

Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi

O. Bilgin K. Z. Korkut

Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Tekirdağ

Araştırmada kullanılan 10 baz uzunluğunda 10 primerden iyi sonuç veren 5'i değerlendirmeye alınmıştır. Primerler genelinde, genotiplerin amplifikasyon bant sayıları 2 – 11 adet arasında değişmiştir. En fazla polimorfik bant sayısı T5 primerinden elde edilmiştir. Ekmeklik buğday genotiplerinde, en düşük benzerlik oranına (0.365) Mv-17 ve ME-2 (51) arasında ulaşılırken, IBWSN-69 ve Mv-17 kombinasyonu en yüksek genetik benzerlik oranını (0.946) vermiştir. Elde edilen dendograma göre genotipler başlıca 2 ana gruba ayrılmışlardır. Dendogramda, 6 genotip ikinci ana grupta ve 14'ü de ilk ana grupta yer almış ve bu iki grup arasındaki genetik benzerlik oranı yaklaşık 0.660 olmuştur. Dendograma göre; Sana ve Flamura-80, Miryana ve ISWYN-29, ME-2 (51) ve IBWSN-58, Prostar ve Pehlivan, IBWSN-69 ve Mv-17 ve ISWYN-24 ve Saraybosna birbirine yakın akraba; Kate A-I ve IBWSN-62 en uzak akraba genotipler olmuşlardır.

Anahtar kelimeler: ekmeklik buğday, DNA, PCR, polimorfizm, benzerlik indeksi, dendogram.

Determination of Genetic Distances

In Some Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties and Lines

Five primers, out of ten primers in ten base length used in the research, giving good results were taken into consideration. The number of amplified bands of genotypes ranged from 2 to 11 in the primers. The most polymorphic bands were obtained from T5 primer. The lowest similarity (0.365) was found between Mv-17 and ME-2 (51), the highest similarity (0.946) was found between IBWSN-69 and Mv-17 combination in the bread wheat genotypes. Genotypes were categorised mainly into two groups based on the dendogram results. Six genotypes took part in the second group and 14 genotypes took part in the first group, and the average similarity between these two groups was 0.660. Sana and Flamura-80; Miryana and ISWYN-29; ME-2 (51) and IBWSN-58; Prostar and Pehlivan; IBWSN-69 and Mv-17; ISWYN-24 and Saraybosna genotypes were closely related while Kate A-I and IBWSN-62 were the most divergent.

Keywords: bread wheats, DNA, PCR, polymorphism, similarity index, dendogram.

Giriş

İslah çalışmalarında temel amaç, bitkilerin genetik yapılarında gerçekleştirilecek değişiklik ile ortaya çıkacak varyasyondan yararlanarak yapılacak seleksiyon yoluyla daha kaliteli, yüksek verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitlerin mümkün olduğunca kısa sürede elde edilmesidir. Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Bunlar çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyet isteyen işlemlerdir. Bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından son yıllarda protein,

izoenzim ve DNA markırları gibi moleküler markırların gerek araştırma gerekse uygulamada kullanımı büyük önem kazanmakta ve bitki ıslahında bunlardan yararlanma olanakları araştırılmaktadır (Halward vd., 1992). Moleküler markırlardan genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında moleküler markırlar ıslah projelerinin sürelerini kısaltarak maliyetlerini düşürmektedirler ve seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde de yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, Dünya'da ve

ülkemizde yapılan ıslah çalışmalarıyla geliştirilen çeşitlerin üreticiye aktarılmasında ve üreticinin çeşit seçiminde zorluklar yaşanmaktadır. Çeşit tescil ve sertifikasyonun da, stabil yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin belirlenmesinde tarla denemeleri ve laboratuvar testleri yanında moleküler markırlar özellikle

DNA markırlarının kullanılması ile bu sorunları aşmak olasıdır.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada materyal olarak, bölgede yaygın olarak tarımı yapılan ekmeklik buğday çeşitleri ve CIMMYT kökenli hatlar Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada materyal olarak kullanılan genotiplerin bazı özellikleri ve hatların pedigrileri

Genotipler	Islah yöntemi/Pedigrisi	Orijini/Kökene
Sana	Kombinasyon ıslahı	Hırvatistan
Kate A-I	Kombinasyon ıslahı	Bulgaristan
Pehlivan	Kombinasyon ıslahı	Türkiye
Saraybosna	Kombinasyon ıslahı	Hırvatistan
Flamura-85	Kombinasyon ıslahı	Romanya
Flamura-80	Kombinasyon ıslahı	Romanya
Bezostaja-1	Kombinasyon ıslahı	Rusya
Prostar	Kombinasyon ıslahı	Bulgaristan
MV-17	Kombinasyon ıslahı	Macaristan
Mirjana	Mutasyon ıslahı	Bulgaristan
IBWSN-42	FILIN CM 97334-OM-20Y-030M-4Y-1Y-0M	27 th IBWSN (1995-96)
IBWSN-58	CMH80A.542/CNO79 CMH83.2446-3B-1Y-2B-2Y-1B-0Y	27 th IBWSN (1995-96)
IBWSN-62	MANGO/SPB CRG121.2-48B-0Y-030M-4Y-3Y-0M	27 th IBWSN (1995-96)
IBWSN-69	KAUZ*2/BOW//KAUZ CRG906-2Y-010M-0Y	27 th IBWSN (1995-96)
ME-2 (51)	PSN/BOW//SERI CM92909-6M-0Y-0M-7Y-0B-1PZ-0Y	EPCME2HR (1995-96)
ME-7 (274)	TJB368.251/BUC SWM9758-15H-1P-0H-4WM-0WM-4WM-2WM-0WM	EPCME7WF (1995-96)
ISWYN-9	VEE/MYNA CM73815-2M-1Y-03M-3Y-1B-0Y	30 th ISWYN (1995-96)
ISWYN -14	TUI CM74849-2M-2Y-3M-2Y-0B-11M-0Y	30 th ISWYN (1995-96)
ISWYN -24	WEAVER CM90320-A-1B-5Y-0B-6M-0Y	30 th ISWYN (1995-96)
ISWYN -29	NESTOR CM87526-025TOPM-14Y-0H-0SY-7M-0Y	30 th ISWYN (1995-96)

Araştırmada kullanılan genotipler arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi amacıyla kullanılan RAPD tekniği; DNA izolasyonu, PCR işlemleri, agaroz jel elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

DNA ekstraksiyonu

Ekmeklik buğday tohumları saksılarda çimlendirilmiş, 10-15 cm boya ulaştıklarında (4 yapraklı dönem) DNA izolasyonu McCouch vd. (1988)’nin yöntemine göre yapılmıştır. İlk önce taze yapraklar toplanmış ve sıvı nitrojen içinde dondurulup – 80 °C’de depolanmıştır. Havan içinde yapraklar ezilerek toz haline getirilmiş ve 50 ml’lik falkon tüplere (25 ml’yi geçmeyecek şekilde) transfer edilmiştir.

Hazırlanan izolasyon tamponu (Çizelge 2) 50 ml’lik tüplere ve 65 °C’de 10 dakika süreyle sıcak su banyosuna konulmuştur. Daha sonra tamponun her 50 ml’si için 0.19 g sodyum bisülfid eklenmiştir. Bu tampondan her tüpe eşit miktarlarda (20-25 ml) eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler tekrar 65 °C’de sıcak su banyosuna 30 dakika süreyle bırakılmış, tüpler 10 dakika bir yavaşça ters yüz edilmiştir. Sıcak su banyosundan çıkarılan her tüpün üst kısmına kadar kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edilmiştir ve yavaşça karıştırılıp 15 dakika karıştırıcıya konulmuştur. Tüpler 15 dakika 2800 rpm sanrifüj edildikten sonra tüplerin üst fazları yeni falkonlara aktarılmıştır. Alt fazlar da çöpe atılmıştır. Her tüpe 8.6 mg/ml’lik RNaz’dan 23 µl eklenmiş, yavaşça karıştırılmış ve 15 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Pipet

kullanılarak her tüpe eşit hacimde fenol ilave edilerek yavaş yavaş ters düz edilerek karıştırılmıştır. 5 dakika 2800 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Pipet kullanılarak üst fazlar yeni tüplere transfer edilmiştir. Yine her tüpe eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) ilave edilerek yavaşça karıştırılmış ve 2800 rpm'de santrifüj edilmiştir. % 95'lik soğuk EtOH'dan 2X hacim eklenmiştir. DNA'lar tortu halinde beyaz renkte görülmeye başlanıncaya kadar yavaşça karıştırılmış ve - 20 °C'de gece boyunca bekletilmiştir. Bir sonraki gün DNA'lar 15 ml'lik tüplere aktararak 5 ml % 70'lik EtOH'da temizlenmiştir. Steril kurutma kağıtları kullanılarak kurutulan DNA'lar yeni tüplere alınmış ve 250 µl TE eklenmiştir. Tüpler 65 °C'de sıcak su banyosuna alınarak çözülmeye kadar vorteks ile karıştırılmıştır. 12000 rpm'de spin edilmiştir. DNA kalitesinin kontrolü için jele yüklenerek gözlenmiştir. Daha sonraki PCR işlemi için örneklerimize ait DNA içeren tüpler derin dondurucuya (- 20 °C) konulmuştur.

Çizelge 2. DNA izolasyon tamponu

NaCl	5 M	5.0 ml
Tris	1 M pH 7.8	5.0 ml
EDTA	0.25 M pH 7.0	10.0 ml
SDS	% 20	3.1 ml
H ₂ O	Distile	26.9 ml

PCR işlemleri

PCR'a başlamadan önce izole edilen DNA'ların miktarı spektrofotometre'den yararlanılarak ölçülmüştür. Ölçülen DNA miktarlarına göre PCR işlemi için (5 µl'sinde 25-30 ng DNA olacak şekilde) filtre edilmiş su ile seyreltme yapılmıştır.

Çizelge 3. PCR işlemi için tüplere konulan maddeler ve miktarları

Maddeler	Miktarları (µl)
DNA	5.0
MgCl ₂	3.0
Tampon	3.0
dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2.4
Primer	2.4
Taq polimeraz enzimi	2.4
Filtre H ₂ O	11.8
Toplam hacim	30.0

DNA amplifikasyonu için 200 µl'lik PCR tüpleri kullanılmıştır. Her bir tüpe Çizelge 2'de belirtilen maddeler ve 1 damla mineral yağ konularak PCR işlemine geçilmiştir. Ayrıca, PCR uygulamalarında olası bir bulaşmayı önlemek için ise, her uygulama ile birlikte genomik DNA'yı içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. PCR tüpleri Eppendorf Minicycler thermocycler'a yerleştirilerek 95 °C'de 5 dakika tutulup DNA'ların (enzim olmadan) denature olması sağlanmıştır.

PCR işlemi için oligonükleotidler olarak denenen 10 primerden daha iyi sonuç veren 5 primer seçilmiş ve RAPD analizleri için kullanılmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Araştırmada kullanılan primerler ve baz dizilişleri

Sıra no	Primer ismi	Baz dizilişi
1	T3	5'-TCA GAG CGC C-3'
2	T4	5'-CGA CCA GAG C-3'
3	T5	5'-GTG ACG TAG G-3'
4	T7	5'-GAC CGC TTG T-3'
5	A17	5'-AAT GGC CGT A-3'

Agaroz jel Elektroforezi

PCR tamamlandıktan sonra amplifiye olan DNA'ların elektroforez işlemine geçilmiştir. Jel ve elektrot tampon çözeltisi olarak 1XTAE kullanılmıştır (Çizelge 5). Elektroferez işlemi için % 1.5'luk agaroz jel kullanılmıştır. Amplifiye olan DNA'ların bulunduğu tüplere 2 µl markır boya olarak brom fenol blue eklenmiş, pipetleme yapılarak boyanın iyice karışması sağlanmış ve ardından yine pipet yardımı ile örnek yuvalarına yükleme yapılmıştır. Örnek yüklemesi sırasında standart markör DNA olarak 100 bp DNA ladder (Promega) 5 µl alınarak ilk yuvaya yüklenmiş ve jel yaklaşık 3 saat süresince 100 V'luk sabit gerilimde tutulmuştur.

Çizelge 5. 50XTAE stok solüsyonunun hazırlanışı

Tris	242.0 g
Glasiyalasetik asit	57.1 ml
EDTA (pH: 8.5)	37.2 g
Destile su ile 1 litreye tamamlanmıştır	

Sonuçların değerlendirilmesi

Elektroforez işleminden sonra jel 0.5 µl/ml'lik etidyum bromid çözeltisine konularak 45 dak karıştırıcıda yavaşça çalkalanarak boyanması sağlanmıştır. Boyanan jel 20 dak distile suda yıkanmıştır.

UV ışık altında incelenen jelde çeşitlerin bant desenlerine bakılarak bantların olup olmamasına göre "1" veya "0" şeklinde değerlendirilmiş ve benzerlik indeksleri oluşturulmuştur. Bu amaçla Sokal ve Sneath (1963) tarafından geliştirilen "Benzerlik İndeksi (B.İ.)" formülü iki birey arasındaki benzerlik karşılaştırmalarında kullanılmıştır.

Çeşitler arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendogram verileri ise, Rohlf (1990) tarafından geliştirilen NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System, Version 1.80) programı kullanılarak "UPGMA cluster" analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

RAPD analizleri için kullanılan 20 ekmeçlik buğday genotipinin primerlere göre değerlendirmeye alınan bant sayıları Çizelge 6'da belirtilmiştir.

Çizelge 6. Araştırmada incelenen ekmeçlik buğday çeşitlerinin primerlere göre değerlendirmeye alınan bant sayıları

Genotipler	Primerler					Genotipler	Primerler				
	T3	T4	T5	T7	A17		T3	T4	T5	T7	A17
Kate A-I	5	6	4	7	8	Prostar	5	5	4	4	2
IBWSN-69	6	10	11	10	7	IBWSN-62	4	10	8	8	6
Mv-17	7	10	11	10	8	Miryana	6	4	4	6	5
IBWSN-42	3	10	11	9	7	Sana	3	4	4	4	5
ME-7 (274)	4	4	6	4	4	Pehlivan	5	5	6	7	2
ME-2 (51)	2	4	4	4	3	IBWSN-58	4	5	4	4	3
ISWYN-24	6	7	8	8	7	Flamura-80	6	4	4	8	6
ISWYN-14	6	4	10	9	5	ISWYN-9	5	5	5	5	4
Saraybosna	4	9	10	9	6	ISWYN-29	6	4	6	4	7
Bezostaja-1	6	4	3	3	7	Flamura-85	7	5	7	6	3
						Toplam	100	119	130	129	105

Çizelge 6'dan görüleceği gibi, primerler reaksiyon sonucunda oluşan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde elde edilen bant sayıları 100-130 arasındadır. En çok bant sayısı T5 ve T7 primerlerinde görülmüştür.

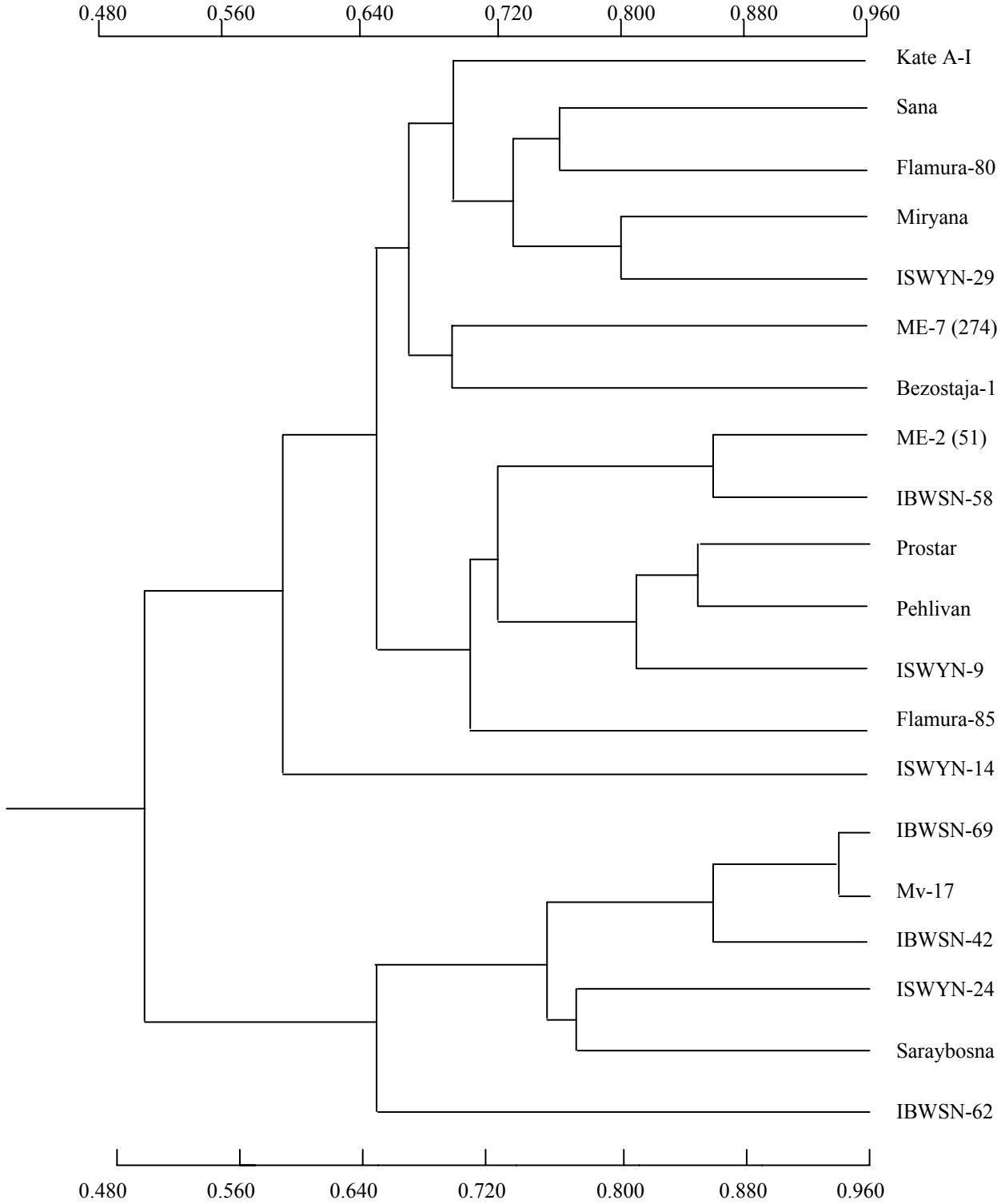
Primerlerin amplifikasyon ürünleri incelendiğinde; T3 primeri ile elde edilen 100 bantın 77 tanesi homomorfik, 23 tanesi de polimorfik; T4 primeri kullanıldığında elde edilen toplam 119 banttan 90'ı homomorfik, 29 tanesi ise polimorfik; T5 primeri kullanılarak gözlenen 130 bantın 70 tanesi homomorfik ve diğer 60'ı da polimorfik; T7 primeri kullanıldığında elde edilen 129 bantın 80'i homomorfik 49'u da polimorfik ve A17 primeri kullanıldığında gözlenen 105 bantın 60 tanesi

homomorfik ve kalan diğer 45'i de polimorfik bant olarak belirlenmiştir.

Benzerlik indeksi (B.İ.) formülüne göre denemeye alınan genotiplerin ortalama benzerlik oranları Çizelge 7'de verilmiştir. Bu oranlar yönünden IBWSN-69 ile Mv-17 arasındaki genetik benzerlik düzeyi 0.946 ile en yüksek olarak hesaplanmıştır. En düşük oranı (0.365) ise Mv-17-ME-2(51)'den elde edilmiştir. Ayrıca, toplam 190 kombinasyonun 9'unda 0.300-0.400 arası, 35'ünde 0.400-0.500 arası, 47'sinde 0.500-0.600 arası, 53'ünde 0.600-0.700 arası, 37'sinde 0.700-0.800 arası ve 8'inde de 0.800-0.900 arası ve 1'inde 0.900-1.000 arasında benzerlik oranları belirlenmiştir.

Çizelge 7. Genotiplere ait 5 primerden hesaplanan ortalama benzerlik indeksleri

Genotipler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Kate A-I	-																		
IBWSN-69	0.602	-																	
MV-17	0.645	0.946	-																
IBWSN-42	0.597	0.857	0.861	-															
ME-7 (274)	0.550	0.478	0.450	0.424	-														
ME-2 (51)	0.603	0.385	0.365	0.385	0.713	-													
ISWYN-24	0.746	0.788	0.792	0.745	0.573	0.467	-												
ISWYN-14	0.569	0.485	0.536	0.442	0.582	0.477	0.616	-											
Saraybosna	0.643	0.734	0.788	0.799	0.450	0.398	0.752	0.554	-										
Bezostaya	0.680	0.383	0.477	0.383	0.698	0.652	0.544	0.603	0.465	-									
Prostar	0.558	0.477	0.446	0.377	0.753	0.773	0.567	0.550	0.435	0.684	-								
IBWSN-62	0.570	0.714	0.673	0.614	0.507	0.480	0.691	0.458	0.616	0.423	0.527	-							
Miryana	0.714	0.529	0.540	0.487	0.700	0.720	0.668	0.672	0.560	0.739	0.740	0.508	-						
Sana	0.693	0.433	0.444	0.576	0.671	0.770	0.557	0.530	0.474	0.675	0.707	0.480	0.719	-					
Pehlivan	0.557	0.488	0.457	0.388	0.614	0.621	0.551	0.589	0.424	0.570	0.848	0.511	0.629	0.554	-				
IBWSN-58	0.606	0.453	0.403	0.372	0.693	0.860	0.514	0.476	0.402	0.632	0.833	0.520	0.699	0.713	0.681	-			
Flamura-80	0.670	0.486	0.489	0.486	0.617	0.667	0.595	0.546	0.407	0.628	0.641	0.557	0.737	0.767	0.593	0.693	-		
ISWYN-9	0.653	0.545	0.507	0.445	0.661	0.710	0.637	0.568	0.466	0.642	0.820	0.643	0.701	0.707	0.809	0.770	0.693	-	
ISWYN-29	0.723	0.586	0.590	0.543	0.719	0.686	0.725	0.622	0.547	0.730	0.717	0.596	0.810	0.776	0.641	0.665	0.748	0.767	-
Flamura-85	0.574	0.475	0.525	0.472	0.659	0.665	0.640	0.547	0.515	0.557	0.681	0.600	0.619	0.613	0.683	0.762	0.677	0.759	0.629



Şekil 1. Genotiplere ait genetik ilişki dendrogramı

Yirmi ekmeklik buğday genotipinin kullanılmasıyla elde edilen polimorfik bantlardan hesaplanan benzerlik oranları kullanılarak oluşturulan dendrograma göre genotipler başlıca iki gruba ayrılmışlardır (Şekil 1). IBWSN-69, Mv-17, IBWSN-42, ISWYN-

24, Saraybosna ve IBWSN-62 bir grubu; kalan 14 genotip (Kate A-I, Sana, Flamura-80, Miryana, ISWYN-29, ME-7 (274), Bezostaja-1, ME-2 (51), IBWSN-58, Prostar, Pehlivan, ISWYN-9, Flamura-85 ve ISWYN-14) ise diğer grubu oluşturmuşlardır.

Dendogramda oluşan iki ana grup ta kendi aralarında 2 alt gruba ayrılmıştır. Birinci grupta ISWYN-14 ayrı bir alt grubu oluştururken diğer 13 genotipin meydana getirdiği diğer alt grup içerisinde genotiplerin daha küçük alt gruplara ayrılabilirdiği Şekil 1'den görülmektedir. İkinci ana grupta IBWSN-62 ayrı bir alt grupta bulunurken, diğer 5 genotip ayrı bir alt grupta yer almışlardır. Bu iki ana grup arasındaki benzerlik oranı yaklaşık 0.660 olmuştur.

Dendogramdan, Sana ile Flamura-80, Miryana ile ISWYN-29, ME-2(51) ile IBWSN-58, Prostar ile Pehlivan, IBWSN-69 ile Mv-17 ve ISWYN-24 ile Saraybosna genotiplerinin birbirlerine yakın akraba olduğu görülmektedir. Genetik olarak birbirine en yakın akraba genotipler IBWSN-69 ile Mv-17 olurken en uzak akraba genotipler Kate A-I ile IBWSN-62 olmuştur.

Elde edilen benzerlik oranları bitkisel özellikler açısından dikkate alındığında, genotiplerin morfolojik ve ekolojik orijinleri ile bağlantılı olabileceği gibi, bunlardan bağımsız olarak ta ortaya çıkmaktadır. Yapılan bu çalışma ile, başka bitkilerde olduğu gibi (He ve ark. (1992), buğdayda; McDonald ve ark. (1994), mısır, soya fasulyesi ve çayır üçgölünde; Abebe ve ark. (1997), sorgumda; Cao ve Oard (1997), çeltikte; Ordon ve ark. (1997), arpada; Roberto ve Kelly (1997), fasulyede) ekmeklik buğdaylarda da Halden ve ark. (1994)'nın açıldığı gibi birbirine yakın

akraba genotiplerin tanımlanmasında RAPD yöntemi başarılı ve etkili bir yöntem olarak bulunmuştur.

Sonuç

Araştırmada incelenen 20 ekmeklik buğday genotipine RAPD tekniği uygulanarak elde edilen DNA parmak izi bantları genotiplerde mevcut olan varyasyon ve genetik farklılığı ortaya koymaktadır.

RAPD tekniğinin çok az bitki örneği ile yapılabilmesi, bütün işlemlerin yaklaşık 6-8 saat sürmesi ve moleküler tanımlamalarda yöntemin hızlı, güvenilir ve etkili olması araştırmalarda bu yöntemin yaygın olarak kullanılabilirdiğini göstermiştir. Ancak, genetik polimorfizmin ve DNA parmak izlerinin saptanması amacıyla farklı uzunlukta ve çok sayıda primer ile çalışılması araştırmadaki başarıyı artıracaktır.

Teşekkür

Bu yayın, sayın Oğuz BİLGİN'in Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda doktora tezinin bir kısmını kapsamaktadır. Bu araştırma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜAF-265) tarafından desteklenmiştir. Araştırmada kullanılan genetik materyalin sağlanmasında yardımlarından dolayı CIMMYT ve Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ve ayrıca teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abebe, M., Goldsbrough P. and E. Gebisa, 1997. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. *Crop Sci.* 37: 564-569.
- Cao, D. and J.H., Oard, 1997. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. *Crop Sci.* 37: 1630-1635.
- Halden, C., Nilson, N.O., Rading, M.I. and T., Sall, 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 123-128.
- Halward, T., Stalker, T., Larue, E. and G., Kochert, 1992. Use of single-primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol. Bio.*, 18: 315-325.
- He, S., Ohm, H. and S., Mackenzie, 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 84: 573-578.
- McCouch, S.R., Kochert, G., Yu, Z.H., Wang, Z.Y., Khush, G.S., Coffman, W.R. and S.D., Tanksley, 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 815-829.
- McDonald, M.B., Elliot, L.J. and P.M., Sweeney, 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. *Seed Sci. and Techn.*, 22: 171-176.
- Ordon, F., Schiemann, A. and W., Friedt, 1997. Assessment of the genetic relatedness of barley accessions (*Hordeum vulgare* L.) resistant to soil-born mosaic-inducing viruses (BaMMV,

- BaYMV, BaYMV-2) using RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 325-330.
- Roberto, A.Y. and D., Kelly, 1997. Markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. *Crop Sci.*, 37: 940-946.
- Rohlf, F.J., 1990. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.8. *Appl. Biostatistics*, New York.
- Sokal, R.R. and P.N.A., Sneath, 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.