نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۸، شماره ۶ ، بهمن - اسفند ۱۳۸۹، ص ۱۰۲۱-۱۰۱۲

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 8, No. 6, Jan. – Feb. 2011, p. 1012-1021

روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و صفات زراعی

آنیتا نماینده[۱]- محمد مجتبی کامل منش [۲*]- ساسان قاسمی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۷

چکیده

در این تحقیق روابط ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ لوبیا با استفاده از نشانگرهای مولکولی رپید وبرخی صفات زراعی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این مطالعه آزمایشی درقالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار و ۲۵ تیمار (ژنوتیپ های لوبیا) در شرایط مزرعه انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تنوع زیادی بین ژنوتیپ های لوبیا از نظر عملکرد و سایر صفات زراعی وجود دارد. در حالی که دندروگرام مربوطه تهیه شده با روش UPGMA و براساس فاصله های اقلیدسی، به هیچ وجه حاکی از تفکیک ژنوتیپ ها به سه گروه متمایز چیتی، قرمز و سفید نبود. در تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ ها با استفاده از نشانگر های مولکولی رپید ۲۶ آغاز گر تصادفی مورد استفاده قرار گرفت که ۱۴۴ نوار چندشکل با میانگین ۵/۵۴ نوار برای هر آغازگر ایجاد شد. متوسط میزان اطلاعات چند شکلی ۰/۲۷۳ و دامنه آن بین ۰/۰۷۷ (آغازگر P17) تا ۰/۴۵۸ (آغازگر P9) متغیر بود. بالاترین و پائین ترین مقدار شاخص نشانگربه ترتیب به آغازگرهای P1 (۳/۵۵) و P17 (۰/۱۵۴) مربوط بوده که متوسط این شاخص ۱/۵۹ محاسبه گردید. تجزیه خوشه ای براساس داده های حاصل از نشانگرهای مولکولی رپید وروش UPGMA وبا استفاده ازضرایب جاکارد ژنوتیپ ها را به سه گروه تقسیم نمود. در این تجزیه انواع لوبیا چیتی، قرمز و سفید کاملاً از یکدیگر مجزا شده و تنها چهار ژنوتیپ درگروه مربوط به خود قرار نگرفتند لذا کارایی این گروه بندی ۸۴٪=۲۱/۲۵ تعیین شد. تفکیک ژنوتیپ ها با استفاده از این دو روش کاملاً متفاوت بود و آزمون مانتل نیز هیچگونه همبستگی معنی داری (۰/۰۶۲-=r) بین دو دندروگرام نشان نداد. نتیجه نهایی اینکه در این تحقیق نشانگر مولکولی رپید ابزار بهتری در تفکیک انواع لوبیا نسبت به صفات زراعی تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: لوبیا، نشانگر مولکولی رپید، صفات زراعی و تجزیه خوشه ای

مقدمه

بررسی تنوع ژنتیکی درگیاهان، ازطریق صفات مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی همواره متداول بوده است (۷). بهره برداری آگاهانه از ذخایر ژنتیکی جهت استفاده در مطالعات مختلف از جمله تجزیه های ژنتیکی به یک دانش تفصیلی از روابط ژنتیکی مواد گیاهی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی موجود نیاز دارد (۱۵). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ ها برای محافظت و استفاده از منابع ژرم پلاسم دارای اهمیت زیادی است (۱۸). این اطلاعات می تواند محققان را در انتخاب ترکیبات والدینی مناسب برای بهره برداری حداکثر از مواد ژنتیکی موجود جهت تولید هیبرید های پر محصول و جمعیت های در حال تفکیک یاری دهد (۲۵).

مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که تفاوت یا شباهت گونه ها، جمعیت ها و یا افراد را با استفاده از روش ها و مدل های آماری خاص بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می کند (۲۰). تنوع ژنتیکی گونه های زراعی ووحشی لوبیا بوسیله انواع مختلف نشانگرها موردارزیابی قرارگرفته است، نشانگرهای زراعی ومورفولوژیکی، پروتئین دانه و فازئولین، آیزوانزایم ها، آر.اف.ال.پی، رپید، مینی ساتلایت‌ها و ماکروساتلایتها از آن جمله هستند (۱۶). دراین بین از نشانگر مولکولی رپید بطورگسترده درتهیه نقشه های ژنتیکی، مطالعات تاکسونومی و فیلوژنیکی و همچنین روابط ژنتیکی استفاده شده است (۸). بالکایا و ارگون (۵) با ارزیابی صفات مورفولوژیکی ۴۴ جمعیت از لوبیاهای ترکیه را به وسیله تجزیه خوشه ای به شش گروه تقسیم کردند. این

۱- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
(*- نویسنده مسئول :Email: kamelmanesh@iaushiraz.ac.ir)
۲ و۳- استادیاران گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

موضوع نشان داد که تنوع زیادی از نظر صفات مورفولوژیک بین جمعیت های لوبیا وجود دارد. مویب و همکاران (۲۱) با استفاده از نشانگر مولکولی رپید تنوع ژنتیکی را در بین لوبیا های آفریقایی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۲۴ جمعیت لوبیا وجود داشت که نسبت به ۹ آغازگر از مجموع ۱۱ آغازگر چند شکلی نشان دادند و ۵۳ نوارتولید شد. نتایج این تحقیق مشخص کرد که تنوع ژنتیکی خوبی در بین این نمونه ها وجود دارد که می توان از آن در برنامه های اصلاحی سود جست. ردی و همکاران (۲۴) به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی۳۰ ژنوتیپ لوبیا به ترتیب از ۱۹ و ۳۵ نشانگر اس.اس.آر و آی.اس.اس.آر استفاده نمودند. نتایج نشان داد که نشانگرهایی که اساس توالی های موتیف آنها AC است چند شکلی بیشتری نسبت به آنهایی که توالی های موتیف آنها AG هست نشان می دهند. آن ها همچنین بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق نشانگر های اس.اس.آر و آی.اس.اس.آر را ابزارهای مفیدی برای گروه بندی معرفی نمودند؛ زیرا آنها به خوبی ژنوتیپ هایی که از لحاظ جغرافیایی اختلاف داشتند را تفکیک کرده بودند.

رنگ بذر یکی از خصوصیاتی است که در طبقه بندی انواع لوبیا مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر این رنگ بذر شاخص مهمی برای بازارپسندی و تولید زراعی است. همچنین در طبقه بندی های تجاری لوبیا و برنامه های تحقیقاتی سیات[1] خصوصیت رنگ بذر از اهمیت بالایی برخوردار است. در ایران سه تیپ رنگی لوبیا رایج است: سفید، مهمترین کلاس با اندازه متوسط و تیپ Great.Northern که به آن لوبیا سفید گفته می شود. در مرتبه دوم اهمیت لوبیا چیتی با اندازه متوسط قرار دارد که از تیپ Cranberry است و لوبیا قرمز که از تیپ Red Mexican بوده و اندازه بذر از خیلی کوچک تا متوسط متغیر است (۲). اما سئوالی که در اینجا مطرح است اینست که آیا ژنوتیپ های لوبیا که از نظر این خصوصیات مهم تجاری در گروه های متفاوت قرار می گیرند از لحاظ صفات زراعی هم در گروه های متفاوتی قرار می گیرند؟ به عبارت دیگر آیا نشانگرهای زراعی قادر به تفکیک این ژنوتیپ ها در گروه های خود هستند. یا اینکه ممکن است ژنوتیپ هایی که از نظر این خصوصیت از یکدیگر متمایز هستند از لحاظ نشانگر های زراعی به یکدیگر نزدیک تر باشند و در یک گروه قرار گیرند. همین سئوال ها در رابطه با نشانگرهای مولکولی مانند رپید نیز مطرح است. از طرفی مقایسه قدرت تفکیک اینگونه نشانگرها با نشانگرهای زراعی نیز در این زمینه می تواند در نوع خود جالب باشد. با توجه به موارد ذکر شده در بالا تحقیق حاضر با اهداف زیر طراحی و به اجرا در آمد:

الف- گروه بندی ارقام ولاین‌های لوبیا بااستفاده از صفات زراعی

ب- گروه بندی ارقام ولاین‌های لوبیا بااستفاده از نشانگرهای مولکولی رپید

ج- مقایسه این دوروش گروه بندی بایکدیگر و ارزیابی کارآیی آنها

مواد و روش ها

این آزمایش در محل دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاداسلامی شیراز در سال ۱۳۸۷ انجام گردید: مرحله اول مطالعات مزرعه ای و گروه بندی بر اساس صفات زراعی و مرحله دوم مطالعات آزمایشگاهی، استخراج DNA و گروه بندی براساس نشانگرهای مولکولی رپید بود. دراین تحقیق، ۲۵ رقم ولاین لوبیا (تهیه شده از مرکز ملی لوبیای خمین) از انواع مختلف قرمز، چیتی و سفید مورد مطالعه قرار گرفتند. فهرست اسامی ارقام ولاین های تحت بررسی، همراه با کدهای مربوطه در جدول۱ آمده است. آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۲۵ تیمار (ارقام ولاین های لوبیا) و۳ تکرار اجرا گردید. هر کرت ۳×۳ شامل ۴ خط کاشت با فاصله بین خطوط ۵۰ سانتی متر بود که پس از تنک کردن در هر کرت ۴۰ بوته نگه داشته شد. جهت ثبت صفات زراعی از هر کرت با حفظ اثر حاشیه تعداد ۶ نمونه به طور تصادفی برداشت گردید. تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار هایExcel-2007 ، SAS-6.12 و NTSYSpc-2.02e انجام شد.

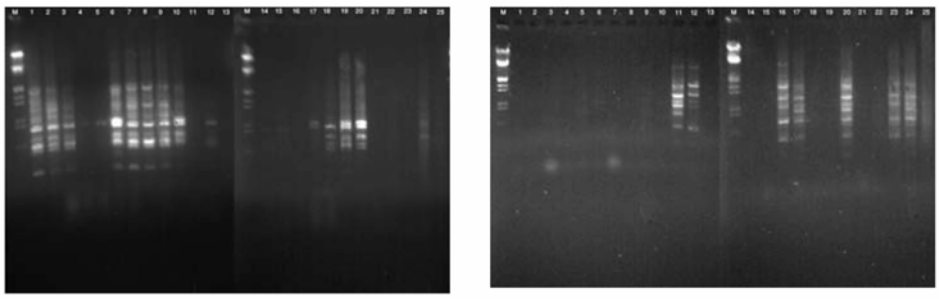
استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مراز

DNA ژنومی از ۹۰ میلی گرم برگ جوان که قبلاً در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شده بود باروش گاول و جارت (۱۳) استخراج شد. پنج میکرولیتر از DNA ژنومی استخراج شده بر روی ژل ۰/۷ درصد آگارز که با ۵۰۰ نانوگرم در لیتر اتیدیوم بروماید مخلوط شده بود، بار گذاری شد. پس از الکتروفورز، کیفیت و کمیت DNA با توجه به لاندا DNA به عنوان کنترل ارزیابی شد و تنها DNA های استفاده شدند که فاقد اسمیر RNA روی ژل آگارز بودند و نسبت A260/A280 آنها بین ۲- ۱/۸ بود. سپس DNA های مناسب به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رسید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد (یخچال) جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز نگهداری شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۱۰ میکرولیترانجام گرفت که مواد واکنش شامل DNA با غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر، یک واحد Taq DNA Polymerase، ۵ نانوگرم در میکرولیترآغازگر، ۱۰ میلی مولار dNTPs، یک میکرولیتر بافر 10xPCR و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ بود. تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر انجام شد: به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد در یک چرخه اولیه سپس یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، یک دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد و دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در ۴۰ چرخه، پس از انجام ۴۰ چرخه به مدت ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه

1- Centro International de Agriculture Tropical, Cali, Columbia

جدول۱- مشخصات ارقام و لاین های لوبیا مورد مطالعه

ردیف	نام ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	نوع	ردیف	نام ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	نوع
۱	Khomein-5	Ks-21152	چیتی	۱۴	Sayad	Ks-31166	قرمز
۲	Local Khomein	Ks-21467	چیتی	۱۵	Derakhshan	Ks-31168	قرمز
۳	Daneshjo	Ks-21468	چیتی	۱۶	Akhtar	Ks-31170	قرمز
۴	Cardinal	Ks-21469	چیتی	۱۷	G5710	Ks-41104	سفید
۵	Cran 75	Ks-21470	چیتی	۱۸	WA8528-9	Ks-41108	سفید
۶	Pinto	Ks-21472	چیتی	۱۹	WA8563-2	Ks-41125	سفید
۷	MCD4012	Ks-21475	چیتی	۲۰	WA8563-6	Ks-41127	سفید
۸	COS16	Ks-21478	چیتی	۲۱	WA8563-4	Ks-41133	سفید
۹	Taylor	Ks-21488	چیتی	۲۲	WA8563-3	Ks-41135	سفید
۱۰	Goli	Ks-31167	قرمز	۲۳	11805	Ks-41233	سفید
۱۱	Naz	Ks-31165	قرمز	۲۴	Cifemcave	Ks-41235	سفید
۱۲	Capsoli	Ks-31145	قرمز	۲۵	WA4502-1	Ks-41237	سفید
۱۳	D81083	Ks-31164	قرمز				



شکل ۱- نمونه ای ازنوارهای بدست آمده مربوط به آغازگرهای ۹ و ۲۵ برای ۲۵ ژنوتیپ لوبیا

سانتی گراد باعث تکثیر نهایی رشته های DNA گردید.

محصولات تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE 1x در ولتاژ ۹۰ به مدت یک ساعت در الکتروفورز بارگذاری شدند. آنگاه با استفاده از نشانگر شماره ۳ شرکت سیناژن (λDNA/Hind III-EcoRI) اندازه نوارهای ایجادشده مشخص گردید. و براساس عدم وجود و وجود نوار کد صفر و یک داده شد. برای تجزیه خوشه ای از روش UPGMA[1] و ضرایب جاکارد (جهت داده های رپید) و فاصله های اقلیدسی (جهت داده های صفات زراعی) استفاده شد و دندروگرام های مربوطه با نرم افزار NTSYSpc-2.02e رسم گردید.

از ۳۰ آغاز گر رپید به کار گرفته شده در تکثیر، ۲۶ آغازگر چندشکلی ایجاد کردند (شکل ۱).

میزان اطلاعات چند شکلی[2] (PIC) و شاخص نشانگر[3] (MI) که معیارهایی جهت قدرت تفکیک آغازگرها هستند با استفاده از معادلات ۱ و ۲ محاسبه شد (۲۹):

$$PIC=\Sigma[2p_i (1-p_i)] \quad (۱)$$

$$MI=PIC \times B \quad (۲)$$

در این معادلات p_i فراوانی نوار iام و B تعداد نوارهای چند شکل می باشد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ساده نشان می دهد ژنوتیپ ها در تمامی ۱۲ صفت مطالعه شده با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند (جدول ۲). از آنجائیکه ژنوتیپ ها مربوط به سه گروه لوبیا چیتی، قرمز و سفید بودند چنین تنوعی منطقی به نظر می رسد. چنین تنوع بالایی در ارتباط با صفات زراعی از تحقیقات پکسن و گلومسر (۲۳)، آنجو و همکاران (۴) و دورسان (۱۰) هم گزارش شده است. ضریب تغییرات در بعضی از صفات ازجمله تعداد ساقه فرعی (۳۱/۳۸ درصد)، وزن

1- Unweighted Pair Group Method Analysis
2-Polymorphic Information Content
3- Marker Index

غلاف (۳۰/۶۳ درصد) و تعداد دانه در بوته (۳۳/۹ درصد) کمی بالاست، از آنجائیکه توارث این صفات به صورت کمی بوده (۲) و بیشتر تحت تأثیر عوامل محیطی می باشند لذا شاید یکی از دلایل بزرگ شدن ضریب تغییرات همین موضوع باشد.

در جدول ۳ آماره های توصیفی مربوط به صفات مورد مطالعه به تفکیک انواع لوبیا ارائه شده است. همانطور که در این جدول (۳) ملاحظه می شود میانگین طول ساقه اصلی و دامنه تغییرات این صفت در لوبیا چیتی بیش از دو گروه دیگر لوبیا است. در صورتی که در رابطه با صفات طول غلاف و طول دانه میانگین و دامنه تغییرات صفات در انواع لوبیا قرمز بیش از دو گروه دیگر می باشد. میانگین صفت تعداد ساقه فرعی در لوبیا قرمز بیشتر از گروه های دیگر است اما دامنه تغییرات در لوبیا چیتی بیش از دو گروه دیگر می باشد. از نظر صفت تعداد گره ساقه اصلی، لوبیا چیتی دارای بیشترین میانگین و دامنه تغییرات است. در ارتباط با سه صفت تعداد غلاف در بوته، تعداد غلاف پوک در بوته و تعداد دانه در بوته بیشترین میانگین و دامنه تغیرات مربوط به گروه لوبیا سفید است. بیشترین میانگین و دامنه تغییرات وزن غلاف مربوط به گروه لوبیا قرمز است. بیشترین میانگین وزن ۱۰۰ دانه مربوط به گروه لوبیا چیتی بوده و بیشترین دامنه تغییرات مربوط به انواع لوبیا سفید می باشد. در رابطه با عملکرد بوته نیز بیشترین میانگین و دامنه تغییرات مربوط به انواع لوبیا سفید بود. همانطور که در مطالب قبلی دیده شد تنوع زیادی در رابطه با صفات زراعی بین گروه های مختلف لوبیا مشاهده می شود.

گروه بندی ژنوتیپ ها براساس داده های حاصل از نشانگر مولکولی رپید و صفات زراعی

از ۳۰ آغازگر تصادفی انتخاب شده در این تحقیق (P1-P30) ۲۶ آغازگر چند شکل، قطعات تکثیر متفاوتی را در بین ۲۵ ژنوتیپ مورد مطالعه ایجاد کردند (جدول ۴). تعداد نشانگرهای ایجاد شده در این آزمایش ۱۴۴ نوار تکثیر شده تصادفی بود. بطوریکه میانگین تعداد نوارهای چند شکلی برای هر آغازگر ۵/۵۴، بیشترین نوار چند شکل مربوط به آغازگر P18 (۱۰ نوار چند شکل) و کمترین نوار چند شکل مربوط به آغاز گر P28 (یک نوارچند شکل) بود (جدول ۵). متوسط تعداد نوارهای چند شکل در مطالعه گالوان و همکاران (۲۰۰۶) ۴/۱۵ ودر تحقیق فرانکلین و همکاران (۱۱) ۴/۸ گزارش شد.

متوسط اطلاعات چند شکلی برای هر آغازگر در این تحقیق ۰/۲۷۳ به دست آمد. بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر P9 (۰/۴۵۸) و کمترین میزان اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر P17 (۰/۰۷۷) بود. میانگین شاخص نشانگر برای هر آغازگر در این آزمایش ۱/۵۹۴ محاسبه شد، بطوریکه بیشترین مقدار آن مربوط به آغازگر P1 (۳/۵۵۲) و کمترین آن مربوط به آغازگر P17 (۰/۱۵۴) بود (جدول ۵). متوسط اطلاعات چندشکلی در پژوهش تیماپایه و همکاران (۲۹) ۰/۳۱۲ ودر تحقیق سارالادوی و همکاران (۲۶) ۰/۲۴۳ گزارش گردید. اندازه تقریبی نوارهای ایجاد شده در محدوده ۲۵۰۰-۳۰۰ جفت باز بوده و باندهای خارج از این محدوده به علت ضعیف بودن تکرار پذیری آنها از محاسبات خارج شدند. اگر چه نشانگر رپید به علت سادگی تکنیک و هزینه پائین بطور وسیعی در مطالعات طبقه بندی نمونه ها، تشخیص ارقام و تنوع ژنتیکی بکار رفته (۱۴) اما تکرار پذیری آن همیشه مورد سئوال بوده است. یکی از دلایل این امر استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای پائین برای اتصال آغازگرها به DNA الگو می باشد که موجب تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی برخی نقاط که دارای شباهت کمی با آغازگرها می باشد می گردد. برای این مشکل دو راه حل ارائه شده است. الف- تکرار آزمایش در شرایط کاملاً یکسان و حذف نوارهای تکرار ناپذیر. ب- انجام فقط یک آزمایش و پذیرفتن درصدی از خطا (۱).

در این تحقیق به منظور تعیین تکرار پذیری، آزمایش در شرایط مشابه با آزمایش اصلی تکرار گردید و نهایتاً در آزمایش اول تعداد ۱۷۲ نوار چند شکل و در آزمایش تکراری ۱۴۴ نوار چند شکل تکرار شده به دست آمد. بطوریکه عمده نوارهای تکرار نشده که در خارج از محدوده ۲۵۰۰-۳۰۰ جفت باز بودند از محاسبات حذف گردیده و همان ۱۴۴ نوار تکرار شده اساس محاسبات اصلی قرار گرفتند. نهایتاً میزان تکرار پذیری در این آزمایش ۸۳/۷۲ در صد برآورد گردید که عددی قابل قبول است (جدول ۵).

دراین تحقیق براساس داده های حاصل از صفات زراعی و نتایج به دست آمده از نشانگرهای رپید بر مبنای عدم حضور و حضور نوار (کد صفر و یک) پس از تجزیه خوشه ای با استفاده از روش UPGMA[1] و ضرایب جاکارد (جهت داده های رپید) و فاصله های اقلیدسی (جهت داده های صفات زراعی) دندروگرام های مربوطه با نرم افزار NTSYSpc-2.02e رسم گردید (شکل ۲ و۳). با توجه به دندروگرام مربوط به داده های حاصل از نشانگر های رپید مشخص می شود که کلیه ژنوتیپ های مربوط به گروه لوبیا چیتی (۱ تا ۹) در دسته I ، پنج ژنوتیپ (۱۵و ۱۱،۱۲،۱۳،۱۴) از هفت ژنوتیپ لوبیا قرمز در دسته II و هفت ژنوتیپ (۲۵ و ۱۷،۱۸،۲۱،۲۲،۲۳،۲۴) از نه ژنوتیپ لوبیا سفید در دسته III قرار گرفته اند. از ۲۵ ژنوتیپ مورد مطالعه تنها چهار ژنوتیپ (ژنوتیپ های ۱۰،۱۶ مربوط به گروه لوبیا قرمز و ژنوتیپ‌های ۱۹،۲۰ مربوط به گروه لوبیا سفید) در دسته های خود قرار نگرفتند. بدین ترتیب کارآیی تفکیک ژنوتیپ ها به سه گروه چیتی، قرمز و سفید در این تحقیق ۸۴٪= ۲۱/۲۵ تعیین شد. یکی از دلایل این امر می تواند همبستگی نزدیک آغازگرهای انتخاب شده با ژن‌های کنترل کننده رنگ بذر باشد. مک کلین و همکاران (۱۹) هشت مکان ژنی متفاوت بر روی شش گروه پیوسته مختلف برای

1- Unweighted Pair Group Method Analysis

رنگ بذر گزارش نمودند. این پراکندگی مکان های ژنی در سطح ژنوم می تواند یکی از دلایل مهم این همبستگی باشد چراکه نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق نیز در سطح ژنوم پراکنده اند (تجزیه به هماهنگ های اصلی[1] (PCOA) انجام شده در ادامه این موضوع را نشان می دهد) فرانکلین وهمکاران (۱۹) نیز همبستگی بسیار خوب وبالایی بین الگوی نوارهای حاصل از رپید با تفکیک نمونه ها لوبیا براساس وزن دانه به گروه های سبک، متوسط و سنگین بدست آوردند و گزارش نمودند احتمالاً بین آغازگرهای انتخاب شده و ژن‌های کنترل کننده وزن دانه همبستگی وجود داشته است. از طرفی مطالعه دندروگرام مربوط به داده های حاصل از صفات زراعی به هیچ وجه حاکی از تفکیک ژنوتیپ ها به سه گروه متمایز چیتی، قرمز و سفید نیست. تفکیک ژنوتیپ ها با استفاده از این دو دندروگرام کاملاً متفاوت است به عنوان مثال در دندروگرام حاصل از داده های مولکولی ژنوتیپ های ۱۶و۱۷ بیشترین شباهت در حالیکه این دو ژنوتیپ در دندروگرام حاصل از صفات زراعی فاصله زیادی بایکدیگر دارند. جهت مقایسه این دو دندروگرام از نرم افزار NTSYSpc-2.02e و آزمون مانتل (۱۷) استفاده گردید. براساس این آزمون، r= −۰/۰۶۲ بدست آمد (p[random Z >=observed Z=0.3462) که نشان دهنده اینست که دو دندروگرام از نظر آماری با هم همبستگی ندارند. چنین نتایجی در مطالعات زیادی گزارش شده است (۶، ۹، ۲۷ و ۲۸). البته همبستگی های ضعیف در شرایطی که تعداد نشانگرها خیلی زیاد بوده گزارش شده است (۱۲ و ۲۲)؛ مهمترین دلیل اینکه گروه بندی حاصل از داده های مربوط به نشانگرهای رپید با نتایج حاصل از گروه بندی براساس صفات زراعی مطابقت ندارد اینست که، اغلب اینگونه صفات توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می گیرند. همچنین نشانگرهای مولکولی رپید به طور تصادفی در سراسر ژنوم توزیع می شوند و عمدتاً اغلب نواحی ژنوم (بیش از ۹۰ درصد) از نظر ژنتیکی بروز فنوتیپی ندارد (۹). بنابراین احتمال اینکه نواحی غیر کدکننده برای عمل نشانگر رپید انتخاب گردد بسیار زیاد است لذا عدم تطابق نتایج حاصل از نشانگرهای رپید و صفات زراعی بسیار محتمل به نظر می رسد. به عبارت دیگر روابط مشاهده شده بر اساس نشانگرهای مولکولی رپید شاید حاوی اطلاعاتی در خصوص تکامل و بیولوژی ارقام و ژنوتیپ ها باشد ولی لزوماً نمی تواند منعکس کننده تفاوت ها در سطح صفات زراعی و مورفولوژیکی باشد. برای اثبات این موضوع در این تحقیق بر روی داده های حاصل از نشانگرهای رپید تجزیه به هماهنگ های اصلی صورت گرفت. نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول کمتر از ۴۰ درصد تغییرات را توجیه می کند (جدول ۶ و شکل ۴).

1- Principal Coordinate Analysis.

جدول۲- تجزیه واریانس ساده صفات مورد مطالعه، اعداد داخل جدول میانگین مربعات می باشد.

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ساقه اصلی (cm)	طول غلاف (mm)	طول دانه (mm)	تعدادساقه فرعی	تعدادگره ساقه اصلی	تعدادغلاف دربوته	تعدادغلاف پوک دربوته	تعدادداته دربوته	تعدادداته درغلاف	وزن غلاف (gr)	وزن ۱۰۰دانه (gr)	عملکردتک بوته(gr)
بلوک	۲	۱۷۸/۲	۴۴/۷	۲/۱۶	۵/۲۴	۲/۹۴	۷۴/۸	۳۴/۸	۵۲۲	۰/۵۲	۲۷۵/۳۹	۶۵/۹۳	۱۴۷/۱۰
ژنوتیپ	۲۴	۲۴۰۹/۸**	۳۸۴/۳**	۱۰/۳**	۲۴/۳**	۳۴/۰**	۲۵۵/۹**	۱۰۷/۶**	۲۰۳۵**	۱/۴۷**	۵۳۳/۲*	۲۲۵/۳**	۲۱۱/۰**
اشتباه	۴۸	۱۲۹/۸	۴۸/۷	۲/۲	۵/۵	۲/۲	۴۹/۴	۴۳/۹	۴۹۱/۶	۰/۲۹	۲۷۸/۴	۵۵/۳	۹۲/۶
C.V%	---	۱۴/۵۹	۷/۵۵	۱۱/۹۵	۳۱/۳۸	۱۱/۵۹	۲۸/۴	۱۸/۴۱	۳۳/۹	۱۴/۴۲	۳۰/۶۳	۱۹/۰۱	۲۰/۴۵

**و* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

اگر چه این میزان از نقطه نظر آماری برای نمایش گرافیکی مناسب نمی‌باشد ولی از نقطه نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگر ها از کل ژنوم می باشد. به این ترتیب که هر یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش های متفاوت ژنوم بوده، بنابراین دارای همبستگی کمتر با یکدیگر هستند (۳). از آنجائی که عمده ژنوم قسمت های غیرکدکننده می باشند بنابراین می توان گفت که دلیل اصلی عدم همبستگی دو دندروگرام در این مطالعه توزیع آغازگرهای رپید انتخابی در کل سطح ژنوم بوده است. البته این موضوع در رابطه با صفت رنگ بذر که مکان های ژنی کنترل کننده آن نیز در سطح ژنوم توزیع خوبی دارد و نقش عوامل محیطی بر روی آنها کم می‌باشد (۱۹)؛ باعث شد که نشانگرهای رپید به خوبی آنها را به گروه های متمایز تقسیم کند اما در رابطه با صفات زراعی بایستی توجه داشت که چون همزمان چندین صفت درنظر گرفته شده که نحوه توزیع ژن های کنترل کننده آنها در سطح ژنوم با یکدیگر متفاوت می‌باشد و از طرفی تأثیر عوامل محیطی نیز روی آنها زیاد است، لذا عدم وجود تفکیک مشابه با دو روش منطقی به نظر می رسد. نتیجه نهایی اینکه در این تحقیق نشانگر رپید کارآیی بسیار بالاتری نسبت به صفات زراعی در تفکیک انواع لوبیا چیتی، قرمز و سفید داشت و به عنوان ابزاری مناسب در این زمینه معرفی می شود.

جدول۳- آماره های توصیفی صفات مورد مطالعه در انواع ژنوتیپ های لوبیا

صفت	نوع لوبیا	میانگین	اشتباه استاندارد	حداکثر	حداقل	دامنه
طول ساقه اصلی (cm)	چیتی	۸۲/۵۱	۹/۸۴	۱۲۷/۵۲	۴۱/۹۷	۸۵/۵۵
	قرمز	۶۴/۴۰	۱۱/۱۲	۱۱۶/۰۰	۴۱/۱۷	۷۴/۸۳
	سفید	۷۵/۹۹	۸/۰۶	۱۰۹/۳۳	۳۸/۴۷	۷۰/۸۶
طول غلاف (mm)	چیتی	۸۰/۸۱	۴/۲۵	۱۰۴/۳۹	۶۸/۲۳	۳۶/۱۶
	قرمز	۹۴/۸۰	۵/۶۲	۱۱۴/۹۶	۷۳/۶۷	۴۱/۲۹
	سفید	۹۳/۵۹	۳/۷۵	۱۰۶/۰۵	۷۰/۵۲	۳۵/۵۳
طول دانه (mm)	چیتی	۱۲/۴۴	۰/۴۶	۱۳/۹۰	۹/۷۰	۴/۲۰
	قرمز	۱۲/۹۹	۰/۹۳	۱۶/۴۰	۱۰/۳۰	۶/۱۰
	سفید	۱۱/۱۶	۰/۵۸	۱۴/۹۰	۹/۳۰	۵/۶۰
تعدادساقه فرعی	چیتی	۷/۰۰	۱/۱۵	۱۴/۵۰	۳/۵۰	۱۱/۰۰
	قرمز	۷/۵۵	۱/۲۸	۱۲/۸۳	۴/۱۷	۸/۶۶
	سفید	۷/۵۰	۰/۹۱	۱۱/۳۳	۳/۸۳	۷/۵۰
تعدادگره ساقه اصلی	چیتی	۱۳/۵۲	۱/۲۲	۱۸/۱۷	۸/۳۳	۹/۸۴
	قرمز	۱۱/۰۵	۱/۲۸	۱۵/۱۷	۷/۵۰	۷/۶۷
	سفید	۱۲/۹۸	۰/۹۲	۱۶/۵۰	۹/۶۷	۶/۸۳
تعدادغلاف دربوته	چیتی	۱۸/۶۳	۲/۲۹	۳۰/۸۳	۹/۵۰	۲۱/۳۳
	قرمز	۲۲/۹۸	۳/۶۵	۳۸/۸۳	۱۳/۳۳	۲۵/۵۰
	سفید	۲۸/۵۰	۵/۵۰	۶۰/۸۳	۱۳/۳۳	۴۷/۵۰
تعدادغلاف پوک دربوته	چیتی	۵/۷۶	۰/۷۴	۸/۵۰	۱/۶۷	۶/۸۳
	قرمز	۸/۱۹	۲/۵۴	۲۲/۳۳	۳/۵۰	۱۸/۸۳
	سفید	۱۴/۸۹	۵/۸۳	۵۴/۸۳	۲/۶۷	۵۲/۱۶
تعداددانه دربوته	چیتی	۴۸/۳۹	۷/۳۰	۸۵/۳۳	۱۷/۸۳	۶۷/۵۰
	قرمز	۵۶/۹۵	۸/۲۱	۱۰۲/۳۳	۳۷/۱۷	۶۵/۱۶
	سفید	۷۸/۱۹	۱۶/۹۸	۱۹۱/۸۳	۲۵/۸۳	۱۶۶/۰۰
تعداددانه درغلاف	چیتی	۳/۷۰	۰/۲۵	۵/۰۰	۲/۵۰	۲/۵۰
	قرمز	۳/۸۹	۰/۴۲	۶/۰۵	۲/۷۷	۳/۲۸
	سفید	۳/۸۸	۰/۳۴	۵/۳۷	۲/۱۶	۳/۲۱
وزن غلاف (gr)	چیتی	۳۷/۱۰	۴/۸۷	۵۶/۸۴	۱۸/۴۰	۳۸/۴۴
	قرمز	۴۵/۴۷	۱۲/۷۳	۱۱۴/۹۴	۲۲/۴۲	۹۲/۵۲
	سفید	۴۲/۵۶	۶/۴۹	۸۴/۱۹	۱۰/۸۵	۷۳/۳۴
وزن ۱۰۰دانه (gr)	چیتی	۴۸/۶۱	۴/۰۴	۷۵/۲۶	۳۶/۷۸	۳۸/۴۸
	قرمز	۳۸/۷۹	۳/۲۷	۵۵/۴۹	۳۰/۷۵	۲۴/۷۴
	سفید	۳۵/۱۲	۴/۰۷	۶۴/۹۹	۲۶/۲۵	۳۸/۷۴
عملکردتک بوته (gr)	چیتی	۲۰/۸۳	۲/۸۱	۳۱/۴۵	۱۰/۱۱	۲۱/۳۴
	قرمز	۲۰/۲۷	۲/۷۶	۳۵/۳۲	۱۳/۰۱	۲۲/۳۱
	سفید	۲۳/۴۲	۴/۱۱	۵۰/۵۷	۶/۶۹	۴۳/۸۸

جدول ٤- لیست آغازگرهای رپید استفاده شده و مشخصات مربوطه

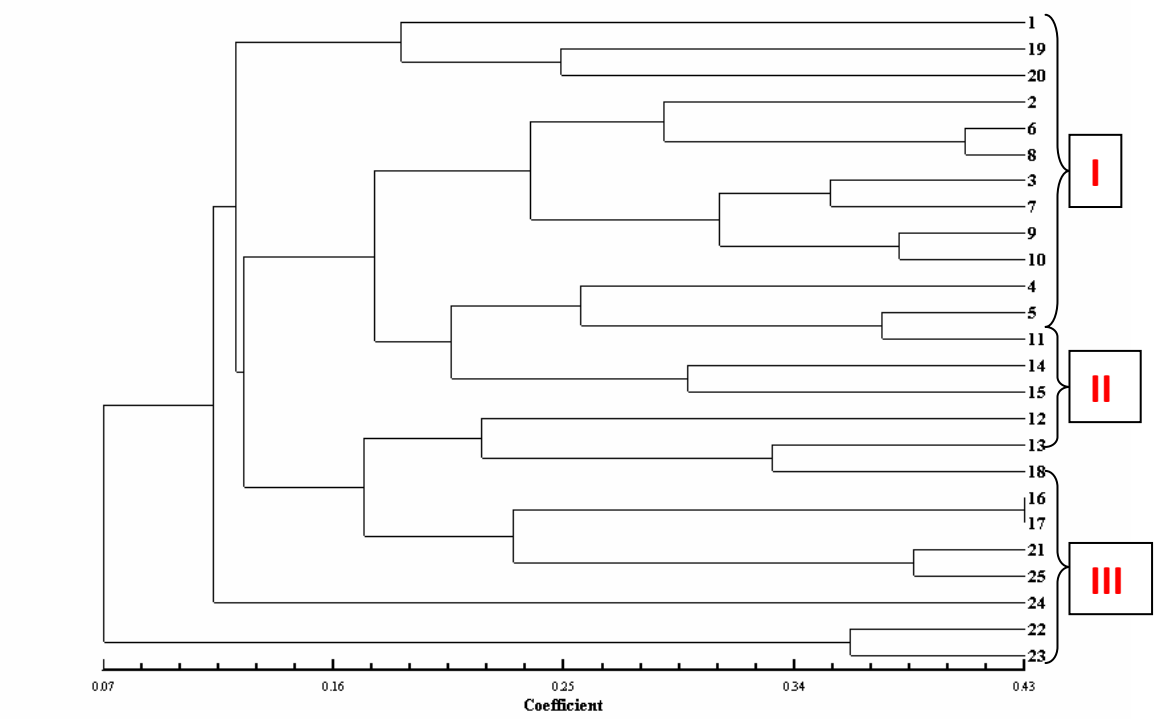
آغازگر	توالی ´۵ به ´۳	تعدادباندهای چندشکلی	PIC value	MI	اندازه تقریبی باند های ایجاد شده ((bp
P1	CAG GCC CTT C	۸	۰/۴۴۴	۳/۵۵۲	۸۰۰ -۲۰۰۰
P2	AGG ACT GCT C	۷	۰/۲۲۷	۱/۵۸۹	۵۰۰ -۲۰۰۰
P3	GTG GGT GCC A	۷	۰/۳۶۰	۲/۵۲۰	۴۰۰ -۱۶۰۰
P4	AAC GGG CCA A	۷	۰/۳۱۶	۲/۲۱۲	۳۰۰ -۲۰۰۰
P5	ACG GAA GCC C	۶	۰/۳۸۴	۲/۳۰۴	۴۰۰ -۱۴۰۰
P6	GAG CCC GAC T	۷	۰/۳۱۴	۲/۱۹۸	۵۰۰ -۲۰۰۰
P7	GAG ACC AGA C	۶	۰/۳۵۷	۲/۱۴۲	۵۰۰ -۱۹۰۰
P8	AGA TGC AGC C	۹	۰/۱۵۲	۱/۳۶۸	۶۰۰ -۲۵۰۰
P9	ACC CGA CCT G	۶	۰/۴۵۸	۲/۷۴۸	۴۰۰ -۲۰۰۰
P10	GAG CGT CGC T	---	---	---	---
P11	GTG ACG TAG G	۵	۰/۱۷۰	۰/۸۵۰	۸۰۰ -۱۶۰۰
P12	CAA TCG CCG T	۷	۰/۲۹۲	۲/۰۴۴	۶۰۰ -۲۰۰۰
P13	TCG GCG ATA G	---	---	---	---
P14	CAG CAC CCA C	۳	۰/۱۲۸	۰/۳۸۴	۵۰۰ -۱۳۰۰
P15	TCT GTG CTG G	---	---	---	---
P16	TTC CGA ACC C	۴	۰/۱۶۲	۰/۶۴۸	۸۰۰ -۲۰۰۰
P17	AGC CAG CGA A	۲	۰/۰۷۷	۰/۱۵۴	۵۰۰ -۱۷۰۰
P18	GAC CGC TTG T	۱۰	۰/۲۳۴	۲/۳۴۰	۶۰۰ -۲۰۰۰
P19	AGG TGA CCG T	۸	۰/۴۳۴	۳/۴۷۲	۴۰۰ -۲۱۰۰
P20	GTT TCG CTC C	۵	۰/۳۵۱	۱/۷۵۵	۷۰۰ -۱۹۵۰
P21	CAT CCC CCT G	۴	۰/۲۵۸	۱/۰۳۲	۸۵۰ -۲۰۰۰
P22	GGA CTG GAG T	۶	۰/۲۰۳	۱/۲۱۸	۴۰۰ -۱۹۰۰
P23	TGC GCC CTT C	۴	۰/۲۰۳	۰/۸۱۲	۸۰۰ -۲۰۰۰
P24	GGT GAC GCA G	۵	۰/۳۱۱	۱/۵۵۵	۷۰۰ -۱۸۰۰
P25	GTC CAC ACG G	۴	۰/۲۶۴	۱/۰۵۶	۷۵۰ -۱۹۵۰
P26	CAA ACG TCG G	---	---	---	---
P27	GTT GCC ATC C	۵	۰/۱۹۸	۰/۹۹۰	۵۰۰ -۲۲۰۰
P28	GGC TGC GAC A	۱	۰/۲۱۱	۰/۲۱۱	۸۰۰ -۹۰۰
P29	AGG CAG AGC A	۲	۰/۳۱۷	۰/۶۳۴	۸۰۰ -۱۵۰۰
P30	GGT CGA TCT G	۶	۰/۲۴۷	۱/۶۴۴	۳۵۰ -۱۹۰۰

جدول ۵- اطلاعات آماری آغاز گرها همراه با درصد تکرارپذیری

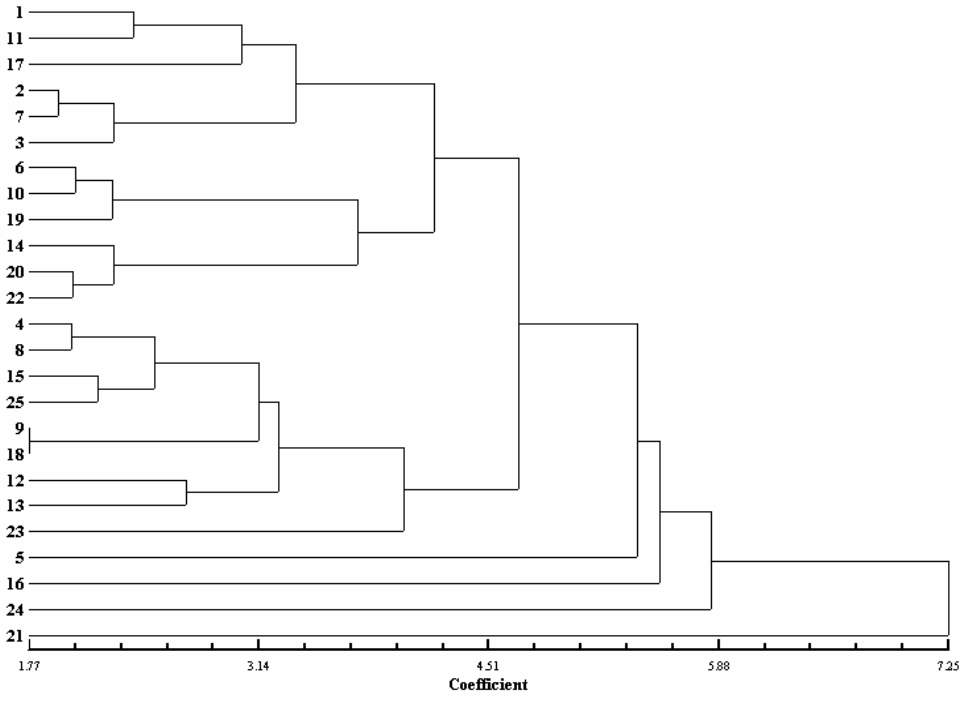
	PIC value	MI	تعدادباندهای چندشکلی	درصد تکرارپذیری
میانگین	۰/۲۷۳	۱/۵۹۴	۵/۵۴	۸۳/۷۲
حداکثر	۰/۴۵۸ – آغازگر (P9)	۳/۵۵۲ – آغازگر (P1)	۱۰ - آغازگر (P18)	۱۰۰
حداقل	۰/۰۷۷ – (P17)	۰/۱۵۴ – (P17)	۱ - آغازگر (P28)	۶۶/۶۶
دامنه	۰/۳۸۱	۳/۳۹۸	۹	۳۳/۳۴

جدول ٦- مقادیر ویژه مؤلفه ها، درصد مقادیر ویژه و درصد تجمعی مقادیر ویژه آنها برای داده های حاصل از نشانگر های رپید

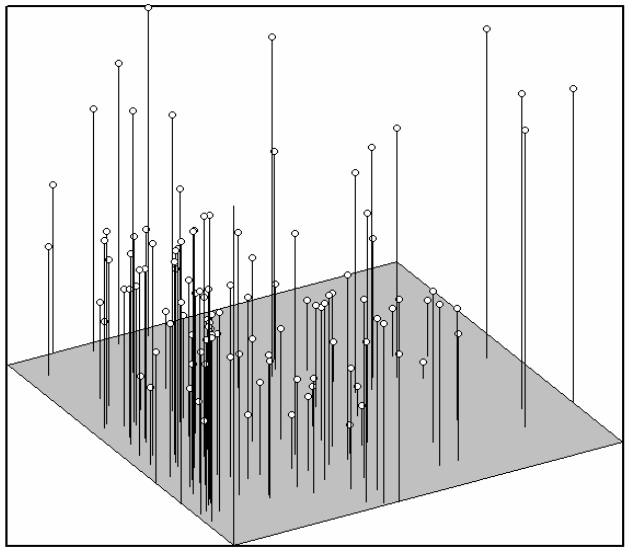
مؤلفه	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی مقادیر ویژه
اول	۶/۶۹	۱۵/۲۵۳۶	۱۵/۲۵۳۶
دوم	۵/۸۸	۱۳/۵۸۳۲	۲۸/۸۳۶۹
سوم	۴/۶۹	۱۰/۸۳۰۴	۳۹/۶۶۷۲
چهارم	۳/۰۸	۷/۱۱۱۷	۴۶/۷۷۸۹



شکل ۲- دندروگرام ۲۵ ژنوتیپ لوبیا بر مبنای روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد مربوط به داده های حاصل از نشانگرهای رپید



شکل۳- دندروگرام ۲۵ ژنوتیپ لوبیا بر مبنای روش UPGMA و بر اساس فاصله های اقلیدسی مربوط به داده های حاصل از صفات زراعی



شکل ٤- نمودار سه بعدی پراکنش نشانگرها رپید در سطح ژنوم براساس سه مؤلفه اول (PCOA)

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی انجـام شـده در دانـشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می باشد کـه بدینوسـیله از مـسئولین زیـربط کـه منابع مالی این کار را فراهم نمودند سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱- آقازاده قولکی، ر.، ب. قره یاضی، ق. نعمت زاده و ن. بابائیان. ۱۳۸۲. طبقه بندی بخشی از ژرم پلاسم برنج ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD . مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۴: ۷۵۷-۷۶۷.

۲- باقری، ع. ر.، ع. ا. محمودی و ف. قزلی.۱۳۸۰. زراعت واصلاح لوبیا (ترجمه). جهاد دانشگاهی مشهد.۵۵۶ صفحه.

۳- محمدی، س. ا. ۱۳۸۵. تجزیه وتحلیل داده های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی. مقالات کلیـدی: نهمـین کنگـره علـوم زراعت واصلاح نباتات ایران. پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران، شهریور ۱۳۸۵.

4- Anju, D., S. K. Sharma, K. P. Singh, and O. P. Luthra. 2006. Path analysis of seed yield components in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Research on Crops, 7: 255- 257.

5- Balkaya, A and A. Ergun. 2008. Diversity and use of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) populations from Samsun, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 36: 189- 197.

6- Chowdhury, A. K., P. Srinives, P. Tongpamnak, and P. Saksoong. 2001. Genetic diversity based on morphology and RAPD analysis in vegetable soybean. Korean J. Crop Sci. 46 (2): 112-120.

7- Chtourou-Ghorbel, N., B. Lauga, N. B. Brahim, D. Combes, and M. Marrakchi. 2002. Genetic variation analysis in the genus *Lathyrus* using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 363-370.

8- Danylchenko, O and B. Sorochinsky. 2005. Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and g-rays. BMC Plant Biol. 5 (Suppl. 1), S9.

9- Dey, S. S., A. K. Singh, D. Chandel, and T. K. Behera. 2006. Genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits. Scientia Horticulturae. 109: 21-28.

10- Dursun, A. 2007. Variability, heritability and correlation studies in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. World Journal of Agricultural Sciences. 3 (1): 12- 16.

11- Franklin, C. J., M. M. Sudheer, G. Thomas, G. Varghese, N. Selvaraj, and M. Dorai. 2009. Genetic diversity and conservation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Nilgiris. Current Science. 97: 227-235.

12- Galvan, M. Z., M. C. Menendes-Sevillano, A. M. De Ron, M. Santalla, and P. A. Balatti. 2006. Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. Genetic Resoources and Crop Evolution. 53:891-900.

13- Gawel, N. J and R. L. Jarret. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Molecular Biology Reporter. 9: 262-266.

14- Konstantinos, T., O. Koutita, I. I. Papadopoulos, I. S. Tokatlidis, E. G. Tamoutsidis, V. P. Michailidou, and M. K. Sotiriou. 2008. Genetic diversity in bean populations based on RAPD markers. Biotechnology. 7: 1-9.

15- Liu, K., M. Goodman, S. Muse, J. S. Smith, E. Buckler, and J. Doebley. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics. 165: 2117- 2128.
16- Martins, S. R., F. J. Venses, L. E. Saenz, M. R. Barroso, and V. Carnide. 2006. RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Scientia Horticulturae. 108: 133-142.
17- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
18- Matus, I. A and P. M. Hayes. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome. 45: 1095- 1106.
19- Mc Clean, P. E., R. K. Lee, C. Otto, P. Gepts, and M. J. Bassett. 2009. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The Journal of Heredity. 93: 148-152.
20- Mohammadi, S. A and B. M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. Crop Science. 43: 1235- 1248.
21- Moyib, O. K., M. A. Gbadegesin, O. O. Aina, and O. A. Odunola. 2008. Genetic variation within a collection of Nigerian accessions of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) revealed by RAPD primers. African Journal of Biotechnology. 7: 1839- 1864.
22- Ortiz, R. 1997. Morphological variation in Musa germplasm. Genet. Res. Crop Evol. 44: 393-402.
23- Peksen, E., and A. Gulumser. 2005. Relationships between seed yield and yield components and path analysis in some common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. Ondokus Mayis Universitesi. 20:82- 87.
24- Reddy, K. S., J. Souframanien, and P. Dhanasekar. 2008. Genetic diversity in mungbean as revealed by SSR and ISSR markers. Journal of Food Legumes. 21: 15- 21.
25- Reif, J. C., X. C. Xia, A. E. Melchinger, M. L. Warburton, D. A. Hoisington, D. Beck, M. Bohn, and M. Frisch. 2004. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize population of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. Crop Science. 44: 326- 334.
26- Saraladevi, M., K. Selvaraju, and P. Shanmugasundaram. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. Electronic Journal of Biotechnology. 11: 641- 653.
27- Solouki, M., H. Mehdikhani, H. Zeinali, and A.A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. Scientia Horticulturae. 117: 281-287.
28- Talebi, R., F. Fayaz, M. Mardi, S. Pirsyedi, and A. M. Naji. 2008. Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines based on RAPD and agronomic markers. Int. J. Agri. Biol. 10: 301-305.
29- Thimmappaiah, W., G. Santhosh, D. Shobha, and G. S. Melwyn. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae. 118: 1-7.