

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش یافته سویا با قدرت تثبیت ازت بالا با

استفاده از نشانگر ملکولی RAPD

مهدی یونسی حمزه‌خانلو^۱، علی ایزدی دربندی^{۲*}، محمد طاهر حلاجیان^۳، نجات پیرولی
پیرانوند^۴، عباس مجدآبادی^۵

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳، ۴ و ۵- به ترتیب مربیان و استادیار پژوهشکده سازمان انرژی اتمی ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Aizady@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

چکیده

در این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی نسل هفتم (M₇) ۳۳ لاین جهش یافته سویا با تثبیت ازت بالا حاصل از پرتوتابی رقم مادری L17 با اشعه گاما به همراه دو رقم تجاری ویلیامز و کلارک و رقم مادری L17 با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD حاصل انجام گرفت که مجموعاً ۱۰۴ باند قابل امتیازدهی بدست آمد. از بین این ۱۰۴ باند ۳۴ باند یک شکل و بقیه (۷۰ باند) چند شکل بودند. برای برآورد شباهت بین لاین‌های بررسی شده و ارقام تجاری و مادری از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. میزان تشابه در بین افراد بررسی شده بین ۰/۷۹-۰/۱۷ متغیر بود. بر اساس ماتریس تشابه، لاین جهش یافته شماره ۳۲ (M32) مشابه‌ترین لاین به رقم مادری و لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) دورترین لاین جهش یافته نسبت به رقم مادری بود. گروه بندی ژنوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای و با استفاده از الگوریتم CL (دورترین همسایه) لاین‌ها و ارقام بررسی شده در هفت گروه مختلف قرار گرفتند. با توجه به تنوع بالایی که لاین‌های جهش یافته از خود نشان دادند این لاین‌ها می‌توانند در برنامه‌های آتی اصلاح نباتات برای توسعه ارقام مورد نظر استفاده شوند

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
جهش یافته،
سویا،
RAPD.

مقدمه

سویا (*Glycine max* L.) از گیاهان مهم زراعی و با ارزش‌های فراوان در تأمین نیازهای غذایی بشر است. از این جهت شناسایی منابع ژنتیکی اولیه و تلاش در ایجاد ذخایر ژنتیکی با ارزش جدید می‌تواند رهیافت بسیار مهم اصلاحی باشد. تنوع ژنتیکی به منزله‌ی ماده اولیه فعالیت‌های اصلاح نباتات است و جهش این تنوع ژنتیکی را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در گیاه سویا نسبت به سایر گیاهان محدودتر است. گزارش شده که در هر مکان ژنی سویا معمولاً فقط دو الل چند شکلی طولی قطعات محدود شده (RFLP) وجود دارد (۲، ۳). هنگامی که تنوع ژنتیکی به واسطه استفاده از روش‌های متداول اصلاح نباتات محدود گردد، جهش‌های القائی می‌تواند مهم‌ترین روش برای توسعه تنوع ژنتیکی در مواجهه با شرایط تنگنا باشد.

آزمایشات اصلاحی از طریق جهش منجر به شناسایی بسیاری از لاین‌های جهش‌یافته با صفات مطلوب مانند مقاومت به ریزش غلاف، محتوای پایین لینولئیک اسید^۱ و محتوای بالای اولئیک اسید^۲ در گیاه سویا شده است (۴). از جهش‌زاهای فیزیکی مانند اشعه گاما و ترکیب آن با جهش‌زاهای شیمیایی مانند اتیل متان سولفانات برای القای تغییرات ژنتیکی و یا القای مقاومت به بیماری‌ها و سموم مانند سم آترازین در سویا و سایر گیاهان به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است (۵ و ۶) به‌طوری که بیش از ۲۳۰۰ واریته جهش‌یافته با استفاده از اشعه‌های موثرانی آزاد شده است (۷). بررسی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی نشان داده است که این گونه جهش‌ها باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی هم در سطح ماده ژنتیکی و هم در سطح مورفولوژیکی گردیده است، که این تغییرات می‌تواند در راستای اهدافی باشد که محققان به دنبال آن هستند (۸ و ۹). نشانگر RAPD به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی تنوع جهش‌یافته‌ها در بسیاری از گیاهان مانند سویا استفاده شده است. این گونه تغییرات که بواسطه تغییر در تک مکان یا بیش از یک مکان ژنی و یا بواسطه حذف و اضافه شدن توالی DNA می‌باشد، می‌تواند بواسطه تغییراتی که در مکان‌های اتصال آغازگرها اتفاق می‌افتد آشکار شود (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). بررسی تنوع لاین‌های جهش‌یافته با قدرت تثبیت ازت بالا حاصل از پرتودهی با اشعه گاما، مقایسه تنوع لاین‌های جهش یافته، رقم مادری و ارقام تجاری از لحاظ نشانگرهای مولکولی (RAPD) و گروه‌بندی آنها جهت بهره‌برداری‌های اصلاحی از اهداف مورد نظر در این تحقیق بود. مطالعات اولیه نشان داده است که لاین‌های حاضر از نظر قدرت تثبیت ازت نسبت به رقم مادری L17 و سایر لاین‌های جهش یافته برتر می‌باشند (۱).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تنوع ژنتیکی در نسل هفتم ۳۳ لاین جهش‌یافته رقم L17 که قبلاً از پرتوتابی بذور با دزهای ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰گری با استفاده از اشعه گاما در گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای تحقیقات

^۱ Linoleic acid

^۲ Oleic acid

کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمده بودند بررسی شدند. در این تحقیق از رقم L17 (که لاین‌های جهش یافته از آن بوجود آمده بودند) و ارقام تجاری ویلیامز (WI) و کلارک (CL) که از بخش دانه‌های روغنی مرکز تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شده بودند نیز استفاده شد.

استخراج DNA و PCR

تمامی مواد مورد نیاز برای انجام واکنش از شرکت سینا ژن خریداری شد. استخراج DNA بر مبنای روش شارما و همکاران (۱۴) صورت گرفت. از بین تعداد زیادی آغازگر، تنها ۱۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی (جدول ۱) که چندشکلی مناسبی را برای نمونه‌های مورد مطالعه داشتند برای این تحقیق انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳ (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۷/۸۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر، ۰/۲۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی (۰/۴ مول در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۵ واحد/میکرولیتر)، ۱/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم و ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانو گرم در هر میکرولیتر) استفاده گردید. واکنش RAPD بر اساس روش شارما و همکاران (۱۴) انجام گرفت. از دستگاه ترموسایکلر اپندورف برای چرخه‌های دمایی واکنش استفاده شد. چرخه‌های دمایی واکنش PCR عبارت بود از دو چرخه به‌صورت، ۹۴°C، ۲ دقیقه برای واسرشته سازی، ۳۵°C، یک دقیقه برای اتصال، ۷۲°C، یک دقیقه برای تکثیر، سپس دو چرخه به‌صورت، ۹۴°C، یک دقیقه برای واسرشته سازی، ۳۵°C، ۳۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲°C، یک دقیقه برای تکثیر، سپس ۴۰ چرخه به‌صورت، ۹۴°C، ۱۵ ثانیه برای واسرشته سازی، ۳۵°C، ۳۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲°C، یک دقیقه برای تکثیر و در نهایت یک مرحله به‌صورت، ۷۲°C، ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی بود. پس از اتمام چرخه‌ها محصولات واکنش از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش‌های PCR هت تعیین تکرارپذیری نشانگرهای RAPD حداقل دو بار تکرار شدند. محصولات PCR در ژل‌های آگارز ۱/۵ درصد، بافر TAE و ولتاژ

^۳ Polymerase chain reaction

ثابت ۸۰ به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. ژل‌ها با محلول ۰/۵ میکروگرم/میکرولیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و پس از قرار گرفتن در زیر نور فرابنفش (۲۶۰ نانومتر) عکس برداری از آن‌ها انجام گردید.

محاسبات آماری

برای تجزیه داده‌های حاصل از نشانگر RAPD ابتدا به خاطر کیفی بودن ماهیت آن‌ها ماتریس صفر و یک تشکیل شد. باندهای یک شکل که در تمام افراد تکثیر شده بودند، از تجزیه حذف شدند. ماتریس داده‌ها که در آن ردیف‌ها نماینده لاین‌ها و ستون‌ها نماینده نشانگرها بودند در نرم افزار NTSYS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای محاسبه ماتریس تشابه در اندازه‌گیری شباهت بین ژنوتیپ‌ها از ضریب تشابه جاکارد^۱ استفاده شد. در این تحقیق روش CL^2 یا دورترین همسایه‌ها برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به کار برده شد. برای به دست آوردن درصد چند شکلی تعداد قطعات چند شکل بر تعداد قطعات کل تقسیم شد و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید. برای محاسبه PIC از فرمول روبرو استفاده شد، $H_e = 1 - \sum P_i^2$ که H_e هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا همان PIC می‌باشد و P_i فراوانی آلل نام می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج تکرار واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نشان داد که در شرایط تکثیری یکسان الگوی باندهای RAPD بطور مشابه خواهد بود. واکنش PCR با ۱۰ آغازگر تعداد ۱۰۴ باند قابل نمره‌دهی را

تکثیر نمود که ۷۰ باند از بین آن‌ها (۶۷ درصد) چند شکل بودند (جدول ۱). میانگین چندشکلی به دست آمده با ۱۰ آغازگر ۶۷ درصد بود. میانگین PIC به دست آمده برابر با ۰/۸۰۱ بود. میزان PIC برای ۱۰ نشانگر بررسی شده بین ۰/۷۴ تا ۰/۸۷ متغیر بود. PIC نه تنها با در نظر گرفتن تعداد الل‌های یک مکان ژنی بلکه با در نظر گرفتن فراوانی نسبی این الل‌ها یک برآوردی از قدرت تمیز هر نشانگر را ارائه می‌کند. مقدار PIC به دست آمده بیانگر قدرت تشخیص بالای آغازگرهای استفاده شده می‌باشد ضریب همبستگی کوفتیک^۳ (بین ماتریس تشابه جاکارد و ماتریس کوفتیک) ۰/۷۸ بود. ضریب همبستگی کوفتیک بالای ۰/۹ نشانه کارایی بالای تجزیه خوشه‌ای می‌باشد. و هرچه ضریب همبستگی کمتر از ۰/۸ باشد نشانگر عدم کارایی مطلوب تجزیه خوشه‌ای می‌باشد ولی در مورد نشانگرهای مولکولی ضریب همبستگی کوفتیک ملاک نیست و معمولاً پایین است (۱۵) لذا ضریب همبستگی کوفتیک به دست آمده در این تحقیق قابل قبول می‌باشد. با توجه به دندروگرام حاصل از روش CL یا دورترین همسایه‌ها (شکل ۱) لاین‌های بررسی شده (لاین‌های جهش‌یافته، ارقام تجاری و رقم والدی L17) در ۷ گروه مختلف قرار گرفتند که ضریب تشابه بین آن‌ها از ۰/۱۷ تا ۰/۷۹ متغیر بود. گروه اول شامل ۱۳ فرد بود که لاین‌های جهش‌یافته در کنار رقم مادری (L17) قرار گرفته بودند. گروه دوم شامل ۱۳ لاین جهش یافته بود.

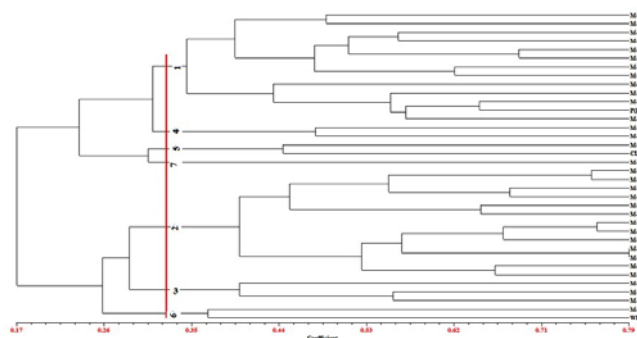
³Cophenetic correlation

¹ Jaccard

² Complete linkage

جدول ۱- درجه چندشکلی و اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده برای لاین‌های بررسی شده

شماره	آغازگر	توالی (۵'-۳')	مجموع قطعات	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
۱	OPA-01	CAGGCCCTTC	۶	۵	۸۳	۰/۷۷
۲	OPA-02	TGCCGAGCTG	۱۱	۷	۶۴	۰/۷۹
۳	OPA-03	AGTCAGCCAC	۱۲	۷	۵۸	۰/۸۰
۴	OPA-04	AATCGGGCTG	۹	۴	۴۴	۰/۷۳
۵	OPA-05	AGGGGTCTTG	۱۱	۸	۷۳	۰/۸۷
۶	OPA-07	GAAACGGGTG	۱۲	۱۰	۸۳	۰/۸۳
۷	OPA-08	GTGACGTAGG	۱۱	۹	۸۲	۰/۸۶
۸	OPA-09	GGGTAACGCC	۱۱	۷	۶۴	۰/۸۰
۹	OPA-10	GTGATCGCAG	۱۰	۶	۶۰	۰/۷۴
۱۰	OPA-11	CAATCGCCGT	۱۱	۷	۶۴	۰/۸۲
			۱۰۴	۷۰	۶۷	۰/۸۰۱

¹ SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

گروه سوم و چهارم هر کدام به ترتیب شامل سه و دو لاین جهش یافته بود. گروه پنجم شامل رقم تجاری کلارک (CL) و لاین جهش یافته شماره ۱۳ (M13) بود. گروه ششم شامل رقم تجاری ویلیامز (WI) و لاین جهش یافته شماره ۱۸ (M18) بود. گروه هفتم فقط شامل لاین جهش یافته شماره ۲۰ (M20) بود. با توجه به ماتریس تشابه جاکارد لاین جهش یافته شماره ۳۲ (M32) با ضریب تشابه $0/643$ مشابه ترین لاین به رقم مادری (L17) بود. لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) که در گروه سوم قرار گرفته است با ضریب تشابه $0/262$ دورترین لاین جهش یافته نسبت به رقم مادری (L17) بود. در بین لاین های بررسی شده لاین های جهش یافته شماره ۵ (M5) و شماره ۶ (M6) با ضریب تشابه $0/794$ و لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) و رقم تجاری کلارک (CL) با ضریب تشابه $0/175$ ، به ترتیب مشابه ترین و دورترین (متفاوت ترین) لاین ها نسبت به هم دیگر بودند. با اینکه لاین های جهش یافته با استفاده صفات مورفولوژیکی قابل شناسایی از لاین مادری و ارقام تجاری هستند ولی در مواردی که تعداد افراد زیاد است و اثرات محیطی وجود دارد، می تواند باعث ایجاد محدودیت هایی شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان روش جایگزین می تواند بر این مشکل فائق آید. القاء جهش با استفاده از اشعه های یونزا با اثرات متقابل اشعه با گیاه شروع می شود. تغییر ژنتیکی با استفاده از اشعه های یونزا بواسطه یونیزاسیون و تحریک مولکول DNA ایجاد می شود. اشعه های یونزا بر روی مواد وراثتی دو اثر دارد: جهش ژنی و شکست کروموزومی. القاء جهش با افزایش تنوع ژنتیکی مرتبط می باشد و در برنامه های اصلاح نباتات به کار می رود. تعداد باندهای تولید شده توسط هر

DNA الگو بعد از جهش، در ارتباط باشد که تعداد مکان‌های اتصال آنزیم Taq پلیمرز را تغییر می‌دهد. ظهور باندهای جدید معمولاً به واسطه تغییرات ساختاری (شکست، جابجایی، حذف و ...) DNA می‌باشد. راینا و همکاران (۱۷) گزارش کردند که چندشکلی نشانگر RAPD در اکوتیپ‌های مختلف مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بادام زمینی ۴۲/۷ درصد می‌باشد که این تنوع به واسطه جهش در DNA هسته‌ای می‌باشد. سوفرامانین و همکاران (۱۸) جهش‌های حذفی و اضافه شده بیشتری را در بلک گرم^۱ در مقایسه با رقم مادری مشاهده کردند که لاین‌های جهش‌یافته با استفاده از اشعه گاما ایجاد شده بودند. نتیجه مشابه نشان داد که جهش یافته‌ها نسبت به والدین باندهای بیشتری را نشان دادند (۱۹). پرتوتابی اشعه گاما منجر به افزایش شکست‌ها در DNA می‌شود. این شکست‌ها می‌تواند با استفاده از تغییرات در الگوهای باندهای RAPD شناسایی شوند (۱۳). مکان-های RAPD تنوع زیادی از الگوی باندهای DNA را نشان دادند به طوری که ۲۷ درصد تغییرات حاصل ناشی از دو آغازگر OPA-07 و OPA-08 بود. وجود چنین تنوعی در بین این لاین‌ها و ارقام تجاری و مادری نشان دهنده پتانسیل بالای اشعه‌های یونزا برای ایجاد تنوع در گیاهانی مانند سویا می‌باشد. همان‌طوری که قبلاً مشخص شده بود این لاین‌ها از نظر تثبیت ازت نسبت به رقم مادری برتری داشته‌اند (۱) و لذا دستیابی به تنوع ژنتیکی و اثبات این تنوع (تنوع بین لاین‌های جهش‌یافته و رقم تجاری) می‌تواند مسیر روشنی را برای بهره‌برداری هرچه بیشتر و کاربردی‌تر این لاین‌ها در پیش روی اصلاح‌گران قرار دهد تا با دیدی بازتر و روشن‌تر به استفاده از این لاین‌ها بپردازند. در این ارتباط محققان مختلفی از این ابزار برای سنجش تنوع القا شده توسط اشعه گاما استفاده کرده‌اند تا بتوانند نحوه تأثیر و میزان تنوع القا شده را با استفاده از گروه بندی افراد و سنجش میزان دوری افراد نسبت به رقم مادری بسنجند و در نهایت از آن‌ها برای اهداف مختلف بهره ببرند (۲۰، ۲۱، ۶ و ۱۲). تنوع الگوی باندهای حاصل از آغازگرهای تصادفی که بین لاین‌های جهش‌یافته و

^۱ Black gram

مادری وجود داشت نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی مشخص آن-هاست. یعنی جهش در نقاط اتصال این آغازگرها تغییراتی ایجاد کرده است که منجر به تفاوت محصولات PCR تولید شده از لاین‌های جهش‌یافته و مادری شده است. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD به خوبی این تنوع و اختلاف را نشان داد و گروه لاین‌های جهش‌یافته را از رقم مادری و ارقام تجاری جدا کرد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ژنتیکی تنوع موجود بین لاین‌های جهش‌یافته، تجاری و رقم مادری را آشکار ساخت. این تحقیق نشان داد که نشانگرهای مولکولی مانند RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش‌یافته مناسب می‌باشد زیرا تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نشانگر RAPD باعث تفکیک گروه-های زیادی شد. نشانگر RAPD با اندازه حدود ۳ کیلو باز منحصراً در رقم مادری مشاهده شد که قابل تبدیل به نشانگر SCAR است. با توجه به تنوعی که این لاین‌ها از لحاظ نشانگر ژنتیکی بررسی شده نشان دادند پیشنهاداتی را می‌توان به این شرح ارائه داد. شناسایی لاین‌های جهش یافته‌ای که فاصله ژنتیکی زیادی با رقم مادری داشته باشند می‌تواند منجر به شناسایی لاین-های جهش‌یافته با ژن‌های مطلوبی شود که این لاین‌ها سازگاری بهتری را نسبت به رقم والدی و ارقام تجاری در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی از خود نشان دهند. همچنین با توجه به اینکه قبلاً مشخص شده بود که این لاین‌ها دارای صفات مطلوب و برتری از جمله تثبیت بیولوژیک نیتروژن بالاتر نسبت به والد خود می‌باشند (۱) می‌توان باندهای اختصاصی مرتبط با این صفت را در جهش‌یافته‌های با خصوصیات گره‌زایی و تثبیت ازت بالا مشخص نمود. مقدار PIC محاسبه شده نشان‌دهنده قدرت تمیز بالای آغازگرهای استفاده شده می‌باشد. لاین‌های جهش‌یافته حاضر می‌توانند در شرایط مزرعه‌ای برای مقاومت به انواع بیماری‌ها و پاتوژن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرند و لاین‌های مقاوم انتخاب شوند. با ایجاد لاین‌های مقاوم به پاتوژن‌ها و بیماری‌ها سموم کمتری مصرف می‌شود و در نهایت آسیب جدی به اکوسیستم کشاورزی وارد نمی‌شود.

منابع

۱. یرولی بیرانوند ن، عباسعلیان ح، موسوی شلمانی م ا و صیادی ر (۱۳۸۵) ارزیابی تثبیت بیولوژیک نیتروژن برخی موتانت‌های گیاه سویا حاصل از پرتو دهی با اشعه گاما. نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران- دانشگاه تهران- پردیس ابوریحان.
2. Keim P , Schupp J M, Travis S E, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, and Webb D M (1997) A high density soybean genetic map based on AFLP markers Crop Science 37: 537-543
3. Skorupska H T , Shoemaker R C, Warner A, Shipe E R and Bridges W C (1993) Restriction fragment length polymorphism in soybean germplasm of the southern USA Crop Sci 33:1169-1176
4. Rahman S M , Takagi V, Kubota K, Miyamoto K and Kawakita V (1995) High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation Biosci Biotech Biochem 59: 922-933
5. Villavicencio A L C H , Araujo M M, Baldasso J G, Aquino S, Konietzny U and Greiner R (2004) Irradiation influence on the detection of genetic-modified Soybeans Radiation Physics and Chemistry 71 (2004) 489-492
6. Atak Ç, Alikemanoglu S, Acik L, and Canbolat Y (2004) Induced of plastid mutations in soybean plant (glycine max L Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD Mutation research 556:35-44
7. Jain S M (2005) Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA Plant Cell Tiss Org Cult 82:113-123
8. Khan M H , and Tyagi S D (2009) Studies on induction of chlorophyll mutations in soybean, Glycine max (L) Merrill Front Agric China 2009, 3(3): 253-258
9. Manjaya J G , Suseelan K N, Gopalakrishna T, Pawar S E and Bapat V A (2007) Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [Glycine max (L) Merrill] Food Chemistry 100, 1324-1327
10. Kumar S, Prasad K V and Choudhary M L (2006) Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers Current Sci 90:1103-1118
11. Caetano-Anolles G, Bassam B J and Gresshoff P M (1991) DNA amplification fingerprinting using very as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietals identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species Genome 44: 763-772
- short arbitrary oligonucleotide primers Biotechnol 9: 553-5
12. Raisheed M S , Asad S, Iqbal M J, Mukhter Z, Zaffar Y and Malik K A (2001) Polymorphic studies employing RAPD analysis in stress-induced variants of sugarcane developed through in-vitro techniques Pak Sugar J 16(6): 15-26
13. Senthamizh S B , Ponnuswami V and Kavitha P S (2008) Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in caonla (Emblia officinalis Gaertn) Adv Nat Appl Sci 2(3): 129-134
14. Sharma R , Mahila H R, Mohapatra T, Bhargava S C and Sharma M M (2003) Isolating Plant Genomic DNA Without Liquid Nitrogen Plant Molecular Biology Reporter 21: 43-50
15. Rohlf F J (1987) NTSYS-pc: Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. Amer. Statistician, 41:330.
16. Waugh R and Powell W (1992) Using RAPD Markers for Crop Improvement Trends Biotech, 10: 186-190
17. Raina S N , Rani V, Kojima T, Ogihara Y, Singh K P and Devarumath R M (2001) RAPD and ISSR fingerprints 18. Souframanien J, Pawar S E and Rucha A G (2002) Genetic variation in gamma ray induced mutants in black gram as revealed by RAPD and ISSR markers Indian J Genet 4: 291-295
19. Banerjee H , Pai R A, and Sharma R P (1999) Restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of chickpea accessions Biol Plant 42: 197-208.
20. Ganapathi T R , Sidha M, Suprasanna P , Ujjappa K M, Bapat V A and D'Souza S F (2008) Field performance and RAPD analysis of gamma-irradiated variants of banana cultivar 'Giant Cavendish' (AAA) Int J Fruit Sci 8(3): 147-159
21. Wendt S N , Peters J A, Oliveira A C, Bobrowski V L, Cosa E L C , Madrugá C S and Vighi I L (2001) Plant regeneration and molecular characterization of potato cultivar Macaca, obtained from gamma irradiation explants J New Seeds, 3(2): 17-37