campuran reaksi amplifikasi adalah 25 µL.

Tabel 1. 13 Aksesi markisa yang digunakan dalam penelitian ini

Aksesi	Spesies <i>Passiflora</i>	Jenis
M-01	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-02	<i>P. edulis</i>	Kuning
M-03	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-05	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-06	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-07	<i>P. edulis</i>	Kuning
M-08	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-09	<i>P. edulis</i>	kuning
M-10	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-11	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-13	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-15	<i>P. edulis</i>	Ungu
M-16	<i>P. ligularis</i>	Kuning muda

Selanjutnya tabung-tabung tersebut dimasukkan ke dalam blok mesin PCR (*Applied Biosystem Thermal Cycler* version 2.00), yang diprogramkan dengan bentuk tahapan temperatur dan waktu : inisiasi denaturasi 94 °C selama 4 menit sebanyak satu siklus, selanjutnya denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 36 °C selama 1 menit, dan ekstension pada suhu 72 °C selama 1 menit sebanyak 40 siklus, diikuti ekstension akhir pada suhu 72°C selama 5 menit sebanyak satu siklus. Setelah reaksi amplifikasi berakhir produk amplifikasi diberi *loading dye*, dan selanjutnya dielektroforesis pada 1,2 % gel agarose dalam larutan TBE 1x. Elektroforesis dilakukan selama 120 menit pada tegangan 60 volt, suhu ruang. Pengamatan pita hasil amplifikasi dilakukan menggunakan alat doku-mentasi gel (gel dok) dan direkam ke dalam disket.

Analisis Data

Data hasil ISSR dianalisis dengan metode Dice dan analisis korelasi. Sebelum data ISSR dianalisis, terlebih dahulu data tersebut di skor dengan nilai nol (0) jika tidak ada pita, dan satu (1) jika ada pita pada tingkat migrasi yang sama.

Analisis similaritas dilakukan berdasarkan rumus Nei dan Li (1978), analisis pengelompokan menggunakan *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested* (SAHN)-UPGMA (*Unweighted pair-group method, arithmetic average*) pada program NTSYS-pc versi 2.02, hasil analisis ini disajikan dalam bentuk dendrogram, dan analisis komponen utama dilakukan dengan mengekstrak 3 *eigenvectors* dari 3 *Eigenvalues* utama yang memberikan tingkat keragaman paling tinggi melalui prosedur analisis

Ordination dalam program NTSYS-pc versi 2.02. Hasil analisis disajikan dalam bentuk plot 2 dan 3 dimensi (Rohlf, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Polimorfisme ISSR

Delapan primer ISSR menghasilkan total 51 pita, setiap primer menghasilkan 4-9 pita (rata-rata 6,37 pita setiap primer). Diperoleh persentase skor pita polimorfik tinggi (80,98 %, 51) (Tabel 2; Gambar 1).

Jumlah pita polimorfik yang dihasilkan oleh primer bervariasi 4-9 pita (Tabel 2). Berdasarkan hasil ISSR, menunjukkan bahwa dari 8 primer yang digunakan, primer PKBT2, dengan sekuens (AC)₈TT, menghasilkan jumlah skor pita tertinggi, dan primer PKBT7 dan PKBT11 menunjukkan skor terendah. Delapan primer ISSR memungkinkan pemisahan 13 genotipe, termasuk tanaman dari aksesori yang sama. Hasil analisis pola pita antara genotipe yang paling mirip (antara jenis markisa buah berwarna ungu), M11 dan M13, menunjukkan bahwa mereka hanya berbeda 3 pita (5,88 %) dari 51 pita, sedangkan yang paling jauh, M15 dan M16 (antara markisa ungu dengan jenis markisa manis, disajikan 24 pita berbeda (56,86 %). Tingginya tingkat polimorfisme yang diamati secara konsisten sebanding dengan studi lain (Gemas et al., 2004; Martins-Lopes et al., 2007; Gomes et al., 2009).

Analisis Pengelompokan

Analisis pengelompokan terhadap 51 pola pita DNA menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar antara 48 - 94% atau terdapat keragaman genetik sebesar 6-52% (Gambar 2).

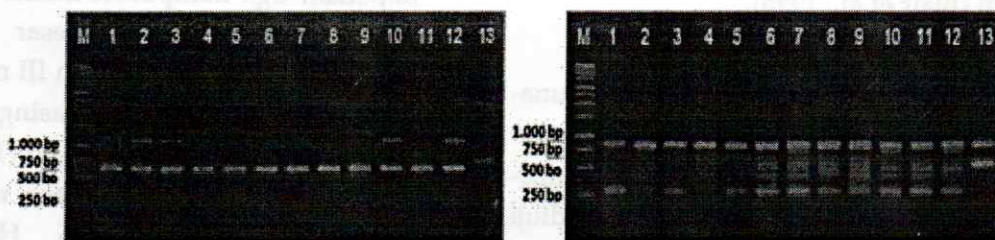
Nilai koefisien kemiripan genetik (KKG) 48% atau jarak genetik 52% terbentuk dua kelompok utama, yaitu, kelompok utama A dan kelompok utama B. Kelompok utama B hanya terdapat satu aksesori, yaitu M-16, yang merupakan spesies *P. ligularis* Juss, sedangkan aksesori lain pada koefisien kemiripan genetik 0,68 atau jarak genetik 32%, masuk pada kelompok utama A yang terdiri atas dua subkelompok, yaitu sub kelompok A₁ dan subkelompok A₂. Pada subkelompok (A₁) dengan KKG 78 % atau jarak genetik 22 %, aksesori M-02 atau markisa kuning (*P. edulis* Sims f. *flavicarva* Deg) memisah dari aksesori lainnya yang merupakan markisa jenis ungu (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims). Pada subkelompok yang sama, dengan KKG 94 % atau jarak genetik 6 %, terdapat dua aksesori, yaitu M-11 dan M-15. Kedua aksesori ini memiliki karakter bentuk buah, bulat

agak melonjong. Dibanding dengan aksesori lainnya memiliki karakter bentuk buah bulat atau lonjong. Pada KKG 88 % atau jarak genetik 12 % terdapat subkelompok dengan anggota aksesori M-01, M-03 dan M-06. Hanya ketiga aksesori dari sub-kelompok ini yang memiliki karakter bentuk buah lonjong.

Subkelompok A₂ dengan KKG 0,71 atau jarak genetik 29 %, nampak bahwa aksesori M-08 memisah sendiri dari aksesori lainnya (M-07, M-09, M-10 dan M-13). Berdasarkan pengamatan morfologi menunjukkan bahwa hanya M-08 yang memiliki karakter warna sulur muda kecoklatan. Pada tingkat KKG 91% atau jarak genetik 9% diperoleh subkelompok (A₂) terdiri atas aksesori M-07 dan M-09. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa kedua aksesori ini berasal dari markisa jenis kuning (*P. edulis* Sims f. *flavicarva* Deg).

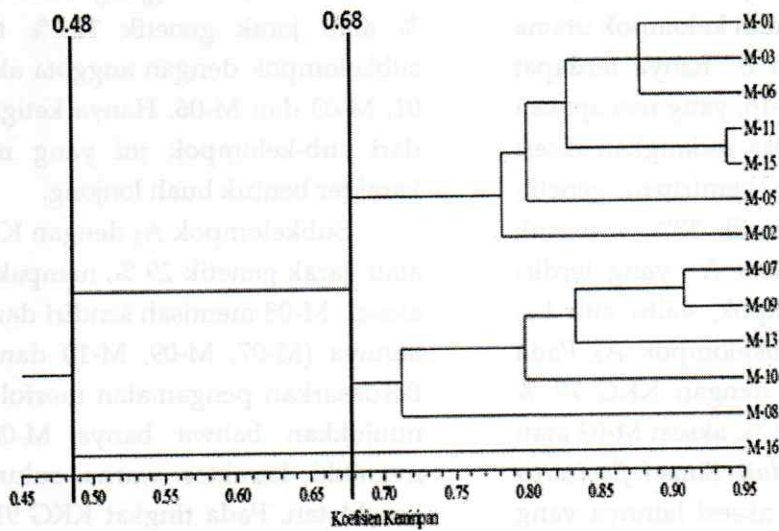
Tabel 2. Primer ISSR yang digunakan untuk analisis keragaman markisa

Marka Spesifik	Sequence (5' -3')	Pita-pita		
		Total	Polimorfik	%
PKBT2	(AC) ₈ TT	9	8	88,8
PKBT3	(AG) ₈ T	7	6	85,7
PKBT7	(GA) ₈ A	4	4	100,
PKBT8	(GA) ₉ C	6	6	100,
PKBT9	(GA) ₉ T	7	6	85,7
PKBT11	(GT) ₉ T	4	4	100,
PKBT4	(AG) ₈ A	8	1	87,5
PKBT6	(AG) ₈ TT	6	2	100,



Gambar 1. Pola pita DNA 13 aksesori markisa pada dua primer ISSR, yaitu PKBT2 (a) dan PKBT7 (b). Lajur (M) Marker (1 kb DNA Ladder); (1) M-01; (2) M-02; (3) M-03; (4) M-05; (5) M-06; (6) M-07; (7) M-08; (8) M-09; (9) M-10; (10) M-11; (11) M-13; (12) M-15; (13) M-16.

Keragaman genetik beberapa aksesori markisa berdasarkan penanda ISSR



Gambar 2. Dendrogram kemiripan genotipik hasil analisis kluster dengan metode pengelompokan UPGMA berdasarkan 51 pola pita DNA.

Tabel 3. Pengelompokan 13 aksesori nenas berdasarkan dendrogram analisis ISSR.

Kelompok Utama	Sub Kelompok	Koefisien kemiripan genetik (%)	Aksesori markisa
A	A ₁	78	M01, M03, M06, M11, M15, M05, dan M02
	A ₂	71	M07, M09, M13, M10, dan M08
B	B ₁	48	M16

Hasil analisis pengelompokan dengan menggunakan primer ISSR telah dilakukan juga pada 46 aksesori rumput gajah (Lima et al., 2011) dan pada 59 varietas padi (Blair et al., 1998).

Analisis Komponen Utama

Analisis komponen utama digunakan untuk mengetahui visualisasi kecenderungan sebaran dan pola pengelompokan genotipe-genotipe yang diuji dalam bentuk diagram pencar dua dimensi. Analisis komponen utama mampu mereduksi data peubah yang berjumlah banyak (multi-dimensi) men-

jadi dimensi yang lebih sedikit (Sumer-tajaya et al., 2003). Analisis komponen utama dari 51 pola pita DNA pada 13 aksesori markisa pada penelitian ini mendapatkan tiga komponen utama dengan keragaman kumulatif sebesar 62,40%. Komponen utama I, II, dan III memiliki % akumulasi keragaman masing-masing sebesar 27,83, 23,47, dan 11,00 (Tabel 4). 19 pola pita direduksi karena memiliki nilai MSA kurang dari 0,5. Hal yang sama dilaporkan Sarwono (2006) dan Simamora (2005), peubah yang memiliki nilai MSA kurang dari 0,5 tidak dapat digunakan dalam analisis faktor. Hasil

Tabel 4. Nilai proporsi keragaman setiap komponen utama 51 pola pita profil ISSR

Komponen utama	Nilai ciri	Persentase keragaman	% Akumulasi keragaman
1	1,43	27,83	27,83
2	1,11	23,47	51,40
3	0,54	11,00	62,40
4	0,44	9,00	71,40

penelitian Santos et al., (2011), menunjukkan bahwa hasil analisis komponen utama 14 peubah morfologi direduksi menjadi dua kom-ponen utama (KU) dengan keragam-an kumulatif sebesar 84%. KU 1 dan KU II memiliki ke-ragaman masing-masing sebesar 48.9% dan 35.12%. Genetik molekuler ber-peranan penting pada berbagai aspek konservasi tanaman seperti untuk deteksi, karakterisasi, dan evaluasi keragaman gene-tik. Karakterisasi yang dulu dilaku-kan secara langsung dengan pengamatan penotipik, sekarang dengan kemajuan dibidang biologi molekuler pengamatan dapat dilakukan dengan lebih teliti pada level DNA, yaitu dengan bantuan penanda DNA. Bila dibanding-kan pengamatan fenotipik, karakterisasi dengan bantuan penanda molekoler menjanjikan akurasi dan efisiensi yang lebih tinggi. Identifikasi dilakukan pada level DNA, tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan dapat dilakukan pada tahap awal per-tumbuhan tanaman (Hiltallmani et al., 1995).

KESIMPULAN

Marka ISSR dapat mendeteksi aksesi markisa dengan menggunakan delapan primer spesifik, yaitu PKBT2, PKBT3, PKBT4, PKBT6, PKBT7, PKBT8, PKBT9,

PKBT11, dan PKBT14. Panjang pita ke 8 primer spesifik berkisar 250-1.000 pasang basa.

Primer PKBT2 menghasilkan pita paling banyak, sedangkan primer PKBT7 menghasilkan jumlah pita paling sedikit. Berdasarkan dendrogram ISSR 13 aksesi markisa, nilai koefisien kemiripan genetik antara 0,48-0,68 (48 %-68 %) atau variasi genetik 32 %-52 %.

Pada nilai koefisien kemiripan genetik 0,48 terbagi menjadi dua kelompok kelompok utama. Hasil analisis komponen utama menun-jukkan bahwa terdapat empat pita utama yang dapat membentuk keragaman sebesar 70,40% dari total 100%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pen-didikan Nasional yang telah membiayai pe-nelitian ini melalui Proyek Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2010.

DAFTAR PUSTAKA

Abreu, S., J. Peixoto, N. Junqueira, and M. Sousa. 2009. Agronomic features of six genotypes of passion fruit cultivated in Distrito Federal, Brazil. *Rev Bras Frutic* 31:920-924.

Keragaman genetik beberapa aksesori markisa berdasarkan penanda ISSR

- Bellon, G, F. Faleiro, J. Peixoto, P. Junqueira, N. Junqueira, K. Fonsceca, and M. Braga. 2009. Genetic diversity obtained from cultivated population and native accesses of sweet passion fruit based on RAPD markers. *Rev. Brasil Frutic* 31:197-202.
- Blair, MW., O. Panaud dan S.R. McCouch. 1998. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98(5):780-792.
- Botstein, D., RL. White, M. Skolnick, and RW. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Cerqueira-Silva, C, C. Cardoso-Silva, L. Conceição, J. Nonato, A. Oliveira, and R. Corrêa. 2009. Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants based on molecular markers and physicochemical descriptors. *Genet. Mol. Res.* 8:870-879.
- Cerqueira-Silva C, C. Cardoso-Silva, E. Santos, L. Conceição, A. Pereira, A. Oliveira, and R. Corrêa. 2010. Genetic diversity in wild species of passion fruit (*Passiflora trintae*) based on molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 9:2123-2130.
- Clyde, MM., PC. Chew, MN. Normah, V. Ramanatha-Rao, and I. Salma. 2005. Genetic diversity of *Nephelium ramboutan-ake* Leenh assessed using RAPD and ISSR. *Acta Hort.* 665:171-181
- Crochemore, M., H. Molinari, and N. Stenzel. 2003a. Agro-morphological of passion fruit (*Passiflora spp.*) germoplasm. *Rev. Brasil de Frutic* 25:5-10.
- Crochemore ML, HBC. Molinari, and LGE. Vieira. 2003b. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora spp.*) evaluated by RAPD markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:521-527
- Doyle, J.J, and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fajardo, D., F. Angel, M. Grum, J. Tohme, M. Lobo, WM. Roca, and I. Sanchez. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica* 101:341-347.
- Fang, DQ., ML. Roose, RR. Krueger, and CT. Federici. 1997. Fingerprinting of trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:211-219.
- Gemas, VJV, MC. Almadanim, R. Tenreiro, A. Martins, and P. Fevereiro. 2004. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. europaea) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 51:501-511.
- Gomes, S., P. Martins-Lopes, J. Lopes, and H. Guedes-Pinto. 2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. *Plant Mol. Biol. Rev.* 27:365-373.
- Gupta, M., YS. Chyi, J. Romero-Severson, and JI. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse

- genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.
- Hiltallmani, S., MR. Foolad, T. Mew, RL. Rodriguez and Huang. 1995. Development of a PCR-Based Marker to Identify Rice Blast Resistance-Gene, Pi-2(t), in a Segregating Population. *Theor. Appl. Gen.* 91:9-14.
- Karsinah, F.H. Silalahi, dan A. Mashur. 2007. Eksplorasi dan karakterisasi plasma nutfah tanaman markisa. *J. Hort.* 17(4): 297-306.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren, and T. Kakanuga. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.* 21:1111-1115
- Lima de RSN., RF. Daher, LSA. Gonçalves, DA. Rossi, AT. do Amaral únior, MG. Pereira and FJS. Léo. 2011. RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. *Genetics and Molecular Research* 10 (3): 1304-1313.
- Manica, I. 1997. Maracujá: Taxonomia-anatomia-morfologia. In: AL. São José, CH. Bruckner, I. Manica, M. Hofmann (eds) Maracujá: Temas selecionados-Melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Cinco Continentes, Porto Alegre, pp 7-24.
- Martins-Lopes, P., J. Lima-Brito, S. Gomes, J. Meirinhos, L. Santos, and H. Guedes-Pinto. 2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: genetic variability and molecular cultivar identification. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54:117-128
- Meyer, W., TG. Mitchell, EZ. Freedman, and R. Vilgays. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 31:2274-2280.
- Moreno, S., JP. Martin, and JM. Ortiz. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101:117-125
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Pádua, J.G., E.J. Oliveira, MI. Zucchi, GCX. Oliveira, LEA. Camargo, and MLC. Vieira. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Mol. Ecol. Notes* 5:863-865.
- Plotze, R., M. Falvo, J. Pádua, L. Bernacci, M. Vieira, G. Oliveira, and O. Bruno. 2005. Leaf shape analysis using the multiscale Minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* (Passifloraceae). *Botany* 83:287-301
- Reddy, M.P., N.Sarla, and EA. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.

- Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, MS. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, TJ. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and ES. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082.
- Weber JL., and PE. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.* 44:388-396
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, JA. Rafalski, and SV. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are usefull as genetic marker. *Nucleic Acids Res.* 18: 125-132.
- Wu K., R. Jones, L. Dannaeburger, and PA. Scolnik. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22:3257-3258.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D.Labuda. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.