

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 (*NARCISSEUS* SPP.) USING RAPD MARKERS

مهرانگیز چهارزی، 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 آن‌ها به قبل از تاریخ هجری می‌رسد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی و قرابت بین و درون جمعیت‌های گل نرگس بومی (استان‌های خراسان جنوبی، خوزستان، کهگیلویه 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 نژادگان‌ها 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 $r = 0.97$ 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. نژادگان‌ها در ۹ گروه مجزا قرار گرفتند. چهار گروه عمده شامل: ۱- 'شها کازرون'، 'شها بیرجند'، 'شها کوه سفید کهگیلویه'، 'شها گچساران'، 'شها شیراز'، 'شها دیل‌آرو کهگیلویه'، 'شها برم‌الوان کهگیلویه'، 'شها شیراز'، 'شها بهبهان'، 'شها شمال' و 'شها اهواز'، ۲- 'مسکینک بهبهان'، 'مسکینک اهواز' و 'مسکینک کازرون'، ۳- 'پنجه گربه‌ای بهبهان'، 'پرپر گچساران'، 'پرپر شمال'، 'پنجه گربه‌ای اهواز' و 'پرپر بهبهان'. جمعیت‌های 'مسکینک بهبهان'، 'پرپر شیراز' و چهار رقم وارداتی هر یک به طور انفرادی گروه‌های مجزایی را به خود اختصاص دادند. هر یک از گروه‌های به دست آمده ویژگی‌های منحصر بفردی از خود بروز دادند. تشابه جمعیت‌های غیر بومی در حد قابل قبول و تشابه جمعیت‌های 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، ۹۶-UBC با توالی '5'-GGCGGCATGG-3' توانست ۲۱ جمعیت گل نرگس بومی ایران را به دو گروه متمایز تفکیک کند. شناسایی نشانگر ذکر شده می‌تواند با حذف زمان مورد انتظار برای به گل رفتن، به نحو موثری در گزینش نژادگان‌های مذکور، مورد استفاده واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، گل نرگس. *Narcissus* spp. RAPD, PCR.

تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۳۰

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۱۳

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.

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 و هزاران 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 گل‌های زینتی و مهم کشور محسوب می‌شوند. این گل علاوه بر استفاده تجاری به صورت گل بریدنی، در باغچه خانه‌ها و در پارک‌ها نیز کاشته می‌شود. این گیاه به طور طبیعی در پائیز و اوایل زمستان که کمتر گیاهی گل می‌دهد به گل می‌رود. رقم‌هایی از نرگس‌های هلندی نیز به ایران وارد شده‌اند که در برخی از نقاط ایران به صورت تجاری کشت می‌شوند. این ارقام در بهار به گل می‌روند. نرگس‌های بومی ایران، در نواحی جنوبی از غرب تا شرق به طور خودرو وجود دارند.

پژوهش‌های 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 اندازه‌گیری و قابلیت تعمیم نتایج به بررسی‌های دیگر می‌باشد (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 نژادگان‌های انار ایران به کمک نشانگرهای RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند و این نشانگر به عنوان یک روش مؤثر و مفید برای گروه بندی نژادگان‌های 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 ریزماهوره ای^۳ مورد بررسی قرار گرفت و سیر تکاملی چند شکلی خامه ارزیابی شد (۱۰). در مطالعه تنوع ژنتیکی سه جمعیت مختلف گل‌های 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 تلاقی‌های درون گونه‌ای میان گونه‌های وحشی گلابول جنوب آفریقا به اثبات رسانده‌اند (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 گل‌های نرگس (۲) شناسایی یک نشانگر متمایز کننده برای نمونه‌های پریپر از کم‌پر.

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

۴- Polymorphism

مواد و روش‌ها

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

جدول ۱- نام‌های نژادگان‌های مورد بررسی گل نرگس همراه با کد مربوطه.

Table 1. Names of genotypes assigned.

شماره	نژادگان	کد	شماره	نژادگان	کد
۱	'شهلا اهواز'	SA	۱۴	'مسکینک بهبهان'	MKB
۲	'شهلا برم الوان'	SBA	۱۵	'مسکینک کازرون'	MKK
۳	'شهلا بهبهان'	SB	۱۶	'پنجه گربه ای اهواز'	PGA
۴	'شهلا بیرجند'	SBI	۱۷	'پنجه گربه‌ای بهبهان'	PGB
۵	'شهلا دیل آرو'	SD	۱۸	'پر پر بهبهان'	PPB
۶	'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	۲۴	'نرگس هلندی ۳'	NH3
۱۲	'مسکینک بهبهان'	MB	۲۵	'نرگس هلندی ۴'	NH4
۱۳	'مسکینک اهواز'	MKA			

استخراج DNA بر اساس روش دلاپورتا و همکاران (۹) صورت گرفت. از نوک برگ تازه روئیده جهت استخراج استفاده شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج‌های 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 پلیمرز (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.

غلظت نهایی	مقدار بکار رفته (μl)	اجزاء واکنش
-	13.66	آب دوبار تقطیر (H ₂ O)
1	2.5	بافر (10X)
0.2	0.5	dNTPS
2.28	1.14	کلرید منیزیم (MgCl ₂)
0.8	2	آغازگر
0.004	0.2	Taq DNA polymerase
5	5	DNA الگو (۵ ng ml ⁻¹)

فرآورده‌های تکثیر شده پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ (در بافر TAE)، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و زیر نور UV مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند. آنالیزهای ژل برای هر آغازگر تا سه دفعه تکرار گردید و نتایج تکرار پذیر در آزمایش‌ها 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 با کمک 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 (شکل ۱). تعداد باندهای تکثیر شده از ۴۰ (آغازگر ۱ UBC) تا ۹۲ (آغازگر ۷۶ UBC) متغیر بودند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده از ۹ برای

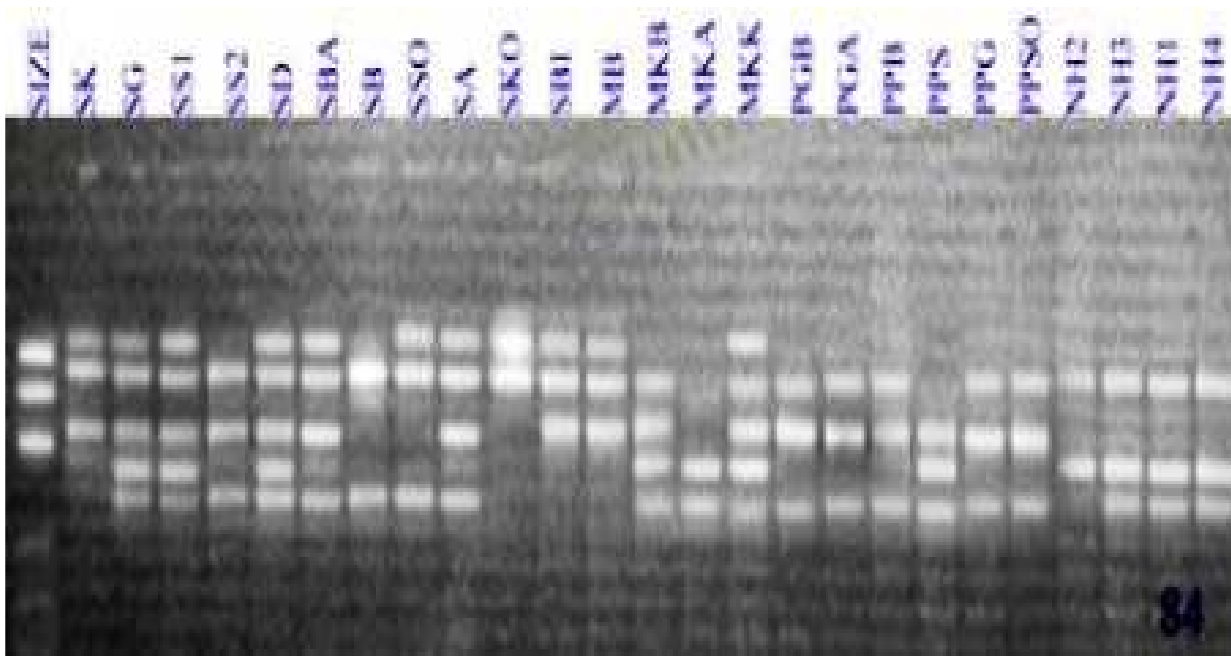


Fig. 1. Banding patterns resulting from DNA amplification based on UBC84 primer. Columns from left to right are as follows: Size marker ϕ X174; SK: 'Kazeroon Shahla'; SG: 'Gachsaran Shahla'; SS1: 'Shiraz Shahla 1'; SS2: 'Shiraz Shahla 2'; SD: 'Kohkiloye Dilaru Shahla'; SBA: 'Kohkiloye Barmalvan Shahla'; SB: 'Behbahan Shahla'; SSO: 'Shomal Shahla'; SA: 'Ahvaz Shahla'; SKO: 'Kohkiloye Koohsefid Shahla'; SBI: 'Birjand Shahla'; MB: 'Behbahan miskin'; 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 بانندی 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 شیراز ۱' (SS1)، 'شهلا شیراز ۲' (SS2)، '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)، 'مسکین بهبهان' (MKB)، 'مسکین اهواز' (MKA)، 'مسکین کازرون' (MKK)، 'پنجه گربه ای بهبهان' (PGB)، 'پنجه گربه ای اهواز' (PGA)، 'پرپر بهبهان' (PPB)، 'پرپر شیراز' (PPS)، 'پرپر گچساران' (PPG)، 'پرپر شمال' (PPSO)، 'نرگس هلندی ۲' (NH2)، 'نرگس هلندی ۳' (NH3)، 'نرگس هلندی ۱' (NH1)، 'نرگس هلندی ۴' (NH4).

آغازگرهای ۳ UBC، ۷۶ UBC و ۸۹ UBC و کمترین تعداد ۵ متعلق به آغازگرهای ۱ UBC، ۶۹ UBC و ۸۴ UBC 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، مقدار $r=0/97$ به دست آمد. میانگین کل تشابه نشانگرهای RAPD مورد آزمایش برابر $0/81$ و برای دو زیرخوشه بومی و غیربومی به ترتیب برابر $0/88$ و $0/48$ بود. نتایج به دست آمده از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت ($0/34$) مربوط به نرگس های هلندی با 'شهیلا شیراز ۱' و 'شهیلا دیل آرو' بود و بیشترین شباهت طبق شکل (۲) با ضریب کوفنتیکی (۱) بین نرگس های 'شهیلا شیراز ۱' و 'شهیلا دیل آرو' و پس از آن بیشترین شباهت ($0/98$) بین 'شهیلا شیراز ۱' و 'دیل آرو' با 'شهیلا گچساران' بوده است. در کل، نژادگان های 'نرگس شهیلا' تشابه نزدیک تری ($0/91-1$) به نژادگان های 'مسکین'، 'مسکینک ها'، 'پرپرها' و 'پنجه گربه ای ها' نسبت به نژادگان های هلندی داشتند.

در گروه بندی گل های نرگس ایران ۹ گروه متمایز به دست آمد (شکل ۲): ۱- 'نرگس شهیلا' (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 'شهیلا' 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 'شهیلا' و 'مسکینک' تقسیم بندی شده اند، که با تقسیم بندی مولکولی که 'شهیلا' در گروه 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 شیراز با ویژگی گلبرگ قاشقی و نوکدار به تنهایی در یک 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 می باشند: گروه ششم دارای تاجی کوتاه به رنگ کرم با لبه چین دار و کاسبرگ و گلبرگی هم رنگ تاج، گروه هفتم دارای تاج بلند با حاشیه لب دار به رنگ زرد و هم رنگ با کاسبرگ و گلبرگ، گروه هشتم با تاج بلند به رنگ زرد، کاسبرگ و گلبرگ زرد رنگ با رگه های سفید و گروه نهم با تاجی بلند به رنگ زرد با حاشیه مضرس به رنگ نارنجی و کاسبرگ و گلبرگ زرد با نوک سفید (جدول ۴).

همانطور که نشانگرهای RAPD نشان دادند (شکل ۲)، 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 *Narcissus tazetta* L. و نرگس های غیر بومی متعلق به نرگس های شیپوری *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).

جدول ۳- 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')	آغازگر Primer	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 بالای 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 کاملاً مدنظر بوده است. از میان ۵۰ آغازگر مورد استفاده، ۹۶ UBC با توالی 5'-GGCGGCATGG-3' توانست دو گروه گل های نرگس پرپر و کم پر را از هم متمایز نماید (شکل ۳). 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 ۱۳۰۰-۱۵۰۰ بازی مربوط به نرگس های هلندی بودند. این باندها به طور اختصاصی در ارقام غیربومی دیده شدند.

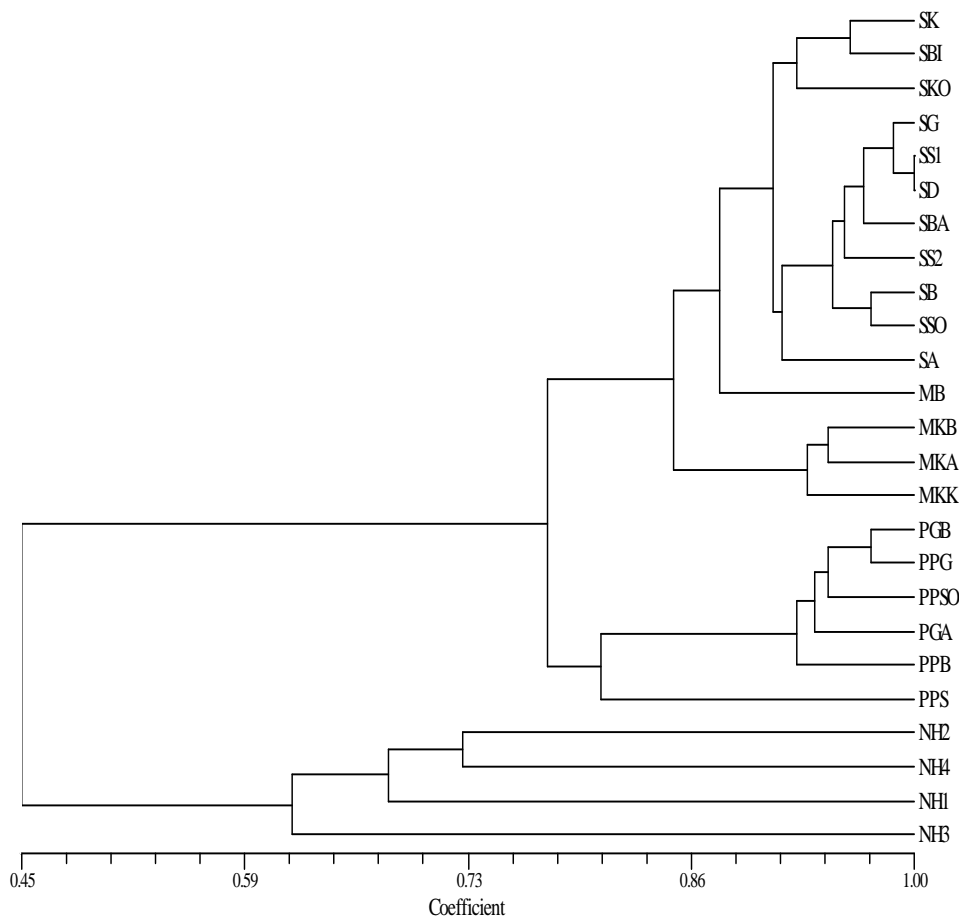


Fig.2. Dendrogram constructed from similarity coefficients (SM) for different *Narcissus* genotypes

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

استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی 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، می تواند کمک موثری به گزینش نماید. این نشانگرها می توانند 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 رقم‌ها به طور کامل توجیه پذیر می‌گردد.
(۳)

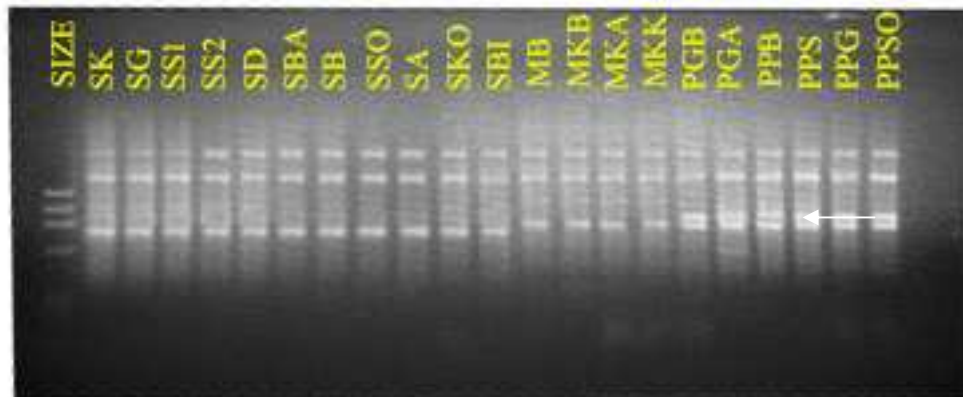


Fig. 3. Banding patterns resulting from DNA amplification based on UBC96 primer. Columns from left to right are as follows: Size marker ϕ X174 ; SK: 'Kazeroon Shahla'; SG: 'Gachsaran Shahla'; SS1: 'Shiraz Shahla 1'; SS2: 'Shiraz Shahla 2'; SD: 'Kohkiloye Dilaru Shahla'; SBA: 'Kohkiloye Barmalvan Shahla'; 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'.

شکل ۳- الگوی باندی به دست آمده از تکثیر DNA نژادگان های گل نرگس با استفاده از آغازگر UBC96. پیکان سمت راست نشانگر متمایز کننده پریرها از کم‌پرها و پیکان سمت چپ نشانگر متمایز کننده شهلاها از بقیه نژادگان‌ها. نژادگان‌ها عبارتند از: 'شهلا کازرون' (SK)، 'شهلا گچساران' (SG)، 'شهلا شیراز ۱' (SS1)، 'شهلا شیراز ۲' (SS2)، '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 و RAPD 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

جدول ۴- ویژگی های مرفولوژیکی ۹ گروه به دست آمده از داده های مولکولی.

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

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

فیلوژنتیکی، گزینش و اصلاح ارقام نرگس نماید. انتظار می رود 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 پلاسما 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

می‌کنند که به طور معمول بر اساس صفات ظاهری ثبت شده در مزرعه این شناسایی های پدیدگانی (فنتیپی) صورت می‌گیرد (۳). تهیه اثر انگشت واریته‌ای با موفقیت در محصولات 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.

REFERENCES

منابع

۱. اعلائی، م.، ر. نادری، ا. خلیقی و ع. وزوایی. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی سیکلامن های ایران با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیک و RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۲۴ 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 ۲۷، 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. ۱۳۶۸. بستان السیاحه. انتشارات دانشگاه تهران، ۶۷۳ 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 longispatus* (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 annuus* 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, G.K., 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.