

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های پنیرک (*Malva neglecta*) با استفاده از نشانگر مولکولی

ISSR

عبدالمهدی نوریان^{۱*} و هومن شیروانی^۲

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۴

چکیده

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۸ اکوتیپ پنیرک (*Malva neglecta*) تهیه شده از بانک ژن سازمان جنگل‌ها و مراتع مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت و با ۱۵ نشانگر ISSR تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۹ باند تولید کنند که از این تعداد، ۲ باند یک شکل مشاهده شد. آغازگرهای IS6 و IS5 به ترتیب با ۱۲ و ۱۱ باند بیشترین تعداد و آغازگرهای UBC807 و UBC867 با ۴ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. شاخص‌های محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانگی موثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP) برای کلیه نشانگرها محاسبه گردید که با توجه به شاخص‌های محاسبه شده آغازگرهای IS6 و IS5 به عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی پنیرک معرفی گردید. میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگرها برابر ۰/۶۹ بود. بیشترین تشابه را اکوتیپ G4 با اکوتیپ G9 با ضریب ۰/۸۴ داشتند. کمترین تشابه مربوط به اکوتیپ G1 با اکوتیپ‌های G9، اکوتیپ G15 با G6 و G8 با ضرایب تشابه ۰/۵۷ بود. نتایج حاصل از گروهبندی تجزیه خوشه-ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد اکوتیپ‌ها را در ۳ گروه قرار داد که بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCo) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گروه‌های حاصل از تجزیه کلاستر تایید گردید بر طبق این گروهبندی واریانس بین گروه‌ها در سطح ۵٪ معنی‌دار بود، اما براساس واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروه‌ها تنها ۲۹ درصد از تنوع کل بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مارکر مولکولی، پنیرک، ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۴۶۳۰۹۰۲، پست الکترونیکی: Mehdi_Noorian@yahoo.com

مقدمه

دارویی و معطر و نقش این گیاهان در ایجاد تنوع در بوم نظام‌های زراعی ایران، بسیار مورد اهمیت می‌باشد (۱۵). پنیرک (*Malva*) از تیره *Malvaceae* گیاهی علفی یک ساله، دوساله یا پایا با خواص شناخته شده دارویی است. گونه *Malva neglecta* گیاهی علفی یکساله و دارای ساقه نیمه خوابیده به طول ۴۰-۱۰ سانتی‌متر می‌باشد (۱). گونه‌های مختلف پنیرک همانند *Malva neglecta* Wallr در کشورهای مختلف دنیا کشت می‌گردد یا به

کشت گیاهان دارویی و معطر، از دیرباز از جایگاه ویژه‌ای در نظام‌های سنتی کشاورزی ایران برخوردار بوده است و این نظام‌ها از نظر ایجاد تنوع و پایداری، نقش مهمی ایفا می‌کرده‌اند. متأسفانه در سال‌های اخیر، به دلیل جایگزین شدن گونه‌های زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از این گونه‌ها و ارقام بومی و محلی به فراموشی سپرده شده و از سیستم‌های زراعی ایران حذف شده‌اند. بنابراین بررسی وضعیت تولید گیاهان

DNA امکان شناسایی مستقیم تنوع توالی ژنومی را در بین گیاهان فراهم می‌کنند که می‌تواند در تکمیل اطلاعات شجره‌نامه مورد استفاده قرار گیرند (۲۱). نشانگر ISSR یک نشانگر مبتنی بر PCR است که می‌تواند تفاوت‌های افراد با خویشاوند را به سرعت از یکدیگر جدا کند و ثابت شده است که نشانگرهای مولکولی مفیدی در مطالعات انگشت‌نگاری ژنومی بررسی‌های فیلوژنتیکی و نشان-گذاری ژن است این تکنیک از یک آغازگر منفرد طراحی شده براساس توالی زیر ماهواره که در ۵' یا ۳' با ۲ تا ۴ نوکلئوتید انتخابی قلاب شده است استفاده می‌کند و برای طراحی آغازگر به اطلاع قبلی از ژنوم نیاز ندارد نشانگر ISSR به علت طول نسبتاً بلندتر آغازگرها و دمای اتصال بالاتر قابل اطمینان‌تر از RAPD است و می‌تواند بطور گسترده خصوصاً برای ارزیابی ژرم پلاسم گیاهی و تنوع ژنتیکی استفاده شود (۲۶). نشانگرهای ISSR برای آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی بین نژادها از طریق تولید تعداد زیادی نشانگر میکروساتلایتی توزیع شده در سراسر ژنوم مفید هستند (۵). تحقیقات زیادی در ارتباط با وجود تنوع ژنتیکی در بین گیاهان دارویی با استفاده از نشانگرهای مولکولی خصوصاً نشانگر ISSR صورت گرفته است و نتایج حاصل این بررسی‌ها بیانگر کارایی این نشانگر در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی می‌باشد (۸، ۹، ۱۴، ۲۶). در کشور ایران تحقیقات انجام شده در زمینه اصلاح گیاهان دارویی به نسبت اهمیتی که این گیاهان در صنایع مختلف دارد، محدود می‌باشد. بنابراین انجام تحقیقات بیشتر به منظور دستیابی به ارقام اصلاح شده ضروری به نظر می‌رسد، لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی در اکوتیپ‌های مختلف پنبیرک در جهت تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی برای دستیابی به هتروزیس و افزایش ترکیبات می‌تواند مفید باشد، در نهایت می‌توان از این اطلاعات نیز جهت حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسم استفاده نمود.

طور خودرو رشد می‌کند (۶). خواص آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف پنبیرک در نقاط دیگر دنیا توسط برخی محققین گزارش شده است (۱۸). پنبیرک منبع غنی از ویتامین‌های A، B و C بوده و به عنوان یکی از گیاهان دارویی موثر در کاهش عوارض سرماخوردگی به ویژه سرفه، همچنین در التهاب‌های تنفسی، مجاری ادراری و گوارشی و نیز جوش‌های پوستی می‌باشد. نتایج مطالعات انجام دهنده بر روی خواص ضد میکروبی پنبیرک حاکی از آن است که این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی علیه بسیاری از پاتوژن‌های انسانی می‌باشد (۱۹).

به دلیل عوارض فراوان ناشی از استفاده از داروهای شیمیائی مصنوعی، استقبال چشمگیری از داروهای طبیعی با منشاء گیاهی شده است (۱۲). آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی تعیین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه‌ی ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد (۲۵). بیشتر به‌نژادگران معتقدند که کمبود تنوع ژنتیکی پیشرفت‌های اصلاحی را در آینده مختل می‌کند (۱۷). ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی، حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گونه گیاهی برای انتخاب والدین جهت رسیدن به دو رگ مناسب از اهمیت زیادی بر خوردار است (۲۰). تنوع ژنتیکی می‌تواند به وسیله تخمین فاصله ژنتیکی با استفاده از اطلاعات شجره یا با استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی شود (۲۲). به منظور تخمین این تنوع انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط به‌نژادگران گیاهی استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی شامل بیوشیمیائی و DNA اشاره کرد. نشانگرهای

مواد و روشها

در تحقیق انجام شده بذره‌های ۱۸ اکوتیپ از گیاه دارویی پنیرک به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر کد اکوتیپ و محل دریافت یا جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق

اکوتیپ	استان	شهرستان	کد بانک ژن
G1	یزد	یزد	10534
G2	گستان	گنبد	12926
G3	همدان	نهبوند	14342
G4	یزد	شاهدیه	15504
G5	یزد	تفت	15843
G6	یزد	صدوق	15922
G7	آذربایجان شرقی	هریس	20011
G8	یزد	صدوق	21113
G9	یزد	بافق	21122
G10	سمنان	سمنان	21601
G11	هرمزگان	بندرعباس	22521
G12	هرمزگان	قشم	22900
G13	هرمزگان	میناب	22903
G14	کرمان	کرمان	26408
G15	سمنان	دامغان	30789
G16	یزد	طیس	33487
G17	ایلام	دهلران	34327
G18	ایلام	دهلران	34338

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۲۴) برای هر اکوتیپ در آزمایشگاه انجام گرفت. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۰۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار ۱x) انجام شد. چرخه

حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت-سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود (۵۲ تا ۶۰ درجه). همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محصولات واکنش بر روی از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد الکتروفورز شدند. به منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بارگزاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایش باندها استفاده شد.

محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC= Polymorphic information content) از طریق فرمول

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

محاسبه شد، در اینجا p برابر با مجموع باندهای هر لوکوس برای کلیه اکوتیپ‌ها است (۱۶). همچنین شاخص نشانگری (MI= Marker Index)

از رابطه $MI = PIC \times N \times B$ بدست آمد که N تعداد کل باندها و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر بود (۱۱).

شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR= Effective multiplex ratio) از رابطه $EMR = NPB \times \beta$ که از درصد چندشکلی (β) ضربدر تعداد باندهای چندشکل (NPB) بدست آمد (۱۲) و قدرت تفکیک (RP= Resolving power) از رابطه $RP = \sum IB$ محاسبه گردید. $RP = \sum IB$ در رابطه $IB = 1 - [2 \times (0.5 - P_i)]$ و P_i نسبت افراد دارای باند

ترتیب ۰/۳۱۸، ۰/۳۳۰ و ۰/۳۳۸) توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپ‌ها نداشتند. در مورد شاخص نشانگر (MI) آغازگرهای IS6 و IS5 به ترتیب بیشترین میزان و آغازگرهای UBC807 و UBC869 دارای کمترین میزان شاخص نشانگر بودند. برای شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR) آغازگرهای IS6 و IS5 دارای بیشترین و آغازگر UBC807 کمترین میزان را به خود اختصاص داد. در شاخص تفکیک (RP) نیز ملاحظه شد که آغازگرهای IS5 و IS6 دارای بیشترین میزان و آغازگرهای IS9 و IS14 دارای کمترین میزان بودند. آغازگرهای IS9، IS10، IS11 و IS14 با کمترین میزان توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپ‌ها نداشتند و دیگر آغازگرها در حد متوسطی بودند.

ماتریس تشابه: تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۵۷ تا ۰/۸۴ متغیر بود (جدول ۳)، میانگین تشابه بین اکوتیپ‌ها برابر ۰/۶۹ بود که بالا بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم در بین اکوتیپ‌های پنیوک بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را اکوتیپ G4 با اکوتیپ G9 با ضریب ۰/۸۴ داشتند. کمترین تشابه و بیشترین فاصله مربوط به اکوتیپ G1 با اکوتیپ‌های G9، اکوتیپ G15 با G6 و G8 با ضرایب تشابه ۰/۵۷ بود.

تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس برای اکوتیپ‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. همچنانکه ملاحظه می‌گردد اکوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل اکوتیپ‌های G1، G2، G3، G4، G7، G6 و G10 بود، که متوسط ضریب تشابه برای این سه اکوتیپ ۰/۶۵ بدست آمد. گروه دوم شامل چهار اکوتیپ G5، G8، G9 و G18 بود. برای این گروه متوسط ضریب تشابه این گروه ۰/۴۸ بود. گروه سوم شامل اکوتیپ‌های G11، G12، G13، G14، G15، G16 و G17 بود که میانگین تشابه برای این گروه ۰/۵۸ بود. بنابراین

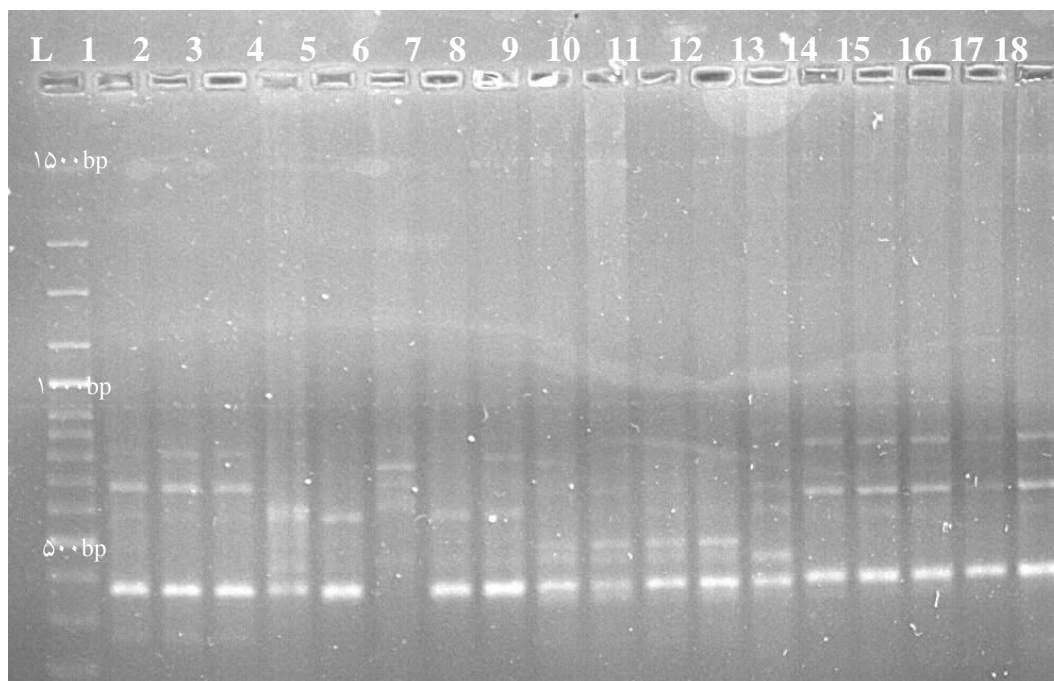
است (۴). در پایان نیز داده‌های حاصل، با استفاده از نرم افزارهای NTSYSpc 2.02e برای محاسبه ماتریس تشابه و آزمون مانتل، DARwin 6 جهت تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و GenAlEx 6.2 برای تجزیه واریانس مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

بررسی پلی‌مورفیسم: با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت که آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۹ باند تولید کنند که از این تعداد ۲ باند یک شکل مشاهده شد و ۹۷ باند چندشکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۸ اکوتیپ برابر ۵/۵ بود. آغازگر IS6 بیشترین تعداد باند (تعداد ۱۲ باند) و آغازگرهای UBC807 و UBC867 کمترین تعداد باند (تعداد ۴ باند) را نشان دادند. اکوتیپ G2 بیشترین باند (۶۵ باند) و اکوتیپ G1 کمترین باند (۲۵ باند) را در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. شکل ۱ الگوی باندی ۱۸ اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS7 را نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است که با توجه به این جدول، میانگین درصد چند شکلی در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۸/۱۲ بود، کمترین درصد چند شکلی را آغازگرهای IS11 (۸۷/۵٪) و IS5 (۹۱/۹۱٪) داشتند و دیگر آغازگرها با داشتن ۱۰۰٪ چند شکلی دارای بیشترین میزان بودند. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگر-های مورد بررسی برابر ۰/۳۳۶ بود که بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای IS3، UBC807، UBC847 و UBC848 به ترتیب با ۰/۴۵۳، ۰/۴۲۰، ۰/۴۰۵ و ۰/۴۰ اختصاص داشت، بنابراین این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانستند فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها را مشخص کنند. آغازگر IS10، IS11 و IS5 با کمترین میزان PIC (به

اکوتیپ‌های گروه اول دارای بیشترین تشابه و اکوتیپ‌های گروه دوم دارای کمترین تشابه بودند.



شکل ۱- الگوی بانندی ۱۸ اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر JS7. اولین چاهک از سمت چپ DNA Leader با سایز ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ bp می‌باشد.

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده و شاخص‌های محاسبه شده

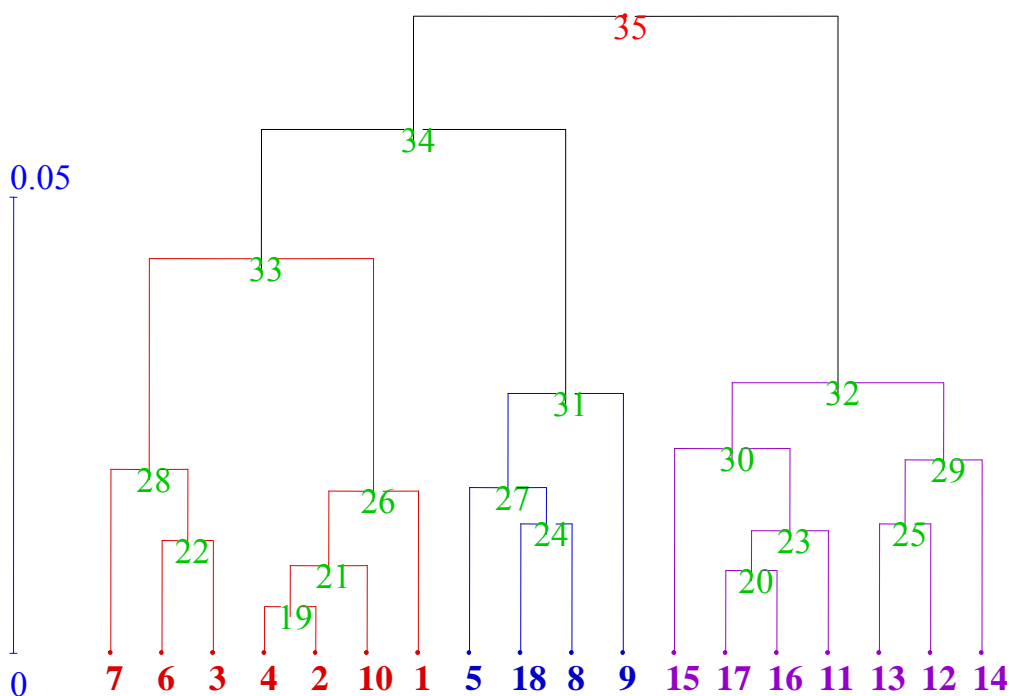
نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	محتوی اطلاعات چند شکلی	شاخص نشانگری	نسبت چندگانه موثر	قدرت تفکیک
UBC807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	۴	۴	۱۰۰	۰/۴۵۳	۱/۸۱۳	۴	۴/۸۲۳
IS5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱	۰/۳۳۸	۳/۳۸۴	۹/۰۹۱	۸/۷۰۵
IS6	5'-ACACACACACACACACC-3'	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۷۹	۴/۵۵۱	۱۲	۹/۲۹۴
IS7	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۲۱	۲/۱۰۳	۵	۳/۵۲۹
IS9	5'-CTCTCTCTCTCTCTG-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۴۶	۲/۰۷۶	۶	۲/۹۴۱
IS10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGARc-3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۱۸	۲/۲۲۸	۷	۵/۶۴۷
IS11	5'-ACACACACACACACACC-3'	۸	۷	۸۷/۵	۰/۳۳۰	۲/۳۱۳	۶/۱۲۵	۷/۴۱۱
UBC847	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCC-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۴۰۶	۲/۴۳۵	۶	۳/۵۲۹
UBC856	5'-CCGCCGCCGCCGCCGCCG-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۸۸	۱/۹۳۷	۵	۵/۵۲۹
IS14	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۶۸	۱/۸۴۰	۵	۲/۵۸۸
IS15	5'-GGATGGATGGATGGAT-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۴۱	۲/۰۴۸	۶	۴
IS16	5'-DBDACACACACACACA-3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۹۰	۲/۷۲۶	۷	۳/۸۸۲
UBC857	5'-ACACACACACACACACYG-3'	۸	۸	۱۰۰	۰/۳۳	۲/۶۲	۸	۵/۳۵
UBC848	5'-CACACACACACAARG-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۰	۲	۵	۳/۳۶
UBC869	5'-GTTGTTGTTGTTGTTGTT-3'	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۶	۱/۴۲	۴	۴/۷۸
		۶/۶	۶/۴۶	۹۸/۱۲	۰/۳۶	۱/۴۴	۶/۳۴	۵/۵۵

میانگین

Y=(C,T), V=(A,C,G), D=(A,G,T), B=(C,G,T)

جدول ۳- ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها برای پرایمرهای SCoT استفاده شده بر اساس ضریب دایس

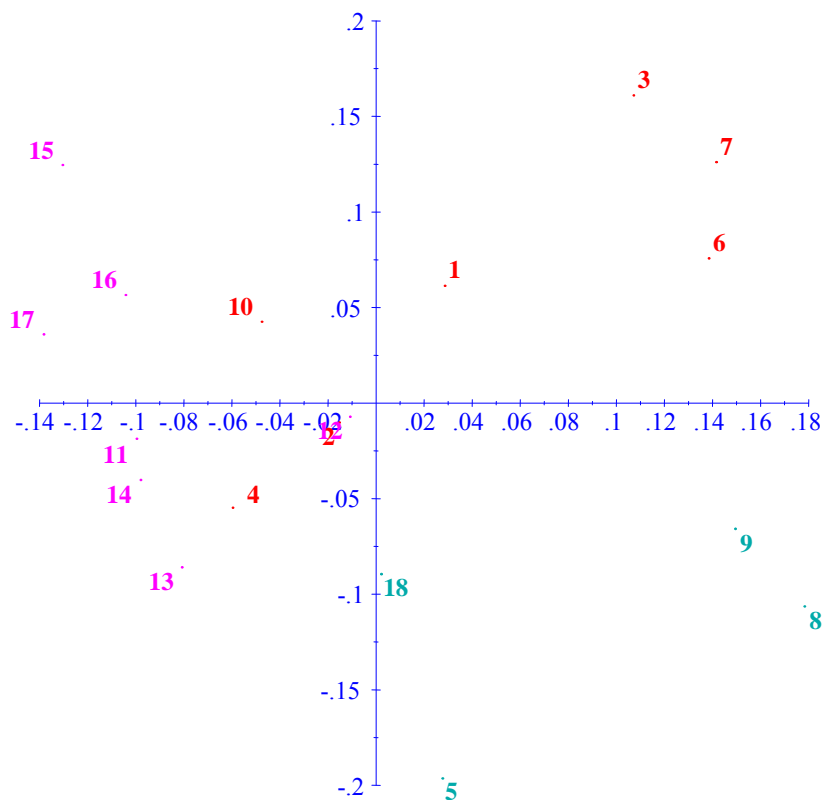
اکوتیپ	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	
G1	۱																		
G2	۰/۷۳	۱																	
G3	۰/۷۵	۰/۷۹	۱																
G4	۰/۷۸	۰/۸۶	۰/۶۸	۱															
G5	۰/۷۰	۰/۷۵	۰/۶۰	۰/۷۹	۱														
G6	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۷۸	۰/۶۸	۰/۶۳	۱													
G7	۰/۷۰	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۶۷	۰/۵۹	۰/۷۳	۱												
G8	۰/۶۵	۰/۷۰	۰/۷۱	۰/۶۵	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۶۷	۱											
G9	۰/۵۷	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۳	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۷۰	۱										
G10	۰/۷۸	۰/۷۹	۰/۷۱	۰/۸۴	۰/۷۰	۰/۷۵	۰/۷۰	۰/۶۵	۰/۶۰	۱									
G11	۰/۶۸	۰/۷۹	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۶۷	۰/۶۵	۰/۶۳	۰/۶۸	۰/۶۰	۰/۷۵	۱								
G12	۰/۷۰	۰/۷۸	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۷۵	۰/۷۳	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۶۵	۰/۷۶	۰/۷۶	۱							
G13	۰/۶۵	۰/۷۰	۰/۶۲	۰/۷۵	۰/۶۷	۰/۶۵	۰/۶۰	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۸	۰/۷۱	۰/۷۶	۱						
G14	۰/۶۲	۰/۷۳	۰/۶۲	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۶۲	۰/۶۷	۰/۶۲	۰/۶۳	۰/۷۵	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۷۵	۱					
G15	۰/۶۳	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۶۷	۰/۵۹	۰/۵۷	۰/۶۸	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۷۰	۱				
G16	۰/۶۵	۰/۷۰	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۶۳	۰/۶۲	۰/۶۷	۰/۷۵	۰/۷۸	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۷۹	۱			
G17	۰/۶۷	۰/۷۳	۰/۶۸	۰/۷۸	۰/۶۳	۰/۶۸	۰/۶۰	۰/۵۹	۰/۶۳	۰/۷۵	۰/۷۸	۰/۷۰	۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۸۱	۱		
G18	۰/۶۷	۰/۷۵	۰/۶۳	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۶۷	۰/۶۸	۰/۷۶	۰/۶۸	۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۷۰	۱	



شکل ۲- نمودار حاصل تجزیه از خوشه‌های داده‌های نشانگر ISSR برای اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب دایس و روش UPGMA. اعداد روی نمودار (Node) بیانگر شباهت و نزدیکی اکوتیپ‌ها می‌باشد

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۵)، که اکوتیپ‌ها در داخل ۳ گروه قرار گرفتند بر اساس آماره PhiPT در بین گروه‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی به صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج بدست آمده نشان داد که در میان گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروه‌ها برابر ۷۱٪ و در بین گروه‌ها تنوع برابر ۲۹٪ مشاهده گردید.

تجزیه به مختصات اصلی (PCo): بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای اکوتیپ‌ها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۴/۵۱ و ۱۹/۲۷ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۴۳/۷۸ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی اکوتیپ‌ها رسم گردید (شکل ۳)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا حدودی مطابقت داشت و اکوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند.



شکل ۳- بای پلات اکوتیپ‌ها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR

PhiPT	درصد از واریانس		میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
	Var%	Est. Var.				
۰/۲۹*	٪۲۹	۵/۰۰۲	۳۲/۹۰	۹۸/۷۰	۲	بین گروه
	٪۷۱	۱۲/۱۰۹	۱۲/۱۰	۱۵۷/۴۲	۱۵	درون گروه
	٪۱۰۰	۱۷/۱۱۱		۲۶۶/۱۲	۱۷	کل

** اختلاف در سطح ۱٪ معنی‌دار

بحث و نتیجه گیری

در مطالعات بسیاری گزارش شده که نشانگر ISSR به دلیل خصوصیتی نظیر تکرار پذیری بالا، عدم نیاز به دانستن توالی برای یافتن آغازگر و عدم نیاز به دانستن اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم یکی از گزینه‌های مناسب به منظور بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد (۱۳ و ۲۷). در این تحقیق نیز مشخص شد که با استفاده از این نشانگر می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی را مشخص ساخت. بر اساس نتایج همانطور که مشاهده گردید تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین اکوتیپ‌های پنیرک وجود داشت و چند شکلی مطلوبی بر اساس نشانگر ISSR مشاهده شد. در بررسی Celka و همکاران (۷) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و ISJ که بر روی ۲۴ گونه مختلف پنیرک صورت گرفت، کارایی نشانگر مولکولی ISSR بالا گزارش گردید به نحوی که در این بررسی گونه‌ها کاملاً از یکدیگر تفکیک شدند. همچنین Domblides و همکاران (۸) تنوع ژنتیکی ۳۲ نمونه گیاه جعفری (متعلق به خانواده چتریان) را با استفاده از ۶ آغازگر ISSR بررسی کردند و به طور متوسط ۱۰/۲ باند پلی‌مورف مشاهده کردند. آنها نشان دادند این نشانگر از کارایی بالایی برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه برخوردار است.

محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین،

نشانگرهایی با محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (۱۹) همچنین بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیرپذیری دارد (۴). در حالت کلی و بر اساس شاخص‌های محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص قدرت تفکیک (RP) مناسب-ترین آغازگرها برای بررسی‌های گونه پنیرک، آغازگرهای UBC807، IS5، IS6، IS7 و IS12 تعیین شد، و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما دیگر اکوتیپ‌های پنیرک در تحقیقات بعدی استفاده گردند. Ma yanming و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ توده‌ی زیره سبز از ۳۸ آغازگر ISSR استفاده کردند که در این میان ۱۲ آغازگر تولید قطعات چندشکل نمودند. میزان چندشکلی در این تحقیق برابر با ۰/۳۳ بود و بر اساس شاخص PIC بهترین آغازگرها را معرفی نمودند. در این مطالعه میانگین تشابه بین اکوتیپ‌ها برابر ۰/۶۹ بود که بالا بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم در بین اکوتیپ‌های پنیرک بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. داروین (DARwin) نرم افزاری برای آنالیز تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی است. این نرم افزار بیشتر روی توصیف ساختار تنوع بر مبنای روش‌های مبتنی بر فاصله تأکید دارد. در این برنامه تعدادی Node وجود دارد که به ترتیب شباهت و نزدیکی اکوتیپ‌ها را نشان می‌دهد. Hammad (۱۰) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های پنیرک با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و آیزوزایم‌ها بر اساس اطلاعات حاصل از این نشانگرها اقدام به

وجود دارد. بنابراین این مطلب را که در اکثر مطالعات مربوط به ارزشیابی تنوع درون گونه ای، تنوعی اندک بین اکوتیپ‌های یافته‌اند و یا گاهی هیچگونه تنوعی وجود نداشته است، نمی‌توان به عنوان یک پیش فرض برای هرگونه در نظر گرفت. در مجموع در این مطالعه و بر اساس آغازگرهای مورد استفاده و همچنین با توجه به ماتریس تشابه، تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی کمترین تشابه و بیشترین فاصله مربوط به اکوتیپ G1 (مربوط به یزد) با اکوتیپ‌های G12 (مربوط به هرمزگان) بود که پیشنهاد می‌گردد از این اکوتیپ‌ها که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. همچنین با توجه به تنوع ژنتیکی پایین درون ژنوتیپ‌های پنیرک کشور که از بانک ژن جنگلها و مراتع کشور تهیه شده بود، حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسما و استفاده از روش‌های تکثیر مناسب این گیاه توصیه می‌شود. فرشادفر و همکاران (۲، ۳) در بررسی‌های خود بر روی گیاهان دارویی رازیانه و مریم نخودی نتایج مشابهی را گزارش نمودند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است. که از این بابت از مسئولان مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

گروه بندی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب دایس و روش UPGMA نمودند. بر اساس تجزیه خوشه-ای اکوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند، که پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. که ممکن است علت این موضوع جدایی منشاء جغرافیایی ژنوتیپ‌ها یا ایجاد و تجمع جهش‌های ژنتیکی مجزا در سطح ژنوم باشد که باعث ایجاد تنوع در آنها نسبت به یکدیگر شده است. در حالی که در تعداد دیگری از ژنوتیپ‌ها چنین تطابق دیده نشده که این امر می‌تواند به دلیل منشاء مشترک، مهاجرت و انتقال باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با دیاگرام حاصل از پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس مقدار مختصات اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت نشان داد. در نهایت بر اساس تجزیه واریانس مولکولی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشاهده شد. Celka و همکاران (۷) در بررسی روابط ژنتیکی میان ۲۴ گونه مختلف پنیرک با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و ISJ، از تجزیه واریانس مولکولی به منظور بررسی سهم تنوع در درون و بین گونه‌ها استفاده نمودند. همچنین Gajera و همکاران (۹) تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ گونه گیاهی در معرض خطر *Mangifera indica* را با استفاده از ۲۱ آغازگر ISSR بررسی کردند و با استفاده از داده‌های مولکولی اقدام به گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نمودند. طبق بررسی‌های انجام شده، تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پنیرک مورد مطالعه وجود داشت و از آنجا که این اکوتیپ‌های نماینده توده‌های پنیرک موجود در بانک ژن می‌باشند لذا در بین کل اکوتیپ‌های موجود در بانک ژن نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای

منابع

- ۱- زرگری، ع.، (۱۳۸۷). گیاهان دارویی جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۱۸۱۰، صفحه ۳۵۰-۳۵۲
- ۲- محسن فرشادفر، ف.، شیروانی، ه.، امجدیان، م.، قلی پور، م. ۱۳۹۷. مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، (زودآیند).
- ۳- محسن فرشادفر، ف.، شیروانی، ه.، امجدیان، م.، نوریان، م.ع. ۱۳۹۷. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گونه مریم نخودی (*Teucrium polium*) در غرب ایران با استفاده از نشانگر

ایران، (زودآیند).

مولکولی SCoT. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی

- 4- Altıntas, S., F. Toklu, S. Kafkas, B. Kilian, A. Brandolini and H. O. Zkan. (2008). Estimating Genetic Diversity in Durum and Bread Wheat Cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL Markers. *Plant Breeding* 127: 9-14.
- 5- Awasti, A K., Nagaraja, GM., Naik, Gv., Kanginakludru, S., Tangavelu, K. and Nagaraja, J. (2004) Genetic diversity and relationships in mulbert (genus Mours) as revealed by RAPD and ISSR marker assays *Bio Medical Central Genetics* 5: 1471- 2156.
- 6- Azimova, S.S. & Glushenkova A.I. (Eds.), (2012), *Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources*. Springer, Tashkent, Republic of Uzbekistan, 609-633.
- 7- Celka, Z., Szczecińska, M. and Sawicki, J. (2010). Genetic relationships between some of Malva species as determined with ISSR and ISJ markers. *Biodiversity Research and Conservation*. 19(1): 23–32.
- 8- Domblides, A. S., E. A.Domblides., V. A. Kharchenko. and G. A. Potekhin. (2010). Study of Genetic Variation Among Parsley (*Petroselinum Crispum* (Mill.) Nym.) Samples Using RAPD and ISSR Markers. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.*, 65(4): 142-154.
- 9- Gajera, H. P., R. S. Tomar., S. V. Patel., R. R. Viradia. and B. A. Golakiya. (2011). Comparison of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among different endangered *Mangifera indica* genotypes of Indian Gir forest region. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 10: 1000-1007.
- 10- Hammad, I. (2009). Genetic Variation among *Hibiscus Rosa-sinensis* (Malvaceae) of Different Flower Colors Using Issr and Isozymes, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1): 113-125,
- 11- Hou, Y., Z. Yan and Y. Wei. (2005). Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis *Barely. Genetics Newsletter* 35:9-22.
- 12- Kumar J, Kumar Gupta P (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reporats Journal* 2: 93-112.
- 13- Kumar, M., G. P. Mishra, R. Singh, J. Kumar, P. K. Naik and Sh. B. Singh.(2009). Correspondence of ISSR and RAPD Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity among Different Apricot Genotypes from Cold Arid Deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15(3): 225-236.
- 14- Ma yanming, L., H. Wang. and F. Han. (2008). Evaluation of cumin germplasm by ISSR markers. *Xinjiang Agriculture Science.*, No 45.
- 15- Mardi, M., A. Taleei, and M. Omid. (2003). Study on genetic variation and yield Components Indies type chickpea. *Iranian Journal of Agricultural Science* 34: 345-351.
- 16- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- 17- Rajaram, S. (2010). International wheat breeding. *The Proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress: Crop Production*, Pp: 225-238.
- 18- Samavati, V. & Manoochehrizade, A., (2013), Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti -oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 427–436.
- 19- Shale, TL., Stirk, W.A., and Staden, J.V. (2005). Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds, *Journal of Ethnopharmacology.*, 96: 325–330.
- 20- Singh, S.K. (2003). Cluster analysis for heterosis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Genetics*. 63(3):249-250.
- 21- Solimani, V.D., Baum, B. R., and Jahason, D.A. (2002). AFLP and pedigree based genetic diversity estimates cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104:350-357.
- 22- Stachel, M., Lelley, T., Grausgruber, H., and Vollmann, J. (2000). Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:242–248.
- 23- Thimmappaiah W, Santhosh G, Shobha D, and Melwyn, GS. (2008). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sciatica Horticulture* 118: 1-7.
- 24- Torres, A.M., NF. Weeden and A. Martin. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and

- RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics 85: 935–945.
- 25- Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jackson, M.T., and Newbury, H. J. (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, 74: 170-179.
- 26- Zahid, N. Y., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. and Ahmad, Z. (2009) Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare*. Germplasm in Pakistan assessed By RAPD markers. *Pakistan Journal of Botany* 41(4): 1759-1767.
- 27- Zietkiewicz, E., Rafalski, A, and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Genetic variability of *Malva neglecta* ecotype using ISSR molecular markers

Noorian A.M.,^{1*} Shirvani H.²

¹ Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In this research, the genetic diversity of 18 *malva* (*Malva neglecta*) from the gene bank of forests and rangelands was evaluated. DNA extraction was performed using CTAB method, and genetic variation was investigated with 15 ISSR markers. All of the ISSR primers showed 99 visible bands in which four bands were similar patterns. The IS5 and IS6 primers had the most number of bands with 12 and 11 bands respectively, while UBC807 and UBC867 with two bands showed the least band numbers. The Polymorphic information content (PIC), marker index (MI), EMR and RP indices were calculated for all primers. With this point of view, IS5 and IS6 were the best primers to identify variability among these *Malva*. Total genetic similarity based on these primers was 69 percent. The greatest genetic similarity was between G4 with G9 ecotype. The lowest genetic distance was between G1 and G9 ecotype. Cluster analysis based Jakard coefficient by UPGMA was classified all genotype to tree groups and this clustering was confirmed by principal coordinate (PCo) and analysis of molecular variance (AMOVA). Portion of between group variance was just 29 percent of total variance.

Key words: Genetic variability, Molecular marker, ISSR, *Malva*