بررسی تنوع وراثتی ارقام زراعی و گونه های خودروی جنس *Crocus* با استفاده از نشانگر ISSR در ایران

امیرحسین بیکی*[۱،]، ناهید عباسپور[۲]، جواد مظفری[۳]

[۱] قم، دانشگاه قم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، گروه بیوتکنولوژی

[۳] کرج، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۸

چکیده

جنس *Crocus* شامل تقریبا هشتاد گونه است که عمدتاً توسط گونه زراعی آن *Crocus sativus* شناخته می شود. تنوع ژنتیکی میان ۱۶ نژادگان جنس فوق در ایران برای اولین بار توسط نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفت. چهارده نشانگر، در مجموع ۲۰۸ قطعه قابل تشخیص و تکرار پذیر تولید کردند که تمام قطعات چند شکل بودند. قطعات ایجاد شده بر اساس وجود و عدم وجود امتیاز دهی شدند و از داده های فوق برای محاسبه ضرایب شباهت دایس، جاکارد و تطابق ساده استفاده گردید. دندروگرام مربوطه توسط نرم افزار NTSYSpc (نسخه ۲/۰۲) و بر اساس الگوریتم Complete Linkage و UPGMA ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل خوشه ای، نژادگان را به پنج گروه اصلی تقسیم نمود. علاوه بر این، نمودارهای به دست آمده از تحلیل PCoA نیز نژادگان را به پنج گروه تفکیک می نماید. قدرت تفکیک تجمعی برابر با ۱۳۴، میزان کمینه قدرت تفکیک برابر با ۴/۸۷ در آغازگر UBC872 و میزان بیشینه برابر با ۱۵/۵ در آغازگر UBC851 و متوسط قدرت تفکیک برابر با ۹/۶ می باشد. نتایج به دست آمده سودمندی بالای نشانگر های ISSR را برای گروه بندی گونه های *Crocus* و تحلیل روابط زنتیکی آنها را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: انگشت نگاری، تنوع ژنتیکی، زعفران، قدرت تفکیک، ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۵۳۲۱۰۳۵۹۱ ، پست الکترونیکی: amirbeiki@gmail.com

مقدمه

در طی دوره های طولانی توانایی یک جمعیت برای سازگار شدن با شرایط متفاوت محیطی به سطح تنوع ژنتیکی آن بستگی دارد (۵). بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیتها و ساختار جمعیتهای درون یک گونه نه تنها فرآیندهای تکامل و مکانیسم آن را بررسی می کند، بلکه اطلاعات مفیدی را در مورد حفاظتهای بیولوژیکی فراهم می نماید (۲ و ۲۱).

روشهای مختلفی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جوامع گیاهی وجود دارد. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی به صورت بسیار گسترده ای از نشانگرهای مولکولی استفاده می شود. نشانگرهای مبتنی بر واکنشهای زنجیره ای پلیمراز به دلیل سادگی و نیاز به مقادیر کم DNA کاربرد زیادی دارند. انتخاب نوع نشانگرهای مولکولی به تکرارپذیری بالا، سادگی روش و هزینه پایین و قابلیت اعتماد بالای آن بستگی دارد. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) نشانگر چند جایگاهی اختیاری است که علاوه بر داشتن این خصوصیات، محدودیت نشانگرهای دیگر مثل تکرار پذیری کم در RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA)، هزینه بالا و سختی کار در AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) را نداشته و به طور گسترده در سرتاسر ژنوم پراکنده هستند (۱۳ و ۱۸). نشانگرهای ISSR تکرارهای ریزماهواره ای ۴ تا ۱۲ واحدی هستند که از یک انتهایشان ۲ تا ۴ نوکلئوتید اختیاری دارند. آغازگرهای فوق امکان تکثیر قطعاتی از DNA را فراهم می آورند که بین دو ریزماهواره قرار داشته و به اندازه کافی به هم نزدیک هستند (۱۵). وراثت پذیری بالای جایگاههای ISSR، توزیع گسترده آنها در سرتاسر ژنوم، شباهت آنها به وراثت مندلی، تکرارپذیری بالا، عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنوم سبب استفاده روزافزون این نشانگر نسبتاً جدید شده است. ISSR ها به خاطر طول بلند آغازگر های آن که اجازه انتخاب دمای واسرشته سازی بالاتر را می دهد، دارای تکرار پذیری بیشتری می باشند. این نشانگرها معمولاً به عنوان یک نشانگر غالب در نظر گرفته می شود (۱۰ و ۲۲). هر چند در بعضی از موارد بخاطر توانایی آنها در جداسازی هموزیگوت ها از هتروزیگوت ها به عنوان نشانگر همبارز دسته بندی می شوند (۱۵ و ۲۳). ISSR ها انگشت نگاریهایی با چند شکلی بالا تولید می کنند (۲۰ و ۲۴). مطالعات اخیر بر روی جمعیتهای بومی، طبیعت فوق العاده متنوع این نشانگرها و نیز پتانسیل آنها را برای مطالعه سطوح مختلف جمعیتی نشان می دهد (۸). تا کنون مطالعه ای به وسیله نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه های جنس *Crocus* در ایران انجام نشده است.

گریلی و همکاران (۱۱) تنوع ژنتیکی شش نژادگان زعفران زراعی و هفت گونه وابسته را با کمک نشانگر های مولکولی ارزیابی کردند. نتایج به دست آمده از بررسی داده های مولکولی نشان داد که *C. cartwrightianus* گونه وابسته زعفران زراعی و گونه *C. thomasii* مشابه با آن است. سیک و همکاران (۲۲) از نشانگر هایRAPD و ISSR برای تعیین تنوع و روابط ژنتیکی ۵۶ نژادگان زراعی در ترکیه استفاده کردند و توانستند نمونه های فوق را با کمک نشانگر های فوق به هفت گروه دسته بندی کنند. آنها سطح بسیار بالایی از تنوع ژنتیکی را در نمونه های خویش گزارش نمودند که از آن به عنوان شاهد این مدعی که ترکیه مرکز تنوع زعفران است استفاده نمودند. علوی کیا و همکاران(۴) از ۲۸ ترکیب آغازگر رتروترنسپوزون حاصل از جو به بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی زعفران زراعی ایران پرداختند. نتایج این بررسی نشان دهنده هتروژنی بالا بین جمعیتهای مختلف جنس *Crocus* و مشخص کننده همولوژی نسبی زعفران زراعی با جو بود. بیکی و همکاران (۶) با استفاده از نشانگر RAPD تنوع و روابط ژنتیکی ۳۰ نژادگانهای مختلف جنس *Crocus* را بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داد نژادگانهای زعفران زراعی همگی در یک زیر شاخه قرار داشته و بیشترین شباهت را با *C. haussknechii* نشان می دهند.

در تحقیقی که توسط روبیو موراگا و همکاران (۱۹) بر روی زعفران زراعی جمع آوری شده از ۱۱ کشور مختلف با استفاده از سه نشانگر RAPD، ISSR و SSR (Simple seguence repeat) انجام شد نشان داده شد که زعفران زراعی یک گونه منومورف می باشد. این نتایج با بررسیهای قبلی(۴، ۶، ۱۱و ۲۲) مطابقت ندارد. در سال ۲۰۱۰ روبیو موراگا (۲۱) و همکاران با استفاده از نشانگر ISSR گزارش نمودند که بین *C. sativus* و *C. oreocreticus* تفاوتی وجود ندارد اما در تحلیلهای HPLC برای میزان کارتنوئید ها تفاوت کمی گزارش نمودند که با نتایج به دست آمده توسط گریلی و همکاران (۱۲) مطابقت داشت.

گیاه زعفران یکی از اعضای خانواده زنبق (*Iridaceae*) و متعلق به جنس زعفران می باشد. گیاهان این خانواده دارای ریزوم، بنه و پیاز هستند. خانواده زنبق شامل ۶۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه می باشد. جنس زعفران شامل گونه های بومی از اروپا، شمال آفریقا، آسیا و به خصوص در کشورهایی از جنوب شرق، غرب و مرکز آسیا می شود. جنس زعفران عموماً به خاطر گونه زراعی آن شناخته شده است. این

جنس دارای گونه های دیگری نیز می باشد که به خاطر رنگ بسیار زیبای گلهای آن با ارزش بوده و به طور وسیعی در باغبانی استفاده می شود (۹).

چون گونه های خودرو هر منطقه در معرض خطر فرسایش ژنتیکی و حتی انهدام هستند و از طرفی بعلت عدم وجود تنوع کافی در کلکسیونهای ژرم پلاسم، شناسایی، جمع آوری و نگهداری آنها شایان توجه بیشتری است (۱۷). شناسایی ژرم پلاسم زعفران و خویشاوندان آن و بررسی میزان خویشاوندی بین آنها می تواند در برنامه های اصلاحی و حفظ ذخایر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

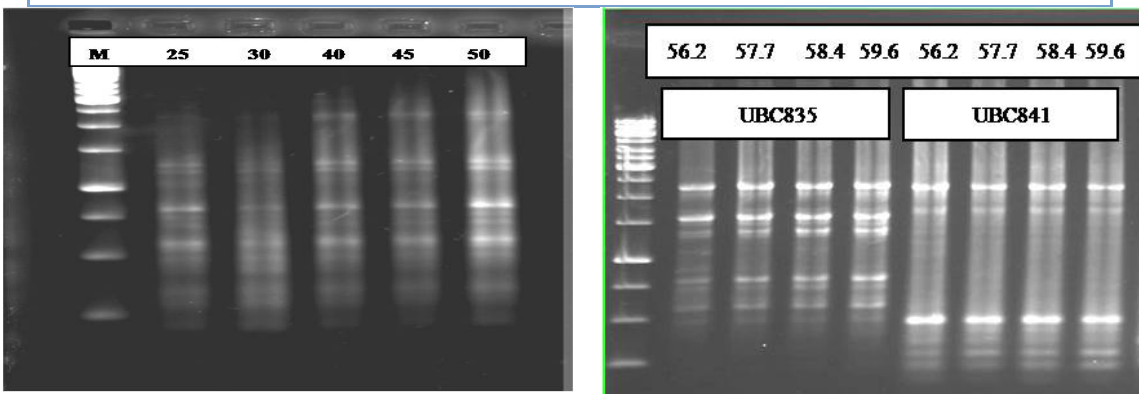
جدول ۱- نام و محل جمع آوری نژادگان های مورد استفاده

گونه	محل جمع آوری	کد نژادگان	گونه	محل جمع آوری	کد نژادگان
C.sativus	خراسان رضوی- قائن	**saKrGn**	*C.cancellatuse*	فارس- استهبان	**cnFaEs**
C.sativus	گلستان- آزادشهر	**saGoAz**	*C.cancellatuse*	کرمانشاه - سراب قنبر	**cnKeS1**
C.speciosus	گیلان- رودبار	**spGiRd**	*C.cancellatuse*	کرمانشاه - سراب قنبر	**cnKeS2**
C.speciosus	گیلان- دیلمان	**spGiDi**	*C.cancellatuse*	کرمانشاه- بیستون	**cnKeBi**
C.speciosus	مرکزی- الوند	**spMaA1**	*C.cancellatuse*	کردستان- دیواندره	**cnKoDi**
C.speciosus	مرکزی- الوند	**spMaA2**	*C.caspius*	گیلان- رستم آباد	**csGiRs**
C.speciosus	کرمانشاه- کوژان	**spKeKj**	*C.haussknechii*	کرمانشاه-اسلام آباد	**haKeEs**
C.speciosus	کرمانشاه- گهواره	**spKeGa**	*C.haussknechii*	کردستان- سارال	**haKoSa**

جدول۲- نام و توالی آغازگرها، تعداد کل باند، تعداد باند های چند شکل ، Tm ، Ta و R_P هر آغازگر

نام پرایمر	توالی آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکل	Tm	Ta	Rp
UBC807	$AG)_8T$	۱۸	۱۸	۵۰	۵۲/۵	۱۱/۰۰
UBC808	$(AG)_8C$	۲۱	۲۱	۵۲	۵۱/۶	۱۳/۲۵
UBC812	$(GA)_8A$	۱۰	۱۰	۵۰	۵۲/۵	۱۲/۶۰
UBC827	$(AC)_8G$	۱۸	۱۸	۵۲	۵۳/۶	۱۰/۲۵
UBC834	$(AG)_8CT$	۱۷	۱۷	۵۴	۵۳/۴	۱۰/۷۵
UBC835	$(AG)_8CC$	۱۹	۱۹	۵۶	۵۹/۶	۱۳/۱۲
UBC836	$(AG)_8CA$	۱۲	۱۲	۵۴	۵۳/۵	۱۰/۵۰
UBC840	$(GA)_8CT$	۱۰	۱۰	۵۴	۵۳/۴	۵/۵۰
UBC841	$(GA)_8CC$	۱۳	۱۳	۵۶	۵۹/۶	۵/۵۰
UBC851	$(GT)_8CG$	۲۵	۲۵	۵۶	۵۸/۴	۱۵/۵۰
UBC868	$(GAA)_6$	۱۱	۱۱	۴۷	۴۷/۰	۵/۳۷
UBC872	$(GATA)_4$	۸	۸	۳۸	۳۷/۱	۴/۸۷
UBC876	$(GATA)_2(GACA)_2$	۱۰	۱۰	۴۳	۴۳/۹	۶/۱۲

UBC880	$(GGAGA)_3$	۱۶	۱۶	۴۹	۵۳/۵	۹/۷۵



شکل ۱- تاثیر ۴ دمای واسرشته سازی مختلف بر روی الگوی باندهی آغازگر های UBC835 و UBC841 با Tm=۵۶°c (سمت راست) و بررسی غلظت های مختلف DNA با استفاده از آغازگر UBC835 در زعفران زراعی (سمت چپ)

در پژوهش حاضر گوناگونی ژنتیکی و انگشت نگاری گونه های خودرو و زراعی جنس زعفران با استفاده از نشانگر ISSR بررسی و مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین اثرات مختلف مؤثر بر فرآیند PCR مثل دمای واسرشت، تعداد جرخه هایPCR و غلظت DNA در جهت افزایش ویژگیهای اختصاصی و بهینه سازی نشانگر ISSR جهت گزینش و شناسایی گونه ها و تصمیم گیری در مورد به نژادی زعفران بررسی گردید.

مواد و روشها

مواد گیاهی : **نمونه برگی ۱۶ نژادگان زعفران زراعی و خودروی ایران که توسط بانک ژن ملی گیاهی ایران از رویشگاههای مختلف طبیعی جمع آوری و در محل مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذرمشهد کاشته شده بود، در زمستان و بهار تهیه گردید (جدول۱). نمونه های برگی جمع آوری شده در ازت مایع منجمد و تا پیش از استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد..**

با توجه به دشواری و بازدهی نامناسب استخراج DNA به روشهای معمولی، از روش تغییر یافته مورای و تامپسون استفاده گردید (۱۴). در این روش ابتدا ۱۰۰ میلی گرم نمونه برگی توسط نیتروژن مایع درون هاون چینی پودر شد و پس از افزودن ۱میلی لیتر بافر استخراج [شامل Tris-HCL (۱۰۰ میلی مولار)، EDTA (۲۰ میلی مولار)، NaCl (۲مولار)، CTAB (۲ درصد) ، PVP (۲ درصد) و بتا مرکاپتو اتانول (۱ درصد)] ، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۷۰۰ میکرولیترکلروفرم-ایزوآمیل الکل افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژشد (این عمل دو بار انجام گرفت). پس از آن مایع بالایی برداشته شد و پس از افزودن ۱میلی لیتر ایزوپروپانل سرد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- در جه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق، ایزوپروپانل دور ریخته شد و رسوب DNA توسط الکل ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن ، ۵۰ میکرولیتر بافر TE افزوده و به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز۰/۸ و همچنین به منظور تأیید نتایج با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. برای آزمایشهای واکنشهای زنجیره ای پلیمراز ازکلیه نمونه های استخراجی، غلظتهای یکسان (۵۰ng/µl) تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

واکنش ISSR-PCR : آزمایش ISSR، با استفاده از۴۲ آغازگر مکمل با توالیهای ریزماهواره ای $(AG)_8$، $(GA)_8$، $(AC)8$، $(AT)_8$، $(TA)_8$، $(CT)_8$، $(GT)_8$، $(TG)_8$، همرا ه با یک ، دو و سه نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ و ´۵ و توالیهای ریز ماهواره ای $(AGC)_6$، $(GAA)_6$، $(GATA)_4$، $(TGCA)_4$، $(GGAGA)_3$، بدون نوکلئوتید اضافی انجام گرفت. پس از بررسی آغازگر ها از نظر تکرارپذیری و چند شکلی، تعداد ۱۴ آغازگر انتخاب شدند (جدول۲). برای بهینه سازی شرایط تکثیر، غلظتهای مختلف DNA (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و دمای متفاوت اتصال (Ta) (Annealig temperature) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمایش ISSR-PCR در حجمهای ۲۰ میکرولیتری و با استفاده از PCR Master Kit شرکت سیناژن و به کمک دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه حرارتی اعمال شده برای واکنشهای زنجیره ای پلیمراز شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه به عنوان شروع واکنش، ۳۵ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹–۳۷ درجه سانتی گراد (بسته به آغازگرهای مختلف) به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در آخر واکنش یک مرحله بسط نهایی به مدت چهار دقیقه در ۶۸ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. به منظور مشاهده الگوی قطعهی، محصولات واکنشهای زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری و با ولتاژ ۸۵ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد (شکل ۱ و ۲).

امتیازدهی و تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور تجزیه وتحلیل نتایج، قطعات چند شکل به دست آمده بر اساس وجود و عدم وجود قطعه به صورت صفر و یک امتیازدهی شدند. دندروگرام مربوطه بر اساس الگوریتم Complete Linkage و UPGMA (Unweighted Pair Group Mathematical Average) و ضرایب تشابه دایس، تطابق ساده، و جاکارد، و تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCoA) (Analysis Principle Coordinate) توسط برنامه NTSYSpc (نسخه ۲/۰۲) انجام شد (۱۸). توانایی نشانگرها برای تمایز نژادگانها با استفاده از شاخص قدرت تفکیک (Rp) (Resolving power) تعیین گردید. محاسبه این شاخص با استفاده از رابطه ارائه شده توسط پریوست و ویلکینسون انجام گرفت (۱۵).

$$Rp = \sum Ib$$

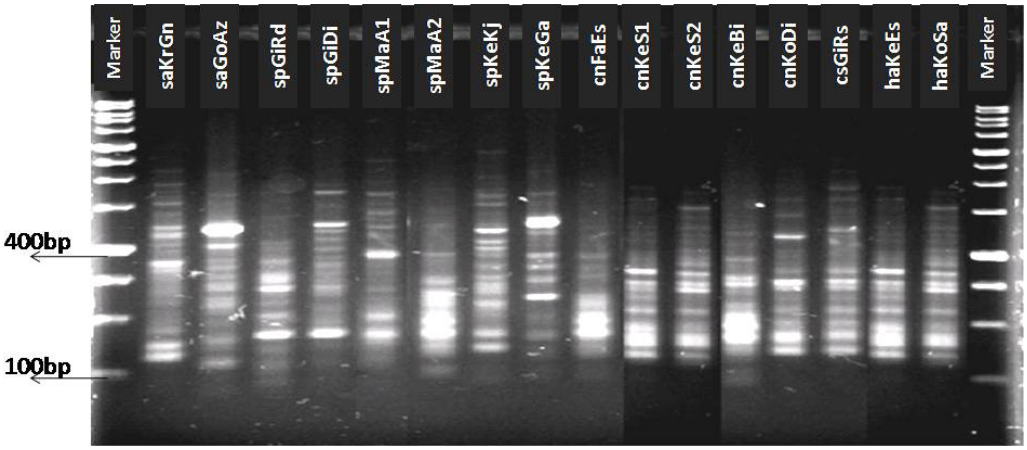
$$Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

که در آن P برابر است با نسبت نژادگانهایی که در هر نشانگر دارای قطعه می باشند.

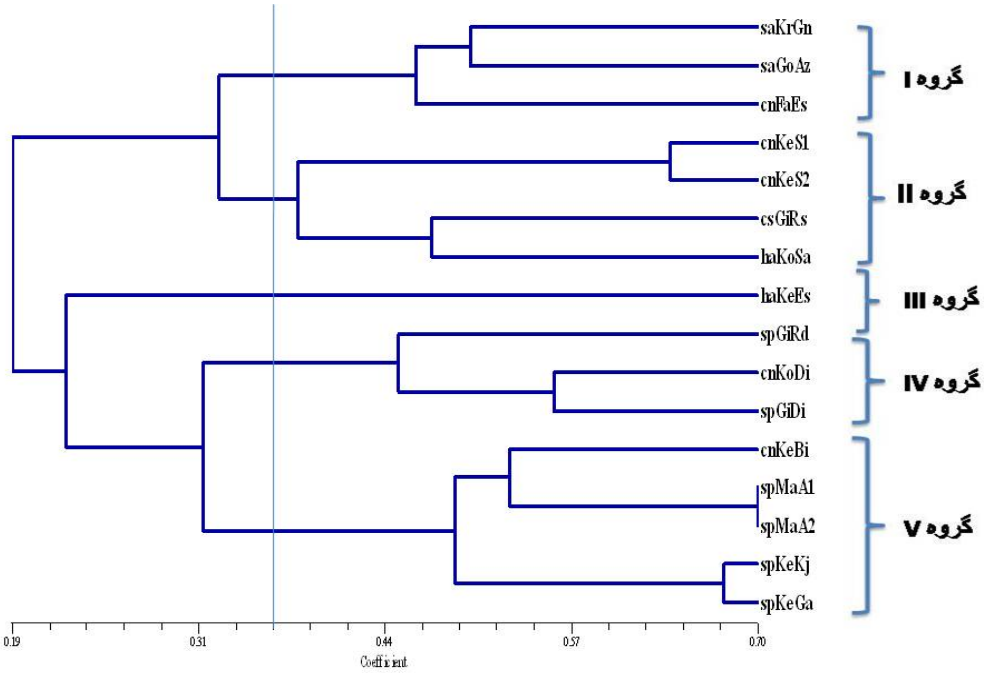
نتایج و بحث

بورنت و همکاران معتقدند که اصلاح دمای واسرشته سازی، تأثیر زیادی بر وضوح قطعه ها ی ایجاد شده دارد (۷). به منظور بهینه سازی واکنشهای زنجیره ای پلیمراز، ۴ دمای واسرشته سازی مختلف برای هر آغازگر مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ سمت راست)، که اکثر آغازگر های مورد مطالعه به جز آغازگرهای UBC835، UBC841 و UBC880 در دمای نزدیک به Tm (Melting Temperature) باند دهی مطلوبی داشتند (جدول ۲). بررسی غلظتهای مختلف DNA نیز نشان داد که غلظت ۵۰ نانو گرم بر میکرولیتر بهترین وضوح باندی را ایجاد می کند (شکل ۱ سمت چپ).

پس از بررسی ۴۲ آغازگر از نظر تکرارپذیری و وضوح باندی، تعداد ۱۴ آغازگر انتخاب شدند که در مجموع ۲۰۸ باند قابل امتیازدهی تولید کردند. آغازگر UBC812 بیشترین وضوح باندی را نشان داد. بیشترین تعداد باند متعلق به آغازگر UBC851 و کمترین آن مربوط به آغازگر UBC827 بود.



شکل ۲- قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگر UBC812 برای ۱۶ نمونه گیاهی جمع آوری شده از رویشگاه های مختلف طبیعی



شکل۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر اساس الگوریتم Complete Linkage و ضریب تشابه دایس

میانگین تعداد باندها ۱۴/۹ برای هر نشانگر بود. تنها نشانگرهای با نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' و نشانگرهای بدون نوکلئوتید اضافی باند دهی خوبی داشتند که با نتایج ردی و همکاران (۱۶) مطابقت داشت. این پژوهشگران عنوان نمودند که آغازگرهایی که دارای نوکلئوتید اضافی در انتهای۳' می باشند، شبیه آغازگرهای اختصاصی عمل کرده و به نقاط خاصی از DNA الگو متصل می شوند و الگوی باندی با وضوح بالاتر ولی تعداد باند کمتر تولید می کنند.

قدرت تفکیک نشانگرها در دامنه بین ۱۵/۵-۴/۸۷ قرارگرفت که میزان بالای آن نشانه کارآیی و کفایت این نشانگر در تمایز میان نژادگانهای به دست آمده است.

بیشترین و کمترین میزان Rp به ترتیب متعلق به آغازگرهای UBC851 و UBC872 بود.

به منظور پیدا کردن بهترین روش خوشه بندی ضریب کوفنتیک بر اساس الگوریتمهای UPGMA و Complete Linkage و سه ضریب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد (جدول۳)، که بر این اساس الگوریتم Complete Linkage و ضریب تشابه دایس با ضریب کوفنتیک یک بهترین روش خوشه بندی از میان روشهای فوق می باشد.

تجزیه خوشه ای، نژادگانهای مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد (شکل۳). در گروه اول دو نمونه *C.sativus* از خراسان و گلستان به همراه یک نمونه *C.cancellatus* از فارس قرار گرفت. گروه بعدی شامل دو نمونه *C.cancellatus* هر دو از کرمانشاه، یک نمونه *C.caspious* از گیلان و یک نمونه *C.haussknechii* از کردستان بود. نمونه *C.haussknechii* از کرمانشاه به تنهایی در گروه سوم قرار گرفت. در گروه چهارم دو نمونه *C.speciosus* از دو منطقه رودبار و دیلمان استان گیلان به همراه *C.cancellatus*از کردستان قرار داشتند و آخرین گروه نیز شامل یک نمونه *C.cancellatus* از کرمانشاه و ۴ نمونه *C.speciosus* از کرمانشاه و مرکزی بود. بر اساس این نتایج تجزیه خوشه ای توانست نژادگانهای مختلف به خصوص گونه *C.haussknechii* را بر اساس گونه و محل رویش از یکدیگر جدا کند.

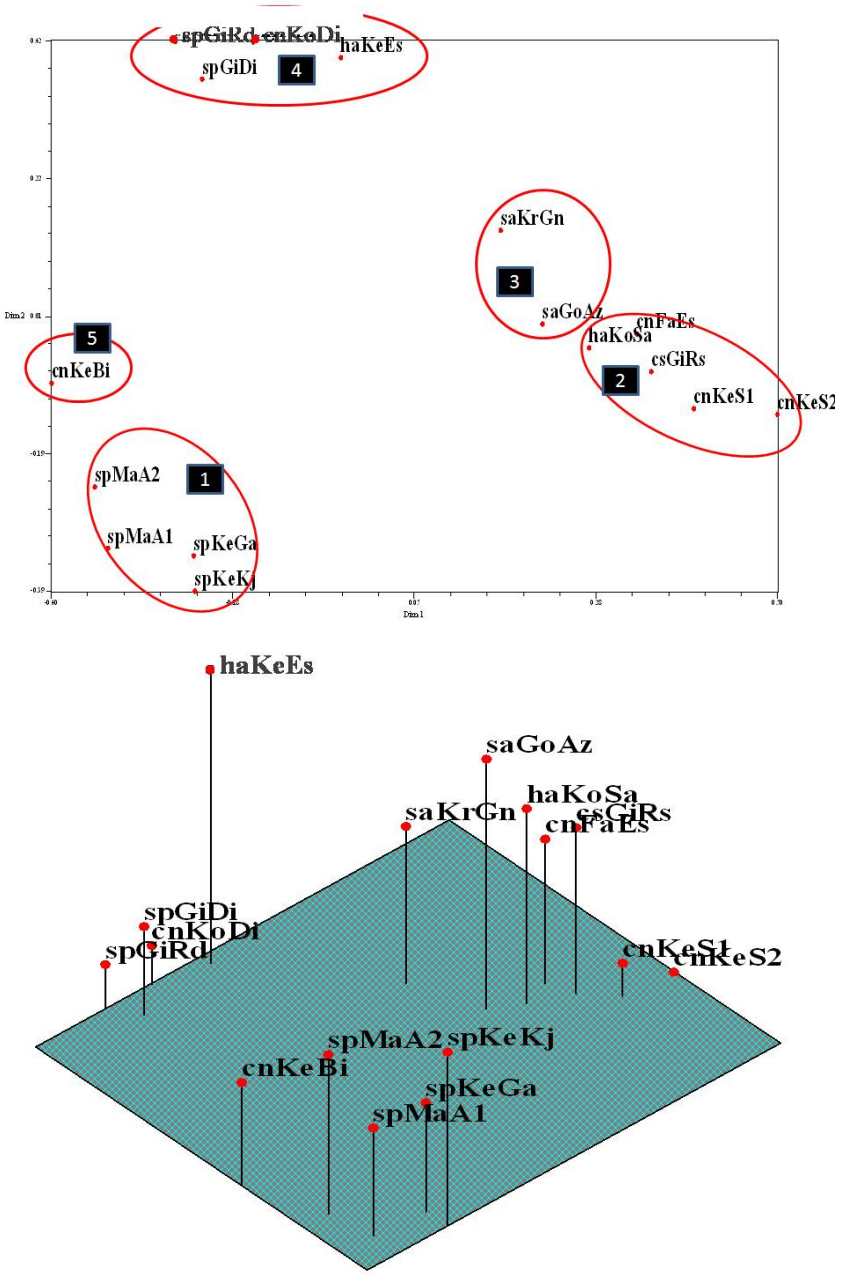
با توجه به اینکه نمونه های ژنتیکی داخل یک گونه دارای بیشترین شباهت ژنتیکی بوده و اصولاً با یگدیگر گروه بندی می شوند، قرار گرفتن گونه های یکسان در داخل گروههای مختلف ممکن است در اثر جدایی میکروکلیمایی باشد که باعث روند تکاملی متفاوت در دو جهت مختلف است.

ضریب تشابه دایس در دامنه بین ۰/۶۳ – ۰/۱۸ قرار گرفت. گونه *C.sativus* با ضریب تشابه ۰/۴۸ بیشترین مشابهت را با گونه *C.cancellatus* از فارس نشان داد، که بر این اساس می توان آن را یکی از نزدیک ترین خویشاوندان خودرو زعفران زراعی به شمار آورد. علوی کیا و همکاران (۴) با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزون دو گونه *C.michelsoni* و *C.almehensis* و کافی و همکاران (۳) نیز بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی *C.haussknechii* را نزدیک ترین خویشاوندان خودرو زعفران زراعی معرفی کردند. با توجه به این نتایج به نظر می رسد، استفاده از نشانگرهای اختصاصی بتواند اطلاعات دقیق تری درمورد اجداد خودرو این گونه زراعی فراهم نماید.

تجزیه به مؤلفه های اصلی تا حدودی نتایج تحلیل خوشه ای را تأیید کرد (شکل ۴). سه مؤلفه اول ۳۷ در صد از تغییرات را توجیه کردند که نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می باشد. به این ترتیب که هر یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخشهای متفاوت ژنوم بوده، بنابراین دارای همبستگی کمتر می باشند. این روش نیز توانست برخی از گونه ها را از لحاظ منطقه رویش، از یکدیگر جداسازی کند، به طوری که گروه ۱ شامل گونه *specious* از استانهای مرکزی و کرمانشاه و گروه ۳ شامل گونه *sativus* از استانهای خراسان رضوی و گلستان هستند. نمونه cnKeBi به تنهایی در گروه ۵ قرار دارد. سه نمونه از چهار نمونه *cancellattuse* در گروه ۲ واقع شده اند. گروه ۳ یعنی گروهی که فقط شامل گونه *sativus* است به گروه ۲ که اکثریت آنها *cancellattuse* می باشند بیشترین شباهت را دارد. با توجه به همگروهی نمونه های گونه *sativus* با گونه *cancellattuse* در تحلیل خوشه ای (گروه ۱–شکل ۳) می توان چنین نتیجه گرفت که گونه زراعی *sativus* بیشترین شباهت را با *cancellattuse* دارد. گروه بندی نمونه ها بر حسب گونه بهتر از گروه بندی بر حسب نواحی جغرافیایی است.

جدول ۳- ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم های Complete Linkage و UPGMA و ضرایب تشابه تطابق ساده، دایس و جاکارد

الگوریتم / ضریب تشابه	تطابق ساده	دایس	جاکارد
Complete Linkage	۰/۷۹	۱	۰/۸۲
UPGMA	۰/۸۰	۰/۸۲	۰/۸۵



شکل ۴- نمودار دو بعدی (بالا) و سه بعدی (پایین) تجزیه به مولفه های اصلی بر اساس فراوانی داده های نشانگر ISSR

به طور کلی نتایج پژوهش حاصل نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در نمونه های زعفران موجود در ایران می باشد که با توجه به عقیم بودن و تکثیر رویشی زعفران زراعی می توان با استفاده از روشهای مدرن اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی نسبت به انتقال صفات مفید از این گونه ها به گونه زراعی اقدام نمود. این مطالعه همچنین کارآیی نشانگرهای ISSR را در بررسی این تنوع نشان داد. با توجه به اینکه جد واقعی این گونه زراعی یکی از معماهایی است که هنوز به طور دقیق حل نشده است و نیز از آنجا که ایران یکی از مراکز مهم پراکنش گیاهی (۱) به خصوص جنس *Crocus* می باشد، انجام مطالعات تکمیلی تر بر روی این گونه ها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی به منظور دست یافتن به اطلاعات دقیق تر و کامل تر ضروری به نظر می رسد.

منابع

۱- آتشگاهی، ز , اجتهادی، ح و زارع، ح . ۱۳۸۸. معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان در جنگلهای شرق دودانگه ساری، استان مازندران. مجله زیست شناسی ایران۲۲(۲): ۱۹۳-۲۰۳.

۲- فخرطباطبایی، م, ملکی، م, رحیمی نژاد، م, عطری، م, نقوی م, مردی م, پیرسیدی م, میرمعصومی م, نوجوان م .۱۳۸۸. مقایسه کارایی نشانگرهای فلوریستیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی در تعیین تنوع جمعیتهای گندم بوئتیکوم (Triticum boeoticum)در ایران .مجله زیست شناسی ایران: ۲۱(۵):۸۱۶-۸۰۶.

۳- کافی،م .۱۳۸۱. زعفران، فن آوری تولید و فراوری .انتشارات زبان و ادب، مشهد.

4- Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S., and Moghadam, M. (2008). Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnol & Biotechnol. Eq. 795-800.

5- Ayla, F.J. and Kiger, J.A. (1984). Modern Genetics. Benjamin/Cumming, Menlo Park, USA.

6- Beiki, A.H.,Keifi, F., and Mozafari, J.(2010). Genetic Differentiation of *Crocus* species by Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology Journal: GEBJ-18.

7- Bornet, B. and Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep.19:209-215.

8- Chen, J.M., Gituru, W.R., Wang, Y.H. and Wang, Q.F., (2006). The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. Aquat. Bot. 84, 301–307.

9- Fernandez, J.A. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Res. Devel. Plant Sci. 2:127-159.

10- Gupta, P.K. and Varshney, R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163–185.

11- Grilli-Caiolla, M., Caputo, P. and Zanier, R. (2004). RAPD analysis in *crocus* sativus l accessions and realated *crocus* species. biologia plantarum 48(3): 375-380.

12- Grilli-Caiola, M., (1995). Study on pollen grains of *Crocus cartwrightianus* (Iridaceae). Plant Syst. Evol. 198, 155–166.

13- Han, Y.C., Teng, C.Z. and Zhong, S. (2007). Genetic variation and clonal diversity in population of *Nelumbo nucifera* (Neloumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. Aguatic Botany. 86:67-75.

14- Murray, M. and Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res.10:4321-4325.

15- Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98: 107-112.

16- 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.

17- Ried, R. and Benet, S.J. (1999). Reason for collecting wild plants: In Benet, S.J. and Cocks, P.S. Genetic resources of Meditranean pasture and forage legumes. Pp: 32-40. Kluwer academic publishers. Netherland.

18- Rohlp, F.J. (1992). NTSYS-pc (numerical taxonomy and multivariate analysis system).vesion 2.02.exeter publ.setauket.ny.

19- Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L. and Ahrazem, O. (2009). Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses BMC Research Notes.2:189.

20- Rubio-Moraga, A. Trapero-Mozos, A., Gomez-Gomez, L., and Ahrazem, O. (2010). Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. Albus. Industrial Crops and Products 32: 147-151.

21- Schaal, B.A., Leverich, W.J. and Rogstad, S.H. (1991). Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk, D.A. and Holsinger, K.E. (Eds). Genetics and Conservation of Rare plant. Oxford University Press, New York, pp.123-134.

22- Sik, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T. and Tanyyolc, B. (2008). Genetic variation among *crocus* L.species from western turkey as revealed by RAPD and ISSR marker.journal of applied biological science. 2:73-78.

23- Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S.H. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor Appl Genet 92: 40–45.

24- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequencerepeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183.

Genetic Diversity of Cultivated and Wild *Crocus* genus in Iran with ISSR Markers

Beiki A.H.[1], Abbaspour N.[2] and Mozafari J.[3]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Qom University, Qom, I.R. of Iran
[2] Biotechnology Dept., Imam Khomeini University, Qazvin, I.R. of Iran
[3] Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

The *Crocus* genus, which comprehends approximately 80 species, is known mainly for the cultivated species *Crocus sativus*. Genetic variability among 16 genotype of Crocus genus originating from Iran was examined for the first time with Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Fourteen primers generated a total of 208 discernible and reproducible bands across the analyzed populations, that all of these showed polymorphism. The fragment scored for presence/absence and used to generate Dice, Jaccard and Simple Maching similarity coefficients and to construct a dendrogram by means of UPGMA and Complete Linkage in NTSYS-pc 2.02 computer program. Cluster analysis revealed primarily five major groups. Furthermore, dimensional graph derived from Principal Coordinate Analysis (PCoA) of ISSR data also revealed a pattern in which the genotypes were assigned into five separate groups. Estimation of Resolving Power (RP) values exhibited a collective rate of 134.08 and varied from 4.87 for UBC 872 to 15.5 for UBC 851 with a mean of 9.6. The results showed the high effectiveness of ISSR markers in grouping of Crocus species under study, and analysis of their genetic relationships.

Keywords: Fingerprinting, Genetic Diversity, Saffron, Resolving power, ISSR.