

## OPTIMALISASI EKSTRAKSI DNA DAN PCR-RAPD PADA *Grevillea* spp. (PROTEACEAE)

### OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION AND PCR-RAPD CONDITION OF *Grevillea* spp. (PROTEACEAE)

**MADE PHARMAWATI**

*Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran Bali.*

*Email: pharmawati@hotmail.com*

#### INTISARI

Analisis genetika molekuler tumbuhan tergantung pada jumlah dan kemurnian sampel DNA serta kondisi optimum reaksi. Oleh karena itu diperlukan metode yang tepat dalam ekstraksi DNA dan reaksi molekuler seperti PCR. Penelitian ini bertujuan menentukan metode untuk mendapatkan DNA dengan berat molekul tinggi dari daun *Grevillea* serta menentukan kondisi optimum untuk reaksi PCR-RAPD. Modifikasi metode ekstraksi DNA standar dari Doyle dan Doyle dengan peningkatan konsentrasi EDTA (50 mM), penambahan 2% (v/v) 2-mercaptoethanol, serta inkubasi selama 14-16 jam pada suhu 55°C menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dan konsisten. Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR-RAPD yang efisien dan konsisten dapat diperoleh dengan kondisi komponen reaksi yang ideal. Pada *Grevillea*, pola-pola PCR-RAPD yang jelas dan konsisten diperoleh dengan menggunakan 10ng DNA cetakan, 5 pmol primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> serta jumlah siklus termal 40 x.

*Kata kunci : ekstraksi DNA, Grevillea, PCR-RAPD*

#### ABSTRACT

Molecular genetic analysis of plants relies on high yield and high purity of DNA as well as optimized condition of molecular reactions. Appropriate methods for DNA extraction and molecular reactions such as PCR are therefore needed. This study aimed to develop protocol for extraction of high molecular weight DNA from *Grevillea* leaf and to optimize condition of PCR-RAPD. Standard plant DNA extraction of Doyle and Doyle was modified by increasing EDTA concentration to 50 mM and addition of 2% (v/v) 2-mercaptoethanol. Moreover, incubation time was prolonged to 14-16 h at 55°C. This method yielded good quality of DNA and consistent results. Amplification of DNA using PCR-RAPD will become efficient and consistent if the amplification reactions are in ideal condition. In *Grevillea*, clear, reproducible and scorable PCR-RAPD patterns were obtained using 10ng DNA template, 5 pmol primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and the number of thermal cycle was 40 x.

*Keywords: DNA extraction, Grevillea, PCR-RAPD*

#### PENDAHULUAN

Ekstraksi DNA merupakan prosedur rutin dalam analisis molekuler. Masalah-masalah dalam ekstraksi DNA masih merupakan hal penting yang perlu diatasi. Jumlah dan kualitas DNA hasil ekstraksi bervariasi tergantung dari spesies tanaman sehingga mempengaruhi analisis lebih lanjut seperti hibridisasi DNA, pemotongan DNA dengan enzim restriksi maupun analisis dengan *polymerase chain reaction* (PCR).

*Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun antarspesies (Qian *et al.*, 2001, Adam *et al.*, 2002, Jena dan Das, 2006). Teknik ini mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki

rangkaian nukleotida acak. Pada reaksi PCR-RAPD ini, sebuah primer menempel pada DNA genomik pada dua tempat berbeda dari DNA komplementer. Jika tempat penempelan primer ini berada pada daerah yang dapat diamplifikasi, maka hasil DNA tertentu dapat dihasilkan melalui amplifikasi siklus termal. Umumnya masing-masing primer menyebabkan amplifikasi beberapa lokus (Welsh dan McClelland, 1990, Williams *et al.*, 1990).

Marka RAPD bersifat lebih sederhana dibandingkan marka lainnya seperti mikrosatelit atau *simple sequence repeat* (SSR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) ataupun *amplified length polymorphism* (AFLP) (Bardakci, 2001). Hal ini dikarenakan teknik RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan DNA genom organisme yang diuji maupun tidak memerlukan probe DNA yang spesifik (Williams *et al.*, 1990). Walaupun metode RAPD relatif cepat, murah dan gampang dilaksanakan

---

*Naskah diterima tanggal 2 Maret 2009 disetujui tanggal 11 Mei 2009*

dibandingkan metode marka DNA lain, konsistensi atau *reproducibility* hasil PCR menjadi perhatian sejak dipublikasikannya teknik ini. Primer RAPD dapat tidak cocok secara sempurna pada urutan penempelan primer, akibatnya amplifikasi pada beberapa siklus mungkin tidak terjadi, sehingga band tetap samar atau bahkan amplifikasi tidak terjadi jika primer tidak berhasil menempel pada DNA cetakan (Lambooy, 1994).

Tidak menempelnya primer pada DNA cetakan secara sempurna, dapat diakibatkan karena tidak tepatnya konsentrasi komponen-komponen PCR-RAPD. Di samping itu, kualitas DNA cetakan juga berpengaruh. Adanya kandungan polifenol dan metabolit sekunder lain seperti tannin, terpen dapat menurunkan kemurniaan DNA dan menghambat menempelnya primer (Padmalatha dan Prasad, 2006).

*Grevillea* merupakan anggota famili Proteaceae dan merupakan genus terbesar dalam famili tersebut (Makinson, 2000). Analisis molekuler genus ini belum banyak dilaporkan sehingga penelitian kearah genetika molekuler perlu dilakukan. Tetapi, komposisi senyawa yang tepat pada daun *Grevillea* belum diketahui, sehingga hasil ekstraksi DNA dapat berpengaruh terhadap hasil PCR. Pada penelitian ini optimalisasi ekstraksi DNA dilakukan dengan memodifikasi metode ekstraksi. Selain itu dilakukan optimalisasi PCR-RAPD dengan melakukan variasi pada konsentrasi komponen reaksi seperti konsentrasi DNA cetakan, primer, MgCl<sub>2</sub> maupun jumlah siklus termal untuk menghasilkan pola-pola PCR-RAPD yang dapat dipercaya untuk analisis keanekaragaman dan hubungan kekerabatan.

Tujuan penelitian ini adalah menghasilkan protokol ekstraksi DNA dari daun *Grevillea* dengan kualitas dan kuantitas yang baik serta menentukan kondisi reaksi PCR-RAPD yang optimal pada *Grevillea*.

## MATERI DAN METODE

### Ekstraksi DNA

Daun *Grevillea* (Proteaceae) dikoleksi dari Mt Annan Botanic Garden, NSW, Australia. Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode dari Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi. Sebanyak 0.5 g daun digerus dengan mortar dan pestle dalam nitrogen cair sampai menjadi tepung. Buffer ekstraksi yang dimodifikasi mengandung 2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 2% (v/v) 2-mercaptoethanol. Buffer ini dipanaskan pada suhu 65°C sebelum digunakan. Daun yang telah digerus dimasukkan ke 5 mL buffer ekstraksi dan diinkubasi pada 55°C selama 14-16 jam dan digoyang perlahan secara kontinu.

Selanjutnya diekstraksi dengan volume yang sama kloroform:isoamilalkohol (24:1) sebanyak dua kali dan DNA dipresipitaskan dengan 2/3 volume isopropanol dingin. Pellet dikoleksi dengan cara sentrifugasi dan dicuci dua kali dengan buffer pencuci (76% etanol, 10 mM amonium asetat) dan dilarutkan kembali dalam

100 µL TE (10 mM Tris-HCl, pH 8 dan 0.1 mM EDTA pH 8). RNase A dengan konsentrasi final 10 µg mL<sup>-1</sup> ditambahkan dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi akhir pada 10000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan kontaminan dan supernatant dipindah ke tabung baru.

### Visualisasi dan Penentuan Konsentrasi DNA

DNA divisualisasi dengan melakukan elektroforesis dengan gel agarosa 0.8% dalam buffer TAE (Tris acetate-EDTA) dengan pewarna etidium bromida (0.5 µg mL<sup>-1</sup>). Elektroforesis DNA dilakukan pada 100 V selama 45 menit dan DNA diamati dengan UV transilluminator. Konsentrasi DNA ditentukan dengan cara membandingkan tingkat perpendaran band DNA hasil ekstraksi dengan lambda DNA (MBI, Fermentas, Richlands B. C., Qld). yang sudah ditentukan konsentrasinya.

### RAPD

Analisis RAPD dilakukan dengan menggunakan random primer dari Operon Technologies, Alameda, CA (Tabel 1). Reaksi PCR menggunakan HotStarTaq™ Master Mix kit (Qiagen, Clifton Hill, Vic.). Volume reaksi yang digunakan dalam analisa RAPD ini adalah 25 µl yang terdiri dari cetakan DNA (dengan konsentrasi 10ng, 25 ng dan 45ng), 12.5 µL HotStarTaq™ Master Mix (1× buffer PCR, 1.25 unit HotStarTaq™ polymerase, 200 mM untuk tiap-tiap dNTP), MgCl<sub>2</sub> (dengan konsentrasi bervariasi yaitu 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM dan 3.5 mM) dan primer (dengan konsentrasi 2.5 pmol, 5 pmol dan 7.5 pmol).

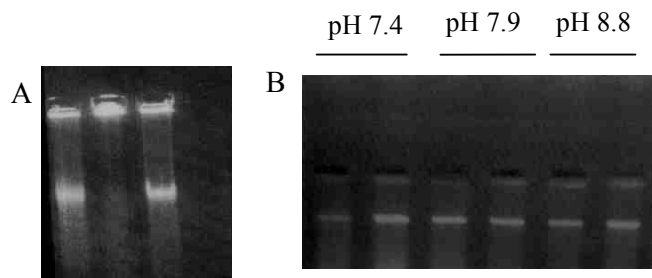
Program siklus termal adalah : aktivasi awal pada 95°C selama 15 menit diikuti dengan 30, 40 atau 45 siklus yang terdiri dari 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 36°C dan 2 menit pada 72°C. Selanjutnya diikuti dengan 1 siklus pemanjangan final pada 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi diamati dengan elektroforesis pada 1.8% gel agarosa dalam buffer TAE dan diwarnai dengan etidium bromide (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabel 1. Primer yang digunakan dan urutan basa primer

| Nama Primer | Urutan basa (5' – 3') |
|-------------|-----------------------|
| OPC6        | GAACGGACTC            |
| OPC8        | TGGACCGGTG            |
| OPC18       | TGAGTGGGTG            |
| OPD7        | TTGGCACGGG            |
| OPD11       | AGCGCCATTG            |
| OPD18       | GAGAGCCAAC            |

## HASIL

Ekstraksi DNA dari daun *Grevillea* dengan metode standar Doyle dan Doyle (1990) memberikan hasil yang tidak konsisten serta larutan DNA yang tampak seperti jeli yang menandakan tingginya konsentrasi polisakarida yang ikut terekstrak. Kontaminan polisakarida yang tinggi juga ditunjukkan dengan tertinggalnya DNA pada sumur gel pada saat elektroforesis. Di samping itu,

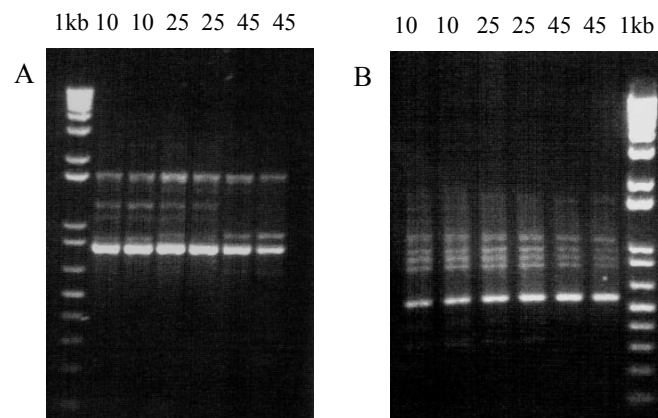


Gambar 1. Ekstraksi DNA *Grevillea* var 'Robyn Gordon' dengan menggunakan (A) metode standar Doyle dan Doyle (1990) dan (B) metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi

hasil elektroforesis menunjukkan DNA dengan 'fire type' yang menandakan tingginya kontaminan polisakarida (Gambar 1A).

Modifikasi dengan meningkatkan konsentrasi EDTA menjadi 50mM dan penambahan 2% (v/v) 2-mercaptoethanol serta inkubasi pada suhu 55°C selama 14-16 jam, menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik (Gambar 1B). Sedangkan pH buffer ekstraksi tidak berpengaruh terhadap hasil ekstraksi DNA pada *Grevillea*.

Pola-pola hasil RAPD dipengaruhi oleh komponen PCR meliputi konsentrasi DNA cetakan, MgCl<sub>2</sub>, primer serta dipengaruhi oleh jumlah siklus termal. Tingkat sensitifitas hasil PCR-RAPD bervariasi terhadap perubahan yang diakibatkan perbedaan konsentrasi tiap komponen. Pengaruh perbedaan konsentrasi komponen dan perbedaan siklus termal pada PCR-RAPD *Grevillea* dan kondisi optimal untuk protokol PCR-RAPD ditampilkan pada Tabel 2 dan Gambar 2 sampai Gambar 4.



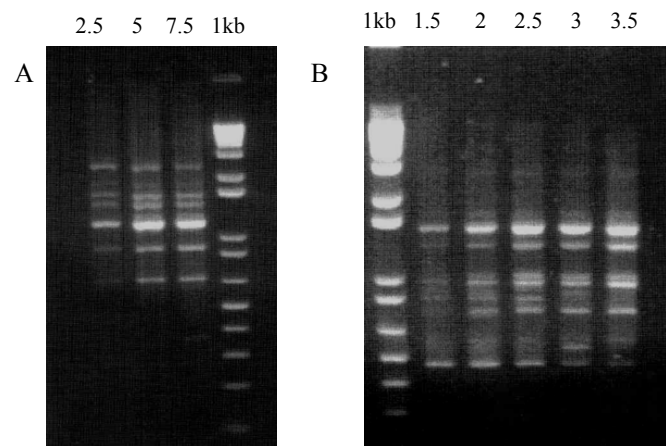
Gambar 2. Pola-pola PCR-RAPD menggunakan konsentrasi DNA cetakan 10 ng, 25 ng dan 45 ng. A = PCR-RAPD *G. humilis* subsp *maritima* dengan OPD7; B = PCR-RAPD *Grevillea* var 'Superb' dengan OPC18

**PEMBAHASAN**

Keberhasilan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh jenis tanaman serta kandungan yang terdapat pada daun tanaman tersebut. Komposisi dinding sel dan komponen lain pada daun *Grevillea* belum diketahui. Inkubasi pada suhu 55°C selama 14-16 jam memaksimalkan keluarnya

Tabel 2. Optimalisasi komponen reaksi PCR-RAPD pada *Grevillea*

| Komponen PCR                  | Konsentrasi                       | Kondisi Optimum | Hasil   |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------|---|
| Konsentrasi DNA               | 10 ng, 25 ng, 45 ng               | 10 ng           | Konsentrasi DNA yang tinggi menyebabkan hilangnya beberapa band   |
| Konsentrasi primer            | 2.5 pmol, 5 pmol, 7.5 pmol        | 5 pmol          | Konsentrasi rendah menyebabkan intensitas produk rendah   |
| Konsentrasi MgCl <sub>2</sub> | 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5mM | 2.5 mM          | Konsentrasi yang rendah dan tinggi mengakibatkan tidak terjadinya amplifikasi   |
| Siklus termal                 | 35 x, 40 x, 45 x                  | 40 x            | Jumlah siklus 35x menghasilkan intensitas produk yang rendah, jumlah siklus 45x memunculkan smear sebagai latar belakang serta band yang terlalu tebal sehingga menyulitkan pada saat melakukan skor band |

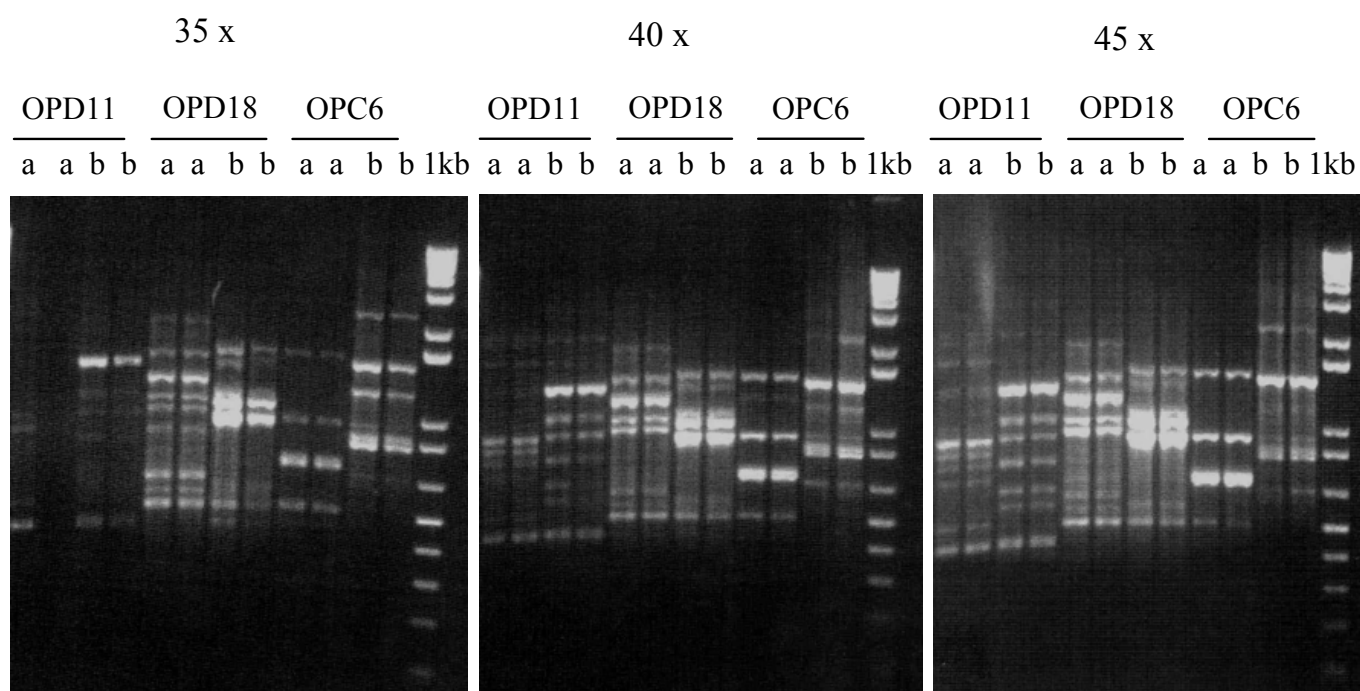


Gambar 3. Pengaruh konsentrasi primer dan MgCl<sub>2</sub> pada pola-pola PCR-RAPD. A = PCR-RAPD *G. olivacea* dengan OPC8 pada konsentrasi 2.5 pmol, 5 p mol dan 7.5 pmol; B = PCR-RAPD *G. robusta* dengan OPD18 pada konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM dan 3.5 mM

DNA dari sel sehingga DNA diperoleh dari tiap sampel secara konsisten.

Semua komponen PCR yang diuji pada *Grevillea* berpengaruh terhadap pola-pola PCR-RAPD yang dihasilkan. Pada konsentrasi DNA rendah (10 ng sampai 25 ng), PCR menghasilkan pola yang konstan, tetapi saat konsentrasi DNA dinaikkan menjadi 45 ng, terdapat band DNA yang tidak teramplifikasi. Beberapa penelitian lain menunjukkan hasil yang berlawanan yaitu rentang konsentrasi DNA cetakan dalam PCR-RAPD sangat luas dan pola-pola DNA yang dihasilkan relatif konstan. Contohnya pada *Fagopyrum esculentum*, pola RAPD tetap sama pada rentang konsentrasi DNA 6 ng sampai 480 ng (Xiaomei *et al.*, 1995), demikian pula pada *Pinus mariana* dan *P. rubens*, PCR-RAPD dengan konsentrasi DNA yang bervariasi (10 ng sampai 1000 ng) menghasilkan intensitas dan pola DNA yang sama (Nkongolo *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini, adanya band yang tidak muncul pada konsentrasi DNA di atas 25 ng dapat disebabkan tidak menempelnya primer pada situs penempelan primer. Salah satu penyebab terjadinya hal ini adalah kualitas DNA yang kurang baik. DNA yang pemurniannya tidak sempurna kemungkinan masih mengandung polisakarida, senyawa fenolik atau kontaminan lain,



Gambar 4. Pengaruh jumlah siklus terhadap pola-pola PCR-RAPD pada *G.robusta* (a) dan *G. pinaster* (b) dengan OPD11, OPD18 dan OPC6 sebanyak 35 siklus, 40 siklus dan 45 siklus.

sehingga dengan meningkatnya konsentrasi DNA maka kontaminan juga bertambah. Kontaminan dalam jumlah yang signifikan dapat mempengaruhi penempelan primer pada DNA cetakan (Weeden *et al.*, 1992). Kandungan fenol, tannin dan metabolit sekunder pada tumbuhan dapat mempengaruhi ekstraksi DNA dan akhirnya dapat mempengaruhi karakterisasi melalui PCR maupun kloning (Nkongolo *et al.*, 1998). Pada penelitian ini konsentrasi DNA yang kecil (10 ng) telah cukup dan memberikan hasil yang baik untuk analisis RAPD pada *Grevillea*.

Konsentrasi primer berpengaruh terhadap intensitas produk PCR-RAPD pada *Grevillea*. Pada tiga konsentrasi primer yang diuji (2.5 pmol, 5 pmol dan 7.5 pmol), konsentrasi primer 5 pmol dan 7.5 pmol memberikan hasil yang sama dan memiliki intensitas band yang lebih jelas dibandingkan konsentrasi primer 2.5 pmol. Menurut Padmalatha dan Prasad (2006) dan Harini *et al* (2008) konsentrasi primer yang terlalu rendah atau yang terlalu tinggi menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi. Rasio yang rendah antara primer dan DNA cetakan dapat menyebabkan produk RAPD yang dihasilkan tidak konsisten (Ali *et al.*, 2006).

Magnesium merupakan komponen yang penting dalam reaksi PCR dan mempengaruhi kualitas profil RAPD yang dihasilkan. Magnesium mempengaruhi penempelan primer serta aktifitas enzim (Padmanatha dan Prasad, 2006). Pada penelitian ini, konsentrasi  $MgCl_2$  yang rendah menyebabkan tidak munculnya beberapa band DNA serta intensitas band yang rendah pada produk RAPD. Hal ini disebabkan rendahnya aktifitas *Taq* polymerase (Harini *et al.*, 2008). Konsentrasi  $MgCl_2$  yang tinggi juga mempengaruhi jumlah band yang dihasilkan dan mengakibatkan penurunan intensitas

band tertentu. Penggunaan  $MgCl_2$  dengan konsentrasi lebih besar dari 1 mM dilaporkan dapat menghasilkan produk amplifikasi yang baik pada bakteri dan tanaman (Bassam *et al.*, 1992). Pada penelitian ini, konsentrasi  $MgCl_2$  2.5mM memberikan hasil yang terbaik yaitu jumlah band yang maksimal serta intensitas band DNA RAPD yang baik.

Hal lain yang mempengaruhi produk RAPD adalah siklus termal yang digunakan. Jumlah siklus dapat mengubah pola-pola DNA produk RAPD. Denaturasi awal pada suhu 95°C berfungsi memisahkan utas ganda DNA serta membuat protease menjadi tidak aktif. Suhu penempelan primer 35°C sampai 36°C direkomendasikan oleh Operon Technologies, sedangkan suhu pemanjangan 72°C selama 2 menit cukup untuk mengamplifikasi produk yang berukuran besar (sampai 4 kb).

Pada penelitian ini peningkatan jumlah siklus termal secara umum menyebabkan peningkatan intensitas band produk RAPD. Tetapi perubahan intensitas band juga tergantung pada primer yang digunakan. Beberapa primer memberikan hasil yang sama baik pada penggunaan siklus termal 40 x maupun 45 x. Jumlah siklus 40 x, dipilih sebagai jumlah siklus optimal untuk meminimalkan amplifikasi produk RAPD yang tidak spesifik.

Dengan menggunakan kondisi PCR 10 ng DNA, 5 pmol primer, 2.5 mM  $MgCl_2$  serta jumlah siklus termal 40 siklus diperoleh amplifikasi fragmen DNA yang optimum dan konsisten. Hasil ini dapat dimanfaatkan untuk karakterisasi molekuler maupun perbaikan genetik pada *Grevillea*.

## SIMPULAN

Modifikasi metode standar ekstraksi DNA diperlukan pada ekstraksi DNA dari daun tanaman yang mengandung banyak polisakarida atau metabolit sekunder. Pada *Grevillea*, ekstraksi DNA dengan memodifikasi metode Doyle dan Doyle (1990) dengan konsentrasi EDTA 50mM dan penambahan 2% (v/v) 2-mercaptoethanol serta inkubasi pada suhu 55C selama 14-16 jam menghasilkan DNA dengan berat molekul yang tinggi dengan kualitas yang baik dan konsisten.

Pada *Grevillea*, kondisi optimum untuk PCR-RAPD adalah menggunakan konsentrasi DNA 10ng, konsentrasi primer 5 pmol, konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM dan jumlah siklus termal 40x. Kondisi ini menghasilkan band dengan intensitas yang baik serta pola-pola band RAPD yang konsisten.

## SARAN

Program siklus termal PCR-RAPD sebanyak 40 x yang digunakan pada penelitian ini berlangsung sekitar 4 jam. Hal ini tentu tidak efisien jika sampel yang di-PCR dalam jumlah besar. Untuk mempersingkat waktu PCR, perlu dilakukan modifikasi terhadap lama denaturasi DNA cetakan maupun lama penempelan primer.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Peter Olde atas bantuannya dalam pengambilan sampel *Grevillea*, kepada Dr. Ian McFarlene dan Dr. Wendy Glenn dari The University of New South Wales, Australia atas saran-saran dalam ekstraksi DNA dan PCR-RAPD.

## KEPUSTAKAAN

- Adam, R.P., C. Hsieh, J. Murata, R.N. Pandey. 2002. Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Sys. Ecol.* 30: 231-241.
- Ali. B.A., T.H. Huang, H.H. Salem, Q.D. Xie. 2006. Influence of thermal cyler day-to-day reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprints. *Biotechnology* 5: 324-329
- Bardakci, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J. Biol.* 25: 185-196
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles, P.M. Gresshoff. 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* 38: 70-76
- Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Harini, S.S., M., Leelombika, M.N. Shiva Kameshwari, N. Sathyanarayana. 2008. Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD methods for molecular analysis of *Urginea indica* Kunth. *International J. Integrative Biol.* 2: 138-144
- Jena, S.N., A.B. Das. 2006. Inter-population variation of chromosome and RAPD markers of *Suaeda nudiflora* (Willd.) Moq. a mangrove species in India. *African J. Agric. Res.* 1: 137-142
- Lambooy, W.F. 1994. Computing Genetic Similarity Coefficients from RAPD Data: The Effects of PCR Artifacts. *Genome Res.* 1994 4: 31-37
- Makinson, R.O. 2000. *Grevillea*. Flora of Australia 17A. Australian Biological Resources Study: Canberra/CSIRO: Melbourne
- Nkongolo, K.K., K. Klimaszewska, W. S. Gratton. 1998. DNA yields and optimization of RAPD patterns using spruce embryogenic lines, seedlings, and needles. *Plant Mol. Biol. Reporter* 16: 1-9
- Padmalatha, K., M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African J. Biotech.* 5: 230-234
- Qian, W., Ge, S., Hong, D.Y. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. App. Genet.* 102: 440-449
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab Press.
- Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M.Hemmat, B.E. Kneen, M.A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In *Applications of RAPD technology to plant breeding*, Symposium Proceedings, pp. 12-17. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535
- Xiaomei, Z., L. Rufa, H. Jianping, C. Rouru, Z. Jiangtao, L. Wenbin. 1995. Optimizing Polymorphic the Generation of Random DNAs in Buckwheat. *Curr. Advances Buckwheat Res.* 95: 149 - 154