مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۰، شماره ۱، سال ۱۳۹۳

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی بر اساس نشانگرهای RAPD

Genetic Diversity of Iranian Lettuce Genotypes Based on RAPD Markers

سیدحسن موسوی[۱]، رجب چوکان[۲]، نیازعلی سپهوند[۳] و علی اکبر قنبری[۳]

۱، ۲ و ۳- به ترتیب محقق، استاد و استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۸

چکیده

موسوی، س. ح.، چوکان، ر.، سپهوند، ن. ع. و قنبری، ع. ا. ۱۳۹۲. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی بر اساس نشانگرهای RAPD. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰:** ۱۳۱ - ۱۱۵.

شناسایی ویژگی‌ها و پتانسیل ژنتیکی ژرم‌پلاسم کاهو در ایران و امکان استفاده از آن‌ها در ایجاد ارقام از اهداف مهم به‌نژادی این محصول است. در این آزمایش ۴۲ ژنوتیپ کاهوی ایرانی از مناطق مختلف کشور همراه با یک رقم خارجی با استفاده از هفده آغازگر تصادفی RAPD در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در آزمایشگاه سبزی و صیفی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه‌های آماری شامل تجزیه به مولفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA به منظور تعیین کارآیی نشانگرها محتوی اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه موثر و قدرت تفکیک انجام شد. آغازگرها در مجموع ۸۰۷ باند چند شکل تولید کردند که بیشترین تعداد مربوط به آغازگر P9 با ۷۸ باند و کمترین آن آغازگر P6 با ۱۵ باند بود. دامنه اندازه باندهای تولید شده در آغازگرها بین ۲۸۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. در محاسبه ضرایب تشابه به روش جاکارد، ضرایب تشابه از صفر تا ۰/۳۲۴ متغیر بود. بیشترین تشابه به ترتیب، بین ژنوتیپ بابل و لاین۱۱ مازندران (۰/۳۲۴)، لاین‌های ۱۹ و ۲۳ مازندران (0/314) و ژنوتیپ کرج و سفید نیشابور (0/300) به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی توانست ژنوتیپ‌ها را در سطح تشابه ۰/۲۵ مطابق با صفات مورفولوژیک به چهار گروه تقسیم‌ندی کند. نتایج نشان داد ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تنوع بالایی برخوردار بودند و استفاده از نشانگرهای RAPD برای گروه‌بندی کاهوهای بومی ایران روش مفید و موثری است.

واژه‌های کلیدی: کاهو، ژنوتیپ‌های بومی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، چند شکلی، تنوع ژنتیکی.

نویسنده مسئول: mousavi218@yahoo.com تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۳۷۸۵

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.)، یک سبزی برگی یک ساله، خودگشن، دیپلوئید (2n = 2x = 18) و محصول فصل خنک از تیره Asteraceae و از زیر تیره Chicorideae است که عمدتاً در مناطق معتدله مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (Lebeda *et al.*, 2007؛ Funk *et al.*, 2005). کاهو یکی از مهم‌ترین سبزی‌های برگی است که عمدتاً برای مصارف تازه‌خوری و سالادی استفاده می‌شود. سابقه کشت و کار این محصول به ۴۵۰۰ سال قبل برمی‌گردد (Hancock, 2004). موطن اصلی کاهو از آسیا و به احتمال زیاد ایران و ترکمنستان است (Singh *et al.*,1997). این گیاه با داشتن حدود ۱/۷ میلیون هکتار سطح زیر کشت در جهان یکی از سبزی‌های مهم به شمار می‌رود (Anonymous, 2010). مرکز تنوع و پیدایش کاهو در نواحی مدیترانه و جنوب غرب آسیا است (DeVeris, 1997؛ Lindquist, 1960). منشاء آن از کاهوی وحشی *L. serriola* است (DeVries, 1997؛ Lebeda, 2004). این جنس از نظر مورفولوژی دارای شش تیپ است. تیپ‌های مختلف کاهو (Cos) Romaine، (Iceberg) Crisphead، Butterhead، (Asparagus) Stem، (cutting) Leaf و Oilseed هستند (Treuren, 2001؛ Mikel, 2007؛ Boukema *et al.*, 1990). بر اساس مطالعات لبدا و همکاران (Lebeda *et al.*, 2009) تعداد گونه‌های مختلف جنس *Lactuca* در دنیا ۹۸ گونه بوده که ۱۷ گونه اروپایی، ۴۳ گونه آفریقایی، ۱۲گونه آمریکایی، ۳ گونه استرالیایی و ۵۱ گونه آن آسیایی هستند. از ۵۱ گونه آسیایی بیشترین تنوع گونه‌ای در پاکستان با ۲۳ گونه، هند ۱۸ گونه و ایران ۱۵ گونه وجود دارد.

از آن جایی که مطالعات صفات مورفولوژیک به دلیل تأثیر عوامل محیطی بر این صفات به تنهایی از دقت بالایی برخوردار نیستند، امروزه ارزیابی‌ها و مطالعات مولکولی از جمله روش‌های معتبری هستند که در تعیین روابط ژنتیکی توده‌ها و رقم‌های مختلف به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Landry *et al.*, 1987). تاکنون نیز تحقیقات زیادی جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR انجام شده است، از جمله نشانگرهای مذکور RAPD است. با استفاده از این نشانگر، دستیابی به اطلاعات سریعتر بوده و حتی قادر است در تجزیه و تحلیل ژنوم‌ها در سطح بالای هتروزیگوسیتی با نشانگرهای دیگر رقابت کند (Mullis *et al.*, 1994).

وایکوت و فورت (Waycott and Fort, 1994) در تحقیقی با استفاده از روش RAPD تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف کاهو در ده تیپ از Butter head و یک تیپ از Crisp head را با ۱۳ آغازگر مورد بررسی قرار دادند که در نتیجه

هفت لاین از ده لاین بسیار مشابه بودند و ۹۶ درصد تشابه ژنتیکی داشتند.

یاماتو و همکاران (Yamamoto *et al.*, 1994)، دوازده رقم مختلف کاهو را با ۲۰ آغازگر تصادفی از طریق روش RAPD بررسی و تعداد قطعات چند شکل را ۴۷ درصد گزارش کردند.

کسلی و همکاران (Kesseli *et al.*, 1994) چند شکلی بین دو تیپ کاهو را با نشانگرهای RAPD و RFLP با استفاده از دو نوع DNA بررسی کردند. در بررسی این دو تیپ، از ۱۰۰۸ کاوشگر مشتق شده از cDNA و ۱۸۰ کاوشگر مشتق شده از gDNA ، با استفاده از ۵۰ آغازگر، به ترتیب ۱۰ و ۱۱ درصد چند شکلی دیده شد.

در مطالعه‌ای روابط بین ۹۵ توده از ۲۰ گونه مختلف Lactuca با استفاده از نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت و بین توده‌های مختلف ۵۳ درصد چند شکلی دیده شد (Wim *et al.*, 2001). همچنین با استفاده از روش RAPD تنوع ژنتیکی بین ۱۵رقم کاهو در ژاپن بررسی شد. در این مطالعه بین توده‌های مختلف ۴۹ درصد چند شکلی دیده شد (Suthumchai *et al.*, 2006) و تیپ‌های مختلف کاهو در چهار گروه طبقه‌بندی شدند.

تنوع ژنتیکی ۴۴ توده کاهو با استفاده از نشانگرهای AFLP، SSR -I و RAPD بررسی شدند (Tae-jin *et al.*, 2007). نتایج نشان داد که در مجموع ۲۱۶ باند از ۷ آغازگر RAPD، ۴ آغازگر SSR -I و ۵ آغازگر AFLP به دست آمد و از این تعداد، ۱۹۶ باند چند شکل بودند و بین توده‌ها بیش از ۹۰ درصد چند شکلی دیده شد. همچنین این مارکرها توانستند تیپ‌های مختلف برگی، رومن و ساقه‌ای را از یک دیگر تفکیک کنند. از آن جایی که صفات کمی و کیفی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق، در مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفتند (Mousavi *et al.*, 2012) و تاکنون تحقیق مدونی در خصوص استفاده از مارکرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها گزارش نشده است، لذا این مطالعه با هدف تعیین فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف کاهوی ایرانی و به کارگیری آن در فرایندهای به‌نژادی بعدی، با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای 42 ژنوتیپ بومی کاهو که از مناطق اصلی تولید در کشور تهیه و مطالعات مورفولوژیک و بررسی صفات کمی و کیفی آن‌ها قبلاً بر اساس توصیف نامه بین‌المللی (Kristkova *et al.*, 2008) انجام شده بود (Mousavi *et al.*, 2012)، همراه با یک رقم خارجی از کاهوی گریت لیک در این ارزیابی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های برگی ۴۳ ژنوتیپ کاهو به صورت تک بوته انجام شد. با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز تهیه شده با غلظت یک درصد در بافر TBE (Tris boric EDTA) و روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۸۰ نانومتر (دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer، مدل EZ-201) کمیت و کیفیت DNA بررسی شد.

آزمایش‌های RAPD

برای انجام آزمایش‌های RAPD از ۱۷آغازگر تصادفی به منظور تکثیر قطعات DNA استفاده شد. میزان ترکیبات مورد استفاده در هر مخلوط از واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل۴ میکرولیترDNA ژنومی (۲۵ نانوگرم)، ۲/۵ میکرولیتر بافر X۱۰، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر آغازگر تصادفی، ۰/۲میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمراز، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم و ۱۳/۸ میکرولیتر آب دیونیزه شده بود. مخلوط حاصله بلافاصله تحت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترمال سایکلر(Bio-Rad مدل I-cycler) قرار گرفت. برنامه چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۴۵ چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

الکتروفورز فرآورده‌های تکثیری

پس از انجام واکنش PCR به ۱۲ میکرولیتر از فرآورده‌های تولیدی PCR در هر میکروتیوپ ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری افزوده و مخلوط حاصله در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE ریخته شد. در چاهک‌های ابتدایی و انتهایی از خط‌کش ژنی یا سایز مارکر و در سایر چاهک‌ها محصولات تکثیری ژنوتیپ‌های مختلف کاهو به منظور تخمین اندازه باندهای تشکیل شده ریخته شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۸۰ در بافر TBE انجام شد. پس از اتمام الکتروفور، رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در لیتر انجام شد. سپس قطعات تکثیر یافته DNA زیر نور UV (با طول موج ۳۰۵ نانومتر) توسط دستگاه ژل داک (Gel document, UVP) مشاهده و عکس‌برداری از ژل انجام شد. پس از انجام آزمایش، جهت بررسی چند شکلی بین ژنوتیپ‌ها، باندهای تشکیل شده چند شکل، نمره‌دهی شدند. بدین صورت که به حضور یک باند خاص عدد یک و به عدم حضور آن صفر داده شد. پس از تشکیل ماتریس اعداد یک و صفر در ژنوتیپ‌های مورد بررسی (به تعداد باند

چند شکل)، تجزیه‌های آماری و ماتریس تشابه یا ماتریس فاصله ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و NT sys (ver, 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jacquard's similarity coefficient) محاسبه شد. در پایان بر اساس ماتریس فواصل و محاسبه ضریب کوفنتیک، تجزیه خوشه‌ای انجام و دندروگرام به روش UPGMA به دست آمد.

محاسبه فواصل ژنتیکی به روش جاکارد با استفاده از فرمول زیر انجام شد:

$$S_{jac} = a/a+b+c$$

a : باندهای مشترک موجود در هر دو نمونه X و Y

b : وجود باند در X و عدم وجود باند در Y

c : وجود باند در Y و عدم وجود باند در X

همچنین برای هر آغازگر در این آزمایش قدرت تفکیک (Rp) محاسبه شد. این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه است. چنانچه همه باندها از نظر وضوح‌سازی در شرایط ایده‌ال باشند، بهترین آغازگرها آن هایی هستند که بیشترین مقدار باند را تولید می‌کنند. که این شاخص بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$Rp=\sum Ib \qquad \{Ib=1-(2\times|0.5-p|)\}$$

Ib: میزان وضوح باند است. این مقدار بر اساس فرمول برای هر کدام از باندهای تولید شده بین صفر و ۱ است.

P: نسبتی از ژنوتیپ‌ها که باند مورد نظر را دارا هستند.

Rp: قدرت تفکیک

تجزیه آماری داده‌ها شامل محاسبه میزان اطلاعات چند شکلی (Polymorphism information content) PIC، شاخص نشانگری MI (Marker index)، نسبت چندگانه موثر EMR (Effective multiplex ratio)، قدرت تفکیک RP (Resolving power)، تجزیه به مختصات اصلی PCOA (Principle component analysis)، ضریب تشابه به روش جاکارد و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA بود. نرم‌افزارهای Excel و NTSYSver2.1 برای تجزیه آماری استفاده شدند.

فرمول شاخص‌های ذکر شده به شرح زیر بود:

$$PIC=\sum [2Pi(1-Pi)]$$

Pi : مقدار فراوانی باندها برای نشانگرهای غالب است.

$$EMR= np\times\beta$$

np : تعداد کل باند چند شکل و β نسبت تعداد باند چند شکل به تعداد کل باند است.

$$DI= 1-\sum Pi^2$$

$$MI= DI\times EMR$$

قدرت تفکیک (RP) این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه است. این مقدار برای هر آغازگر با نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

$$RP= \sum Ib$$

$Ib= 1-(2\times|0.5-p|)$

P : نسبت تعداد باند به تعداد کل نمونه‌ها است.

نتایج و بحث

مشخصات ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

در این بررسی، از میان ۲۰ آغازگر تصادفی استفاده شده، ۱۷ آغازگر قطعات چند شکل مطلوب نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۱- کد، تیپ و مشخصات جغرافیایی ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی

Table 1. Code, type and geographical location of Iranian lettuce genotypes

کد	ژنوتیپ	تیپ	مختصات جغرافیایی Geographic coordinates: طول جغرافیایی Longitude		عرض جغرافیایی Latitude		ارتفاع
			درجه	دقیقه	درجه	دقیقه	
Code	Genotype	Type	Degree	Minute	Degree	Minute	Altitude (m)
1	Abtavil	Romaine	50	27	28	46	0
2	Borazjan	Romaine	51	38	29	21	0
3	Siahe-Dezful	Romaine	49	17	30	28	52
4	Piche-Ahvaz	Romaine	48	17	31	25	30
5	Shadegan	Romaine	48	23	30	45	45
6	Qom	Stem	50	53	34	38	930
7	Karaj	Romaine	51	27	35	48	1360
8	Sefide-Neishaboor	Leaf	58	47	36	12	1210
9	Siahe-Neishaboor	Leaf	58	47	36	12	1210
10	Gorgan1	Romaine	53	17	36	28	45
11	Amol	Romaine	53	12	36	34	45
12	Gorgan2	Romaine	53	17	36	28	45
13	Babol	Romaine	53	12	36	34	45
14-31	Mazandran-Lines	Romaine	53	12	36	34	45
32	Varamin 1	Leaf	51	39	35	19	915
33	Varamin 2	Leaf	51	39	35	19	915
34	Varamin 3	Romaine	51	39	35	19	915
35	Shiraz	Romaine	52	22	29	37	1540
36	Zirehii	Romaine	51	24	29	25	985
37	Hamadan	Romaine	48	31	34	48	1851
38	Nahavand	Romaine	48	21	34	32	1615
39	Parsabad	Romaine	48	38	38	28	1280
40	Ardabil	Romaine	48	28	38	18	1311
41	Jahrom	Romaine	53	33	28	30	1050
42	Fasa	Romaine	53	39	28	56	1370
43	Great lake	Romaine	-	-	-	-	-

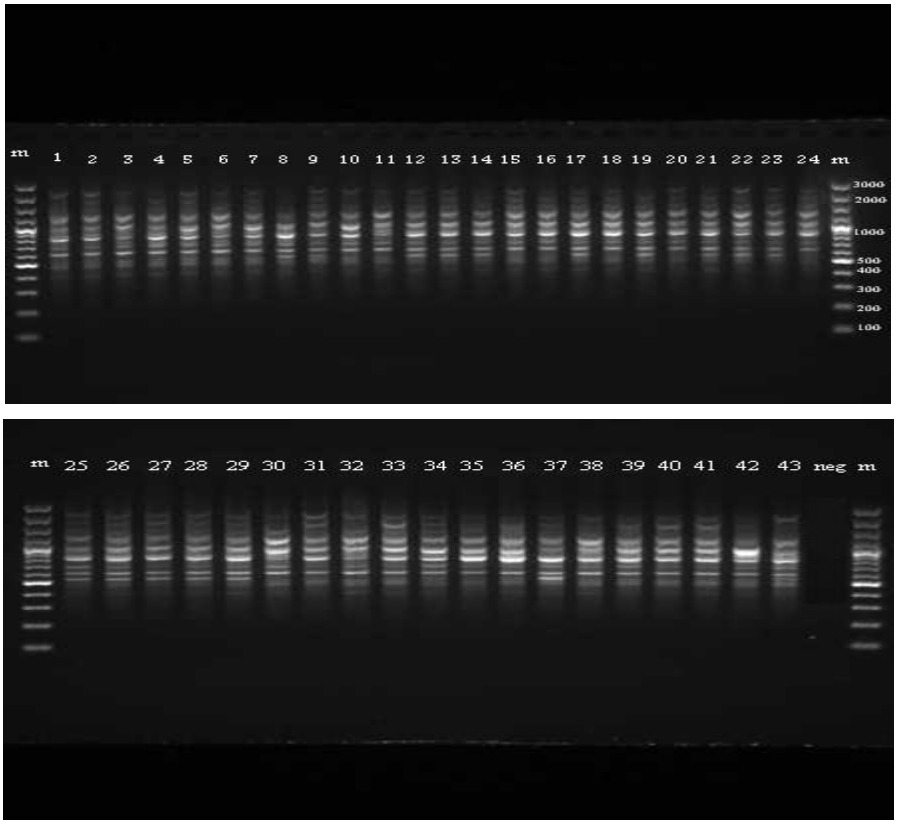
در مطالعات یاماتو و همکاران (Yamaoto *et al.*, 1994) روی ۱۲ رقم کاهو نیز به منظور تعیین چند شکلی با استفاده از روش RAPD، از ۲۰ آغازگر تصادفی استفاده کردند

جدول۲- توالی آغازگرها و شاخص های بررسی شده نشانگر RAPD در ۴۳ ژنوتیپ کاهو
Table 2. Sequence of primers and investigated measures for RAPD markers in 43 lettuce genotypes

کد آغازگر	توالی	دمای اتصال	دامنه تولید باند	باندهای چندشکل	قدرت تفکیک	نسبت چندگانه موثر		نسبت چندگانه موثر	شاخص نشانگری
Primer code	Sequence 5 —>3	Annealing temp. (c°)	Size range (bp)	Total Polymorphic bands	Resolving power (RP)	Polymorphism information content(PIC)	β	Effective multiplex ratio (EMR)	Marker index (MI)
P1	AGTCCTATGC	37	750-2930	22	5.44	0.117	1	22	2.54
P2	GCATTACGGA	30	440-2840	35	8.00	0.109	1	35	3.82
P3	TACGGCATGA	37	600-3000	49	13.82	0.133	1	49	6.52
P4	AGATCGGCAT	37	310-3000	39	11.30	0.137	1	39	5.34
P5	GTGGTCAAAC	37	1000-2520	23	8.18	0.168	1	23	3.86
P6	CGTATCCTGA	30	1260-2660	15	3.77	0.118	1	15	1.77
P7	AGGCATTACG	37	330-3000	77	27.30	0.166	1	77	12.78
P8	AGTACGGCAT	37	370-2480	53	17.67	0.156	1	53	8.27
P9	GGCGGCACAGCA	35	410-2860	78	32.93	0.199	1	78	15.52
P10	GCCGCTTCAGCT	40	590-3000	45	25.44	0.254	1	45	11.43
P11	GGAGGATGGCCC	40	570-2130	53	26.19	0.226	1	53	11.98
P12	GGCAACTGGCCA	40	500-2300	44	16.84	0.175	1	44	7.70
P13	GTCGACGGACGT	39	350-3000	54	15.95	0.140	1	54	7.56
P14	AGTCCTAAGC	34	420-2870	43	14.84	0.164	1	43	7.05
P15	TGGACACTAC	37	280-3000	76	25.12	0.155	1	76	11.78
P16	CTGAACTGAC	37	480-2970	61	26.00	0.198	1	61	12.08
P17	GTACAGACCT	37	320-2570	40	15.67	0.189	1	40	7.56

که ۱۹ آغازگر قطعات چند شکل مطلوب نشان دادند. دوازده آغازگر مورد استفاده در این پژوهش از میان آغازگرهای مطالعه فوق که بیشترین محتوی GC را داشتند، انتخاب شدند. در این مطالعه آغازگرها در مجموع ۸۰۷ باند چند شکل تولید کردند که بیشترین تعداد مربوط به آغازگر P9 با ۷۸ باند و کمترین آن مربوطه به آغازگر P6 با ۱۵ باند بود. دامنه اندازه باندهای حاصل از آغازگرها، بین ۲۸۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۲). هانگ و همکاران (Hwang *et al.*, 2002) با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر RAPD به بررسی خویشاوندی ۳۵ رقم کاهو پرداختند. در مطالعه آن‌ها، تعداد باندهای مشاهده شده آغازگرها از ۳ تا ۱۳ متغیر بود. همچنین تنوع ژنتیکی ۴۴ توده کاهو با استفاده از نشانگرهای AFLP، SSR -I و RAPD بررسی شدند (Tae-jin *et al.*, 2007). نتایج نشان داد که در مجموع ۲۱۶ باند از ۷ آغازگر RAPD، ۴ آغازگر SSR -I و ۵ آغازگر AFLP به دست آمد و از این تعداد، ۱۹۶ باند چند شکل بودند و بین توده‌ها بیش از ۹۰ درصد چند شکلی دیده شد. در مطالعه دیگر سوتوماشی و همکاران (Suthumchai *et al.*, 2006) به منظور تعیین چند شکلی بین ۱۵ رقم از تیپ‌های مختلف کاهو از ۷۸ آغازگر ترکیبی استفاده کردند، نتایج نشان داد که ۴۴ درصد از باندها، چند شکلی مطلوب نشان دادند.

شکل ۱ الگوی باندی قطعات DNA تکثیر شده آغازگر شماره ۹ را در ۴۲ ژنوتیپ بومی کاهوی ایرانی و یک رقم کاهوی خارجی گریت لیک نشان می‌دهد. کمترین مقدار PIC



شکل ۱- الگوی باندی به دست آمده از تکثیر قطعه‌های DNA ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی با استفاده از آغازگر ۹

m طرفین در بالا و پایین: سایز مارکر و سپس در بالا از چپ به راست ژنوتیپ‌های شماره ۱ تا ۲۴ و در پایین از چپ به راست ژنوتیپ‌های ۲۵ تا ۴۲ (جدول ۱)، شماره ۴۳ کاهوی رقم خارجی گریت لیک، neg چاهک آخر شاهد (بدون DNA).

Fig. 1. Banding pattern obtained by DNA amplification of Iranian lettuce genotypes using primer 9

m both the top and bottom: size marker, and then in top from left to right genotypes no. 1 to 24 and the lower from left to right genotypes no. 25 to 42 (Table 1), number 43 foreign cultivar of lettuce Great Lake. neg the last well, control (no DNA).

(۰/۱۰۹) مربوط به آغازگر P2 و بیشترین مقادیر PIC (۰/۲۵۴) و (۰/۲۲۶) مربوط به آغازگرهای P10 و P11 بود. متوسط PIC در این پژوهش ۰/۱۶۵ بود، بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که آغازگرهای P10 و P11 با بیشترین مقدار PIC توانسته‌اند بهتر از بقیه آغازگرهای استفاده شده، فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کنند. نتایج حاصله از مطالعات (Yamaoto *et al.*, 1994) در به کارگیری این آغازگرها نیز موید این موضوع بود.

بیشترین نسبت چندگانه موثر (۷۸) مربوط به آغازگر P9 و کمترین نسبت (۱۵) مربوط به آغازگر P6 بود. میانگین نسبت چندگانه موثر در این بررسی ۴۷/۴۷ بود. بیشترین شاخص نشانگری در این پژوهش ۱۵/۵۲۲ و مربوط به آغازگر P9 با ۷۸ باند و کمترین شاخص نشانگری ۱/۷۷ مربوط به آغازگر P6 با ۱۵ باند

بود. بیشترین قدرت تفکیک (۳۲/۹۳) مربوط به آغازگر P9 و کمترین قدرت تفکیک (۳/۷۶۷) مربوط به آغازگر P6 بود (جدول ۲). از آن جایی که آغازگرهایی که بیشترین شاخص نشانگری و نسبت چندگانه موثر را دارند، برای تشخیص و تعیین تنوع ژنتیکی موثرتر هستند، لذا آغازگرهای ۹، ۷، ۱۵ و ۱۶ از بین سایر آغازگرها مناسب‌تر تشخیص داده شدند.

آغازگر P9 دارای بالاترین محتوی GC (۷۵ درصد)، بیشترین قطعات چند شکل و بیشترین تراکم باندی بود. آغازگرهای با محتوی GC بالاتر، معمولاً باندهای بیشتری در RAPD تولید می‌کنند. در این خصوص آغازگر P11 اگرچه دارای محتوی GC (۷۵ درصد) بالایی بود. اما باندهای چند شکل کمتری نسبت به آغازگر P9 داشت. از آن جایی که ساختار شکلی و محتوی GC از فاکتورهای موثر در کارآیی آغازگرها محسوب می‌شوند (Takada *et al.*, 1998). به نظر می‌رسد این آغازگر دارای ساختار گره‌ای (Stem loop) یا سرسنجاقی (Hairpin loop) باشد.

در محاسبه ضرایب تشابه به روش جاکارد برای ۴۳ ژنوتیپ کاهو، ضرایب تشابه از صفر تا ۰/۳۲۴ متغیر بود. بیشترین تشابه به ترتیب، بین ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ و ۱۴ (۰/۳۲۴) و ژنوتیپ‌های شماره ۱۹ و ۲۰ (۰/۳۱۴) و ژنوتیپ‌های شماره ۷ و ۸ (۰/۳۰۰) به دست آمد. ویژگی‌های مشترک دو ژنوتیپ در نزدیک بودن شاخص‌های مورفولوژیک بود. کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های شماره ۸ و ۱۸، ۸ و ۱۴، ۲۸ و ۳۷ (صفر) به دست آمد (جدول ۳).

تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف کاهوی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA حاصل از داده‌های RAPD توانست ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی را در سطح تشابه ۰/۲۵ به چهار گروه تقسیم‌بندی کند (شکل ۲).

گروه اول شامل کاهوهای آبطویل، برازجان، سیاه دزفول، پیچ اهواز، بابل و ژنوتیپ‌های شماره ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵ ،۲۶ و ۲۷ بودند. از ویژگی‌های این گروه می‌توان به پراکندگی یکسان جغرافیایی ژنوتیپ‌ها اشاره کرد، به نحوی که تمامی ژنوتیپ‌ها، متعلق به منطقه جنوب کشور و تمامی لاین‌ها به مازندران تعلق دارند. این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از بررسی مورفولوژیک ژنوتیپ‌های مذکور (Mousavi *et al.*, 2012) مطابقت داشت. برای بررسی میزان همپوشانی داده‌های مورفولوژی و مولکولی مقایسه‌ای بین ماتریس تشابه مولکولی و مورفولوژیکی انجام شد. میزان همبستگی بین این دو نشانگر $r = ۰/۴۸$ به دست آمد که همبستگی مناسبی بین نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی است. با توجه به این که نشانگر RAPD می‌تواند کل ژنوم را

جدول ۳- ضرایب همبستگی تشابه جاکارد حاصل از داده‌های نشانگر RAPD در ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی

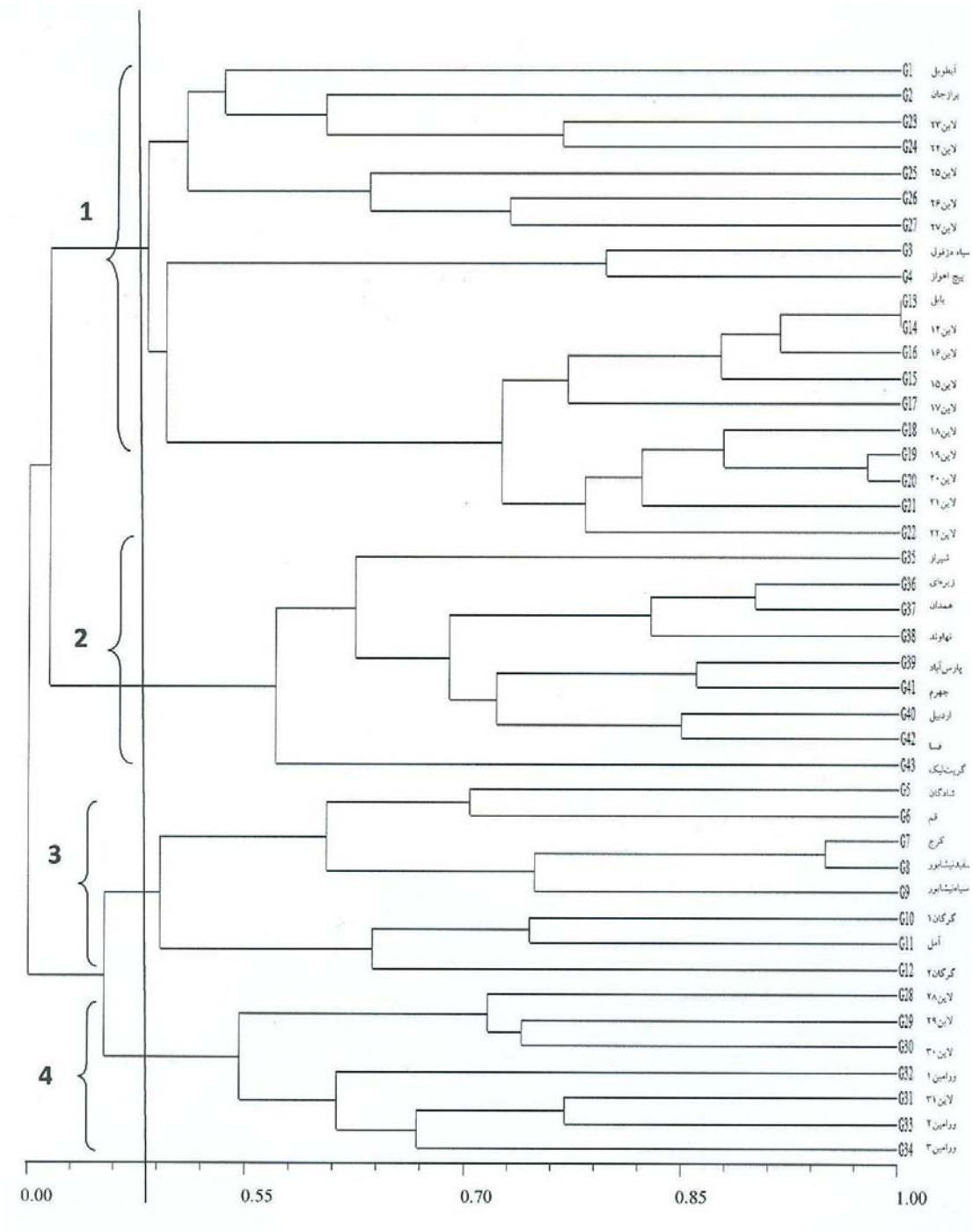
Table 3. Correlation coefficients Jaccard`s similarity based on RAPD data in Iranian lettuce genotypes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	1.000																						
2	0.120	1.000																					
3	0.076	0.172	1.000																				
4	0.044	0.077	0.229	1.000																			
5	0.043	0.055	0.068	0.120	1.000																		
6	0.041	0.020	0.085	0.072	0.186	1.000																	
7	0.052	0.051	0.051	0.097	1.124	0.241	1.000																
8	0.047	0.033	0.047	0.102	0.122	0.161	0.300	1.000															
9	0.080	0.065	0.086	0.060	0.093	0.098	0.022	0.193	1.000														
10	0.058	0.013	0.042	0.028	0.042	0.048	0.130	0.178	0.120	1.000													
11	0.034	0.020	0.041	0.057	0.026	0.063	0.090	0.141	0.141	0.205	1.000												
12	0.049	0.041	0.041	0.050	0.027	0.055	0.059	0.062	0.116	0.142	0.166	1.000											
13	0.075	0.074	0.060	0.040	0.073	0.044	0.013	0.021	0.027	0.070	0.036	0.014	1.000										
14	0.045	0.065	0.072	0.074	0.058	0.035	0.013	0.000	0.047	0.022	0.058	0.014	0.324	1.000									
15	0.054	0.053	0.082	0.077	0.053	0.014	0.027	0.007	0.027	0.007	0.053	0.029	0.247	0.295	1.000								
16	0.044	0.064	0.100	0.095	0.031	0.057	0.032	0.013	0.025	0.036	0.065	0.006	0.305	0.266	0.256	1.000							
17	0.051	0.064	0.064	0.073	0.050	0.013	0.053	0.041	0.046	0.036	0.050	0.020	0.193	0.207	0.019	0.280	1.000						
18	0.080	0.063	0.153	0.114	0.041	0.064	0.014	0.000	0.051	0.024	0.023	0.039	0.188	0.193	0.212	0.228	0.218	1.000					
19	1.064	0.056	0.098	0.108	0.063	0.049	0.039	0.013	0.038	0.028	0.027	0.013	0.238	0.186	0.212	0.296	0.256	0.289	1.000				
20	0.052	0.102	0.102	0.097	0.038	0.066	0.040	0.050	0.091	0.045	0.066	0.021	0.152	0.132	0.128	0.256	0.180	0.245	0.314	1.000			
21	0.081	0.118	0.073	0.097	0.058	0.036	0.047	0.020	0.069	0.037	0.059	0.036	0.181	0.167	0.193	0.200	0.209	0.205	0.284	0.233	1.000		
22	0.052	0.117	0.109	0.074	0.058	0.066	0.047	0.027	0.013	0.022	0.021	0.028	0.135	0.184	0.182	0.198	0.154	0.213	0.251	0.212	0.214	1.000	
23	0.106	0.144	0.097	0.092	0.052	0.044	0.041	0.028	0.063	0.030	0.029	0.014	0.139	0.171	0.160	0.108	0.125	0.112	0.183	0.145	0.211	0.190	1.000
24	0.094	0.133	0.085	0.041	0.013	0.038	0.058	0.022	0.065	0.023	0.038	0.038	0.075	0.106	0.068	0.034	0.064	0.072	0.094	0.074	0.116	0.132	0.215
25	0.132	0.071	0.071	0.032	0.037	0.200	0.040	0.020	0.039	0.036	0.057	0.058	0.033	0.046	0.078	0.060	0.025	0.043	0.025	0.026	0.026	0.068	0.093
26	0.135	0.080	0.052	0.032	0.045	0.043	0.026	0.042	0.026	0.029	0.028	0.044	0.094	0.116	0.064	0.068	0.046	0.052	0.039	0.033	0.055	0.069	0.087
27	0.024	0.170	0.095	0.056	0.061	0.054	0.025	0.053	0.018	0.034	0.019	0.013	0.102	0.093	0.104	0.113	0.077	0.109	0.083	0.123	0.072	0.171	0.103
28	0.079	0.094	0.055	0.072	0.085	0.072	0.091	0.038	0.051	0.032	0.031	0.023	0.052	0.043	0.069	0.065	0.081	0.065	0.064	0.075	0.044	0.059	0.045
29	0.088	0.054	0.067	0.068	0.086	0.075	0.063	0.088	0.037	0.070	0.021	0.040	0.037	0.030	0.045	0.055	0.069	0.068	0.081	0.063	0.057	0.063	0.031
30	0.067	0.059	0.038	0.060	0.058	0.075	0.100	0.073	0.076	0.078	0.051	0.051	0.027	0.026	0.057	0.054	0.061	0.060	0.060	0.055	0.062	0.062	0.056
31	0.045	0.044	0.051	0.073	0.071	0.081	0.098	0.095	0.068	0.052	0.035	0.043	0.033	0.026	0.034	0.052	0.046	0.035	0.045	0.083	0.054	0.061	0.027
32	0.027	0.054	0.033	0.056	0.091	0.062	0.065	0.069	0.050	0.048	0.070	0.054	0.014	0.035	0.044	0.034	0.020	0.022	0.034	0.035	0.035	0.028	0.059
33	0.038	0.031	0.012	0.032	0.100	0.115	0.115	0.129	0.083	0.052	0.082	0.035	0.034	0.054	0.071	0.046	0.032	0.036	0.052	0.033	0.069	0.068	0.063
34	0.019	0.032	0.012	0.026	0.066	0.067	0.070	0.106	0.033	0.104	0.092	0.060	0.006	0.013	0.027	0.013	0.013	0.014	0.026	0.020	0.020	0.034	0.027
35	0.076	0.067	0.040	0.055	0.039	0.037	0.080	0.029	0.071	0.031	0.022	0.007	0.043	0.034	0.036	0.034	0.034	0.030	0.033	0.057	0.035	0.049	0.043
36	0.070	0.055	0.033	0.064	0.084	0.046	0.043	0.029	0.020	0.023	0.007	0.015	0.067	0.058	0.029	0.034	0.057	0.023	0.034	0.035	0.066	0.058	0.084
37	0.047	0.033	0.061	0.048	0.040	0.045	0.027	0.029	0.042	0.015	0.022	0.007	0.035	0.042	0.028	0.041	0.056	0.046	0.048	0.050	0.042	0.050	0.067
38	0.064	0.041	0.063	0.065	0.070	0.023	0.021	0.022	0.043	0.024	0.047	0.031	0.004	0.043	0.029	0.035	0.065	0.039	0.049	0.043	0.059	0.051	0.037
39	0.092	0.054	0.076	0.041	0.061	0.030	0.027	0.037	0.042	0.007	0.022	0.022	0.043	0.042	0.044	0.056	0.034	0.030	0.041	0.020	0.050	0.065	0.067
40	0.066	0.079	0.079	0.032	0.051	0.043	0.040	0.043	0.040	0.014	0.021	0.058	0.062	0.047	0.034	0.012	0.046	0.043	0.045	0.019	0.040	0.054	0.055
41	0.069	0.098	0.054	0.055	0.046	0.037	0.049	0.029	0.049	0.007	0.045	0.037	0.035	0.020	0.028	0.020	0.034	0.022	0.033	0.027	0.042	0.049	0.051
42	0.069	0.054	0.054	0.078	0.033	0.014	0.020	0.044	0.042	0.023	0.053	0.038	0.021	0.042	0.036	0.020	0.034	0.015	0.027	0.035	0.065	0.057	0.075
43	0.080	0.108	0.058	0.060	0.051	0.043	0.054	0.042	0.046	0.044	0.050	0.082	0.013	0.006	0.006	0.019	0.019	0.043	0.059	0.040	0.062	0.047	0.048

Table 3. Continued

ادامه جدول ۳

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
24	1.000																			
25	0.072	1.000																		
26	0.074	0.192	1.000																	
27	0.091	0.114	0.198	1.000																
28	0.080	0.050	0.075	0.133	1.000															
29	0.025	0.076	0.114	0.156	0.190	1.000														
30	0.021	0.540	0.062	0.079	0.193	0.202	1.000													
31	0.027	0.046	0.054	0.084	0.082	0.165	0.183	1.000												
32	0.028	0.034	0.028	0.061	0.071	0.104	0.132	0.147	1.000											
33	0.020	0.053	0.092	0.057	0.082	0.098	0.149	0.217	0.166	1.000										
34	0.007	0.040	0.048	0.650	0.110	0.085	0.086	0.124	0.116	0.214	1.000									
35	0.045	0.086	0.082	0.039	0.530	0.059	0.065	0.102	0.068	0.087	0.073	1.000								
36	0.054	0.072	0.043	0.026	0.046	0.046	0.043	0.057	0.096	0.050	0.075	0.177	1.000							
37	0.061	0.049	0.028	0.026	0.000	0.032	0.013	0.064	0.061	0.027	0.028	0.155	0.277	1.000						
38	0.022	0.058	0.036	0.033	0.007	0.046	0.044	0.058	0.046	0.058	0.044	0.161	0.229	0.259	1.000					
39	0.112	0.095	0.050	0.097	0.030	0.066	0.020	0.041	0.061	0.027	0.043	0.119	0.232	0.228	0.247	1.000				
40	0.065	0.082	0.033	0.044	0.014	0.021	0.033	0.046	0.035	0.040	0.026	0.155	0.168	0.203	0.230	0.223	1.000			
41	0.085	0.200	0.065	0.097	0.045	0.073	0.072	0.071	0.060	0.034	0.028	0.118	0.130	0.119	0.151	0.258	0.201	1.000		
42	0.061	0.087	0.057	0.068	0.062	0.045	0.050	0.056	0.029	0.020	0.043	0.155	0.150	0.129	0.162	0.138	0.254	0.215	1.000	
43	0.081	0.082	0.069	0.057	0.058	0.076	0.033	0.090	0.057	0.054	0.077	0.064	0.114	0.072	0.099	0.129	0.114	0.192	0.203	1.000



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۴۳ ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی (جدول ۱) با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA حاصل از داده‌های RAPD

Fig. 2. Dendrogram of 43 Iranian lettuce genotypes (Table 1) constructed by Jaccard`s similarity coefficients and UPGMA method based on RAPD data

پوشش دهد و چندشکلی آن را بررسی کند (Kumat, 1999؛ William *et al.*, 1990) می‌توان نتیجه گرفت صفاتی که توسط مکان‌های محدودی از ژنوم کنترل می‌شوند نتوانسته‌اند با نشانگر RAPD تطابق نشان دهند. در مطالعات مختلفی نتایج نشانگرهای مورفولوژیکی با نشانگرهای مولکولی با هم مقایسه شده و همبستگی مناسب بین این دو روش را گزارش کرده‌اند (Vollmann, 2005؛ Semagn, 2002). به عبارت دیگر در این گروه بین ویژگی‌های مورفولوژیک و گروه‌بندی RAPD تطابق مناسبی وجود داشت. در این گروه بر اساس جدول ماتریس تشابه، بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های سیاه دزفول و پیچ اهواز (۰/۳۲۴) و سپس لاین‌های شماره ۱۹ و ۲۰ (۰/۳۱۴) بود. با توجه به این که این دو ژنوتیپ در یک منطقه کشت و کار می‌شوند این تشابه بالا، احتمال یکسان بودن این ژنوتیپ‌ها را تقویت می‌کند. کمترین شباهت بین لاین‌های شماره ۱۵ و۱۷ (۰/۰۱۹) بود.

گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های شیراز، زیره‌ای، همدان، نهاوند، پارس‌آباد، اردبیل، جهرم، فسا و رقم گریت لیک بودند. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های همدان و نهاوند (۰/۲۷۷) دیده شد با توجه به این که این دو ژنوتیپ در یک منطقه کشت و کار می‌شوند این تشابه بالا، احتمال یکسان بودن این دو ژنوتیپ را تقویت می‌کند. در این گروه کمترین تشابه بین ژنوتیپ شیراز و رقم گریت‌لیک دیده شد. رقم گریت لیک یک رقم خارجی و نسبت به سایر ژنوتیپ‌های این گروه در فاصله دورتری قرار گرفت. این امر احتمالاً به دلیل تفاوت در منشاء جغرافیایی این رقم باشد. پراکندگی مختلف جغرافیایی ژنوتیپ‌های موجود در این گروه (فارس، اردبیل و همدان) می‌تواند دلیلی بر دارا بودن زمینه ژنتیکی نزدیک آن‌ها با یک دیگر باشد. به عبارت دیگر این مسئله شاید، احتمال چند نامی بودن بعضی از ژنوتیپ‌های بومی کشور را توجیه کند. زیرا تفاوت‌های مورفولوژیکی موجود نیز ممکن است ناشی از تفاوت شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناطق مورد گسترش باشد.

گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های شادگانی، قم، کرج، سفید نیشابور، سیاه نیشابور، گرگان۱، گرگان ۲ و رقم وارش بودند. بیشترین ماتریس تشابه به ژنوتیپ‌های کرج و سفید نیشابور (۰/۳۰۰) و کمترین میزان به ژنوتیپ شادگان و رقم وارش (۰/۰۲۶) تعلق داشت. ژنوتیپ‌های این گروه علی رغم گستردگی در مناطق مختلف جغرافیایی (شمال، جنوب و مرکز) احتمالاً دارای زمینه ژنتیکی نزدیک به یک دیگر هستند.

گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های ورامین۱، ورامین۲، ورامین۳ و لاین‌های شماره ۲۸ ،۲۹، ۳۰ و ۳۱ بودند. در این شاخه بیشترین ماتریس تشابه به لاین ۳۱ و ژنوتیپ ورامین ۲، (۰/۲۱۷) و کمترین میزان تشابه به لاین ۲۸ و ورامین ۱ (۰/۰۷۱) تعلق داشت. قرار گرفتن لاین‌های شمال کشور و ژنوتیپ ورامین در یک شاخه در

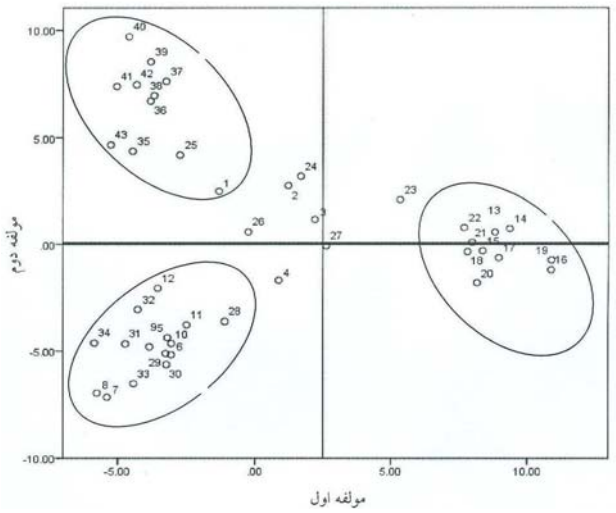
تجزیه خوشه حاصل از داده‌های RAPD، دلیل بر قرابت ژنتیکی نزدیک به هم این ژنوتیپ‌هاست.

نتیجه مناسبی که از بررسی ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی به دست آمد، وجود سطح چند شکلی بالا بین این ژنوتیپ‌هاست. همچنین تنوع ژنتیکی ۴۴ توده کاهو نتایج نشان داد که در مجموع ۲۱۶ باند از ۷ آغازگر RAPD، ۴ آغازگر I- SSR و ۵ آغازگر AFLP به دست آمد و از این تعداد، ۱۹۶ باند چند شکل بودند و بین توده‌ها بیش از ۹۰ درصد چند شکلی دیده شد (Tae-jin *et al*., 2007).

در بررسی (Yamamoto *et al*., 1994) در مورد تنوع ژنتیکی برخی ارقام کاهو با استفاده از نشانگر RAPD، حدود ۴۷ درصد چندشکلی به دست آمد.

در تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCoA) بین ۴۳ ژنوتیپ، بر اساس داده‌های مولکولی سه مولفه شناسایی شدند که در مجموع ۶۶/۸۱ درصد از کل واریانس را توجیه کردند. سهم مولفه اول ۳۰/۲۵ درصد سهم مولفه دوم ۲۱/۵۵ درصد و سهم مولفه سوم ۱۵/۰۲ درصد از کل واریانس بود.

نمودار پراکنش PCOA (شکل ۳) الگوی دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی مورد بررسی با استفاده از دو مولفه اول حاصل از تجزیه فاکتور داده‌های RAPD بر اساس دو مولفه اول توانست ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کند که تا حدود زیادی مبین گروه‌بندی‌های انجام شده به روش تجزیه خوشه‌ای بود.



شکل ۳- الگوی دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی (جدول ۱) مورد بررسی با استفاده از دو مولفه اول حاصل از تجزیه فاکتور داده‌های RAPD.

Fig. 3. Distribution graph of 43 Iranian lettuce genotypes (Table 1) by first and second components (PCOA) based on factor analysis RAPD data

نتایج حاصله از مطالعات RAPD در این بررسی نشان داد آغازگرهای ۷، ۹، ۱۵ و ۱۶ دارای بیشترین نسبت چندگانه موثر و بیشترین شاخص نشانگری در این پژوهش بودند. لذا این آغازگرها برای تشخیص و تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف کاهوی ایرانی موثرتر هستند. همچنین نتیجه مناسبی که از بررسی ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی با استفاده از این تکنیک به دست آمد وجود سطح چند شکلی بالا بین ژنوتیپ‌ها بود. وجود سطح چند شکلی بالا در بین ژنوتیپ‌ها مورد بررسی کاهوی ایرانی در این پژوهش، به نحوی تایید‌کننده نظریه خاستگاه احتمالی و موطن کاهو در ایران است. با توجه به تنوع بالای ژنوتیپ‌ها کاهو در ایران که به عنوان ذخایر ارزشمند برای برنامه‌های به‌نژادی به شمار می‌روند، به کارگیری روش تلاقی در این گیاه ابزاری کارآمد برای فایق آمدن بر نارسایی‌های زراعی و افزایش تحمل نتاج به تنش‌های محیطی، بیماری‌ها، عملکرد و بهبود کیفیت محسوب می‌شود.

References

Anonymous 2010. faostat.fao.org/faostat/sevlet/ Cited 20 April 2010.

Boukema, I. W., Hazekamp, T. H., and Hintum, T. H. J. L. 1990. The CGN Collection Reviews: The CGN Lettuce Collection. Wageningen, Centre for Genetic Resource, 2-5.

DeVries, I. M. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. Genetic Resources and Crop Evolution 44: 165-174.

Funk, V .A., Bayer, R. J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J. L., Baldwin, B. G., Garcia Jacas, N., Susanna, A., and Jansen, R. K. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a super tree to understand the diversity and distribution of the Compositae. Biologiske Skrifter 55: 343-374.

Hancock, J. F. 2004. Plant Evolution and the Origin of Crop Species. 2nd ed. CABI Publishing, Wellingford, UK.

Hwang, S. J., Yoo, K. O., Ho, Q. S., Kim, H. J., and Lim, H. T. 2002. Intraspecific relationships of *Lactuca sativa* cultivars based on external morphology and RAPD markers. Journal of Korean Society of Horticultural Science 43: 575-581.

Kesseli, R. V., Paran, I., and Michelmore, R. W. 1994. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. Genetics 136: 1435-1446.

Kristkova, E., Dolezavola, I., Lebeda, A., Vinter, V., and Novotna, A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. HortScience 35: 113-129.

Kumar, L. S. 1999. DNA markers in plant improvement. Biotecnology Advances 17: 143-183.

Landry, B. S., Kessel, I R. V., Farrara, B., and Michelmore, R. W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics 116: 331–337.

Lebeda, A., Dolezalova, I., Krıstkova, E., Kitner, M., Petrzelova, I., Mieslerova, B., and Novotna, A. 2009. Wild Lactuca germplasm for lettuce breeding: current status gaps and challenges. Euphytica 170: 15-34.

Lebeda, A., Ryder, E. J., Grube, R., Dolezalova, I., and Kristkova, E. 2007. Lettuce (Asteraceae; *Lactuca* spp). pp. 377-472. In: Singh R. J. (ed.), Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Vol. 3, Vegetable Crops. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Lindquist, K. 1960. Cytogenetic studies in the serriola group of Lactuca. Hereditas 46: 75-151.

Mikel, M. A. 2007. Genealogy of contemporary north American lettuce. HortScience 42: 489-493.

Mousavi, S. H., Hassandoght, M. R., Choukan, R., Sepahvanad, N., and Khosrowshahli., M. 2012. Assessment of qualitative and quantitative traits in commercial Iranian lettuce (*lactuca sativa* L.) genotypes. Annals of Biological Research 3 (9):4352-4360.

Mullis, K. B., Ferre, F., and Gibbs, R. A. 1994. The Polymerase Chain Reaction. Birkhauser, Basel, Swetzerland.

Semagn, K. 2002. Genetic relationships among ten endod types as reveald by a combination of morphological, RAPD and AFLP markers. Hereditas 137: 149-158.

Singh, V., Pand, P. D., and Jian, A. D. 1997. A Text Book of Botany, Angiosperms. Rastogi Publication, India.

Suthumchai, W., Matsui, T., Okuda, N., and Kosugi, Y. 2006. Classification of lettuce cultivars by RAPD analysis. Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management 13(2): 58-63.

Tae-jin, T., Sum, J. Y., Jang, W., and Bae kim, W. 2007. Genetic relationships of *Lactuca* spp. Reveald by RAPD, inter-SSR, AFLP, and PCR-RFLP analysis. Journal of Crop Science and Biotechnology 10: 29-34.

Takada, T., Shimada, T., Nomura, K., Ozaki, T., Haji, T., Yamaguchi, M., and Yoshida, M. 1998. Classification of apricot varieties by RAPD analysis. Journal of Japanese Society of Horticultural Science 67: 21-27.

Treuren, R. 2001. Efficiency of reduced primer selectivity and bulked DNA analysis for the rapid detection of AFLP polymorphisms in a range of crop species. Euphytica, 117: 27–37.

Vollmann, J., Grausgnxber, H., Dryzhynik, Stiff., and Lelley., T. 2005. Genetic diversity in camelina germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. Plant Breeding, 124: 446-453.

Waycott, W., and Fort, S. B. 1994. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analyses. Genome 85: 239–244.

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

Wim., J., Koopman, M., Martin, J., and Ronald, G. 2001. Species relationships in (*Lactuca sativa*. L.) inferred from AFLP fingerprints. American Journal of Botany 88(10): 1881-1887.

Yamamoto, T., Nishikawa, A., and Oeda, K. 1994. DNA polymorphisms in *Oryza sativa* L. and *Lactuca sativa* L. amplified by arbitrary primed PCR. Euphytica 78: 143–148.