دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی قرابت ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای اختصاصی برای گلرنگ و خویشاوندان وحشی آن در ایران

مژده اکبرزاده للکامی[۱]، محمدهادی پهلوانی[۲]، سعید نواب پور[۳] و خلیل زینلی‌نژاد[۴]

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: hpahlavani@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱

چکیده

خویشاوندان وحشی منبع مهمی از ژن‌های مربوط به صفات مطلوب و سازگاری به شرایط محیطی هستند که می‌توانند برای غنی‌سازی ذخیره ژنی گلرنگ زراعی مورد استفاده قرار گیرند. در این مطالعه، قرابت ژنتیکی و امکان یافتن نشانگرهای اختصاصی برای سه گونه جنس کارتاموس شامل تینکتوریوس، لاناتوس و اکسیاکانتا با استفاده از آغازگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. تفکیک باندها روی ژل آگارز و پلی‌آکریل‌آمید صورت پذیرفت. از ۹ آغازگر ISSR در مجموع ۱۶۹ باند ایجاد گردید که ۹۶/۵ درصد آنها چند شکلی نشان دادند. از نظر توانایی ایجاد چند شکلی بین گونه‌ای، متوسط تعداد باندهای چند شکل ایجاد شده توسط آغازگرها ۱۸/۳۳ بود و بالاترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) توسط آغازگر ۱ بدست آمد. نتایج ماتریس تشابه نشان داد که بیشترین شباهت بین گونه زراعی و اکسیاکانتا وجود داشت. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب Jaccard با روش گروه‌بندی UPGMA، نمونه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد که هر یک متعلق به یکی از سه گونه مورد بررسی بود. در کل ۴۰ باند اختصاصی برای سه گونه مورد بررسی شناسایی شد که بیشتر آنها توسط دو آغازگر ۵ و ۶ تولید شدند و گونه زراعی (تینکتوریوس) با ۲۰ باند بیشترین را به خود اختصاص داد. برای دو گونه لاناتوس و اکسیاکانتا نیز به ترتیب ۱۲ و ۸ باند اختصاصی کشف گردید. با استفاده از این نشانگرهای اختصاصی شناسایی‌شده، تاکسونومی و تمایز سه گونه جنس گلرنگ با دقت بالا و بدون نیاز به ارزیابی‌های مورفولوژیکی ممکن می‌گردد. نتایج این تحقیق همچنین کمک شایانی در افزایش کارایی انتقال ژن‌های مفید از خویشاوندان وحشی به گونه زراعی خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گلرنگ، نشانگر اختصاصی، ISSR، PIC

مقدمه

گلرنگ از جنس کارتاموس (Carthamus) متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae)، گیاهی دانه روغنی است که احتمالاً از نواحی ایران، ترکیه و هندوستان منشاء گرفته است، بطوریکه کشور ما از لحاظ ذخایر ژنتیکی این گیاه، یکی از غنی‌ترین مناطق جهان بشمار می‌رود (۲۲). گلرنگ کاربردهای متنوع طبی، صنعتی و غذایی دارد، روغن آن به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و ضروری اسید لینولئیک و اسید اولئیک از کیفیت بالایی برخوردار است و از همه مهمتر گونه‌های مختلف گلرنگ دارای ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند (۱۶). سطح زیر کشت گلرنگ در ایران از ۱۰۰۰ هکتار در سال ۱۹۹۹ به ۷۴۰ هکتار در سال ۲۰۱۰ و متوسط میزان تولید دانه از ۱ تن در هکتار به ۶۳۵ کیلوگرم در هکتار کاهش یافته است (۲۱). از عوامل این کاهش می‌توان به نبود ارقام زراعی مناسب و شیوع آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز اشاره کرد، مهمترین راهکار مقابله با این معضلات، اصلاح ارقام جدید گلرنگ با انتقال ژن‌های مناسب از سایر ارقام گونه زراعی و یا در صورت نیاز از سایر خویشاوندان وحشی به آن می‌باشد. مهمترین این ژن‌ها آن‌هایی هستند که مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را القاء می‌کنند و معمولاً در گونه‌های وحشی یافت می‌شوند (۷). جنس کارتاموس دارای ۲۵ گونه است که در سراسر جهان پراکنده شده‌اند. گونه‌های جنس کارتاموس بر اساس تعداد کروموزوم به ۴ بخش تقسیم می‌شوند. بخش یک شامل گونه‌های یکساله زراعی (C. tinctorius)، پالاستینوس (C. palaestinus) و اکسیاکانتا (C. oxyacantha) با تعداد کروموزوم ۲n=۲x=۲۴ می‌باشد. این گونه‌ها با یکدیگر تلاقی‌پذیرند و هیبریدهای بارور تولید می‌کنند. اکسیاکانتا به عنوان جد وحشی گلرنگ زراعی معرفی می‌شود. بخش دو عمدتاً شامل گونه‌های الکساندریوس (C. alexandrinus)، گلاکوس (C. glaucus)، سیریاکوس (C. syriacus) و تنوئیس (C. tenuis) با تعداد کروموزوم ۲n=۲x=۲۰ می‌باشد. هیبریدهای مصنوعی بین گونه‌های دو بخش یک و دو به آسانی انجام می‌شود اما همه آنها عقیم هستند. بخش سه تنها شامل گونه لاناتوس (C. lanatus) می‌باشد که دارای ۲۲ جفت کروموزوم است (۲n=۴x=۴۴). بخش چهار شامل دو گونه باتیکوس (C. baeticus) و ترکستانیکوس (C. turkestanicus) با تعداد کروموزوم ۲n=۶x=۶۴ می‌باشد. هیبریدهای بین باتیکوس و لاناتوس جفت‌شدگی کامل در ۲۲ جفت کروموزوم را نشان دادند و بیانگر این است که لاناتوس یکی از اجداد باتیکوس محسوب می‌شود (به نقل از ۸). دو گونه اکسیاکانتا و لاناتوس بطور وسیعی در ایران پراکنده شده‌اند و به صورت خودرو رشد می‌کنند، به همین خاطر با شرایط آب‌وهوایی کشور سازگار شده و به عنوان گیاهان بومی محسوب شده و برای اصلاح و بهبود برخی خصوصیات گونه زراعی از اهمیت بالایی برخوردارند (۲۲). تنوع ژنتیکی عامل اصلی تکامل گونه‌ها بشمار می‌رود. درک و آگاهی از تنوع و شباهت ژنتیکی در درون افراد یا جمعیت‌ها، برای استفاده موثر از منابع ژنتیکی در یک برنامه اصلاحی ضروری است

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

(۲۰). مهم‌ترین و سریعترین دستاورد بکارگیری زیست‌شناسی مولکولی، شناسایی و کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات است. نشانگرهای مولکولی را می‌توان برای تعیین هویت گیاهان و همچنین تجزیه ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌های موجود برای اصلاح گیاهان زراعی مورد استفاده قرار داد. نشانگر ISSR به دلیل تولید باندهای زیاد با تکرار پذیری مناسب، از کاربرد بالایی در مطالعات تنوع ژنتیکی برخوردار است و همچنین به دلیل عدم نیاز به توالی DNA، به عنوان نشانگری کم هزینه محسوب می‌شود (۱). تنوع ژنتیکی بین نمونه‌هایی از گونه اکسیاکانتا و ارتباط آنها با گلرنگ زراعی با استفاده از نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که ISSR یک سیستم نشانگری موثر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌های گلرنگ است (۱۹). با استفاده از ۴۴ آغازگر تصادفی RAPD، تنوع مولکولی گونه زراعی و چهار گونه وحشی گلرنگ مورد مطالعه قرار گرفت. گونه‌های اکسیاکانتا و پالاستینوس با ضریب تشابه ۰/۹۵، ارتباط نزدیکی با گونه زراعی نشان دادند، از نشانگرهای اختصاصی نیز برای تمایز این گونه‌ها استفاده شد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر، تنوع ژنتیکی ۲۳ جمعیت زراعی و دو جمعیت لاناتوس با استفاده از نشانگر SRAP بررسی شد و نشانگرهای اختصاصی برای تمایز دو گونه از یکدیگر شناسایی شدند (۱۴). در بررسی ارتباط ژنتیکی سه گونه زراعی، لاناتوس و اکسیاکانتا با استفاده از آغازگرهای ISSR، فاصله ژنتیکی بالایی بین گونه‌های لاناتوس و زراعی مشاهده شد و گونه اکسیاکانتا به دلیل نزدیکی بیشتر با گونه زراعی برای هیبریداسیون به منظور انتقال ژن‌های مفید معرفی شد (۳). استفاده از نشانگر ISSR در گیاهان دیگر همچون کلزا به خوبی توانست به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای ۳۶ گونه مورد استفاده قرار گیرد (۹). اهداف این تحقیق شامل (۱) تخمین درجه قرابت ژنتیکی سه گونه جنس کارتاموس (گلرنگ زراعی، لاناتوس و اکسیاکانتا)، (۲) شناسایی نشانگرهای اختصاصی برای تمایز سریع و مطمئن این سه گونه و (۳) تعیین سطح تنوع ژنتیکی درون توده‌ای هر یک از این گونه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام شد. در این مطالعه از هشت ژنوتیپ گلرنگ زراعی (C. tinctorius)، هشت نمونه جمع‌آوری شده ازگونه C. lanatus و دو نمونه جمع‌آوری شده از گونه C. oxyacantha استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱– نام، گونه و منشاء یا محل جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه از سه گونه جنس گلرنگ

Table 1. Name, species and origin of collected samples of three species of *Carthamus*

ژنوتیپ	گونه	منشاء
PI-250537	*C. tinctorius*	کانادا
541-5	*C. tinctorius*	نامعلوم
Aceteria	*C. tinctorius*	کانادا
LRV-55-295	*C. tinctorius*	ایران
Dinger	*C. tinctorius*	نامعلوم
LRV-5151	*C. tinctorius*	ایران
2811	*C. tinctorius*	ایران
34040	*C. tinctorius*	نامعلوم
CL_1	*C. lanatus*	اینچه برون (جمع‌آوری ۱۳۹۰)*
CL_2	*C. lanatus*	بندر ترکمن
CL_3	*C. lanatus*	حدواسط بندر ترکمن- آق قلا
CL_4	*C. lanatus*	حدواسط بندر ترکمن-گمیشان
CL_5	*C. lanatus*	گمیشان
CL_6	*C. lanatus*	حد واسط گمیشان – آق قلا
CL_7	*C. lanatus*	اینچه برون (جمع‌آوری ۱۳۹۱)
CL_8	*C. lanatus*	جزیره آشوراده
OX1	*C. oxyacantha*	گلستان (جمع‌آوری ۱۳۹۰)
OX2	*C. oxyacantha*	گلستان (جمع‌آوری ۱۳۹۱)

*: جمع‌آوری در سال ۱۳۹۰، که یک بار در مزرعه دانشگاه نیز تکثیر شده‌اند.

پس از کاشت بذور در گلدان، از برگ‌ها که به اندازه کافی رشد کرده بودند نمونه‌گیری انجام شد. استخراج DNA به روش دویل ودویل (۶) صورت گرفت. برای انجام این مطالعه از ۹ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

جدول ۲- آغازگرهای ISSR استفاده شده و نتایج تکثیر آنها در مطالعه بین گونه‌های جنس گلرنگ

Table 2. The used ISSR primers and their amplification results in the study of *Carthamus* species

نام آغازگر	توالی	تعداد باند تولید شده	تعداد باند چند شکل	درصد باندهای چند شکل	محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)
آغازگر ۱	5'- $(AG)_8$GCC-3'	۱۹	۱۸	۹۴	۰/۳۴
آغازگر ۲	5'- $(CA)_8$ATC-3'	۲۳	۲۲	۹۵	۰/۲۵
آغازگر ۳	5'- $(CA)_8$ATC-3'	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۲۷
آغازگر ۴	5'- $(AG)_8$CTC-3'	۱۰	۸	۸۰	۰/۲۲
آغازگر ۵	5'- AGAA $(GA)_6$CTT-3'	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۲۸
آغازگر ۶	5'- AGAA $(GA)_6$CTG-3'	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۱۸
آغازگر ۷	5'- $(CA)_8$AGT-3'	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۲۹
آغازگر ۸	5'- $(TG)_8$AGT -3'	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۲۹
آغازگر ۹	5'- $(GACA)_5$-3'	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۳۱
تعداد کل		۱۶۹	۱۶۵		
متوسط		۱۸/۷۷	۱۸/۳۳	۹۶/۵	۲۷

تکثیر قطعات DNA در یک واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم تک‌پلی‌مراز با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر که با آب مقطر اتوکلاو شده، حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شده و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به آن اضافه گردید. تمامی مواد مورد نیاز از شرکت سیناژن تهیه شد. مراحل PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای مطلوب هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه و سنتز و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد. الکتروفورز افقی توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده زیر نور ماورابنفش صورت پذیرفت. الکتروفورز عمودی نیز توسط ژل آکریل‌آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام شد. قطعات DNA به وسیله وجود (۱) و عدم وجود (۰) امتیازبندی شدند. ماتریس تشابه بر اساس ضریب Jaccard محاسبه شد و نمودار دندروگرام نیز بر اساس ضریب Jaccard و روش گروه‌بندی UPGMA[1] با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc 2.2 رسم گردید. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)[2] توسط نرم‌افزار PopGene 1.31 بدست آمد.

نتایج و بحث

نتایج تکثیر باندها توسط آغازگرهای ISSR در جدول ۲ آمده است. تکثیر باندها در محدوده ۱۰۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز بود. در مجموع ۱۶۹ باند بین سه گونه تکثیر شد که ۱۶۵ باند چند شکل بودند و درصد چند شکلی ۹۶/۵ درصد بدست آمد. آغازگرهای ۲، ۵ و ۶ با ۲۳ باند بیشترین باند را تولید کردند. تعداد متوسط باند تولید شده توسط هر آغازگر ۱۸/۷۷ بود. بجز آغازگر ۴ با ۸۰ درصد چند شکلی، سایر آغازگرها چند شکلی کامل یا بالای ۹۰ درصد را نشان دادند. متوسط تعداد باندهای چند شکل توسط هر آغازگر ۱۸/۳۳ بود. مشاهده چند شکلی بالا در این مطالعه به دلیل استفاده از ژنوم سه گونه مختلف گلرنگ، دور از انتظار نبود. سبزعلیان و همکاران (۱۹) در مطالعه روی ژنوتیپ‌های دو گونه مختلف اکسیاکانتا و تینکتوریوس، از ۱۲ آغازگر ISSR در مجموع ۱۸۲ باند بدست آوردند که ۱۷۰ باند (۹۳/۴ درصد) چند شکلی نشان دادند. در بررسی تنوع مولکولی در گونه‌های مختلف گلرنگ از ۲۱ آغازگر RAPD استفاده شد که همه آنها باندهای چند شکل تولید نموده و از ۲۰۲ باند تشکیل شده، ۹۹ درصد چند شکلی نشان دادند (۱۸). در مطالعه روی سه گونه گلرنگ، تعداد ۱۴۴ باند توسط ۱۰ آغازگر ISSR بدست آمد که همگی چند شکل بودند (۳). محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برای آغازگرهای مختلف از ۰/۱۸ برای آغازگر ۶ تا ۰/۳۴ برای آغازگر ۱ متغیر بود (جدول ۲). در نتیجه آغازگر ۱ از بالاترین کارایی برخوردار بود. محتوای اطلاعات چند شکل می‌تواند برای تعیین آغازگرهای کارآمد که بیشترین چند شکلی را نشان می‌دهند استفاده شود. این شاخص ظرفیت هر آغازگر را در شناسایی جایگاه‌های چند شکل در مطالعات بین و درون گونه‌ای توصیف می‌کند و برای نشانگرهای ISSR بین ۰ تا ۰/۵ متغیر می‌باشد. مقدار ۰/۵ حداکثر چند شکلی را نشان می‌دهد (۴). در بررسی تنوع بین گونه‌های زراعی و وحشی گلرنگ با استفاده از آغازگرهای ISSR، بیشترین محتوای اطلاعات چند شکل ۰/۳۷ بدست آمد (۱۹).

نتایج ماتریس تشابه به روش Jaccard در جدول ۳ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود بیشترین تشابه مربوط به نمونه‌های درون هر گونه می‌باشد. دو ژنوتیپ زراعی 541-5 و PI-250537 دارای بیشترین ضریب تشابه بودند (۰/۸۲) و کمترین ضریب تشابه (۰/۶۳) در این گونه بین ژنوتیپ 541-5 با دو ژنوتیپ Aceteria و 2811 بود. برای گونه وحشی لاناتوس، ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۵۳ تا ۰/۷۷ متغیر بود. دو نمونه گونه اکسیاکانتا دارای کمترین ضریب تشابه ژنتیکی درون گونه‌ای (۰/۳۱) بودند. ضرایب تشابه نمونه‌های گونه لاناتوس با گونه زراعی بسیار اندک بود (۰/۰۹ تا ۰/۱۷)، اما شباهت گونه اکسیاکانتا به زراعی اندکی بیشتر و بطور متوسط در حدود ۰/۱۹ بود. شباهت دو گونه وحشی نیز بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۳ متغیر بود.

1- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

2- Polymorphism Information Content (PIC)

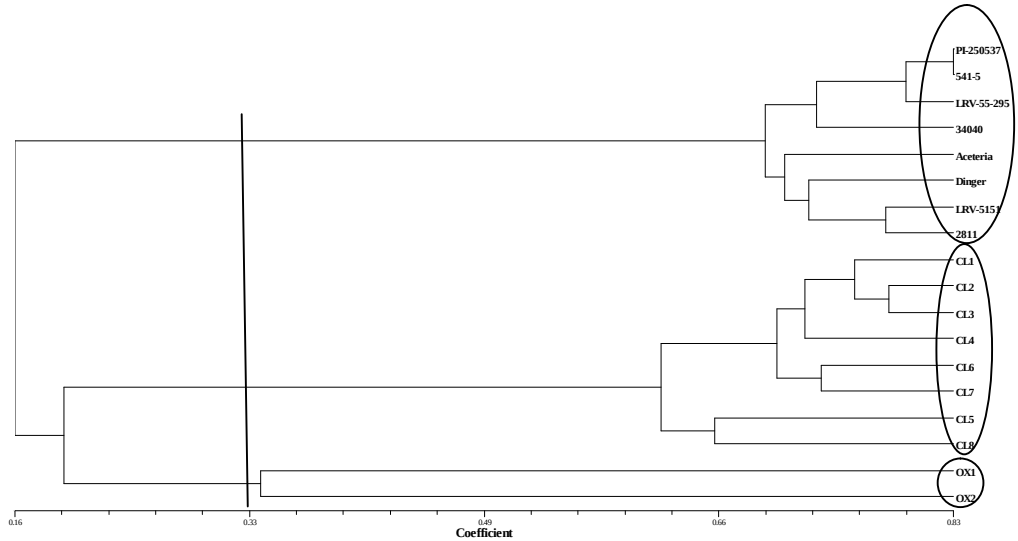
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب Jaccard و روش گروه‌بندی UPGMA نتایج ماتریس تشابه را تایید و نمونه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد (شکل ۱)، بطوریکه هشت ژنوتیپ گونه زراعی، هشت نمونه گونه لاناتوس و دو نمونه گونه اکسیاکانتا در سه گروه مجزا قرار گرفتند. ضریب کوفنتیک این دندروگرام ۰/۹۹ بدست آمد که نشان‌دهنده کارایی بالای تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش Jaccard و UPGMA می‌باشد. تفکیک صحیح گونه‌ها و همچنین افراد درون هر گونه از یکدیگر، کارایی آغازگرهای ISSR و همچنین اختلافات ژنومی بین و درون سه گونه را تایید می‌کند. کارایی آغازگرهای ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در سه گونه مورد مطالعه، توسط محققان دیگر نیز تایید شده است. نشانگر مولکولی ISSR دو گونه زراعی و لاناتوس را در ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۱۶ از یکدیگر جدا ساخت (۲). در مطالعه روی گونه‌های گلرنگ، هر دو دسته نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی، به خوبی توده‌های گونه وحشی اکسیاکانتا را از ژنوتیپ‌های گونه زراعی تفکیک نمودند (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر روی ۳۸ نمونه از سه گونه زراعی، لاناتوس و اکسیاکانتا با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR، مشخص گردید که دو گونه زراعی و اکسیاکانتا در فاصله ژنتیکی نزدیک‌تر از هم قرار دارند که حاکی از رابطه خویشاوندی نزدیکتر این دو گونه با یکدیگر در مقایسه با گونه لاناتوس بود (۳). در ارزیابی مولکولی هفت گونه زراعی و وحشی گلرنگ با استفاده از نشانگر ISSR، نشان داده شد که نزدیک‌ترین گونه به گلرنگ زراعی، گونه پالاستینوس با ضریب تشابه ۰/۹ و دورترین آن، گونه لاناتوس با ضریب تشابه ۰/۳۴ می‌باشد (۱۰).

جدول ۳- ماتریس تشابه به روش Jaccard برای نمونه‌های سه گونه مورد مطالعه از جنس گلرنگ

Table 3. The similarity matrix of Jacard coefficients for the samples of three species of *Carthamus*

	PI-250537	541-5	Aceteria	LRV-55-295	Dinger	LRV-5151	2811	34040	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8	OX1	OX2
PI-250537	۱																	
541-5	۰/۸۲	۱																
Aceteria	۰/۷۵	۰/۶۳	۱															
LRV-55-295	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۷۲	۱														
Dinger	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۷۳	۱													
LRV-5151	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۷۲	۱												
2811	۰/۶۷	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۷۷	۱											
34040	۰/۷۱	۰/۷۳	۰/۶۴	۰/۷۲	۰/۶۶	۰/۶۹	۰/۶۸	۱										
CL1	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۰۹	۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۴	۱									
CL2	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۷۶	۱								
CL3	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۷۴	۰/۷۷	۱							
CL4	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۱۵	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۷۷	۱						
CL5	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۳	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۶۱	۰/۵۹	۰/۷۴	۰/۶۴	۱					
CL6	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۷۷	۰/۷۳	۰/۶۳	۱				
CL7	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۶۱	۰/۶۵	۰/۷۴	۰/۷۰	۰/۶۹	۰/۷۲	۱			
CL8	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۱۲	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۵۳	۰/۵۳	۰/۶۲	۰/۶۳	۰/۶۸	۰/۶۰	۰/۶۶	۱		
OX1	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۲۰	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۲۱	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۰	۱	
OX2	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۲۰	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۳۱	۱



شکل ۱- دندروگرام نمونه‌های سه گونه مورد مطالعه از جنس گلرنگ بر اساس ضریب Jaccard با روش UPGMA

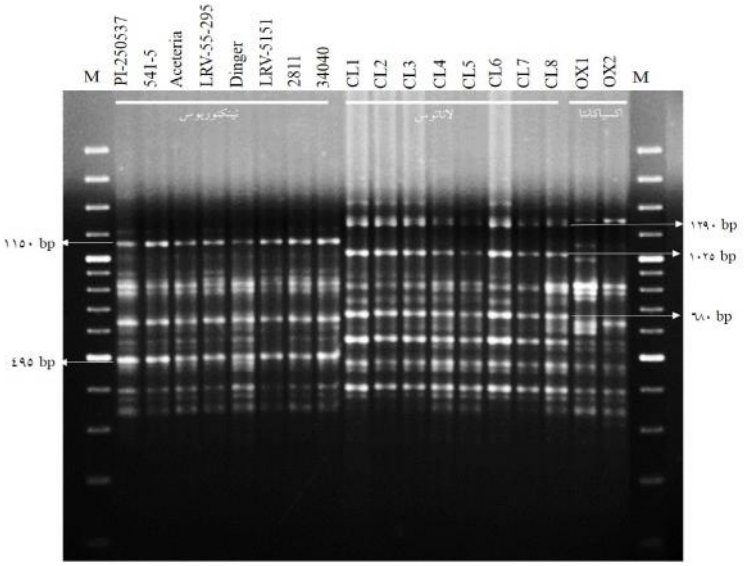
Figure 1. The dendrogram of samples from three species of *Carthamus* based on Jacard coefficient by UPGMA method

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

جدول ۴- تعداد باندهای اختصاصی تولید شده در سه گونه زراعی، لاناتوس و اکسیاکانتا با استفاده از ۹ آغازگر ISSR
Table 4. The produced specific bands in *C. tinctorius, C. lanatus and C.oxyacantha* using nine ISSR primers

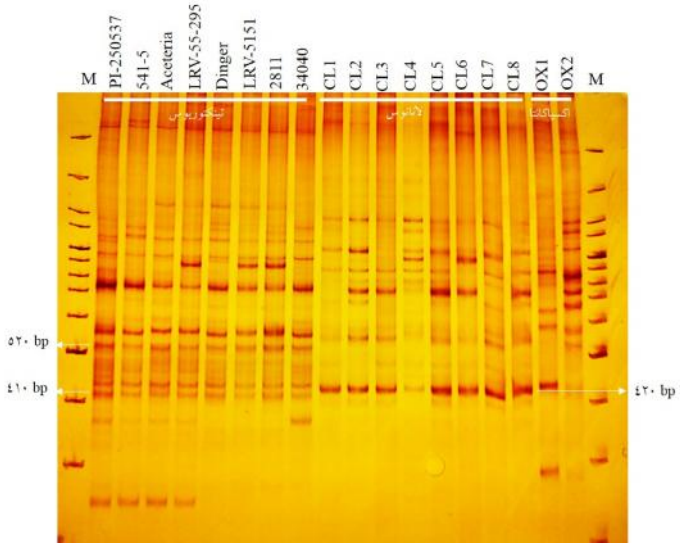
	زراعی (تینکتوریوس)	لاناتوس	اکسیاکانتا	جمع
آغازگر ۱	۲	۳	۰	۵
آغازگر ۲	۰	۱	۱	۲
آغازگر ۳	۲	۱	۰	۳
آغازگر ۴	۱	۲	۱	۴
آغازگر ۵	۳	۳	۱	۷
آغازگر ۶	۳	۰	۴	۷
آغازگر ۷	۴	۰	۰	۴
آغازگر ۸	۳	۰	۱	۴
آغازگر ۹	۲	۲	۰	۴
جمع	۲۰	۱۲	۸	۴۰

به منظور یافتن نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی سریع و مطمئن نمونه‌های هر یک از سه گونه مورد بررسی، اطلاعات باندهای حاصل از هر یک از آغازگرها در جدول ۴ خلاصه گردید. در مجموع ۴۰ باند اختصاصی با استفاده از ۹ آغازگر ISSR برای سه گونه زراعی، لاناتوس و اکسیاکانتا شناسایی شد. آغازگرهای ۵ و ۶ با هفت باند و آغازگر ۲ با دو باند، به ترتیب بیشترین و کمترین باندهای اختصاصی را تولید نمودند، همچنین گونه زراعی با ۲۰ باند، بیشترین باند اختصاصی و گونه اکسیاکانتا با ۸ باند، کمترین باندهای اختصاصی را به خود اختصاص دادند. همانطور که ملاحظه می‌شود آغازگر ۷ در گونه زراعی، آغازگرهای ۱ و ۵ در گونه لاناتوس و آغازگر ۶ در گونه اکسیاکانتا بیشترین باند اختصاصی را تولید کردند (جدول ۴). به عنوان نمونه، وجود باندهای اختصاصی در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. تفکیک باندها روی ژل آگارز با استفاده از آغازگر ۱ وجود پنج باند اختصاصی را نشان داد، بطوریکه دو باند ۱۱۵۰ و ۴۹۵ جفت بازی تنها در گونه زراعی اختصاصی بودند و در دو گونه دیگر مشاهده نشدند و سه باند ۱۲۹۰، ۱۰۲۵ و ۶۸۰ جفت بازی تنها در گونه لاناتوس اختصاصی بودند و در گونه‌های دیگر مشاهده نشدند (شکل ۲). با استفاده از آغازگر ۳ تعداد سه باند اختصاصی روی ژل آکریل‌آمید مشاهده شد، بطوریکه دو باند ۵۲۰ و ۴۱۰ جفت بازی تنها در گونه زراعی و باند ۴۲۰ جفت بازی تنها در گونه لاناتوس اختصاصی بودند (شکل ۳).



شکل ۲- باندهای اختصاصی و اندازه آنها برای سه گونه مورد مطالعه از جنس گلرنگ با استفاده از آغازگر ۱ روی ژل آگارز، M: نشانگر وزن مولکولی
Figure 2. The specific bands and their sizes for three species of *Carthamus* using primer 1 on agarose gel, M: molecular weight marker

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]



شکل ۳- باندهای اختصاصی و اندازه آنها برای سه گونه مورد مطالعه از جنس گلرنگ
با استفاده از آغازگر ۳ روی ژل آکریل‌آمید، M: نشانگر وزن مولکولی

Figure 3. The specific bands and their sizes for three species of *Carthamus* genius using primer 3 on agarose gel, M: molecular weight marker

با استفاده از این نشانگرهای اختصاصی شناسایی شده، تمایز سه گونه جنس گلرنگ بدون نیاز به ارزیابی‌های مورفولوژیکی و با دقت بالا، ممکن شده است. در این مطالعه دو آغازگر ۵ و ۶ علاوه بر داشتن قلاب (به ترتیب CTT و CTG) در انتهای ′۳، دارای یک توالی چهار نوکلئوتیدی AGAA در انتهای ′۵ هستند که به نظر می‌رسد نقش پررنگی در تولید باندهای اختصاصی بیشتر توسط این دو آغازگر داشته باشند. چندین مطالعه گزارش کردند که آغازگرهای ISSR دارای قلاب ′۵، باندهای بهتری ارائه می‌دهند (۵،۱۱)، اما در مطالعه‌ای دیگر، آغازگرهای دارای قلاب ′۳ نسبت به ′۵ در تولید باندهای اختصاصی موفق‌تر بوده‌اند و بسیاری از آغازگرهای بدون قلاب یا دارای قلاب ′۵ الگوهای باندی مبهم و ضعیفی ارائه کرده‌اند (۱۵). از آنجایی که اختصاصی بودن آغازگر توسط هشت نوکلئوتید ابتدایی ′۳ تعیین می‌شود، آغازگرهای دارای قلاب ′۳، تعداد توالی‌های دارای مشابهت با آغازگر را کاهش می‌دهند و بنابراین باندهایی با تفکیک بالا تولید می‌کنند (۱۳). موفقیت در تولید باندهای اختصاصی همچنین به موتیف قلاب نیز بستگی دارد، برای مثال در حالیکه آغازگرهای $(AG)_8T$، $(AG)_8C$ و $(AG)_8G$ باندهای مبهم تولید کردند، آغازگرهای (AG)n که دارای قلاب YT (Y= C, T) یا YA بودند، باندهای مشخص و مجزایی تولید کردند (۱۵). در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ جمعیت گلرنگ زراعی و دو جمعیت گونه لاناتوس با استفاده از آغازگرهای SRAP، باندهای اختصاصی در محدوده ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز که تنها در گونه لاناتوس وجود داشتند و دو گونه را از هم متمایز می‌کردند، شناسایی شدند (۱۴). در نشانگر RAPD، شناسایی هیبرید بین گونه زراعی و پالاستینوس از طریق باندهای اختصاصی صورت پذیرفت (۱۷). با استفاده از آغازگرهای ISSR، تمایز بین هشت توده گونه لاناتوس که از مناطق مختلف استان گلستان جمع‌آوری شده بودند انجام شد (۱۲).

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که از نظر قرابت ژنتیکی، دو گونه گلرنگ زراعی و اکسیاکانتا نزدیکتر بودند و گونه لاناتوس قرابت کمتری با این دو داشت. بیشترین تنوع داخل گونه در گونه اکسیاکانتا مشاهده گردید و پس از آن دو گونه لاناتوس و گلرنگ زراعی قرار داشتند. تفکیک صحیح نمونه‌های مربوط به سه گونه مورد بررسی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ISSR نشانگر مناسبی برای مطالعه تنوع و تعیین قرابت ژنتیکی نمونه‌های جنس گلرنگ است و با شناسایی نشانگرهای اختصاصی، نتایج این تحقیق کمک شایانی در تمایز هر چه بهتر گونه‌های وحشی و زراعی گیاه گلرنگ خواهد کرد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

منابع

1. Ahmadikhah, A. 2010. Advanced plant breeding. Gorgan University Press, Iran. 460 pp (In Persian).
2. Ash, G.J., R. Raman and N.S. Crump. 2003. An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. Weed Res, 43: 208-213.
3. Bagmohammadi, H., M.H. Pahlavani, A. Ahmadikhah and S.E. Razavi. 2012. Genetic variation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and related species revealed by ISSR analysis. Plant Breeding and Seed Science, 66: 139-150.
4. Botstein, B., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.
5. Charters, Y., A. Robertson, M. Wilkinson and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. oleifera) using 5′-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theoretical and Applied Genetics, 92: 442-447.
6. Doyle, J. and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
7. Ehdaei, B. 2007. Plant breeding. Tehran University Press, Iran, 589 pp (In Persian).
8. Kumari, L. 2009. Evaluation of early generations of interspecific crosses of *Carthamus* species for productive recombinants. University of Agricultural Sciences, Dharwad, 64 pp.
9. Mahjoob, B., Najafi-Zarini, H. and Hashemi, S.H.R. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 *Brassica* genotypes using ISSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 6: 96-106.
10. Majidi, M.M. and S. Zadhoush. 2014. Molecular and morphological variation in a world-wide collection of safflower. Crop Science, 54: 2109-2119.
11. Matthews, D., J. McNicoll, K. Harding and S. Millam. 1999. 5′-Anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. Plant Cell Reports, 19: 210-212.
12. Nikdel, S. 2013. Evaluation of inter and intra ecotype genetic diversity for wild safflower (*Carthamus lanatus*) of Golestan Province by ISSR markers, M.Sc. Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran (In Persian), 92 pp.
13. Parsons, B.J., H.J. Newbury, M.T. Jackson and B.V. Ford-Lloyd. 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. Molecular Breeding, 3: 115-125.
14. Peng, S., N. Feng, M. Guo, Y. Chen and Q. Guo. 2008. Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis, Biochem. System. Ecol, 36: 531-538.
15. Pharmawati, M., G. Yan and P.M. Finnegan. 2005. Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. Annals of botany, 95: 1163-1170.
16. Pourdad, S.S. 2006. Safflower. Sepehr Press, Iran, 123 pp (In Persian).
17. Ravikumar, R.L., C.D. Soregaon and D. Satish. 2007. Molecular diversity analysis of five different species of genus *Carthamus.* National Seminar on Changing Global Vegetable Oils Scenario: Issues and Challenges before India, Department of Revenue, Hyderabad, 29-31 January, pp: 2-4.
18. Roopa, V.K. 2007. Molecular and morphological diversity analysis in different *Carthamus* species. University of Dharwad, India, 65 pp.
19. Sabzalian, M.R., G. Saeidi, A. Mirlohi and M.T. Rabbani. 2009. Genetic variation among populations of wild safflower, *Carthamus oxyacantha* analyzed by agro-morphological traits and ISSR markers. Genet Resour Crop Evol, 56: 1057-1064.
20. Safavi, S.A., S.S. Pourdad, M. Taeb and M. Khosroshahli. 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.
21. Saeidi, K. and N.A. Adam. 2011. A survey on pest insect fauna of safflower fields in the Iranian Province of Kohgiloyeh and Boyerahmad. African Journal of Agricultural Research, 6: 4441-4446.
22. Zeinali, E. 1999. Safflower, characteristics, production and utilization. Gorgan University Press, Iran. 137 pp (In Persian).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

Evaluation of Genetic Relationship and Identification of Specific Markers for Safflower and its Wild Relatives Existing in Iran

Mojde Akbarzade Lelekami[1], Mohammad Hadi Pahlevani[2], Saeid Navabpour[3] and Khalil Zaynalinejad[4]

1, 3 and 4- Graduated M.Sc., Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
(Corresponding author: hpahlavani@yahoo.com)
Received: January 17, 2015 Accepted: April 21, 2015

Abstract

The wild relatives are important sources of genes for some desirable traits and adaptation to environmental conditions that can be exploited to enrich the cultivated safflower gene pool. In this study, genetic relationship and finding chance of specific markers between three species of the genus *Carthamus*, including *tinctorius*, *lanatus* and *oxyacantha* were evaluated by 9 ISSR primers. The separation of bands was perfomed on agarose and polyacrylamide gels. Using the nine ISSR primers, 169 bands that 96.5% of them showed polymorphism were produced. In general, 40 specific bands were identified that most of them were produced by primers 5 and 6 and *C. tinctorius* with 20 bands had the highest number. For two species *C. lanatus* and *C. oxyacantha* 12 and 8 bands were identified, respectively. In terms of the ability of producing inter-species polymorphism, the average number of polymorphic bands generated by primers was 18.33 and the highest polymorphic information content (PIC) was obtained by primer 1. The results of similarity matrix showed that the highest similarity existed among cultivated safflower and C. *oxyacantha*. The cluster analysis based on Jacard coefficient with UPGMA separated the samples into three groups which each group were belonged to one species. Using the identified specific markers, the taxonomy and differentiation of the species of *Carthamus* were feasible with high precision and without the need for morphological evaluations. The results of this research also help to increase the efficiency of gene transfer from wild relatives to cultivated species.

Keywords: Genetic Variation, ISSR, PIC, Safflower, Specific marker

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]