تبارشناسی تعدادی از ارقام ایرانی گل داوودی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ITS

میترا شهبازی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲،*] و امیدعلی اکبرپور[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۲- استاد، گروه زرراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۳۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۳)

چکیده

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی دنیاست که نقش مهمی در رونق صنعت گل و گیاهان باغی در دنیا دارد. آگاهی از تنوع ژنتیکی گل داوودی، یکی از پیش‌نیازهای به‌نژادی این گیاه در جهت اهداف مهم اقتصادی است. نشانگرهای مولکولی سهم به‌سزایی در تشخیص و معرفی تنوع ژنتیکی بین و درون‌گونه‌ای دارند. در همین راستا، تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام گل‌های داوودی موجود در ایران با استفاده از توالی‌یابی قسمتی از rDNA به کمک آغازگرهای ITS4 و ITS5 بررسی شد. فاصله ژنتیکی ارقام داوودی از ۰/۰۵ تا ۱۰/۱۵ متغیر بود که نشان دهنده‌ی تنوع ژنتیکی در بین ارقام ایرانی گل داوودی بود. درخت فیلوژنی گونه‌های گل داوودی به روش پارسیمونی ترسیم شد و ارقام را به دو کلاد اساسی، یکی مربوط به کلاد موریفولیوم و دیگری کلاد مربوط به بقیه گونه‌های داوودی، تقسیم نمود که نشان دهنده‌ی قدرت نشانگر ITS در نشان دادن تنوع ژنتیکی بین ارقام گل داوودی بود. در درخت تبارشناسی، تمام ارقام ایرانی در کلاد موریفولیوم قرار گرفتند که نشان می‌دهد احتمالاً تمام ارقام ایرانی از یک ژنوتیپ یا توده منشا گرفته‌اند. نتایج تبارشناسی ارقام داوودی نشان داد که تغییرات و تنوع ژنتیکی فراوانی در جنس گل داوودی مشاهده می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که در جریان تکامل، دورگ‌گیری‌های درون‌گونه‌ای، بین‌گونه‌ای و حتی بین‌جمعیتی در این گیاه سبب ایجاد تنوع فوق‌العاده‌ای شده است که در نتیجه می‌توان از آن‌ها در کارهای به‌نژادی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، داوودی، نشانگر مولکولی، ITS

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **nazarian.f@lu.ac.ir**

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) گیاهی روزکوتاه و متعلق به خانواده *Asteraceae* می‌باشد. منشأ این گل شرق آسیا به‌ویژه کشور چین است (Won *et al.*, 2018). در دهه هفتاد و نود میلادی گل داوودی توانست به ترتیب رتبه اول تولید گل جهان و رتبه دوم گل‌های شاخه بریده را پس از گل رز به خود اختصاص دهد. این گل در بخش‌های مختلفی مانند صنعت گلکاری، دارویی و زینتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. گل داوودی در بین گل‌هایی که کاشت آن‌ها به صورت گلدانی و باغچه‌ای است در جایگاه ویژه‌تری قرار گرفته است، به طوری که یکی از امتیازهای آن، استفاده از این گل به شکل شاخه بریده است (Da Silva, 2004). بنابراین گل داوودی از نظر اقتصادی بسیار سودمند و حائز اهمیت است، به‌طوری که توانسته است در زمینه تولید و مصرف، پس از گل رز، در جایگاه دوم قرار بگیرد (Anderson, 2006; Da Silva, 2003).

بررسی تنوع ژنتیکی و علل آن در بین جمعیت‌های مختلف یک گونه، با استفاده از صفات مورفولوژیک، برای یافتن صفات مطلوب به منظور تولید بیشتر، امری ضروری در به‌نژادی گیاهان می‌باشد. وجود تنوع ژنتیکی جهت انتخاب والدین در برنامه‌های به‌نژادی دارای اهمیت زیادی می‌باشد. به طور کلی، از خصوصیات مورفولوژیکی، فنولوژیکی و زراعی اغلب برای شناسایی اولیه ژرم‌پلاسم استفاده می‌شود (Kia Mohammadi *et al.*, 2011) و به‌عنوان اطلاعات پایه برای به‌نژادگر در امر بررسی تنوع ژنتیکی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (Nazarian-Firouzabadi, 2009). تنوع ژنتیکی پایه اساس توسعه ژنتیکی است، از این‌رو روش‌های متفاوتی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی وجود دارد. تنوع ژنتیکی را می‌توان با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، فرم‌های مختلف یک پروتئین و نشانگرهای DNA مورد مطالعه قرار داد. نشانگرهای مورفولوژیکی نشانگرهای ساده‌ای می‌باشند که وراثت آن‌ها را می‌توان بدون استفاده از روش‌های بیوشیمیایی یا مولکولی مشاهده و بررسی نمود (Nadeem *et al.*, 2018)؛ اثرات پلیوتروپیک، کم بودن چندشکلی، غالبیت و عدم تظاهر در مراحل اولیه رشد، تأثیرپذیری از محیط، اپیستازی و تعداد کم آن‌ها سبب شده است تا استفاده از آن‌ها محدود شود. چندشکلی و پراکندگی مناسب در طول ژنوم، تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی با ضریب دقت بالا، آسانی و کمی هزینه، سرعت شناسایی بالا، نیاز به حجم کمی از نمونه، عدم نیاز به اطلاعاتی در مورد ژنوم، پیوستگی با صفات فنوتیپی از ویژگی‌های یک نشانگر مولکولی ایده‌آل است. به علاوه، یکی از مشخصات بارز نشانگرهای مولکولی ثبات بالای آن‌ها در همه قسمت‌های فرد، بدون در نظر گرفتن مرحله رشد و نموی و تأثیر عوامل محیطی است (Agarwal *et al.*, 2008). گاهی علائم مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ناشی از تفاوت‌های موجود در سطح DNA خود را نشان نمی‌دهند و آن‌ها را می‌توان از طریق بررسی DNA به اثبات رساند. به همین علت به آن‌ها نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌گویند (Patwardhan *et al.*, 2014). نشانگر Internal transcribed spacer (ITS) یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشند که از خصوصیت توالی‌های فاصله‌انداز در نواحی rDNA حفظ شده استفاده می‌کند. از این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان استفاده شده است. برای مثال، برای درک بهتر روند تکامل، روابط خویشاوندی گل داوودی و *Ajania* و موقعیت طبقه‌بندی در برخی از جنس‌های کوچک آسیایی (*Asteraceae* و *Anthemideae*)، از توالی‌های ناحیه ITS و ژن کلروپلاستی trnL-F استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو نشانگر به خوبی می‌توانند روابط خویشاوندی بین گونه‌های داوودی را مشخص کنند (Zhao *et al.*, 2010). مطالعات جدید نشان می‌دهند که گل داوودی تک نیایی نسبت و قرابت بین *Chrysanthemum* و *Ajania* به قدری زیاد است که باید آن‌ها را در یک تاکسون قرار داد (Liu *et al.*, 2012). به

علاوه به نظر می‌رسد که عوامل جغرافیایی-اکولوژیکی، دورگ‌گیری و پلی‌پلوئیدی از جمله فاکتورهای مؤثر در گونه‌زایی جنس *Chrysanthemum* بوده است (Liu *et al.*, 2012).

هدف از این مطالعه بررسی روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی در بین مهمترین ارقام گل داوودی موجود در ایران به کمک نشانگرهای ITS بود تا بتوان از این طریق مبادرت به انتخاب والدین مناسب برای کارهای به‌نژادی و مولکولی نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج DNA: تعداد ۱۱ رقم گل داوودی به نام‌های Ashraf، Avadis ، Bolur، Golgis، Farahnaz، Fariba2، Mani2، Paridokht، Ramtin، Tanaz و Shekarnaz از پژوهشکده گل و گیاهان زینتی محلات به صورت قلمه ریشه‌دار دریافت شد (Salehan and Nazarian Firouzabadi 2017). پس از کاشت ارقام در مزرعه، از گیاهان یک‌ساله، تعداد ۵ عدد برگ جوان تازه جمع‌آوری و با هم مخلوط و بلافاصله در ازت مایع منجمد و با ثبت کد مربوطه در فریزر ۸۰- درجه سانتی-گراد در آزمایشگاه، تا زمان استخراج DNA ژنومی نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB و با استفاده از بافر مربوطه صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز۱ ٪ بررسی شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): در این مطالعه از یک جفت آغازگرITS، با توالی زیر استفاد شد (Schilling *et al.*, 2001):

(ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')
(ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در ۳۵ سیکل به صورت: واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه صورت گرفت. در ضمن در شروع واکنش یک پیش واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و یک بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در انتها صورت گرفت.

جدول ۱- اجزای واکنش PCR برای تکثیر ناحیه ITS در ارقام گل داوودی

Table 1. PCR reaction components used to amplify the ITS region in *Chrysanthemum morifolium cultivars*

ماده Reagent	غلظت پایه Initial Concentration	حجم Volume (µl)
DNA	10 ng	5
بافر PCR	10X	2.5
MgCl2	50 Mm	1.5
آغازگر ITS5	10 Pm	1
آغازگر ITS4	10 Pm	1
dNTPs	10 mM	0.5
Taq DNA polymerase	5 U	0.2
آب مقطر ddW	—	13.3
حجم نهایی Final volume	—	25

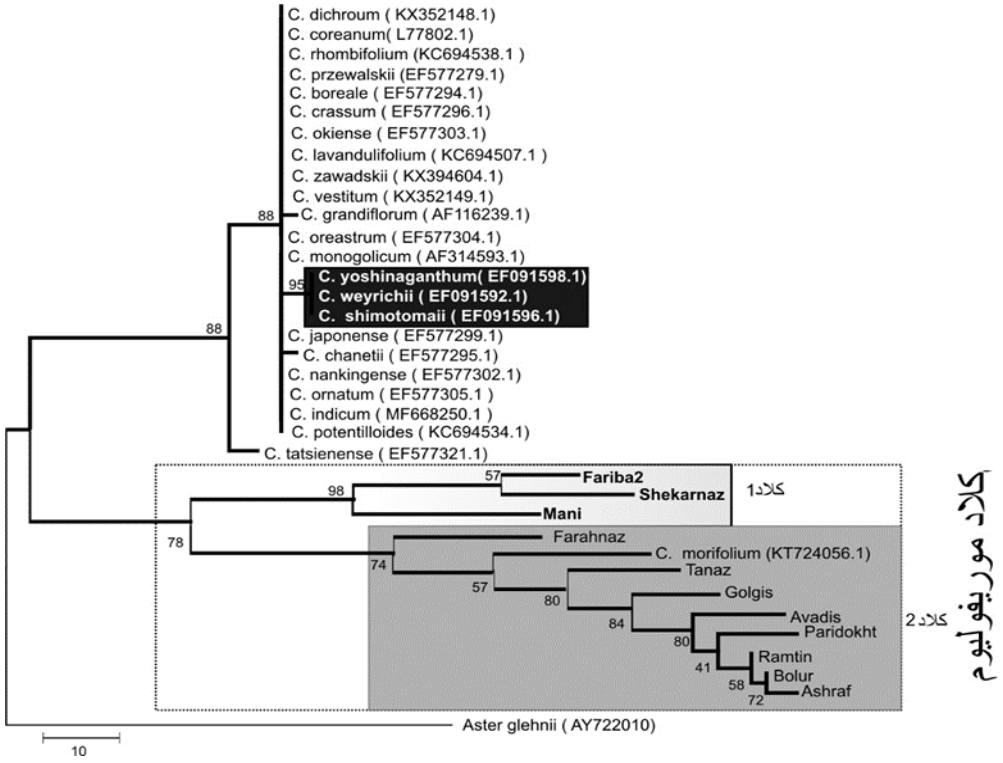
سپس با استفاده از کیت Silica gel (Fermentase)، قطعات DNA از ژل استخراج و خالص شدند و برای توالی‌یابی ارسال شدند. بعد از دریافت فایل FASTA توالی‌ها، به کمک فایل کروموگرام مربوطه توالی‌ها ویرایش و از آن‌ها برای جستجوی BLASTN استفاده شد. تعدادی از نزدیک‌ترین توالی‌ها از پایگاه NCBI دریافت و از آن‌ها برای زیرهم‌چینی و رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. برای بررسی روابط خویشاوندی از نرم‌افزار MEGA7 استفاده شد. درخت فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Parsimony و با ۱۰۰۰ بوت‌استرپ ترسیم شد.

نتایج و بحث

در این بررسی بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دو آغازگر ITS4 و ITS5، باندی به طول ۷۹۰ bp تکثیر شد که با اندازه‌ی ناحیه مورد انتظار هماهنگی داشت. تک تک توالی‌ها به کمک BLASTN مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که میزان شباهت توالی‌ها به توالی-

های ثبت شده در پایگاه NCBI از ۹۶٪ تا ۹۳٪ متغیر بود. درخت تبارشناسی گونه‌های گل داوودی در شکل ۱ مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج این مطالعه، ارقام داوودی موجود در ایران با گونه‌های انتخابی از پایگاه NCBI ، دو کلاد اساسی؛ (۱) کلاد مربوط به موریفولیوم و (۲) کلاد مربوط به بقیه گونه‌های داوودی را تشکیل دادند. تمام ارقام این مطالعه بدون استثناء در کلاد موریفولیوم قرار گرفته‌اند.

این درخت به خوبی نشان می‌دهد که روش پارسیمونی به خوبی توانسته است از اطلاعات موجود در توالی نوکلئوتیدها استفاده و درخت مناسبی از روابط خویشاوندی ارقام گل داوودی ترسیم کند. میزان بوت-استرپ بالای گروه‌بندی‌ها نشان می‌دهد که توالی‌ها به اندازه کافی از اطلاعات مناسبی برای ترسیم درخت برخوردار بوده‌اند. ارزشمندی روش Maximum Parsimony در بررسی روابط خویشاوندی جنس‌های خانواده چتریان اثبات شده است (Sonboli *et al*., 2012; Huang *et al*., 2017). در کلاد بزرگ موریفولیوم دو زیر کلاد دیده می‌شود که تقسیم‌بندی درون کلاد را نشان می‌دهد. در زیرکلاد I سه گونه Mani2،Fariba2 و Shekarnaz و در زیرکلاد II بقیه ارقام گل داوودی این مطالعه جای گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد که ارقام گل داوودی موجود در ایران دارای تنوع ژنتیکی هستند. شواهد خوبی برای اعتبار درخت مبنی بر توالی‌های ITS در کلاد *Chrysanthemum* در مقایسه با سایر جنس‌ها وجود دارد (Liu *et al*., 2012). با این حال اطلاعات مولکولی در خصوص جنس *Chrysanthemum* به بخش محدودی از گونه‌های این جنس اختصاص دارد که در واقع غالباً از یک محدوده جغرافیایی منشأ گرفته‌اند.



شکل ۱- درخت تبارشناسی گونه‌های گل داوودی به روش Maximum Parsimony با استفاده از نواحی ITS برای تعیین اعتبار درخت تبارشناسی از روش Bootstrapping با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد

Figure 1. Phylogeny tree of *Chrysanthemum* species based on Maximum Parsimony method by using the ITS region. Bootstrapping method with 1000 replications was used to validate the tree

جدول ۲- تخمین میزان واگرایی تکاملی بین توالی‌ها

تعداد جابجایی بازها در یک جایگاه بین توالی‌ها توسط روش Kimura-2 Parameters method محاسبه گردید. توالی‌های با کمتر از ۹۵ درصد مشابهت حذف شدند. در مجموع از ۱۸۰ موقعیت برای محاسبه استفاده شد

Table 2. Estimates of evolutionary divergence between sequences

The number of base substitutions per site between sequences was analyzed using the Kimura 2-parameter model. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. There were a total of 180 positions in the final dataset

	Fariba2	Mani2	Shekarnaz	Golgis	Bolur	Ramtin	Tanaz	Avadis	Paridokht
Fariba2	1.00								
Mani2	0.58	1.00							
Shekarnaz	0.61	0.99	1.00						
Golgis	3.27	4.06	4.00	1.00					
Bolur	5.74	6.80	5.27	0.22	1.00				
Ramtin	5.44	7.36	3.92	0.24	0.05	1.00			
Tanaz	4.37	6.32	10.15	0.76	0.64	0.66	1.00		
Avadis	4.06	3.65	4.51	0.31	0.13	0.12	0.62	1.00	
Paridokht	9.12	7.88	4.69	0.28	0.07	0.08	0.62	0.15	1.00
Ashraf	5.06	5.04	4.49	0.27	0.07	0.09	0.56	0.16	0.15

اگرچه در این مطالعه تمرکز روی ارقام جنس *Chrysanthemum* بود، اما داده‌های ITS توانستند گونه‌ها را تا حدودی براساس خصوصیات مورفولوژیکی از هم جدا کنند (Salehan and Nazarian Firouzabadi, 2017). با این حال، در پاره‌ای از مواقع گروه‌بندی دارای استثناءهایی نیز بود. چنین نتایجی را نیز ماسودا و همکاران به دست آورده‌اند (Masuda *et al.*, 2009). برای مثال، در درخت فیلوژنی مطالعه اخیر گونه‌ی *C.yoshinaganthum* که گونه‌ای تتراپلوئید است با گونه *C.vestitum* هگزاپلویئد در یک کلاد قرار گرفته است. یکی از پیچیدگی‌های ژنتیکی گل داوودی، موضوع سطح پلوئیدی آن است (Luo *et al.*, 2017). سطح پلوئیدی در گل داوودی از 2x تا 10x متغیر است (x=9)، از این رو تغییرات و تنوع ژنتیکی فراوانی در جنس گل داوودی مشاهده می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که در جریان تکامل، دورگ‌گیری‌های درون‌گونه‌ای، بین‌گونه‌ای و حتی بین‌جمعیتی نیز در این گیاه سبب ایجاد تنوع فوق‌العاده شده است (Ma *et al.*, 2016). سطح پلوئیدی در گونه‌های *monogolicum* و *zawadskii* به صورت 8x=72 است که هر دو در یک کلاد و در کنار هم قرار گرفته‌اند. همچنین سطح پلوئیدی در گونه‌های *vestitum*، *zawadskii* و *oreastrum* نیز 6x=54 است و در گونه‌های *Potentilloides* و *indicum*، *nankingense* به صورت 2x=18 است که این گونه‌ها نیز در کنار هم قرار دارند. با این‌حال گونه‌هایی نیز با سطوح پلوئیدی متفاوت در بین کلادها قرار دارند که نشان می‌دهد گروه‌بندی براساس ITS با گروه‌بندی براساس سطح پلوئیدی همخوانی ندارد (شکل۱). تنوع رنگ گل، مشخصه دیگری است که از آن می‌توان برای دسته‌بندی گل‌های داوودی استفاده کرد. گل در گونه‌های *Oreastrum* , *Chanetii* و *Zawadskii* در سه رنگ بنفش کم‌رنگ، صورتی و سفید می‌باشد که در درخت مورد مطالعه نیز هر سه گونه در یک کلاد قرار گرفته‌اند. همچنین دو گونه *rhombifolium* و *vestitum* دارای گل‌های سفید رنگ می‌باشند که در درخت نیز هر دو در یک کلاد می‌باشند. در گونه‌های *dichrum* , *indicum* , *lavandulifolium* , *nankingense* , *potentilloides* گل‌ها زرد رنگ می‌باشند که در درخت مربوطه در یک کلاد قرار دارند و سه گونه *nankingense* , *indicum* , *Potentilloides* در نزدیکی یکدیگر قرار دارند. این موضوع از این نظر جالب است که در برخی از مطالعات مشابه در این خصوص اتفاق‌نظر وجود ندارد (Roein *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2010).

دوره گلدهی مشخصه دیگری است که از آن برای گروه-بندی گل‌های داوودی استفاده می‌شود (Ma *et al.*, 2016). در دو گونه *rhombifolium* و *nankingense* دوره گلدهی حدود ۱۱ ماه است، که هر دو گونه در یک کلاد

قرار گرفته‌اند. به‌علاوه، گونه‌های *indicum*، *vestitum* و *lavandulifolium* نیز دارای دوره گلدهی یکسانی به مدت ۱۱–۹ ماه هستند که هر سه نیز در یک کلاد جا گرفته‌اند و دو گونه *vestitum* و *lavandulifolium* در نزدیکی هم می‌باشند.

از نظر محل جغرافیایی و پراکندگی، خاستگاه گونه‌های *dichrum*، *rhombifolium*، *lavandulifolium*، *vestitum*، *oreastrum*، *zawadskii*، *monogolicum*، *nankingense*، *boreale*، *chanetii* و *morifolium* کشور چین است. براین اساس گونه‌های *chanetii* و *nankingense* کنار هم، گونه‌های *monogolicum*، *oreastrum*، *vestitum*، *zawadskii* و *lavandulifolium* کنار هم و گونه‌های *dichrum* و *rhombifolium* نیز نزدیک هم قرار دارند. هم چنین خاستگاه گونه‌های *crassum*، *okiense*، *japonense*، *orantum*، *yoshinaganthum*، *zawadskii* و *boreale* کشور ژاپن می‌باشد، که در درخت مورد مطالعه گونه‌های *crassum*، *okiense* و *boreale* در کنار یکدیگر جای گرفته‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توالی ناحیه ITS تا حدودی قادر است منشأ و خاستگاه جغرافیایی گونه‌ها را در نظر بگیرد. با این حال، مطالعاتی نیز وجود دارد که عدم توانایی این توالی‌ها را در این خصوص نشان داده‌اند (Baliyan *et al*., 2014).

فاصله ژنتیکی ارقام داوودی این مطالعه محاسبه و مشخص شد که این فاصله ژنتیکی بین ارقام داوودی بر اساس ITS5 و ITS4 از ۰/۰۵ تا ۱۰/۱۵ متغیر بود. کمترین فاصله مربوط به دو رقم Bolur و Ramtin و بیشترین فاصله ژنتیکی به دو رقم Shekarnaz و Tanaz اختصاص داشت. به طورکلی، نتایج این مطالعه نشان داد که اطلاعات ناحیه rDNA برای بررسی تبارشناسی ارقام و گونه‌های داوودی مناسب است. تمام ارقام مورد مطالعه ایرانی در یک کلاد مربوط به گونه موریفولیوم قرار گرفتند. این موضوع به‌خوبی نشان داد که حداقل در مورد ارقام موجود در ایران، احتمالاً همگی از یک ژنوتیپ اصلاح شده‌اند و جد مشترکی دارند. با این حال، به دلیل استفاده از یک ناحیه از مناطق ITS، این فرضیه باید با نشانگرهای بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

References

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, **27**: 617-631.

Anderson, N.O. (2006). *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, NL.

Baliyan, D., Sirohi, A., Kumar, M., Kumar, V., Malik, S., Sharma, S. and Sharma, S. (2014). Comparative genetic diversity analysis in chrysanthemum: A pilot study based on morpho-agronomic traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **167**: 164-168.

Da Silva, J.A.T. (2003). Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances*, **21**: 715-766.

Da Silva, J.A.T. (2004). Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **79**: 1-18.

Huang, Y., An, Y.M., Meng, S.Y., Guo, Y.P. and Rao, G.Y. (2017). Taxonomic status and phylogenetic position of Phaeostigma in the subtribe Artemisiinae (Asteraceae). *Journal of Systematics and Evolution*, **55**: 426-436.

Kia Mohammadi, F., Abdoosi, V., Moradi, P., Shafiei, M.R. and Arab, S. (2011). Phylogenetic analysis of some iranian inbreeding Chrysanthemum cultivars using morphological traits. Agronomy and plant breeding. *Agronomy and Plant Breeding*, **8**: 43-45.

Liu, P.L., Wan, Q., Guo, Y.P., Yang, J. and Rao, G.Y. (2012). Phylogeny of the genus Chrysanthemum L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences. *PloS One*, **7**: e48970.

Luo, C., Chen, D., Cheng, X., Zhao, H. and Huang, C. (2017). Genome size estimations in Chrysanthemum and correlations with molecular phylogenies. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **64**: 1451-1463.

Ma, Y.P., Chen, M.-M., Wei, J.X., Zhao, L., Liu, P.L., Dai, S.L. and Wen, J. (2016). Origin of Chrysanthemum cultivars-Evidence from nuclear low-copy LFY gene sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, **65**: 129-136.

Masuda, Y., Yukawa, T. and Kondo, K. (2009). Molecular phylogenetic analysis of members of Chrysanthemum and its related genera in the tribe Anthemideae, the Asteraceae in East Asia on the basis of the internal transcribed spacer (ITS) region and the external transcribed spacer (ETS) region of nrDNA. *Chromosome Botany*, **4**: 25-36.

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A. and Labhane, N. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **32**: 261-285.

Nazarian-Firouzabadi, F. (2009). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. Lorestan University Press, Khorramabad, IR.

Patwardhan, A., Ray, S. and Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, **2(2):**1-9.

Roein, Z., Asil, M.H., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2014). Genetic structure of Chrysanthemum genotypes from Iran assessed by AFLP markers and phenotypic traits. *Plant Systematics and Evolution*, **300**: 493-503.

Salehan, S.M. and Nazarian Firouzabadi, F. (2017). Phylogenetic analysis of chrysanthemum morifolium cultivars by rpoC chloroplastic gene sequencing and morphological traits. *Plant Genetic Researches*, **4**: 89-103.

Schilling, E.E. and Panero, J.L. (2011). A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae) II. Derived lineages. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **167**: 311-331.

Sonboli, A., Stroka, K., Osaloo, S.K. and Oberprieler, C. (2012). Molecular phylogeny and taxonomy of Tanacetum L.(Compositae, Anthemideae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnH-psbA sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*, **298**: 431-444.

Won, S.Y., Jung, J.A. and Kim, J.S. (2018). The complete chloroplast genome of Chrysanthemum boreale (Asteraceae). Mitochondrial DNA Part B, **3**: 549-550.

Zhao, H.B., Chen, F.D., Chen, S.M., Wu, G.S. and Guo, W.M. (2010). Molecular phylogeny of Chrysanthemum, Ajania and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast trnL-F IGS sequences. *Plant Systematics and Evolution*, **284**: 153-169.

Phylogenetic Analysis of some Iranian *Chrysanthemum morifolium* Cultivars, using Internal Transcribed Spacer (*ITS*) Molecular Markers

Mitra Shahbazi[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[2,*] and Omid Ali Akbarpour[3]

1- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Irna
2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Irna
3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Irna

(Received: May 21, 2017 – Accepted: January 23, 2018)

Abstract

Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) is one of the most important ornamental plants which plays a significant role in the development of gardening industry in the world. The knowledge of genetic diversity is one of the prerequisite criteria for *Chrysanthemum* breeding with important economic goals. Molecular markers have a significant share in elucidation of inter and intra species genetic diversity. To this end, genetic diversity of a number of Iranian cultivars was molecularly investigated by sequencing a part of rDNA, using ITS4 and ITS5 primers. Genetic distance between *Chrysanthemum* cultivars ranged from 0.05 to 10.15, demonstrating the power of ITS region in revealing the genetic diversity among cultivars of *morifolium*, suggesting Iranian cultivars have been genetically improved from *morifolium* species. Genetic diversity assessment of Iranian *Chrysanthemum* cultivars demonstrated that presumably inter, intra species or even inter population hybridization may have been involved in creating enormous genetic diversity among *Chrysanthemum* cultivars.

Keywords: Genetic diversity, *Chrysanthemum morifolium*, Molecular marker, ITS

* **Corresponding Author, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir**