التنوع الوراثي لدى الماعز الجبلي السوري باستخدام تقنية(ISSR-PCR)

أيهم العلي - بسام عيسى - سلام لاوند

The GENETIC Diversity in syrian Mountain Goat using(ISSR-PCR)

الملخص

يعد الماعز الجبلي في سورية من الحيوانات الزراعية المحلية المهمة، لما يملكه من مزايا ومواصفات تمكنه من الإنتاج والتناسل تحت الظروف البيئية القاسية, وقد استخدم في برامج الخلط التربوي مع الماعز الشامي كمانح لمورثات صفات التأقلم ومقاومة الأمراض.

رغم ذلك مازال هذا الحيوان بعيداً عن ساحة البحث العلمي, فضلاً عن تعرضه من مربي الماعز لعملية خلط عشوائي مع الماعز الشامي, مما أدى وعلى المدى الطويل إلى ضياع مصدر وراثي حيواني محلي مهم لم تكتشف كل مزاياه.

تم في هذا البحث دراسة التنوع الوراثي عند مجموعات من الماعز الجبلي النقي الموجودة في محطة بحوث عرى في محافظة السويداء باستخدام تقنية (ISSR), وأشارت النتائج إلى وجود تنوع وراثي جزيئي بين عينات الماعز المدروسة تراوح بين تشابه بنسبة (%41 حتى %85)، و تباعد وصل لدرجة اختلاف مقدارها (%59) أما بالنسبة للتعددية الشكلية فقد بلغت (%92.8).

الكلمات المفتاحية: ماعز جبلي سوري, التنوع الوراثي, التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية.

المقدمة

إن صيانة وتطوير الموارد الوراثية تعد من أولويات مهام المؤسسات العلمية لأنها من ثروات الدولة الحيوية والاقتصادية والثقافية. من هذه الثروات الحيوانية المحلية يبرز الماعز الجبلي السوري الذي يملك قدرات وكفاءات عالية في تكوينه تمكنه من الرعي بالمناطق الجبلية الوعرة لحدٍ لا ينافسه أي من الحيوانات الزراعية على ذلك, إضافة لانخفاض تكاليف إنتاجه من الحليب واللحم مقارنة ببقية الحيوانات الزراعية مما أدى لتسميته (بقرة الفقير)، حيث يعد الماعز الجبلي من الحيوانات ثنائية الغرض فهو يربى للحليب واللحم ويستخدم شعره في صناعة الخيام, ويشكل الماعز الجبلي حوالي (85%) من الماعز الموجود في سوريا (وزارة الزراعة-مديرية الإحصاء2010), و يتميز بأنف مستقيم وآذان طويلة متدلية, واللون السائد هو اللون الأسود، له قرون مائلة إلى الخلف في الإناث, أما في الذكور فهي طويلة وغليظة مائلة إلى الخلف والأمام بشكل حلزوني.

تزن الأنثى حوالي (30-35) كغ والذكر (40-60) كغ. ويبلغ إنتاج الحليب (150-200) كغ بنسبة دهن 4% . وتلد الإناث مرة واحدة في العام ويتراوح عدد المواليد في البطن الواحد (1-3) مولود ولكن نسبة التوائم فيها قليلة مقارنة بالماعز الشامي.

إلا أن هذه الثروة المحلية كبقية الثروات تحتاج إلى متابعة علمية توفر لها استمرار البقاء والتطور لاسيما أن بعض النتائج الأولية لبرامج التحسين الوراثي أشارت إلى امتلاكه لإمكانيات وراثية يمكن أن تستغل لتطويره.

و تبرز تقانة الوراثة الجزيئية كأسلوب حيوي يساهم في التعرف على هذه الحيوانات بطريقة غير تقليدية لأنه يكشف عن أحد أهم مواقع تطويرها وهو

موروثها الجزيئي. و مع تقدم طرائق البحث العلمي وتطور تقانات التجارب انتقلت الدراسة من المستوى الشكلي والخليوي والفيزيولوجي والكيمياحيوي إلى المستوى الجزيئي الذي يدرس الحمض النووي بشكل رئيسي.

الدراسة المرجعية

تتنوع العلامات الجزيئية التي تستخدم في الكشف عن التنوع الوراثي داخل وبين الأنواع, وقد استخدم في هذه الدراسة تقنية وراثية مهمة وهي (ISSR) (Inter Simple Sequence Repeats) (أي التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية) التي تعتمد على تضخيم المواقع (100-3000 bp) بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Zietkiewicez *et al*.,1994) و باستخدام مرئسات وحيدة طولها (16-18bp) ومؤلفة من نكيلوتيدات متكررة، ومحاطة في أغلب الأحيان بـــ (2-4) نيكليوتيدات إما في المنطقة (5) أو (3) (Nagragu et al.,2002) (Bornet et al.,2002) وعادة ما يضخم (ISSR) (25-50) منتجاً في التفاعل الواحد ويمكن أن يكون عدد الحزم المنتجة مرتبطاً بشكل عكسي مع عدد النيكلوتيدات في وحدة تكرار المحضر.

إن الفائدة الرئيسية لهذه التقنية هي أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً، وعلى الرغم من حقيقة كونها تورث كمعلمات سائدة وأحياناً غير سائدة, إلا أنها معلمات ذات طبيعة عشوائية, فهي مناسبة بشكل خاص لدراسة علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف.

(Gupta et al.,1994, Fang and Roos, 1997, Wolf et al.,1998, Blier et al.,1999, Jain et al.,1999, Cavan et al.,2000, Raina et al.,2001, Karben et al.,2002)

إضافة لذلك، فإن بساطة معلمات (ISSR) (أي التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية) تزيدمن إمكانية استخدامهافي الوسم المجيني (Ammiraju et al.,2001) إضافة إلى أن معلمات ISSR تتميز بأنها غزيرة فإنها تعطي عدداً

كبيراً من الحزم, ومستوى التعددية الشكلية عالي إلى متوسط, وطبيعة التوريث سائد إلى متنحي, والقدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة, والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض (Van der nest et al., 2000).

باختصار فإن هذه التقنية تعد بسيطة وسريعة وذات مصداقية عالية ولها الميزات نفسها لمعلمات التعددية الشكلية للحمض النووي (DNA) المضخم عشوائياً (Random Amplified Polymoirphic DNA) (RAPD) والتعددية الشكلية لقطع (DNA) المهضومة بأنزيمات التقييد المضخمة (AFLP) (Amplified Fragment Length Polymoirphic) و (SSR). ويمكن تصميم بادئاتها بسهولة وبدون معلومات مسبقة عن التسلسل المجيني لقطعة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسيجين المستهدف, كما أنها تعطي حزماً ذات تعددية شكلية عالية, وتستخدم وبشكل واسع في مجالات تحديد الأصناف, ورسم الخرائط الوراثية, والتنوع الوراثي (Rakoczy–Troganowska.M and Bolibok.H, 2004) و (Qian et al.,2007). وبالحديث عن استخدامات تقنية ISSR في التحاليل الوراثية عند الحيوانات فقد تعددت أهدافها وتعددت موادها. حيث استفاد (Bai Xiu-jual and li Hui, 2001) من تقنية ISSR عند دجاج اللحم للانتخاب لصفة أقل كثافة من الليبوبروتين عند الجيل الثالث لنسبين أحدهما نحيل و الآخر سمين. كما وقام (Glazko V1 et al.,1999) بتحاليل مقارنة للتمايزات الوراثية بين ثلاثة أنواع بقرية: ذكور أوروبية و أمريكية مع الأبقار، وذلك باستخدام أنماط مختلفة من المعلمات الوراثية الجزيئية والكيمياء الحيوية التوريثية ومعلمات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسيجين DNA مثل: (ISSR-PCR) و (RAPD-PCR) حيث ظهر أن تقدير العلامات الوراثية داخل الأنواع كانت مرتبطة مع المعلمات الوراثية الجزيئية المحددة التي تضمنتها الدراسة بشكل أكبر عند مقارنتها مع معلمات تنتمي لنموذج لا على التعيين.

كما قام (Bai Xiu- jua,2004) باستخدام تقنية (ISSR) لدراسة التشابه الوراثي بين النمور الموجودة في مركز (Hengdaohezi Breeding Center) وبين النمور الموجودة في مقاطعة (Heilongjiang) حيث تم أخذ (15 نمراً) من كل مجمع واتضح أن التشابه الوراثي بين العينات في المجمع الأول (0.5263) وكان التشابه الوراثي بين عينات المجمع الثاني (0.0909).

وفي مجال استخدام ISSR عند الماعز فقد تمكن الفريق البحثي (Wang Jie et al.,2009) من دراسة الاختلاف الوراثي الجزيئي بين مجموعتين من أفراد الماعز التيبيتي إحداها ذات غارب مرتفع والثانية ذات غارب منخفض.

أما فيما يتعلق بدراستنا الحالية وبشكل مباشر أي دراسة التنوع الوراثي عند الماعز الجبلي باستخدام تقنية (ISSR). فقد استخدم (Wang Yong et al.,2010) هذه التقنية لتحليل التنوع الوراثي عند مجتمعات الماعز التيبيتي في منطقة (ريتو كونتي) حيث اختيرت (10 بادئات) من بين (93 بادئة ISSR) ثم استخدمت للكشف عن التنوع الوراثي في (107) عينة من الماعز التيبيتي, حيث أعطت هذه البادئات العشرة (112حزمةDNA) من ضمنها (75حزمة) متعددة شكلياً، وكان حجم القطع المضخمة يتراوح بين (219- 2534 bp), مما يؤكد نوعية هذه البادئات التي استطاعت إنتاج فقط حزم متعددة شكلياً, كما أكدت النتائج أيضاً أن مجتمع الماعز المدروس يبدي مستوى عالي للتنوع والإختلاف الوراثي الموجود ضمن الأفراد.

أهمية البحث وأهدافه

إن الدراسات على المستوى الجزيئي في الماعز الجبلي السوري ما تزال قليلة جداً، لذلك تم في هذا البحث استخدام تقنية ISSR من أجل تحليل التنوع الوراثي في مجتمع الماعز الجبلي السوري والاستفادة من هذا التنوع لوضع لبنة يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي لهذا الحيوان وعدم الاستهتار بهذه المادة

الوراثية وحفظها من الضياع لما تتميز به من خصائص ومواصفات.

مواد البحث وطرائقه

1- حيوانات التجربة:

تم الحصول على عينات من دم الماعز الجبلي النقي الموجود في محطة بحوث عرى (محافظة السويداء) التابع لهيئة البحوث العلمية الزراعية , حيث تم اختيار (13) عينة من الماعز الجبلي الخالي من الأمراض و الإصابات و الآفات.

2- مكان تنفيذ البحث

نفذ البحث في قسم الإنتاج الحيواني و مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة_جامعة دمشق.

3- استخلاص الحمض الريبي النووي DNA

تم استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) وذلك وفق (Nonorganic extraction of DNA from whole blood salting out method)، حيث:

جمعت عينات الدم الكامل في أنابيب مخلاة تحوي (EDTA) وخزنت في درجة حرارة أقل من ($4\ C^{o}$). ثم وضع(1 ml) من الدم الكامل في أنبوب, وتم إضافة (1 ml) من محلول حال للخلايا(0.32 مم سكروز، 10مم Tris-Hcl، PH=7.6، 5مم Mgcl2، 1%(Triton^{R} x-100)) إلى الأنبوب، ونقل الأنبوب بسرعة (4000 rpm) لمدة 5 دقائق. ثم أعيدت هذه المرحلة مرة ثانية. يضاف

بعد ذلك (500 µl) من محلول هضم البروتين(10مم Tris-Hcl ، PH=8 ، 10مم Nacl ، 10مم EDTA) إلى الأنبوب.

ثم نثقل الأنبوب بسرعة (4000 rpm). وبعدها نضيف (225 µl) من محلول هضم البروتين، و (25 µl) من محلول البروتيناز (k) (10 mg/ml) إلى الأنبوب من أجل التخلص من البروتينات. بعد ذلك نضع الأنبوب في درجة حرارة ($65\ C^{O}$) في حمام حراري, ثم وضع الأنبوب لمدة ساعتين. بعدها نثقل الأنبوب لمدة (2) دقيقة بسرعة (10000 rpm).

يتم ترسيب DNA باستخدام 0.6 من الحجم الكلي بالإيزوبروبانول، ويترك الأنبوب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة ($-20\ C^{O}$) ثم يثقل لمدة 5 دقائق بسرعة (10000 rpm) ليضاف بعد ذلك الكحول 70% لغسل الحمض النووي DNA ويترك ليجف ويضاف بعد ذلك الماء المقطر والمعقم، و يحفظ بدرجة حرارة ($-20\ C^{O}$) حتى الاستخدام.

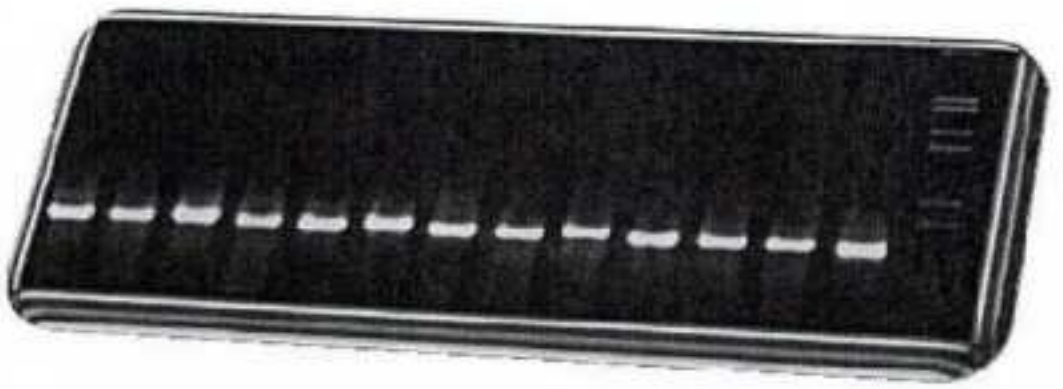
تحل عينات الحمض الريبي النووي DNA و توضع بدرجة حرارة أقل من ($-20\ C^{O}$) حتى الإستخدام.

4_ التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبي النووي (DNA)

يتم استخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي UV Spectrophotometer لتقدير كمية الحمض النووي في العينات ويعتمد مبدأ عمله على قياس كمية

الـــحمض النووي الموجودة في العينات وذلك عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية بأطوال موجات (260–280) نانومتر وأيضاً لتحديد نقاوة الـــحمض النووي. حيث تحمل كمية قليلة من الـــحمض النووي المستخلص في هلامة الآغاروز (0.8%) المضاف إليها إيثيديوم بروماید لتحديد نوعيتها والتأكد من عدم تقطعها. الشكل (1).

حيث تراوحت النقاوة بين (1.85 , 1.94). والتركيز بين (0.26 , 0.45 (mg/ml



شكل (1) هلامة الآغاروز بتركيز 0.8% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA.

5– تضخيم الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

تمت عملية حل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) في الماء المقطر والمعقم للوصول إلى التركيز (40 mg/ml). ثم أجري تضخيم (DNA) باستخدام (13بادئة) (ISSR) ، أربع بادئات منها لم تعطِ نتائج ، و (9 بادئات) أعطت نتائج تضخيم.

يحوي الأنبوب الواحد أثناء عملية التضخيم (PCR) على (25 µl) متضمنة: 12.5 µl (Master Mix) من شركة (Promega)، و (8.5 µl) ماء مقطر معقم، و (2 µl) من محلول البادئ المستخدم ذو التركيز (10 mM)، و(2 µl) من

محلول الحمض الريبي النووي DNA ذو التركيز (40 ng/µl). وأجريت عملية التضخيم ضمن جهاز التضخيم الحراري (جهاز Techne TC-512).

عملية التضخيم تتألف من (35 دورة) وكل دورة مؤلفة من ثلاث مراحل:

	درجة الحرارة	مدة المرحلة
مرحلة التفكيك الحراري Denaturation	94 C°	30 ثانية
مرحلةالالتحامAnnealing	درجة الحرارة المذكورة بالجدول (1) حسب البادئة المستخدمة	30 ثانية
مرحلةالاستطالة Extension	72 C°	60 ثانية

ثم يترك الأنبوب لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 72 C° لإتمام جميع التفاعلات.

و يبين الجدول رقم (1) رموز البادئات المستخدمة في عملية التضخيم (PCR)، وتسلسلها النيكليوتيدي، ودرجات حرارة الإلتحام لكل منها.

الجدول (1). الرموز و التسلسل النيكليوتيدي و درجات حرارة الإلتحام للبادئات المستخدمة

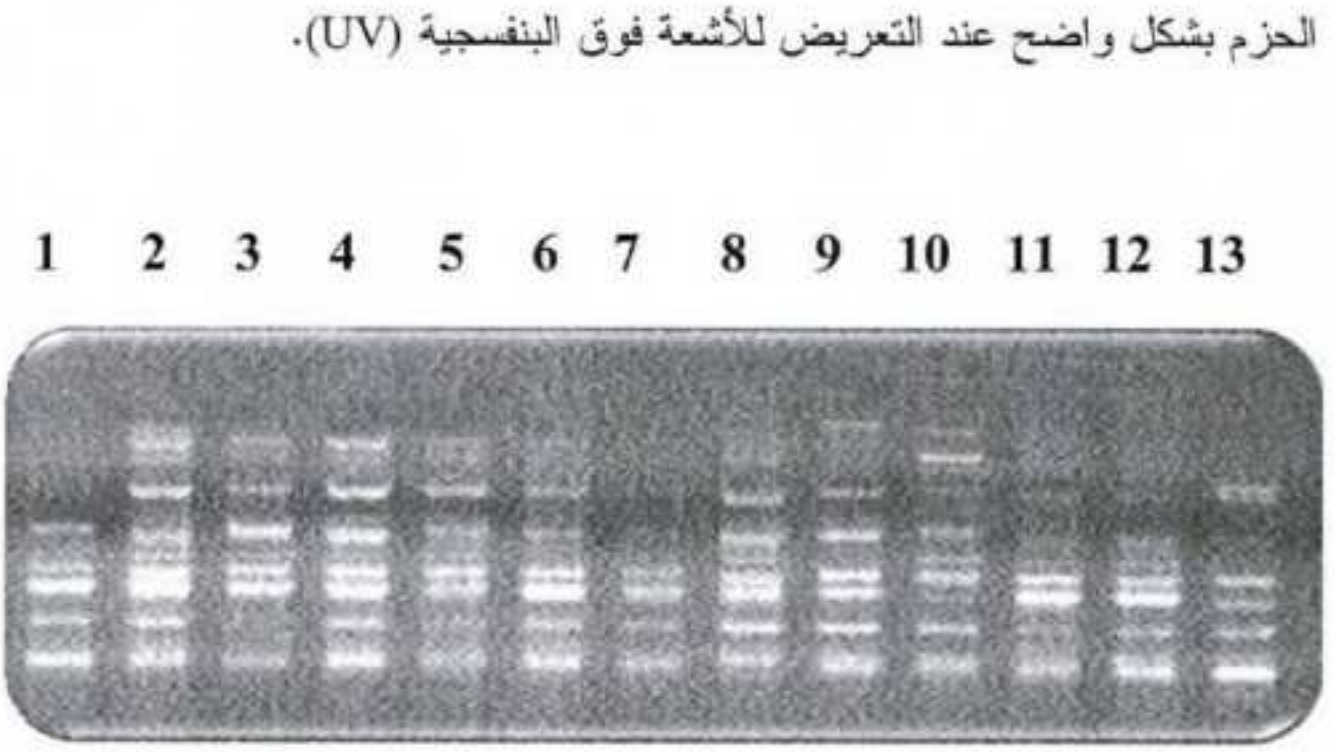
رقم البادئ	التسلسل النكليوتيدي	درجة حرارة الإلتحام م°
1	$(AG)_8T$	50
3	$(CA)_8A$	50
5	$(AC)_8T$	50
6	$(GA)_8CG$	56
9	$(AC)_8GG$	56
14	$CCAG(GT)_7$	56
15	$(GT)_4(GA)_5$	54
16	$(AC)_7(AT)_3$	54
34	$(CT)_8G$	50

6- الرحلان الكهربائي Electrophoresis

يتم تحديد نجاح التضخيم وذلك باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي ومحلول TBE (Tris Borate EDTA) حيث ينفصل الحمض النووي DNA خلال هلامة الآغاروز، أومتعدد الأكريلامايد، اعتماداً على الوزن الجزيئي إذ ترحل القطع الكبيرة ببطء أكثر من القطع الصغيرة ثم يتم كشف الحمض النووي DNA باستخدام صبغة ETBr الإثيديوم بروماید ليظهر الحمض النووي DNA على شكل حزم على الهلامة عند التعريض للأشعة فوق البنفسجية (UV)، ولا بد من إضافة سلم جزيئي يعبر عن الطول الجزيئي (ladder) إلى الهلامة، وهو عبارة عن محلول

تجاري من شركة (Promega) يتألف من قطع من الحمض النووي DNA بأطوال معروفة (pb 10000-250) بعد الهجرة وذلك للكشف عن مواقع وأحجام الحزم باستخدام التصوير بالأشعة فوق البنفسجية (UV) كما في الشكل (2).

تم فصل نواتج التضخيم ضمن جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة الآغاروز (2%) ومحلول الفصل الكهربائي (TBE1x) بشدة تيار (100 فولط) وكان الترحيل باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي. أضيف للهلامة إيثيديوم بروماید بمقدار (5 ميكروليتر) لكل (100 ml) من هلامة الآغاروز وذلك لإظهار الحزم بشكل واضح عند التعريض للأشعة فوق البنفسجية (UV).



الشكل (2) نواتج التضخيم على جيل الأغاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربائي باستخدام البادئة (*5)

7-التحليل الإحصائي

تمت دراسة التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية اعتماداً على بياناتها الجزيئية، وحللت باستخدام برنامج (PopGen 32) الإحصائي وذلك بعد تحويل البيانات إلى صيغ رقمية، بوجود الحزمة أو عدم وجودها (1) أو (0) على الترتيب، كما رسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram اعتماداً على هذا البرنامج (الشكل رقم3). و أنشئت مصفوفة نسب عدم التوافق PDV (**P**ercent **D**isagreement **V**alues) بتطبيق **UPGMA** (**U**nweighted **P**air Group **M**ethod With **A**rit).

جدول (2) مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق (PDV) الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي للصفات الجزيئية للعينات المدروسة.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.00												
2	0.41	0.00											
3	0.51	0.34	0.00										
4	0.50	0.33	0.36	0.00									
5	0.36	0.28	0.27	0.28	0.00								
6	0.54	0.31	0.40	0.31	0.29	0.00							
7	0.36	0.38	0.41	0.35	0.30	0.29	0.00						
8	0.47	0.35	0.31	0.33	0.28	0.36	0.17	0.00					
9	0.44	0.40	0.39	0.30	0.21	0.34	0.21	0.15	0.00				
10	0.34	0.48	0.59	0.43	0.42	0.53	0.51	0.48	0.43	0.00			
11	0.33	0.29	0.38	0.25	0.25	0.33	0.25	0.22	0.18	0.31	0.00		
12	0.44	0.40	0.44	0.33	0.38	0.36	0.40	0.33	0.30	0.35	0.20	0.00	
13	039	0.35	0.53	0.33	0.40	0.36	0.35	0.38	0.35	0.35	0.18	0.30	0.00

النتائج والمناقشة

نلاحظ من الجدول رقم (2) أنه تراوحت قيم النسبة المئوية لعدم التوافق (PDV) لمعلمات (ISSR) بين عينات الماعز الثلاث عشر بين (PDV =0.15) بين العينتين (8) و (9) وبالتالي أعلى درجة قرابة وراثية وبالتالي فإن الاختلاف الوراثي بينهما بأدنى قيمة ، و(PDV =0.59) بين العينتين (3) و (10) وبالتالي أقل درجة قرابة وراثية وعليه فإن الاختلاف الوراثي بينهما بأعلى قيمة.

إن الجدول رقم (3) يعرض البيانات التي تم الحصول عليها من استخدام البادئات الستسعة، من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية. وقد بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات المستخدمة (115) حزمة أي بمعدل (12.78) حزمة لكل بادئ. أما بالنسبة لعدد الحزم التي أعطت تعددية شكلية فقد كان (108) حزمة، وبهذا بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (92.8). وأعطت (6 بادئات) تعددية شكلية بنسبة (100%) . كما أعطى البادئ (1) أعلى عدد للحزم المدروسة (19 حزمة)، وأعطى البادئ (3) أقل عدد من الحزم (6) حزمة، وكان حجم القطع المضخمة تتراوح بين (200–bp3000)، و هذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الباحث (Wang Yong et al., 2010).

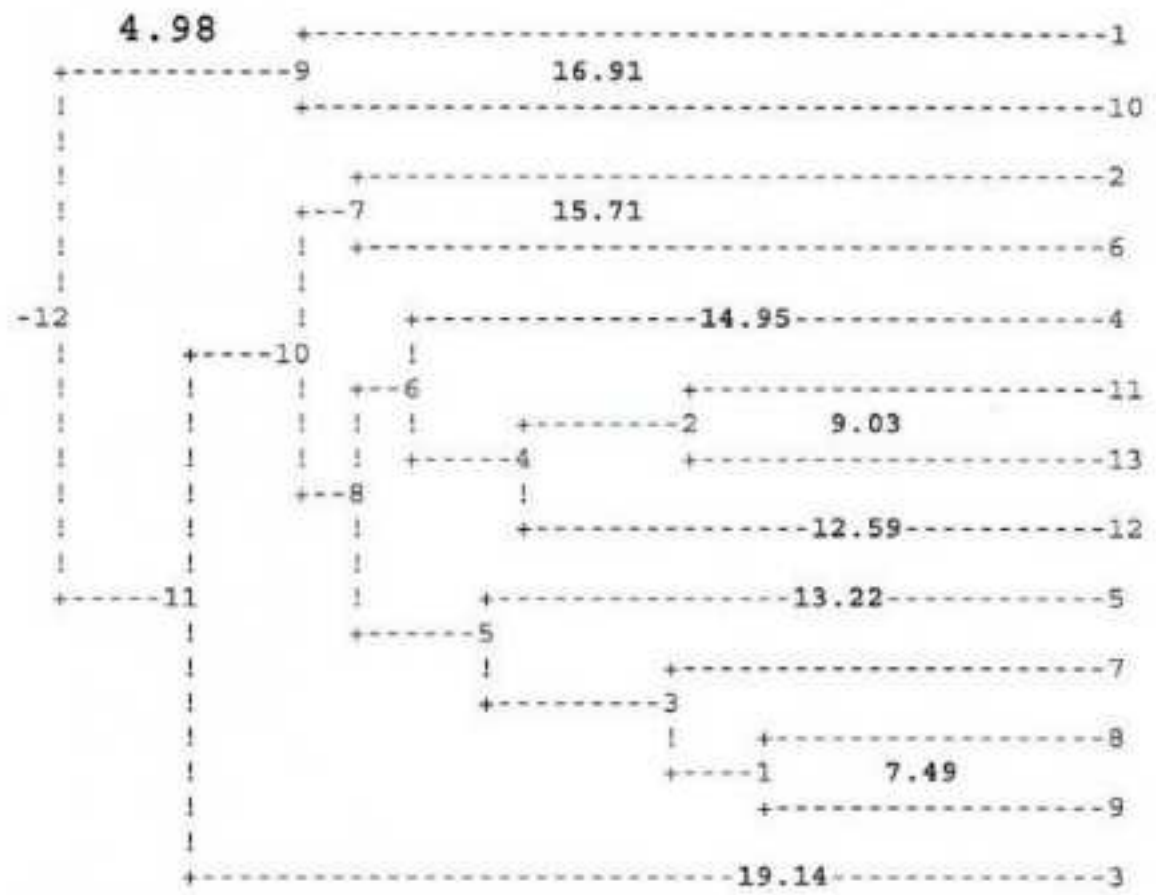
جدول (3) الحزم الناتجة عن البادئات المستخدمة و التعددية الشكلية.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلي	عددالحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم غير المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للحزم غير المتعددة شكلياً
1	19	19	100	0	0
3	6	6	100	0	0
5	13	10	76.9	3	23.1
6	15	15	100	0	0
9	13	13	100	0	0
14	14	14	100	0	0
15	12	11	91.7	1	8.3
16	9	6	66.7	3	33.3
34	14	14	100	0	0
المجموع	115	108	835.3	7	64.7
المعدل	12.78	12	92.8	0.78	7.19

وبشكل عام فقد أظهرت نتائج الدراسة وجود تنوع وراثي بين العينات حيث كانت (PDV) بالمتوسط (0.36). ويبين الشكل (3) شجرة القرابة العنقودية للصفات الجزيئية للعينات المدروسة (Dendrogram) والتي انقسمت إلى مجموعتين رئيسيتين:

ضمت المجموعة الأولى -cluster-1 العينتين (1) و (10)، وهما الأكثر بعداً عن باقي العينات، وضمت المجموعة الثانية -cluster-2 باقي العينات.

وانقسمت المجموعة الثانية بدورها إلى تحت مجموعتين ضمت تحت المجموعة الأولى العينة (3)، وضمت تحت المجموعة الثانية باقي العينات. و انقسمت الأخيرة بدورها إلى فرعين: الفرع الأول ضم العينتين (2) و(6) وضم الفرع الثاني باقي العينات .



الشكل (3) شجرة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة حسب البيانات الجزيئية.

الاستنتاجات والتوصيات

لقد أكدت هذه الدراسة وجود تنوع وراثي بين أفراد الماعز الجبلي السوري، و أوضحت فعالية التقانات الحيوية والوراثة الجزيئية لاسيما تقنية (ISSR-PCR) في دراسة التحاليل الوراثية، وتقدير التشابه والاختلاف الوراثيين بين أفراد من نوع واحد و سلالة واحدة. وعلى هذا نوصي بما يلي:

1- اعتماد نتائج هذه الدراسة لوضع هوية وراثية أولية للماعز الجبلي في سورية.

2- اعتماد طرائق التقانات الحيوية لحماية وتطوير الماعز الجبلي إلى جانب الطرائق التقليدية الأخرى.

3- إجراء دراسات مستفيضة تتناول أعداداً من الماعز الجبلي من كل مناطق تواجده في سورية.

4- التوسع في استخدام مثل هذه التقانات عاى كافة الحيونات الزراعية.

5- البحث عن علاقات إرتباطية إنتاجية لتحديد أهمية هذه التقانات.

المراجع الأجنبية

English References

- AMMIRAJU, J.S.S., DHOLAKIA, B.B., SANTRA, D.K., SINGH, H., LAGU, M.D., TAMHANKAR, S.A., DHALIWAL, H.S., RAO, V.S., GUPTA, V.S. and RANJEKAR, P.K., 2001_ **Identification of inter simple sequece repeat (ISSR) markers associated withseed size in wheat.** *Theor. Appl. Genet.* 102 726-732.
- BAI Xiu-juan., 2004_ **ISSR fingerprint for Manchurian Tigers in Captivity.** *Acta Theriologica Sinica*, S864, 1000-1050.
- BAI Xiu-juan., L.I. Hui., 2001_ **Study on ISSR fingerprinting of broiler chicken divergently selected for very low density lipoprotein (VLDL).** *Journal Jilin Agricultural University*, S831,1000-5684.
- BLAIR, M.W., PANAUD, O., McCOUCH, S.R., 1999_ **Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.).** *Theor. Appl. Genet*, 98, 780-792.
- BORENT, B., GORAGUER, F., JOLY, G., Branchard, M., 2002_**Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs).** *Genome*, 45, 481-484.
- CAVAN, G., POTIER, V., MOSS, S.R., 2000_ **Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat.** *Weed Res*, 40 301-310.
- FANG, D.Q., ROOSE, M.L., 1997_ **Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers.** *Theor. Appl. Genet*, 95, 408-417.
- GLAZKO, V.I., DYMAN, T.N., TARASIUK S.I., DUBIN A.V., 1999_ **The polymorphism of proteins, RAPD-PCR and ISSR-PCR markers in European and American bison and cattle.** *NCBI>Literature>PubMed (PMID: 10707408)*, 33(6), 9-30.
- GUPTA, M., CHYI, Y.S., ROMERO-

SEVERSON, J., OWEN, J.L., 1994_ **Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats.** *Theor. Appl. Genet*, 89 998-1006.

- JAIN, A., APPARANDA, C., Bhalla, P.L., 1999_ **Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of Pandorea (*Bignoniaceae*) by RAPD and inter-SSR PCR.** *Genome*, 42 714-719.

- KORBIN, M., KURAS, A., ŻURAWICZ, E., 2002_ **Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR.** *Cell. Mol. Biol. Lett,* 785-794.

- NAGARAJU, J., KATHIRVEL, M., RAMESH KUMAR, R., SIDDIQ, E.A., HASNAIN, S.E., 2002_ **Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A,* 99, 5836-5841.

- QIAN.Z., HONG, D., DONG HANG, Z., 2007_ **ISSR Molecular Marker and its application in plant researches.** *Molecular Plant Breeding*, V.(5).No 6,123-129.

- RAINA, S.N., RANI, V., KOJIMA, T., OGIHARA, Y., SINGH, K.P., DEVARUMATH, R.M., 2001_ **RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species.** *Genome*, 44, 763-772.

- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M., BOLIBOK, H., 2004_ **Characteristics and a comparision of three classes of Micro satellite- based markers and their application in plants.** *Agricultural university, Nowoursynowska, Wraszawa, Poland.*

- VAN DER NEST, M.A., STEENKAMP, E.T., WIGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J., 2000_ **Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR).** *Plant Breed*, 119, 433-436.

- WANG Jie., WANG Yong., XU Qi-shu ,, GAO Guang-yu., OUYANG Xi., LIU Lu-shu., 2009_ **The research**

of Tibetan goat height at withers functional gene. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, S827.

- WANG YONG., WANG JIE., XU QI-SHU., ZI XIANG-DONG., OUYANG XI., LIU LU-SHU., XIAO YI-XI.,2010_ **Analysis of genetic diversity in Ritu Tibetan goats by ISSR.** *Chinese Journal of Applied Ecology*, 41(9), 1208_1212.

- WOLFE, A.D., XIANG, Q.-Y AND KEPHART, S.R., 1998_ **Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat markers.** *Mol. Ecol.* 71(1998), 1107-1125.

- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D.,1994_ **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchoredpolymerase chain reaction amplification.** *Genomics*, 20(1994), 176-183.