Archive of SID
"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سوم، شماره ۴، ۱۳۸۰

بررسی تنوع ژنتیکی برنج‌های ایرانی با استفاده از نشانگر رپید

Evaluation of Genetic Diversity of Iranian Rice(*Oryza sativa* L.) Using RADP Markers

فرشاد رودبار کلاری[۱]، عزت الله فرشادفر[۲] و بهزاد قره یاضی[۳]

چکیده

برنج از گیاهان زراعی مهم ایران محسوب و در مناطق جغرافیایی وسیعی کشت می‌شود. این امر می‌تواند سبب ایجاد تنوع ژنتیک در آن گردد. تنوع ژنتیک، ماده اولیه برای هر برنامه به نژادی محسوب می‌شود. در این مطالعه تنوع ژنتیک ۱۱۳ رقم از ارقام بومی و اصلاح شده برنج‌های ایرانی موجود در بانک ژن که از مکان‌های جغرافیایی متفاوت جمع آوری شده بودند مورد مطالعه قرار گرفت. دی ان ای (DNA) ارقام مورد بررسی پس از استخراج با استفاده از ۱۴ آغازگر رپید در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند و ۱۳۶ نشانگر تولید کردند. امتیاز دهی بر اساس حضور (یک) و عدم حضور (صفر) باندها صورت گرفت. ماتریس شباهت داده‌ها بر اساس ضریب شباهت جاکارد تشکیل شد و دندروگرام با استفاده از روش UPGMA نرم‌افزار رایانه‌ای NTSYS ترسیم شد. ارقام مورد مطالعه به هشت گروه تقسیم شدند که شباهت بین آن‌ها حداکثر هشتاد و هشت درصد و حداقل چهل و پنج درصد بود. در بین ارقام اصلاح شده مورد بررسی، ارقام گیل ۳ و سپیدرود با ۷۰٪ شباهت نزدیک‌ترین ارقام اصلاح شده به یکدیگر بودند. ارقام با نام محلی مشابه که از مناطق مختلف جمع آوری شده بودند، با وجود داشتن نام‌های یکسان، تنوع ژنتیک قابل ملاحظه‌ای داشتند، به طوری که فاصله ژنتیک بین این ارقام و فاصله ژنتیک آن‌ها با سایر ارقام تفاوت معنی داری نشان ندادند. برنج‌های ایرانی موجود در بانک ژن حتی در صورت برخورداری از نام‌های مشابه دارای تنوع زیادی بودند. از این تنوع می‌توان در برنامه‌های به نژادی بهره برداری کرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنوع ژنتیک و نشانگر رپید.

مقدمه

برنج غذای اصلی مردم ایران محسوب می‌شود و سابقه کشت آن در ایران به ۲۵۰۰ سال قبل برمی‌گردد. برنج‌های ایرانی بر اساس طول دانه به سه دسته صدری (بلند و نازک)، چمپا (متوسط و کوتاه) و گِرده (کوتاه و گِرد) تقسیم بندی می‌شوند (خدابنده، ۱۳۷۱). برنج‌های ایرانی در طبقه بندی برنج‌های آسیایی (Glaszmman, 1987) در گروه دوم و پنجم قرار گرفتند. این گیاه زراعی در پانزده استان کشور با شرایط جغرافیایی متنوع کشت می‌شود (Nematzadeh et al., 2000). تنوع ژنتیک که پایه و اساس اصلاح گیاهان زراعی محسوب می‌شوند گزینش گیاهان با خصوصیات مطلوب و یا انتقال صفات به گیاهان زراعی را امکان‌پذیر می‌سازد. این تنوع می‌تواند به صورت وابستگان نزدیک گیاهان زراعی، همانند بسیاری از گونه‌های گندم (دوروم، گندم معمولی و...) و یا واریته‌های زراعی در مناطق مختلف باشد. تنوع ژنتیکی به دلیل آزادی انتخاب در آینده حائز اهمیت است. هم‌چنین مقاومت

تاریخ دریافت: ۱۳۸۰/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۱/۴/۱۹

۱ و ۳ - به ترتیب عضو هیأت علمی و استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی - کرج و ۲- دانشیار دانشگاه رازی - کرمانشاه

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی بستگی زیادی به تنوع ژنتیک دارد.

تنوع ژنتیک گیاهان زراعی همبستگی مثبتی با پراکندگی جغرافیایی آن‌ها دارد. گیاهان زراعی طی سال‌ها زیستن در شرایط متفاوت حاوی ژن‌های متنوعی شدند (Debra and Frederik., 1999). امروزه دانشمندان به خوبی به اهمیت این گونه ژن‌های مقاوم به آفات و بیماری‌ها و یا ژن‌های متحمل به تنش‌های محیطی (سرما، گرما،...) موجود در واریته‌های بومی و خویشاوندان وحشی پی برده‌اند. این امر محققان را بر آن می‌دارد برای افزایش کمّیت و کیفیت محصولات زراعی در جستجوی منابع جدید ژنی قابل استفاده در برنامه‌های به نژادی باشند (Ko et al., 1994). اما ضرورت و شیفتگی ایجاد مزارع یکنواخت و کاشت واریته‌های اصلاح شده سبب فرسایش ژنتیک و انقراض بومی دربردارنده ژن‌های مقاومت متنوع شده است (Bustos et al., 1998) و رفته رفته آهنگ آسیب پذیری ژنتیک گیاهان زراعی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را افزایش داده است.

در صورت عدم وجود تنوع ژنتیک جدید اختلاف بین نتایج حاصل از تلاقی‌ها کم شده و آستانه تحمل واریته‌ها در برابر تنش‌های زیستی کاهش می‌یابد (Smith and Smith, 1992). به همین دلیل بسیاری از مؤسسات دولتی و خصوصی در حال جمع آوری و نگهداری گونه‌های زراعی و وحشی گیاهان از سراسر دنیا می‌باشند. برای حفظ و نگهداری این ذخایر توارثی می‌توان به جمع آوری و ذخیره ژنوتیپ‌های مختلف به صورت بذر، غده و... در بانک ژن اقدام کرد (Graham and Nicol, 1996). محدودیت‌های موجود در هزینه و فضای کافی جهت ذخیره سازی حجم عظیم مواد گیاهی دانشمندان را بر آن می‌دارد تا از جمع آوری نمونه‌های مشابه پرهیز نمایند. بنابراین شناسایی نمونه‌های گیاهی و مشخص کردن واریته‌های تکراری مواد ژنتیک موجود در کلکسیون‌ها بسیار با اهمیت می‌باشد (Dje et al., 2000).

برای بررسی تفاوت و یا شباهت بین افراد و جمع آوری نمونه‌های متنوع به ویژگی‌هائی نیاز است که بتواند تفاوت‌های بین دو فرد را نشان داده و در نتایج به ارث برسد (قره‌یاضی، ۱۳۷۴).

پیشرفت‌های بیولوژی ملکولی، نشانگرهای دی‌ان‌ای متعدد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نقاط نشانمند از توالی [(Olson, 1989), (Sequence Tagged Sites)]، انگشت نگاری با دی‌ان‌ای تکثیر شده (DNA Amplification Fingerprint), (Caetano-Anolle 1991)، دی‌ان‌ای چند شکل حاصل از تکثیر [(Random Amplified Polymorphic DNA), (Williams et al., 1990)] تفاوت طول قطعات تکثیر شده [(Amplified Fragment Length Polymorphism), (Vos et al., 1995)] و نشانگرهای دی‌ان‌ای غیر مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری [(Variable Number of Tundem Repeat, Nakumura et al., 1987)] تفاوت حاصل از هضم (Botstein et al., 1980) (Restriction Fragment Length Polymorphism) و... را برای محققان به ارمغان آورد.

در روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان تکثیر قطعه مخصوصی از دی ان ای بین دو توالی شناخته شده، امکان‌پذیر می‌باشد. در این روش برای طراحی و ساخت آغازگر به اطلاعات توالی دی‌ان‌ای ژنوم مورد مطالعه نیاز می‌باشد. این اطلاعات به طور کامل برای هیچ گیاه زراعی به جز برنج تهیه نشده است. بنابراین طراحی آغازگر در روش‌های مبتنی بر آغازگرهای اختصاصی یک عامل محدود کننده محسوب می‌شود. ویلیامز و همکاران (Williams et al., 1990) و ولش و میکائیل (Welsh and Michael, 1990)به طور مستقل روش جدیدی را بر اساس تکثیر تصادفی توالی‌های دی‌ان‌ای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابداع کردند. با استفاده از این روش به سادگی و با مقدار کمی دی‌ان‌ای الگو، بدون نیاز به اطلاعات اولیه توالی دی‌ان‌ای می‌توان تنوع بین موجودات را بررسی کرد.

امروزه از رپید به عنوان یک نشانگر در بررسی تنوع ژنتیک;(Debra and Frederick 1999, Estiir et al., 1999 نشانمند کردن Dje et al., 2000; Nebauer et al., 2000) ژن‌ها (Chalmers et al., 1993, Hormaza et al., 1994;

www.SID.ir

Archive of SID

(Penner et al., 1993) به طور گسترده استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۱۳ نمونه از بذور ارقام برنج ایرانی موجود در بخش ژنتیک و ذخایر توارثی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مورد بررسی قرار گرفت. بذور یاد شده در مزرعه کاشته شدند و پس از رسیدن گیاهان به مرحله پنجه دهی، نمونه‌گیری برگ صورت گرفت. استخراج دی‌ان‌ای به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1983) صورت گرفت. در این روش برای حذف بیشتر پروتئین‌ها و ایجاد شرایط مطلوب واکنش، از روش استخراج فنل، کلروفرم استفاده شد. برای انتخاب آغازگر مناسب ٦٦ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی ساخت شرکت اپرون بر روی سه نمونه دی‌ان‌ای آزمایش شد و چهارده آغازگر که دارای چند شکلی مطلوب‌تری بودند انتخاب گریدند (جدول ۱)، محلول واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل مواد زیر تهیه گردید:

[۵۰mKCl, ۱۰mMTris-HCl (pH= ۸/۳), %۰/۰۱Gelatin, ۱/۹۲ $mMMgCl_2$

۱۰۰μMdNTPs, ۱ U Taq DNA Polymerase, ۷۵ ng DNA, ۰/٦ μM Primer]

قبل از شروع چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور واسرشته سازی دی‌ان‌ای، محلول واکنش به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس الگوهای هدف طی ۴۰ سیکل طی سه مرحله شامل ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه (واسر شته سازی دی ان ای)، ۳۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه (چسبیدن آغازگر) و ۷۲ درجه سانتیگراد سه دقیقه (ساخته شدن الگوهای هدف) تکثیر شدند. تفکیک فرآورده‌های حاصل از تکثیر بر روی ژل آگاروز ۱/۵ % صورت گرفت. رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ μg/ml انجام شد. باندهای تکرارپذیر حاصل بر اساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) امتیازدهی شدند و ماتریس شباهت داده‌ها بر اساس ضریب شباهت جاکارد تشکیل شد. دندروگرام ماتریش شباهت بر اساس روش UPGMA و نرم‌افزار رایانه‌ای NTSYS ویرایش ۱/۷ ترسیم شده است.

نتایج و بحث

الف – بررسی وضعیت تجزیه کلاستر:

۱ - با استفاده از چهارده آغازگر ۱۳٦ الگوی باند

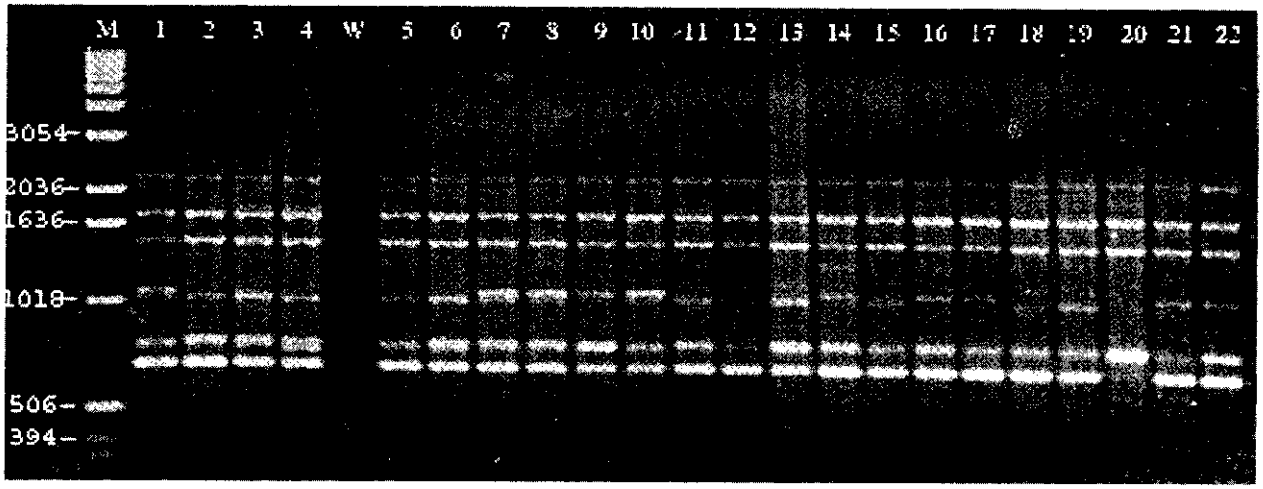
جدول ۱ـ آغازگرهای تصادفی مورد استفاده در مطالعه

Table 1. Arbitrary primers used in the study

نام آغازگر Primers	توالی آغازگر Sequences (5'-3')
OPH -07	GTGCATCGTG
OPG-18	GGCTCATGTG
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPI-09	TGGAGAGCAG
OPI-07	CAGCGACAAG
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPH-20	GGGAGACATC
OPE-20	AACGGTGACC
OPA-13	CAGCACCCAC
OPII-15	AATGGCGCAG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPH-19	CTGACCAGCC
OPI-14	TGACGGCGGT

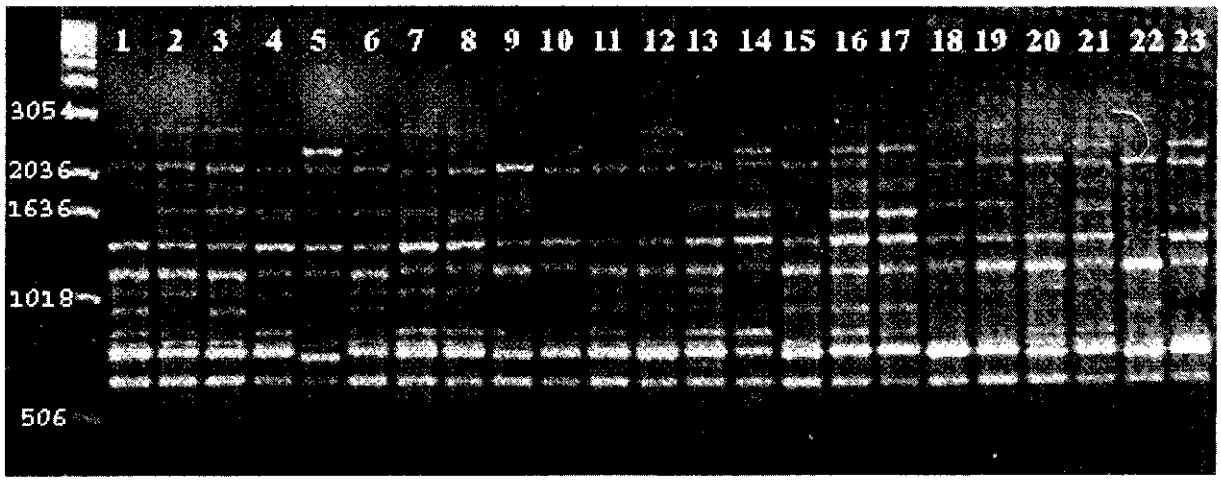
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ـ الگوی باندی حاصل آغازگر (5' GGAAGTCGCC 3') OPH-04 .M:1Kb Ladder و W: شاهد منفی (آب). تفکیک الگوهای باندی با استفاده از آگار ۱/۵ % و ولتاژ ثابت ۸۰ ولت صورت گرفت.

Fig. 1. RAPD band patterns using OPH - 04 (5' GGAAGTCGCC 3'). W: Negative Control and M: 1 Kb Ladder. RAPD band patterns separation through a 1.5% Agarose in a fixed 80 voltage.



شکل ۲ـ الگوی باندی حاصل از آغازگر (5' CAGCGACAAG 3') OPI - 07 .M: 1 Kb Ladder تفکیک الگوی‌های باندی با استفاده از آگار ۱/۵ % و ولتاژ ثابت ۸۰ ولت صورت گرفت

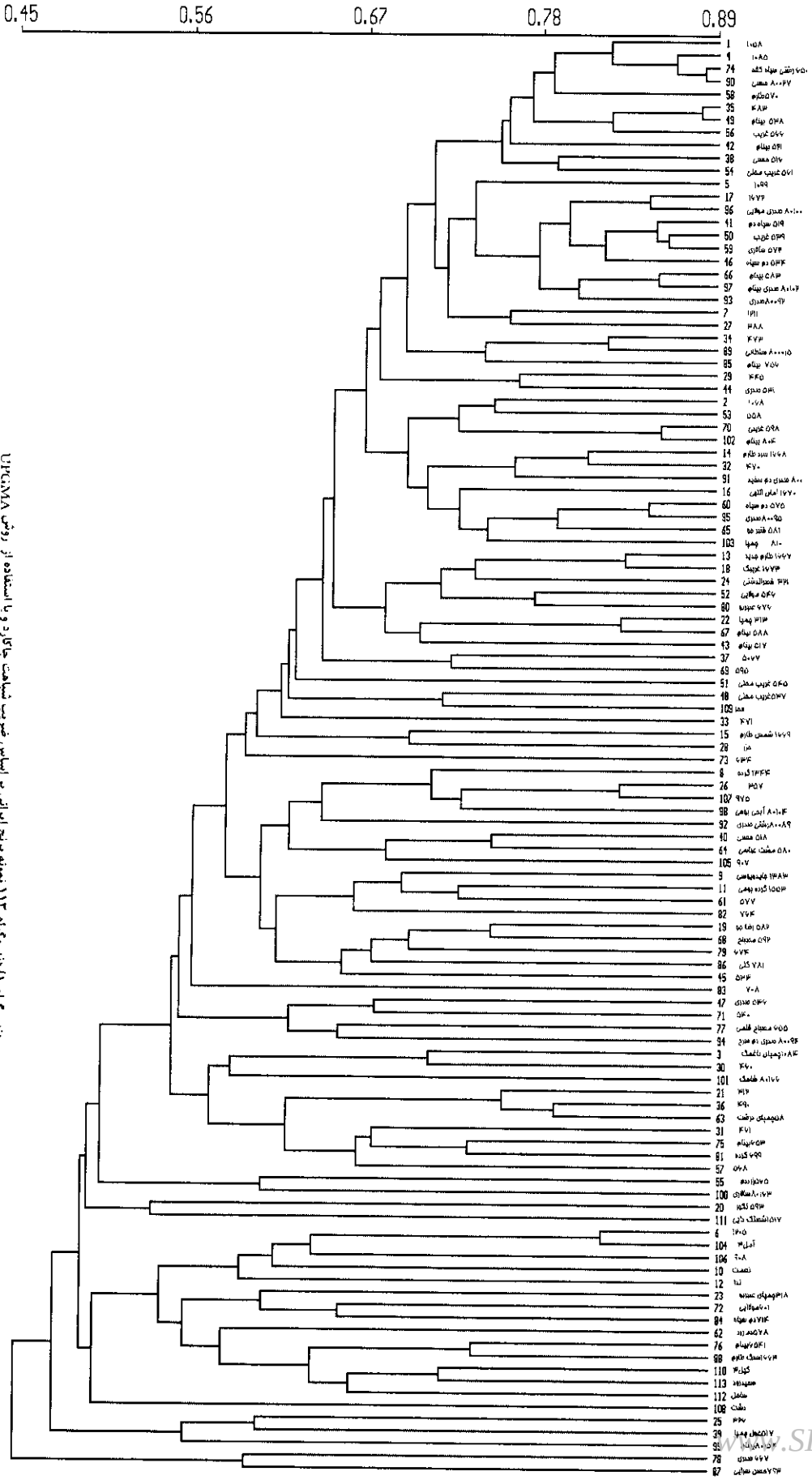
Fig. 2. RAPD band patterns using OPI - 07 (5' CAGCGACAAG 3'). W:Negative Control and M: 1 Kb Ladder. RAPD band patterns separation through a 1.5% Agarose in a fixed 80 voltage.

حاصل شد. آغازگر OPH-19 با هفده باند تکثیر شده قابل امتیاز دهی، جداکثر باندهی و آغازگرهای OPA-03، OPH-20 و OPA-09 هر یک با هشت باند قابل امتیازدهی، جداقل باند تکثیری را داشتند. اما در آغازگر هشت OPA-03 از هشت باند تکثیر شده، فقط سه باند چند شکلی نشان دادند. با استفاده از سایر آغازگرها بین هشت تا دوازده باند ایجاد گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

۲ - ارقام موجود بر اساس دسته بندی انجام شده در هفت

www.SID.ir

Archive of SID



دندروگرام ۱) دندروگرام ۱۱۳ نمونه برنج ایرانی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA

Dendrogram 1) Dendrogram of 113 Samples of Iranian Rice based on Jaccard similarity coefficient using UPGMA method

www.SID.ir

Archive of SID

گروه قرار گرفتند. اکثر قریب با اتفاق این ارقام در گروه یک قرار گرفتند (۸۹ واریته) و گروه‌های دوم، سوم، چهارم، پنجم، ششم و هفتم به ترتیب ۲، ۱۴، ۲، ۱، ۳ و ۲ واریته را شامل می‌شوند. این گروه بندی با نتایج مطالعات میردریکوند (۱۳۷۸) بر اساس نشانگر آیزوزایمی که به هفت گروه تقسیم شده‌اند مطابقت دارد.

۳- از بین واریته‌های اصلاح شده موجود، ۹ واریته مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد، دو واریته خزر و فجر در گروه اول و شش واریته، آمل ۳، ندا، نعمت، گیل ۳، ساحل و سفیدرود در گروه چهارم قرار گرفتند و واریته دشت به تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت. دو واریته گیل ۳ و سفیدرود با ۷۰٪ شباهت نزدیک‌ترین ارقام اصلاح شده به همدیگر می‌باشند.

ب- بررسی تنوع ارقام

۱- برنج‌های ایرانی بر اساس طول دانه به سه دسته صدری، چمپا و گِرده دسته بندی می‌شود (خدابنده، ۱۳۷۱). اما دسته بندی واریته‌ها بر اساس نشانگر رپید، نامگذاری واریته‌ها بر اساس صفات مرفولوژیک را تأیید نمی‌کند. به طوری که که واریته‌های سالاری با کد بانک ژن (۵۷۶ برنج‌های-TN) جزء صدری می‌باشد با واریته غرب از گروه چمپاها با کد بانک ژن (۵۳۹ اساس نام -TN) در یک گروه قرار گرفت. بنابراین بر اساس نام محلی واریته‌ها نمی‌توان برنج‌های ایرانی را دسته‌بندی کرد و می‌توان گفت نامگذاری برنج‌های ایرانی، بر اساس سلیقه کشاورزان و صنف علافان بوده و پایه و اساس علمی برای آن متصور نیست.

۲- در این مطالعه واریته‌های هم‌نام مورد بررسی قرار گرفتند و نشان داده شد که تشابه نام دو واریته دلیلی بر شباهت ژنتیک آن‌ها نمی‌باشد، به عنوان مثال، واریته حسنی در بانک ژن دارای کدهای KC-۸۰۰۲۷ و TN-۵۱۶ دارای ۷۵٪ شباهت بوده و شباهت واریته TN-۵۱۸ با دو واریته بالا ۶۰٪ می‌باشد. بنابراین دو واریته با داشتن نام‌های یکسان، همانند دو واریته مستقل در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند. در نتیجه نام‌های یکسان دلیلی بر شباهت واریته‌ها نمی‌باشد.

قره یاضی و همکاران (Ghareyazie et al., 1994) با استفاده از نشانگر تفاوت طول حاصل از هضم فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR based RFLP) نیز به نتیجه مشابهی رسیده‌اند. هم‌چنین میردریکوند (۱۳۷۸) با استفاده از نشانگر آیزوزایمی نتیجه مشابهی را گزارش کرده است.

۳- در مطالعه تنوع برنج‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای آیزوزایمی میردریکوند (۱۳۷۸)، بسیاری از واریته‌ها با نام‌های محلی متفاوت، بی نام (TN-۲۳۳)، غریب (TN-۵۳۹)، عنبربو (TN-۵۴۹)، صدری (TN-۵۴۱)، مولایی (TN-۵۶۷) و طارم (TN-۵۷۰) مورد بررسی با صددرصد شباهت در یک گروه قرار گرفتند، در حالی که با استفاده از نشانگر رپید واریته‌ها به طور کامل از هم تفکیک شدند. به عنوان مثال دو واریته با کدهای بانک ژن TN-۵۸۸ و TN-۵۲۷ در مطالعه آیزوزایمی دارای صددرصد شباهت بوده‌اند در حالی که در این بررسی با ۷۵٪ شباهت در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین نشانگر رپید قادر است واریته‌ها را به طور مطلوب‌تری از هم تفکیک کند. بنابراین، استفاده از این نشانگر در مدیریت بذور ذخیره شده در بانک ژن توصیه می‌شود.

۴- ارقام بررسی شده در این مطالعه حداکثر ۸۸٪ و حداقل ۴۵ ٪ شباهت داشتند. در مطالعه برنج‌های آسیایی گلازمن (Glaszmman, 1987) حداکثر تنوع ۵۶٪ بوده و در مطالعه واریته‌های زراعی مناطق بلند و پست چند کشور جهان از جمله فیلیپین، هند، برزیل، گینه و نیجریه توسط یول و نگوین (Yul and Nguyen, 1997) با استفاده از نشانگر رپید، حداکثر ۶۵٪ تنوع مشاهده شده است، هم‌چنین کو و همکاران (Ko et al., 1994) در بررسی تنوع ژنتیک برنج‌های استرالیایی با استفاده از نشانگر رپید حداکثر ۲۰٪ تنوع مشاهده کرده است. بنابراین برنج‌های ایرانی با داشتن ۵۵٪ تنوع بسیار متنوع می‌باشند و ذخیره ژرم پلاسم مناسبی برای فعالیت‌های انتقال ژن از طریق به نژادی سنتی و جداسازی ژن هستند.

۵- در مطالعه حاضر نشان داده شد که ارقام موجود در بانک ژن حتی با داشتن نام‌های مشابه فاصله ژنتیک قابل توجهی از همدیگر داشته‌اند بنابراین برای حفظ ژرم پلاسم برنج کشور، جمع آوری نمونه از فواصل کمتر توصیه می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

از بخش ژنتیک و ذخایر توارثی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به خاطر فراهم آوردن بذور مورد نیاز و از همکاری مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی و مؤسسه تحقیقات برنج کشور به خاطر فراهم‌آوردن امکانات مورد نیاز این تحقیق و از آقای مهندس سید قاسم حسینی سالکده به خاطر کمک‌های فنی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

منابع مورد استفاده

خدابنده، ن. ۱۳۷۱. غلات. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۴۸۰.

قره یاضی، ب. ۱۳۷۴. کاربرد نشانگرها دی‌ان‌ای در اصلاح نباتات، چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی اصفهان.

میردریکوند، م. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه بندی توده برنج‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان - دانشکده کشاورزی.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davids. 1980. Construction of genetic linkage map on man using restriction fragment lenght polymorphism. Am. J. Hum. Genet. **32:**314-331.

Bustos, A.D., C. Casanova, C. Solar and N. Jouve. 1998. RAPD variaition in wild population of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Theor. Appl. Genet. **96:**101-111.

Caeto - Anolles G. B. J. Bassam, P. M. Gresshoff. 1991. DNA Amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology **9:**553-557.

Chalmers, K. J., U. Barua, C.A. Hackett, W. T. Thomas, and W. Powell. 1993. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley. Theor. Appl. Gent. **87:**314-320.

Debra, R. A. and J. R. Frederick. 1999. Genetic diversity and structure of narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. Am. J. of Botany **86(3):**344-353.

Dellaporta S.C., F. Wood and J. B. Hicks. 1983. Plant minipreparation: Version II. Plant Mol. Bio. Report **4:**19-21.

Dje Y., Heuertz M., Lefebvre C. and X. Vekemans. 2000. Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatelite markers. Theor. Appl. Genet. **100:**918-925.

Endo, T. and H. Morishima. 1983. Rice in: "Tankesley S. D. and Orton, T. J. (eds) isozymes in Plant genetics and breeding, Part B., Springer-Verlag Berlin Heidelberg".

Estiier H., L. Tiiorsten and I. Sciimitt. 1999. Genetic variation of *Usnea filipendola* (Parameliaceae) populations in western Germany investigated by RAPDS suggests reinvasion from various sources. Am. j. of Botany. **86(5):**753-757.

Ghareyazie, B., G. N. Huang, G. second and J. Bennet. 1995. Classification of rice germplasm (Analysis using ALP and PCR - based RFLP). Theor. Appl. Genet. **91:**218-227.

Glaszmman, J. C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theor. Appl. Genet. **74:**21-30.

Graham, J., R. J. M. Nicol. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars **93:**402-406.

Hormaza, J. I., L Dollo and V. S. Polito. 1994. Identification of RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor. Appl. Gent. **89:**9-13.

www.SID.ir

Archive of SID

Inoue, T., H. S. Zhong, A. Miyao, I. Ashikawa, L Monna, L Fukuoka, L Miyadera, Y. Nagamura, Kuratan., T. Sasaki and Y. Minobe. 1994. Sequence-tagged sites (STSS) as standard landmarkers in the rice genome. Theor. Appl. Genet. **89:**728-734.

Ko, H. L. D. C. Cowan,R. J. Henery, G. C. Graham, A.B. Blakeney and L. G. Lewin. 1994. Random ampilified polymorphic DNA analysis of Austerlian Rice (*Oryza sativa* L.) variaties. Eupytica **80:**179-189.

Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American. April , 56-65.

Nakumura, Y., M. Leppert, P. Oconell, R. Wolff, T. Holm. M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, R. White. 1987. Variable number of Tandem-Repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science **235:**1616-1622.

Nebauer, S. G., L. Castillo-Ahudo and J. Segura. 2000. An assessment of genetic relationships within the genus digitalis based on PCR generated RAPD markers. Theor. Appl. Genet. **100:**1209-1216.

Nematzadeh, G. A., M. T. Karbalaie, F. Farrokhzad and B. Ghareyazie. 2000. Aromatic rices of Iran, In: " Singh R. K., Singh U.S. and Khush, G.S. (eds) Aromatic rices pp. 191-199, Oxford and IBH publishing Co. New Delhi and Calcutta".

Olson, M., L. Hood. C. Cantor. Botstern, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. Science **245:**1434-1435.

Patterson, A. 1991. DNA markers in Plant improvement. Adances in agronomy. **46:**39-90.

Penner. G. A., J. Chong, M. Levesque-Lemay, M. Molanar S. and M. Fedak. 1993. Identification of RAPD marker linked to the oat system rust gene PG3. Theor. Appl. Genet. **85:**702-705.

Richard. A. V. and T. N. Henry. 1992. Use of RAPD markers determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. Theor,. Appl. genet. **84:**835-836.

Romersberg, H. 1989. Cluster analysis for research, Bemon Calif. Lifetime learning publications. **pp:**120-139.

Second, G. 1991. Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic resources. In: " Y. P. S. Bajaj (ed), Biotechnology in agriculture and farestry Vol. 4 rice 468-490. Springer-Verlag berlin heidelberg".

Smith, J. S. C. and O. S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy. **45:**85-141.

Vos, P., R. Hogers. M. Bleeker. M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. Aflp. a New technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research **23(21):**4407-4414.

Welsh, J. and M. Michael. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research **18:**7213-7218.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelic, J. K. Liva, A. Rafalski and V. T. Scott. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research. **18:**6531-6535.

Yul, X. and H. T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) . Theor. Appl. Genet. **87:**668-672.

www.SID.ir