

## بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام متحمل و حساس به خشکی گندم

### نان با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای (ISSR)

مریم زر<sup>۱</sup>، جعفر احمدی<sup>۲</sup>، قاسمعلی گروسی<sup>۳</sup>، امیرحسین بیکی<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳، ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه

بین المللی امام خمینی

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۹ - تاریخ پذیرش:

#### چکیده

گندم نان (*Triticum aestivum*) با بیشترین سطح زیرکشت و میزان تولید در ایران همواره با تنفس خشکی به عنوان یکی از عوامل مهم محیطی کاهاشده‌نده عملکرد مواده است. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم جهت کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی و استفاده از آن در طی برنامه‌های اصلاح نباتات از اهمیت بالایی برخوردار است. این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم گندم (۱۵ رقم مقاوم و ۱۱ رقم حساس) از نشانگرهای ISSR استفاده گردید. از ۲۱ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۰ آغازگر الگوی باندی قابل امتیازدهی چندشکل تولید کردند و جهت تکثیر قطعاتی از DNA ژنومی گندم استفاده شدند. در این مطالعه ۱۳۳ مکان ژنی امتیازبندی شدند که از این تعداد ۹۲ مکان چندشکلی نشان دادند. میانگین محتوای چندشکلی اطلاعات (PIC) برای آغازگرها برابر ۰/۳۷ و بالاترین مقدار PIC مربوط به آغازگرهای K13 و UBC 840 (۰/۴) بود. براساس ضریب تشابه جاکارد بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام ویناک (مقاوم) و مرودشت (حساس) و کمترین فاصله بین ارقام امید (مقاوم) و بک کراس روش زمستانه ( مقاوم) بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌ای به روش Ward، ارقام را به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR به طور موثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام گندم استفاده شوند.

#### واژه‌های کلیدی

گندم نان،  
تنوع ژنتیکی،  
ISSR  
PIC

#### مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*) از نظر اهمیت و میزان تولید، اولین غله دنیاست و به عنوان منبع اصلی تامین کننده کالری و پروتئین انسان در کشورهای مختلف جهان و به خصوص کشورهای در حال توسعه شناخته شده است. ارزش غذایی بالا، هضم آسان، تنوع و مرغوبیت فرآورده‌های آن، سهولت تبدیل و نگهداری و سایر خصوصیات، گندم را در میان سایر غلات متمایز کرده است (۱).

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌های گیاهی

برای انجام این تحقیق از بذور ۲۶ رقم گندم نان که از بخش غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شده بود استفاده شد. جدول (۱) مشخصات ارقام مورد استفاده را نشان می‌دهد.

### استخراج DNA ژنومی

بذور ارقام مورد استفاده در گلدانهای مجزا در محیط گلخانه کشت گردیدند و نمونه‌های برگی در مرحله ۵-۶ برگی در اندازه‌های ۰/۲ گرم تقسیم شده و بعد از ثبیت در ازت مایع (دماي ۱۹۶- درجه سانتی گراد) برای استفاده بلندمدت در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA از بافت برگی از روش تغییریافته پیرتیلا و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. بافر استخراج DNA شامل ۱۰۰ میلی مولار تریس (pH=۸) درصد ۵۰ میلی مولار EDTA (pH=۸)، ۲ مولار کلرید سدیم، ۲ درصد ۲ (w/v) هنگزا دستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، ۲ درصد (w/v) پلی ونیل پیرولیدین (PVP)، ۲ درصد (v/v) بتا-مرکاپتواتانول بود. کمیت و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر U.V ساخت کمپانی لبومد انگلستان و ژل آگاروز ۰/۸ درصد تعیین گردید.

### واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

در این تحقیق از ۲۱ آغازگر ISSR که براساس مطالعات قبلی (۳، ۱۲، ۱۵) انتخاب شده بودند استفاده گردید. ۱۱ آغازگر الگوی باندی قابل امتیازدهی تولید کردند که از بین آنها ۱۰ آغازگر چندشکل بوده و برای بررسی تنوع ارقام مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). تکثیر قطعات DNA با واکنش پی سی آر در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از Master kit (شرکت سینا ژن) انجام گرفت. در ترموسایکلر تکنه مدل گردادیان تی سی (ساخت آلمان) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به- مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (۴۷ تا ۵۶ درجه سانتی گراد) به مدت یک دقیقه، توسعه

امروزه با توجه به توسعه نشانگرهای DNA و قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی آنها، به طور گستردگی از این نشانگرهای کشاورزی استفاده می‌شود. یکی از این نشانگرهای ISSR می‌باشد که می‌توان از آن به عنوان ابزاری مفید در نقشه‌یابی و انگشت-نگاری ژنتیکی استفاده کرد. این روش به DNA الگوی کمی نیاز داشته و به علت طول زیاد آغازگرها، دمای بالای اتصال، سرعت و سادگی فنی و رفتار مندلی ممکن است به سرعت ابزاری با ارزش برای تجزیه ژنوم گندم در آینده نزدیک محسوب شوند (۴). Pasqualone و همکاران (۲۰۰۰) کارآیی بالای نشانگرهای ISSR را برای شناسایی ارقام گندم ماکارونی گزارش نمودند (۱۳). Nagaoka و Ogihara (۱۹۹۷) نشان دادند که ISSR ها در گندم در مقایسه با نشانگرهای RAPD و AFLP اطلاعات مفیدتری را ارائه می‌دهند (۱۲). کارآیی بالای نشانگرهای ISSR برای مکانیابی ژن‌های مفید در کشاورزی اولین بار توسط Akagi (۱۹۹۶) در برنج گزارش گردید (۲). Tsumura (۱۹۹۶) توارث مندلی نشانگرهای ISSR را در کاج و گیاه همیشه بهار گزارش کرد (۱۸). Ratnaparke (۱۹۹۸) یک نشانگر ISSR پیوسته با ژن مقاومت به پلاسیده شدن فوزاریومی در این گیاه معرفی کرد (۱۶). Ammiraju و همکاران (۲۰۰۱) با مطالعه نشانگر ISSR روی اندازه دانه گندم نشان دادند که ISSR ها برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن‌های بزرگ اثر کنترل کننده صفات مهم گندم مفید هستند (۴). استفاده از نشانگرهای ISSR بدليل نیاز نداشتن به اطلاعات قبلی در مورد توالی هدف در مقایسه با نشانگر SSR آسان است (۱۸). Sofalian و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای بومی گندمهای شمال غرب ایران با استفاده از نشانگر ISSR، سطح بالایی از چندشکلی ISSR را گزارش کردند. آنها همچنین اظهار داشتند که نشانگرهای ISSR کارآمدترین ابزار برای تخمین تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای در گندم است (۱۷). نشانگرهای ISSR جهت برآورده تنوع ژنتیکی در محصولات زراعی اصلی مانند ذرت (۹)، گندم (۱۲)، برنج (۵) و جو (۶، ۷) با موفقیت استفاده گردیده است. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام مقاوم و حساس به خشکی گندم با نشانگرهای ISSR بود.

ارقام باستفاده از روش Ward مبتنی بر ضرایب تشابه جاکارد در نرمافزار NTYSYS spc 2.02 انجام گرفت. برای اطلاع از میزان ارتباط بین دندروگرام حاصل از تجزیه خوشای و ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفتیک با نرمافزار مذکور محاسبه شد.

محتوای اطلاعات چند شکل Polymorphic Information Content (PIC) و نیز شاخص نشانگری Marker Index (MI) برای آغازگرها محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفتند. معیار PIC برای هر نشانگر از رابطه  $q_i^2 - p_i^2$  بدست آمد که در آن  $p_i$  فراوانی آلل یک (آلل تولید کننده باند) و  $q_i$  فراوانی آلل صفر بود.

شاخص نشانگر نیز از رابطه  $MI = PIC \times EMR$  بدست آمد. نسبت چندگانه موثر Effective Multiplex Ratio (EMR) از نسبت نشانگر های چندشکا به کا، نشانگر ها محاسبه گردید (۱۵).

رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و با توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه دنبال شد.

الكتروفورز مصادر و اکنث زنجیره‌ای پلی مراز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر TBE (۹۰ میلی مولار تریس، ۹۰ میلی مولار اسیدبوریک و دو میلی مولار EDTA) به مدت ۳ ساعت در ولتاژ ثابت ۸۵ ولت انجام گرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل‌ها با محلول اتیدیوم بروماید، عکس‌برداری زیر نور ماوراء‌بنفسش با دستگاه ترانس‌ایلومیناتور ساخت شرکت U.V.P آمریکا انجام شد. باندهای توسعه یافته به صورت حضور (۱) و عدم حضور باند (صفر) امتیازدھی گردیدند. به منظور برآورد جرم ملکولی قطعات DNA تکثیر شده از DNA Ladder با دامنه وزن ملکولی ۲۵۰ الی ۱۰۰۰ جفت باز استفاده شد. تجزیه خوش‌های پرای گروه‌بندی

## جدول ۱- مشخصات ارقام استفاده شده در تحقیق

نام رقم	وضعیت تحمل به تنش	نام رقم	وضعیت تحمل به تنش	نام رقم
روشن	R	مقاوم	مرودشت	S
امید	R	مقاوم	مهدوی	S
پیشناز	R	مقاوم	آزادی	S
چمران	R	مقاوم	قدس	S
زاگرس	R	مقاوم	شهریار	S
کویر	R	مقاوم	تونس	S
بک کراس روشن(بهاره)	R	مقاوم	الموت	S
بک کراس روشن(زمستانه)	R	مقاوم	شیراز	S
الوند	R	مقاوم	نوید	S
نیک نژاد	R	مقاوم	بزوستایا	S
سباهان	R	مقاوم	گاسپارد	S
سرداری	R	مقاوم		
سبلان	R	مقاوم		
کراس شاهی	R	مقاوم		
ویناک	R	مقاوم		

جدول ۲- توالی نوکلوتیدی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

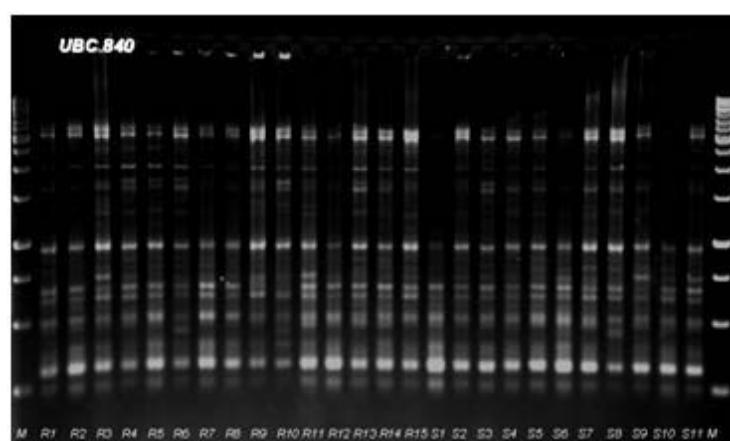
آغازگر	تمای اتصال (سانتی گراد) (5'-3')	توالی آغازگر
K 13	۵۴	(AG) <sub>8</sub> YT
K 16	۵۴	(CA) <sub>8</sub> RC
ISSR 17899 A	۴۴	(CA) <sub>6</sub> AG
ISSR 17899 B	۴۴	(CA) <sub>6</sub> GG
UBC 818	۵۵	G(GGGGT) <sub>3</sub>
UBC 834	۵۵	TT(AG) <sub>8</sub>
UBC 840	۵۳	TT(GA) <sub>8</sub>
UBC 856	۵۶	YA(AC) <sub>8</sub>
UBC 872	۴۷	(GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>
K10	۵۴	(AC) <sub>8</sub> YG

## نتایج و بحث

نتایج این آزمایش نشان داد که برخی از آغازگرهای با موتیف دونوکلئوتیدی چندشکلی بالاتری نسبت به آغازگرهای با موتیف چهار نوکلئوتیدی دارند (۱۲). به طور کلی متوسط تعداد باند در آغازگرها معادل ۲۷۲ و متوسط آن در ارقام ۹ بود. از ۱۳۳ مکان تکثیر شده توسط ۱۰ آغازگر، ۹۲ مکان ثانی (۶۶/۲ درصد) چندشکل بود (جدول ۳).

ضریب همبستگی کوفتیک دندروگرامهای حاصل از ضریب تشابه جاکارد ( $r = 0.86$ ) بزرگتر از ضریب همبستگی کوفتیک دندروگرامهای حاصل از ضرایب تشابه دایس و تطابق ساده بود، لذا ادامه تجزیه خوشای بر اساس نتایج حاصل از ضریب تشابه جاکارد انجام گرفت. با توجه به دندروگرام حاصل (شکل ۲) بیشتر ارقام متعلق به دو گروه اصلی بودند. بقیه ارقام به صورت منفرد در گروههای جداگانه قرار گرفتند.

از ۲۱ آغازگر ISSR مورد استفاده در این تحقیق، ۱۱ آغازگر الگوی باندی واضح و تکرارپذیر تولید نمودند که از بین آنها ۱۰ آغازگر چندشکلی نشان دادند (شکل ۱) و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. میانگین درصد چندشکلی ایجاد شده توسط ۱۰ آغازگر ۶۲/۸ درصد بود. بالاترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر K16 بود. طبق نتایج Akkaya (۱۹۹۲) آغازگرهای دارای موتیف GA، سطح پایین‌تری از چندشکلی را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان می‌دهند، ولی در این مطالعه آغازگر UBC 840 با موتیف GA، چندشکلی بالائی نشان داد (۳). در مقایسه با نتایج Nagaoka و Oghihara (۱۹۹۷) که چندشکلی تولید شده از آغازگرهای با موتیف ۴ نوکلئوتیدی را بالاتر از آغازگرهای با موتیف دو نوکلئوتیدی گزارش کردند،

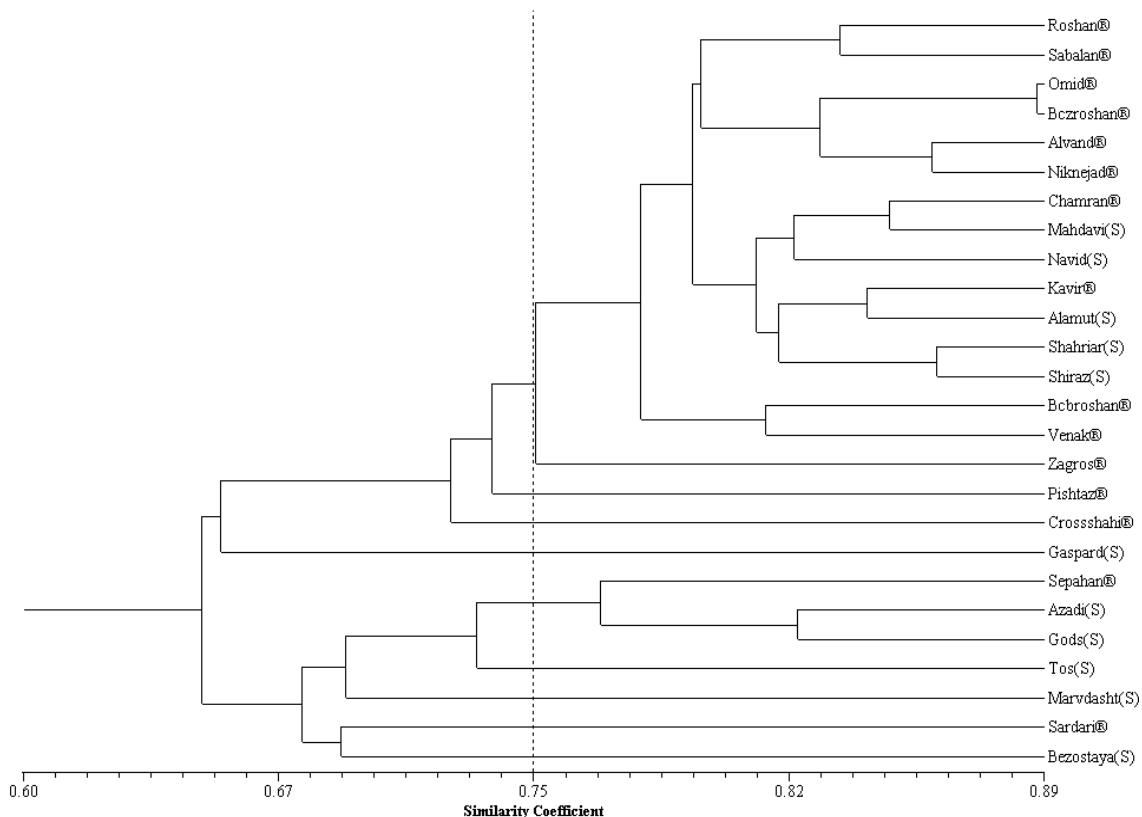


شکل ۱- الگوی باندی DNA های تکثیر شده از ۲۶ رقم گندم توسط آغازگر UBC840

جدول ۳- درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI)

در مطالعه تنوع ۲۶ رقم گندم نان

کد آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد باندهای تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
K 13	۱۹	۳۷۷	۱۴	۰/۷۴	۰/۴۰	۴/۳۴
K 16	۱۴	۲۷۲	۱۳	۰/۹۳	۰/۳۴	۳/۲۸
ISSR17899A	۱۵	۳۲۳	۸	۰/۵۳	۰/۳۶	۲/۳۷
ISSR 1789 B	۱۱	۲۱۳	۹	۰/۸۲	۰/۳۷	۲/۴۶
UBC 818	۸	۱۳۵	۶	۰/۷۵	۰/۴۰	۱/۵۱
UBC 834	۱۱	۲۴۰	۶	۰/۵۵	۰/۳۳	۱/۶۶
UBC 840	۱۸	۳۵۶	۱۳	۰/۷۲	۰/۴۰	۳/۹۹
UBC 856	۱۴	۳۰۴	۸	۰/۵۷	۰/۲۵	۱/۶۴
UBC 872	۱۱	۲۴۴	۷	۰/۶۴	۰/۳۲	۱/۸۹
K 10	۱۲	۲۷۳	۸	۰/۶۷	۰/۲۵	۱/۷۵



شکل ۲- دنдрوگرام ۲۶ رقم گندم با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بر اساس روش ward

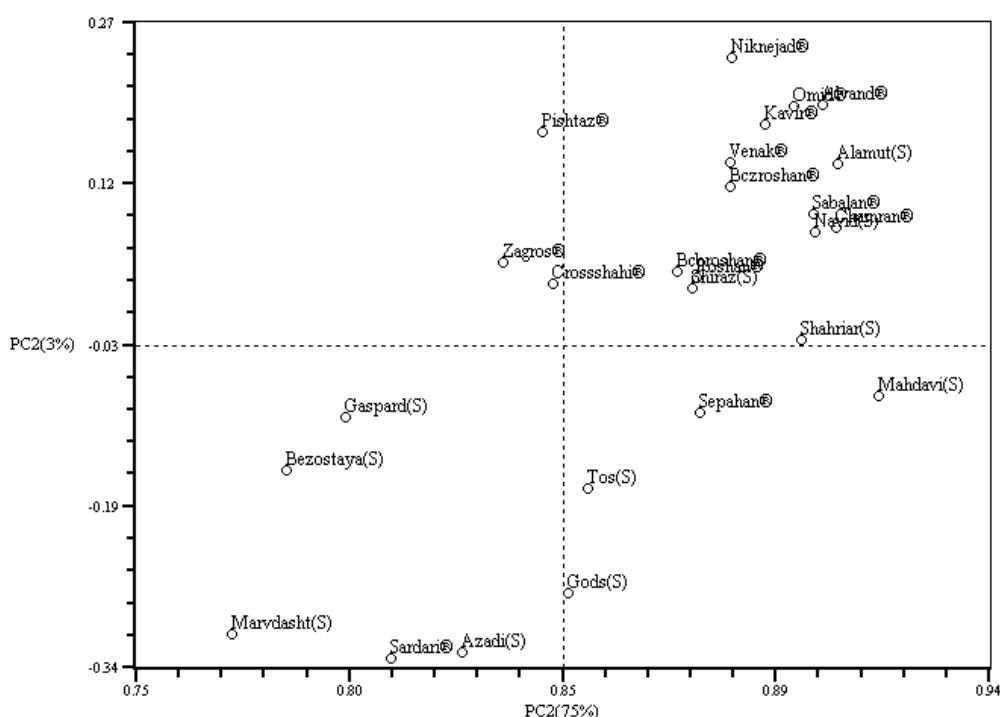
آغازگرهای (MI=۴/۳) K13 840 UBC و (MI=۳/۹) K16 شاخص نشانگری بالاتری را نسبت به سایر آغازگرها نشان دادند. شاخص MI یک معیار کارائی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد. به طورکلی MI می‌تواند بعنوان یک معیار کلی برای پیشگوئی کارائی نشانگر در یک ژرم پلاسم استفاده گردد (۱۵).

تجزیه به مختصات اصلی براساس ماتریس تشابه جاکارد و باستفاده از نرمافزار spc 2.02 NTYSYS انجام گرفت. ۱۰ مولفه اول ۹۰ درصد واریانس داده‌ها را توجیه کردند. با توجه به اینکه دو مولفه اول نزدیک به ۷۸ درصد واریانس اولیه در مجموعه مورد مطالعه را توجیه می‌کرد لذا نمودار دو بعدی افراد مورد مطالعه براساس این دو مولفه نیز رسم گردید (۱۱). همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود ارقام حساس مرودشت، آزادی، بزوستایا، گاسپارد، قدس و تووس جدا از سایر ارقام در ربع اول نمودار قرار گرفته‌اند. بهمین ترتیب اکثریت ارقام مقاوم در ربع سوم نمودار تجمع یافته‌اند. ارقام مقاوم و حساسی که بطور غیرصحیح در نواحی اول و سوم قرار گرفته‌اند را می‌توان با سایر عوامل دخیل در گروه‌بندی به غیر از صفات مقاومت و حساسیت آن ارقام توجیه نمود. در نتیجه گیری نهایی از این تحقیق مشخص شد که نشانگرها مورداستفاده در این آزمایش به طور قابل توجهی از طریق گروه‌بندی با هر دو روش تجزیه خوش‌های و تجزیه به مختصات اصلی، ارقام مقاوم و حساس را تا اندازه‌ای از هم‌دیگر تشخیص دادند. البته این تفکیک می‌تواند به عواملی غیر از مقاوم و حساس بودن ارقام نیز مرتبط باشد. بنابراین بهترین توصیه این است که از این آغازگرها که چندشکلی قابل قبولی را در این مطالعه نشان دادند در مطالعات آینده در گندم استفاده شود و همچنین در تهیه جمعیت‌های نقشه یابی علاوه بر درنظر گرفتن مقاوم و حساس بودن، فاصله ژنتیکی بدست آمده بر اساس این مطالعه نیز لحاظ شود.

گروه اصلی اول به چهار زیر گروه تقسیم گردید. در زیر گروه اول به ترتیب ارقام روشن، سبلان، امید، بک کراس روشن (زمستانه)، الوند و نیک نژاد قرار گرفتند، تمام ارقام قرار گرفته در این گروه متحمل به خشکی بودند. در زیر گروه دوم به ترتیب ارقام چمران، مهدوی، نوید، کویر، الموت، شهریار و شیراز قرار گرفتند که بیشتر ارقام متعلق به این گروه از نوع حساس به خشکی بودند. زیر گروه سوم شامل دو رقم مقاوم بک کراس روشن بهاره و ویناک بود و رقم مقاوم زاگرس به صورت منفرد در زیر گروه چهارم قرار گرفته است. گروه اصلی دوم شامل دو زیر گروه که ارقام حساس آزادی و قدس در زیر گروه اول و رقم مقاوم سپاهان در زیر گروه دوم قرار گرفت. فاصله ژنتیکی ۲۶ رقم مورد بررسی در این آزمایش از طریق ضرب تشابه جاکارد اندازه‌گیری شد. بیشترین فاصله بین ارقام ویناک ( مقاوم) و مرودشت (حساس) با میزان تشابه ۰/۶ و کمترین فاصله ژنتیکی بین ارقام امید ( مقاوم) و بک کراس روشن زستانه ( مقاوم) با میزان تشابه ۰/۸۹ بود. میزان تشابه بین ارقام مورد بررسی از ۰/۶ الی ۰/۸۹ متغیر بود.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فراوانی آللی برای هر آغازگر بطور جداگانه محاسبه گردید (جدول ۳). بالاترین مقدار PIC مربوط به آغازگر ۸۴۰ K13 و ۰/۴ UBC بود. آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از PIC بالاتری برخوردار بودند که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارائی بالای آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد. لذا می‌توان از این آغازگرها به خوبی برای بررسی ژرم‌پلاسم‌های گندم بهره گرفت. میانگین PIC برای آغازگرهای انتخاب شده در این آزمایش برابر ۰/۳۷ است درحالی که در مطالعات Hou و همکاران (۲۰۰۵ و ۲۰۰۶) برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام جو با استفاده از نشانگرها ISSR، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۶۴ و ۰/۴۲ گزارش شد (۸). طبق بررسی‌های Ma و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی تنوع ژنتیکی گندم نان با استفاده از نشانگرها محتوای اطلاعات چندشکل را بین ۰/۶۰-۰/۹۴ با میانگین ۰/۷۹ گزارش نمودند (۱۰). شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه بین ۱/۵ تا ۴/۳ متغیر بود (جدول ۳)

شکل ۳- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه مختصات اصلی مبتنی بر ماتریس تشابه جاکارد



## منابع

7. Hou, Y. C., Z. H. Yan, Y. M. Wei and Y. L. Zheng. 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetic Newsletter. 35: 9–12.
8. Hou, Y. C., Yan, Z. H., Lan, X. J., Wei, Y. M. and Zheng, Y. L. 2006. Genetic diversity among barley germplasm with known origins based on the RAMP and ISSR markers. Scientia Agricultura Sinica.
9. Kantety, R. V., X. P. Zeng, J. L. Bennetzen and B. E. Zehr. 1995. Assesment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding. 1: 365–373.
10. Ma ,Y. M., Li ,S. S., Fan, Y. D., Sun, H. Y., Li, Y. X. and Li, R. J. 2006. Genetic diversity of ISSR loci for wheat cultivars of Huang-Huai winter wheat region. Journal of Plant Genetic Resources. 15: 334-340.
11. Mohamadi, S. A and M. Prassana. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tolls and considerations. Crop of Science. 43: 1235- 1248.
12. Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical Applied Genetics. 94: 597–602.
13. Pasqualone, A. C., A. Lotti. 2000. Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. In: Royo C, Nachit MM, Di Fonzo N, Araus JL (eds) Proc. Durum wheat improvement in the Mediterranean region: new challenges. Zaragoza (Spain). 40:157–161.

1. عبدالمیشانی، س.، شاه نجات بوشهری، ع. ۱۳۷۶. اصلاح نباتات تکمیلی، انتشارات دانشگاه تهران.
2. Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki, A. Nakamura and T. Fujimura. 1996. A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting. Genome. 39: 1205–1209.
3. Akkaya, M. S., A. A. Bhagwat and P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics. 132: 1131–1139.
4. Ammiraju, J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M.D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theoretical Applied Genetics. 102: 726-732.
5. Blair, M. W., O. Panaud and S. R. Mc Couch. 1999. Inter- simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of micro-satellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical Applied Genetics. 98: 780–792.
6. Brantestam, A. K., R .V. Bothmer, C. Dayteg, I. Rashal, S. Tuveson and J. Weibull. 2004. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationship in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. Heredity. 141: 186–192.

14. Pirttila, A. M., M. Hirsikorpi, T. Kamarainen, L. Jaakola and A. Hohtola. 2001. DNA isolation method for medicinal and aromatic plants. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 273-278.
15. Powell, W., Morgante, M., Andre, C. Hanafey, M. Vogel, J. Tingey, S. and Rafalski, A (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular and Breeding. 2: 225–238.
16. Ratnaparke, M. B., D. K. Santra, A. Tullu and F. J. Muehlbeur. 1998. Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. Theoretical Applied Genetics. 96:348–353.
17. Sofalian, O., N. Chaparzadeh, A. Javanmard and M.S. Hejazi. 2008. Study the genetic diversity of wheat landraces from northwest of Iran based on ISSR molecular markers. International Journal of Agriculture and Biology. 10: 465–468.
18. Tsumura, Y., K. Ohba and S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theoretical Applied Genetics. 92: 40-45.