

CHỌN LỌC DẤU PHÂN TỬ RAPD VÀ SSR NHẬN DIỆN ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA SÁU GIỐNG LÚA THƠM Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Phạm Quang Nghĩa¹, Lâm Thùy Giang¹, Đỗ Tấn Khang¹ và Trần Nhân Dũng¹

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/01/2015

Ngày chấp nhận: 28/10/2015

Title:

Diversity of RAPD and SSR markers of six fragrant rice varieties in Mekong Delta

Từ khóa:

Dấu phân tử, đa hình, khuếch đại, lúa thơm, lúa xuất khẩu

Keywords:

Amplify, fragrant rice, export rice, molecular marker, polymorphism

ABSTRACT

Mười lăm môi RAPD và bốn môi SSR được khảo sát trên sáu giống lúa thơm xuất khẩu gồm Jasmine, Tài Nguyên, Nàng Thơm, Hương Biển, Hương Việt, Hương lái sữa. Kết quả ghi nhận 13 môi cho kết quả đa hình, một môi (Sn06) cho kết quả đơn hình và một môi (OPW19) không khuếch đại được trong phản ứng PCR. Tổng số băng lặp lại ghi nhận được là 73 với 64 băng đa hình (57,67%). Số băng đa hình dao động từ 2 đến 11 và số băng trung bình trên mỗi môi là 5,21. Trong 13 môi đa hình, sáu môi cho kết quả tốt nhất về số lượng băng khuếch đại cũng như mức độ đa hình (trên 70%). Kết quả PCR với bốn môi EAP, ESP, INSP và IFAP trên 6 mẫu lúa một lần nữa giúp khẳng định khả năng phân biệt các mẫu lúa của các môi RAPD. Kết quả này cho thấy khả năng ứng dụng của các dấu phân tử RAPD và SSR trong việc phân tích các loci kiểm soát tính trạng mùi thơm của các giống lúa.

TÓM TẮT

Six exported rice cultivars were studied employing 15 RAPD primers, in which 13 revealed polymorphism, 1 (Sn06) was monomorphic and the rest (OPW19) failed to show reaction. Of 73 reproducible bands amplified, 64 (57.67%) were polymorphic, ranging from 2 to 11 fragments with an average of 5.21 bands per primer. Six out of 13 primers amplified a high number of reproducible bands as well as exhibited over 70% of polymorphic level. PCR results with 4 specific primers EAP, ESP, INSP, IFAP using templates obtained from the 6 rice varieties helped to confirm the ability of RAPD primers to differentiate between the rice varieties. The results showed the applicability of the RAPD and SSR markers in the locus analysis related to the fragrant characteristics of the rice varieties.

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm trở lại đây, Việt Nam vẫn là nước đứng thứ hai về xuất khẩu gạo sau Thái Lan. Tuy nhiên, trong 6 tháng đầu năm 2013, hoạt động xuất khẩu nông sản của Việt Nam có chiều hướng sụt giảm. Trước khi xuất khẩu, để phát hiện gạo trộn, có thể đánh giá sự sai khác về hình dạng bên ngoài và độ trong của hạt gạo bằng máy kiểm tra độ đồng nhất. Tuy nhiên, khó có thể phát hiện được

gạo trộn do hình dạng các hạt gạo khá giống nhau. Các phương pháp đánh giá cảm quan mặc dù cho kết quả nhanh chóng nhưng lại chưa thực sự chính xác. Điều này đặt ra vấn đề cần có một quy trình kiểm nghiệm gạo mới đủ tin cậy, hiệu quả cao, phù hợp khoa học và điều kiện kinh tế.

Ngày nay, các kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng trên cây lúa đã trở nên phổ biến và ngày càng phát triển, đặc biệt trong lĩnh vực ứng dụng các chỉ

thị phân tử (molecular marker) trong nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống lúa. Trong hệ thống chỉ thị phân tử hiện hành, kỹ thuật RAPD (William *et al.*, 1990) là kỹ thuật đơn giản, cho kết quả khá tin cậy và có lợi về mặt kinh tế hơn cả. Nhiều nghiên cứu áp dụng kỹ thuật RAPD trên lúa đã được tiến hành rộng rãi với các mục đích khác nhau bao gồm phân tích đa dạng di truyền (Kiani, 2011), phát hiện các giống lúa lai (Hashemi *et al.*, 2009) và phân biệt các loại lúa thơm khác nhau ở Ấn Độ (Choudhury *et al.*, 2011). Tại Việt Nam, việc sử dụng các dấu RAPD để phân biệt các giống lúa vẫn chưa được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, từ thành công của các nghiên cứu quốc tế, tiềm năng ứng dụng kỹ thuật RAPD trong việc phân biệt các giống lúa xuất khẩu là rất lớn. Do đó, đề tài được thực hiện nhằm mục tiêu chọn lọc các dấu phân tử RAPD hiệu quả trong việc phát hiện đa dạng di truyền của các mẫu lúa thơm xuất khẩu.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

2.1.1 Vật liệu

Các giống lúa được khảo sát bao gồm: Jasmine, Tài Nguyên, Nàng Thơm, Hương Biên, Hương Việt, Hương lái sữa được cung cấp từ ngân hàng gen lúa của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học.

2.1.2 Địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

Chuẩn bị mẫu để ly trích DNA: lát giấy thấm vào đĩa petri, thêm vào ít nước vừa đủ ướt giấy thấm, rải đều khoảng 50 hạt lúa vào đĩa và đập nắp lại, ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 5-7 ngày, thu mẫu lá ly trích DNA.

Ly trích DNA: theo quy trình CTAB (Rogers and Bendich, 1988) có hiệu chỉnh và được tóm tắt như sau: Khoảng 1g lá được nghiền với nitor lỏng bằng cối và chày, chuyển phần bột vào tuýp 2,2 ml, thêm 1 ml dung dịch trích và 50 µL SDS 10%. Mẫu được ủ ở 65°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, chuyển 700 µL phần trên vào tuýp mới, thêm một lượng tương đương isopropanol, giữ mẫu ở -20°C trong 10 - 30 phút. Mẫu được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ phần dung dịch, hòa tan DNA trong 400 µL TE. Thêm 400 µL CTAB và ủ ở 65°C trong

15 phút, thêm 800 µL chloroform/isoamylalcohol và đảo đều, ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút. Chuyển phần dung dịch trong qua tuýp mới (tuýp 2,2 mL), sau đó thêm 1,4 mL ethanol 96% và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Ly tâm mẫu 13000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó đổ bỏ phần trong và rửa phần lắng với 400 µL ethanol 70%, làm khô DNA và trữ DNA trong 200 µL TE 0.1X.

Phản ứng PCR: phản ứng PCR được thực hiện với các môi RAPD gồm các thành phần sau: PCR Buffer (NH₄⁺)₂SO₄ 10X, dNTPS 200 µM, môi RAPD 500 µM, Taq polymerase 5U/µL, DNA 50-60 ng. Chu kỳ nhiệt như Bảng 1.

Bảng 1: Chu trình nhiệt của phản ứng RAPD (William *et al.*, 1990)

Các bước của phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Giai đoạn khởi động	94°C	5 phút
Chu kỳ (45 chu kỳ)		
Biến tính	94°C	15 giây
Gắn môi	32°C - 39°C	15 giây
Kéo dài	72°C	1 phút
Giai đoạn kết thúc	72°C	10 phút
Trữ mẫu	4°C	∞

Mười cặp môi RAPD được sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Trình tự 15 môi RAPD (William *et al.*, 1990)

Môi	Trình tự 5' - 3'	Nhiệt độ bắt cặp (T _m) (°C)
A13	CAGCACCCAC	37,7
OPH13	GACGCCACAC	38,7
OPH18	GAATCGGCCA	35,2
OPK14	CCCGCTACAC	36,9
OPK20	GTGTCGCGAG	38,5
OPS05	TTTGGGGCCT	37,0
OPS07	TCCGATGCTG	32,0
OPT05	GGGTTTGGCA	35,8
OPT14	AATGCCGCAG	32,0
OPW19	CAAAGCGCTC	32,0
Sn06	GAGACGCACA	35,3
Sn06a	GAGACGCACAA	37,5
Sn06g	GAGACGCACAG	39,1
Sn06t	GAGACGCACAT	37,1
SO15	TGGCGTCCTT	37,5

Phản ứng PCR được thực hiện với các môi SSR (EAP, ESP, IFAP, INSP) gồm các thành phần sau: PCR Buffer (NH₄⁺)₂SO₄ 5X, MgCl₂ 25 mM, dNTPS 200 µM, môi SSR 0,24 µM mỗi loại, Taq polymerase 5U/µL, DNA 50-60 ng. Chu kỳ nhiệt như Bảng 3.

Bảng 3: Chu trình nhiệt của phản ứng SSR (Bradbury, 2005)

Các bước của phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Giai đoạn khởi động	95°C	3 phút
Chạy chu kỳ (35 chu kỳ)		
Biến tính	95°C	30 giây
Gắn mồi	58°C	30 giây
Kéo dài	72°C	30 giây
Giai đoạn kết thúc	72°C	5 phút
Trữ mẫu	10°C	∞

Bốn mồi SSR được sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4: Trình tự của 4 mồi EAP, ESP, IFAP, INSP

Mồi	Trình tự 5' – 3'
EAP	AGTGCTTTACAAGTCCCGC
ESP	TTGTTGGAGCTTGCTGATG
IFAP	CAATGGAGCAGCTGAAATATATACC
INSP	CTGGTAAAAAGATTATGGCTCA

Điện di đọc kết quả: Sản phẩm PCR được điện di với gel agarose 3% với hiệu điện thế 50V trong 75 phút. Thang chuẩn 100 bp (Gene Ruler) được sử dụng để ước lượng kích thước băng của sản phẩm. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel (BioRad) và hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Quantity One 4.6.

Xử lý số liệu: Các băng thu được từ kết quả điện di RAPD được mã hóa thành dạng nhị phân 1 (đối với trường hợp băng xuất hiện) và 0 (đối với trường hợp băng không xuất hiện) bằng phần mềm PyElph1.4 (Pavel and Vasile, 2012). Hệ số tương đồng Jaccard (Raimundo and Juan, 1996) được xác định từ ma trận dữ liệu dạng nhị phân. Bảng mã hóa được lưu dưới dạng file Excel (.xls) và chuyển sang phần mềm NTSYS v.2.1 (Rohlf, 2000) để xử lý. Sơ đồ phân nhóm (dendrogram) và ma trận tương đồng được xây dựng bởi phương pháp phân tích similarity và SAHN- UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) (Sokal and Michener, 1958).

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Thí nghiệm thử nghiệm 15 mồi RAPD trên 6 mẫu lúa xuất khẩu được lặp lại 2 lần nhằm kiểm tra khả năng lặp lại của mồi RAPD (chỉ có các băng xuất hiện ở cả 2 lần điện di được ghi nhận). Trong 15 mồi sử dụng, mồi OPW19 không cho sản phẩm khuếch đại ở cả 2 lần lặp lại nên không được đưa vào phân tích kết quả. Sản phẩm khuếch đại tạo ra từ 14 mồi RAPD còn lại được quan sát trên gel

agarose 2%. Kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả khuếch đại 14 mồi RAPD ở 6 mẫu lúa xuất khẩu

Mồi (*)	Tổng số	Số băng	Số băng	Phần trăm
	băng lặp lại	băng đa hình	đơn hình	băng đa hình (%)
A13	8	7	1	87,5
OPH13	12	11	1	91,7
OPH18	8	6	2	75
OPK14	2	2	0	100
OPK20	6	5	1	83,3
OSP05	2	2	0	100
OSP07	2	2	0	100
OPT05	3	3	0	100
OPT14	2	2	0	100
Sn06	1	0	1	0
Sn06a	8	7	1	87,5
Sn06g	4	4	0	100
Sn06t	7	5	2	71,4
SO15	5	5	0	100
Tổng	73	64	9	87,67
Trung bình	5,21	4,57	0,64	87,72

(*): mồi OPW19 không được phân tích

Trong 14 mồi được phân tích, 13 mồi cho kết quả đa hình (mồi Sn06 không đa hình). Tổng cộng ghi nhận được 73 băng lặp lại (reproducible band), trong đó có 64 băng đa hình (87,67%) và 9 băng đơn hình (12,33%). Trong số các mồi đa hình, số lượng băng đa hình cao nhất và thấp nhất lần lượt là 11 (khuếch đại bởi mồi OPH13) và 2 băng (khuếch đại bởi các mồi OPK14, OPS05, OPS07, OPT14). Trong thí nghiệm này, số băng trung bình trên mỗi mồi và trên mỗi mẫu lúa lần lượt là 5,21 và 12,2. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Mansour và Solliman (2012) trên sáu giống lúa kháng hạn với trung bình 5,2 băng mỗi mồi.

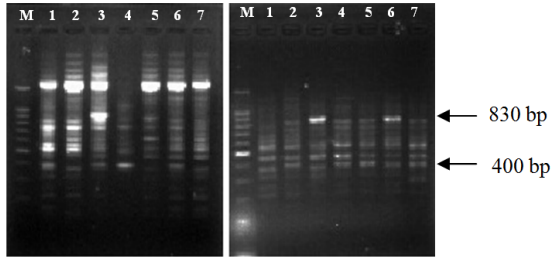
3.1 Mồi OPK14, OPS05, OPS07, OPT05, OPT14, Sn06

Hầu hết các mồi này đều không khuếch đại được DNA của mẫu Nàng Thơm (trừ mồi OPT05 và Sn06). Sự khác biệt này có thể giúp dự đoán sự khác biệt về di truyền của mẫu Nàng Thơm với các mẫu còn lại. Số lượng băng lặp lại ở các mồi này chỉ từ một đến ba băng và hầu hết các băng ghi nhận đều là các băng đa hình.

3.2 Mồi A13

Với mồi A13, số mẫu cho sản phẩm khuếch đại là 100%. Mẫu Jasmine và Hương lái sữa có cùng

số lượng cũng như vị trí của các băng (không có băng ở vị trí 380bp). Trong 6 mẫu được khảo sát, mẫu Nàng Thơm có số băng khuếch đại ít nhất. Mẫu Tài Nguyên và Hương lái sữa chủ yếu có các băng giống nhau, chỉ khác nhau ở 2 băng với kích thước khoảng 400bp và 380bp. Trong 8 băng mỗi A13 khuếch đại, băng 210bp khá mờ ở cả 2 lần lặp lại và băng 580bp là băng đơn hình.

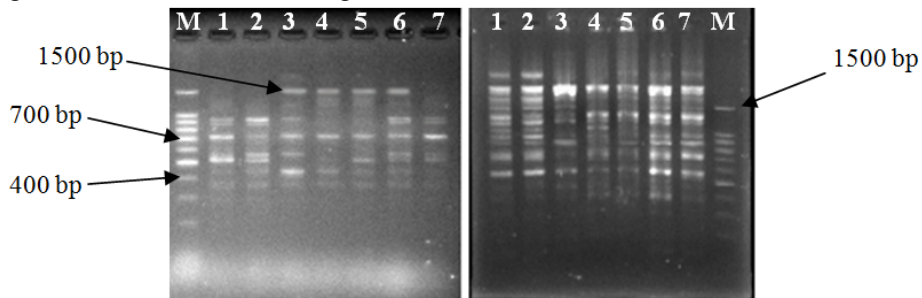


Hình 1: Phổ điện di (2 lần lặp lại) các mẫu lúa với môi A13

M: thang chuẩn 100bp; lane 1: Đối chứng dương; lane 2: Jasmine; lane 3: Tài Nguyên; lane 4: Nàng Thơm; lane 5: Hương lái sữa; lane 6: Hương biển; lane 7: Hương Việt

3.2.1 Môi OPH13

Môi OPH13 cho sản phẩm khuếch đại ở tất cả các mẫu với 12 băng lặp lại được ghi nhận (băng 280bp là băng đơn hình). Đây cũng là môi có số lượng băng lặp lại cao nhất trong 14 môi khảo sát. Với môi này, mẫu Nàng Thơm (có hai băng) vẫn khác biệt trong sáu mẫu nghiên cứu. Các mẫu còn lại đa phần có nhiều điểm chung về số lượng cũng như vị trí băng (chỉ khác nhau từ một đến bốn băng). Trong đó có thể kể đến mẫu Hương lái sữa



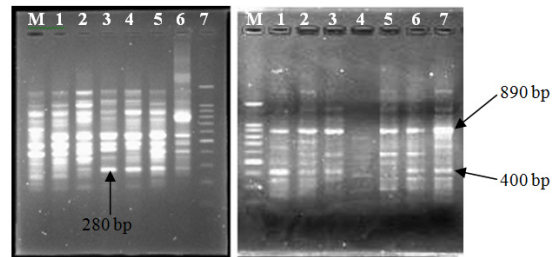
Hình 3: Phổ điện di (2 lần lặp lại) các mẫu lúa với môi OPH18

M: thang chuẩn 100bp; lane 1: Đối chứng dương; lane 2: Jasmine; lane 3: Tài Nguyên; lane 4: Nàng Thơm; lane 5: Hương lái sữa; lane 6: Hương biển; lane 7: Hương Việt

3.2.3 Môi OPK20

Kết quả điện di cho thấy môi OPK20 khuếch đại được tất cả các mẫu với 1 băng đơn hình có kích thước khoảng 690bp. Trong đó, có thể

và Thơm biển (khác nhau ở vị trí 400bp), mẫu Jasmine và Thơm biển (khác nhau ở hai băng có kích thước 1200bp và 750bp). Các mẫu này có thể có quan hệ di truyền gần nhau và khác với mẫu Nàng Thơm.



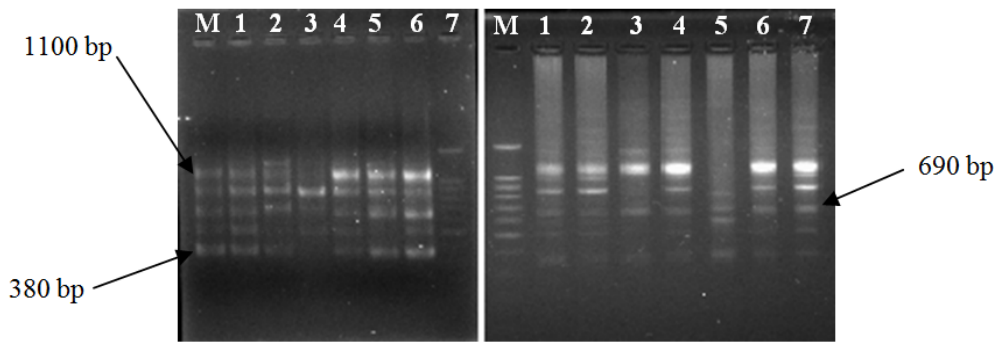
Hình 2: Phổ điện di (2 lần lặp lại) các mẫu lúa với môi OPH13

M: thang chuẩn 100bp; lane 1: Đối chứng dương; lane 2: Jasmine; lane 3: Tài Nguyên; lane 4: Nàng Thơm; lane 5: Hương lái sữa; lane 6: Hương biển; lane 7: Hương Việt

3.2.2 Môi OPH18

Môi OPH18 khuếch đại được 100% số sản phẩm với 1 băng duy nhất được ghi nhận ở vị trí 300bp ở mẫu Thơm biển. Trừ mẫu Thơm biển, các mẫu còn lại đều có khoảng từ 4 đến 5 băng. Mẫu Jasmine và Hương lái sữa khi được khuếch đại bằng môi OPH18 cũng thể hiện phần lớn sự giống nhau về số lượng và vị trí băng (khác nhau ở băng khoảng 1300bp và 890bp). Có 2 băng đơn hình được ghi nhận với môi này ở vị trí với kích thước khoảng 700bp và 380bp.

thấy rõ mối quan hệ di truyền gần giữa 2 mẫu Thơm biển và Hương Việt do 2 mẫu này chỉ khác nhau ở băng với kích thước 500bp. Mẫu Jasmine và Nàng Thơm khác nhau ở vị trí 1300bp và 380bp.



Hình 4: Phổ điện di (2 lần lặp lại) các mẫu lúa với môi OPK20

M: thang chuẩn 100bp; lane 1: Đối chứng dương; lane 2: Jasmine; lane 3: Tài Nguyên; lane 4: Nàng Thom; lane 5: Hương lái sữa; lane 6: Hương biển; lane 7: Hương Việt

3.3 Môi Sn06a

Tất cả các mẫu đều được khuếch đại bởi môi Sn06a với 1 băng đơn hình được ghi nhận ở vị trí 300bp. Dựa trên RAPD profile thiết lập với môi này, có thể thấy phần lớn các mẫu có quan hệ di truyền gần với nhau. Mẫu Hương lái sữa chỉ có sự khác biệt với mẫu Jasmine ở băng 680bp và với mẫu Nàng Thom ở 2 băng 380bp và 270bp. Mẫu Thom biển và Hương Việt cũng khác nhau ở hai băng 550bp và 200bp.

3.3.1 Môi Sn06g

Số lượng băng lặp lại ghi nhận với môi Sn06g tương đối ít (4 băng). Tuy nhiên, kết quả điện di với môi này cho thấy sự giống nhau ở 2 mẫu Thom biển và Hương Việt (đều cùng có 3 băng với kích thước 900bp, 720bp và 500bp).

3.3.2 Môi Sn06t

Kết quả phân tích với môi Sn06t cho thấy 2 mẫu Jasmine và Thom biển gần giống nhau về

quan hệ di truyền. Đồng thời, 2 mẫu này cũng có nhiều băng chung với 2 mẫu Hương lái sữa và Hương Việt. Có 2 băng đơn hình được ghi nhận với kích thước 390bp và 190bp.

3.3.3 Môi SO15

Cũng như môi Sn06g, số lượng băng lặp lại khuếch đại bởi môi SO15 khá ít (5 băng). Mẫu Tài Nguyên và Thom biển khác nhau ở băng 910bp. Đồng thời, mẫu Thom biển và Hương lái sữa có số lượng và vị trí các băng gần giống nhau. Như vậy, 3 mẫu này có thể có tương quan di truyền gần với nhau. Mẫu Nàng Thom khuếch đại bởi môi SO15 chỉ có 1 băng lặp lại được ghi nhận. Có thể thấy cùng với các kết quả phân tích các môi khác, mẫu Nàng Thom có thể có sự khác biệt di truyền lớn với các mẫu còn lại.

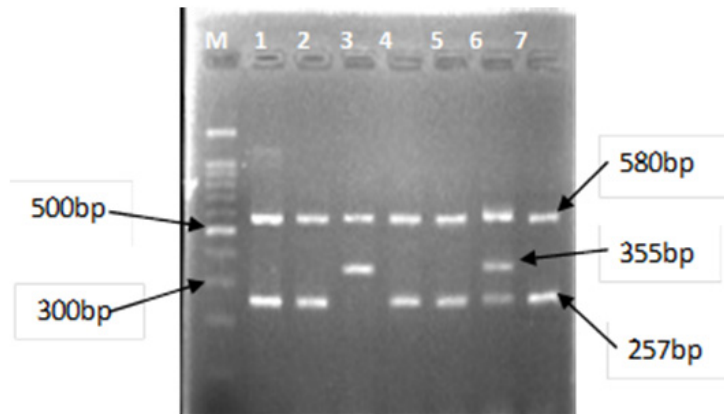
Nhìn chung, trong 14 môi được phân tích, A13 OPH13 OPH18 OPK20 Sn06a Sn06t là các môi đa hình khuếch đại được số lượng lớn băng lặp lại và thể hiện sự khác biệt tương đối rõ nét ở các mẫu.

Bảng 6: Tương quan di truyền giữa 6 mẫu gạo xuất khẩu

	Jasmine	Tài nguyên	Nàng thơm	Hương lái	Thom biển	Hương Việt
Jasmine	100%	*	*	*	*	*
Tài nguyên	55.7%	100%	*	*	*	*
Nàng thơm	55.7%	42.9%	100%	*	*	*
Hương lái	71.4%	64.3%	52.9%	100%	*	*
Thom biển	68.6%	67.1%	47.1%	68.6%	100%	*
Hương Việt	34.3%	62.9%	51.4%	55.7%	70%	100%

Dựa trên hệ số tương đồng Jaccard khi phân tích RAPD profile, có thể thấy 2 mẫu Jasmine và Hương lái có mức độ tương đồng di truyền lớn nhất (71,4%). Đồng thời, khoảng cách di truyền

giữa Tài nguyên và Nàng thơm là lớn nhất (42,9%). Phần lớn các mẫu khi được so sánh từng cặp có mức độ tương quan di truyền nằm trong khoảng 51,4% – 68,6%.



Hình 5: Phổ điện di các mẫu lúa với 4 môi EAP, ESP, INSP, IFAP

M: thang chuẩn 100bp; lane 1: Đối chứng dương; lane 2: Jasmine; lane 3: Tài Nguyên; lane 4: Nàng Thom; lane 5: Hương lài sữa; lane 6: Hương biển; lane 7: Hương Việt

Ứng dụng kết quả nghiên cứu của Bradbury *et al.* (2005) kiểm tra gene qui định mùi thơm BAD2 trên 6 mẫu lúa bằng 4 môi EAP, ESP, INSP, IFAP. Trong đó, cặp môi IFAP và ESP khuếch đại vùng gene thơm với kích thước khoảng 257bp, cặp môi INSP và EAP khuếch đại vùng gene không thơm với kích thước khoảng 355bp, cặp môi ESP và EAP khuếch đại một đoạn khoảng 580bp đóng vai trò nhân tố dương tính ở cả kiểu gene thơm (577bp) và kiểu gene không thơm (585bp). Như vậy, dấu BAD2 phát hiện gene *fgt* ở dạng đồng hợp với 2 vạch băng 580bp + 257bp, dị hợp với 3 vạch băng 580bp + 355bp + 257bp và không có gene *fgt* với 2 vạch băng 355bp + 580bp.

4 KẾT LUẬN

Trong tổng số mười lăm dấu phân tử RAPD được khảo sát, mười ba dấu RAPD (A13, OPH13, OPH18, OPK14, OPK20, OSP05, OSP07, OPT05, OPT14, Sn06a, Sn06g, Sn06t, SO15) cho thấy có thể sử dụng để tìm sự khác biệt di truyền giữa các giống lúa. Kết quả phân tích với các dấu phân tử cho thấy bốn giống lúa (Jasmine, Nàng Thom, Hương lài sữa và Hương Việt) là các giống lúa thơm. Kết quả này cho thấy khả năng ứng dụng của các dấu phân tử RAPD và SSR trong việc phân tích các loci quy định tính trạng mùi thơm của lúa nhằm phục vụ cho công tác lai tạo mang tính công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bradbury LMT, Henry RJ, Jin QS, Reinke RF, Waters DLE, 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol. Breed.* 16: 279– 283.

Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 363-370.

Choudhury, P.R., S. Kohli, K. Srinivasan, T. Mohapatra and R.P. Sharma. 2001. Identification and classification of aromatic rice based on DNA fingerprinting. *Euphytica*, 118:243-251.

Hashemi, S.H., S.A.M. Mirmohammadi-Maibody, G.A. Nematzadeh and A. Arzani. 2009. Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 10:2094-2101.

Kiani, G. 2011. Genetic diversity analysis of Iranian improved rice cultivars through RAPD markers. *Notulae Scientiae Biologicae*, 3:135-139.

Mansour, A. and S.S. Solliman. 2010. Molecular marker for new promising drought tolerance lines of rice under drought stress via RAPD-PCR and ISSR markers. *Journal of American Science*. 6:355-363.

Pavel, A.B. and Vasile, C.I., 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*. v13. 9 GelAnalyzer, BMC Bioinformatics. 2012.

Raimundo Real, Juan M. Vargas, 1996. The Probabilistic Basis of Jaccard's Index of Similarity. *Systematic Biology*, Vol. 45, No. 3. (1996), pp. 380-385.

Rogers, S.O. and Bendich, A.J. Extraction of dna from plant tissues. (Ed.) Plant molecular biology manual. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988.6, p.1-10

Rohlf F. J.2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.

Sokal R and Michener C ,1958. "A statistical method for evaluating systematic relationships". University of Kansas Science Bulletin 38: 1409–1438.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingy. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acid Res*, 18:6531-6535.