بررسی چند شکلی ژنتیکی در ارقام گلرنگ با استفاده از نشانگر RAPD

مریم رحیمی[1]، سیدحسین مرعشی[2]، محمد فارسی[3]، محمود قربانزاده[4] و معصومه رحیمی[5]

تاریخ دریافت: 89/9/22 تاریخ پذیرش: 90/3/23

1-کارشناسی ارشد بیوتکنولوزی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

2و3- به ترتیب دانشیار و استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4- مربی دانشکده کشاورزی شیروان. دانشگاه فردوسی

5- کارشناس ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه فردوسی مشهد

مسئول مکاتبه : E-mail: maryamooo_200000@yahoo.com

چگیده

به منظور بررسی چند شکلی ژنتیکی بین ارقام داخلی و خارجی گلرنگ با استفاده از نشانگر RAPD تعداد 20 رقم گلرنگ مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از 17 آغازگر10 نوکلئوتیدی استفاده شد و در نهایت تعداد 279 نوار قابل امتیازدهی ایجاد شد که 256 نوار در محدوده‌ای بین 100 و 3000 جفت باز را شامل می‌شد. نمودارهای حاصل از روش UPGMA ارقام را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد. گروه اول دو رقم خارجی، و گروه دوم 2 رقم بومی داخلی و یک رقم اصلاح شده را شامل می‌شد. گروه سوم ارقام زراعی محلی، ارقام وحشی و اصلاح شده را شامل می‌شد. گروه چهارم نیز شامل دو رقم اصلاح شده ایرانی اصفهان و رقم KW4 بود. بیشترین فاصله ژنتیکی (863/.) بین رقم داخلی KW4 و رقم خارجی S710 مشاهده شد. ولی در اکثر ارقام داخلی فاصله ژنتیکی کمی دیده شد، که ممکن است به علت وجود منشا و اجداد مشترک در مورد این ارقام باشد. وجود فاصله زیاد (7578/.) در برخی ارقام وحشی و اصلاح شده داخلی ایران نشان‌دهنده پتانسیل بالای ذخایر ژنتیکی داخلی در تولید هیبریدهای مناسب می‌باشد. نتایج نشان می-دهد در حالیکه بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی در ارقام داخلی و خارجی مورد مطالعه در این بررسی همبستگی وجود دارد، ولی این همبستگی در ارقام داخلی مشاهده نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گلرنگ، RAPD

Detection of DNA Polymorphism of Safflower by Using of RAPD Markers

M Rahimi[1], H Marashi[2], M Farsi[3], M Ghorbanzadeh[4] and M Rahimi[5]

Received: 13 December 2010 Accepted: 12 June 2011
[1] MSc student of Department of Biotechnology, Facultuy of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[2, 3]Assistant professor and professor of Department of Biotechnology, Facultuy of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.
4 – Instructor of Shirvan Facultuy of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
5 - MSc student of Medicinal plants, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
*Corresponding author: E-mail: maryamooo_200000@yahoo.com

Abstract

In order to investigate the genetic polymorphism among 18 important Iranian and two foreign cultivars of safflower, RAPD marker was used. In this experiment 17 primer sets (ten mer) were used for amplification in reactions. Out of 279 markable bands, 256 bands were found in the range of 100 to 3000 bp. Cluster diagrams produced by means of the unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) divided the lines into 4 main classes. Class 1 included two exotic genotypes and class 2 included two Iranian landrace lines and one bred cultivated Iranian. Class 3 included 13 wild and local domestic Iranian genotypes. One improved Iranian line (kw4) and Isfahan line placed in class 4. The most genetic diversity (0.863) was observed between Iranian landrace (KW4) and exotic genotype (S710). But in most Iranian landraces, the genetic diversity was low (0.241). The result showed that there is a relationship between the genetic diversity and geographical distances in exotic and indogenous genotypes. But this reletion is not among indogenous cultivars. That might be due to originating from the same parent.

Key word: Genetic diversity**,** Safflower, RAPD

مقدمه

در بین دانه‌های روغنی، گلرنگ با داشتن حدود 78 درصد اسیدهای چرب غیر اشباع از کیفیت روغن بسیار مطلوبی برخوردار است. این گیاه جدا از اینکه به عنوان یک گیاه روغنی شناخته می‌شود، دارای خواص دارویی نیز هست. به دلیل قابلیت‌هایی نظیر قدرت سازگاری بالا، مقاومت به سرما، شوری و قلیایی بودن بالای خاک و موارد مصرف متعدد در بسیاری از کشورها به طور گسترده کشت می‌شود (بختیاری رمضانی و همکاران 1385).

گلرنگ به عنوان گیاهی که بومی ایران می‌تواند از اهمیت خاصی در تولید روغن برخوردار باشد (امیدی و همکاران 1378). به همین دلیل این گیاه از جنبه‌های مختلف از جمله به‌نژادی مورد بررسی قرار می‌گیرد. بهبود وضع ژنتیکی یک گیاه وابسته به وجود و وسعت تنوع ژنتیکی آن است (هوارث و همکاران 1996).

مطالعات نشان می‌دهد، کارهای کمی در زمینه مولکولی برای گلرنگ انجام شده‌است (امینی و همکاران 2007، معالی امیری و همکاران 1380، یزدی صمدی و عبدمیشانی 1991).

بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم یاری می‌نماید و مطالعه الگوپذیری و تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ، نشاندهنده سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت می‌باشد (ویلیامز و همکاران 1990).

در سال‌های گذشته پیشرفت‌های تکنولوژیکی در تکنیک‌های DNA امکان طبقه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها را فراهم ساخته است. از میان تکنیک‌های موجود، تکنیک RAPD با وجود محدودیت‌هایی که در استفاده و تفسیر نتایج آن وجود دارد (تورمان و همکاران 1994)، به صورت موفقیت‌آمیزی برای هیبریدها و گونه‌های مختلف کاملاً استفاده شده است (کاتو همکاران 1992، خان و همکاران 2009، پرنتونی و همکاران 2001، راندا و همکاران 2002). در روش RAPD، از آغازگرهای کوتاه و تصادفی که معمولا از 10 و یا تعداد بیشتری نوکلئوتید تشکیل می‌شوند، استفاده می‌شود. این آغازگرها به طور تصادفی به نقاط مختلف ژنوم اتصال یافته و چندین مکان ژنی را تکثیر می‌کنند. این روش ساده، سریع و نسبتاً ارزان است و نسبت به تکنیک RFLP پلی‌مورفیسم بیشتری را نشان می‌دهد (عبدمیشانی و همکاران 1377، بختیاری و همکاران 1385، ناگوکا و اوگیهارا 1997، لادا و همکاران 2002، اسچیف و همکاران 2003، گریلی و همکاران 2004).

پاول و همکاران (1996) نشان دادند که چهار سیستم نشانگری RFLP، RAPD،AFLP، SSR تخمین بسیار مشابهی از روابط بین ژنوم‌های سویا ارائه می کنند. تورمان و همکاران (1994) نیز اظهار داشتند که نشانگرهای RAPD و RFLP نتایج بسیار مشابهی در شناسایی روابط ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در کروسیفرها نشان داده‌اند. همچنین، نتایج مشابهی در آزمایشات انجام شده در میان ژنوتیپ‌های سویا، ذرت، لوبیا و گوجه فرنگی گزارش شده است (ویلیامز و سیایر 1993، لی و همکاران 1984، پاول و همکاران 1996، وو 1999).

داز و همکاران (2004) از نشانگر RAPD برای ارایه نوار اختصاصی گونه‌های *(Bambusa balacooa)* و *(B. tulda)* استفاده کردند. گریلکایولا و همکاران (2004) به منظور بررسی تنوع گیاه زعفران و رابطه خویشاوندی بین *(Crocus sativus)* و گونه‌های *Crocus* دیپلوئید پاییزه، DNA-های پنج نمونه *(C. sativus)* کشت شده در کشورهای مختلف و گونه‌های (*Crocus*) کاملاً خویشاوند را با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند که نتایج بیانگر شباهت بین آنها بود (گریلی کایولا 2004).

رامئو و همکاران (1998) نشانگرهای RAPD پیوسته با دو نشانگر مورفولوژیکی مربوط به پنج ژن مؤثر در ساختار گیاه نخودفرنگی را شناسایی کردند. همچنین، هوف و همکاران (1993) از این تکنیک برای مطالعه تنوع ژنتیکی در ارقام چاودار استفاده کردند. معالی و همکاران (1380) نیز از تکنیک RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف خارجی و داخلی گلرنگ استفاده کردند و نشان دادند که رابطه ای بین تنوع ژنتیکی و فاصله جغرافیایی وجود ندارد.

در مطالعات دیگر نیز این روش ابزار مناسبی برای بررسی چند شکلی تشخیص داده شد (ویلیامز و همکاران 1990، ولش و همکاران 1991، واچیرا و همکاران 1995، هوارث و همکاران 1996، ریچارد و همکاران 1996، رومسی و همکاران 1996، دپوتی و همکاران 2002، سامال و همکاران 2003 و دنیانشیار و همکاران 2006).

هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی چند رقم گلرنگ ایرانی و دو رقم گلرنگ خارجی با استفاده از نشانگر RAPD بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش که در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد، 18 رقم داخلی و دو رقم خارجی گلرنگ مطالعه شد. نمونه‌ها از مرکز

تحقیقات کشاورزی مشهد و چند نمونه نیز از عطاری-های نقاط مختلف کشور جمع آوری شدند (جدول 1). از هر نمونه 10 بذر داخل گلدان کشت شد. نمونه‌های تازه گیاهی 15-10 روز بعد از جوانه زنی به صورت بالک جمع‌آوری و به منظور استخراج DNA به روش CTAB (سقای معروف و همکاران 1984) استفاده گردیدند.

برای بررسی کمیت و کیفیت DNA[1]، از ژل آگارز 8/. درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. در این روش، نمونه‌هایی که دارای طیف جذبی 2-1/8 بودند، انتخاب شدند.

اجزای شرایط واکنش PCR شامل 2/5 میکرولیتر از PCR Buffer 10X، 50 نانوگرم DNA، 2 میلی‌مول MgCl2، 17/5 پیکومول آغازگر، 0/2 میکرولیتر dNTPmix ،یک واحد *Taq* پلیمراز در هر واکنش 25 میکرولیتری بود. آغازگرها از شرکت سیناژن (جدول 2) و سایر مواد مورد استفاده از شرکت Fermentas تهیه شد.

تکثیر در ترموسایکل گرادیان مدل Biometra تحت شرایط زیر انجام گرفت. دناتوره شدن اولیه در 94 درجه سانتگراد به مدت 5 دقیقه و 35 سیکل دیگر دناتوره شدن بعدی در 94 درجه سانتگراد به مدت یک دقیقه انجام گردید. مرحله اتصال در دمای 36 درجه سانتگراد به مدت 75 ثانیه و مرحله گسترش در 72 درجه سانتگراد به مدت2 دقیقه و مرحله گسترش نهایی در 72 درجه سانتگراد به مدت 10 دقیقه انجام شد. پس از پایان تکثیر، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز 1/2 درصد جدا سازی شد. برای رنگ‌آمیزی نوارهای DNA از اتیدیوم بروماید 0/5 میلی گرم در لیتر استفاده شد.

عکسهای حاصل از ژل با استفاده از نرم افزار V.L. LabWorks تجزیه و تحلیل گردید. باندهای قوی به کدهای صفر و یک تبدیل و پس از انتقال به برنامه Excel97، مکانهای دارای چند شکلی جهت تعیین میزان چند شکلی ژنتیکی و تنوع ژنی با استفاده از نرم افزار Popgene 32 انتخاب گردید (یه و همکاران 1999).

برای گروهبندی ارقام از تجزیه به مولفه‌های اصلی هماهنگ با استفاده از نرم افزارGenALEx 6.1 (پیکال و اسموس 2007) استفاده گردید (هوف و همکاران 1993).

جدول 1- ارقام داخلی و خارجی مورد استفاده در این تحقیق

شماره رقم	نام رقم	منشاء رقم	شماره رقم	نام رقم	منشاء رقم
1	S710	آمریکا	11	بومی چهارمحال و بختیاری	ایران
2	GILA	ایران	12	زرقان (فارس)	ایران
3	S317	آمریکا	13	اصفهان 4	ایران
4	اصفهان 1	ایران	14	295	ایران
5	اصفهان 2	ایران	15	KW4	ایران
6	اصفهان 3	ایران	16	محلی خراسان	ایران
7	IL111	ایران	17	KW3	ایران
8	بومی داراب	ایران	18	KW16	ایران
9	بومی کرمان	ایران	19	محلی مشهد 1	ایران
10	LRV5151	ایران	20	محلی مشهد2	ایران

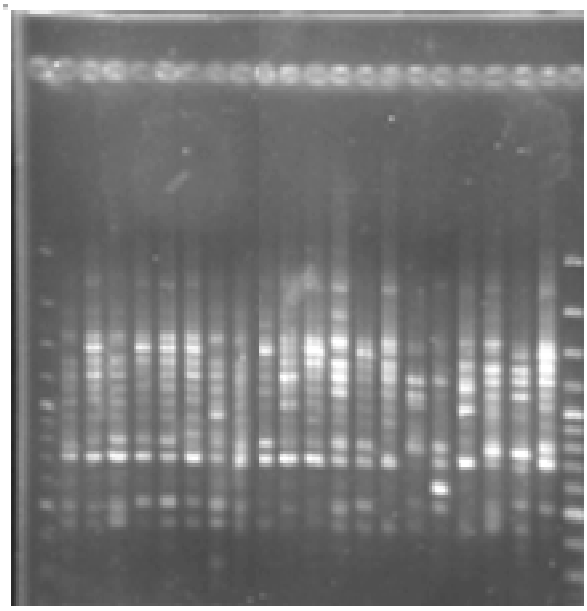
جدول 2- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده

	نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر		نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
1	UB12	CCTGGGTCCA	11	UBA	GGGCTCGTGG
2	UB16	GGTGGCGGGA	12	UBD	CGTCACAGAG
3	UB18	GGGCCGTTTA	13	UBE	CGGTGACATC
4	UB25	ACAGGGCTCA	14	UBF	GAGCCAGAAG
5	UB30	CCGGCCTTAG	15	UBO	CCTGGGCTTG
6	UB76	GAGCACCAGT	16	UBP	TGACGCGCTC
7	UB79	GAGCTCGTGT	17	UB08	CCTCCAGTGT
8	UB91	GGGTGGTTGC			
9	UB91	GGGGGGTTGG			
10	UB96	GGCGGCATGG			

نتایج و بحث

در بررسی تنوع ژنتیکی بیست نمونه گلرنگ با استفاده از 17 آغازگرتصادفی RAPD ، مجموعاً 279 نوار قابل امتیازدهی ایجاد شد که اندازه آنها در محدوده 100 تا 3000 bp بود (شکل 1). در این بین 256 نوار، چند شکلی نشان دادند (91 درصد). میانگین تعداد نوارهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر16/41 و میانگین تعداد نوارهای چند شکل به ازای هر آغازگر15/05 بود.

.



شکل 1- عکس ژل حاصل از آغازگر UB96 در 20 نمونه گلرنگ

توانایی آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چند شکلی در بین نمونه های گلرنگ متغیر بود. در این میان، آغازگر UBp و UB25 UB18 و UB96 دارای بیشترین تعداد نوار چند شکل (18 نوار) و آغازگرUB91 وUB12 دارای کمترین تعداد نوار چند شکل (11 عدد) بودند متوسط تعداد آلل مؤثر در هر لوکوس (Ne) برای تمام آغازگرها 1/64 بود که با توجه به نزدیک بودن این عدد به تعداد آلل واقعی یعنی1/98، دلیل بر تأثیر خوب آللها در چندشکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می باشد.

محتوی اطلاعات چندشکلی و یا شاخص تنوع ژنی (PIC) به وسیله فرمول پیشنهادی بوستین و همکاران (PIC = .1−ΣPi) محاسبه شد که pi فراوانی iامین آلل برای نشانگر i است که برای n آلل بسط داده شده است (بوتسین و همکاران 1980).

. شاخص تنوع ژنی بر اساس داده های بدست آمده از هر آغازگر بین 0/326 و 0/605 متغیر بود. کمترین مقدار PIC [1]برای آغازگر UB30 و بیشترین مقدار PIC برای آغازگر UB96 محاسبه شد. بطور کلی از میان 256 باند چند شکل، 130 عدد از باندها PIC ≥ 0/4

[1]Polymorphic Informatiom Content

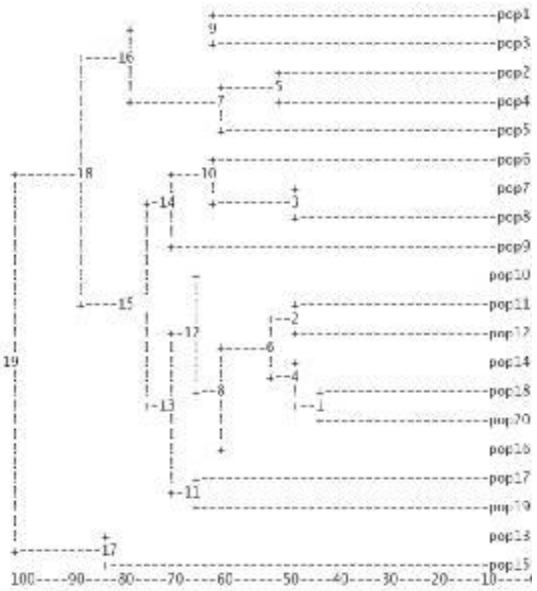
داشتند. بعبارت دیگر 51/1% از باندهای RAPD ، بطور معنی داری در تمایز ژنتیکی بین نمونه ها شرکت داشتند.

بر اساس داده‌های RAPD ، فاصله ژنتیکی بین ارقام از 0/241 تا 0/863 متغیر بود. ارقام 18 و20 در کمترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم (0/241) و ارقام 1و 15 در دورترین فاصله نسبت به هم (0/863) قرار داشتند.

آنالیزهای مولکولی RAPD نشان داد جمعیتها در سه گروه مجزا تفکیک شده‌اند.

دندوگرام حاصل که با استفاده از نرم افزار PopGen32 و به روش UPGMA رسم شده بود در فاصله ژنتیکی 80% ، چهار گروه اصلی را در بین 20 نمونه گلرنگ مشخص کرد (شکل 2).

گروه یک شامل دو رقم خارجی و گروه دو شامل 2 توده بومی داخلی و یک رقم اصلاح شده داخلی بود، که رقم 1 و 3 با توجه به نمودار با فاصله نسبت به رقم 2 و 4 و 5 قرار گرفته‌اند که که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی آن دو با ارقام داخلی ایران است.



شکل2- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA. بر اساس فاصله ژنتیکی نی (نی 1972)

برای مشاهده اعداد نست داده شده به نمونه‌ها به جدول 1 مراجعه شود

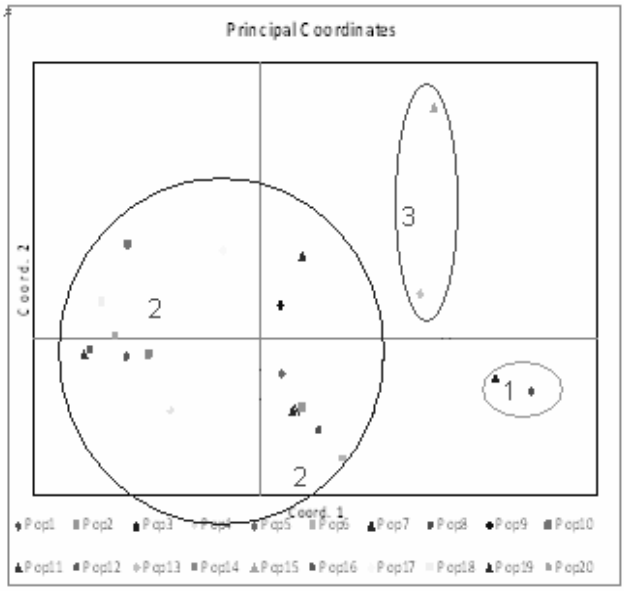
گروه سه شامل ارقام داخلی است و به دو گروه تقسیم میشوند که شامل ارقام زراعی محلی و ارقام اصلاح‌شده داخلی میباشد.همانطور که در شکل شماره 2 مشاهده می‌شود، در ارقام داخلی تفاوت ژنتیکی زیادی وجود دارد. که با توجه به اینکه گلرنگ بومی ایران است، وجود تنوع زیاد و فاصله زیاد ژنتیکی بین ارقام داخلی دور از انتظار نمی‌باشد. گروه چهارم نیز شامل دو رقم اصلاح شده ایرانی اصفهان و رقم KW4 بود.

بیشترین فاصله ژنتیکی بر اساس شکل شماره 2 و داده‌های ماتریس شباهت بین ارقام خارجی 3 و1 و ارقام داخلی 15و 13 (متوسط:7841/.) می باشد. و کمترین فاصله میان ارقام 18 و 20 می باشد (0/2419). داده ها نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی زیاد (863/.) ارقام داخلی با ارقام خارجی می باشد که می توان از این رقم‌های دور از هم در تولید بذر هیبرید استفاده کرد. از طرفی وجود فاصله زیاد (7461/.) در برخی ارقام داخلی ایران نشاندهنده تفاوت ژنتیکی این ژنوتیپها و همچنین پتانسیل بالای ذخایر ژنتیکی داخلی در تولید هیبریدهای مناسب می باشد.

نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی PCoA نیز (شکل 3) توانست چهار گروه اصلی گلرنگ را کاملاً از هم تفکیک کند که تأیید کننده نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای می باشد. نتایج بیانگر توجیه 41 /36 درصد از واریانس ژنتیکی توسط دو مولفه اول است.

گروه (4) نیز مانند نمودار خوشه‌ای شامل دو رقم بومی اصفهان و KW4 که یک رقم اصلاح شده ایرانی هست می‌باشد. همانگونه که مشاهده می‌شود با وجود قرار گرفتن این دو ژنوتیپ در یک گروه، اما فاصله آنها با هم نسبتا زیاد می‌باشد که نشان می‌دهد آنها قرابت کمی با هم دارند که بیانگر وجودتنوع زیاد ارقام داخلی و امکان استفاده ازارقام محلی داخلی در تولید هیبرید-های مناسب است. در این نمودارمانند نمودار خوشه‌ای همچنان بیشترین فاصله بین ژنوتیپ 15 با سایر ژنوتیپها دیده می‌شود و همچنین فاصله زیادی بین ژنوتیپهای 1 و 3 با ژنوتیپهای اصلاح شده داخلی و

زراعی ایران مشاهده می‌شود. این دو رقم در نمودار خوشه‌ای نیز در گروه جداگانه‌ای قرار گرفته بودند.



شکل3- نمودار دوبعدی حاصل از PCOA.

برای مشاهده اعداد نسبت داده شده به نمونه‌ها به جدول 1 مراجعه شود.

در این مطالعه همانطور که انتظار می‌رفت میان پراکنش جغرافیایی نمونه های گلرنگ خارجی و چند نمونه گلرنگ ایرانی با فواصل ژنتیکی آنها ارتباط منطقی وجود دارد. که شاید علت آن جدایی جغرافیایی ارقام خارجی نسبت به ارقام ایرانی و ایجاد و تجمع جهشهای ژنتیکی مجزا در ارقام خارجی باشد که باعث ایجاد تنوع در آنها نسبت به ارقام ایرانی شده است که با انتخاب ارقام مناسب که فاصله جغرافیایی و ژنتیکی زیاد دارند این تنوع‌ها در این مطالعه مشاهده شده‌اند. از طرفی در برخی ارقام داخلی نیز فاصله زیاد مشاهده شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی زیاد ارقام داخلی با هم می-باشد، در حالی‌که، در تعداد دیگری چنین تطابقی مشاهده نشد. میتوان علت آن را وجود منشا مشترک برای آنها در نظر گرفت که با مهاجرت و انتقال جغرافیایی تغییراتی کرده اند (معالی امیری و همکاران 1380).در نتیجه عدم تطابق بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی در ارقام داخلی مشاهده می‌شود.

در مطالعاتی که توسط معالی و همکاران (1380) انجام شد عدم تطابق فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی تایید شد.در صورتی که، تفاوت چشمگیری برای اکثر ارقام ایرانی با ارقام خارجی وجود دارد. همچنین عدم تطابق بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی در سایر مطالعات نیز تائید شده‌است (باقری و همکاران 1377 و یزدی صمدی و عبد میشانی 1991 و امینی و همکاران 2007 و جانسون و همکاران 2007 و خان و همکاران 2009 و ماهاسی و همکاران 2009 و یانگ و همکاران 2009).

اطلاع از فاصله‌های ژنتیکی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مخصوصا در انتخاب والدین برای تلاقیها مفید باشد. این مطالعه نشان داد که، روش RAPD ابزار مناسبی در جهت تشخیص تنوع داخل گونه‌ای برای استفاده در اصلاح گونه ها ارائه می دهد (معالی امیری و همکاران 1380 و سگال و همکاران 2005 و ویلارترسانا و همکاران 2005).

نتیجه گیری

از نتایج این مطالعه این‌طور استنباط می‌شود که رابطه مستقیمی بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی در ارقام گلرنگ وجود ندارد. از طرفی تنوع ژنتیکی در ارقام داخلی بسیار زیاد است و می‌توان از ارقام بومی و محلی در تولید هیبرید استفاده نمود. با توجه به اینکه ارقام داخلی خود را با شرایط محلی سازگار نموده‌اند و در عین حالی که تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاح کنندگان نبات را فراهم می‌کنند نیازی به تطابق با شرایط داخلی ایران ندارند.

منابع مورد استفاده

امیدی اح، قنادها م، احمدی م و پیغمبری سع، 1378 . بررسی صفات مهم زراعی ارقام گلرنگ -بهاره از طریق روشهای چند متغیره آماری. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد 30. شماره 4. صفحه‌های 817 -826 .

باقری ا، 1377. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی گلرنگ ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران.

بختیاری رمضانی م، لباسچی م. ح، نعمتی ن، 1385. تاثیر تراکم کشت بر عملکرد و اجزای عملکرد در شرایط دیم فصلنامه علمی و پژوهشی و تحقیقات گیاهان داروئی و معطر ایران. جلد 22، شماره 2، صفحه 155 تا 160.

عبدمیشانی س و شاه نجات بوشهری ع، 1377. اصلاح نباتات تکمیلی (جلد دوم). بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران.

معالی امیری ر، یزدی صمدی ب، قنادها م. ر و عبدمیشاهی س، 1380. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گلرنگ با استفاده از روش RAPD-PCR. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد 32، شماره 4، سال 1380. صفحه 737تا 745.

Amini F, Saeidi G and Arzani A, 2007. Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. Euphytica 163: 21-30.

Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW, 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am.J. Hum. Genet. 32: 314-331.

Das M, Bhattacharya S and Pal A, 2004. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for specific marker development in bamboo. Annals of Botany 95(5): 835- 841.

Deputy JC, Ming RH, Ma Z, Liu M, Fitch MW, Wang R, Manshargtm M and Stiles JI, 2002. Molecular markers for sex determination 111.

Dnyaneshwar W, Preeti C, Kalpana J and Bhushan P, 2006. Development and Application of RAPD-SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* L. Biol.Pharm. Bull. 29:2313-2316.

Grilli Caiola M, Caputo P and Zanier R, 2004. RAPD Analysis in *Crocus sativus* L. Accessions and Related Crocus Species. *Biologia Plantarum* 48:375-380.

Hoarce Y, Gallego R and Ferrer E, 1996. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* 88:107-115.

Huff DR, Peakall R and Smouse PE, 1993. RAPD variation within and among population of outcrossing buffalograss (*Buchyloe dactylodes* (Nutt) Engelman). *Theoretical and Applied Genetics* 9:827-834.

Johnson RC, Kisha TJ and Evans MA, 2007. Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers. Crop Sci. 47: 1728-1736

Kato K and Yokoyama H, 1992. Geographical variation in heading characters among wheat landraces adaptability. *Theoretical and Applied Genetics* 84:259-265.

Khan MA, Von S, Witzke-Ehbrecht B, Maass L and Becker HC, 2009. Relationships among different geographical groups, agromorphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in Safflower (*Carthamus tinctorius*). Genet. Resour. *Crop. Evol*. 56:19-30.

Latha R, Subramanian SR, Radha R and Swaminathan MS, 2002. Genetic relationship of *Porteresia coarctata tateoka* using molecular markers. *Plant Biosyst*. 136:339-348.

Lee M, Godshalk EB and Lamkey KR, 1984. Association of restriction fragment length polymorphism among maize inbreeds with agronomic performance of their crosses. *Crop Science* 29: 1067-1071.

Mahasi MJ, Wachira FN, Pathak RS and Riungu T, 2009. Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorious* L.) using RAPD markers. *Crop Science* 1(1): 008-012.

Nagaoka T and Ogihara Y, 1997. Applicability of inter – simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA marker in comparison to RFLP and RAPD marker. *Theoretical and Applied Genetic* 94: 597-602.

Parentoni SN, Maglhaes JV, Pacheco CAP, Santos MX, Abadic T, Gama EFG, Lopes MA and Paira E, 2001. Heterotic groups based on yield – specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollination varieties. *Euphtica.* 121: 197-208.

Peakall R and Smouse PE, 2007. GenALEx V6.1: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. Canberra: Australian National University

Powell W, Morgante M, Andr C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S and Rafalaski A, 1996. The comparison or RFLP, RAPD, AFLP, and SSR markers for germplasm analysis. *Mol Breed*. 2:225-238.

Rameau C, Denoue D, Fraval F, Haurogne K, Josserand J, Laucou V, Batge S and Murfet C., 1998. Genetic mapping in pea. 2.Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant. *Theoretical and Applied Genetics* 97:916-928.

Ranade SA, Verma A, Gupta M and Kumar N, 2002. RAPD profile analysis of betel vine cultivars. *Biol.Plant*. 45:523-527.

Richard A, Vierling A and Nguyen H. T, 1996. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 35:835-838

Rumsay JR, Multani DS, Lyen BR, 1996. RAPD –PCR identification of verticillium dahliae isolates with differential pathogenecity on cotton. Aust.J. Agrc .Res. 47:681-693.

Saghai-Maroof MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW, 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81: 8014-8018.

Samal S, Rout GR, Nayak S, Nanda RM, Lenka P. C and Das P, 2003. Primer screening and optimization for RAPD analysis of cashew. Biol.Plant. 46:301-304.

Scheef EA, Casler M. D and Jung G, 2003. Development of species-specific SCAR markers in Bentgrass. *Crop Science* 43:345-349.

Sehgal D, Raina SN, 2005. Genotyping safflower (*Carthamus tinctorius*) cultivars by DNA fingerprints. *Euphytica.* 146:67–76

Thormann CE, fetrria ME and Camargo HEA, 1994. Comparision of RFLP and RAPD markes to estimating genetic relation ship within and among cruciferous. *Theoretical and Applied Genetics* 88:973-980.

Vilatersana R, Garnatje T, Susanna A and Garcia-Jacas N, 2005. Taxonomic problems in *Carthamus* (Asteraceae): RAPD markers and sectional classification. *Botanical Journal* 147(3):375-383.

Wachira F, Waugh NR, Powell W and Hackett CA, 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*), using RAPD markers. *Genome* 38(2): 201–210

Welsh J, Peterson C and Clelland MMc, 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse application to strain identification in genetic maping. *Nucleic Acid Research* 19:303-3060.

Williams CE and Ciair DA, 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessioes of *lycopersicon esculentum*. *Genome* 36,619-630.

Williams JGK, Kubelinke AR, Livak KA, Rafalski JA and Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res. 18:6531-6535.

Wu M, 1999. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in Maize as revealed by AFLP and RAPDS. Maize Genetic Cooperation Newsletter 74.

Yang YX, Wu W, Zheng WYL, Chen L, Liu RJ and Huang CY, 2007. Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analysed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genet Resour Crop Evol* 54: 1043-1051

Yazdi - Samadi B and Abd.Mishani C, 1991. Cluster analysis in safftawer. Proceeding of Indian. Society of Oilseed Research, 119.126.

Yeh FC, Yang RC and Boyle T, 1999. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology center, University of Alberta, Canada. http://www.ualberta.ca.