

نوع 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 استادیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Nikdel S^{۱*}, Pahlevani MH^۱, Zenalinezhad KH^۱, Yamchi A^۱

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: samanetikdel@gmail.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 به 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 ژنتیکی‌نی، توده جمع‌آوری شده از جزیره آشورآده در بیشترین فاصله با سایر توده‌ها و توده‌های 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 ریزماهوره‌ای و اختلافات ژنومی بین هشت توده مورد بررسی را تأیید می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که توده‌های *C. lanatus* موجود در رویشگاه‌های 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

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* عمدتاً در محیط‌های خشک و نیمه خشک یافت می‌شود و بسیار متحمل به تنش خشکی است (Marinova and Riehl 2009). این جنس نسبتاً 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 نسبتاً نزدیک گلرنگ زراعی محسوب می‌شود (Heaton and Klislewicz 1981). به همین دلیل به آن گلرنگ صحرائی و یا زعفرانی بیابانی نیز گفته می‌شود (Zahedi 1994). *C. lanatus* یک گیاه دگرگشن ($2n = 44$)، 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; Carapetaian 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 جدانشدنی 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 معمولاً 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).

ISSR¹ یک نشانگر شبه RAPD² است که نیازی به داشتن شناخت قبلی از توالی ژنومی ندارد و تکنیکی است که توالی‌های ریزماهوره‌ای را به عنوان آغازگر در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ایجاد نشانگرهای چند جایگاهی مورد استفاده قرار می‌دهد (Reddy et al. 2002). ریزماهوره‌ها، 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 پلیمرز 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)

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 (خیسایدن بذور ضدعفونی شده در جیبرلین ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد (Bag Mohammadi 1390). ضدعفونی بذور در هیپوکلریت سدیم 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 (جدول ۱). 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 ریزماهورای (ISSR) که در مطالعات قبلی توسط سایر محققین مورد استفاده قرار گرفته بود استفاده شد. Ash et al. (2002; Bag Mohammadi 2011). آغازگرها از شرکت Metabion International AG آلمان تهیه شدند. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده‌است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر (یک میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۲ میکرولیتر دزوکسی نوکلئوتیدها (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)،

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 گونه‌های 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 به ترتیب 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 ریزماهورای 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 منشأ 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 منشأ جغرافیایی آن‌ها، تقسیم کرد. استان گلستان از لحاظ دارا بودن انواع گونه‌های وحشی گلرنگ از جمله *C. lanatus* یک منطقه بسیار غنی محسوب می‌شود، طوری که منبع ارزشمند و بالقوه‌ای از ژن‌های مفید را در اختیار اصلاح‌کنندگان گلرنگ قرار می‌دهد. 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.

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

منطقه	تعداد نمونه در توده	جمعیت (توده)
اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)*	۹	CL ₁
بندر ترکن	۹	CL ₂
حدواسط بندر ترکمن-آق قلا	۱۰	CL ₃
حدواسط بندر ترکمن-گمیشان	۱۰	CL ₄
گمیشان	۱۰	CL ₅
حدواسط گمیشان-آق قلا	۹	CL ₆
اینچه برون	۱۰	CL ₇
جزیره آشوراده	۴	CL ₈

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

جدول ۲- 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
تعداد کل				۹۶	۲۵	
متوسط				۱۰/۶۷	۲/۷۸	۰/۳۴

برای هر کدام از آغازگرها استفاده شد. دمای اتصال مورد استفاده برای هر آغازگر طبق دمای^۱ TM ذکر شده در جدول ۲ و حدود ۵ درجه کمتر از دمای TM پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده آغازگرها بود (Gallagher and Wiley 2008). به این ترتیب چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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

۰/۰۵ میکرولیتر تک DNA پلیمرز (U ۵)، سه نانوگرم DNA، یک میکرولیتر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T Gradient Biometra مدل RS 232 انجام پذیرفت. بهترین میزان کلریدمنیزیم، دزوکسی‌نوکلئوتیدها، رشته الگو، DNA پلیمرز 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

¹ Melting temperature

های مختلفی از نواحی جغرافیایی متفاوت بودند چندان دور از انتظار نبود (جدول ۲). (Sehgal and Raina 2005) در مطالعه‌ای که بر روی ارقام *C. tinctorius* انجام دادند، از ۲۰ آغازگر پدید 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 نسبتاً 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 7 ISSR 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 باندهای آغازگر ISSR8 در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج تجزیه کلاستر نمونه‌ها بر مبنای تجزیه ماتریس داده‌های صفر و یک حاصل از الگوی باندهای آغازگرهای بین‌ریزماهواره-ای به روش UPGMA توسط نرم‌افزار پاپژن با ضریب همبستگی کوفتیک 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، اینچه‌برون، بندرترکمن-آق‌قلا و گمیشان-آق‌قلا و در گروه دوم، نمونه‌های بندرترکمن و بندرترکمن-گمیشان قرار گرفتند. گروه سوم، متعلق به نمونه توده جزیره آشورآده 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 اینچه‌برون (برداشت ۱۳۹۰)، گمیشان و در زیرگروه دوم توده اینچه‌برون قرار گرفت. زیرگروه سوم شامل نمونه‌های توده‌های بندرترکمن-آق‌قلا و گمیشان-آق-قلا بود. تفکیک صحیح توده‌ها با منشا متفاوت جغرافیایی از

۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 53°C - 47°C به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط به مدت دو دقیقه در دمای 72°C ، یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای 72°C و مرحله نگهداری در دمای 4°C 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 داکیومننت 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)^۱ بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi 1996).

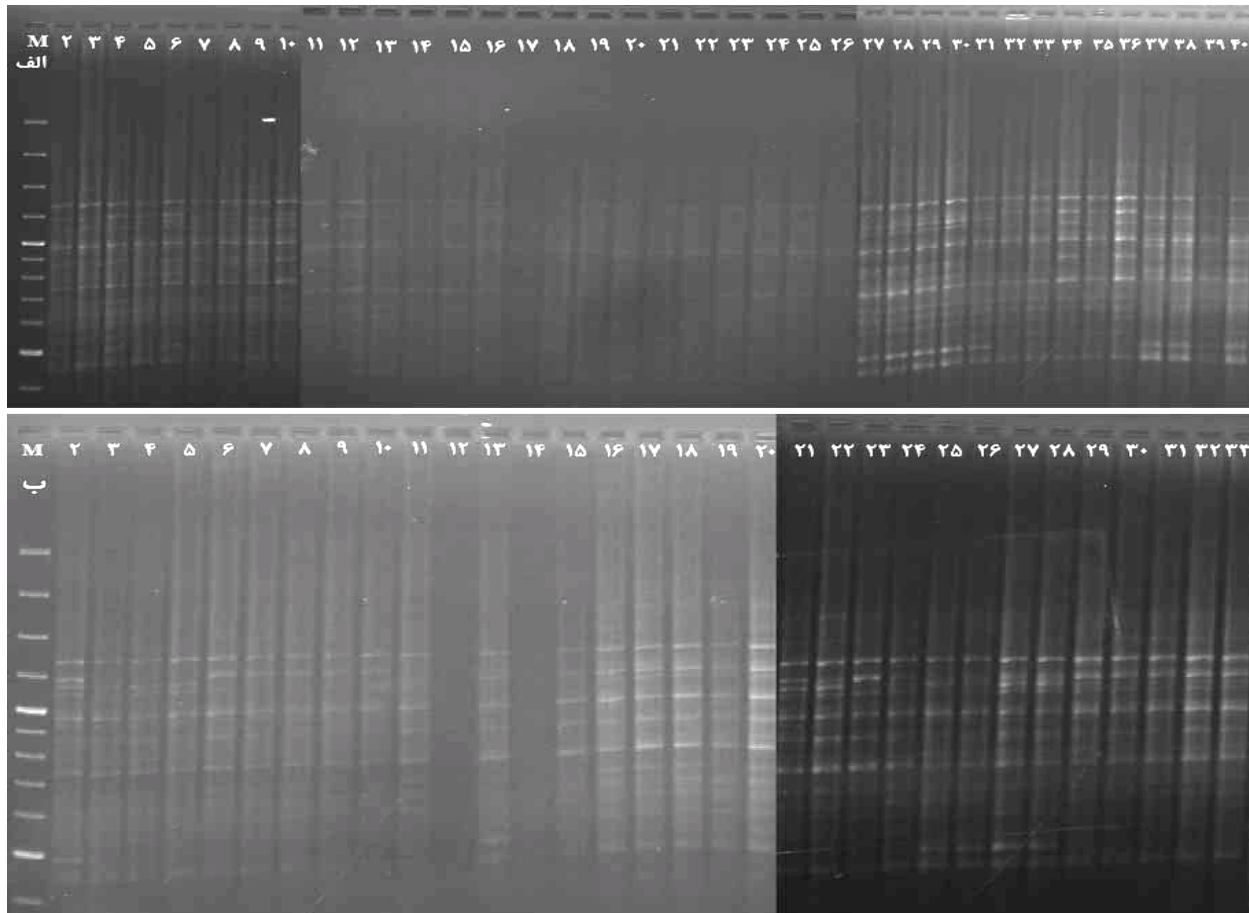
$$PIC = \sum_{i=1}^n 2p_i(1 - p_i)$$

که در این فرمول i شماره جایگاه و p_i فراوانی آلل جایگاه i ام 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 (جدول ۲). نام، توالی، تعداد باند تولید شده، تعداد باند چند شکل و شاخص اطلاعات چند شکل (PIC) برای هر آغازگر در جدول ۲ 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

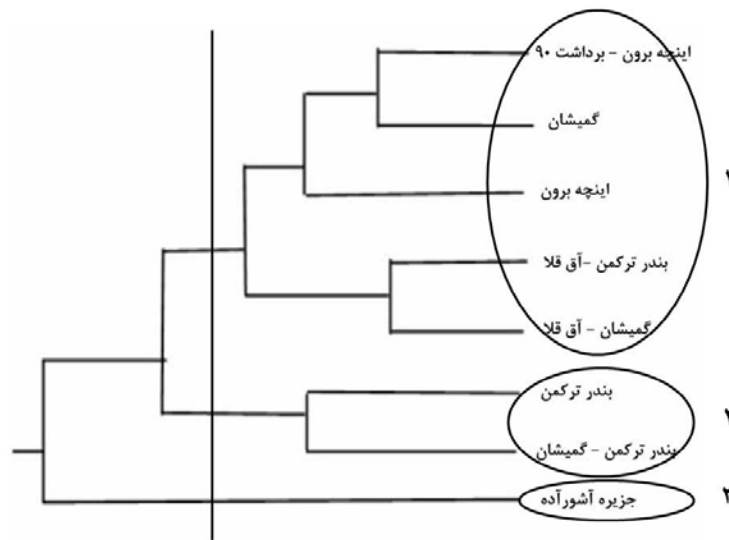
^۱ Polymorphism information content (PIC)



شکل ۱- الگوی باندهای آغازگر ISSR8 بر روی ۸ توده مورد بررسی از *C. lanatus*. الف) بر روی نیمی از جمعیت هر توده. (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 لاین ۳۷ 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).

مکان جغرافیایی توده جمع‌آوری شده از جزیره آشورآده دلیلی بر فاصله گرفتن آن نسبت به سایر توده‌هاست. با توجه به فاصله زیاد و ایزوله شدن 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 می‌یابد 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 (شکل ۲). البته توده‌هایی را که در یک گروه یا زیر گروه قرار گرفته‌اند را می‌توان از نظر ژنتیکی در فاصله نزدیک‌تری لحاظ کرد.

یکدیگر، کارایی آغازگرهای بین ریزماهورهای و اختلافات ژنومی بین این هشت توده و نیز قابلیت تجزیه کلاسترینگ در خوشه‌بندی صحیح بر مبنای اطلاعات داده‌های مولکولی را به تایید می‌رساند. 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 ریزماهورهای 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



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

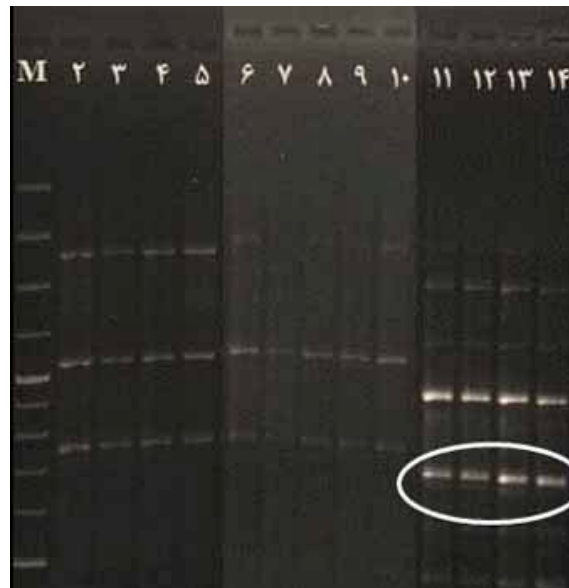
پنج برای توده جزیره آشورآده اختصاصی می‌باشد که در شکل ۳ مقایسه دو توده جزیره آشورآده و اینچه‌برون (برداشت ۱۳۹۰) برای نمونه آورده شده است (شکل ۳). همچنین آغازگر چهار در جایگاه ۸۵۰ bp و آغازگر یک در جایگاه ۹۰۰ bp فقط برای افراد توده جزیره آشورآده و آغازگر یک در جایگاه ۱۰۲۵ bp تنها برای افراد توده اینچه‌برون باند تولید کردند.

تنوع درون توده‌های 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 (کاملاً 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 دست آمده، تنوع ژنتیکی درون توده‌های یک (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)) و دو (بندر ترکمن)، بالاترین مقدار بود. به دنبال آن، پایین‌ترین تنوع ژنتیکی درون، متعلق به توده‌های هفت (اینچه‌برون) و هشت (جزیره آشورآده) می‌باشد.

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 (شکل ۲). بیشترین فاصله ژنتیکی بین این توده و توده حد واسط بندر ترکمن-آق قلا 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 به دست آمده از دندروگرام تجزیه کلاستر در شکل ۲ بود. همچنین با توجه به الگوی بانددهی این ۹ آغازگر برای هشت توده، می‌توان آغازگرهایی را که تنها برای افراد یک توده باند داده است به عنوان آغازگر اختصاصی آن توده معرفی کرد. طبق تعریف آغازگری اختصاصی در نظر گرفته می‌شود که تنها در کلیه افراد یک توده باند ایجاد نماید و در سایر توده‌ها بدون باند باشد. با استفاده از نشانگرهای اختصاصی می‌توان توده‌های مختلف را نسبت به هم متمایز کرد. با توجه به اطلاعات به دست آمده آغازگر سه برای توده گمیشان و آغازگر

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 باندهای آغازگر ISSR5 جمعیت توده یک (اینجه‌برون (برداشت ۹۰)) و توده هشت (جزیره آشورآده). (لاین ۲ تا ۱۰ توده یک، لاین ۱۱ تا ۱۴ توده هشت).

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

از نتایج به دست آمده کاملاً 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 $PIC=0/5$ 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.

استفاده کرده و آن را به عنوان پایه‌ای برای تحقیقات آینده و اصلاح گلرنگ زراعی در نظر گرفت.

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

منابع

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

Ahmadihah 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.

Gallagher 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, Klisiewicz JM (1981) A disease-resistant safflower allopolyploid 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 agromorphological 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 agromorphological 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.

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 Evolution 221:89-105.

Vilatersana R, Garnatje T, Susanna A, Garcia NJ (2005) Taxonomic problems in *Carthamus* (*Asteraceae*): RAPD

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).