نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، ص. ۳۸۲-۳۷۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 30, No. 3, Fall 2016, P. 376-382
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های زنبق (*Iris* spp) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

سیده زینب عطاری[۱]- محمود شور[۲] - محمود قربانزاده نقاب[۳*]- علی تهرانی فر[۴]- سعید ملک زاده شفارودی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۶

چکیده

زنبق از رده تک لپه‌ای‌ها و گیاهان بومی ایران بوده که در نقاط مختلف کشور به صورت وحشی می روید. گونه‌های زنبق ارزش زینتی و دارویی بسیار زیادی دارند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های زنبق با استفاده از آغازگرهای ISSR، نمونه‌های مختلف زنبق‌های وحشی شامل *Iris kopetdaghensis*، *Iris songarica*، *Iris fosteriana* از نقاط مختلف استان خراسان جمع‌آوری گردید. در این بررسی ۱۶ آغازگر مورد بررسی قرار گرفت و از میان آن‌ها شش آغازگر $(CA)_8G$ ، $(CT)_8RG$، $(TC)_8C$، $(TG)_8G$، $(AC)_8YG$ و$(AG)_8YT$ که پلی مورفیسم قابل ملاحظه‌ای نشان دادند برای این مطالعه استفاده شدند. در بررسی توسط شش نشانگر مولکولی ISSRاز میان ۱۲۶ باند تکثیر یافته، تعداد ۱۱۹ باند چندشکلی نشان دادند (۹۴/۴ درصد). بیشترین تعداد جایگاه‌های چندشکل را آغازگرهای $(TC)_8C$ و $(AC)_8YG$ و کمترین میزان جایگاه‌های چندشکل را آغازگر $(CA)_8G$ تولید نمود. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر نشانگر مولکولی نشان داد که این نشانگر قادر به تشخیص گونه‌ها و ژنوتیپ‌های جمعیت یک گونه از یکدیکر است. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت برنامه‌های اصلاحی زنبق بخصوص انگشت نگاری مفید می‌باشد و نشانگر مولکولی ISSR کارایی لازم را برای مطالعه تنوع ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم زنبق را دارد. همچنین توصیه می‌شود از توده‌های بومی زنبق وحشی به‌عنوان یک منبع غنی ژنتیکی در برنامه‌های آتی زنبق استفاده شود.

واژگان کلیدی: تجزیه کلاستر، خراسان، روابط فیلوژنتیکی و ژرم پلاسم زنبق

مقدمه

زنبق از رده تک لپه‌ای‌ها و گیاهان بومی ایران بوده که در نقاط مختلف کشور به صورت وحشی می‌روید. جنس Iris از خانواده Iridaceae، گیاهی چندساله و دارای اندام زیرزمینی به شکل ریزوم یا پیاز با غده است (۲). گونه‌های زنبق دارای ارزش زینتی و دارویی بسیار زیادی هستند. دانش کافی از تنوع ژنتیکی در جمعیت های گیاهی و چگونگی استفاده بهینه از آن، از منافع بنیادین علوم پایه و برنامه‌های کاربردی مانند مدیریت موثر منابع ژنتیکی محصولات گیاهی است. بهبود منابع ژنتیک گیاهی، وابسته به تزریق مداوم نمونه‌های وحشی، گونه‌های سنتی و استفاده از روش های اصلاحی مدرن است. این فرآیند تماماً نیاز به ارزیابی تنوع دارد تا واریته‌های با عملکرد بالا و مقاوم انتخاب شوند (۲ و ۱۲).

بیش از ۳۰۰ نوع زنبق وحشی در دنیا وجود دارد که از این تعداد ۲۰ گونه و زیرگونه آن در ایران گزارش شده است (۲). Iris بزرگترین جنس خانوادهIridaceae است و از بیش از ۲۶۰ گونه و زیرگونه علفی چند ساله تشکیل شده است. این جنس بیشترین تعداد گونه را از مرز اروپا-آسیا تا شرق دور دارد. تعداد قابل توجهی از گونه‌ها در مناطق مرطوب قرار دارند، اما اکثر گونه‌ها در محیط‌های خشک، نیمه‌بیابانی و کوههای سنگی دیده می‌شوند (۷). گونه‌های زنبق اهمیت دارویی بسیار زیادی داشته و در درمان سرطان، التهاب و آلودگی‌های باکتریایی و ویروسی کاربرد دارند. همچنین از گیاهان این خانواده، در درمان سرماخوردگی، آنفلوانزا، مالاریا، دندان‌درد و کبودی استفاده می‌شود (۱۷).

شناسایی صحیح گونه‌های زنبق با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی، زمانی امکانپذیر است که گیاه به گل رفته باشد. گاهی در مرحله گلدهی نیز بعلت اثر شرایط محیطی خصوصیات فنوتیپی بروز یکسانی ندارند. تنوع ژنتیکی در سطح مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بعلت اثر محیط بر بیان ژنوتیپ دارای محدودیت‌هایی است (۱). امروزه از روش‌های مطمئن‌تری مانند نشانگرهای مولکولی (بعنوان ابزاری کارآمد در ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌ها) استفاده می‌شود. مزیت تکنیک های مولکولی نسبت به مورفولوژیکی، دقت آن‌ها در تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی جزئی و همچنین وابسته نبودن

۱ ، ۲ و ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان زینتی، دانشیار و استاد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، مجتمع آموزش عالی شیروان، دانشگاه فردوسی مشهد
(* -نویسنده مسئول: (Email: ghorbanzadeh@um.ac.ir
۵-دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

به اثرات محیط و مراحل رشد گیاه می‌باشد (۹،۱۰ و ۱۳). از میان روش‌های مولکولی بررسی تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR[1] یک روش مبتنی بر PCR است که می‌تواند تفاوت‌های افراد با خویشاوندی نزدیک را بسرعت از یکدیگر جدا کند. اگرچه نشانگر ISSR مزایایی مشابه RAPD که یکی از کم هزینه‌ترین نشانگرهای مولکولی است را دارد، ولی بدلیل طول نسبتا بلندتر آغازگرها و دمای اتصال بالاتر قابل اطمینان‌تر از RAPD است و می تواند بطور گسترده خصوصا برای ارزیابی ژرم پلاسم گیاهی و تنوع ژنتیکی استفاده شود (۲۲). نشانگر مولکولی ISSR نشانگر مفیدی در مطالعات انگشت‌نگاری ژنومی، بررسی‌های فیلوژنتیکی ، نشان‌گذاری ژن و ... است (۴).

از نشانگر ISSR برای تخمین تنوع ژنتیکی در سطح درون گونه‌ای و بین گونه‌ای تعداد زیادی از گونه های گیاهی مانند پرتقال (۶)، گلرنگ (۱۵) *Iris lactea* var. chinensis (۲۲)، لاله واژگون (۱۱)، زعفران(۳ و ۸)، مرکبات(۴) ، عناب (۲۰) و زنبق (۱۴) استفاده شده است. فانگ و همکاران (۶) نشان دادند که آغازگرهای قلاب شده ISSR بسیار مفید و تکرارپذیرتر از ایزوزایم ها[2]، RFLP[3] و RAPD[4] در تجزیه تنوع ژرم پلاسم نارنگی سه برگی هستند. اکثر محققان اعلام نمودند که نشانگر ISSRیک تکنیک مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی و شناسایی سریع ارقام گیاهی است و می توان از آن در تعیین خصوصیات توده‌های بومی و ژرم‌پلاسم بین‌المللی گیاهان استفاده نمود (۱۵ و ۴). در آینده نه چندان دور حفظ مالکیت ژرم‌پلاسم امری بدیهی و ضروری است. تا امروز ISSR ها چند شکلی بیشتری را نسبت به هر روش دیگری نشان داده‌اند. لذا نقش مهمی را در ایمن کردن حقوق ژنوتیپ‌ها و ارقام گیاهی در تشخیص ژرم‌پلاسم‌ها ایفا می‌کنند (۹).

با توجه به اهمیت گیاه زنبق، اولین قدم برای برنامه‌های اصلاحی، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف آن در مناطق متفاوت است. از آنجایی که نشانگر ISSR برای تعیین تنوع ژنتیکی در گیاهان کارایی بالایی دارد، می توان از آن در بررسی تنوع و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم گیاه زنبق در مناطق جغرافیایی مختلف نظیر خراسان بهره برد. در این تحقیق بمنظور اطلاع از روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی موجود در بین ۱۶ ژنوتیپ زنبق جمع‌آوری شده، از آغازگر های ISSR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

۱۶ ژنوتیپ زنبق از سه گونه از مناطق مختلف در استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردید. شناسایی ژنوتیپ‌ها به کمک کارشناس گیاهشناسی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گردید. اطلاعات مربوط به نمونه‌ها در جدول (۱) آمده است.

استخراج DNA: برگ‌های ۱۶ اکوتیپ بلافاصله بعد از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و DNA آن‌ها استخراج شد. استخراج DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB انجام شد (۵). به منظور ایجاد یکنواختی در DNAهای مورد بررسی، غلظت اولیه DNA الگو با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد، تعیین و بهینه شدند. برای بررسی چند شکلی DNA ژنوتیپ‌های زنبق ۱۶ آغازگر ISSR استفاده شد. بعد از بررسی باندهای تولید شده، در نهایت شش آغازگر دو نوکلئوتیدی برای مطالعه همه ژنوتیپ‌های انتخاب شدند (جدول ۲).

اجزای هر واکنش زنجیره پلیمراز شامل ۱/۵ میکرو لیتر DNA (۵۰-۳۰ نانو گرم)، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCL_2$، ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز، یک میکرولیتر آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول و ۲/۵ میکرو لیتر از PCR Baffer 1X، انجام شد. حجم محلول واکنش جهت انجام PCR با آب مقطر استریل شده به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. دمای مرحله واسرشته سازی برای تمامی آغازگرها ۹۴ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد، زمان واسرشته‌سازی اولیه ۴ دقیقه و واسرشته‌سازی در هر چرخه ۴۵-۳۰ ثانیه اعمال شد. دمای مرحله اتصال بسته به دمای ذوب آغازگرها بین ۵۶-۵۲/۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۵-۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در انتها یک مرحله توسعه ۲-۱/۵ دقیقه و توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه اعمال شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شدند. الگوهای چندشکل بر اساس حضور و عدم حضور نوار به ترتیب با یک و صفر امتیازبندی شدند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه نی و روش UPGMA توسط نر مافزار NTSYS 2.02 (۱۸) انجام شد. تجزیه تنوع ژنی بین و داخل جمعیت‌های با استفاده از نرم افزار POPGENE32 انجام شد (۲۳).

نتایج و بحث

در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ ژنوتیپ زنبق از مناطق متفاوت ، آغازگرها باندهای چند شکل تکرارپذیری را تولید نمودند. وزن مولکولی باندهای تکثیر شده بین ۲۱۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز متغیر بودند. از میان ۱۲۶ باند تکثیر یافته تعداد ۱۱۹ باند چندشکلی نشان دادند (۹۴/۴درصد) که متوسط تعداد باند پلی‌مورفیسم در هر آغازگر ۱۹/۸ بدست آمد. تعداد باند چندشکل تکثیر یافته در هر آغازگر بین ۲۴-۱۶ باند بود (جدول ۲). بیشترین تعداد جایگاه‌های چندشکل را آغازگرهای $(TC)_8C$ و $(AC)_8YG$ (شکل ۱) و کمترین میزان جایگاه‌های چندشکل را آغازگر $(CA)_8G$ تولید نمودند.

1- *Inter Simple Sequence Repat*
2- *Isozyme*
3-*Amplified Fragment Length Polymorphism*
4- *Random Amplified Polymorphism DNA*

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های زنبق جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در استان خراسان رضوی

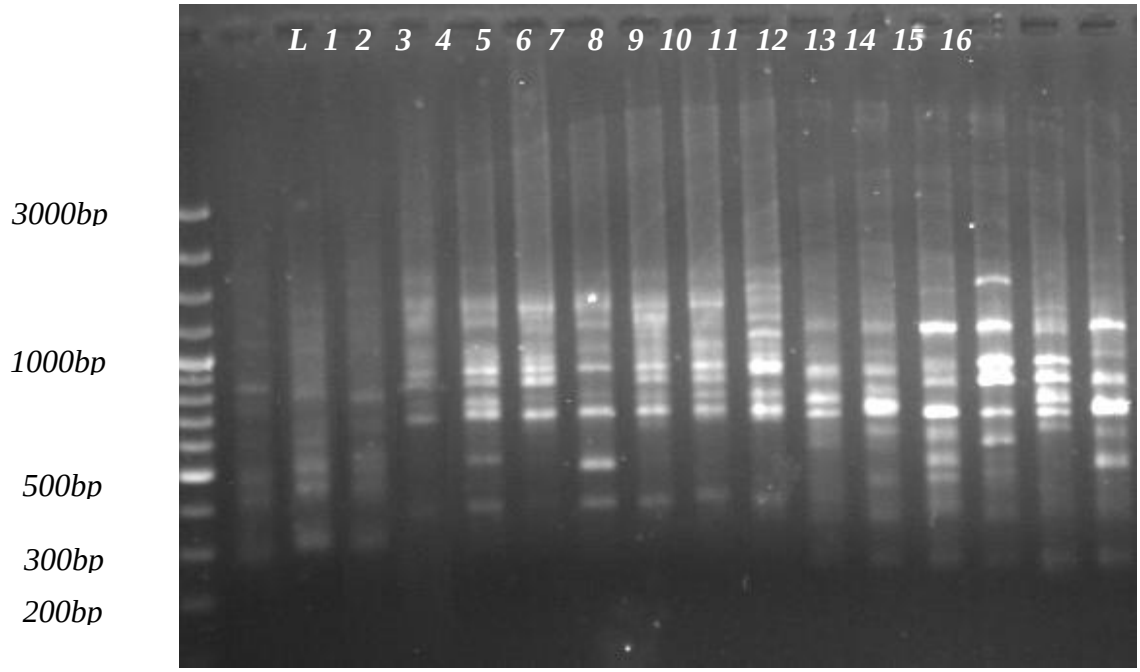
Table 1. Profile ecotypes of *Iris* ssp. collected from different regions in Khorasan Razavi

کد نمونه Abbreviation	گونه *Species*	مکان جمع‌آوری Collection area
1	*Iris fosteriana*	پارک جنگلی وکیل آباد مشهد Forest park Vakilabad, Mashhad
2	*Iris fosteriana*	جاده قدیم قوچان–درگز، بعد از پایگاه نیرو هوایی دهشت Ghoochan-Dargaz old road , after air force base Dahesht
3	*Iris fosteriana*	۱۵ کیلومتر بعد از محل جمع آوری نمونه شماره ۲، ابتدای کوههای الله اکبر 15 km after gathering sample location 2, beginning of the mountains Allahu Akbar
4	*Iris kopetdaghensis*	جاده قدیم قوچان–درگز، ۱۰ کیلومتری روستای امام قلی Ghoochan-Dargaz old road , 10 kilometers from the village of Imam Qoli
5	*Iris kopetdaghensis*	جاده قدیم قوچان–درگز، ۵ کیلومتری روستای امام قلی Ghoochan-Dargaz old road , 5 kilometers from the village of Imam Qoli
6	*Iris kopetdaghensis*	جاده قدیم قوچان–درگز، بعد از پایگاه نیرو هوایی دهشت Ghoochan-Dargaz old road , after air force base Dahesht
7	*Iris kopetdaghensis*	جاده قدیم قوچان–درگز،۱۰ کیلومتر بعد از پایگاه نیرو هوایی دهشت Ghoochan-Dargaz old road , 10 kilometers after air force base Dahesht
8	*Iris kopetdaghensis*	جاده قدیم قوچان–درگز، ۱۵ کیلومتر بعد از پایگاه نیرو هوایی دهشت Ghoochan-Dargaz old road , 15 kilometers after air force base Dahesht
9	*Iris kopetdaghensis*	اخلمد Akhlamad
10	*Iris kopetdaghensis*	جاده سبزوار–قوچان، حدود۴۹ کیلومتری دوراهی سبزوار، حدود روستای شغل آباد Sabzevar -Ghoochan road, about 49 kilometers dilemma Sabzevar, around village of Shoghlabad
11	*Iris songarica*	سبزوار– منطقه حفاظت شده شیراحمد Sabzevar -Shir Ahmad conservation area
12	*Iris songarica*	سبزوار–حارث آباد Sabzevar –Hares abad
13	*Iris songarica*	جاده سبزوار–قوچان، حدود۴۹ کیلومتری دوراهی سبزوار، حدود روستای شغل آباد Sabzevar -Ghoochan road, about 49 kilometers dilemma Sabzevar, around village of Shoghlabad
14	*Iris songarica*	جاده نیشابور–کاشمر، بعد از روستای قاسم آباد Neyshabur Kashmar road, after Ghasemabad village
15	*Iris songarica*	جاده نیشابور–کاشمر، روستای شورود (۱۵ کیلومتر فاصله با محل جمع آوری نمونه ۱۴) Neyshabur Kashmar road,Shorood village, 15 km from the place of sample collection 14
16	*Iris songarica*	جاده معدن فیروزه، تپه‌های مقابل وزیر آباد Turquoise mine road, The hills of front Vazirabad

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده، دمای اتصال، تعداد کل باندها، باندهای چندشکل و درصد چند شکلی اکوتیپ‌های زنبق

Table2. ISSR primers used, annaling, total produced bands, polymorphic bands and Polymorphism(%) of Iris ecotype

توالی Sequence	دمای ذوب (Tm) Annaling	تعدادکل باندها Total produced bands	تعداد باندهای چند شکل polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)
$(AC)_8YG$	56	24	24	100
$(CA)_8G$	52.8	16	16	100
$(TC)_8C$	52.8	26	24	92
$(TG)_8G$	52.8	18	18	100
$(AG)_8YT$	53.7	18	18	79
$(CT)_8RG$	53.7	24	19	100
میانگین Mean		21	19.8	94.4

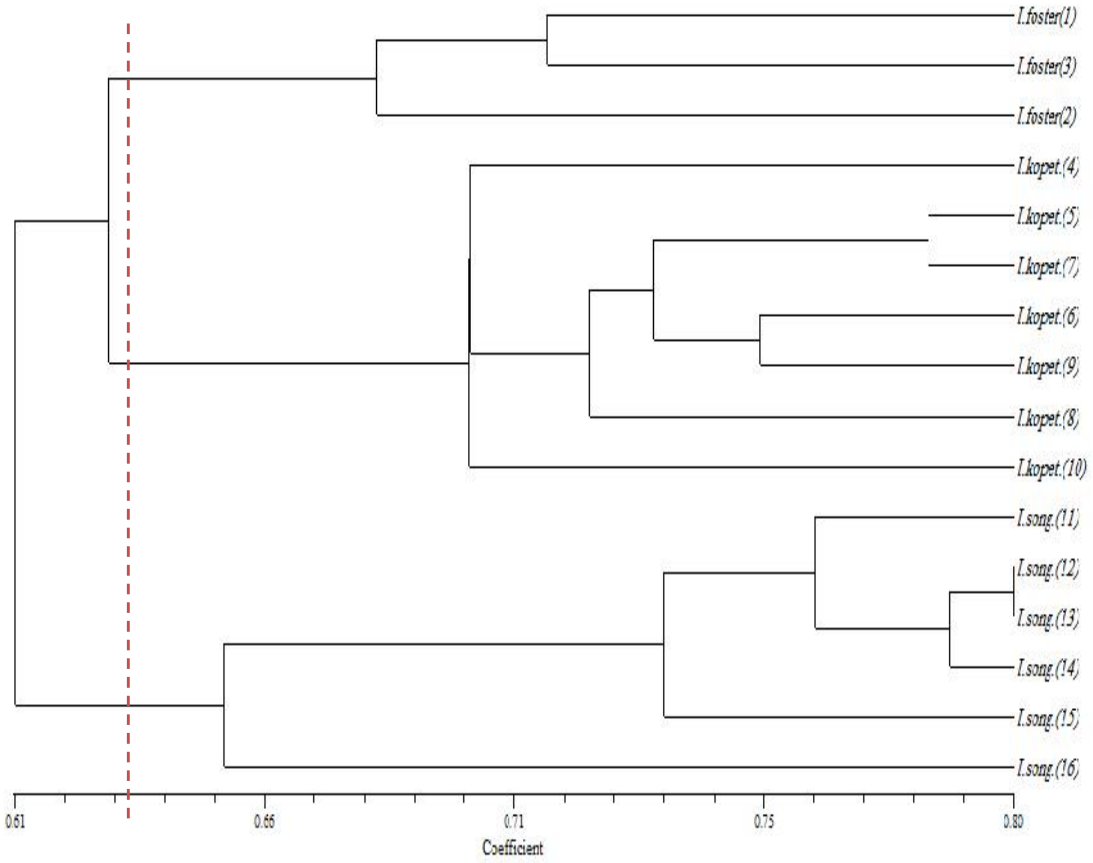


شکل ۱- الگوی تکثیر اکوتیپ‌های زنبق با آغازگر $(AC)_8YG$. (نمونه‌ها به ترتیب جدول شماره ۱ در چاهک‌ها بارگذاری شده‌اند و L سایز مارکر).
Figure 1. ISSR amplification profile for primer $(AC)_8YG$ on *Iris* sp. (Ecotypes numbers represent the ecotype according to Table 1. L: 1 kb DNA ladder)

بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به خصوص بین باندهای تکثیر شده ژنوتیپ‌های مربوط به یک گونه الگوی باندی مشابه مشاهده گردید اما بین گونه‌ها مشابهت کمتری وجود داشت. همانطور که انتظار می‌رفت ژنوتیپ‌های گونه‌های مختلف اختلاف زیادی با یکدیگر داشتند که این امر نشان دهنده کارآبودن نشانگر ISSR در مطالعات تنوع ژنتیکی، تکاملی و همچنین برطرف نمودن مشکلات احتمالی مربوط به طبقه‌بندی گونه‌های جنس Iris است.

نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب شباهت ژنتیکی نی و به روش UPGMA حاکی از وجود سه گروه اصلی درضریب شباهت ۰/۶۴است که سه گونه شناسایی شده را از هم تفکیک نمود. بر مبنای این دسته‌بندی، ژنوتیپ‌های جمعیت یک گونه که از مناطق مختلفی جمع‌آوری شده بودند در دسته‌های مشابه قرار گرفتند. بیشترین میزان شباهت ژنتکی مشاهده شده درون جمعیت‌های یک گونه در *Iris kopetdaghensis* مشاهده گردید. جمعیت‌های درون این گونه بیش از ۷۰ درصد شباهت نشان دادند. در مطالعه ونگ و همکاران (۲۲) بر روی ۲۴ ژنوتیپ *Iris lactea* var. chinensis، نیز نشانگر ISSR توانست تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را آشکار سازد و میزان چندشکلی ۷۹/۴ درصد بود (۲۲).

در این مطالعه همانطور که انتظار می‌رفت میان پراکنش جغرافیایی گونه‌ها با فواصل ژنتیکی آنها ارتباط منطقی وجود داشت. علت این امر شاید بدلیل جدایی جغرافیایی گونه‌ها از یکدیگر و ایجاد و تجمع جهش‌های ژنتیکی مجزا در هر گونه در منطقه پراکنش آن گونه باشد که باعث ایجاد تنوع شده است. هچنین تنوع ژنتیکی نسبتا بالایی داخل یک گونه مشاهده شد. فاصله جغرافیایی نمونه ۲ و ۳ گونه *Iris fosteriana* نزدیکتر به یکدیگر قرار دارد اما شباهت ژنتیکی نمونه ۱ و ۳ این گونه بیشتر ارزیابی شده است. در گونه *Iris kopetdaghensis* نیز اگر چه نمونه شماره ۶ و ۹ از دو مکان کاملا دور از یکدیگر جمع‌آوری شده‌اند در یک دسته قرار گرفته و بیش از ۷۸ درصد شباهت نشان دادند. در مجموع، نمونه‌هایی که از مناطق نزدیکتر به یکدیگر جمع‌آوری شده بودند در دسته‌های نزدیکتری نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند. قرارگرفتن ژنوتیپ‌های یک گونه در یک گروه می‌تواند بدلیل سازگاری و شرایط پراکنش ژنوتیپ‌ها هر گونه در یک محدوه جغرافیایی باشد. این نتایج با یافته‌های پارواتینی و همکاران (۱۶) همخوانی دارد. آن‌ها در بررسی ۱۳ اکوتیپ Cucumis که از مناطق مختلف جغرافیایی هند جمع‌آوری شده بودند، از آغازگر ISSR، استفاده کردند و ۸۷/۲ درصد چند شکلی گزارش کردند. آنها ژنوتیپ‌ها را در شش گروه تقسیم‌بندی نمودند. نتایج تحقیق آنها نشان دادا که نشانگر ISSR، قادر به تمایز جمعیت‌های مختلف از یکدیگر است، بطوری‌که نمونه‌های شرق هند را در یک گروه و نمونه‌های جنوب را در دسته جداگانه‌ای طبقه‌بندی کردند، در حالی‌که نشانگرهای مورفولوژیکی نتوانستند این تفاوت‌ها را آشکار کنند (۱۶).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای ۱۶ اکوتیپ زنبق بر اساس آغازگرهای ISSR

Figure 2- Dendrogram of ISSR analysis on 16 ecotypes of *Iris* sp. using the Unweight Pair-Group Method

بر مبنای نتایج حاصل از ماتریس شباهت (جدول ۳) برای سه گونه مورد بررسی، بیشترین میزان تشابه ژنتیکی در بین گونه‌های *Iris kopetdaghensis* و *Iris fosteriana* و کمترین میزان آن در بین گونه‌های *Iris kopetdaghensis* و *Iris songarica* مشاهده گردید.

جدول۳- ماتریس شباهت سه گونه زنبق

Table3. The similarity matrix for three species of Iris

گونه *Species*	*Iris fosteriana*	*Iris kopetdaghensis*	*Iris songarica*
Iris fosteriana	1		
Iris kopetdaghensis	0.943	1	
Iris songarica	0.910	0.890	1

بطور کلی هرچه والدین مناسب از یکدیگر دورتر باشند، انتظار می رود هتروزیس بیشتری در نتاج دیده شود، لذا با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، گونه‌های *Iris kopetdaghensis* و *Iris songarica* بیشترین فاصله را دارند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی به کار گرفته شوند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که آغازگرهای ISSR توانایی تفکیک گونه‌های زنبق را دارند. این نتایج با گزارش شایسته (۲۰) مبنی بر کارا بودن نشانگر ISSR مطابقت دارد. بر مبنای نتایج شایسته بر روی اکوتیپ‌های عناب خراسان، آغازگرهای دو نوکلئوتیدی قادرند که ژنوتیپ‌های مربوط به هر گونه را بطور کامل از یکدیگر جدا کنند که این امر بدلیل فراوانی

بیشتر توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی و قرارگیری آنها در ناحیه بین ژنی باشد در گیاهان است(۱۹). کارایی آغازگرهای ISSR در تفکیک ژنوتیپ‌های جمعیت *Magnolia officinalis* (۲۴)، *elegans Zinnia* (۲۵)، پسته(۲۱) و لاله واژگون (۱۱) نیز اثبات شده است. نتایج سایر محققین نیز نشان داد که نشانگرهای ISSR در مقایسه با نشانگرهای سایر نشانگرها از جمله RAPD، RFLP و AFLP الگوی نواری تکرارپذیری ایجاد می‌کنند و برای گروه‌بندی ارقام گیاهی موثرترند (۲، ۹ و ۱۹). نشانگر ISSR می‌تواند یک سیستم نشانگری مناسب در جهت تشخیص تنوع داخل گونه‌ای و روابط ژنتیکی بین گونه‌ای برای استفاده در اصلاح گونه‌ها ارائه نماید. همچنین می‌توان از آن‌ها جهت تفکیک ژنوتیپ‌ها و بارکدینگ آن‌ها در یک ژرم‌پلاسم استفاده نمود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق تنوع بالایی را ، بین گونه‌های زنبق و ژنوتیپ های‌درون گونه‌های مورد مطالعه نشان داد. با استفاده از شش آغازگر ISSR، در مجموع ۱۲۶ مکان قابل امتیازدهی ایجاد شد که اندازه آن‌ها در محدوده ۳۵۵۰-۲۱۰ جفت باز بود. تمامی جایگاه‌ها چند شکلی نشان دادند. نتایج حاصل نشان داد که آغازگرهای ISSR توانایی بالایی در تفکیک گونه‌های زنبق و ژنوتیپ‌های هر گونه را از یکدیگر دارند و می‌توان در ارزیابی ژرم پلاسم این گیاه در برنامه‌های آتی از آن استفاده نمود.

منابع

1. Al-gabbiesh A.H., Hassawi D.S., and Afifi F.U. 2006. Determination of genetic diversity among Iris species using random amplified polymorphic DNA analysis. Biotechnology, 5(2): 173-179.
2. Azimi M.H., Sadeghanmotahar Y., Beyramizadeh A., Kalatehjari S., and Tahernejad Z. 2011. Study the genetic diversity of Iranian lily species using morphological characteristics. Journal of Horticultural Science and Technology, 11(1): 71-86.
3. Beiki A.H. Abbaspour N., and Mozafari J. 2015. Genetic diversity of cultivated and wild crocus genus in Iran with ISSR markers. Journal of Molecular Cell Biology, 26 (2): 164-173.
4. Biswas M.K., Xu Q., and Deng X. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. Sci. Hortic, 124: 254–261.
5. Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus,12(1): 13–15.
6. Fang D.Q., Roose M.L., Krueger R.R. and Fredric C.T. 1997. Fingerprinting trifoliate orange gerrmplasm. Accessions with isozyme, RFLPs and inter-simple sequence repat markers. Theor. Appl. Genet., 95: 211-219.
7. Glimn-Lacy J., and Kaufman P.B. 2006. Iris Family (Iridaceae). Botany Illustrated. Introduction to Plants. Major Groups, Flowering Plant Families. Springer, New York, USA
8. Khansarinejad B., Hassandokht M.R., Nazeri V. and Soorni A. 2015. Comparison of molecular markers (RAPD, ISSR) for determination genetic differences two of Crocus. International Journal of Farming and Allied Sciences, 4 (5): 457-464.
9. Lamkey K.R. and Lee M. 1993. Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. In: B. C. Imrie and J. B Hacker (ed.) Focused plant improvement: Towards responsible and sustainable agriculture. Proc. 10th Australian Plant Breeding Conf., Gold Coast Organising committee, Australian Convention and Travel Service: Canberra.104-115.
10. Lamote v., Roldán-Ruiz I., Coart E. De Loose M., and Van Bockstaele E. 2002. A study of genetic variation in Iris pseudacorus populations using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). Aquatic Botany, 73: 19–31.
11. Momeni h., Shiran B., Khodambashi M., and Chaghmirzaei K. 2014. An assessment of the genetic diversity of imperial crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations from Zagross region of Iran through ISSR markers and morphological traits . Iranian Journal of Horticultural Science, 44(1): 61-72.
12. Mondini L., Noorani A., and Mario Pagnotta A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity, 1: 19-35.
13. Ohlrogg J.B. 1994. Design of new plants products: engineering of fatty acid metabolism. Plant Physiology, 104: 824-826.
14. Olena M. B., Igor O. A., Ruslan N. K., Kateryna V. S., and Viktor A. K. 2013. Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity. Biologia, 68(4): 613-620.
15. Panahi B., and Ghorbanzadeh Neghab M. 2013. Genetic characterization of Iranian safflower(*Carthamus tinctorius* L.) using inter simple sequence repeats (ISSR) markers . Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(20): 239-243.
16. Parvathaneni R.K., Natesan S., Devaraj A.A., Muthuraja R., Venkatachalam R., Subramani A.P., and Laxmanan P. 2011. Fingerprinting in cucumber and melon (*Cucumis* spp.) genotypes using morphological and ISSR markers. J. Crop Sci. Biotech, 14(1): 39-43.
17. Rahmana A., Nasima S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B., and Choudhary M.I. 2003. Anti-inflammatory

isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. Journal of Ethnopharmacology, 86: 177-180.
18. Rohlf F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.1. Exeter Software, New york.
19. Rout G.R., and Mohapatra A. 2006. Use of molecular markers in ornamental plants: A critical reappraisal. European Journal of Horticultural Science, 71(2): 53-68.
20. Shayesteh H. 2011. Evaluation of the genetic diversity of Jujube (*Ziziphus* spp.) collection of ecotypes Iran using ISSR markers. Master's thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
21. Taghzadeh A., Ahmad J., Hadah R., and Zarabi M. 2012. Study Iranian pistachio genetic variation using ISSR markers. Journal of Horticultural Science, 25(4) 453-460.
22. Wang K., Kang J., Zhou H., Sun Y., Yang Q., Dong J., and Meng L. 2009. Genetic diversity of *Iris lactea* var. chinensis germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). African Journal of Biotechnology, 8(19): 4856-4863.
23. Yeh F.C., Yang R.C., and Boyle T. 1999. POPGENE, the User-Friendly Software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology center, University of Alberta, Canada.
24. Yu H.H., Yang Z.L., Sun B., Liu R.N. 2011. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. Biochemical Systematics and Ecology, 39: 71–78.
25. Zhang J.W., Ning G.G., and Bao M.Z. 2008. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae, 118: 1-7.