جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۸ شماره ۳ صفحه های ۲۲۵ تا ۲۳۶ (۱۳۸۶)

# بررسی تنوع ژنتیکی گل‌های نرگس (*Narcissus* spp.) بومی و غیربومی با استفاده از نشانگرهای RAPD [۱]

# STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF EXOTIC AND ENDEMIC DAFFODILS (*NARCISSUS* SPP.) USING RAPD MARKERS

**مهرانگیز چهرازی، روح انگیز نادری، علی اکبر شاه نجات بوشهری و محمد اسماعیل حسنی [۲]**

## چکیده

گل‌های نرگس بومی ایران از قدیمی‌ترین گل‌های زینتی بوده که قدمت آن ها به قبل از تاریخ هجری می‌رسد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی و قرابت بین و درون جمعیت‌های گل نرگس بومی (استان های خراسان جنوبی، خوزستان، کهکیلویه و بویراحمد، فارس، گلستان و مازندران ) و ارقام وارداتی با استفاده از نشانگرهای RAPD بررسی گردید. از میان ۵۰ آغازگر تصادفی، تنها ۱۴ آغازگر بین نژادگان ها قطعات چند شکلی مطلوب نشان دادند. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم افزار NTSYS با روش ضریب تطابق ساده مبتنی بر گروه بندی UPGMA، تجزیه خوشه‌ای انجام شد. ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد r = ۰/۹۷ به دست آمد. میانگین کل تشابه نشانگرهای RAPD مورد آزمایش برابر ۰/۸۱ و برای دو زیرخوشه بومی و غیربومی به ترتیب برابر ۰/۸۸ و ۰/۴۸ بود. نژادگان ها در ۹ گروه مجزا قرار گرفتند. چهار گروه عمده شامل: ۱- 'شهلا کازرون'، 'شهلا بیرجند'، 'شهلا کوه سفید کهکیلویه'، 'شهلا گچساران'، 'شهلا شیراز ۱'، 'شهلا دیل‌آرو کهکیلویه'، 'شهلا برم‌الوان کهکیلویه'، 'شهلا شیراز ۲'، 'شهلا بهبهان'، 'شهلا شمال' و 'شهلا اهواز' ۲- 'مسکینک بهبهان'، 'مسکینک اهواز' و 'مسکینک کازرون' ۳- 'پنجه گربه‌ای بهبهان'، 'پرپر گچساران'، 'پرپر شمال'، 'پنجه گربه‌ای اهواز' و 'پرپر بهبهان'. جمعیت های 'مسکین بهبهان'، 'پرپر شیراز' و چهار رقم وارداتی هر یک به طور انفرادی گروه های مجزایی را به خود اختصاص دادند. هر یک از گروه‌های به دست آمده ویژگی‌های منحصر بفردی از خود بروز دادند. تشابه جمعیت های غیر بومی در حد قابل قبول و تشابه جمعیت های بومی به نسبت بالا بود. نظر به اینکه گسترش پایه ژنتیکی نیازی اساسی در اصلاح گیاهان به شمار می‌رود، این مطلب قابل اهمیت است. از میان آغازگرهای تصادفی به کار رفته، UBC-۹۶ با توالی '5'-GGCGGCATGG-3 توانست ۲۱ جمعیت گل نرگس بومی ایران را به دو گروه متمایز تفکیک کند. شناسایی نشانگر ذکر شده می تواند با حذف زمان مورد انتظار برای به گل رفتن، به نحو موثری در گزینش نژادگان‌های مذکور، مورد استفاده واقع گردد.

**واژه های کلیدی:** تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، گل نرگس *Narcissus* spp.، RAPD، PCR.

---

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۳۰

۲- به ترتیب مربی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز و استادیار گروه علوم باغبانی، استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی و استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، جمهوری اسلامی ایران.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


## مقدمه

گل نرگس با نام علمی *Narcissus* sp. از تیره Amaryllidaceae ، گیاهی ژئوفیت، تک لپه و چندساله است و به طریق رویشی توسط سوخ تکثیر می شود. مراکز انتشار این گیاه نواحی مدیترانه‌ای، اسپانیا، پرتغال، هلند، انگلیس، جنوب فرانسه، ایالات کالیفرنیا، اورگان، واشنگتن از ایالات متحده آمریکا، شمال آفریقا و در یک نوار کم عرض تا چین و ژاپن می باشد (۷). گل نرگس دارای حدود ۶۵ گونه وهزاران رقم و دورگه است (۶).

قدمت این گل در ایران به قبل از تاریخ هجری می رسد (۴). گل‌های نرگس بومی ایران معطر و از جمله گل های زینتی و مهم کشور محسوب می‌شوند. این گل علاوه بر استفادهٔ تجاری به صورت گل بریدنی، در باغچه خانه ها و در پارک‌ها نیز کاشته می‌شود. این گیاه به طور طبیعی در پائیز و اوایل زمستان که کمتر گیاهی گل می‌دهد به گل می رود. رقم هایی از نرگس های هلندی نیز به ایران وارد شده اند که در برخی از نقاط ایران به صورت تجاری کشت می‌شوند. این ارقام در بهار به گل می روند. نرگس‌های بومی ایران، در نواحی جنوبی از غرب تا شرق به طور خودرو وجود دارند.

پژوهش های بسیاری جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان زینتی با استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR [۱] صورت گرفته است. از جمله این نشانگرها، RAPD می‌باشد. این نشانگر دارای مزایایی مانند نیاز به مقدار DNA ژنومی کم در هر ارزیابی، عدم نیاز به اطلاعات قبلی توالی‌ها، سهولت ارزیابی و اندازه گیری و قابلیت تعمیم نتایج به بررسی های دیگر می باشد (۲). همچنین نیاز به تجهیزات گران قیمت و مواد رادیواکتیو هم ندارد (۱۲). در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ نژادگان سیکلامن ایران با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی و RAPD، تنوع ژنتیکی بالایی مشاهده گردید (۱).

در آزمایشی، تنوع ژنتیکی تعدادی از نژادگان های انار ایران به کمک نشانگرهای RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند و این نشانگر به عنوان یک روش مؤثر و مفید برای گروه بندی نژادگان های انار توصیه گردید (۲). در یک بررسی، تنوع ژنتیکی نرگس چینی، پس از انگیزش جهش با اشعه گاما به وسیله نشانگرهای AFLP [۲] و RAPD ارزیابی گردید (۱۵) . در مطالعه دیگری ساختار و تنوع ژنتیکی جوامعی از نرگس (*N. triandrus*) ، با استفاده از DNA کلروپلاست و نشانگرهای ریزماهواره ای [۳] مورد بررسی قرار گرفت و سیر تکاملی چند شکلی خامه ارزیابی شد (۱۰). در مطالعه تنوع ژنتیکی سه جمعیت مختلف گل های زنبق با هشت نشانگر RAPD، میانگین چندشکلی [۴] مشخص شده به میزان ۳۵٪ برآورد گردید (۵). نشانگرهای RAPD همچنین کارایی خود را در تعیین روابط ژنتیکی و تلاقی های درون گونه ای میان گونه های وحشی گلایول جنوب آفریقا به اثبات رسانده اند (۲۱). نشانگرهای RAPD همچنین برای روابط ژنتیکی بین چهار گونه گیاه خورشیدی *Clivia* sp. و ارتباط میان ۳۲ نمونه درون گونه‌ای *C. miniata* استفاده گردیده است (۱۷).

اهداف این پژوهش عبارت بودند از : ۱) کاربرد نشانگرهای RAPD جهت تمایز بین ۲۵ نمونه گل نرگس و تخمین روابط ژنتیکی بین گل های نرگس ۲) شناسایی یک نشانگر متمایز کننده برای نمونه‌های پرپر از کم پر.

---

۱- Polymerase chain reaction ۲- Microsatellite ۳- Amplified Fragment Length Polymorphism
۴- Polymorphism

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


## مواد و روش‌ها

سوخ نژادگان‌های وحشی گل نرگس *Narcissus* spp. از نرگسزارهای طبیعی ایران از استان های خوزستان (اهواز ، بهبهان)، کهکیلویه و بویراحمد (گچساران، برم الوان، دیل آرو، کوه سفید)، فارس (شیراز، کازرون)، خراسان جنوبی (بیرجند) بدین نحو جمع آوری گردیدند که ابتدا در اواخر پاییز و اوایل زمستان سال ۸۳ نمونه‌ها در مرحله گلدهی بر اساس اختلافات ظاهری نشانه گذاری شده سپس سوخ ها در تابستان ۸۴ پس از گل انگیزی از خاک بیرون آورده شدند. نژادگان‌های تجاری نیز از محل‌های پرورش آن ها، استان‌های تهران، مازندران و گلستان جمع آوری گردیدند و در دانشکده کشاورزی کرج کشت و تحت آزمایش قرار گرفتند. نمونه ها از نظر ویژگی‌های مرفولوژیکی نیز بررسی گردیدند. نژادگان‌ها به همراه کد مربوطه در جدول ۱ نشان داده شده اند.

جدول ۱- نام های نژادگان های مورد بررسی گل نرگس همراه با کد مربوطه.

Table 1. Names of genotypes assigned.

| شماره | نژادگان | کد | شماره | نژادگان | کد |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | 'شهلا اهواز' | SA | ۱٤ | 'مسکینک بهبهان' | MKB |
| ۲ | 'شهلا برم الوان' | SBA | ۱٥ | 'مسکینک کازرون' | MKK |
| ۳ | 'شهلا بهبهان' | SB | ۱٦ | 'پنجه گربه ای اهواز' | PGA |
| ٤ | 'شهلا بیرجند' | SBI | ۱۷ | 'پنجه گربه‌ای بهبهان' | PGB |
| ٥ | 'شهلا دیل آرو' | SD | ۱۸ | 'پر پر بهبهان' | PPB |
| ٦ | 'شهلا شمال' | SSO | ۱۹ | 'پر پر شمال' | PPSO |
| ۷ | 'شهلا شیراز ۱' | SS1 | ۲۰ | 'پر پر شیراز' | PPS |
| ۸ | 'شهلا شیراز ۲' | SS2 | ۲۱ | 'پرپر گچساران' | PPG |
| ۹ | 'شهلا کازرون' | SK | ۲۲ | 'نرگس هلندی ۱' | NH1 |
| ۱۰ | 'شهلا کوه سفید' | SKO | ۲۳ | 'نرگس هلندی ۲' | NH2 |
| ۱۱ | 'شهلا گچساران' | SG | ۲٤ | 'نرگس هلندی ۳' | NH3 |
| ۱۲ | 'مسکین بهبهان' | MB | ۲٥ | 'نرگس هلندی ٤' | NH4 |
| ۱۳ | 'مسکینک اهواز' | MKA | | | |

استخراج DNA بر اساس روش دلاپورتا و همکاران (۹) صورت گرفت. از نوک برگ تازه روییده جهت استخراج استفاده شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز و مقایسه آن با نشانگر استاندارد لامبدا تعیین گردید.

برای تکثیر DNA ژنومی از تعداد ۵۰ آغازگر تصادفی ۱۰ مری UBC (شرکت سیناژن-ایران) استفاده شد برای حجم ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) براساس روش ویلیامز و همکاران (۲۲) طبق جدول ۲ واکنش طراحی و اجرا گردید.

چرخه‌های به کار رفته برای PCR شامل یک چرخه (۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه)، چهل و پنج چرخه [(۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه)، (۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه)، و (۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه)] و یک چرخه (۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه) بود .

جدول ۲- اجزاء تشکیل دهنده واکنش PCR .

Table 2. Components of the PCR cocktail.

| اجزاء واکنش | مقداربکار رفته(µl) | غلظت نهایی |
|---|---|---|
| آب دوبارتقطیر($H_2O$) | 13.66 | - |
| بافر(10X) | 2.5 | 1 |
| dNTPS | 0.5 | 0.2 |
| کلریدمنیزیم ($MgCl_2$) | 1.14 | 2.28 |
| آغازگر | 2 | 0.8 |
| *Taq* DNA polymerase | 0.2 | 0.004 |
| DNA الگو($۵\ ng\ ml^{-1}$) | 5 | 5 |

فرآورده‌های تکثیر شده پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ (در بافر TAE)، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و زیر نورUV مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند. آنالیزهای ژل برای هر آغازگر تا سه دفعه تکرار گردید و نتایج تکرار پذیر در آزمایش ها وارد گردید.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، براساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) فرآورده‌های PCR، داده‌ها رتبه‌بندی و ضرایب تشابه بر اساس ضرایب تطابق ساده[۱] محاسبه شد. سپس از این ضرایب برای تشکیل دندروگرام بر مبنای UPGMA[۲] باکمک نرم افزار NTSYS pc 2.02e (۱۹) استفاده گردید.

## نتایج و بحث

پنجاه آغازگر تصادفی جهت تکثیر قطعات DNA برای ۲۵ نژادگان گل نرگس به کار برده شد. از بین ۵۰ آغازگر آزمایش شده، ۱۴ آغازگر باندهای با وضوح بالا و قابل رتبه‌بندی تولید کردند (شکل۱). تعداد باندهای تکثیر شده از ۴۰ ( آغازگر UBC۱ ) تا ۹۲ ( آغازگر UBC ۷۶ ) متغیر بودند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده از ۹ برای

۱- Simple matching coefficients ۲- Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages

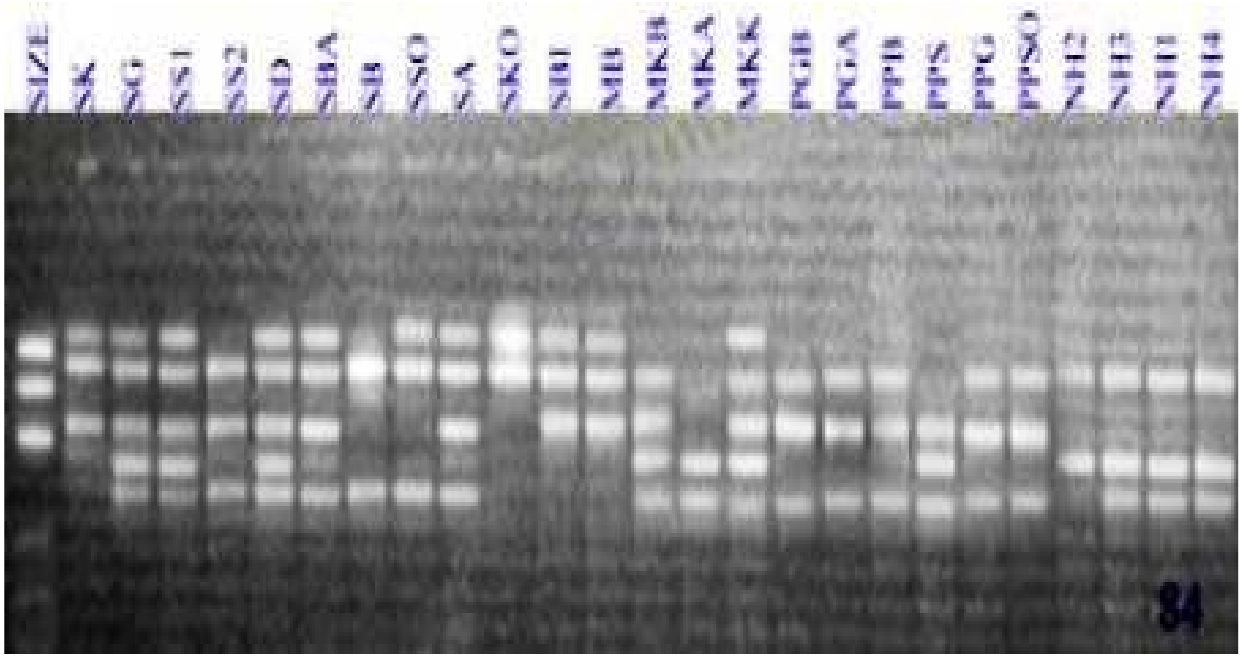


Fig. 1. Banding patterns resulting from DNA amplification based on UBC84 primer. Columns from left to right are as follows: Size marker øX174; SK: ‘Kazeroon Shahla’; SG: ‘Gachsaran Shahla’; SS1: ‘Shiraz Shahla 1’; SS2: ‘Shiraz Shahla 2’; SD: ‘Kohkiloye Dilaru Shahla’; SBA: ‘Kohkiloye Barmalvan Shahla’; SB: ‘Behbahan Shahla’; SSO: ‘Shomal Shahla’; SA: ‘Ahvaz Shahla’; SKO: ‘Kohkiloye Koohsefid Shahla’; SBI: ‘Birjand Shahla’; MB: ‘Behbahan meskin’; MKB: ‘Behbahan Meskinak’; MKA: ‘Ahvaz Meskinak’; MKK: ‘Kazeroon Meskinak’; PGB: ‘Behbahan Panjehgorbee’; PGA: ‘Ahvaz Panjehgorbee’; PPB: ‘Behbahan Porpar’; PPS: ‘Shiraz Porpar’; PPG: ‘Gachsaran Porpar’; PPSO: ‘Shomal Porpar’; NH2: ‘Hollandi Narges 2’; NH3: ‘Hollandi Narges 3’; NH1: ‘Hollandi Narges 1’; NH4: ‘Hollandi Narges 4’.

شکل ۱ – الگوی باندی به دست آمده از تکثیر DNA نژادگان های گل نرگس با استفاده از آغازگر UBC84.

نژادگان‌ها عبارتند از: ‘شهلا کازرون’ (SK)، ‘شهلا گچساران’ (SG)، ‘شهلا شیراز۱’ (SS۱)، ‘شهلا شیراز۲’ (SS۲)، ‘شهلا دیل آرو کهکیلویه’ ( SD )، ‘شهلا برم الوان کهکیلویه’ (SBA)، ‘شهلا بهبهان’ (SB)، ‘شهلا شمال’ (SS)، ‘شهلا اهواز’ (SA)، ‘شهلا کوه سفید کهکیلویه’ (SKO)، ‘شهلا بیرجند’ (SBI)، ‘مسکین بهبهان’ (MB)، ‘مسکینک بهبهان’ ( MKB)، ‘مسکینک اهواز’ ( MKA)، ‘مسکینک کازرون’ (MKK )، ‘پنجه گربه ای بهبهان’ (PGB)، ‘پنجه گربه ای اهواز’ (PGA)، ‘پرپر بهبهان’ (PPB)، ‘پر پر شیراز’ (PPS)، ‘پرپر گچساران’ (PPG)، ‘پرپر شمال’ (PPSO)، ‘نرگس هلندی۲’ (NH۲)، ‘نرگس هلندی۳’ ( NH۳)، ‘نرگس هلندی۱’ (NH1 )، ‘نرگس هلندی۴’ ( NH۴).

آغازگرهای۳ UBC، ۷۶ UBC و ۸۹ UBC و کمترین تعداد ۵ متعلق به آغازگرهای ۱ UBC ، UBC۶۹ و UBC۸۴ بود. باندها در محدوده ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز قرار داشتند. باندهای ۱۵۰۰–۱۳۰۰ بازی مربوط به نرگس‌های هلندی بودند. میانگین درصد چند شکلی در ۱۴ آغازگر ۹۶٪ بود که گویای درصد بالای چند شکلی در بین

نژادگان های مورد مطالعه بود (جدول ۳). در محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیکی که نشان دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه و دندروگرام می باشد، مقدار۰/۹۷=r به دست آمد. میانگین کل تشابه نشانگرهای RAPD مورد آزمایش برابر ۰/۸۱ و برای دو زیرخوشه بومی و غیربومی به ترتیب برابر ۰/۸۸ و ۰/۴۸ بود. نتایج به دست آمده از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۳۴) مربوط به نرگس‌های هلندی با 'شهلا شیراز۱' و 'شهلا دیل آرو' بود و بیشترین شباهت طبق شکل (۲) با ضریب کوفنتیکی (۱) بین نرگس های 'شهلا شیراز۱ 'و 'شهلا دیل آرو' و پس از آن بیشترین شباهت (۰/۹۸) بین 'شهلا شیراز۱' و 'دیل آرو' با 'شهلا گچساران' بوده است. در کل، نژادگان های 'نرگس شهلا' تشابه نزدیک تری (۱-۰/۹۱) به نژادگان های 'مسکین'، 'مسکینک ها'، 'پرپرها ' و 'پنجه گربه ای ها' نسبت به نژادگان های هلندی داشتند.

در گروه بندی گل‌های نرگس ایران ۹ گروه متمایز به دست آمد (شکل۲): ۱- 'نرگس شهلا' (۱۱ نژادگان) ۲- 'مسکین' (۱ نژادگان) ۳- 'مسکینک ها' (۳ نژادگان) ۴- 'پرپرها' و 'پنجه گربه ای ها' (۵ نژادگان) ۵- 'پرپر شیراز' (۱ نژادگان) ۶، ۷، ۸ و ۹- 'هلندی ها' (۴ نژادگان).

از نظر ویژگی های مرفولوژیکی نرگس ها به دسته های 'شهلا' با مشخصه کم پر بودن، کرم رنگ و گرد بودن گلبرگ ها و کاسبرگ ها، 'مسکینک' با ویژگی کم پر بودن، کشیدگی و سفید رنگ بودن گلبرگ ها و کاسبرگ ها و 'مسکین' با ویژگی های مرفولوژیکی حد واسطی از 'شهلا' و 'مسکینک' تقسیم بندی شده اند، که با تقسیم بندی مولکولی که 'شهلا' درگروه یک، 'مسکین' در گروه دو و 'مسکینک' در گروه سه قرار گرفته اند مطابقت دارد.

در ادامه نتایج به دست آمده از نشانگرهای RAPD، پنج نژادگان پرپر را که از نظر مرفولوژیکی در یک گروه قرار داشتند مجزا نموده است. در حالی که یک نژادگان پرپر شیراز با ویژگی گلبرگ قاشقی و نوکدار به تنهایی در یک دسته مجزا قرار گرفت. نتایج نشانگرهای RAPD، همچنین چهار گروه باقیمانده موسوم به نرگس های هلندی را که برخوردار از صفت مشترک تک گلی بودند در چهار گروه مجزا تفکیک نمود، که دارای این ویژگی های متمایز کننده می‌باشند: گروه ششم دارای تاجی کوتاه به رنگ کرم با لبه چین‌دار و کاسبرگ و گلبرگی همرنگ تاج، گروه هفتم دارای تاج بلند با حاشیه لب‌دار به رنگ زرد و همرنگ با کاسبرگ و گلبرگ، گروه هشتم با تاج بلند به رنگ زرد، کاسبرگ و گلبرگ زرد رنگ با رگه‌های سفید و گروه نهم با تاجی بلند به رنگ زرد با حاشیه مضرس به رنگ نارنجی و کاسبرگ و گلبرگ زرد با نوک سفید (جدول۴).

همانطور که نشانگرهای RAPD نشان دادند (شکل۲)، تنوع ژنتیکی بین نژادگان های بومی و غیربومی زیاد می باشد. بر اساس کلید های شناسایی فلور ایرانیکا (۱۸) و طبقه بندی گیاهی (۶) نرگس های بومی ایران متعلق به نرگس های فنجانی یا پیاله ای[۱] *Narcissus tazetta* L. و نرگس های غیر بومی متعلق به نرگس های شیپوری[۲] *Narcissus pseudonarcissus* L. می باشند. در ضمن نرگس های بومی معطر و حساس به سرما و غیربومی ها فاقد عطر و مقاوم به سرما هستند . از طرفی تنوع ژنتیکی درون گونه ای بین نژادگان های بومی کم بوده، که گویای رابطه خویشاوندی نزدیک بین آن هاست. در همین راستا نیز در پژوهشی که روی ارقام نرگس ( *Narcissus tazetta* var. Chinensis Roem ) در چین با استفاده از نشانگر RAPD صورت گرفته است، سطح تنوع ژنتیکی به نسبت پایین و رابطه خویشاوندی نزدیکی بین ارقام مورد آزمایش مشاهده گردید (۸).

---

۱- Cup daffodils ۲- Trumpet daffodils

جدول۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای تصادفی مورد استفاده و ویژگی باندهای به دست آمده.

Table. 3. The information of random primers used and their obtained bands.

| چندشکلی (٪) Polymorphism (%) | تعداد باندهای چند شکل Polymorphic bands | باندهای تکثیر شده Amplified bands | توالی آغازگر Primer sequence (5'…3') | آغازگرPrimer | کد Code |
|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 5 | 5 | CCTGGGCTTC | UBC1 | 1 |
| 100 | 9 | 9 | CCTGGGCTTA | UBC3 | 2 |
| 100 | 8 | 8 | CCTGGGTTCC | UBC5 | 3 |
| 100 | 6 | 6 | CCTGCGCTTA | UBC9 | 4 |
| 100 | 6 | 6 | CCTGGGTGGA | UBC13 | 5 |
| 85 | 6 | 7 | GGTGGCGGGA | UBC16 | 6 |
| 100 | 5 | 5 | GAGGGCAAGA | UBC69 | 7 |
| 88 | 8 | 9 | GAGCACCAGT | UBC76 | 8 |
| 100 | 5 | 5 | GGGCGCGAGT | UBC84 | 9 |
| 100 | 6 | 6 | GTGCTCGTGC | UBC85 | 10 |
| 88 | 8 | 9 | GGGGGCTTGG | UBC89 | 11 |
| 100 | 7 | 7 | GGGGGGTTGG | UBC95 | 12 |
| 87 | 7 | 8 | GGCGGCATGG | UBC96 | 13 |
| 100 | 6 | 6 | ATCGGGTCCG | UBC100 | 14 |
| – | 92 | 105 | – | – | کل (total) |
| 96 | 6.57 | 7.5 | – | – | میانگین (mean) |

با توجه به محدود بودن پایه ژنتیکی نرگس های بومی، گسترش پایه ژنتیکی نیازی اساسی به شمار می رود. این در حالی است که تنوع به نسبت بالا ی نژادگان های غیر بومی (هلندی) نشانگر توجه بهنژادگران به این مطلب بوده و نشان می دهد که در اصلاح نژادگان های هلندی، به کارگیری والدین متفاوت کاملا مدنظر بوده است. از میان ۵۰ آغازگر مورد استفاده، UBC ۹۶ با توالی '5'-GGCGGCATGG -3' توانست دو گروه گل های نرگس پرپر و کم پر را از هم متمایز نماید (شکل۳). نشانگر مذکور دارای وزن مولکولی تقریبی ۶۵۰ جفت باز بود. این نتیجه در تکرارهای

متعدد به صورت ثابت مشاهده و اثبات گردید. در بیشتر آغازگرهای به کار گرفته شده نیز باندهای ۱۵۰۰- ۱۳۰۰ بازی مربوط به نرگس های هلندی بودند. این باندها به طور اختصاصی در ارقام غیربومی دیده شدند.

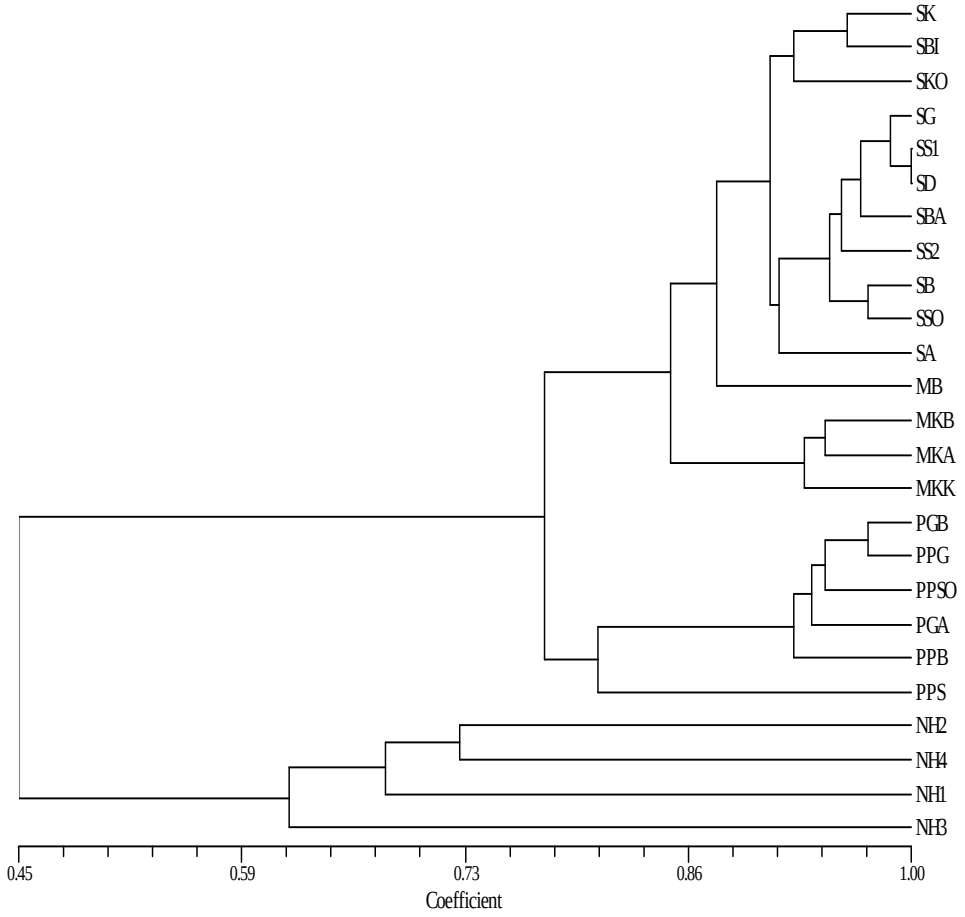


Fig.2. Dendrogram constructed from similarity coefficients (SM) for different *Narcissus* genotypes

شکل ۲- دندروگرام به دست آمده از داده های نشانگرهای RAPD درتفکیک نژادگان های نرگس بر اساس ضرایب تشابه تطابق ساده

استفاده از ویژگی‌های مرفولوژیکی منحصربفرد مشاهده شده در هر یک از ۹ گروه به همراه نشانگرهای شناسایی شده برای تمایز پرپرها از کم‌پرها، تمایز شهلاها از بقیه و نیز نشانگرهای با وزن مولکولی بالا مشاهده شده برای ارقام وارداتی، می‌تواند کمک موثری به گزینش‌ها نماید. این نشانگرها می‌توانند با حذف زمان مورد انتظار برای به گل رفتن، به نحو موثری در گزینش نژادگان های یاد شده، مورد استفاده واقع گردند. با وجود نتایج قاطع مورفولوژیکی به دست آمده در این آزمایش، به طور معمول ارزیابی های ظاهری نه تنها شناسنامه واضحی ارائه نداده بلکه کاربرد محدودی دارند. به علاوه این روش ها طولانی بوده و در طول دوره رشد گیاه انجام شده و پرهزینه و دارای زحمت زیاد هستند و تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می گیرند. جهت رفع این مشکل،

روش‌های آزمایشگاهی مبتنی بر DNA، برای طبقه بندی و انگشت نگاری رقم ها به طور کامل توجیه پذیر می گردد (۳).

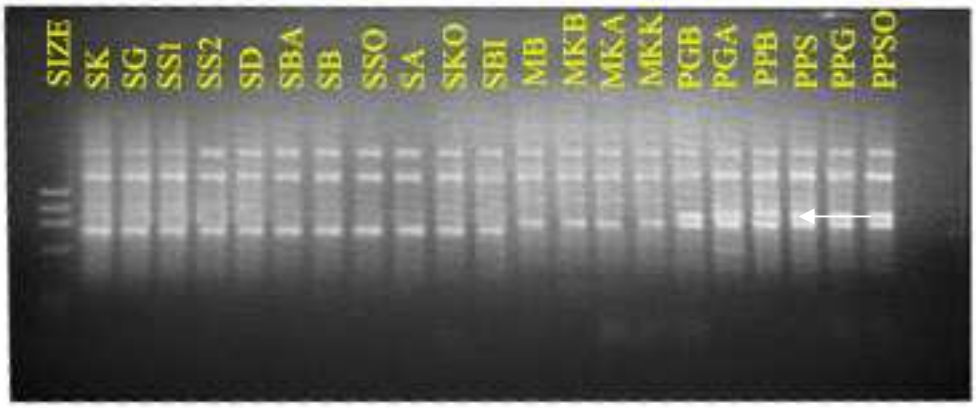


Fig. 3. Banding patterns resulting from DNA amplification based on UBC96 primer. Columns from left to right are as follows: Size marker øX174 ; SK: ‘Kazeroon Shahla’; SG: ‘Gachsaran Shahla’; SS1: ‘Shiraz Shahla 1’; SS2: ‘Shiraz Shahla 2’; SD: ‘Kohkiloye Dilaru Shahla’; SBA: ‘Kohkiloye Barmalvan Shahla’; SB: ‘Behbahan Shahla’; SSO: ‘Shomal Shahla’; SA: ‘Ahvaz Shahla’; SKO: ‘Kohkiloye Koohsefid Shahla’; SBI: ‘Birjand Shahla’; MB: ‘Behbahan Meskin’; MKB: ‘Behbahan Meskinak’; MKA: ‘Ahvaz Meskinak’; MKK: ‘Kazeroon Meskinak’; PGB: ‘Behbahan Panjehgorbee’; PGA: ‘Ahvaz Panjehgorbee’; PPB: ‘Behbahan Porpar’; PPS: ‘Shiraz Porpar’; PPG: ‘Gachsaran Porpar’ and PPSO: ‘Shomal Porpar’.

شکل۳ – الگوی باندی به دست آمده از تکثیر DNA نژادگان های گل نرگس با استفاده از آغازگر UBC96 .

پیکان سمت راست نشانگر متمایز کننده پرپرها از کم‌پرها و پیکان سمت چپ نشانگر متمایز کننده شهلاها از بقیه نژادگان‌ها. نژادگان‌ها عبارتند از: ‘شهلا کازرون’ (SK)، ‘شهلا گچساران’ (SG)، ‘شهلا شیراز۱’ (SS۱)، ‘شهلا شیراز۲’ (SS۲)، ‘شهلا دیل آرو کهکیلویه’ (SD )، ‘شهلا برم الوان کهکیلویه’ (SBA)، ‘شهلا بهبهان’(SB)، ‘شهلا شمال’ (SSO)، ‘شهلا اهواز’ (SA)، ‘شهلا کوه سفید کهکیلویه’ (SKO)، ‘شهلا بیرجند’ (SBI)، ‘مسکین بهبهان’ (MB)، ‘مسکینک بهبهان’ (MKB)، ‘مسکینک اهواز’ (MKA)، ‘مسکینک کازرون’ (MKK )، ‘پنجه گربه ای بهبهان’ ( PGB)، ‘پنجه گربه ای اهواز’ (PGA)، ‘پرپر بهبهان’ ( PPB)، ‘پرپر شیراز’ (PPS)، ‘پرپر گچساران’ (PPG)، ‘پرپر شمال’ (PPSO).

در جمع، در مطالعه حاضر از چندشکلی به دست آمده از داده های مورفولوژیکی وRAPD در سطح ژنومی برای شناسایی نشانگرهای اختصاصی و نیز طبقه‌بندی نرگس‌های تحت کشت در ایران استفاده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، آنالیز RAPD در شناسایی و توصیف نژادگان‌های نرگس می‌تواند کمک قابل ملاحظه‌ای در مطالعات

جدول۴- ویژگی های مرفولوژیکی ۹ گروه به دست آمده از داده های مولکولی.

Table 4. The morphological results 9 cluster of the molecular data.

| گروه | تعداد گل روی ساقه Flower number | کم پر و پرپربودن Single and double | شکل کاسبرگ و گلبرگ Tepal morphology | رنگ کاسبرگ و گلبرگ Tepal color | شکل تاج Corona morph | رنگ تاج Corona color | طول تاج Corona length | قطر دهانه تاج Corona mouth diameter | شکل دهانه تاج Corona mouth morph | رنگ برگ Leaf color |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | بیش از یک گل More than one | کم پر single | گرد و بزرگ Round and wide | کرم Cream | فنجانی cupped | زرد Yellow | کوتاه Short | متوسط Medium | صاف زرد yellow entire | سبز روشن Light green |
| ۲ | ″ | ″ | گرد وکوچک Round and smal | ″ | ″ | ″ | ″ | کوچک Small | ″ | ″ |
| ۳ | ″ | ″ | کشیده Lanceolate | سفید White | ″ | ″ | ″ | ″ | ″ | ″ |
| ۴ | ″ | پرپر Double | ″ | کرم Cream | – | ″ | ″ | ″ | – | ″ |
| ۵ | ″ | ″ | قاشقی Spoon shaped | ″ | – | ″ | ″ | ″ | – | ″ |
| ۶ | یک گل one | کم پر Single | کشیده Lanceolate | ″ | چین دار Wrinkled | کرم Cream | ″ | بزرگ Large | چین دار Wrinkled | سبز تیره Dark green |
| ۷ | ″ | ″ | ″ | زرد Yellow | شیپوری Trumpet | زرد Yellow | بلند Long | ″ | دندانه ای زرد Yellow wrinkled | ″ |
| ۸ | ″ | ″ | ″ | زرد با رگه سفید Yellow with white veined | ″ | ″ | ″ | ″ | لبدار زرد Yellow lobed | ″ |
| ۹ | ″ | ″ | ″ | زرد با نوک سفید Yellow with white tip | ″ | ″ | ″ | متوسط Medium | مضرس نارنجی Orange serrate | ″ |

فیلوژنتیکی، گزینش و اصلاح ارقام نرگس نماید. انتظار می‌رود بر مبنای به کارگیری تعدادی آغازگر و از طریق تکثیر قطعاتی از DNA، آغازگرهای شاخصی را برای تفکیک و شناسایی ارقام مختلف در آینده پیدا نمود.

تشخیص لاین های اصلاحی و ارقام برای شرکت های تولید بذر و آزمایشگاه های بذر از اهمیت خاصی برخوردار است. با این کار نه تنها اجازه تکثیر و بازاریابی ژرم پلاسم جدید فراهم می گردد بلکه موجب کنترل کیفی محصولات نیز می شود. به طور مثال شرکت ها قبل از معرفی ارقام دورگ، خلوص ژنتیکی محصول خود را تعیین

می کنند که به طور معمول بر اساس صفات ظاهری ثبت شده در مزرعه این شناسایی های پدیدگانی (فنوتیپی) صورت می گیرد (۳). تهیه اثر انگشت واریته‌ای با موفقیت در محصولاتی نظیر داوودی (۲۰)، آفتابگردان (۱۴)، کرفس (۲۳)، سیب (۱۳)، و غیره به کار گرفته شده است. در این آزمایش بعضی از آغازگرها از این نظر پتانسیل خوبی از خود بروز داده‌اند. صرفه نظر از مشکلات ارزیابی های ظاهری، صفات مورفولوژیکی نیز نژادگان ها را به خوبی از هم تفکیک نمود.

## منابع REFERENCES


۱. اعلائی، م.، ر. نادری، ا. خلیقی و ع. وزوایی. ۱۳۸٤. بررسی تنوع ژنتیکی سیکلامن های ایران با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیک و RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۲٤ ص.

۲ . زمانی، ذ.، ع. سرخوش، م. ر. فتاحی مقدم و ع. عبادی. ۱۳۸۵. ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین تعدادی از نژادگان های انار به کمک نشانگرهای RAPD . مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۷، شماره ۵، ۸۷۳-۸۶۵.

۳. شاه نجات بوشهری، ع. ۱۳۷۹. روش طبقه بندی و تهیه اثر انگشت ژنتیکی محصولات باغی با روش RAPD. دومین کنگره علوم باغبانی ایران، ۴۲۲ ص.

۴. شیروانی، ز. ۱۲٦۸. بستان السیاحه. انتشارات دانشگاه تهران،٦۷۳ ص.

5. Artyukova, E. and V. Etal. 2001. Genetic variability of *Iris setosa.* J. Genet. Russ. 35:134-138.
6. Bailey, L.H. 1973. Manual of Cultivated Plants. The Macmillan Company, New York, 420 p.
7. Barrett, S.C.H., W.W. Cole and C.M. Herrera. 2004. Mating patterns and genetic diversity in the wild daffodil *Narcissus longispathus* (Amaryllidaceae). Heredity 92:459-465.
8. Chen, L. J., Y. Miao, D.H. Chen and H.Q. Tian. 2002. Analysis of germplasm resources of *Narcissus tazetta* L. var. Chinensis by RAPD. J. Xiamen Uni. 41:6.
9. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version 2. Plant Mol. Bio. Rep.14:19-21.
10. Hodgins, K.A. and C.H. Barrett. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylus *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. Mol. Ecol. 16:2317-2332.
11. Huang, H., D.R. Layne, T.L. Kubisiak. 2003. Molecular characterization of cultivated pawpaw (*Asimina triloba*) using RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:85-93.
12. Justus, M., M. Ester, W. Kahangi and M. Fusao. 2004. Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. Sci. Hort. 99:9-20.
13. Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85:901-904.
14. Lawson, W.R., R.G. Henry, K.J.K. Chman and G.A. Kong. 1994. Genetic diversity in sunflower (*Helianthus anuus* L.) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. Aust. J. Agric. Res. 45:1319-1327.
15. Lu, G., Z. Xiaoying, Z. Yijing, Z. Qingch, X. Xun and C. Jiashi. 2007. Effect of radiation on Chinese *Narcissus* and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Plant Cell Tissue Organ Cult. 88:319-327.

16. Manen, J.F., O. Sinitsyna, L. Aeshbach, A.V. Markov and A. Sinitsyn. 2005. A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissues. BMC Plant Biol. 5:23.
17. Ran, Y., B.C. Murry and K.R.W. Hammett. 2001. Evaluating genetic relationships between and with in *Clivia* species using RAPD. Sci. Hort. 90:167-179.
18. Rechinger, K.H. 1970. Flora Iranica. Amaryllidaceae. No,67:323-330.
19. Rohlf, F.G. 2000. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate system version 2. Appl. Biostat. Inc. New York, U.S.A.
20. Ruminska, L. J., M. Zalewska, Z. Sadoch and M. Jerzy. 2005. Identification of *Chrysanthemum* mutants of Neor and Wonder groups using RAPD markers. Elec. J. Polish Agr. Uni., Hort. 8:1-6.
21. Takatsu, Y., M. Miyamoyo, E. Inove, T. Yamada, T. Manabe, M. Kasumi, M. Hayashi, F. Sakuma, W. Marubashi and M. Niwa. 2001. Interspecific hybridization among wild *Gladiolus* species southern Africa based on randomly amplified polymorphic DNA markers. Sci. Hort. 91:339-348.
22. Williams, GK., A.R. Kubelik, K.I. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
23. Yang, X. and C.F. Quiros. 1993. Identification and classification of celery with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.