ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۸۴-۱۷۵

تنوع مولکولی و خویشاوندی ژنتیکی توده‌های *Carthamus lanatus* در رویشگاه‌های استان گلستان

Molecular variation and genetic relationship of *Carthamus lanatus* ecotypes in Golestan province stands

سمانه نیکدل*[۱]، محمدهادی پهلوانی[۱]، خلیل زینلی‌نژاد[۱]، احد یامچی[۱]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیار و استادیاران، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Nikdel S[*1], Pahlevani MH[1], Zenalinezhad KH[1], Yamchi A[1]

1. Graduated MSc Student, Associate Professor, Assistant Professors, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: samanenikdel@ymail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۷- تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

گونه‌های گیاهی وحشی یکی از منابع مهم ژنتیکی برای انتقال ژن‌های خصوصیات پرارزش همانند سازگاری و مقاومت به بیماری‌ها و آفات به خویشاوندان زراعی آنها محسوب می‌شوند. در این پژوهش توده‌های وحشی گونه *Carthamus lanatus* از هشت رویشگاه مختلف استان گلستان جمع‌آوری شد و توسط نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۴ نشانگر مدنظر، ۹ نشانگر به میزان ۲۶/۰۴ درصد چندشکلی نشان دادند که از این بین، نشانگر هشت از کارایی بهتری نسبت به سایر نشانگرها برخوردار بود. تجزیه کلاستر، هشت توده مورد بررسی را به سه گروه مجزا کرد. در گروه اول، توده بندرترکمن، در گروه دو، توده جمع‌آوری شده از حد واسط بندرترکمن-آق‌قلا و سایر توده‌ها نیز در گروه سوم قرار گرفتند. همچنین بر اساس ماتریس فواصل ژنتیکی‌نئی، توده جمع‌آوری شده از جزیره آشورآده در بیشترین فاصله با سایر توده‌ها وتوده‌های اینچه‌برون و گمیشان در کمترین فاصله نسبت به هم قرار داشتند. با توجه به اطلاعات به‌دست آمده، آغازگر سه برای توده گمیشان و آغازگر پنج برای توده جزیره آشورآده اختصاصی بودند. همچنین آغازگر چهار در جایگاه ۸۵۰ bp و آغازگر یک در جایگاه ۹۰۰ bp فقط برای افراد توده جزیره آشورآده و آغازگر یک در جایگاه ۱۰۲۵ bp تنها برای افراد توده اینچه‌برون تولید باند کردند. تفکیک صحیح بر مبنای مکان جغرافیایی محل رویش، کارایی آغازگرهای بین ریزماهواره‌ای و اختلافات ژنومی بین هشت توده مورد بررسی را تایید می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که توده‌های *C. lanatus* موجود در رویشگاه-های استان گلستان از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردارند و اینکه فاصله جغرافیایی عاملی در ایجاد و حفظ تفاوت ژنتیکی بین این توده‌ها بود.

واژه‌های کلیدی

تجزیه کلاستر
فاصله ژنتیکی نئی
نشانگر
ISSR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

مقدمه

جنس *Carthamus* از خانواده *Asteraceae* شامل حدود ۲۰ گونه شناخته شده می‌باشد که *Carthamus tinctorius* تنها گونه زراعی این جنس به حساب می‌آید (Vilatersana et al. 2000, 2005). جنس *Carthamus* عمدتا در محیط‌های خشک و نیمه خشک یافت می‌شود و بسیار متحمل به تنش خشکی است (Marinova and Riehl 2009). این جنس نسبتا کوچک به دو دسته، گونه زراعی (گلرنگ) و گونه‌های وحشی یا غیر زراعی تقسیم می‌شود (Bowles 2010). کشت گلرنگ در گذشته، برای استفاده از گل آن بود که حاوی رنگدانه کاردیمین و عاملی برای رنگ‌آمیزی پارچه می‌باشد. اما امروزه از دانه این گیاه برای استحصال روغن، خوراک پرندگان و علوفه دام و در آماده‌سازی مواد غذایی و داروهای گیاهی و لوازم آرایشی استفاده می‌شود (Mundel et al. 2004). روغن خوراکی حاصل از ارقام گلرنگ دارای بالاترین میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در بین محصولات دانه روغنی است و به دلیل اینکه حاوی اسید اولئیک و اسید لینولئیک است، از با کیفیت‌ترین روغن‌های گیاهی محسوب می‌شود (Knowles 1955). یکی از گونه‌های وحشی این جنس، *Carthamus lanatus* است که از خویشاوندان نسبتا نزدیک گلرنگ زراعی محسوب می‌شود (Heaton and Klislewicz 1981). به همین دلیل به آن گلرنگ صحرایی و یا زعفرانی بیابانی نیز گفته می‌شود (Zahedi 1994). *C. lanatus* یک گیاه دگرگشن (۲n = ۴۴)، یک ساله، زمستانه با ریشه‌های کم‌عمق و سطحی، دارای ساقه‌های بلند، عمودی و خشبی بوده که ارتفاع بوته آن تا دو متر می‌رسد. این گیاه منبع خوبی برای خصوصیات مقاومت یا تحمل به بیماری‌های مختلف و آفات و سازگاری به شرایط نامناسب محیطی به ویژه تنش‌های غیرزیستی می‌باشد. این خصوصیات به همراه بالا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن دانه و خواص دارویی و همچنین پراکندگی بالای این گونه در ایران، *C. lanatus* را به یک گونه دارای پتانسیل برای تولد یک گونه زراعی جدید و یا منبع ژنتیکی با ارزش برای اصلاح گلرنگ زراعی مبدل کرده است (Kessler 1987; Taskova et al. 2003; Vilatersana et al. 2000, 2005; Carapetain and Zarei 2005; Sabzalian et al. 2008). طبق برخی گزارش‌های موجود، *C. lanatus* به عنوان علف هرز طبقه‌بندی شده و به خوبی می‌تواند در خارج از محدوده بومی خود رشد کند (Bowles 2010). بذر این گونه وحشی اغلب در خاک و به حالت خواب بیش از چندین سال باقی می‌ماند و تا سالیان درازی در محصولات زراعی بعدی به عنوان علف هرز سبز می‌شود (Gruber and Claupein 2007). بنابراین کنترل دائمی این علف هرز به دلیل حضور تعداد زیادی بذر خفته در خاک بسیار دشوار است (Grace et al. 2002). به کارگیری مناسب از منابع وحشی و غیر زراعی علاوه بر روشن - بودن اندازه و ماهیت ژن‌های موردنظر، مستلزم آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های وحشی و درجه قرابت ژنتیکی آنها با خویشاوند زراعی نیز می‌باشد (Safavi et al. 2010). از آنجا که اساس ایجاد تنوع ژنتیکی و چند شکلی‌های طبیعی ناشی از تغییر توالی‌های DNA در ژنوم افراد بین و داخل گونه می‌باشد، امروزه ارزیابی الگوهای تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی به جزیی جداناشدنی در بسیاری از پژوهش‌های بیولوژی تکاملی، ژنتیک حفاظتی، ژنتیک اکولوژی و اصلاح گیاهان تبدیل شده است. این نشانگرها در زمره پرکاربردترین نشانگرها هستند، زیرا به تعداد زیاد و معمولا در نواحی غیر رمزکننده ژنوم واقع شدند. همچنین این نشانگرها برخلاف نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، از نظر نوع و تعداد نامحدودند و تحت تاثیر عوامل محیطی و با مراحل نمو گیاهی قرار نمی‌گیرند (Ahmadikhah 2009).

ISSR[1] یک نشانگر شبه RAPD[2] است که نیازی به داشتن شناخت قبلی از توالی ژنومی ندارد و تکنیکی است که توالی‌های ریزماهواره‌ای را به عنوان آغازگر در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ایجاد نشانگرهای چند جایگاهی مورد استفاده قرار می‌دهد (Reddy et al. 2002). ریزماهواره‌ها، تکرارهای کوتاه پشت سرهمی هستند که در همه ژنوم‌های یوکاریوتی حاضر هستند. آن‌ها در سراسر ژنوم پراکنده شده و در تعداد واحدهای تکراری متفاوت هستند (Tautz and Renz 1984). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر ISSR، روشی ساده، سریع، غیراختصاصی و کارآمد با تکرارپذیری بالا برای آشکارسازی

[1] ISSR (Inter-simple sequence repeat amplification)
[2] RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

چندشکلی‌ها در طول ژنوم است (Ahmadikhah 2009). این خصوصیات موجب شد تا گزارشات روزافزونی در به کارگیری نشانگرهای مولکولی به ویژه ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی گونه-های گیاهی ارائه شود. Ash et al. (2002) به بررسی تنوع ژنتیکی *C. lanatus* در استرالیا با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. آن‌ها در این مطالعه ۲۹ نمونه DNA از گیاه *C. lanatus* را توسط صد نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند که ۷ آغازگر در آشکارسازی تنوع ژنتیکی موفق بودند. ژنوتیپ‌های *C. lanatus* مورد مطالعه در دو گروه شمالی و جنوبی به‌ترتیب با تنوع کمتر از ۲۲ و ۳۳ درصد بر اساس شاخص تنوع ژنتیکی شانون قرار گرفتند. هم چنین ژنوتیپ زراعی با فاصله ژنتیکی زیادی در گروهی مجزا قرار گرفت. همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای از توانایی بالایی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی برخوردار هستند. Golkar et al. (2011) به بررسی تنوع ژنتیکی گونه زراعی گلرنگ بر اساس ISSR پرداختند. تنوع ژنتیکی شانزده ژنوتیپ گلرنگ از مناطق جغرافیایی مختلف ایران و برخی با منشا جدید، توسط ۳۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۳۰ آغازگر مورد بررسی، در ۲۰ مورد قطعات چندشکل ایجاد شد. تجزیه خوشه‌بندی بر اساس نشانگرهای ISSR، ارقام مورد مطالعه را به گروه‌های مجزا دارای ارتباط منطقی با منشا جغرافیایی آن‌ها، تقسیم کرد. استان گلستان از لحاظ دارا بودن انواع گونه‌های وحشی گلرنگ از جمله *C. lanatus* یک منطقه بسیار غنی محسوب می‌شود، طوری‌که منبع ارزشمند و بالقوه‌ای از ژن‌های مفید را در اختیار اصلاح‌کنندگان گلرنگ قرار می دهد. شناسایی نمونه‌های برتر این گیاه و استفاده از ترکیبات مفید آن می‌تواند دستور کار مطالعات قرار گیرد. به منظور حفاظت از جوامع طبیعی گونه *C. lanatus* به عنوان یک محصول زراعی بالقوه و همچنین استفاده از ژن‌های موجود در این ذخیره‌گاه برای بهبود خصوصیات گونه زراعی گلرنگ و همچنین شناخت بیشتر این گونه از جنبه مدیریت علف‌های هرز این مطالعه با اهداف (۱) تعیین تنوع و پراکنش ژنتیکی توده‌ها و (۲) تخمین قرابت ژنتیکی درون و بین توده‌های *C.lanatus* در رویشگاه‌های شمال ایران، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ انجام شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی بین توده‌ای، از هشت جمعیت *C. lanatus* بومی استان گلستان استفاده شد. جمع‌آوری بذور توده‌ها در مرداد ماه سال ۱۳۹۱ از هشت منطقه‌ی رویش این گونه در استان گلستان صورت گرفت (جدول ۱). سه ماه پس از جمع‌آوری بذور و همراه با کاهش رطوبت بذور، از دو روش شکستن خواب بذر استفاده شد تا بذور آماده جوانه‌زنی و ایجاد گیاهچه شوند. در روش اول از گرمادهی بذور ضدعفونی شده در آون (۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت ساعت) و در روش دوم از تیمار جیبرلین (خیسانیدن بذور ضدعفونی شده در جیبرلین ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد (BagMohammadi 1390). ضدعفونی بذور در هیپوکلریت‌سدیم ۵ درصد به مدت دو دقیقه و سپس شستشو با آب مقطر انجام شد. پس از جوانه دار شدن بذور و رشد کافی آنها، نمونه‌گیری از گیاهچه‌های هر جمعیت با استفاده از قیچی استریل انجام شد. تعداد گیاهچه‌های نمونه‌گیری شده در هر توده متفاوت بود (جدول۱). نمونه‌های برگی در هاون‌های چینی استریل شده توسط ازت مایع کوبیده شدند. سپس ۰/۲ گرم از پودر حاصله را در تیوپ‌های دو میلی‌لیتری ریخته و تا زمان استخراج DNA درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. استخراج DNA به روش Doyle and Doyle (1978) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از روش الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. در این تحقیق از ۹ آغازگر تصادفی بین ریزماهواره‌ای (ISSR) که در مطالعات قبلی توسط سایر محققین مورد استفاده قرار گرفته بود استفاده شد Ash et al. (2002; BaghMohammadi 2011). آغازگرها از شرکت Metabion Internationl AG آلمان تهیه شدند. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول۲ آورده شده‌است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر (یک میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۲ میکرولیتر دزوکسی نوکلئوتیدها (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

جدول ۱- نام، تعداد نمونه و ناحیه جغرافیایی جمعیت‌های *Carthamus lanatus* جمع‌آوری‌شده از استان گلستان

جمعیت (توده)	تعداد نمونه در توده	منطقه
CL_1	۹	اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)*
CL_2	۹	بندر ترکن
CL_3	۱۰	حدواسط بندر ترکمن-آق قلا
CL_4	۱۰	حدواسط بندر ترکمن-گمیشان
CL_5	۱۰	گمیشان
CL_6	۹	حدواسط گمیشان-آق قلا
CL_7	۱۰	اینچه برون
CL_8	۴	جزیره آشوراده

* جمع‌آوری شده از ناحیه اینچه برون در سال ۱۳۹۰، که یک بار در مزرعه آموزشی و پژوهشی شماره‌ی یک دانشگاه تکثیر شده‌اند.

جدول۲- اطلاعات چندشکل آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای توده‌های *C. lanatus*

نام آغازگر	توالی	دمای اتصال مورد استفاده (°C)	دمای TM پیشنهادی (°C)	تعداد باند تولید شده	تعداد باند چندشکل	شاخص اطلاعات چندشکل (PIC)
ISSR1	5'-$(CA)_8$ATC-3'	۵۰	۵۵	۱۷	۷	۰/۳۳
ISSR2	5'-$(CA)_7$GCG-3'	۵۰	۵۵	۷	۳	۰/۳۶
ISSR3	5'-$(GA)_8$C-3'	۴۷	۵۲	۱۰	۱	۰/۲۷
ISSR4	5'-$(CA)_8$AGT-3'	۵۰	۵۵	۹	۳	۰/۲۴
ISSR5	5'- $(GACA)_5$ -3'	۵۳	۵۸	۹	۲	۰/۴۰
ISSR6	5'-GGG$(TGGGG)_2$TG-3'	۵۲	۵۷	۸	۳	۰/۴۷
ISSR7	5'-$(AG)_8$GCC-3'	۵۴	۵۹	۱۲	۱	۰/۱۸
ISSR8	5'- $(TG)_8$G -3'	۴۷	۵۲	۱۱	۲	۰/۵۰
ISSR9	5'-$(AG)_8$CTC-3'	۵۲	۵۷	۱۳	۳	۰/۳۲
تعدادکل				۹۶	۲۵	
متوسط				۱۰/۶۷	۲/۷۸	۰/۳۴

۰/۰۵ میکرولیتر تک DNA پلیمراز (۵ U)، سه نانوگرم DNA، یک میکرولیتر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T Gradiant Biometra مدل RS 232 انجام پذیرفت. بهترین میزان کلریدمنیزیم، دزوکسی‌نوکلئوتیدها، رشته الگو، DNA پلیمراز و همچنین تعداد چرخه PCR با کاربرد غلظت‌های مختلف در آزمایشات متفاوت تعیین شد. در این تحقیق از ۹ برنامه متفاوت چرخه‌های حرارتی به طور اختصاصی برای هر کدام از آغازگرها استفاده شد. دمای اتصال مورد استفاده برای هر آغازگر طبق دمای TM[1] ذکر شده در جدول ۲ و حدود ۵ درجه کمتر از دمای TM پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده آغازگرها بود (Gallaghery and Wiley 2008). به این ترتیب چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (FAO/IAEA 2010) عبارت بود از: یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت هفت دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ °C به مدت

[1] Melting temperature

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای $^{\circ}C$ ۵۳-۴۷ به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط به مدت دو دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۷۲، یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۷۲ و مرحله نگهداری در دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت یک ساعت. برای الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از تهیه عکس از ژل آگارز که برای آشکارسازی محصولات PCR توسط دستگاه ژل داکیومنت انجام شد، باندهایی که چندشکلی نشان دادند به صورت یک (حضور) و صفر (عدم-حضور) امتیازبندی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا ماتریس دوتایی صفر و یک برای هر نمونه بر مبنای چندشکلی توسط نشانگرها تشکیل شد. مرحله‌ی بعدی گروه‌بندی آن‌ها بر اساس درجه شباهت یا تفاوت آن‌ها است. تشکیل ماتریس فاصله‌ی ژنتیکی نئی بین توده‌های *C. lanatus* و رسم دندروگرام بر اساس فاصله ژنتیکی نئی به روش UPGMA به وسیله نرم‌افزار Pop gene ver 1.31 (Nei et al. 1973, 1975) صورت گرفت. محتوی اطلاعات چند شکل (PIC)[1] بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi 1996).

$$PIC = \sum_{i=1}^{n} 2p_i(1-p_i)$$

که در این فرمول i شماره جایگاه و p_i فراوانی آلل جایگاه iام می‌باشد که برای هر آغازگر، به صورت جداگانه مورد محاسبه قرار گرفت. میزان اطلاعات چندشکل برای نشانگرهای غالب حداکثر ۰/۵ می‌باشد (Ahmadikhah 2010).

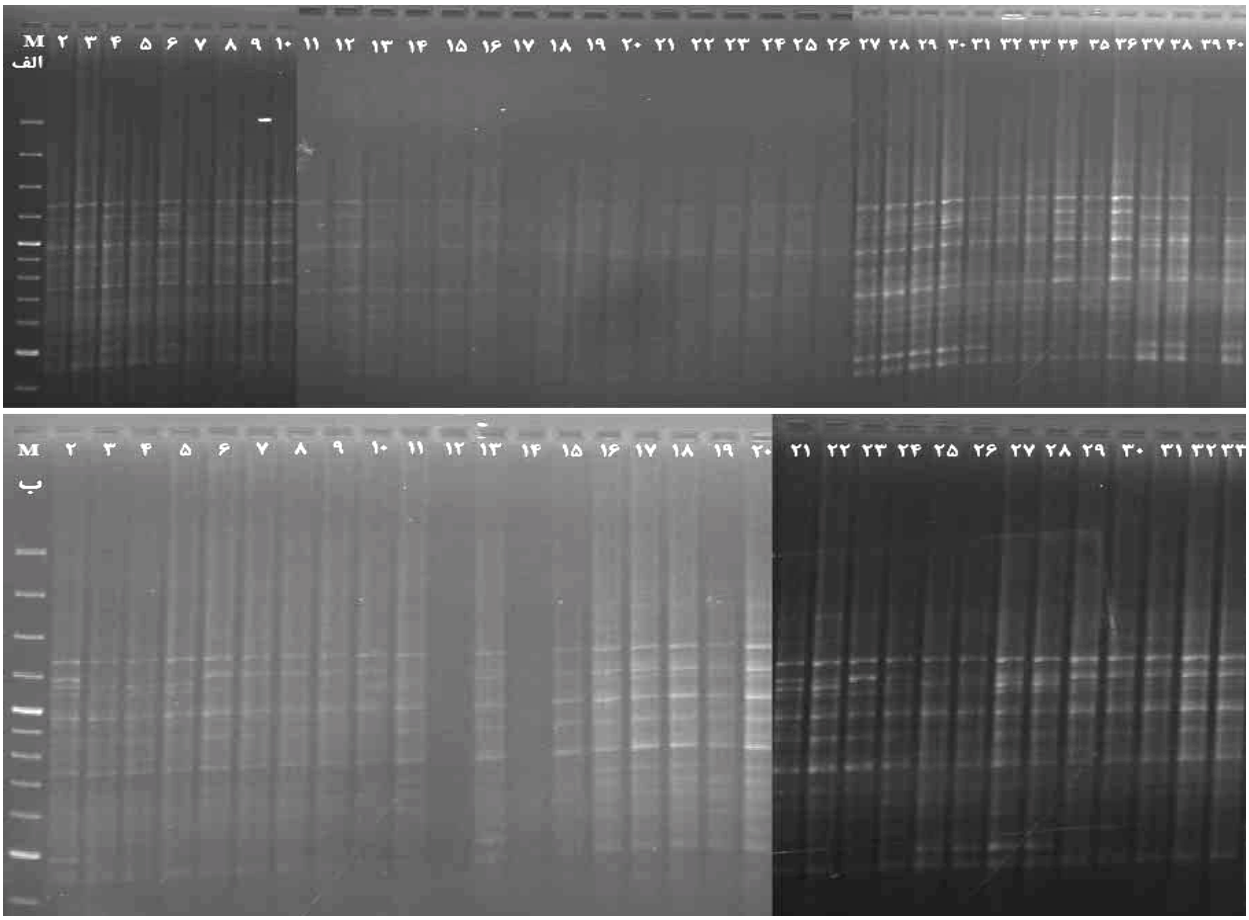
نتایج و بحث

از ۲۴ آغازگر مورد استفاده برای PCR نمونه‌ها، ۹ آغازگر که چندشکلی نشان دادند برای کلیه ۷۱ نمونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۲). نام، توالی، تعداد باند تولید شده، تعداد باند چند شکل و شاخص اطلاعات چند شکل (PIC) برای هر آغازگر در جدول۲ نشان داده شده است. در کل ۹۶ باند تولید شد که از این تعداد، ۲۵ باند (معادل ۲۶/۰۴ درصد)، چندشکلی نشان دادند. مشاهده چندشکلی با توجه به اینکه نمونه‌ها متعلق به توده های مختلفی از نواحی جغرافیایی متفاوت بودند چندان دور از انتظار نبود (جدول۲). Sehgal and Raina (2005) در مطالعه‌ای که بر روی ارقام *C. tinctorius* انجام دادند، از ۲۰ آغازگر رپید و ۱۳ آغازگر ISSR و ۴ آغازگر AFLP استفاده کردند که چندشکلی نمایان شده به ترتیب به میزان ۲۴/۲، ۱۷/۸ و ۶۱/۱ درصد بود. اما در مطالعه‌ای که Yang et al. (2007) در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط میان نمونه‌های *C. tinctorius* بر اساس آغازگر ISSR انجام دادند چندشکلی نسبتا بالایی مشاهده کردند. آن‌ها از ۲۲ آغازگر ISSR کمک گرفتند که از کل ۴۲۹ باند تکثیر شده، ۳۵۵ باند (حدود ۸۲/۷ درصد) چندشکلی نشان دادند. میزان PIC برای آغازگرهای مختلف از ۰/۱۸ برای آغازگر ISSR 7 تا ۰/۵۰ برای متغیر بود. شاخص اطلاعات چند شکل (PIC) می‌تواند کارآمدی و ظرفیت هر آغازگر را در شناسایی جایگاه‌های چندشکل در میان ارقام یا توده‌های مختلف تعیین کند. دامنه میزان اطلاعات چندشکل برای نشانگرهای غالب بین صفر تا ۰/۵ متغیر می‌باشد (Ahmadikhah 2010). به این ترتیب آغازگر ISSR8 نسبت به سایر آغازگرها از کارایی بالاتری برخوردار بود. الگوی باندهی آغازگر ISSR8 در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج تجزیه کلاستر نمونه‌ها بر مبنای تجزیه ماتریس داده‌های صفر و یک حاصل از الگوی باندهی آغازگرهای بین‌ریزماهواره-ای به روش UPGMA توسط نرم‌افزار پاپ‌ژن با ضریب همبستگی کوفنتیک ۶۷ درصد در شکل ۲ نمایش داده شده است که هشت توده مورد بررسی را به سه گروه مجزا بر اساس نرم-افزار SAS و سایر ملاحظات تجربی تقسیم کرد. در گروه اول، نمونه‌های اینچه‌برون (برداشت ۱۳۹۰)، گمیشان، اینچه برون، بندرترکمن-آق‌قلا و گمیشان-آق‌قلا و در گروه دو، نمونه‌های بندرترکمن و بندرترکمن-گمیشان قرار گرفتند. گروه سوم، متعلق به نمونه توده جزیره آشوراده بود (شکل ۲). گروه اول خود به زیرگروه اول، دوم و سوم تفکیک شد می‌شود (شکل ۲). به این ترتیب که در زیرگروه اول توده‌های اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)، گمیشان و در زیرگروه دوم توده اینچه‌برون قرار گرفت. زیر گروه سوم شامل نمونه‌های توده‌های بندرترکمن-آق‌قلا و گمیشان-آق-قلا بود. تفکیک صحیح توده‌ها با منشا متفاوت جغرافیایی از

[1] Polymorphism information content (PIC)

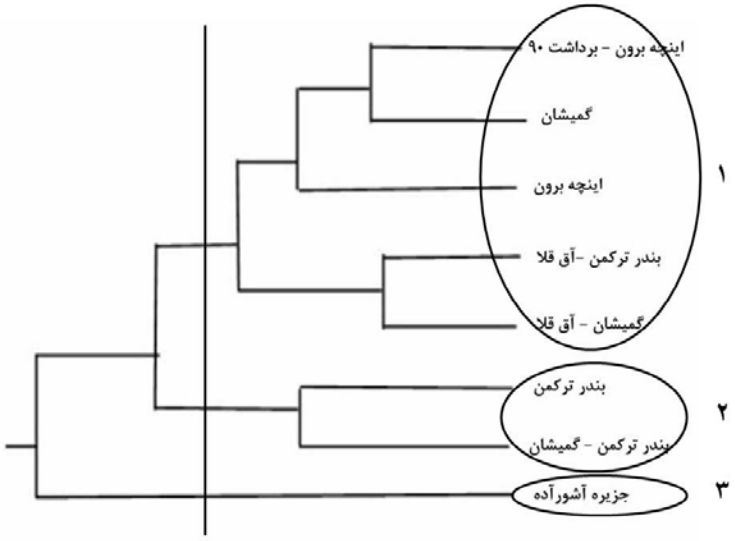
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]



شکل ۱- الگوی باندهی آغازگر ISSR8 بر روی ۸ توده مورد بررسی از *C. lanatus*. الف) بر روی نیمی از جمعیت هرتوده. (لاین ۲ تا ۶ توده یک، لاین ۷ تا ۱۱ توده دو، لاین ۱۲ تا ۱۶ توده سه، لاین ۱۷ تا ۲۱ توده چهار، لاین ۲۲ تا ۲۶ توده پنج، لاین ۲۷ تا ۳۱ توده شش، لاین ۳۲ تا ۳۶ توده هفت و لاین۳۷ تا ۴۰ توده هشت). ب) بر روی نیم دیگر جمعیت. (لاین ۲ تا ۵ توده یک، لاین ۶ تا ۱۰ توده سه، لاین ۱۱ تا ۱۵ توده چهار، لاین ۱۶ تا ۲۰ توده پنج، لاین ۲۱ تا ۲۴ توده دو، لاین ۲۵ تا ۲۸ توده شش و لاین ۲۹ تا ۳۳ توده هفت).

یکدیگر، کارایی آغازگرهای بین ریزماهواره‌ای و اختلافات ژنومی بین این هشت توده و نیز قابلیت تجزیه کلاسترینگ در خوشه-بندی صحیح بر مبنای اطلاعات داده‌های مولکولی را به تایید می-رساند. تجزیه کلاستر همچنین نشان می‌دهد که فاصله جغرافیایی عاملی در ایجاد و یا حفظ تفاوت ژنتیکی توده‌ها *C. lanatus* بوده است. کارآمدی و سودمندی آغازگرهای بین ریزماهواره‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌ی *lanatus* توسط محققینی چون Ash et al. (2002) و BaghMohammadi (2011) و در دیگر گونه‌های گیاهی توسط Yang et al. (2007) و Sabzalian et al. (2009) نیز گزارش شده است. به این ترتیب توده جزیره آشورآده در گروهی مجزا نسبت به سایر توده‌ها قرار گرفت که متفاوت و مجزا بودن مکان جغرافیایی توده جمع‌آوری شده از جزیره آشورآده دلیلی بر فاصله گرفتن آن نسبت به سایر توده‌هاست. با توجه به فاصله زیاد و ایزوله‌شدن این جزیره نسبت به سایر مناطق و وجود مانعی چون آب دریای خزر توانایی این توده در تبادل ژنتیکی با سایر توده‌ها توسط عواملی از قبیل گرده افشانی با حشرات کاهش می-یابد و باعث افزایش خلوص ژنتیکی شده و این مکان را می‌توان در برنامه‌های اصلاحی آینده مد نظر گرفت. بر طبق آنچه که انتظار می‌رفت تجزیه کلاستر توانست توده‌های متعلق به هر منطقه را در یک گروه قرار دهد (شکل۲). البته توده‌هایی را که در یک گروه یا زیر گروه قرار گرفته‌اند را می‌توان از نظر ژنتیکی در فاصله نزدیک‌تری لحاظ کرد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]



شکل ۲- دندروگرام گروه‌بندی هشت توده *C. lanatus* بر اساس فاصله ژنتیکی نئی، با روش UPGMA توسط نرم‌افزار پاپ‌ژن با ضریب همبستگی کوفنتیک ۶۷ درصد. اعداد ۱ تا ۳ نشان‌دهنده تعداد گروه‌های ایجاد شده‌است.

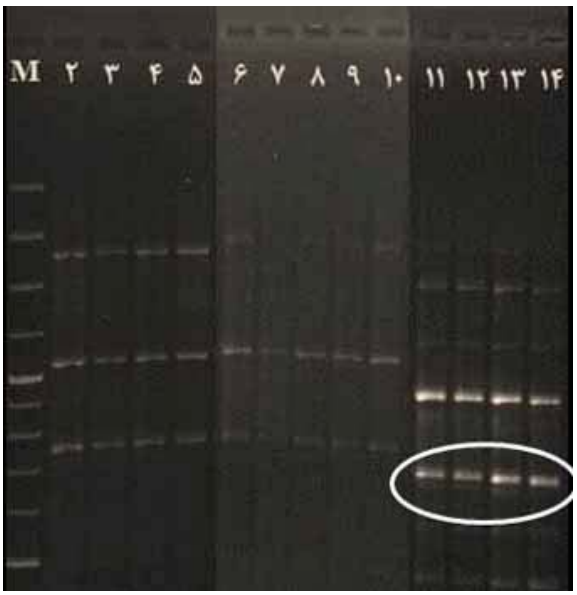
فواصل ژنتیکی توده‌های بررسی شده در جدول ۳ نشان داده شده است. فاصله ژنتیکی نئی از صفر تا یک متغیر است و هرچه این عدد کوچکتر باشد نشان می‌دهد که دو جمعیت از نظر ژنتیکی مشابهت بیشتری دارند (Nei 1978). طبق انتظار، نمونه‌های توده جزیره آشورآده در اکثر موارد در بیشترین فاصله از سایر توده‌ها قرار داشتند (شکل۲). بیشترین فاصله ژنتیکی بین این توده و توده حد واسط بندرترکمن–آق‌قلا وجود داشت زیرا شاخص نئی آن ۰/۵۵۹ بود (جدول ۳). همچنین کمترین فاصله ژنتیکی مشاهده - شده بین توده‌های اینچه‌برون (برداشت ۱۳۹۰) و گمیشان مشاهده شد (۰/۱۱۹) که مطابق با نتایج به‌دست آمده از دندروگرام تجزیه کلاستر در شکل ۲ بود. همچنین با توجه به الگوی باندهی این ۹ آغازگر برای هشت توده، می‌توان آغازگرهایی را که تنها برای افراد یک توده باند داده‌است به عنوان آغازگر اختصاصی آن توده معرفی کرد. طبق تعریف آغازگری اختصاصی در نظر گرفته می- شود که تنها در کلیه افراد یک توده باند ایجاد نماید و در سایر توده‌ها بدون باند باشد. با استفاده از نشانگرهای اختصاصی می- توان توده‌های مختلف را نسبت به هم متمایز کرد. با توجه به اطلاعات به دست آمده آغازگر سه برای توده گمیشان و آغازگر پنج برای توده جزیره آشورآده اختصاصی می‌باشد که در شکل ۳ مقایسه دو توده جزیره آشورآده و اینچه‌برون (برداشت ۱۳۹۰) برای نمونه آورده شده‌است (شکل ۳). همچنین آغازگر چهار در جایگاه ۸۵۰ bp و آغازگر یک در جایگاه ۹۰۰ bp فقط برای افراد توده جزیره آشورآده و آغازگر یک در جایگاه ۱۰۲۵ bp تنها برای افراد توده اینچه‌برون باند تولید کردند.

تنوع درون توده‌ای جمعیت‌های مورد بررسی را می‌توان بر اساس میانگین ضریب تشابه بین افراد هر توده بیان کرد. ضریب تشابه میزان نزدیکی دو فرد را در هر توده نشان می‌دهد و بین صفر (عدم شباهت) تا یک (کاملا مشابه) متغیر است. برای این منظور میانگین ضریب تشابه بین افراد هر توده به این ترتیب محاسبه شد: توده یک ۰/۵۳۸؛ توده دو ۰/۴۵۵؛ توده سه ۰/۶۱۵؛ توده چهار ۰/۷۲۴؛ توده پنج ۰/۶۰۷؛ توده شش ۰/۵۴۱؛ توده هفت ۰/۷۵۱ و توده هشت ۰/۶۵۵. با توجه به محاسبات به دست‌آمده، تنوع ژنتیکی درون توده‌های یک (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)) و دو (بندرترکمن)، بالاترین مقدار بود. به دنبال آن، پایین‌ترین تنوع ژنتیکی درون، متعلق به توده‌های هفت (اینچه‌برون) و هشت (جزیره آشورآده) می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

جدول ۳- ماتریس فاصله ژنتیکی نئی بین توده‌های *C. lanatus*

جمعیت	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8
CL1	۱							
CL2	۰/۲۱۲	۱						
CL3	۰/۱۸۹	۰/۲۳۲	۱					
CL4	۰/۲۰۲	۰/۱۵۰	۰/۳۰۸	۱				
CL5	۰/۱۱۹	۰/۲۳۷	۰/۲۶۸	۰/۱۹۶	۱			
CL6	۰/۱۴۹	۰/۲۵۲	۰/۲۴۶	۰/۱۹۲	۰/۲۵۱	۱		
CL7	۰/۲۰۳	۰/۴۰۱	۰/۲۲۶	۰/۳۹۲	۰/۳۱۴	۰/۳۵۹	۱	
CL8	۰/۳۶۵	۰/۳۹۶	۰/۵۵۹	۰/۳۰۹	۰/۴۲۷	۰/۳۸۳	۰/۴۲۸	۱



شکل ۳- الگوی باننددهی آغازگر ISSR5 جمعیت توده یک (اینچه‌برون (برداشت ۹۰)) و توده هشت (جزیره آشورآده). (لاین ۲ تا ۱۰ توده یک، لاین۱۱ تا ۱۴ توده هشت).

از نتایج به دست آمده کاملا مشخص است که توده‌های *C. lanatus* در شمال استان گلستان از نظر ژنتیکی مشابه نبوده، بین و درون توده‌ها تنوع ژنتیکی وجود دارد. همچنین با توجه به شاخص اطلاعات چندشکل محاسبه شده، آغازگر ISSR8 با میزان PIC=۰/۵ دارای بالاترین شاخص اطلاعات چندشکل در میان ۹ آغازگر مورد استفاده بوده و بنابراین کارایی آن نسبت به سایر آغازگرها بالاتر بوده و ظرفیت آن در شناسایی جایگاه‌های چندشکل در میان توده‌های *C. lanatus* بررسی شده بیشتر است، بدین طریق توانسته خود را از دیگر آغازگرها متمایز کند. علاوه بر این، در میان توده‌های مورد مطالعه، توده جمع‌آوری شده از جزیره آشورآده با توجه به داشتن بیشترین فاصله ژنتیکی، بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی نئی، و قرار گرفتن در گروهی مجزا بر اساس تجزیه کلاستر که منطبق با فاصله و شرایط جغرافیایی آن می‌باشد، به عنوان با ارزش‌ترین توده قلمداد می‌شود. با توجه به تجزیه کلاستر به دست آمده منطبق با مکان جغرافیایی توده‌ها و تمایزگذاری بین توده‌ها از لحاظ ژنتیکی، به کارایی و کارآمد بودن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

آغازگر ISSR در این آزمایش می‌توان پی برد. با توجه به ناهمگن بودن توده‌های گونه *lanatus* در استان گلستان می‌توان از این تنوع به عنوان منابع و ذخایر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی آتی استفاده کرده و آن را به عنوان پایه‌ای برای تحقیقات آینده و اصلاح گلرنگ زراعی در نظر گرفت.

منابع

Ahmadikhah A (2009) Advanced genetics. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press. (In Farsi).

Ahmadikhah A (2010) Advanced plant Breeding. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press. (In Farsi).

Ash GH, Raman R, Crump NS (2002) An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using intersimple sequence repeats (ISSR) analysis. European Weed Research Society 43:208-213.

Baghmohammadi H (2011) Evaluation of genetic diversity, Crossable and Response different species to *Pythium ultimum*. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (In Farsi).

Bowles V (2010) Relationships and introgression within *Carthamus* (*Asteraceae*), with an emphasis on safflower (*Carthamus tinctorius*). M.Sc in Plant Biological. Thesis. Canada. University of Alberta. Pp 140.

Carapetain J, Zarei Gh (2005) Variation in protein, oil and fatty acid contents in three wild species of safflower (*Carthamus*) from west Azerbaijan, Iran. International journal of Botany 1:133-137.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. Phytochemistry Bulletin 19:11-15

FAO/IAEA (2010) Molecular characterization of mutant germplasm. Available at http://naweb.iaea.org/nafa/pbg/public/manuals-pbg.html. Pp 145.

Gallaghery SR, Wiley EA (2008) Current protocols essential laboratory technique. Pp 737.

Grace BS, Sheppard A, Whaley RDB, Sindel BM (2002) Seedbank and seedling emergence of saffron thistle (*Carthamus lanatus*) in eastern Australian pastures. Australian Journal of Agricultural Research 53:1327-1334.

Gruber S, Claupein W (2007) Seed dormancy of safflower-Do we have to worry about it? 7th International Safflower Conference.

Golkar P, Arzani A, Rezaei AM (2011) Genetic variation in safflower (*Carthamus tinctorious* L.) for seed quality-related traits and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. International Journal of Molecular Sciences 12:2664-2677.

Heaton TC, Klislewicz JM (1981) A disease-resistant safflower alloploid from *Carthamus tinctorius* L ×*C. lanatus* L. Canadian Journal of Plant Science 6:219-224.

Kessler E (1987) *Carthamus lanatus* L. (*Asteraceae*: *Cynareae*)-A potentially serious plant pest in Oklahoma. Proceeding of the Oklahoma Academy of Science 67:39-43.

Knowles PF (1955) Safflower- Production, Processing and Utilization. Economic Botany. Department of Agronomy, University of California, Davis, California 273-299.

Mahasi MJ, Wachira FN, Pathak RS, Riungu TC (2009) Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using RAPD markers. Journal of Plant Breeding and Crop Science 1:8-12.

Marinova E, Riehl S (2009) *Carthamus* species in the ancient Near East and south-eastern Europe: archaeobotanical evidence for their distribution and use as a source of oil. Vegetation History and Archaeobotany 18:341-349.

Mohammadi SA (2006) Analysis of molecular data from the perspective genetic diversity. In: Articles of ninth congress of Iranian agricultural and plant breeding sciences. Abooreyhan Tehran University, 96-119 (In Farsi).

Mundel HH, Blacksaw RE, Byers JR, Huang HC, Johnson DL, Keon R, Kubik J, McKenzie R, Otto B, Roth B, Stanford K (2004) Safflower Production on the Canadian Prairies. Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre, Alberta Pp 43.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 70:3321-3323.

Nei M (1975) Molecular population genetics and evolution. North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology 40: Pp 290.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Center for Demographic and Population Genetics 89:583-590.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.

Sabzalian MR, Saeidi G, Mirlohi A (2008) Oil content and fatty acid composition in seeds of three safflower species. Journal of the American Oil Chemist Society 85:717-721.

Sabzalian MR, Mirlohi A, Saeidi G, Rabbani MT (2009) Genetic variation among populations of wild safflower,*Carthamus oxyacanthus* analyzed by agro-morphological traits and ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 56:1057-1064.

Safavi SA, Pourdad SS, Taeb M, Khosroshahli M (2010) Assessment of genetic variation among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) accessions using agro-morphological traits and molecular markers. Journal of Food, Agriculture and Environment 8:616-625.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]

markers and sectional classification. Botanical Journal of the Linnean Society 147:375-383.
Yang YX, Wu W, Zheng YL, Chen L, Liu RJ, Huang CY (2007) Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genetic Resources and Crop Evolution 54:1043-1051.
Zahedi A (1994) Plant dictionary (The scientific name of plants in English, French, German, Arabic, Persian). Tehran University Press (In Farsi).

Taskova R, Mitova M, Mikhova B, Duddeck H (2003) Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen 58:704-707.
Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 10:4127-4137.
Vilatersana R, Garnatje T, Susanna A, Garcia NJ (2000) Generic delimitation and phylogeny of the Carduncellus-*Carthamus* complex (*Asteraceae*) based on ITS sequences. Plant Systematic Evolation 221:89-105.
Vilatersana R, Garnatje T, Susanna A, Garcia NJ (2005) Taxonomic problems in *Carthamus* (*Asteraceae*): RAPD

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.4.2]