ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۲۴۰- ۲۳۳

شناسایی ژن کنترل کننده زودرسی با استفاده از نشانگر RAPD در توتون (*Nicotiana tabacum* L.)

Detection of precocity gene using RAPD marker in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

زین العابدین شهادتی مقدم*[۱]، نجلا عطار[۲]، محمد رضا صلواتی میبدی[۳]، نادعلی باقری[۴]

۱و۳- دانشجوی دکتری و مربی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، بهشهر
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد کرج
۴- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی ساری

Shahadati Moghaddam Z*[1], Attar N[2], Salavati Maybodi MR[3], Bagheri N[4]

1,3. PhD Student and Instructor, Tirtash Research and Education Center, Behshahr
2. MSc Student, Islamic Azad University of Karaj
4. Assistant Professor, Agriculture University of Sari

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shahadati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۲- تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

این طرح با هدف تعیین نشانگرهای مولکولی مناسب جهت ردیابی ژن زودرسی بر اساس تجزیه تفرق تـوده ای اجرا شد. برای رسیدن به این هدف، رقم زودرس (Urumieh2) و رقـم دیـررس (Burley Ree 103) از تیـپ بارلی تلاقی داده شد و نسل F_2 در مزرعه کشت شد. براساس رسـیدگی بوتـه هـا در مزرعـه، ۱۰۰ بوتـه اعـم از زودرس و دیررس انتخاب شد. پس از نمونه گیری از این بوته ها، استخراج DNA صورت گرفـت. در بررسـی ۶۰ آغازگر RAPD در والدین و بالکهای زودرس و دیررس دو آغازگر OPB08 و OPC09 چند شـکلی نشـان دادند که در مرحله بعد پـس از بررسـی در ۹۶ نمونـه از نسـل F_2 دو مـارکر OPB08-1050 و OPC09-1900 انتخاب شد که به ترتیب فواصل ۱۹/۷ سانتی مورگان و ۱۵ سانتی مورگان را از مکان ژنی زود رسی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

آزمایش مزرعه‌ای،
تفرق،
توتون،
زود رسی،
RAPD

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

مقدمه

گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) امروزه یکی از گیاهان صنعتی مهم در جهان محسوب می شود که سهم عمده ای در تجارت بین الملل دارد. در کشور ما نیز به رغم توصیه‌های بهداشتی به علت مصرف نسبتاً بالای سیگار، میزان نیاز به توتون بالاست و بیشتر این محصول از خارج وارد شده و موجب خروج ارز می‌شود. لذا می‌توان با کشت این محصول در مناطقی که قابلیت تولید دارند موجب تحول اقتصادی در این مناطق شد. توتون‌های تیپ غربی در مناطقی که فصل رشد مناسب آنها بین ۱۲۰ تا ۱۴۰ روز می‌باشد به راحتی تولید می‌شوند (Davis and Nielsen 1999) اما کشت آنها در مناطقی که فصل رشد کوتاهتری دارند نیز با استفاده از ارقام زودرس می‌تواند مد نظر باشد. از مزیت‌های مهم توتون‌های زودرس می‌توان به صرفه جویی در هزینهٔ کارگری، صرفه جویی در مصرف آب، افزایش کیفیت توتون و استفاده از مزرعه برای کشت دوم اشاره کرد. از آنجا که برای تشخیص زودرسی نیاز است تا آخر فصل صبر شود و نیز امکان دارد که این زودرسی به علت شرایط محیطی ایجاد شده باشد و در نسل بعد حاصل نشود، لذا استفاده از نشانگر مولکولی برای ردیابی ژن‌های دست‌اندرکار در زودرسی امر مهمی به نظر می‌رسد. این امر به اصلاح‌گر کمک می‌کند تا بوته‌های حامل ژن زودرسی را با اطمینان انتخاب و در روش‌هایی مثل بک‌کراس استفاده کند. Paunescu and Paunescu (1996) با استفاده از روش موتاسیون به بوته‌های زودرس توتون دست یافتند و از این بوته‌ها در اصلاح ارقام زودرس استفاده کردند. Salaji (1996) در مقایسه بین چند واریته توتون تیپ شرقی، واریته موتانت ۲ را زودرس‌ترین و موتانت ۴ را پرمحصول‌ترین موتانت معرفی نمود و از این موتانت در پروژه اصلاحی ارقام زودرس استفاده کرد. Rostami (1998) با تلاقی دو رقم Sumsun958 و CH.T.269-12 به یک رقم نیمه‌شرقی توتون زودرس به نام TS8 دست یافت که عملکرد و کیفیت قابل قبولی داشت. Noguchi et al. (1996) با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD توانستند بین ارقام مقاوم و حساس به ویروس PVY در توتون چند شکلی‌هایی مشاهده کنند و لینکاژ تعدادی از توالی‌ها را با ژن مقاومت اثبات کنند. Yi et al. (1998) جهت نقشه‌یابی ژن مقاومت به نماتد ریشه در توتون (RK) از نشانگر RAPD استفاده نمودند. آنها با استفاده از رقم حساس KY14 و نسل‌های F_1 تا F_3 توانسته‌اند ۱۶ نشانگر RAPD را در ۶ مکان ژنی روی نقشه‌ای به طول ۲۴/۱ سانتی‌مورگان شناسایی کنند که ۶ نشانگر در مکان ژنی مقاومت قرار داشتند. He et al. (2002) ارقام مقاوم و حساس به ساق‌سیاه توتون را با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. آنها ابتدا ۶ آغازگر را به عنوان نشانگرهای اختصاصی شناسایی نمودند و در بررسی‌های بعدی آغازگر S95760 را با محصول باندی به طول ۷۶۰ جفت‌باز نزدیکترین نشانگر به ژن مقاومت تشخیص دادند. Johnson et al. (2002) از روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA) و نشانگر RAPD برای تشخیص توالی‌های متصل به ژن مقاومت ساق‌سیاه (*ph*) در رقم Coker371 و K326 توتون استفاده نمودند. آنها مارکر OPZ5-770 را برای غربال ژن مقاومت پیشنهاد نموده و تاثیر آن را با روش MAS اثبات کردند. Feghhi et al. (2009) در بررسی بیماری ریزومانیا در چقندرقند با استفاده از روش تجزیه تفرق توده‌ای و نشانگر RAPD توانستند ۳ مارکر پیوسته به ژن مقاومت شناسایی کنند که نشانگر R2 را به فاصله ۸/۳ سانتی‌مرگان در حالت ناجفت و نشانگرهای C2 و C5 را به فواصل ۳۲/۸۷ و ۴۳/۷ سانتی‌مرگان از ژن مقاومت گزارش کردند. Javidfar et al. (2006) به منظور شناسایی نشانگر مولکولی مرتبط با مقدار اسیداولئیک در کلزا از جمعیت دابل‌هاپلوئید حاصل از تلاقی دو لاین کلزا و روش تجزیه تفرق توده‌ای استفاده کردند که پس از معرفی دو نشانگر RAPD، آنها را تبدیل به نشانگر SCAR نمودند.

این طرح با هدف تعیین نشانگر مناسب برای ژن زودرسی در توتون با استفاده از آغازگرهای RAPD به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ابتدا دو رقم Urumieh2 (زودرس) و Burley Ree103 (دیررس) در مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش (بهشهر) با هم تلاقی داده شد. تعداد ۵۰۰ بوته از نسل F_2 آن در مزرعه کشت شد. تفرق

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

صفت زودرسی در نسل F_2 مشاهده شد. آزمون X^2 تصحیح شده یتز (۲۴ و ۱۹) برای نسبت بوته‌های زودرس و دیررس بین ۲۰۰ بوته تصادفی از نسل F_2 انجام شد.

استخراج DNA

پس از انتخاب ۱۰۰ بوته از نسل F_2 از این بوته‌ها نمونه برگی تهیه شد. این نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع خرد شده و به روش Dellaporta et al. (1983) استخراج DNA شدند. بدین شرح که ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر بافراستخراج (EDTA 50 mM, Tris 100 mM, NaCl 500 mM, SDS 1.25%, pH 8) و ۱۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول به تیوب حاوی برگ خرد شده اضافه و مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار اضافه (Murray and Thompson 1980) و بعد از ۱۵ دقیقه نیز مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم–ایزوآمیل الکل (۲۴–۱) اضافه شده و مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ *g* سانتریفیوژ شد. فاز بالایی به تیوب جدید منتقل و مرحله کلروفرم–ایزوآمیل الکل تکرار شد. فاز بالایی به تیوب جدید منتقل و برای رسوب DNA از ایزوپروپانول خنک استفاده شد. تیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ *g* سانتریفیوژ و DNA ته نشین شده با الکل اتانول ۷۰ درصد دو بار شستشو داده شد. سپس DNA در ۱۰۰–۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. در نهایت از ۹۶ نمونه، DNA مناسب استحصال شد. برای تست کیفیت DNA حاصل، این نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ برابر رقیق شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری (OD) در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس برای تعیین کیفیت از فرمول $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ استفاده شد. این عدد برای کیفیت خوب DNA باید در حدود ۱/۸ باشد (Chawla 2003). همچنین این نمونه‌ها روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نیز امتحان شد (Shahadati 2008).

آغازگرهای RAPD

تعداد ۶۰ آغازگر RAPD (۱۰ bp) از کیت اپرون (Operon) تهیه شد (جدول ۱) و پس از آماده‌سازی برای PCR دمای آنلینگ آنها با چند نوبت PCR گرادیان حرارتی تعیین شد.

محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به مقدار ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش حاوی ۱۰۰–۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۲ میلی‌مولار هر یک از نوکلئوتیدها (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x واکنش، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز تهیه شد. عمل PCR در دستگاه ترموسایکلر بایورد (BioRad-MjMini) با چرخه دمایی شامل یک دور، ۴ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ دور، یک دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه ۴۰–۳۳ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک دور، ۸ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (Shahadati 2008). محصول PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد، الکتروفورز و تفکیک شده و با اتیدیوم بروماید به غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر رنگ آمیزی شدند (Chawla 2003).

تجزیه تفرق توده‌ای (BSA)

برای شناسایی ژن مرتبط با زودرسی از آزمون تجزیه تفرق توده-ای که توسط Michelmore et al. (1991) ارائه شده استفاده شد. از این روش در موارد زیادی استفاده شده به طور مثال جهت شناسایی نشانگر مولکولی مرتبط با مقدار اسیداولئیک در کلزا (Javidfar et al. 2006). نمونه DNA رقیق شده هشت عدد از بوته‌های زودرس و هشت عدد از بوته‌های دیررس از نسل F_2 به طور جداگانه با یکدیگر مخلوط شد. این نمونه‌ها به همراه DNA والدین توسط ۶۰ آغازگر RAPD مورد آزمون قرار گرفتند. میانگین طول دوره رشد برای بوته‌های زودرس حدود ۹۰ روز و برای بوته‌های دیررس حدود ۱۳۰ روز بود. آغازگرهایی که بین والدین و توده‌های دیررس و زودرس چند شکلی نشان دادند انتخاب شده و روی افراد تشکیل دهنده توده‌ها آزمون شدند (Ohmori et al. 1996). در نهایت آغازگرهای گزینش شده برای تعیین فاصله نشانگر برروی جمعیت ۹۶ بوته امتحان شدند (Poulsen et al. 1995).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

جدول ۱- لیست و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی(′3 -′5)	نام آغازگر	توالی(′3 -′5)	نام آغازگر	توالی(′3 -′5)
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPI-04	CCGCCTAGTC	OPQ-01	GGGACGATGG
OPA-09	GGGTAACGCC	OPI-07	CAGCGACAAG	OPQ-05	CCGCGTCTTG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPJ-04	CCGAACACGG	OPQ-06	GAGCGCCTTG
OPB-07	GGTGACGCAG	OPJ-05	CTCCATGGGG	OPR-02	CACAGCTGCC
OPB-08	GTCCACACGG	OPJ-14	CACCCGGATG	OPR-04	CCCGTAGCAC
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPK-04	CCGCCCAAAC	OPR-06	GTCTACGGCA
OPC-02	GTGAGGCGTC	OPK-08	GAACACTGGG	OPS-03	CAGAGGTCCC
OPC-05	GATGACCGCC	OPK-09	CCCTACCGAC	OPT-09	CACCCCTGAG
OPC-09	CTCACCGTCC	OPK-17	CCCAGCTGTG	OPU-13	GGCTGGTTCC
OPC-19	GTTGCCAGCC	OPK-20	GTGTCGCGAG	OPU-19	GTCAGTGCGG
OPD-02	GGACCCAACC	OPL-04	GACTGCACAC	OPV-07	GAAGCCAGCC
OPE-01	CCCAAGGTCC	OPM-03	GGGGGATGAG	OPV-08	GGACGGCGTT
OPE-13	CCCGATTCGG	OPM-12	GGGACGTTGG	OPV-10	GGACCTGCTG
OPE-17	CTACTGCCGT	OPM-16	GTAACCAGCC	OPW-03	GTCCGGAGTG
OPG-02	GGCACTGAGG	OPN-03	GGTACTCCCC	OPX-11	GGAGCCTCAG
OPG-07	GAACCTGCGG	OPN-14	TCGTGCGGGT	OPX-17	GACACGGACC
OPH-04	GGAAGTCGCC	OPO-06	CCACGGGAAG	OPZ-07	CCAGGAGGAC
OPH-13	GACGCCACAC	OPP-13	GGAGTGCCTC	OPZ-09	CACCCCAGTC
OPH-19	CTGACCAGCC	OPP-14	CCAGCCGAAC	OPAE-02	TCGTTCACCC
OPI-01	ACCTGGACAC	OPP-16	CCAAGCTGCC	OPAE-07	GTGTCAGTGG

تجزیه و تحلیل آماری

به جهت انتخاب غیر تصادفی ۹۶ بوته نهایی برای صفت زودرسی آزمون کای اسکور برای مارکرهای انتخاب شده صورت نگرفت. برای تعیین فاصله مارکر از مکان ژنی مورد نظر از دو روش درصد بوته‌های نو ترکیب بر اساس تابع کوزامبی (فرمول۲) (Kosambi 1944) و نرم افزار MAPMAKAR 3.0 استفاده شد (Lander et al. 1987).

$$m = 0.25Ln(\frac{1+2c}{1-2c}) \quad (۲)$$

(در این فرمول c فراوانی نوترکیبی و m فاصله براساس سانتی مورگان می‌باشد)

نتایج و بحث

از ۲۰۰ بوته تصادفی بررسی شده در نسل F_2، ۴۲ بوته زودرس و ۱۵۸ بوته دیررس بودند. آزمون $\chi2$ یتز (Yi et al. 1998; Nouhi et al. 2008) برای احتمال ۱:۳ با یک درجه آزادی نشان داد که $\chi2$ حاصل (۱/۸۲) از χ^2 جدول در سطح احتمال ۵ درصد (۳/۸۴) کوچکتر است و لذا با تایید نسبت ۱:۳ می‌توان گفت که این صفت با یک ژن مغلوب بزرگ اثر کنترل می‌شود.

جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر برای DNAهای مختلف از ۰/۴۰۶ تا ۰/۴۲۸ متغیر بود. این عدد برای ۲۸۰ نانومتر نیز از ۰/۲۰۸ تا ۰/۲۳۳ بود. غلظت DNA ها بر اساس جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر از ۲۰۳۰ تا ۲۱۴۰ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد

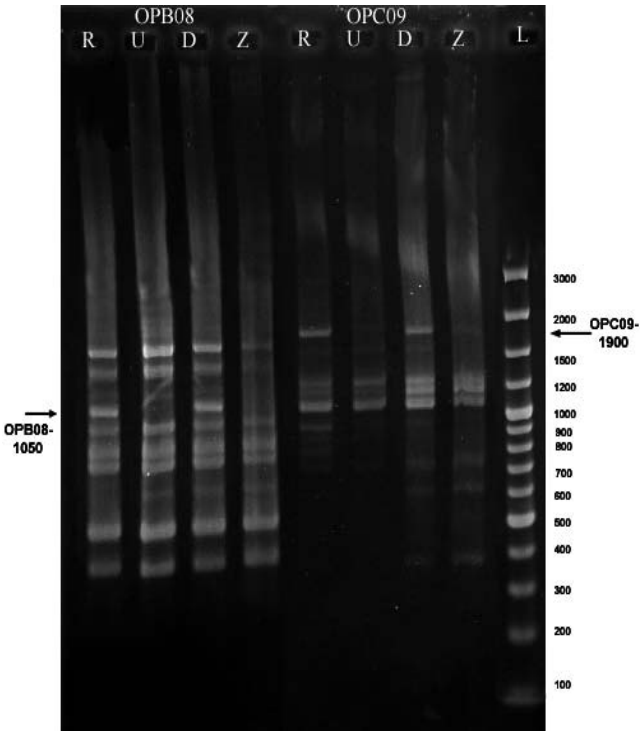
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

(Shahadati 2008). نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نیز از ۱/۷۶ تا ۱/۹۷ متغیر بود که نشان دهنده کیفیت مناسب DNAها می‌باشد (Chawla 2003). مشاهده برروی ژل ۰/۸ درصد نیز این کیفیت را تایید نمود.

در بررسی دمای اتصال آغازگرها، این دما برای آغازگرهای مختلف بین ۳۳ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. تعداد باندها برای هر آغازگر از ۱ تا ۱۳ متغیر بود. تعداد کل باندهای حاصل از ۶۰ آغازگر به کار رفته در بررسی نیز ۵۸۳ باند بود.

برای تهیه توده‌های زودرس و دیررس، از DNA ۸ بوته برای هر توده استفاده شد. تعداد زیاد افراد در هر توده دقت کار را افزایش ولی احتمال بروز چندشکلی را به شدت کاهش می‌دهد و تعداد کم افراد در توده احتمال چند شکلی غیر مرتبط با صفت را افزایش می‌دهد (Giovannoni et al. 1991; Michelmore et al. 1991; Chague et al. 1996) با آزمایش آغازگرها در والدین و بالکهای زودرس و دیررس ۴ آغازگر (OPE17, OPC09, OPB08 و OPV08) چند شکلی نشان دادند. سپس این آغازگرها روی تک تک افراد توده آزمون شدند، آغازگرهای OPE17 و OPV08 به علت عدم تکرارپذیری حذف شدند. در نهایت دو آغازگر OPB08 و OPC09 انتخاب شدند. آغازگر OPB08 باندی به اندازه ۱۰۵۰ جفت باز و آغازگر OPC09 باندی به اندازه ۱۹۰۰ جفت باز همبسته با مکان ژنی زودرسی نشان داد (شکل۱) که به ترتیب OPB08-1050 و OPC09-1900 نامیده شد. این باندها نسبت به زودرسی در حالت ناجفت[1] قرار داشتند. بدین معنی که در افراد دیررس دیده می شدند. از آنجا که هم صفت دیررسی و هم مارکر RAPD غالب هستند. لذا حالت ناجفت برای صفت زودرسی می‌تواند مفید باشد. زیرا که در صورت نبود باند با اطمینان می‌شود گفت که زودرسی وجود دارد (الل غالب موجود نیست).

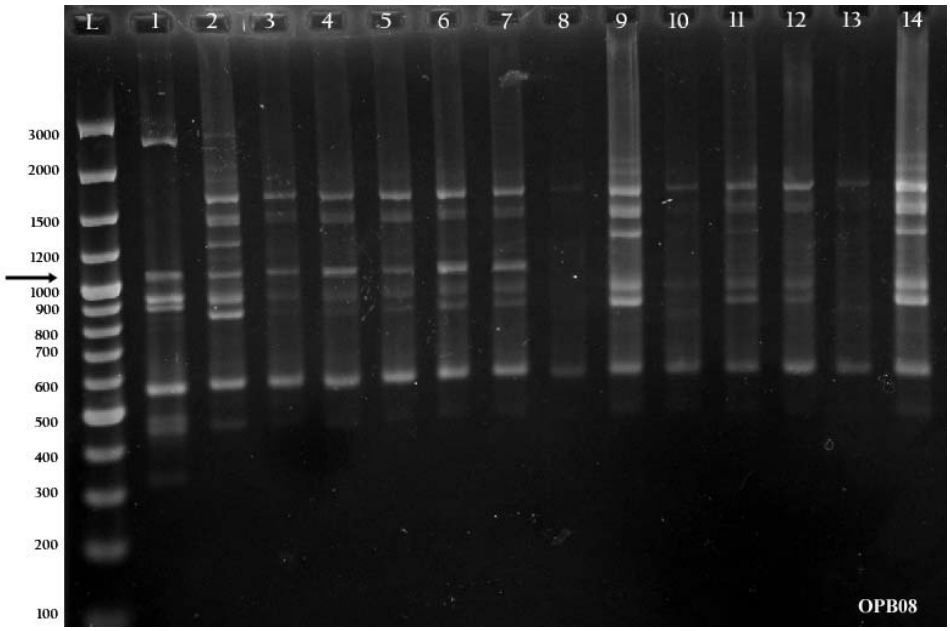


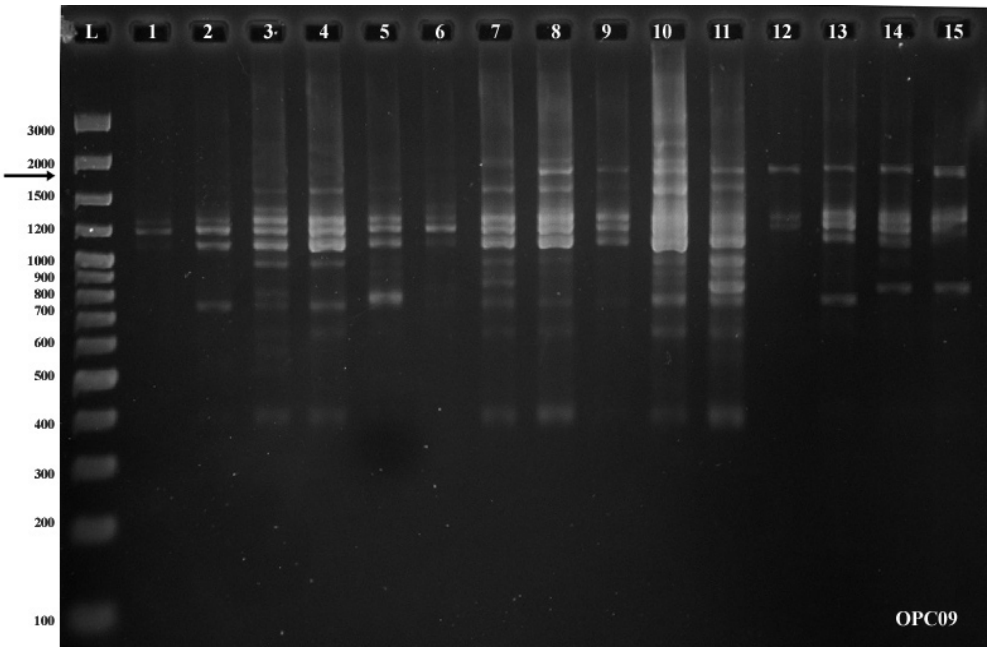
شکل۱- تولید باندهای وابسته به زودرسی در آغازگرهای OPB08 و OPC09. R) والد دیررس؛ U) والد زودرس؛ D) بالک دیررس؛ Z) بالک زودرس.

پس از اینکه آغازگرهای انتخاب شده روی DNA ۹۶ بوته از نسل F_2 چک شد (شکل۲). بررسی فاصله مارکرها از ژن زودرسی براساس تابع کوزامبی (Kosambi 1944) نشان داد که مارکر OPB08-1050 به فاصله ۱۹/۷ سانتی مورگان و مارکر OPC09-1900 به فاصله ۱۵ سانتی‌مورگان از مکان ژنی زودرسی قرار دارند (شکل۳). این در حالیست که نتایج حاصل از نرم افزار MAPMAKAR 3.0 با LOD Score برابر ۳ و حداکثر فاصله ۴۰ سانتی مورگان نشان داد که مارکر OPB08-1050 در فاصله ۱۵/۹ سانتی مورگان و مارکر OPC09-1900 در فاصله ۱۱/۸ سانتی مورگان از مکان ژنی زودرسی قرار گرفته است (جدول ۲). از آنجا که بر اساس گزارشات Amiri et al. (2009) و Barzen et al. (1992) نرم افزار MAPMAKAR فاصله‌ها را در حالت ناجفت با اریب برآورد می کند. لذا اطمینان تابع کوزامبی در این حالت بیشتر است.

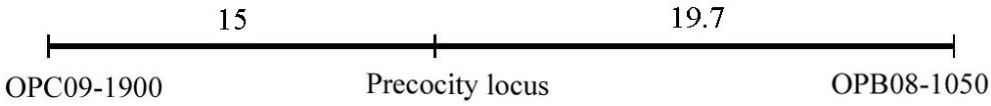
[1] Repulsion

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]





شکل۲- ظهور باندهای مارکر در تعدادی از افراد نسل F_2 برای مارکر OPB08-1050 و OPC09-1900 (شماره ۷-۱ زودرس و ۱۵-۸ دیررس هستند).



شکل ۳- نقشه ژنی بین مارکرها و مکان ژنی زودرسی بر اساس تابع کوزامبی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

جدول ۲- فاصله مکان ژنی زودرسی و مارکرها براساس نرم افزار Mapmaker

Markers	Distance	
OPB08-1050	15.9 cM	
Precocity locus	11.8 cM	
OPC09-1900		
	27.8 cM	log-likelihood= -77.38

نتیجه‌گیری

نتایج تابع کوزامبی در این حالت ارجحیت دارد. پیشنهاد می‌شود از دو نشانگر فوق به صورت ترکیبی برای شناسایی ژن زودرسی استفاده شود تا کارایی بالاتری داشته باشند.

سپاسگزاری

در انتها از تمام همکارانی که اینجانب را در اجرای موفق این طرح یاری نمودند و از مدیریت و معاونت مرکز تحقیقات تیرتاش کمال تشکر را دارم.

منابع

Amiri R, Mesbah M, Moghaddan M, Bihamta MR, Mohammadi SA, Norouzi P (2009) A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. Biologia Plantarum 53: 112-119.

Barzen E, Mechelke W, Ritter E, Seitzer JF, Salamini F (1992) RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermy and hypocotyl colour. Plant Journal 2: 601-611.

Chague V, Mercier JC, Guenard M, Decourcel A, Vedel F (1996) Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-5 in tomato by bulked segregant analysis. Theoretical Applied Genetics 92: 1045-1051.

Chawla HS (2003) Plant biotechnology a practical approach, Science publishers, Inc. 302p.

Davis DL, Nielsen MT (1999) Tobacco Production, chemistry and technology. Blackwell Science.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Feghhi SMA, Norouzi P, Saidi A, Zargari K (2009) Identification of molecular markers linked to sugar beet Rhizomania gene resistance using bulk segregation analysis. Biological Sciences 4: 1-7.

Giovannoni JJ, Wing RA, Ganal MW, Tanksley SD (1991) Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. Nucleic Acids Research 19: 6553-6558.

He C, Zhang H, Li J (2002) Study of the RAPD marker linked to the tobacco black shank resistant gene. Tobacco Science Research Conference 56:18.

Javidfar F, Zeinali H, Abdmishani C, Shahnejat Bushehri A, Tavakol Afshari R (2006) Identification of Molecular Markers Associated with Oleic Acid Level in Spring Oilseed rape (Brassica napus L.). Seed and Plant Journal, 21: 515-529

Johnson ES, Wolf ME, Wersman EA (2002) Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. Plant Disease 86:1303-1309.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Annals of Eugenics 12:172-175.

Lander ES, Green P, Abrahamson I, Barlow A, Daley MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 9828- 9832

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-5.

Noguchi S, Tajima T, Yamamoto Y, Kubo T (1996) Identification of RAPD markers linked to potato virus Y resistance gene in tobacco. Bull. Spec. CORESTA, Congres Yokohama p.160.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]

Nouhi A, Amiri R, Haghnazari A, Saba J, Mesbah M (2008) Tagging of resistance gene(s) to rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). African Journal of Biotechnology 7: 430-433.

Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F (1996) Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. Theoretical and Applied Genetics 92: 151-156.

Paunescu M, Paunescu AD (1996) the genetic mutations in Roumanian oriental tobacco. Bulletin Special CORESTA Congres, Yokohama. p184.

Poulsen DME, Henry RJ, Johnston RP, Irwin JAG, Rees RG (1995) The use of bulked segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barely. Theoretical and Applied Genetics 91: 270- 273.

Rostami HA (1998) Breeding of a new precocious variety of semi-oriental (TS8). Bull. Spec. CORESTA. Congres Brighton. P 147.

Salaji MH (1996) Characterization of mutant varieties 2, 3 and 4. Anuual Report of Urumieh Research Center 22-23.

Seefelder S, Ehrmaier H, Schweizer G, Seigner E (2000) Male and female genetic linkage map of hops, Humulus lupulus. Plant Breeding 119: 249-255.

Shahadati Moghadam Z (2008) Detection methods of genetically modified. Sepehr Pub 131p.

Yi YH, Rufty RC, Wernsman EA (1998) Mapping the root-knot nematode resistance gene (RK) in tobacco with RAPD markers. Plant Disease 82:1319-1322.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.2.8]