

**Karakterisasi Genetik Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Berdasarkan Penanda Molekuler *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (Genetic Characterization of Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism Molecular Markers)**

**Dyah Subositi & Rohmat Mujahid**

Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Jl. Raya Lawu, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, Tel.: (0271) 697010, Fax.: (0271) 697451, **E-mail:** dyah.subositi@gmail.com

**Memasukkan:** Februari 2013, **Diterima:** April 2013

**ABSTRACT**

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) is known as an important medicinal plant used as a diuretics and antihypertensives. This plant is widely distributed in Indonesia. Genetic diversity of tempuyung is important information as a database for further research especially in medicinal plant standardization. The objective of this study was to analyse genetic characterization of tempuyung based on SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) molecular markers. Thirteen samples were collected from 8 different locations and amplified using 5 primer SRAP combinations. Similarity matrix was calculated using Dice coefficient. Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean (UPGMA) cluster analysis was performed to develop a dendrogram. The result indicates that there was a genetic variation among tempuyung accessions and divided into 4 clusters with similarity index of 0,7719. Citeureup and Turen3 accessions were the most closely similar with similarity index of 0,8936. In conclusion, SRAP markers may serve as an efficient and effective tools to analyze the genetic diversity among tempuyung accessions.

**Keywords:** genetic characterization, tempuyung (*Sonchus arvensis* L.), SRAP

**ABSTRAK**

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) banyak dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat untuk menurunkan tekanan darah tinggi dan peluruh air seni. Tempuyung mudah dan banyak dijumpai di berbagai tempat di Indonesia. Keragaman genetik tempuyung merupakan informasi penting sebagai data base untuk penelitian lebih lanjut terutama mendukung standarisasi tumbuhan obat. Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi genetik tempuyung menggunakan penanda molekuler SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*). Sebanyak 13 aksesi tempuyung yang dikoleksi dari 8 lokasi digunakan sebagai sampel dan diamplifikasi menggunakan 5 pasang kombinasi primer SRAP. Indeks similaritas dihitung menggunakan rumus indeks similaritas Dice kemudian disusun analisis kluster dan konstruksi dendrogram dilakukan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA). Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi genetik antar aksesi tempuyung dan terbagi menjadi 4 kluster pada indeks similaritas 0,7719. Aksesi Citeurep dan aksesi Turen 3 mempunyai hubungan kemiripan yang terdekat pada indeks similaritas 0,8936. Penanda molekuler SRAP merupakan teknik efektif dan efisien untuk karakterisasi genetik antar aksesi tempuyung.

**Kata Kunci:** Karakterisasi genetik, tempuyung (*Sonchus arvensis* L.), SRAP

**PENDAHULUAN**

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) merupakan tumbuhan anggota familia Asteraceae dan banyak ditemukan di Sumatera, Jawa, Bali,

Sulawesi dan Papua. Tumbuhan tersebut dapat tumbuh di tempat dengan ketinggian 50-2400 m dpl dan banyak dijumpai di sekitar persawahan, tepi jalan, dan tebing (Backer & van den Brink 1965). Tempuyung banyak digunakan untuk

mengobati asma, batuk, beberapa keluhan sakit pada dada, menenangkan saraf, anti radang, peluruh air seni dan menurunkan tekanan darah tinggi. Tempuyung juga dilaporkan berfungsi sebagai insektisida. Flavonol, glikosida flavonol, monoasil galaktosilgliserol, seskuiterpen lakton, dan asam kuinat berhasil diisolasi dari tanaman ini (Xiang & Yu 2010).

Keanekaragaman genetik pada suatu spesies sangat penting digunakan untuk menggambarkan daya adaptasi, seleksi genotip dan untuk merakit varietas baru, sidik jari genetik, serta manajemen plasma nutfah. Karakter morfologi merupakan karakter yang banyak digunakan untuk sebagai langkah awal untuk identifikasi dan analisis keanekaragaman genetik, karena karakter ini mudah diamati. Karakter morfologi mempunyai keterbatasan yaitu membutuhkan waktu pengamatan yang lama dan membutuhkan ketelitian dan kemampuan dalam mencandra saat di lapangan serta mudah terpengaruh oleh kondisi lingkungan (Fu *et al.* 2008; Meng *et al.* 2011).

Perkembangan teknik penanda molekular memungkinkan untuk menganalisis genom secara langsung dan akurat sehingga dapat meminimalisasi kesalahan akibat faktor lingkungan. Berbagai macam teknik penanda molekular juga telah banyak digunakan untuk karakterisasi dan identifikasi varietas pada tumbuhan (Abdelmigid 2012). Penanda molekular tersebut antara lain *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeats* (SSRs) dan *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs) (Muthusamy *et al.* 2008).

*Sequence-related amplified polymorphism* (SRAP) merupakan penanda molekular yang ditemukan lebih akhir dibandingkan penanda molekular lainnya seperti RFLP, AFLP, RAPD, SSR dan ISSR. SRAP mengkombinasikan

kemudahan teknik RAPD dan hasil yang mempunyai keakuratan tinggi seperti AFLP serta mampu mendeteksi polimorfisme di *coding sequence* yang umumnya terdapat di genom kultivar dan mempunyai tingkat mutasi yang relatif rendah (Keyfi & Beiki 2012; Zeng *et al.* 2012). Penanda molekular telah banyak digunakan untuk berbagai tujuan antara lain yaitu untuk identifikasi kultivar (Jianfeng *et al.* 2012), analisis keragaman genetik dan hubungan kemiripan plasma nutfah (Alghamdi *et al.* 2012), identifikasi dan karakterisasi genetik F1 hibrid (Zhang *et al.* 2012). Tujuan penelitian ini adalah karakterisasi genetik aksesori tempuyung berdasarkan penanda molekular SRAP untuk mendukung standarisasi tumbuhan obat.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Koleksi sampel tempuyung dilakukan pada bulan Februari-Agustus 2012, wilayah pengumpulan sampel meliputi provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Barat, Nusa Tenggara Barat dan Sumatera Barat. Sebanyak 52 aksesori tempuyung berhasil dikoleksi kemudian diamati pola spektrum FTIR (*Fourier transformed infrared spectrophotometer*) dan analisis hasil menggunakan PCA (*Principal Component Analysis*). Sebanyak 13 aksesori yang berbeda secara profil FTIR serta lokasi tumbuh dipilih sebagai sampel untuk analisis karakterisasi genetik (Tabel 1).

Sebanyak 0,1 gram daun muda tempuyung disimpan pada freezer -80°C kemudian diisolasi menggunakan protokol dan kit isolasi DNA (*Sigma GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Hasil isolasi DNA genom tempuyung diencerkan 1000X dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (1 260/280) menggunakan spektrofotometer untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA.

**Tabel 1.** Daftar aksesi tempuyung yang digunakan untuk karakterisasi genetik

No	No Koleksi	Nama Aksesi	Asal	Keterangan
1	2	Turen-2	Turen, Malang	Liar
2	3	Turen-3	Turen, Malang	Liar
3	15	Purwokerto	Purwokerto	Liar
4	25	Kalisoro	Tawangmangu, Karanganyar	Liar
5	27	Patuk	Gunung Kidul	Liar
6	34	Materia Medika	Materia Medika, Malang	Budidaya
7	36	Mataram	Mataram	Liar
8	37	Citereup	Citereup, Bandung	Liar
9	47	B2P2TO-OT (1)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
10	48	B2P2TO-OT (2)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
11	49	B2P2TO-OT (3)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
12	50	B2P2TO-OT (4)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
13	52	B2P2TO-OT (campuran untuk QC)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya

Amplifikasi DNA aksesi tempuyung menggunakan 5 kombinasi primer SRAP yaitu ME1-EM2, ME1-EM3, ME2-EM1, ME3-EM2 dan ME4-EM3 (Tabel 2). Protokol SRAP berdasarkan Li & Quiros (2001) dengan modifikasi pada komposisi/campuran untuk reaksi PCR dan waktu elongasi terakhir. Sebanyak 3 µl *template* (25 ng DNA genom), 0,6 µl primer *reverse* dan 0,6 µl primer *forward*, 13 µl PCR Mix, kemudian ditambah *distillated water* sampai volume 25 µl. Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi 94°C selama 5 menit, kemudian siklus pertama sebanyak 5 siklus terdiri atas fase denaturasi 94°C selama 1 menit, fase penempelan pada suhu 35°C selama 1 menit dan fase elongasi/pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit, selanjutnya diikuti oleh siklus kedua sebanyak 35 siklus terdiri atas fase denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, fase penempelan pada suhu 50°C selama 1 menit dan fase elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri fase elongasi pada suhu 72°C selama 8 menit dan 4°C sebagai *holding temperature*.

Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% yang telah diberi *SYBR safe green* pada 80 volt selama 100 menit. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (BioRad).

Data diperoleh dari hasil visualisasi fragmen DNA tiap aksesi tempuyung pada kombinasi primer SRAP yang berbeda. Bila terdapat fragmen diberikan skor 1 dan bila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Indeks similaritas dihitung menggunakan rumus indeks similaritas Dice kemudian disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) dan konstruksi dendogram dilakukan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA). Data tersebut diolah menggunakan program komputer (*software*) NTSYS ver 2.02.

## HASIL

Sebanyak 48 fragmen DNA dihasilkan dari amplifikasi menggunakan 5 kombinasi primer SRAP dengan jumlah  $\geq 2$  fragmen DNA tiap primer (Tabel 3). Kombinasi primer ME2-EM1

**Tabel 2.** Primer SRAP untuk analisis variasi genetik tempuyung

No	Nama Primer	Sekuen
1	ME1	5' TGAGTCCAAACCGGATA 3'
2	ME2	5' TGAGTCCAAACCGGAGC 3'
3	ME3	5' TGAGTCCAAACCGGAAT 3'
4	ME4	5' TGAGTCCAAACCGGACC 3'
5	EM1	3' GACTGCGTACGAATTAAT 5'
6	EM2	3' GACTGCGTACGAATTTGC 5'
7	EM3	3' GACTGCGTACGAATTGAC 5'

menghasilkan jumlah fragmen paling banyak yaitu 17 fragmen, sedangkan primer ME1-EM3 menghasilkan fragmen paling sedikit yaitu 2 fragmen. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari kombinasi primer ME1-EM2 berkisar antara 130-1050 bp, primer ME1-EM3 menghasilkan fragmen 160-250 bp, primer ME2-EM1 menghasilkan fragmen 40-1.620 bp, primer ME3-EM2 menghasilkan fragmen 20-1.000 bp, sedangkan kombinasi primer ME4-EM3 menghasilkan fragmen 50-450 bp.

Polimorfisme tertinggi dihasilkan amplifikasi menggunakan pasangan primer ME2-EM1 yaitu 94,1%, polimorfisme terendah 50% bila diamplifikasi menggunakan pasangan primer ME1-EM3, sedangkan polimorfisme rata-rata yaitu 77,1% (Tabel 3).

Lima kombinasi primer SRAP menghasilkan fragmen DNA dengan polimorfisme rata-rata yang cukup tinggi (77,1%) dan 4 kombinasi primer menghasilkan beberapa fragmen spesifik tetapi kombinasi primer ME1-EM3 tidak dapat menghasilkan fragmen spesifik pada aksesori tertentu. Kombinasi primer ME4-EM3 menghasilkan fragmen spesifik untuk aksesori B2P2TO-OT (4) pada ukuran sekitar 80 bp, sedangkan primer ME2-EM1 menghasilkan primer spesifik untuk aksesori Materia Medika Malang pada ukuran sekitar 1620 bp dan fragmen spesifik ukuran sekitar 1140 bp pada aksesori Mataram. Aksesori Turen-2 mempunyai fragmen spesifik ukuran sekitar 200 bp jika diamplifikasi menggunakan

kombinasi primer ME3-EM2, sedangkan kombinasi primer ME1 dan EM2 menghasilkan fragmen spesifik dengan ukuran sekitar 205 dan 300 bp pada aksesori Kalisoro dan fragmen spesifik berukuran 130 dan 500 bp pada aksesori B2P2TO-OT (Campuran) (Gambar 1).

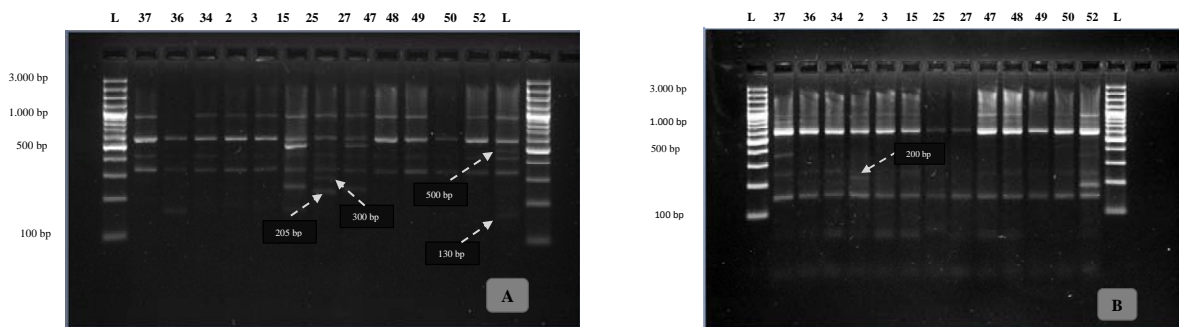
Dendogram (Gambar 2) menunjukkan 13 aksesori tempuyung terbagi menjadi 4 kluster. Indeks kemiripan genetik 13 aksesori tempuyung berkisar 74,93%-89,36%. Kluster I terdiri dari aksesori Citeurep, aksesori Turen 2 dan aksesori Mataram, Kluster II terdiri dari aksesori Materia Medika Malang, aksesori B2P2TO-OT campuran, aksesori B2P2TO-OT 1, aksesori B2P2TO-OT 2, aksesori B2P2TO-OT 4, dan aksesori B2P2TO-OT 3, kluster III hanya beranggotakan aksesori Purwokerto, sedangkan kluster IV terdiri dari aksesori Turen-3, aksesori Patuk dan aksesori Kalisoro. Aksesori Citeurep dan aksesori Turen 3 mempunyai hubungan kemiripan yang terdekat dengan nilai indeks kesamaan/kemiripan sebesar 89,36% atau 0,8936.

## PEMBAHASAN

Lima kombinasi primer SRAP menghasilkan fragmen dan tingkat polimorfisme yang cukup tinggi (77,1%), hal tersebut menunjukkan bahwa kombinasi primer SRAP terutama primer ME1-EM2, ME2-EM1 dan ME3-EM2 efektif digunakan untuk karakterisasi genetik tempuyung karena menghasilkan fragmen DNA banyak dan

**Tabel 3.** Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 5 primer SRAP dan prosentase fragmen polimorfik pada 13 aksesi tempuyung.

No	Kombinasi Primer	Total fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Prosentase Polimorfik (%)
1	ME1 : 5' TGAGTCCAAACCGGATA 3' EM2 : 3' GACTGCGTACGAATTTGC 5'	11	3	72,7
2	ME1 : 5' TGAGTCCAAACCGGATA 3' EM3 : 3' GACTGCGTACGAATTGAC 5'	2	1	50
3	ME2 : 5' TGAGTCCAAACCGGAGC 3' EM1 : 3' GACTGCGTACGAATTAAT 5'	17	1	94,1
4	ME3 : 5' TGAGTCCAAACCGGAAT 3' EM2 : 3' GACTGCGTACGAATTTGC 5'	11	3	72,7
5	ME4 : 5' TGAGTCCAAACCGGACC 3' EM3 : 3' GACTGCGTACGAATTGAC 5'	7	3	57,1
<b>Total</b>		48	11	
<b>Rata-rata</b>				77,1



**Gambar 1.** Fragmen DNA Tempuyung hasil amplifikasi dengan menggunakan primer SRAP (A: kombinasi primer ME1-EM2 dan B: kombinasi primer ME3-EM2)

polimorfisme tinggi. Variasi prosentase polimorfisme menggambarkan perbedaan genetik antar dan di dalam populasi dan atau genotip yang diteliti serta kombinasi primer SRAP yang digunakan selain itu primer yang menghasilkan polimorfisme fragmen tinggi lebih efisien untuk studi keragaman genetik dan untuk membedakan antar genotip (Abdelmigid 2012; Alghamdi 2012).

Adanya fragmen spesifik yang terdapat pada beberapa aksesi jika di amplifikasi menggunakan kombinasi primer SRAP tertentu dapat digunakan sebagai penanda untuk karakterisasi ataupun identifikasi aksesi tersebut. Kusumadewi dkk. (2010) menyatakan bahwa pita-pita DNA yang unik dan dijumpai pada populasi tertentu

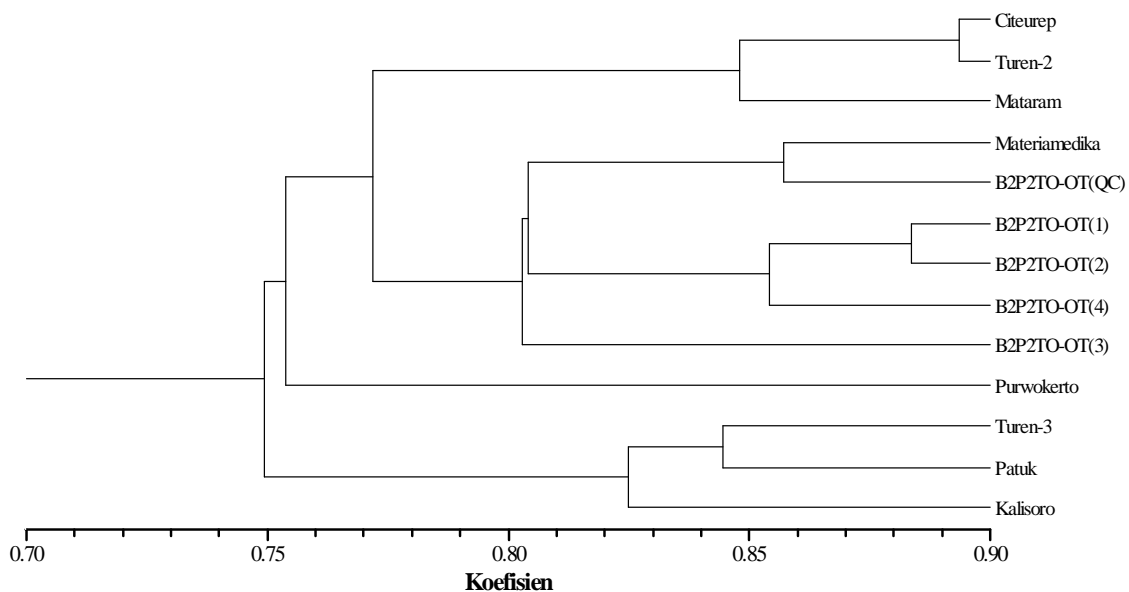
dapat dijadikan sebagai marka identifikasi, akan tetapi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dengan jenis penanda molekular dan jumlah sampel yang digunakan. Primer SRAP terdiri dari primer *forward* yang mengamplifikasi daerah ekson dan primer *reverse* mengamplifikasi daerah intron dan daerah yang mempunyai promoter. Polimorfisme yang teramati berasal dari variasi panjang ekson, intron, *promoter* dan *spacer* baik antar individu maupun antar spesies (Li & Quiros 2001). Menurut Noormohammadi *et al.* (2011) adanya fragmen/lokus spesifik pada beberapa kultivar atau aksesi menunjukkan terjadinya insersi/ delesi di DNA pada genotip dimana hal tersebut berguna untuk perencanaan

hibridisasi. Primer SRAP mempunyai desain unik sehingga teknik tersebut lebih reproduibel, stabil, lebih sederhana dibandingkan dengan teknik molekular lainnya.

Penanda molekular SRAP mampu menunjukkan adanya keragaman genetik diantara 13 aksesi tempuyung pada indeks kemiripan berkisar 74,93%-89,36%. Hal tersebut mengindikasikan keragaman genetik yang sempit antar aksesi tempuyung. Kluster II (Gambar 2) menunjukkan anggota kluster terdiri dari sebagian besar aksesi berasal dari B2P2TO-OT Tawangmangu. Hal tersebut menunjukkan bahwa penanda molekular SRAP mampu mengelompokkan beberapa aksesi-aksesi menjadi satu kluster berdasarkan lokasi asal sampel atau tempat tumbuh yang sama. Menurut Shafie *et al.* (2011) tingkat kemiripan yang tinggi berkorelasi dengan kondisi tempat tumbuh yang sama atau mirip. Lima aksesi B2P2TO-OT menjadi satu kluster kemungkinan disebabkan berasal dari tetua yang sama, dibudidayakan dalam jangka waktu lama dan tumbuh pada kondisi lingkungan yang sama. Al-Rawashdeh (2011) menyatakan bahwa

kemiripan atau kesamaan aksesi kemungkinan karena mempunyai tetua yang sama. Hasil yang sama terjadi pada karakterisasi genetik kultivar alfalfa menggunakan penanda molekular SRAP, terdapat kluster yang beranggotakan kultivar alfalfa berdasarkan kemiripan kondisi lingkungan asal (Yuan *et al.* 2011). Seluruh anggota kluster II merupakan aksesi yang telah dibudidayakan yaitu di B2P2TO-OT Tawangmangu dan di Materia Medika Malang, hal tersebut menunjukkan bahwa penanda molekular SRAP mampu mengelompokkan aksesi berdasarkan karakter budidaya. Seehalak *et al.* (2006) menyatakan variasi genetik yang sempit antar aksesi yang telah dibudidayakan kemungkinan disebabkan karena dibudidayakan dalam jangka waktu yang lama sehingga aksesi telah beradaptasi dengan kondisi agroklimat.

Penanda molekular SRAP merupakan penanda paling kuat untuk analisis keanekaragaman genetik pada kultivar rumput *Bucholoe dactyloides* dibandingkan dengan penanda molekular SSR, ISSR dan RAPD (Budak *et al.* 2004). Penanda molekular SRAP mampu menunjukkan adanya variasi genetik yang sempit antar aksesi



**Gambar 2.** Dendrogram 13 aksesi tempuyung berdasarkan penanda molekular SRAP

tempuyung. Variasi genetik tersebut kemungkinan disebabkan adanya perbedaan budidaya dan tetua aksesori tempuyung. Informasi tersebut merupakan salah satu data untuk mendukung standarisasi tempuyung sebagai bahan baku serta penelitian lebih lanjut pengembangan aksesori tempuyung. Penanda molekular SRAP dapat digunakan untuk identifikasi secara molekular pada tempuyung.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini ini adalah salah satu bagian penelitian yang dibiayai dari DIPA Tahun 2012 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), Badan Litbang Kesehatan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmigid, HM. 2012. Efficiency of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for genotype fingerprinting and genetic diversity studies in canola (*Brassica napus*). *Afri. J. Biotech.* 11(24): 6409-6419.
- Al-Rawashdeh, IM. 2011. Genetic Variability in a Medicinal Plant *Artemisia judaica* using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Inter. J. Agri. Ecol.* 13:279-282.
- Alghamdi, SS., SA. Al-Faifi, HM. Migdadi, MA. Khan, EH. El-Harty, & MH. Ammar. 2012. Molecular Diversity Assessment Using Sequence Related Amplified Poly-morphism (SRAP) Markers in *Vicia faba* L. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 16457-16471.
- Backer, CA. & RCB. van den Brink. 1968. *Flora of Java (spermatophytes only)* Vol. 2. Walters Nordoff, NY Groningen, The Netherlands.
- Budak, H., RC. Shearman, I. Parmaksiz, RE. Gaussoin, TP. Riordan, & I. Dweikat. 2004. Molecular characterization of buf-falograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 328-334.
- Fu, XP., GG. Ning, LP. Gao, & MZ. Bao. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morpho-logical traits. *Sci. Horticult.* 117: 263– 270.
- Jianfeng, H., Q. Yonghua, M. Hingxia, Z. Chunyang, Y. Zixing, & H. Guibing. 2012. Molecular marker analysis of ‘Shatangju’ and ‘Wuzishatangju’ mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Afri. J. Biotech.* 11(89):15501-15509.
- Keyfi, F., & AH. Beiki. 2012. Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection. *J. Med. Plants Res.* 6(14): 2761-2768.
- Kusumadewi, Y., YS. Purba, & T. Partomihardjo. 2010. Keragaman Genetika Ramin [*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz] dari Provinsi Riau Berdasarkan Profil Random Amplified Polymorphic DNA. *J. Biol. Indonesia* 6(2): 173-183.
- Li, G., & CF. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Meng, L., HX. Yang, PC. Mao, HW. Gao, & FD. Sun. 2011. Genetic diversity analysis of *Arrhenatherum elatius* germplasm with inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afri. J. Biotech.* 10(44): 8729-8736.

- Muthusamy, S., S. Kanagarajan, & S. Ponnusamy. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR Markers System in Genetic Variation of Rice Bean (*Vigna umbellata*) Landraces. *Elec. J. Biotech.* 11(3): 1-10.
- Noormohammadi, Z., F. Shojaei-Jesvaghani, M. Sheidai, F. Farahani, & O. Alishah. 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *Afri. J. Biotech.* 10(56): 11839-11847.
- Seehalak, W., N. Tomooka, A. Waranyuwat, P. Thipyapong, P. Laosuwan, A. Kaga, & DA. Vaughan. 2006. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighbouring regions revealed by AFLP analysis. *Gen. Res. Crop Evo.* 53(5): 1043-1059.
- Shafie, SB., SMZ. Hasan, AM. Zain, & RM. Shah. 2011. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *J. Med. Plants Res.* 5(18): 4426-4437.
- Xiang, ZXIA., & LJ.Yu. 2010. Steroids and Phenols from *Sonchus arvensis*. *Chin. J. Nat. Med.* 8(4): 267-269.
- Yuan, Q., J. Gao, Z. Gui, Y. Wang, S. Wang, X. Zhao, B. Xia, & XL. Li. 2011. Genetic relationships among alfalfa gemplasm resistant to common leaf spot and selected Chinese cultivars assessed by sequence-related amplified polymorphism (SARP) markers. *Afri. J. Biotech.* 10(59): 12527-12534.
- Zhang, F., YY. Ge, WY. Wang, XL. Shen, & XY. Yu. 2012. Assessing genetic divergence in interspecific hybrids of *Aechmea gomosepala* and *A. recurvata* var. *recurvata* using inflorescence characteristics and sequence-related amplified polymorphism markers. *Genet. Mol. Res.* 11 (4): 4169-4178.
- Zeng, B., GZ. Wang, FY. Zuo, ZH. Chen, & XQ. Zhang. 2012. Genetic diversity analysis of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) accessions with sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afri. J. Biotech.* 11(67):13075-13084.