Archive of SID

مجله دانش علف‌های‌هرز

مجله دانش علف‌های‌هرز ۱۱ (۱۳۹۳) ۱۰۶-۹۷

مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های تیغ گرگی (*Carthamus lanatus*) در مناطق شمال شرق ایران

سمانه نیکدل[1*]، محمدهادی پهلوانی[2]، خلیل زینلی نژاد[3]، احد یامچی[4]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۲- دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۳-استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۴-استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱

چکیده

اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی جوامع علف‌های‌هرز به روش‌های کنترل بیولوژیک آن‌ها کمک زیادی می‌کند، مطالعه حاضر، جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های تیغ گرگی (*Carthamus lanatus*) جمع‌آوری شده از هشت رویشگاه مختلف استان گلستان با استفاده از ۲۴ نشانگر ISSR انجام شد. با استفاده از ۹ نشانگری که حدود ۲۶/۰۴ درصد چندشکلی نشان دادند، میانگین ضریب تشابه بین افراد هر توده بر اساس روش جاکارد و پارامترهای توصیفی نظیر تنوع ژنی نئی، شاخص اطلاعات شانون، درصد جایگاه‌های چند شکل، تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل مؤثر محاسبه گردید. بالاترین ضریب تشابه ژنتیکی افراد در توده-های گمیشان و اطراف آن و پایین‌ترین آن در توده بندرترکمن وجود داشت. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی درون توده‌های مورد بررسی (۶۳ درصد) بیش از تنوع ژنتیکی بین توده‌ای (۲۳ درصد) بود. بیشترین شاخص تنوع ژنی نئی، اطلاعات شانون، درصد جایگاه‌های چند شکل، تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل مؤثر در توده بندر ترکمن و کمترین آنها در توده‌های جزیره آشورآده و اینچه‌برون محاسبه شد. بنابراین توده بندرترکمن دارای بالاترین و توده‌های جزیره آشورآده و اینچه‌برون دارای کمترین مقدار تنوع ژنتیکی درون توده‌ای بودند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، ضریب تشابه، ISSR

* Corresponding author. E-mail: samanenikdel@ymail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تیغ گرگی با نام علمی *Carthamus lanatus* L. یک علف‌هرز یک ساله، زمستانه با ریشه‌های کم عمق و سطحی دارای ساقه‌های بلند، عمودی و خشبی است که ارتفاع آن از ۱۰ سانتی‌متر تا ۱ متر می‌رسد. نام دیگر این گیاه تیغ گرگی یا گلرنگ بیابانی و نام انگلیسی آن distaff thistle است. گیاهچه‌های این گونه، برگ‌های کوتیلدونی نسبتا بزرگی داشته و به صورت روزت رشد می‌کنند. همان‌طور که ساقه رشد می‌کند، برگ‌های روزت پژمرده شده و ناپدید می‌شوند و رشد برگ‌ها روی ساقه به صورت متناوب و همراه با خارهای تیز ضخیمی می‌باشد. رشد ساقه‌ها با غنچه‌هایی با گل زرد رنگ خاتمه می‌یابند که هر یک توسط براکته‌های بزرگ، خاردار و برگ مانند محصور شده‌اند (Kessler *et al.*, 1987). این گیاه به آسانی دگرگشنی می‌کند و به این ترتیب ساختار و میزان تنوع ژنتیکی جمعیت پیوسته تغییر می‌کند و تنوع ژنتیکی درون جمعیت در موفقیت کنترل بیولوژیکی این علف‌هرز، می‌تواند تاثیرگذار باشد (Ash *et al.*, 2002). بذور تیغ گرگی اغلب در خاک در حالت خواب بیش از چندین سال باقی مانده و بعد از آن در دیگر محصولات زراعی به عنوان علف‌هرز جوانه می‌زند (Grace *et al.*, 2002). تیغ گرگی مناطق گرم و نیمه خشک با حاصلخیزی پایین و بارندگی سالانه ۳۰۰ تا ٦۰۰ میلی‌متر را ترجیح می‌دهد. این علف‌هرز را می‌توان در مزارع غلات، حاشیه جاده‌ها، چراگاه-ها و مراتع فقیر مشاهده می‌شود (Sindel *et al.*, 1997). سختی کنترل تیغ گرگی به روش‌های متداول، این علف‌هرز را به یک هدف بالقوه برای کنترل بیولوژیکی تبدیل کرده است. با این حال رابطه نزدیک آن با گلرنگ زراعی، مشکلاتی را در نحوه کنترل بیولوژیکی ایجاد کرده است (Ash *et al.*, 2002). همچنین از این گونه می‌توان به عنوان منبع ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها و آفات و تنش‌های غیرزیستی در اصلاح گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L.) و همچنین دارای مصارف دارویی و خوراکی و صنعتی یاد نمود (Heaton & Klislewicz, 1981; Kessler et al., 1987; Taskova et al., 2003; Carpetain & Zarei, 2005).

از طرفی اساس ایجاد تنوع ژنتیکی که عامل اصلی تکامل گونه‌ها بشمار می‌رود، تفاوت یا چند شکلی طبیعی ناشی از تغییر توالی‌های DNA در ژنوم گیاهی و جانوری در بین و داخل یک گونه می‌باشد (Henry, 2005). ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای حفاظت از منابع ژنتیکی، کنترل، گسترش پایه ژنتیکی و برنامه‌های کاربردی عملی از جمله برنامه‌های اصلاحی ضروری است (Amini *et al.*, 2008). در گذشته مطالعات تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی عمدتاً بر ارزیابی صفات مورفولوژیک و مشاهده‌ای متکی بود اما در حال حاضر، بسیاری از سیستم‌های نشانگر مولکولی وجود دارد که به طور مداوم برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرارمی‌گیرد (Khan *et al.*, 2009). 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 تأثیر عوامل محیطی و یا مراحل نمو گیاهی قرار نمی‌گیرند (Ahmadikhah *et al.*, 2009). این خصوصیات موجب شد تا گزارشات روزافزونی برای به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی بویژه ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی ارائه شود. ISSR یک نشانگر شبه RAPD است که نیازی به داشتن شناخت قبلی از توالی ژنومی ندارد (Reddy *et al.*, 2002). ارزیابی ژنتیکی و روابط درون گونه گلرنگ زراعی بر اساس نواحی بین توالی‌های تکراری ساده (ISSR) توسط تجزیه و تحلیل شد (Yang *et al.*, 2007). در این ارزیابی تنوع ژنتیکی میان ٤۸ نمونه گلرنگ جمع آوری شده از ۳۲ کشور مختلف با استفاده از ۳۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که از ۳۰ آغازگر تکثیر شده ۲۲ آغازگر چندشکلی نشان دادند. نتایج، چندشکلی بالایی را در سطح DNA در ژرم‌پلاسم گلرنگ نشان داد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی نمونه‌های نشات گرفته از آسیا بالاتر از نمونه‌های جمع آوری شده از اروپا بود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصله از این مطالعه بیان می‌دارد که ISSR سیستم نشانگر مؤثری برای تشخیص تنوع ژنتیکی در میان گلرنگ است. تنوع ژنتیکی در میان جوامع تیغ گرگی، *Carthamus oxyacanthus* M.Bieb.، توسط سبزعلیان و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر اساس نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفت (Sabzalian *et al.*, 2009). مواد گیاهی این مطالعه شامل ۱۹ نمونه *C. oxyacanthus* جمع‌آوری شده از مناطق غربی، مرکزی و جنوبی ایران همراه با ۵ ژنوتیپ زراعی بود. برای بررسی ژنوتیپ‌ها از ۱٦ پرایمر ISSR مورد استفاده، ۱۲ تا از آن‌ها چندشکلی بالایی نشان دادند. همانطور که انتظار می‌رفت، چندشکلی حاصل از نشانگر ISSR در نمونه‌های وحشی نسبت به ژنوتیپ زراعی بالاتر بود. در مطالعه‌ی حاضر، تعداد زیادی از باندهای منحصر به فرد در دو گونه ایجاد شد که با هم تفاوت داشتند، که این موضوع دلالت بر قابلیت نشانگرهای ISSR در تجزیه و تحلیل تنوع و امکان استفاده از آن در مطالعات تکاملی دارد.

دمای بالا، کمبود نزولات و فقر خاک موجب شده است تا علف‌هرز تیغ گرگی در نواحی شمال شرق ایران بویژه استان گلستان به وفور مشاهده شود و مبارزه بیولوژیکی با آن یکی از اهداف مدیریتی مزارع و مراتع محسوب می‌شود. همچنین استان گلستان از لحاظ دارا بودن انواع گونه‌های وحشی گلرنگ از جمله تیغ گرگی و خار زرد (*C. oxyacantha* M.Bieb.) منطقه‌ای بسیار غنی محسوب می‌شود، به طوری که منبع ارزشمندی از ژن‌های مفید را در اختیار اصلاح‌کنندگان گلرنگ زراعی قرار می‌دهد. لذا هدف از انجام این مطالعه آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های گونه *C. lanatus* به منظور مدیریت علمی و مؤثر کنترل آن به عنوان علف‌هرز مزارع و افزایش کارایی حفاظت از جوامع طبیعی این گونه به عنوان یک گونه زراعی بالقوه در آینده می‌باشد.

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 و درون توده‌ای، از هشت توده *C. lanatus* L. (تیغ گرگی) بومی استان گلستان استفاده شد. جمع‌آوری بذور توده‌ها در مرداد ماه سال ۱۳۹۱ از هشت منطقه‌ی رویش این گونه در استان گلستان صورت گرفت که به صورت زیر بود: (۱) توده اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰) یا CL1، (۲) توده بندر ترکمن یا CL2، (۳) توده حد واسط بندر ترکمن–آق قلا یا CL3، (٤) توده حد واسط بندر ترکمن–گمیشان یا CL4، (٥) توده گمیشان یا CL5، (٦) توده حد واسط گمیشان–آق قلا یا CL6، (۷) توده اینچه برون یا CL7، (۸) توده جزیره آشوراده یا CL8. 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 ٢٤ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد) استفاده شد (Bagmohammadi *et al.*, 2011). 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 توده با استفاده از قیچی استریل انجام شد. تعداد گیاهچه-های نمونه‌گیری شده در هر توده متفاوت بود. نمونه‌های برگی درهاون‌های 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 & 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 مطالعه ابتدا تعداد ٢٤ آغازگر تصادفی بین ریزماهواره‌ای (ISSR) مورد ارزیابی

www.SID.ir

Archive of SID

اولیه قرار گرفتند و با توجه به چندشکلی ایجاد شده، از ۹ آغازگر دارای کارایی برای بررسی کلیه نمونه‌ها استفاده شد. آغازگرها از شرکت MetabionInternationl AG آلمان تهیه شدند که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر (۱ میکرولیتر بافر PCR[1] (۱۰x)، ۰/۲ میکرولیتر دزوکسی نوکلئوتیدها[2] (۱۰ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم[3] (۵۰ میلی مولار)، ۰/۰۵ میکرولیتر دی‌ان‌ای پلیمراز[4] (۵ recombinant TaqU)، ۳ نانوگرم DNA، یک میکرولیتر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T GradiantBiometra 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 بطور اختصاصی برای هر کدام از آغازگرها استفاده گردید. دمای اتصال مورد استفاده برای هر آغازگر طبق دمای ذوب ذکر شده و حدود ۵ درجه کمتر از دمای ذوب پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده‌ی آغازگرها بود (Gallaghery & Wiley, 2008). به این ترتیب چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (FAO/IAEA, 2010) عبارت بود از: یک چرخه واسرشت-سازی اولیه در دمای ۹٤ °C به مدت هفت دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ٤۷-۵۳ °C به مدت ٤۵ ثانیه و مرحله بسط به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ °C، یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ °C و مرحله نگهداری در دمای ٤ °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 داکیومنت انجام شد، باندهایی که چندشکلی نشان دادند به صورت یک (حضور) و صفر (عدم‌حضور) 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 براساس درجه شباهت یا تفاوت آن‌ها است.به منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون هر توده، ماتریس تشابه ژنتیکی درون توده‌های *C .lanatus* بر اساس روش جاکارد توسط نرم افزار ان‌تی‌سیس رسم و پارامترهای توصیفی نظیر تنوع ژنی نئی، شاخص اطلاعات شانون، تعداد جایگاه‌های چند شکل، درصد جایگاه‌های چند شکل، تعداد آلل مشاهده شده (na) و تعداد آلل مؤثر (ne) توسط نرم‌افزار Pop gene ver 1.31 (Nie *et al.*, 1973 & 1975) محاسبه گردید. همچنین تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAlexVer 6.3 صورت گرفت.

جدول ۱- نام، توالی و دمای ذوب ۹ پرایمر ISSR استفاده شده در این مطالعه

Table 1- Name, sequence and TM of 9 ISSR primers used in this study.

Primer	Sequences	Used linkage temperature	Melting Tempreture suggested by the manufacturer
ISSR1	5'-CACACACACACACACAATC-3'	50ºC	**55 ºC**
ISSR2	5'-CACACACACACACAGCG-3'	50ºC	**55 ºC**
ISSR3	5'-GAG AGAGAGAGAGAGAC-3'	47ºC	**52 ºC**
ISSR4	5'-CACACACACACACACAAGT-3'	50ºC	**55 ºC**
ISSR5	5'- GACAGACAGACAGACAGACA-3'	53ºC	**58 ºC**
ISSR6	5'-GGGTGGGGTGGGGTG-3'	52ºC	**57 ºC**
ISSR7	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGGCC-3'	54ºC	**59 ºC**
ISSR8	5'- TGTGTGTGTGTGTGTGG-3'	47ºC	**52 ºC**
ISSR9	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCTC-3'	52ºC	**57 ºC**

[1] PCR buffer
[2] dNTPs
[3] $MgCl_2$
[4] Taq polymerase

www.SID.ir

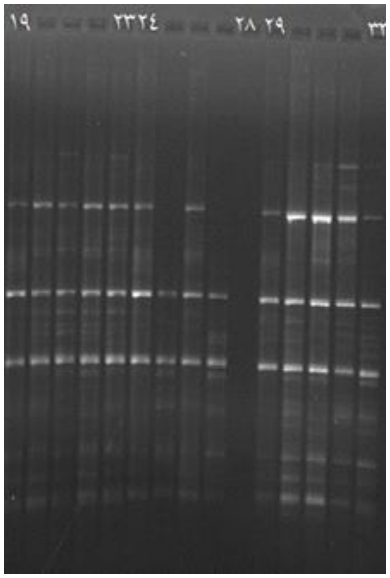
Archive of SID

نتایج و بحث

از ٢٤ آغازگر مورد استفاده برای PCR نمونه‌ها، ۹ آغازگر ذکر شده که چندشکلی نشان دادند برای کلیه ۷۱ نمونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. در کل ۹٦ باند تولید شد که از این تعداد، ۲۵ باند (معادل ٢٦/٠٤ 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. بعنوان مثال، الگوی باندهی آغازگر ISSR5 بر روی نمونه‌های DNA علف‌هرز تیغ گرگی در تعدادی از گیاهان توده CL3، توده CL4 و توده CL5، در شکل ۱ آورده شده است. در مطالعه‌ای که بر روی ارقام گلرنگ زراعی انجام شد، از ۲۰ آغازگر RAPD و ۱۳ آغازگر ISSR و ٤ آغازگر AFLP استفاده گردید که چندشکلی نمایان شده به ترتیب به میزان ٢٤/٢، ۱۷/۸ و ٦۱/۱ درصد بود (Sehgal & Raina, 2005).

ضریب تشابه میزان نزدیکی دو فرد را در هر توده نشان می-دهد و بین صفر (عدم شباهت) تا ۱ (کاملا مشابه) متغیر است. در توده CL1 تعداد نمونه‌های مورد بررسی ۹ بود که ضریب تشابه آنها بین ۰/۲۹ تا ۰/۹۱ متغیر بود. در توده CL2 تعداد نمونه‌های مورد بررسی ۹ بود که ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۱۹ تا ۰/۸۰ متغیر بود.در توده CL3، تعداد ۱۰ نمونه بررسی شد که دامنه ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/٤۰ تا ۰/۸۹ تغییر کرد.

در مورد توده CL4 نیز، تعداد ۱۰ نمونه بررسی شد که تغییرات ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/٥٦ تا ۰/۹۲ مشاهده شد. تعداد نمونه بررسی شده در توده CL5 نیز ۱۰ بود که ضریب تشابه آن‌ها از ۰/۲۰ تا ۰/۹۲ متغیر بود. تغییرات ضریب تشابه ۹ نمونه بررسی شده از توده CL6، بین ۰/۲۹ تا ۰/۸۷ بود. ماتریس تشابه ۱۰ نمونه بررسی شده از توده CL7 ضرایب تشابه آن‌ها را بین ۰/٥۷ تا ۰/۹۱ نشان می‌دهد. در ٤ نمونه بررسی شده در توده CL8 ضریب تشابه بین ۰/٥۸ تا ۰/۸٦ متغیر بود که بعنوان نمونه، در جدول ۲ ماتریس تشابه ژنتیکی توده CL1 بر اساس روش جاکارد نشان داده شده‌است. Pang *et al.*, 2008 در مطالعه‌ای که بر روی ۲۳ جمعیت *C. tinctorius* و ۲ جمعیت *C. lanatus* با استفاده از نشانگر SRAP داشتند، ماتریس تشابه ژنتیکی بین این جمعیت‌ها رسم



شکل ۱- الگوی باندهی آغازگر ISSR5 بر روی نمونه‌های DNA علف‌هرز تیغ گرگی (*C.lanatus*). لاین ۱۹ تا ۲۳ توده CL3، لاین ٢٤ تا ۲۸ توده CL4 و لاین ۲۹ تا ۳۳ توده CL5.

Figure 1- Banding patterns of PCR products by ISSR5 on DNA of *C. lanatus*. Lane 19-23 samples of ecotype CL3, Lane 24-28 samples of ecotype CL4, and Lane 29-33 samples of ecotype CL5.

www.SID.ir

Archive of SID

کردند که ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۰۱ تا ۰/۸۵ متغیر بود (Pang *et al.*, 2008). طبق آنچه که ذکر شد و بنابر میانگین ضریب تشابه بین افراد هر توده که به این ترتیب می‌باشد : توده CL1؛ برابر ۰/۵۳۸، توده CL2؛ برابر ۰/٤٥٥، توده CL3؛ برابر ۰/٦١٥، توده CL4؛ برابر ۰/۷۲٤، توده CL5؛ برابر۰/٦۰۷، توده CL6؛ برابر۰/٥٤١، توده CL7؛ برابر ۰/۷٥۱ و توده CL8؛ برابر ۰/٦٥٥؛ تنوع ژنتیکی درون توده‌های CL1 (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)) و CL2 (بندرترکمن)، بالاترین مقدار بود. به دنبال آن، پایین‌ترین تنوع ژنتیکی درون، متعلق به توده‌های CL7 (اینچه‌برون) و CL8 (جزیره آشورآده) می‌باشد.

داده‌های به دست آمده از پارامترهای توصیفی ذکر شده در جدول ۳ نیز، گواهی بر این مدعاست. بر طبق آنچه که در جدول ۳ آمده است تنوع ژنی نئی از بیشترین به کمترین مقدار به ترتیب، متعلق به توده‌های CL2 (بندرترکمن)، CL1 (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰))، CL3 (حد واسط بندرترکمن – آق‌قلا)، CL6 (حد واسط گمیشان – آق‌قلا)، CL4 (حد واسط بندرترکمن – گمیشان)، CL5 (گمیشان)، CL8 (جزیره آشورآده) و CL7 (اینچه‌برون) به ترتیب به میزان ۰/۳۱۷، ۰/۲۵، ۰/۲۳، ۰/۲۰، ۰/۱۹، ۰/۱۸، ۰/۱ و ۰/۱ بود. با توجه به جدول ۳، بیشترین مقدار شاخص اطلاعات شانون به میزان ۰/٤٦٨ و بنابر نتایج جدول ٤ بالاترین درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل و متوسط تعداد آلل مؤثر به ترتیب به مقدار ۸٤ درصد و ۱/٥٦ متعلق به توده CL2 (بندرترکمن) بود. تمام این آمارها به بیان این مطلب می‌پردازد که تنوع ژنتیکی درون این توده بالاترین مقدار نسبت به سایر توده‌هاست. در مقابل بر طبق داده‌های حاصله در جداول ۲ و ۳ تنوع ژنتیکی درون توده‌های CL8 (جزیره آشورآده) و CL7 (اینچه‌برون) کمترین مقدار بود.

جدول ۲- ماتریس تشابه ژنتیکی توده CL1 بر اساس روش جاکارد.

Table 2- Matrix of genetic similarity for samples of ecotype CL1 based on jaccard coefficient.

Sample number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1.00								
2	0.47	1.00							
3	0.50	0.65	1.00						
4	0.67	0.50	0.73	1/00					
5	0.38	0.73	0.65	0.60	1.00				
6	0.38	0.44	0.56	0.41	0.44	1.00			
7	0.43	0.50	0.63	0.69	0.50	0.50	1.00		
8	0.29	0.63	0.47	0.41	0.53	0.37	0.60	1.00	
9	0.46	0.53	0.56	0.62	0.44	0.53	0.91	0.64	1.00

جدول ۳- تنوع ژنی نئی، شاخص اطلاعات شانون توده‌های علف‌هرز تیغ گرگی (*C. lanatus*) مطالعه شده توسط آغازگرهای بین ریزماهواره‌ای.

Table 3- Nei's gene diversity coefficient and Shannon's information index for ecotypes of *C. lanatus* by ISSR markers.

ecotype	Nei's gene diversity		Shannon's Information index	
	Mean	St. Dev	Mean	St. Dev
CL_1	0.25	0.19	0.38	0.27
CL_2	0.32	0.18	0.47	0.25
CL_3	0.23	0.22	0.34	0.31
CL_4	0.19	0.19	0.29	0.38
CL_5	0.18	0.19	0.27	0.27
CL_6	0.20	0.21	0.30	0.30
CL_7	0.10	0.17	0.15	0.25
CL_8	0.10	0.19	0.14	0.27

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- تعداد جایگاه‌های چند شکل، درصد جایگاه‌های چند شکل، تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل مؤثر برای توده‌های علف‌هرز تیغ گرگی (*C. lanatus*) مطالعه شده توسط آغازگرهای بین ریزماهواره‌ای.

Table 4- Number of polymorphic loci, percentage of polymorphic loci, observed and effective number of alleles for ecotypes of *C. lanatus* by ISSR markers.

ecotype	number of polymorphic loci	percentage of polymorphic loci	Observed number of alleles	Effective number of alleles
CL_1	18	72%	1.72	1.43
CL_2	21	84%	1.82	1.56
CL_3	15	60%	1.60	1.43
CL_4	14	56%	1.56	1.39
CL_5	14	56%	1.56	1.30
CL_6	13	52%	1.52	1.36
CL_7	7	28%	1.28	1.16
CL_8	6	24%	1.24	1.19

داده‌های حاصله نشان می‌دهد که افراد درون هر کدام از توده-های CL1 و CL2 از قرابت (شباهت) کمتری نسبت به سایر توده‌ها برخوردار هستند. بنابراین می‌توان اظهار داشت توده CL2 (بندرترکمن) و CL1 (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)) دارای هتروزیگوسیتی و توده‌های CL8 (جزیره آشورآده) و CL7 (اینچه‌برون) دارای هموزیگوسیتی بیشتری بودند. تنوع ژنتیکی پایین توده‌های CL8 (جزیره آشورآده) و CL7 (اینچه‌برون) را می‌توان به این دلیل نسبت داد که توده‌CL8 (جزیره آشورآده) در مکانی جدا از سایر توده‌ها در جزیره محصور شده توسط دریا قرار گرفته است، تقریباً تمام راه‌های ارتباطی آن با دیگر توده‌ها قطع شده و در پی آن نمی‌تواند با توده‌های دیگر از *C .lanatus* در انتقال گرده و تلقیح مشارکت داشته باشد که سبب هموزیگوسیتی درون این توده می‌شود. هم‌چنین توده‌CL7 (اینچه‌برون) نیز از نظر جغرافیایی با سایر توده‌ها در فاصله دورتری روی خشکی قرار گرفته که این فاصله زیاد مانع از دگرگرده‌افشانی با دیگر توده‌ها شده و گرده‌افشانی درون جمعیت توده CL7 صورت گرفته که هموزیگوسیتی را به دنبال می‌آورد. همچنین گرده‌افشانی در این گونه توسط حشراتی چون سوسک‌ها و زنبورها صورت می‌گیرد که وجود شرایط آب و هوایی مناسب جهت فعالیت حشرات ضرورت دارد. بنابراین گرمای هوا، خشکی محیط و شرایط نامناسب آب و هوایی سبب کاهش گرده‌افشانی و به دنبال آن تنوع ژنتیکی کاهش می‌یابد. لذا می‌توان بیان کرد عوامل ذکر شده در منطقه مرزی اینچه‌برون سبب کاهش تنوع ژنتیکی آن شده است.

مقایسه میزان هتروزیگوسیتی دو توده یک و هفت که هر دو از منطقه اینچه‌برون جمع‌آوری شده‌اند نشان می‌دهد که توده CL1 (اینچه برون (برداشت ۱۳۹۰)) از تنوع درون توده‌ای بیشتری نسبت به توده CL7 (اینچه‌برون (برداشت۱۳۹۱)) برخوردار است که دلیل احتمالی آن را می‌توان روش نمونه-گیری در سال ۱۳۹۰ ارتباط داد که تعداد بوته بیشتری از چند ناحیه از منطقه اینچه‌برون جمع‌آوری شده بود.

نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از نرم افزار GenAlex Ver. 6.3 نشان داد که واریانس درون توده‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه جدول آنالیز واریانس مولکولی (جدول ٥)، سطح بالایی از تنوع درون توده‌ای و بین توده‌ای ژنوتیپ‌های جمعیت مورد بررسی به ترتیب ٦٣ و ٢٣ درصد را نشان می-دهد. این نتایج حاکی از آن است که سهم بیشتری از تنوع کل مربوط به تنوع درون توده است.تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی که گلکار و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی شانزده ژنوتیپ گلرنگ (*C. tinctorius*) بومی و غیر بومی ایران توسط بیست آغازگر ISSR انجام دادند هیچ تفاوت معنی داری را بین دو گروه ژنوتیپ بومی و غیر بومی نشان نمی-دهد. این تجزیه و تحلیل برای داده‌های ISSR درون گروه-های ژنوتیپی تنوع معنی داری را نشان می‌دهد (Golkar *et al.*, 2011).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- تجزیه واریانس بین و درون توده‌های علف‌هرز تیغ گرگی (C. lanatus) با استفاده از داده‌های نشانگر ISSR.

Table 5- Analysis of between and within ecotypes variation for ecotypes of *C. lanatus* by ISSR markers.

Source of variation	df	Variance	percentage of Variance	P-value
between population	7	1.93	23	<0.01
within population	63	3.35	63	
Total	70	5.28	1	

نتایج تجزیه واریانس مولکولی حاکی از آن است که سهم بیشتری از تنوع کل، مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها است. به نظر می‌رسد به دلیل دگرگشنی جمعیت‌ها، انتقال دانه گرده درون جمعیت‌ها صورت گرفته و با گذشت زمان با هم اختلاط یافته‌اند. معنی‌دار و بالا بودن واریانس مولکولی بین توده‌ها نشان دهنده وجود ارتباط میان فاصله ژنتیکی و جغرافیایی است. تنوع بالا در میان گونه‌های جمع‌آوری شده از طبیعت می‌تواند به دلیل آزادگرده‌افشانی و در نتیجه نوترکیبی فراوان ژن‌ها در اثر انتقال گرده توسط حشرات از گیاهی به گیاهی دیگر باشد. همان گونه که در قبل ذکر شد گونه‌ی *C .lanatus* به نقل از Ash *et al.*, 2002 گیاهی است که به آسانی دگرگشنی می‌کند (Ash *et al.*, 2002). البته این نوع تنوع به تنوع ژنی مربوط می‌شود نه تنوع آللی، زیرا نشانگر مورد استفاده غالب بود. بنابراین می‌توان گفت توده‌CL7 (اینچه‌برون) به دلیل دورافتاده بودن از سایرتوده‌ها و توده‌CL8 (جزیره آشورآده) به علت متفاوت و مجزا بودن مکان جغرافیایی توده و دور از دسترس بودن نسبت به سایر توده‌ها، تنوع ژنتیکی پایینی دارد. باید اشاره داشت در این دو توده، جامعه گیاهی کوچک است و امکان دارد در سال تنها چند گیاه در بذرگیری و ایجاد بوته‌های سال بعد شرکت کنند، در این حالت بعضی از ژن‌ها از نسلی به نسل بعد انتقال نمی‌یابند که باعث کم و زیاد شدن تصادفی وفور نسبی ژن‌ها در توده‌ها می‌شود. بنابراین امکان دارد که این دو توده دچار فرآیندی به نام رانده‌شدن ژنتیکی شده و به مرور سبب گونه‌زایی و یا حتی انقراض گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به تجزیه و تحلیل‌های انجام گرفته در این مطالعه، می‌توان بیان داشت با وجود اینکه تنوع درون و بین توده‌ای ژنوتیپ‌های جمعیت مورد بررسی در سطح بالایی قرار دارند، اما تنوع درون توده‌ای نسبت به تنوع بین توده‌ای، سهم بیشتری (٦٣ درصد) را به خود اختصاص داده است. همچنین در بین توده‌های مورد بررسی، توده CL2 (بندرترکمن) را می‌توان به عنوان توده‌ای که دارای بالاترین تنوع درون توده‌ایست معرفی نمود. به منظور هر چه بهتر انجام گرفتن کنترل علف‌هرز، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی آن الزامی است، به این ترتیب که هر چه میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی از علف‌هرز بالاتر باشد، درجه مقاومت افراد متفاوت خواهد بود و در نتیجه ممکن است کنترل آن با عوامل بیولوژیک با مشکلات زیادتری مواجه شود.

منابع

Ash, G.H., Raman, R. and Crump, N.S. 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 *Pythiumultimum.* Gorgan University of

Ahmadikhah, A. 2009. Advanced genetics. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press. (In Persian with English summary).

Amini, F., Saeidi, G., and Arzani, A. 2008. Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. Euphytica Sci.163: 21–30.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian with English summary).

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

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. Phytochem. 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, S.R. and Wiley, E.A. 2008. Current protocols essential laboratory technique. Pp 737.

Golkar, P., Arzani, A. and Rezaei, A.M. 2011. Genetic variation in safflower (*Carthamus tinctorious* L.) for seed quality-related traits and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Intl. J. of Mo. Sci. 12: 2664-2677.

Grace, B.S., Sheppard, A., Whaley, R.D.B. and Sindel, B.M. 2002. Seedbank and seedling emergence of saffron thistle (*Carthamus lanatus*) in eastern Australian pastures. Aus. J. Agric. Res. 53: 1327-1334.

Heaton, T.C. and Klislewicz, J.M. 1981. A disease-resistant safflower alloploid from *Carthamus tinctorius* L × *C. lanatus* L. Can J. Plant Sci. 6: 219-224.

Henry, R.J. 2005. Plant diversity and evolution genotypic and phenotypic variation in higher plants. CABI Publishing, USA. 325 Pp.

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.

Khan, M.A., Ehbrecht, S.V.W., Maass, B.L. and Becker, H.C. 2009. Relationships among different geographical groups, agro-morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in safflower (*Carthamus tinctorius*). Gen. Reso. & Crop Evo. 56: 19–30.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 70: 3321-3323.

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

Peng, S., Feng, N., Guo, M., Chen, Y. and Guo, Q. 2008. Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis. Biochem Sys. Eco. 36: 531–538.

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

Sabzalian, M.R., Mirlohi, A., Saeidi, G. and Rabbani, M.T. 2009. Genetic variation among populations of wild safflower, *Carthamus oxyacanthus* analyzed by agro-morphological traits and ISSR markers. Genetic Res. & Crop Evo. 56: 1057-1064.

Sehgal, D. and Raina, S.N. 2005. Genotyping safflower (*Carthamus tinctorius*) cultivars by DNA fingerprints. International Journal and Plant Breeding, Euphytica. 146 :67-76.

Sindel, B. M. 1997. The persistence and management of thistle in Australian pastures. Proc. 50th N.Z. Plant Protec. Conf. 453- 456.

Taskova, R., Mitova, M., Mikhova, B. and Duddeck, H. 2003. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. 58: 704-707.

Yang, Y.X., Wu, W., Zheng, Y.L., Chen. L., Liu, R.J. and Huang, C.Y. 2007. Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Gen. Res. and Crop Evo. 54: 1043-1051.

www.SID.ir

Archive of SID

A Study of Genetic Variation within and between Ecotypes of Distaff Thistle (*Carthamus lanatus*) from North East Iran

Samane Nikdel[1], Mohammadhadi Pahlevani[2], Khalil Zenalinezhad[3], Ahad Yamchi[4]

1- Graduated MSc Student of Plant Breeding department, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources 2- Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources 3- Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources 4- Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

The information of the genetic diversity of weed community helps researchers to find more effective biological control methods. In the present study the genetic diversity within and between populations of distaff thistle (*Carthamus lanatus*) was investigated using 24 ISSR markers. The populations were collected from eight different regions of Golestan province. Using 9 polymorphic (26.4 %) ISSR markers, the mean coefficient of similarity between individuals based on Jaccard, and descriptive parameters such as Nei's gene diversity, Shannon's information index, percentage of polymorphic loci, observed number of alleles (na) and effective number of alleles (ne) were calculated for each population. The highest genetic similarity coefficient was observed in the ecotypes collected around Gomishan and the lowest occurred in ecotype Bandartorkman. Analysis of molecular variance showed that the genetic diversity among populations (63 percent) was higher than genetic variation between populations (23 percent). The highest values for Nei's gene diversity, Shannon's information index, percentage of polymorphic loci, observed number of alleles, effective number of alleles was observed in ecotype Bandartorkman and the lowest values of these parameters occurred for ecotypes Ashuradeh Island and Inchehbroon. Therefore, ecotype Bandartorkman had the highest, and ecotypes of Ashuradeh Island and Inchehbroon the lowest within population genetic diversity.

Key words: Analysis of molecular variance, biological control, coefficient of similarity, ISSR

www.SID.ir