

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بومی پیاز ایرانی به کمک نشانگر مولکولی RAPD

Genetic diversity of Iranian onion genotypes using RAPD marker

فاطمه احمدی مشگنانی^۱، مهدی نصر اصفهانی^{۱*}، محمدعلی ابراهیمی^۲

۱- به ترتیب کارشناس، دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Ahmadi Moshgenani F¹, Nasr Esfahani M^{*1}, Ebrahimi MA²

1. Instructor, Associate Professor, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research Center, Isfahan, Iran

2. Associate Professor, Payame Noor University, Tehran, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mne2011@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

برنامه‌های اصلاحی گیاهان بر اساس تنوع و انتخاب صفات برتر کمی و کیفی صورت می‌گیرد. لذا ارزیابی تنوع ژنتیکی، اولین مرحله در برنامه‌های اصلاحی است. در این راستا، استفاده از روش‌های جدید مطالعه تنوع ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد. در این بررسی تعیین تنوع ژنتیکی سیزده ژنوتیپ پیاز ایرانی در مقایسه با دو ژنوتیپ خارجی با استفاده از نشانگر رپید (RAPD) صورت گرفته است. یازده آغازگر تصادفی استفاده شده در ژنوتیپ‌های پیاز چند شکلی نشان دادند. محاسبات آماری بر اساس ضریب تشابه جاکارد و گروه‌بندی به روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS ver. 2.02 انجام شد. در نمودار حاصل در حد تشابه ۹۴ درصد ژنوتیپ‌ها در پنج گروه جای گرفتند. ضریب کوفنتیک (Cophenetic) بین ماتریس تشابه و نمودار حاصل $r = 0.87$ به دست آمد. ژنوتیپ‌های سفید قم و یزد با ضریب تشابه ۹۴ درصد بیشترین تشابه و ژنوتیپ‌های کاشان و پادوک با ضریب تشابه ۳۰ درصد کم‌ترین تشابه را نشان دادند. ژنوتیپ‌های تک‌زاس ارلی گرانو و خمین در یک گروه با ضریب تشابه ۸۰ درصد و یلو سوئیت اسپانیش و یاسوج با ضریب تشابه ۸۳ درصد در گروه دیگر قرار گرفتند. لذا، این احتمال وجود دارد که اجداد اولیه دو ژنوتیپ تک‌زاس ارلی گرانو و سوئیت یلو اسپانیش متعلق به ژنوتیپ‌های مورد آزمون ایرانی باشند.

واژه‌های کلیدی

پیاز (*Allium cepa*)

تنوع ژنتیکی

RAPD
DNA

نوارهای چند شکل در درون توده‌ها و هیبریدها از ۶۶ تا ۱۳۱ نوار متغیر بود و فاصله ژنتیکی بین آنها بر اساس ضریب نی بین ۰/۳۷ تا ۰/۳۱ برآورد شد. تجزیه واریانس مولکولی تنوع معنی‌داری را در بین و درون توده‌های پیاز نشان داد. ولی، میزان واریانس بین ژنوتیپ‌های نسبت به درون ژنوتیپ‌های کمتر بود (Mosavizade 2006). در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ توده تره ایرانی و مقایسه آنها با کورات و تره فرنگی از ۳۲۰ آغازگر ده تایی استفاده شده است و ۹ چند شکل خوب جهت دسته بندی گیاهان بدست آمده است (Dashti et al. 2003).

با توجه به موارد فوق و نیز اهمیت پیاز به عنوان یکی از محصولات سبزی حایز اهمیت، لازم شد که تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کشوری مورد بررسی قرار گیرد. لذا در این راستا میزان تنوع ژنتیکی سبزه ژنوتیپ مختلف پیاز ایرانی در مقایسه با دو ژنوتیپ پیاز خارجی با استفاده از نشانگر رپید (RAPD) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

این آزمایش در بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انجام گرفت. مواد گیاهی این آزمایش شامل سبزه ژنوتیپ از ژنوتیپ‌های بومی پیاز ایرانی در مقایسه با دو ژنوتیپ خارجی بودند. سبزه ژنوتیپ موجود از گونه پیاز مورد کشف با نام علمی *Allium cepa* از ژنوتیپ‌های رایج کشور و دو ژنوتیپ رایج خارجی متعلق به کشورهای اسپانیا و آمریکا بود. بذر ژنوتیپ‌های مربوطه‌ی مورد آزمایش از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور واقع در کرج تهیه شد. ژنوتیپ‌های بومی پیاز کشور شامل ژنوتیپ‌های کاشان، آذرشهر، درچه اصفهان، سفید قم، یزد، یاسوج، هرسین، نیشابور، بهبهان، پادوک، خمین، رامهرمز و صالح آباد نطنز و ژنوتیپ‌های خارجی شامل یلو سوئیت اسپانیس (Yellow Sweet Spanish) و نگراس‌ارلی‌گرانو (Texas Early Grano) بودند. کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در خرداد ماه ۱۳۹۰ برای بررسی قدرت جوانه زنی و کیفیت بذر ابتدا در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین درصد جوانه زنی، بذرها در محیط گلخانه در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شد. استخراج DNA برگ پیاز با استفاده از روش CTAB انجام گرفت (Ganish et al. 2007). واکنش تکثیر (PCR) با حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. از این

پیاز (*Allium cepa*)، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی بوده که از هزاران سال قبل، به عنوان دارو و طعم‌دهنده غذاها از آن استفاده شده است (Mitchell et al. 1984). پیاز گیاهی است علفی و دو ساله که در سال اول اندام‌های رویشی آن به وجود می‌آیند و در سال دوم اندام‌های زایشی ایجاد می‌شود که تولید بذر می‌کنند (Rabinowitch and Kamenetsky 2002; Agafonov 2006). این گیاه از جنس *Allium* و خانواده Liliaceae (Lily family) می‌باشد. پیاز از محصول سبزیجات دنیا و دومین محصول این گروه پس از گوجه‌فرنگی می‌باشد و علی‌رغم ارزش اقتصادی آن دانش کمی در مورد تنوع ژنتیکی ارقام آن وجود دارد (2010 Maniruzzaman et al.). امروزه، نشانگرهای مولکولی متعددی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی در دسترس می‌باشند. استفاده از چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف اطلاعات ژنتیکی قابل توجهی را فراهم آورده است (Zhang et al. 1992). هزینه بالا و زمان بر بودن این روش، از عوامل محدودکننده ارزیابی تنوع ژنتیکی در مقیاس وسیع و مطالعه ژنتیک جمعیت‌ها بوده‌است. در روش SSR، برای طراحی آغازگرها نیاز به اطلاعات اولیه از توالی نوکلئوتیدی ژنوم مورد مطالعه می‌باشد (Smulders et al. 1997). روش RAPD این محدودیت‌ها را نداشته و با استفاده از آن می‌توان تعداد زیادی از نشانگرهای چند شکل را در مدت زمان کم‌تر و با مقادیر کم DNA ژنومی و بدون اطلاع قبلی از توالی ژنومی، مورد استفاده قرار داد. در شرایط آزمایش غیر استاندارد، تکرارپذیری نشانگرهای RAPD کاهش می‌یابد (Prenner 1993). RAPD یک نشانگر غالب است که برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در چند گونه گیاهی از جمله پیاز استفاده شده است (Thompson et al. 1998; Ouborg et al. 1999; Fu et al. 2002). به منظور بررسی روابط ژنتیکی توده‌های بومی پیاز ایران و مقایسه با برخی از ارقام خارجی از ۱۵ جفت آغازگر ریزوماهواره SSR استفاده شده است (Karimi-Nafchi et al. 2011). به منظور ارزیابی تنوع درون و بین توده‌های بومی پیاز ایران، ۲۰ توده بومی به همراه دو هیبرید، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۶ آغازگر RAPD از ۲۰۰ آغازگر مورد ارزیابی، ۱۷۰ نوار چند شکل تولید کردند. تعداد کل

آغازگرهای OPA-09 و OPE-01 با ۷۱/۴۳ درصد چندشکلی به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین درصد چند شکلی را ایجاد کردند. میانگین درصد چند شکلی برای آغازگرهای تصادفی ۸۹/۸ درصد تعیین شد.

برای تجزیه و تحلیل‌های آماری، باندهای هم شکل حذف و فقط باندهایی که چند شکلی نشان دادند مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. قطعات DNA تکثیر شده بین ۱۵۰۰-۵۰۰ bp بودند. برای تفکیک صحیح ژنوتیپ‌ها و هم‌چنین، تخمین درست میزان تشابه موجود بین ژنوتیپ‌ها، دقت کافی در امتیازبندی و حذف باندهای مصنوعی صورت گرفت. این موارد شامل باندهایی بود که در تغییر شرایط PCR و کدورت ژل به صورت باند مشاهده می‌شد. زیرا عدم دقت در امتیازبندی و وجود باندهای مصنوعی سبب برآورد نادرست روابط ژنتیکی بین افراد می‌شود.

ماتریس صفر و یک حاصل برای بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها شامل ۱۵ سطر و ۸۶ ستون بود که سطرها شامل ژنوتیپ‌ها و ستون‌ها شامل باندهای چند شکل بودند. محاسبات آماری این بررسی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و گروه‌بندی به روش UPGMA استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver. 2.02 انجام شد. نتایج حاصل از آغازگرهای تصادفی ژنوتیپ‌های مختلف مورد بررسی پیاز را در پنج گروه طبقه‌بندی کرد. گروه یک شامل سفید قم و یزد با ضریب تشابه ۹۴ درصد بود و این احتمال وجود دارد که ژنوتیپ‌ها از یک جمعیت اولیه منشا گرفته باشند و یا این که در اصل یک ژنوتیپ بوده‌اند که به دلایل نامعلوم به مرور زمان اسامی متفاوتی به خود گرفته‌اند. کم‌ترین تشابه به ترتیب بین کاشان و پادوک با ضریب تشابه ۳۰ درصد و هم‌چنین کاشان با دو ژنوتیپ بهبهان و هرسین با ضریب تشابه ۳۳ درصد برآورد شد. بین آذرشهر و بهبهان ضریب تشابه ۳۲ درصد بود. در مجموع بهبهان کم‌ترین تشابه را با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. دامنه‌ی ضریب تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بین ۹۴ - ۳۰ درصد محاسبه شد. میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۸۱/۳۰ درصد برآورد شد. ضریب کوفتیک (Cophenetic) بین ماتریس تشابه و نمودار حاصل $r = 0.87$ محاسبه شد.

تحقیقات (Wilkie et al. 1993) و (Friesend and Klaas 1998) در خصوص کارایی نشانگرهای RAPD نشان داد که این روش

مقدار دو میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر و بقیه شامل سایر اجزای واکنش PCR (شامل: آب مقطر دو بار تقطیر (دیونیزه) برای رساندن حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر، بافر PCR، کلرید منیزیم، dNTP، آنزیم Taq polymerase، آغازگرها بود (Ganish et al. 2007).

از یازده آغازگر تصادفی مربوطه، ساخت شرکت سیناژن استفاده شد و پس از انجام PCR از هر نمونه شش میکرولیتر برداشته و با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading day) مخلوط کرده و در چاهک‌های مجزا روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد. برای هر الکتروفورز، چاهک اول برای نشانگر با باندهای استاندارد ۱۰۰ جفت باز از شرکت Max cell (Hybrid and Ladder 100-) (10000 bp) در نظر گرفته شد. پس از انجام الکتروفورز ژل برای تعیین الگوهای باندهای در دستگاه ژل داک قرار گرفته و در حضور اشعه UV از نوارهای باندهای حاصل عکس‌برداری شد.

محاسبات آماری بر اساس ضریب تشابه جاکارد و گروه‌بندی به روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS ver. 2.02 انجام شد. به این منظور، حضور هر باند یک و عدم حضور آن صفر در نظر گرفته شد. ضریب تشابه جاکارد برای آغازگرهای تصادفی در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش پیاز محاسبه شد و خوشه‌بندی گروهی برای ژنوتیپ‌های پیاز به روش UPGMA انجام شد. هم‌چنین ضریب کوفتیک (Cophenetic) بین ماتریس تشابه و نمودار حاصل محاسبه شد.

از بین ۴۰ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی گروه OP-مورد ارزیابی، یازده آغازگر ایجاد چند شکلی کردند و دیگر آغازگرها یا هیچ باندهای ایجاد نکرده و یا محصولات تکثیر شده آن‌ها وضوح کافی نداشت. در بین آغازگرهای مورد استفاده آغازگر OPA-19، OPAB-04 و OPC-06 با ایجاد ۱۰ باند، بیش‌ترین تعداد باند و آغازگر OPD-01 با ایجاد دو باند کم‌ترین تعداد باند را ایجاد کردند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر ۷/۲ باند تعیین شد. آغازگر OPA-19 بیش‌ترین قطعه چند شکل را ایجاد کرد. میانگین تعداد قطعه چند شکل برای هر آغازگر ۶/۴۲ محاسبه شد. درصد چند شکلی آغازگرهای تصادفی، بین ۷۱/۴۳-۱۰۰ درصد متغیر بود. آغازگرهای OPA-07، OPA-16، OPA-19، OPC-09 و OPD-01 با ۱۰۰ درصد چند شکلی و

می‌شود (Wilkie et al. 1993 ; Ganish et al. 2007). بررسی‌های ژنتیکی پیاز به هر دو روش سیتوژنتیکی و مولکولی نسبت به دیگر محصولات محدود است و نیاز به زمان بیش‌تری برای مطالعه دارد زیرا DNA ژنومی بزرگ و ژنتیک پیچیده‌ای دارد (Peffley and Mangum 1990). در سال‌های اخیر نشانگرهای DNA چند شکل به منظور برنامه‌های حفاظت ژرم‌پلاس و توسعه ژنتیک گیاه ساخته شده است. مخصوصاً نشانگرهای مبتنی بر RFLP، اتصال براساس RFLP در گونه‌های پیاز به دلیل اندازه بزرگ ژنوم در مقایسه با دیگر سبزیجات دارای مشکلاتی است. سطح همانندسازی نشده DNA در سلول، در *A. cepa* برابر ۳۳/۵ پیکوگرم، در گوجه فرنگی دو پیکوگرم و در ذرت ۷/۸ پیکوگرم می‌باشد (Bennet et al. 1976).

در مجموع چندین عامل تخمین روابط ژنتیکی بین افراد را تحت تاثیر قرار می‌دهد که عبارتند از: تعداد نشانگر مورد استفاده، توزیع نشانگرها در ژنوم و طبیعت مکانیسم‌های تکاملی که در واقع زیربنای تنوع محاسبه شده می‌باشند. در ایران انواع متفاوتی از توده‌های بومی پیاز کاشت می‌شوند (Saffarian 1994) که تاکنون خصوصیات و قرابت ژنتیکی همه آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی مطالعه نشده است. در مجموع از نتایج حاصل در این تحقیق، به نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌های بومی پیاز ایرانی با یکدیگر متفاوت و بعضی قرابت نزدیک دارند. هم‌چنین ژنوتیپ‌های خارجی مورد آزمون با ژنوتیپ‌های ایرانی قرابت نزدیکی داشته که بیانگر این احتمال است که اجداد آنها ژنوتیپ‌های ایرانی بوده است.

منابع

- Dashti F, Kashi A, Vezvaei A (2003) Study on genetic diversity in genotypes of Taree Irani Allium ampeloprasum ssp. persicum using morphological characters. Seed and Plant 19: 87-100
- Karimi-Nafchi Z, Sayed Tabatabaei BE, Mobli M (2011) Genetic diversity of onion genotypes using microsatellite markers. Iranian Journal of Horticultural Sciences 42: 11-20.
- Mosavizade SA (2006) Analysis of genetic diversity in Iranian onion landraces using morphological and molecular markers. PhD. Thesis. Dept. of Agriculture, Tabriz University.

برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های پیاز مناسب می‌باشد. هم‌چنین، (Roxas and Peffley 1992) کاربرد موفق نشانگرهای RAPD را در شناسایی ارقام پیاز با استفاده از شش آغازگر تصادفی گزارش کردند که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی و هماهنگی دارد. همان‌طوری که از نتایج مشخص شد، ژنوتیپ‌های ایرانی با یکدیگر متفاوت بوده که در الگوهای مربوطه به وضوح قابل مشاهده است. این مشخصه نشان می‌دهد که تفاوت‌های مورد مشاهده تاثیرات جغرافیایی نیز دخیل بوده و قرابت آنها را با ژنوتیپ‌های خارجی نمایان می‌سازد. در این خصوص Le Thierry (1997) Dennequin et al. تعداد ۱۹ ژنوتیپ پیاز و ۲۱ ژنوتیپ موسیر را که تکثیر رویشی و جنسی داشتند، از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و نشانگرهای RAPD، برای تعیین روابط ژنتیکی بررسی کردند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای RAPD، هشت ژنوتیپ اروپایی و گرمسیری پیاز خوراکی را در گروه جداگانه‌ای از ۱۴ ژنوتیپ موسیر گروه‌بندی کرد. در این بررسی نتایج دو روش استفاده از نشانگرهای RAPD و ویژگی‌های مورفولوژیک تقریباً یکسان بود. این پژوهش‌گران بر پایه گروه‌بندی‌های حاصل گزارش کردند که قرابت بالایی بین پیاز و موسیرهای تولیدی از طریق بذر وجود دارد و آنها را مربوط به گونه‌های *A. cepa* دانستند. مقایسه تنوع جغرافیایی با این گروه‌بندی‌ها باعث شد که آنها دو مسیر مهاجرت از آسیا به آفریقا و اروپا را برای پیاز گزارش کنند. این گزارش در این‌جا با نتایج این تحقیق در خصوص قرابت ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی نیز مورد تایید قرار می‌دهد. هم‌چنین، تفکیک ژنوتیپ‌های مورد آزمون در این تحقیق با گزارش در بررسی ارقام مختلف پیاز در کشور ژاپن موافقت دارد. (Tanikawa et al. 2002) آنها ۲۲ رقم پیاز را با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی کردند. ۱۷ آغازگر از ۱۰۰ آغازگر مورد بررسی نوارهای چند شکل و تکرارپذیر واضح تولید کردند. از ۸۸ نشانگر تولید شده توسط ۱۷ آغازگر، ۳۵ نشانگر چند شکل بودند. نشانگرهای چند شکل حاصل توانستند ۲۲ رقم مورد مطالعه را از هم متمایز کنند. نشانگرهای مبتنی بر RFLP به دلیل اندازه بزرگ ژنوم گونه‌های پیاز در مقایسه با دیگر سبزیجات مشکلاتی را ایجاد می‌کند. به‌عنوان یک جایگزین از RAPD برای تجزیه ژنتیک پیاز استفاده

- Agafonov A (2006) Perennial onions - state and perspectives of its use. proceedings on vegetable and melon growing (to 75-anniversary of the All-Russian Research Institute of Vegetable Crops). VNIIO, Moscow. 1: 39-42.
- Bennet MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society, London B224: 227-274.
- Friesen N, Klaas M (1998) Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. Genetic Resources and Crop Evolution. 45: 511-523.
- Fu YB, Peterson G, Diederichsen A, Richards KW (2002) RAPD analysis of genetic relationship of seven flax species in the genus *Linum* L. Genetic Resources and Crop Evolution 49: 253-259.
- Ganesh CT, Veere Gowda R, Narayanaswamy P, Ramanjini Gowda PH (2007) Development of protocols for DNA Extraction and Amplification in Onion (*Allium cepa* L.) for RAPD Analysis. Recent Trends in Horticultural Biotechnology.
- Le Thierry D'ennequin M, Panaud O, Robert T, Ricoch A (1997) Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. Heredity 78: 403-409.
- Maniruzzaman ME, Haque M, Haque M, Sayem MA, AL-Amin M (2010) Bangladesh Journal of Agricultural Research 35: 313-322.
- Mitchell PD, Jerie PH, Chalmers DJ (1984) Effects of regulated water deficits on pear tree growth, flowering, fruit growth and yields. Horticultural Science 109: 604-606.
- Ouborg NJ, Piquot Y, van Groenendael JM (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plant. Journal of Ecology 87: 551-568.
- Peffly EB, Mangum PD (1990) Introgression of *A. fistulosum* L. into *A. cepa* L. via cytoplasmic evidence. Theoretical and Applied Genetics 79: 113-118.
- Prenner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Dommier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SL, Fedak G (1993) Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods and Applications 2: 341-345.
- Rabinowitch HD, Kamenetsky R (2002) Shallot *Allium cepa*, Aggregatum group. In: *Allium* crop science: Recent Advances eds. Rabinowitch, H.D. and currah, L. CAB International p. 409-430.
- Roxas VP, Peffley EB (1992) Short-day onion varietal identification using molecular RAPD markers. *Allium* Improvement Newsletter 2: 5-17.
- Saffarian A (1994) Onion production and its constraints in Iran. Acta Horticulture 358: 95-100.
- Smulders MJ, Bredemeijer MG, Rus-Kortekass W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* Species. Theoretical and Applied Genetics 97: 264-272.
- Tsuyoshi Tanikawa, Masatoshi Takagi, Masahiko Ichii (2002) diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 71:244- 251.
- Thompson JA, Nelson RL, Vodkin LOV (1998) Identification of diverse soyabean germplasm using RAPD markers. Journal of Crop Science and Biotechnology 38: 1348- 1355.
- Wilkie SE, Isaac PG, Slater RJ (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theoretical and Applied Genetics 86: 497-504.
- Zhang Q, Saghai Maroof MA, Lu TY, Shen BZ (1992) Genetic diversity and differentiation of indicat and japonicarice detected by RFLP analysis. Theoretical and Applied Genetics 83: 495-499.