مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

گوناگونی ژنتیکی و ساختار جمعیتی در توده‌های بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) غرب کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR

آرمان سلیمی[۱]، علی عزیزی[۲*]، منصوره توان[۳] و زهرا کریمی[۴]

چکیده

در مطالعه حاضر هفت جمعیت بومي گیاه بن‌سرخ (مجموعاً ۷۰ نمونه) از سه استان غرب ایران مورد مطالعه قرار گرفت. از نشانگرهاي مولکولي ISSR جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکي و ساختار جمعیت بن‌سرخ استفاده شد. از تعداد ۱۴ آغازگر بکار برده شده در این مطالعه ۹۴ باند با وضوح بالا بدست آمد (با میانگین ۶/۷ باند برای هر آغازگر) که از آنها ۸۴ باند (۹۱/۴ %) چند شکل بودند. تجزیه‌ي خوشه‌اي بر پایه ماتریس تشابه ژنتیکي جاکارد و با روش UPGMA، نمونه‌هاي بن‌سرخ را به ۸ گروه تقسیم نمود. تجزیه به مختصات اصلي (PCOA) نتایج تجزیه خوشه‌اي را تا حد زیادي تأیید نمود. مقدار تشابه ژنتیکی نمونه‌ها در دامنه‌ای از صفر تا ۰/۷۵ بدست آمد. بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۷۵) مربوط به دو نمونه از جمعیت سقز و کمترین (صفر) متعلق به یک نمونه از جمعیت اراک با دو نمونه از جمعیت مهاباد مشاهده شد. در بررسي ساختار ژنتیکي جمعیت‌ها با استفاده از نرم افزار STRUCTURE جمعیت‌ها به چهار زیرجمعیت تقسیم شدند. آغازگر IS5 با شاخص نشانگری (MI)، ۲/۴۱، آغازگر IS24 با قدرت تفکیک (Rp)، ۶/۴۹ و آغازگر IS20 با میانگین اطلاعات چند شکل (PIC)، ۰/۳۶ به عنوان آغازگرهای برتر در این مطالعه شناخته شدند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نشانگر ISSR یک روش کارآمد و قدرتمند مولکولي در پیمایش تنوع ژنتیکي گیاه بن‌سرخ مي‌باشد. یافته‌هاي این پژوهش مي‌تواند در برنامه‌هاي به‌نژادی بن‌سرخ در آینده به ویژه روش‌های مبتنی بر تلاقی استفاده شود.

واژه‌هاي کلیدي: بن سرخ (*Allium jesdianum*)، تنوع ژنتیکي، ساختار جمعیت، نشانگر مولکولي ISSR

---

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
[۲] * نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان. ایمیل: azizi@basu.ac.ir
[۳] دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

مقدمه

گیاه بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) متعلق به خانواده‌ی پیازی‌ها (Alliaceae) است. این گیاه از سبزی‌های وحشی، پیازی و بومی ایران می‌باشد. بن‌سرخ دارای ۲ الی ۳ برگ بوده و در ارتفاعات ۱۸۰۰ تا ۲۶۰۰ متری زاگرس می‌روید (Ebadi et al., 2011). از بخش‌های هوایی آن برای درمان دردهای شکمی، روماتیسم و سنگ کلیه استفاده می‌شود. استروئیدهای موجود در پیاز آن اثرات بازدارنده علیه سلول‌های توموری بدخیم از خود نشان داده است (Vahdani et al., 2011). علاوه بر کاربرد دارویی، از این گیاه در طبخ غذا هم استفاده می‌شود. از ترکیبات عمده‌ی موجود در عصاره این گیاه کورزرنون و کورزن می‌باشند. اثرات ضد میکروبی این گیاه احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات سولفیدی و ترپنوئیدی است (Ebadi et al., 2011). امروزه با توجه به جایگاه گیاهان دارویی در بسیاري از کشورهاي پیشرفته و درحال توسعه از نظر بهداشت و سلامت جامعه، تمایل براي استفاده از این گیاهان همواره مورد توجه مراکز علمی و تحقیقاتی قرار گرفته است. از این رو روش‌هاي بیوتکنولوژي همانند بسیاري از حوزه‌هاي علوم زیستی در شناسایی سریعتر و دقیقتر اکوتیپ‌هایی که ماده موثره بیشتری تولید می‌کنند، همچنین افزایش عملکرد و کیفیت گیاهان دارویی، تولید صنعتی متابولیت‌های گیاهی و همچنین سودآوري از لحاظ تجاري کاربرد گسترده‌اي پیدا کرده است (زاجی و همکاران، ۱۳۸۸).

در کشاورزي امروزه بیوتکنولوژي، علاوه بر تسهیل ریز-افزایی سریع گونه‌های گیاهی از طریق کشت سلول و بافت و دستکاری ژنتیکی گونه‌های گیاهی (با وارد کردن صفات جدید)، همچنین از طریق نشانگرهای مولکولی توانسته به شناسایی گیاهان دارویی اصلی از جعلی و بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی به ویژه آنهایی که در معرض خطر انقراض هستند، کمک شایانی بنماید. تنوع ژنتیکی در گیاهان و جمعیت‌هاي گیاهی از نظر کاربردي مورد توجه است. کشاورزي و تولید غذا بستگی به استفاده از ژنوتیپ-هاي گیاهی پرمحصول دارد و روش‌هاي متداول اصلاح گیاهان زراعی براساس گزینش ژنوتیپ‌هاي مطلوب، از بین تنوع ژنتیکی موجود و دست‌ورزي همه یا تعدادي از صفات ممکن و مورد علاقه در یک ژنوتیپ به منظور تولید یک واریته تجاري می‌باشد. جهت بررسي تنوع ژنتیکي مي توان از انواع نشانگرها استفاده کرد. نشانگرهاي مورفولوژیکی به دلیل کم بودن تعداد و نیز متأثر شدن از محیط با محدودیت مواجه هستند (Hashemi et al., 2009). نشانگر مولکولی، توالی خاصی از DNA است که به راحتی آشکار می‌شود و توارث آن به سادگی قابل رویت است. استفاده از نشانگرهاي مولکولی، مبتنی بر چندشکلی طبیعی در DNA می‌باشد (فارسی و باقري، ۱۳۸۶). این نشانگرها که براساس مطالعه مستقیم تفاوت‌هاي موجود در بین توالی DNA قابل بررسی هستند، به عنوان اساسی‌ترین و مفیدترین ابزار براي شناسایی تفاوت‌هاي موجود در بین موجودات زنده مورد مطالعه شناخته می-شوند. همچنین با استفاده از نشانگرهاي مولکولي امکان شناسایي و جداسازي ژن‌هاي مسئول در مراحل مختلف چرخه هاي متابولیت ثانویه در گیاهان دارویي وجود دارد (Kumar and Kumar Gupta, 2008). از این بین، نشانگرهای توالی‌هاي تکراري ساده داخلی (ISSR) بطور گسترده‌اي در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (شهریاری احمدي و همکاران، ۱۳۹۱). ISSR یک روش بر پایه ریزماهواره‌ها است که به اطلاعات اولیه در زمینه ژنوم و طراحی آغازگرها نیاز ندارد. این نشانگر که از سال ۱۹۹۴ به نام ISSR معرفی شد (Reddy et al., 2000)، نیمه تصادفی بوده و در حضور یک آغازگر مکمل نسبت به ریزماهواره هدف، تکثیر می-یابد (Reddy et al., 2000؛ Schlötterer, 2002). این تکنیک شامل تکثیر قطعات DNA موجود در فواصل قابل تکثیر بین دو ناحیه تکرار ریزماهواره‌ای است که در دو جهت مختلف قرار گرفته‌اند (Mezzena et al., 2001). در کاربرد این نشانگر از ریزماهواره‌هایی به طول ۳۵ تا ۶۶ باز به عنوان آغازگرها استفاده می‌شوند که در یک

واکنش PCR مکان‌هاي ژنومی متعددي را مورد هدف قرار می‌دهند. این نشانگرها می‌توانند در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی ژنتیکی، زیست‌شناسی تکاملی، نشانمند کردن ژن و انتخاب به کمک نشانگر و نیز مشخص کردن فراوانی توالی‌هاي ریزماهواره‌اي استفاده شوند (Goulao et al., 2001 ؛ جبارزاده، ۱۳۹۰).

Hao و همکاران (۲۰۰۲) از نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی روابط بین شش گونه از آلیوم‌ها استفاده کردند. طی پژوهشی فخرشاهی و همکاران (۱۳۹۱) از نشانگر ISSR براي بررسي رابطه پراکندگي جغرافیایي و ژنتیکي سیر استفاده کردند، براي این منظور ۲۲ توده مختلف از سراسر ایران (شامل ۲ توده وارداتي با منشاء چیني و پاکستاني) جمع آوري و DNA آنها استخراج گردید. تکثیر قطعات ژني با استفاده از ۲۲ پرایمر مختلف اختصاصي جنس *Allium* صورت گرفت. نتایج الکتروفورز با استفاده از نرم افزار TotalLab، بررسي و ۱۸۱ باند که داراي وضوح بسیار بالایي بودند انتخاب شدند. ۲۲ توده مختلف در ۲۱ گروه مختلف طبقه بندي شدند. تنوع مشاهده شده ۱/۵۲ درصد و تشابه توده‌ها بین ۷/۴۳ تا ۸/۹۵ درصد تعیین و رابطه بین پراکندگي جغرافیایي و ژنتیکي اکثر توده‌هاي سیر ایراني نشان داده شد.

درحال حاضر با توجه به بررسی منابع علمی، مطالعات بهنژادی و پژوهش‌های مرتبط با آن روي گیاه بن‌سرخ انجام نشده است و هیچ رقم خاصی از آن اهلی و اصلاح نگردیده است. به علاوه، به دلیل جمع‌آوري بی‌رویه آن از طبیعت توسط افراد بومی احتمال نابودي آن وجود دارد و ممکن است ذخایر ژنتیکی آن در رویشگاه‌های طبیعی کم و کمتر شود و در نهایت از بین برود. با توجه به وجود توده‌هاي متفاوت و همچنین نمونه‌هاي ژنتیکی مختلف در درون یک توده که در اقلیم‌هاي مختلف کشور می‌رویند، به نظر می‌رسد که تفاوت‌هایی از نظر ژنتیکی و به تبع آن تفاوت‌هایی در صفات رشدی، مقاومت به تنش‌ها و نیز در میزان اسانس و مواد موثره و غیره در بین آنها وجود داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف بن‌سرخ با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می‌باشد، به دنبال تعیین تنوع ژنتیکی می‌توان از جمعیت‌های مختلف به عنوان والدین در تلاقی-ها استفاده نمود.

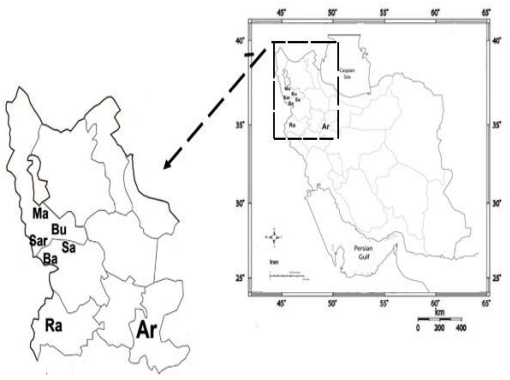
مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

جهت اجرای این پژوهش تعداد هفت توده (هر کدام ۱۰ فرد)، مجموعا ۷۰ نمونه بن‌سرخ (جمع‌آورد شده از ۴ استان غرب و شمال غربی کشور) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). همچنین در شکل ۱ موقعیت رویشگاه‌های نمونه برداری شده روی نقشه ایران مشخص شده است. نمونه‌ها از هفت شهرستان با حداقل فاصله‌ی ۵۰ کیلومتر از هم جمع‌آوری شدند و جمع‌آوری نمونه‌ها در درون جمعیت با حداقل فاصله‌ی ۱۰۰ متر صورت گرفت. نمونه-گیري به این طریق انجام گرفت که پس از جدا نمودن بخش‌های مختلف گیاه، پیازها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج ماده ژنتیکي در فریزر۲۴- درجه نگهداري شدند.

جدول ۱- محل جمع‌آوری نمونه

شماره	شهرستان	استان
۱	بانه	کردستان
۲	سقز	کردستان
۳	بوکان	آذربایجان غربی
۴	مهاباد	آذربایجان غربی
۵	سردشت	آذربایجان غربی
۶	روانسر	کرمانشاه
۷	اراک	مرکزی



شکل ۱- موقعیت رویشگاه‌های نمونه برداری (Ba: بانه، Sa: سقز، Bu: بوکان، Ma: مهاباد، Sar: سردشت، Ra: روانسر، Ar: اراک)

استخراج DNA ژنومی

به منظور استخراج DNA از روش Doyle و Doyle (۱۹۸۷) با کمي تغييرات استفاده شد. جهت بررسي كميت و كيفيت DNA استخراج شده از دو روش اسپكتروفتومتري و الكتروفورز افقي روي ژل آگارز۱% استفاده گرديد.

شرايط واكنش زنجيره ای پلی‌مراز (PCR)

واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز در حجم نهايي ۲۵ ميكروليتر شامل ۱ ميكروليتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم در ميكروليتر)، ۲ ميكروليتر آغازگر با غلظت ۰/۸ ميكرومولار، ۱۶/۲ ميكروليتر آب مقطر استريل، ۲/۵ ميكروليتر بافر PCR، ۱/۵ ميكروليتر كلريد منيزيوم ۳ ميلی‌مولار، ۱/۵ ميكروليتر dNTPs ۰/۶ ميلی‌مول و ۰/۲ ميكروليتر تک DNA پلی‌مراز به اندازه ۱ واحد بود. در اين تحقيق از۳۲ آغازگر كه ساخت شركت بيونير (Bioneer) بودند استفاده گرديد و برای انتخاب دمای بهينه آغازگرها، دماهای نزديک به دمای ذوب پرايمر (TM) انتخاب شد. درجه حرارت اتصال آغازگر به طور عملی و با تكرار آزمايشات برای هر پرايمر به روش گراديانت مشخص شد (جدول ۲). واكنش زنجيره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسايكلر (Bio Rad Co., USA) انجام شد. شرايط واكنش در جدول ۳ آورده شده است. پس از انجام واكنش زنجيره‌ای پلی‌مراز، محصول واكنش در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۲% تهيه شده با بافر TBE (Tris-Boric acid-EDTA) بارگيری و به مدت ۱۵۰ دقيقه و شدت ۸۰ ولت الكتروفورز شد. پس از اتمام اين مرحله ژل جهت رنگ-آميزي به مدت ۲۰-۱۵ دقيقه در محلول اتيديوم بروماید ۰/۵ ميكروگرم بر ميلی‌ليتر قرار گرفت و سپس توسط

دستگاه ژل داکیومنتیشن قطعات تکثیر یافتهي DNA تحت نورUV مشاهده و عکس برداري از ژل صورت گرفت.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهاي مورد استفاده

ردیف	کد آغازگر	توالي آغازگر (´۳ - ´۵)	دماي بهینه اتصال (درجه سانتي گراد)
۱	IS1	CTCTCTCTCTCTCTCTG	-
۲	IS2	GACGACGACGACGACC	۵۷
۳	IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC	-
۴	IS4	CACACACACACACACACAG	۶۲
۵	IS5	ACACACACACACACACACG	۵۲
۶	IS6	ACACACACACACACACACC	۶۱
۷	IS7	ACGACGACGACGACGG	-
۸	IS8	ACGACGACGACGACGC	۳۹
۹	IS9	TCGTCGTCGTCGTCGG	-
۱۰	IS10	TCGTCGTCGTCGTCGC	۵۲
۱۱	IS11	ACACACACACACACACG	-
۱۲	IS12	CACACACACACACACART	-
۱۳	IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۵۴
۱۴	IS14	AGAGAGAGAGAGAGAGC	-
۱۵	IS15	ACACACACACACACACYG	-
۱۶	IS16	AGAGAGAGAGAGAGAGT	-
۱۷	IS17	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۵۶
۱۸	IS18	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	۵۲
۱۹	IS19	BDBTCCTCCTCCTCCTCCTCC	-
۲۰	IS20	HVHTCCTCCTCCTCCTCCTCC	۶۳
۲۱	IS21	AGAGAGAGAGAGAGAGRC	-
۲۲	IS22	TCCTCCTCCTCCTCCYR	-
۲۳	IS23	CTCCTCCTCCTCCTCRC	۵۶
۲۴	IS24	ACACACACACACACACT	۵۶
۲۵	IS25	GACAGACAGACAGACA	-
۲۶	UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	-
۲۷	UBC-849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	-
۲۸	UBC-850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	۵۹
۲۹	UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	-
۳۰	UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	۵۲
۳۱	UBC-878	GGATGGATGGATGGAT	-
۳۲	UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA	-

محاسبات آماری

براي نوارهاي ايجاد شده به حضور باند عدد يک و عدم حضور باند عدد صفر داده شد تا ماتريس داده‌ها تهيه گردد. ماتريس تشابه با استفاده از ضريب جاكارد، تجزيه‌ي خوشه‌اي و رسم دندروگرام بر اساس ضرايب تشابه جاكارد و با استفاده از مدل (SAHN) و روش (UPGMA) محاسبه گرديد. رسم الگوي دو بعدي پراكنش ژنوتيپ‌هاي مختلف بر اساس ۲ عامل اصلي حاصل از داده‌هاي ISSR (تجزيه به مختصات اصلی، PCOA)، و به وسيله نرم‌افزار (NTYSYS-PC,Ver. 2.01) محاسبه شد. آناليز ساختار ژنتيكي و منشأ جمعيت‌ها با نرم‌افزار (STRUCTURE ver 2.3.3) و با استفاده از الگوريتم زنجيره‌اي ماركوو- مونت كارلو(MCMC) انجام گرديد. در اين نرم افزار هر فرد در يک زير جمعيت (K) قرار مي‌گيرد كه با محاسبه احتمالات براي $Pr(X \mid K)\, K_r$ يا L(K) در يک مدل تركيبی از K= ۱ تا K=۱۰ تعداد خوشه‌ها محاسبه شده و اجازه مقايسه پتانسيل باز تركيبي بين خوشه‌بندي‌هاي حاصله را مي‌دهد. براي محاسبه هر K، ۷۰۰۰۰ تكرار و به دنبال آن ۳۰۰۰۰ دور آزمايش در ۱۰ اجرا به صورت كامل انجام شد. استنتاج تعداد زير جمعيت‌ها بر طبق روش Evanno و همكاران (۲۰۰۵) و با استفاده از ميزان تغييرات لگاريتم احتمال $(\Delta K)K$ به ارزش‌هاي بهينه K انجام شد.

جدول ۳- برنامه واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز

مرحله	درجه حرارت(C °)	زمان مورد نياز	تعداد چرخه
واسرشته سازي اوليه	۹۴	۵ دقيقه	۱
واسرشته سازي	۹۴	۱ دقيقه	۳۷
اتصال آغازگر	(۶۸-۳۹)- بسته به توالي آغازگر	۷۵ ثانيه	۳۷
DNAبسط	۷۲	۲دقيقه	۳۷
بسط نهايي	۷۲	۷ دقيقه	۱
دماي نگهداري	۴	$+\infty$	-

نتايج و بحث

از ۳۲ آغازگر به كار گرفته شده در اين مطالعه، ۱۸ آغازگر قادر به توليد باند نبودند. از ۱۴ آغازگر ديگر براي بررسي تنوع ژنتيكي جمعيت‌ها استفاده شد. انتخاب باندهاي چند شكل براي تجزيه و تحليل بر اساس خصوصيات باندها نظير درجه وضوح و تكرار پذيري آنها صورت گرفت. در اين پژوهش آغازگرها باندهايی با اندازه طولي ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تكثير نمودند، كه ۱۰ آغازگر ۱۰۰ درصد چند شكلي را نشان دادند و آغازگر IS10 كمترين درصد چند شكلي (۵۰%) را نشان داد. در مجموع ۹۴ باند حاصل گرديد كه ۸۴ تاي آن (۹۱/۴%) چند شكل بودند. بيشترين قطعه‌ي تكثير شده (عدد۱۰) با استفاده از پرايمر IS5 و كمترين قطعه‌ي تكثير شده (عدد ۴) پس از كاربرد پرايمرهای IS18 و IS20 به دست آمد (جدول ۴). ميانگين شاخص نشانگري در جمعيت‌هاي مورد مطالعه ۱/۵۲ به‌دست آمد كه بيشترين آن (۲/۴۱) در پرايمر(IS5) و كمترين آن (۰/۹۷) در پرايمرIS4 مشاهده شد. قدرت تفكيک بين ۱/۲۳ براي IS4 تا ۶/۴۹ براي IS24 و ميانگين قدرت تفكيک تمام نشانگرها ۳/۶۵ به دست آمد (جدول۴). براي هر پرايمر ميانگين نسبت جمعيت‌هاي داراي باند حاوي اطلاعات (mp) و ميانگين تعداد باند حاوي اطلاعات (mIb) نيز در جدول ۴ آورده شده است. اطلاعات چند شكل (PIC) با استفاده از فراواني آللي براي هر آغازگر به طور جداگانه محاسبه گرديد. بالاترين مقدار PIC، (۰/۳۶) مربوط به آغازگر IS20 بود و كم‌ترين آن هم

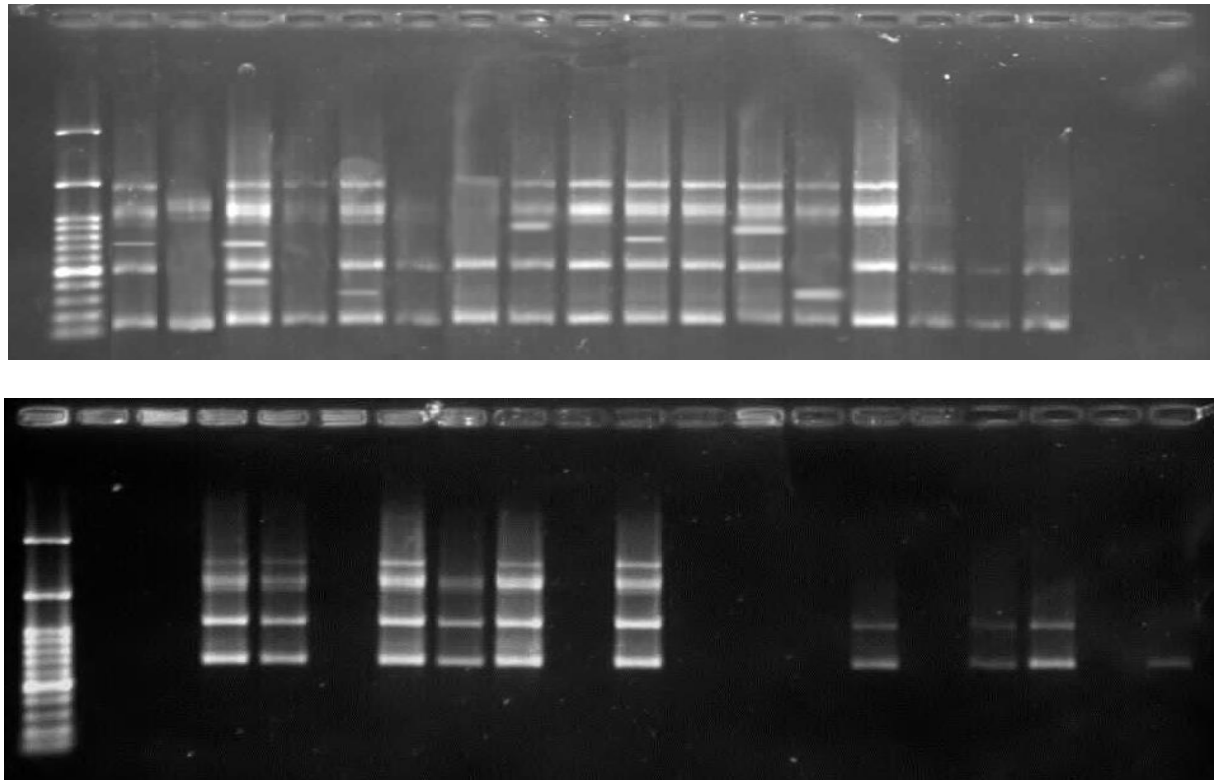
براي آغازگر IS4، (۰/۱۶) محاسبه شد (جدول ۴). الگوي باندي حاصل از تكثير DNA ژنومي پرايمر (UBC868) در شكل۲ آورده شده است. نشانگر ISSR در اين مطالعه درصد بالايي از چند شكلي را نشان داد كه اين نشانه‌ي كارايي بالاي اين نشانگر در بررسي تنوع ژنتيكي مي‌باشد.

اين نتايج با بررسي‌هايي كه با استفاده از نشانگر ISSR بر روی جنس‌های آلیوم صورت گرفت تطابق دارد (Mukherjee et al., 2013) و با نتايج Chen و همكاران (۲۰۱۴) بر روی *Allium sativum* نيز تا حدود زيادی مطابقت دارد.

جدول ۴- نتايج و شاخص های بدست آمده برای هر يک از آغازگرهای ISSR

پرايمر		n	np	% P	mp	mIb	Rp	mPIC	MI
IS2	GACGACGACGACGACC	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۱	۰/۶۲	۴/۳۱	۰/۳۳	۲/۳۰
IS4	CACACACACACACACACAG	۶	۶	۱۰۰	۰/۱۰	۰/۲۰	۱/۲۳	۰/۱۶	۰/۹۷
IS5	ACACACACACACACACACG	۱۰	۸	۸۰	۰/۳۷	۰/۷۳	۵/۸۶	۰/۳۰	۲/۴۱
IS6	ACACACACACACACACACC	۷	۵	۷۱/۴	۰/۴۲	۰/۸۵	۴/۲۳	۰/۳۱	۱/۵۶
IS8	ACGACGACGACGACGC	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۹	۰/۷۸	۵/۴۶	۰/۱۹	۱/۳۱
IS10	TCGTCGTCGTCGTCGC	۸	۴	۵۰	۰/۴۸	۰/۹۶	۳/۸۶	۰/۲۹	۱/۱۶
IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۶	۶	۱۰۰	۰/۱۵	۰/۲۹	۱/۷۴	۰/۲۰	۱/۱۸
IS17	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۶	۶	۱۰۰	۰/۱۷	۰/۳۴	۲/۰۳	۰/۲۳	۱/۴۰
IS18	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	۴	۴	۱۰۰	۰/۴۱	۰/۸۳	۳/۳۱	۰/۳۰	۱/۲۱
IS20	HVHTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۱	۰/۶۲	۲/۴۹	۰/۳۶	۱/۴۴
IS23	CTCCTCCTCCTCCTCRC	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۲	۰/۴۳	۲/۶۰	۰/۲۷	۱/۶۲
IS24	ACACACACACACACACT	۹	۷	۷۷/۸	۰/۴۶	۰/۹۳	۶/۴۹	۰/۱۹	۱/۳۴
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	۷	۷	۱۰۰	۰/۱۶	۰/۳۳	۲/۲۹	۰/۲۵	۱/۷۶
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۶	۰/۷۱	۵	۰/۲۳	۱/۶۰
Total		۹۴	۸۴						
Average		۶/۷	۶	۹۱/۴			۳/۶۵	۰/۲۶	۱/۵۲

تعداد باند تكثير شده (n)، تعداد باند تكثير شده‌ي چند شكل (np)، درصد چندشكلي (P%)، باند حاوي اطلاعات(mp)، ميانگين تعداد باند حاوي اطلاعات (mIb)، قدرت تفكيك(Rp)، ميانگين اطلاعات چند شكل (PIC)، شاخص نشانگري(MI).

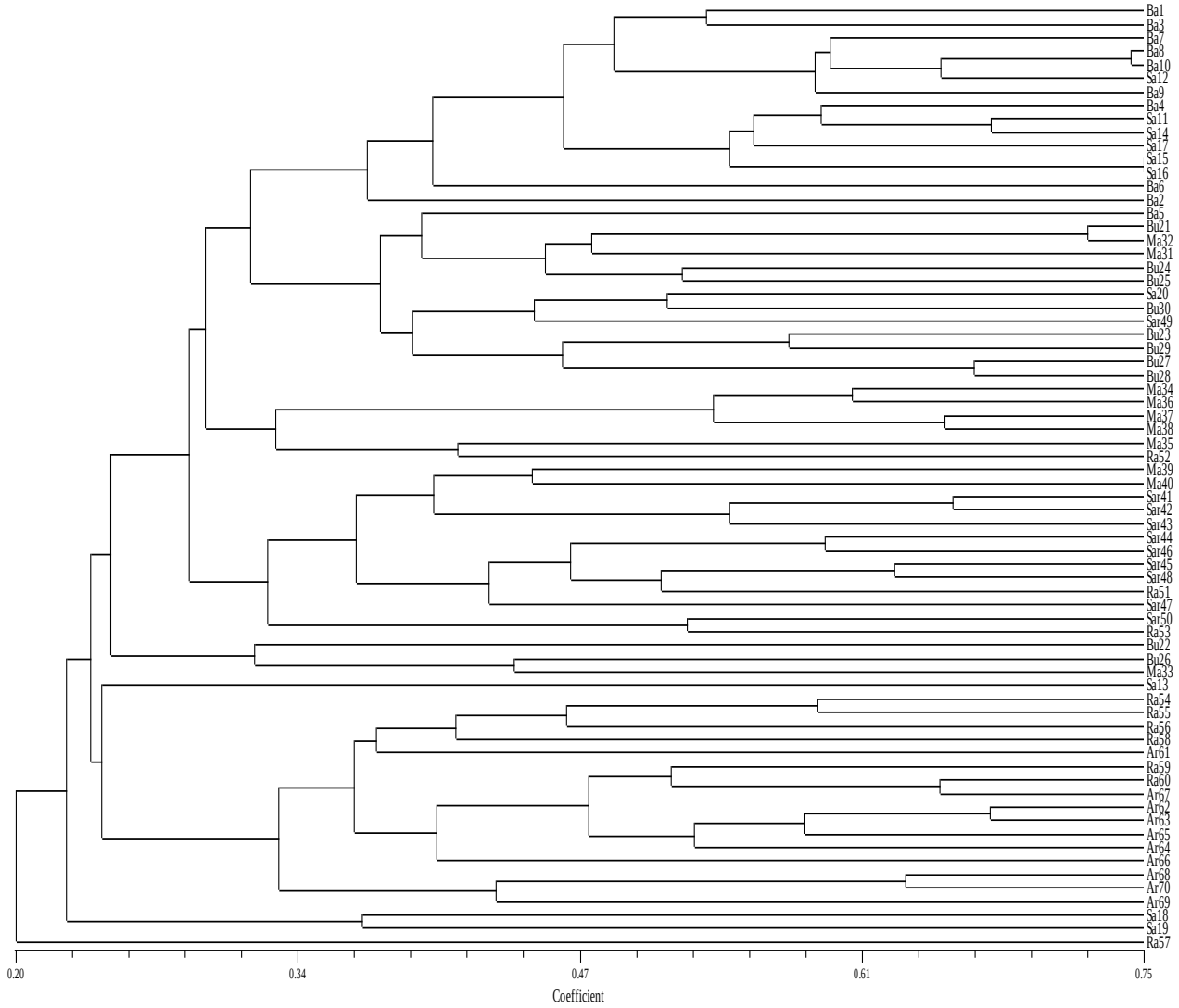


شکل ۱- الگوي باندي حاصل از تکثیر DNA ژنومي جمعیت‌هاي بن سرخ توسط آغازگرUBC868

آغازگرهاي با بیشترین PIC قادر به شناسایي بهتر فاصله ژنتیکي توده‌ها هستند. همچنین آغازگرهاي با MI بالا بیشترین پتانسیل را در تولید باند دارند (Powell *et al.*, 1996). شاخص نشانگري (MI) و قدرت تفکیک (Rp) محاسبه شد تا توانایي نشانگرهاي ISSR را، در تمایز جمعیت‌هاي بن‌سرخ نشان دهد. در این مطالعه بیشترین شاخص نشانگر براي IS5 به دست آمد که نشان مي‌دهد این آغازگر بیشترین چند شکلي را تولید کرده است.

مقدار تشابه ژنتیکي ژنوتیپ‌ها در دامنه‌اي از صفر تا ۰/۷۵ بود. بیشترین شباهت ژنتیکي (۰/۷۵) بین دو نمونه Sa16و Sa15 مشاهده گردید که هر دو متعلق به جمعیت سقز بوده و بعد از آن متعلق به دو نمونه از جمعیت بانه Ba10 وBa8 (۰/۷۴) می‌باشند. کمترین شباهت ژنتیکي که برابر صفر بود متعلق به یک جمعیت از اراک (Ar66) با دو جمعیت از مهاباد (Ma39,40) بود و بعد از آن کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۰۲) متعلق به یک جمعیت از مهاباد با یک جمعیت از سردشت (Ma40 باSa13) و یک جمعیت از اراک با یک جمعیت از روانسر (Ar66 با Ra53) مشاهده شد.

بر اساس نتایج حاصل از دندروگرام (شکل ۳)، جمعیت های مورد مطالعه به ۸ گروه مجزا در سطح تشابه ۰/۳۱ تقسیم شدند. درگروه اول گیاهان متعلق به ۵ جمعیت قرار گرفته‌اند. در گروه دوم و گروه پنجم ۳ نمونه از سقز به تنهایی قرار گرفته و مابقی به طور پراکنده در گروه اول به همراه ۴ جمعیت دیگر قرار گرفته است. نیمی از جمعیت مهاباد به همراه یک نمونه از روانسر در گروه دوم جای دارد. برخی از افراد جمعیت مهاباد در گروه ۱ و۳ قرار دارند که در ۳ گروه نزدیک به هم می باشند. در گروه سوم نمونه‌هایی از روانسر و سردشت مشاهده می‌شود. نیمی از جمعیت روانسر در گروه ششم و یک نمونه به تنهایی در گروه هشتم قرار گرفته است. اراک به تنهایی در ۲ زیر شاخه در گروه ششم قرار گرفته است، تنها بعضی از نمونه‌های روانسر در این گروه قرار دارد.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل باندهاي ISSR در جمعیت‌های بن‌سرخ با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد (Ba: بانه، Sa: سقز، Bu: بوکان، Ma: مهاباد، Sar: سردشت، Ra: روانسر، Ar: اراک)

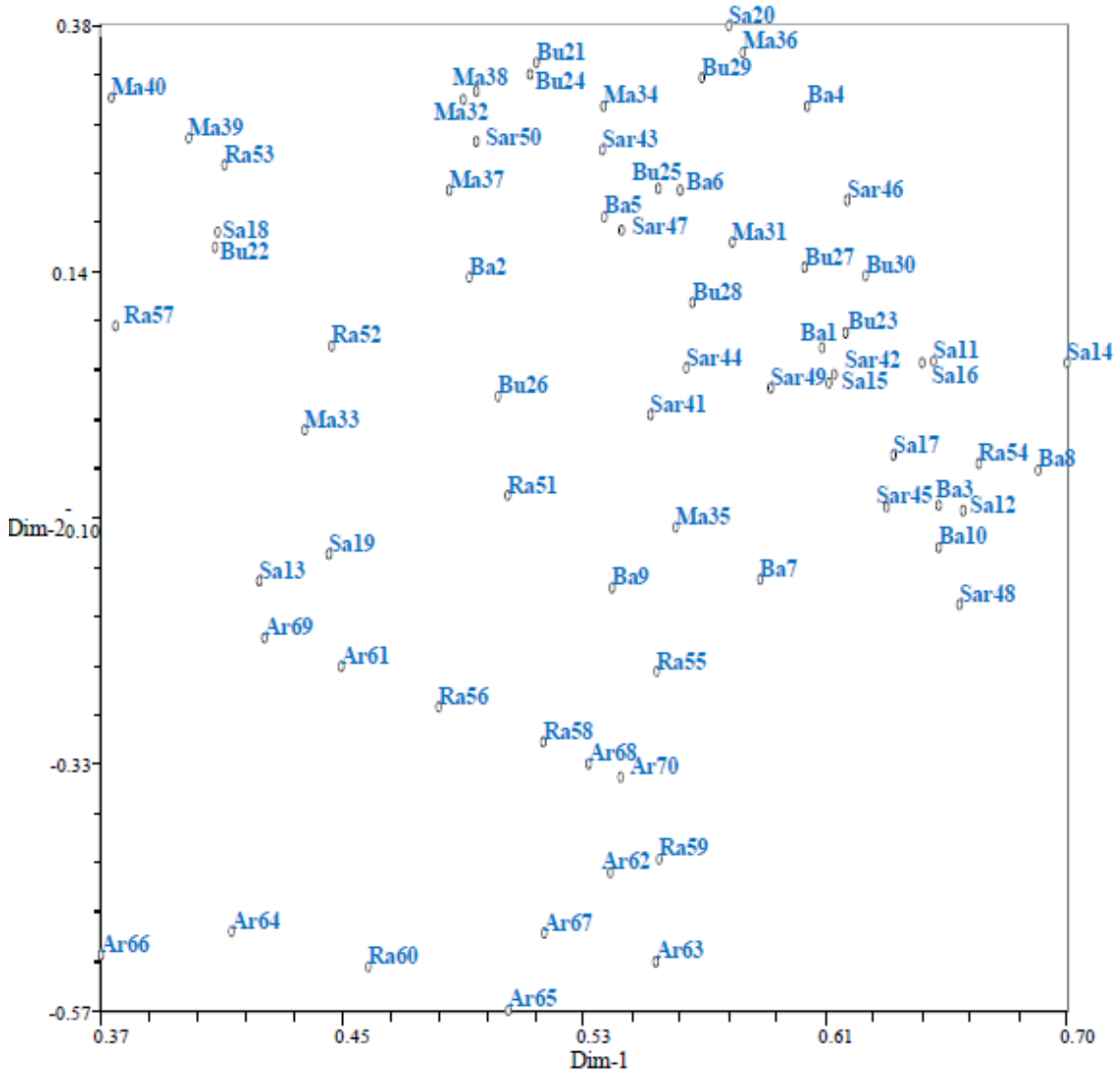
با استفاده از داده‌هاي حاصل از نشانگر ISSR مي‌توان تجزیه به مختصات اصلي(PCOA) را نشان داد. داده‌هایي که مقادیر ویژه‌ي بالاي ۱ داشتند در ۱۵ عامل قرار گرفتند. اولین مؤلفه بیشترین تغییرات (۲۹/۸۹%) را نسبت به سایر مؤلفه‌ها توجیه مي‌کند و مؤلفه‌ي دوم حدود (۶/۴%) تغییرات را توجیه مي‌کند (جدول ۵).

جدول ۵- مقادیر ویژه و میزان توجیه تغییرات توسط هر مؤلفه

مؤلفه‌ی اصلی	مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
۱	۲۰/۹۲	۲۹/۸۹	۲۹/۸۹
۲	۴/۵	۶/۴	۳۶/۳۲
۳	۳/۴۵	۴/۹	۴۱/۲۵
۴	۲/۵۹	۳/۷۱	۴۴/۹۶
۵	۲/۳۳	۳/۳۳	۴۸/۳۰
۶	۱/۸۲	۲/۶	۵۰/۹۱
۷	۱/۷	۲/۴۷	۵۳/۳۹
۸	۱/۶۳	۲/۳۴	۵۵/۷۳
۹	۱/۴۴	۲/۰۶	۵۷/۸۰
۱۰	۱/۳۲	۱/۸۹	۵۹/۶۹
۱۱	۱/۲۳	۱/۷۶	۶۱/۴۶
۱۲	۱/۱۷	۱/۶۷	۶۳/۱۴
۱۳	۱/۱۶	۱/۶۶	۶۴/۸
۱۴	۱/۰۷	۱/۵۳	۶۶/۳۴
۱۵	۱/۰۱	۱/۴۴	۶۷/۷۹

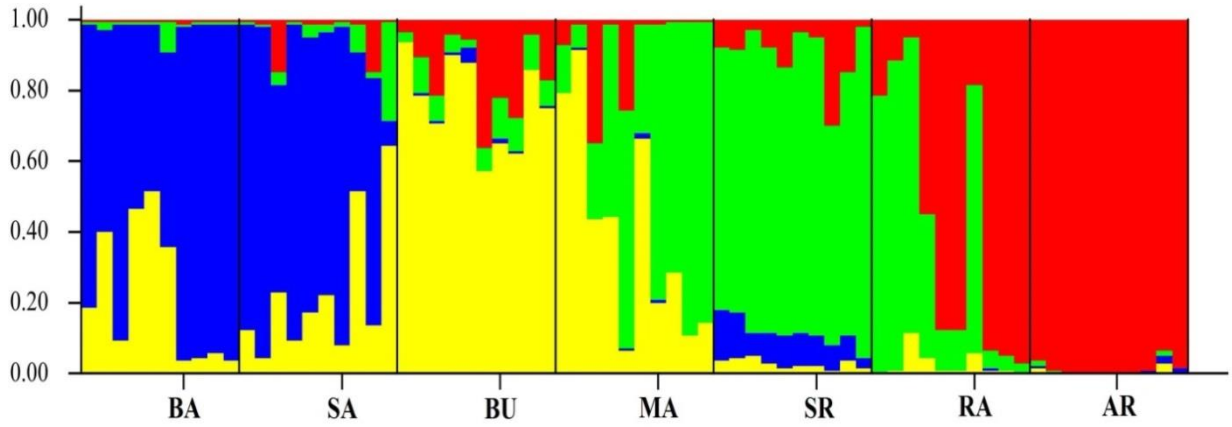
از تجزیه به مختصات اصلي مي‌توان براي نمايش دو بعدي پراکنش افراد استفاده کرد. اين درحالي است که بيشتر موارد در صفات کمي به خصوص هنگامي که صفات همبستگي زيادي داشته باشند، دو تا سه مولفه اول بيش از ۹۰ درصد تغييرات را توجيه ميکنند. در داده‌هاي نشانگرهاي مولکولي امکان توجيه مقادير بيشتر واريانس متغيرهاي اوليه توسط چند مولفه اصلي ابتدايي وجود ندارد (Mohammadi and Prasanna, 2003).

علاوه بر تجزیه خوشه‌ای از تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) بر اساس داده‌های مولکولی نیز برای بررسی گروه‌بندی نمونه‌ها استفاده شد (شکل۴)، که پراکنش و توزیع نمونه‌ها را براساس ۲ مؤلفه اول و دوم ارائه نموده است. توزیع نمونه‌ها در این نمودار در برخی موارد مطابق با توزیع آن‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بود. تجمع در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی بیشتر آن نمونه‌ها خواهد بود. با توجه به اینکه عامل‌های اول و دوم به ترتیب ۲۹/۸۹ و ۶/۴ (مجموعا ۳۶/۳۲) از واریانس کل را بیان کردند. لذا، عدم تطابق کامل گروه‌ها بین این دو روش قابل توجیه می‌باشد. ضریب کوفنتیک بین ماتریس تشابه و ماتریس خوشه‌بندی r = ۰/۶۸ بدست آمد که نشان می‌دهد خوشه بندی UPGMA روش نسبتاً مناسبی بوده است.



شکل ۴- نمودار دو بعدي حاصل از تجزيه به مختصات اصلي مبتني بر ماتريس تشابه جاکارد

بررسي ساختار ژنتيکي جمعيت‌ها بر اساس داده‌هاي ISSR و با استفاده از روش Evanno و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که بيشترين ميزان ΔK در مقابل تغييرات K در۴ =K به دست آمد که نشان می دهد که جمعيت‌ها در چهار گروه (زير جمعيت) قرار دارند. مطابق شکل ۵، نتايج گراف شده حاصل از آناليز Structure، جمعيت روانسر و اراک در يک گروه با رنگ قرمز جای گرفتند که شباهت ژنتيکی اين دو جمعيت را با وجود فاصله‌ی جغرافيايی آنها نشان می دهد که می توان علت آن را تبادل ژنی از طريق انتقال بذور به طور فيزيکی توسط انسان يا پرندگان دانست. مهاباد و سردشت در يک گروه با رنگ سبز و بانه و سقز در گروه ديگر با رنگ آبی قرار دارند که علت دسته-بندی اين جمعيت‌ها در اين ۲ گروه را می توان مکان-های جغرافيای نزديک به هم و با شرايط آب و هوايی شبيه به هم نسبت داد. جمعيت بوکان به تنهايی در يک گروه (زرد) قرار گرفته است.



شکل ۵- آنالیز کلاستر بندي بيزين بر اساس۴ =K، تعداد زير جمعيت‌ها در جمعيت‌هاي مختلف بن سرخ ۷۰ فرد با استفاده از داده‌هاي ISSR. هر جمعيت در نمودار افقي مشخص شده است و گروه‌ها با چهار رنگ نمايش داده شده‌اند جمعيت اراک و روانسر(رنگ قرمز)، جمعيت سردشت و مهاباد (سبز)، جمعيت سقز و بانه (آبي)، جمعيت بوکان (زرد)

نتايج حاضر با نتايج حاصل از تجزيه‌ي خوشه‌اي تا حدود زيادی مطابقت دارد. ارتباط تقريباً بالايي بين زير جمعيت-ها و توزيع جغرافيايي جمعيت‌هاي مورد مطالعه مشاهده گرديد.

برای بهره‌وری موفق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود بین گونه‌های وحشی گیاهان از جمله گیاهان دارویی اطلاع از روابط ژنتیکی آن‌ها ضروری است. همچنین بررسی این روابط ژنتیکی می‌تواند به عنوان راهنمايي براي بهره‌گيري بهتر از منابع ژنتيکی در استفاده از آن‌ها در تلاقی‌ها و جداسازي ژن‌هاي مفيد به کار رود (Alamdary *et al.*, 2012). در اين تحقيق از نشانگر مولکولي ISSR براي بررسي تنوع ژنتيکي استفاده شد و نتايج نشان داد پيمايش DNA ژنومی با استفاده از اين نشانگر، يک روش کارآمد و قدرتمند براي داده‌هاي مولکولي در بررسي تنوع ژنتيکي مي‌باشد. با اين وجود ميانگين شاخص تفکيک کنندگی تمام آغازگرهای به کار رفته در اين تحقيق نشان داد که اين آغازگرها از قدرت تفکيک کنندگی متوسطی در جهت شناسايی جمعيت‌های بن‌سرخ برخوردارند. از جمله آغازگرهای مورد استفاده در اين تحقيق می‌توان IS24، IS5 و IS20 را معرفی نمود که نسبت به ساير آغازگرها دارای برتری بودند. آغازگر IS5 با شاخص نشانگری (MI)، ۲/۴۱، آغازگر IS24 با قدرت تفکيک (Rp)، ۶/۴۹ و آغازگر IS20 با ميانگين اطلاعات چند شکل (PIC)، ۰/۳۶ به عنوان آغازگرهای برتر در اين مطالعه شناخته شدند. به علاوه در اين پژوهش مشخص شد که در مجموع ۹۴ باند حاصل گرديد که ۸۴ تاي آن (۹۱/۴%) چند شکل بودند. از ۱۴ آغازگر مورد مطالعه که قادر به توليد باند بودند، ۱۰ آغازگر ۱۰۰ درصد چند شکلي را نشان دادند که بيانگر قدرت بالاي اين پرايمرها در بررسي تنوع مولکولي و همچنين بيانگر تنوع زياد جمعيتهاي بن‌سرخ مورد بررسي در مقايسه با گياهان دارويی ديگر مي باشد. به عنوان مثال احمدوندي و همکاران (۱۳۹۰) تنوع ژنتيکی برخی توده‌هاي زيره سبز را براساس نشانگر ISSR بررسی کرده و مشاهده نمودند، ۵۷/۹۵ درصد چندشکلی در باندهاي تکثير شده توسط نشانگر ISSR بدست‌آمد، براساس تجزيه خوشه‌اي و تجزيه به مؤلفه‌هاي اصلی با استفاده از ضريب تشابه ژنتيکی جاکارد ژنوتيپ‌ها به سه گروه متمايز تقسيم شدند و بيشترين تشابه ژنتيکی بين توده‌هاي ۳۱ و ۳۷ و کمترين شباهت ژنتيکی بين توده‌هاي ۲۲ و ۳ مشاهده گرديد. بر

اساس نتایج پژوهش حاضر، دو نمونه‌ای که بیشترین فاصله ی ژنتیکی را داشتند یک نمونه از اراک با دو نمونه از مهاباد را می‌توان نام برد. داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی ISSR در نتایج حاصل از خوشه‌بندی جمعیت های بن‌سرخ، تنوع ژنتیکی قابل توجهی را در این جمعیت ها نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از دندروگرام، جمعیت های مورد مطالعه به ۸ گروه مجزا در سطح تشابه ۰/۳۱ تقسیم شدند. درگروه اول گیاهان متعلق به ۵ جمعیت قرار گرفته‌اند که نشان دهنده‌ی این می‌باشد که با وجود فاصله‌ی جغرافیایی و شرایط آب و هوایی متفاوت، قرابت ژنتیکی و خویشاوندی احتمالی بین این مناطق وجود دارد که هر ۵ جمعیت متعلق به مناطق دو استان هم جوار هم می‌باشند که به احتمال زیاد نزدیک بودن این دو استان باعث جا به جایی و در نتیجه شباهت ژنتیکی بالای این مناطق و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌باشد. در گروه دوم و گروه پنجم ۳ نمونه از سقز به تنهایی قرار گرفته و مابقی به طور پراکنده در گروه اول به همراه ۴ جمعیت دیگر قرار گرفته است که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این باشد که این جمعیت، تنوع درون و بین جمعیت بالایی را نشان می‌دهد. نیمی از جمعیت مهاباد در گروه دوم جای دارد به همراه یک نمونه از روانسر که شاید منشأ آن مهاباد باشد. برخی از افراد جمعیت مهاباد در گروه ۱ و۳ قرار دارند که در ۳ گروه نزدیک به هم می باشند که نشان دهنده‌ی شباهت ژنتیکی و تنوع درون جمعیت بالای نمونه‌های مهاباد است. در گروه سوم نمونه‌هایی از روانسر و سردشت مشاهده می‌شود که شباهت ژنتیکی این ۲جمعیت با مهاباد را نشان می‌دهد. نیمی از جمعیت روانسر در گروه ششم قرار گرفته است و یک نمونه به تنهایی در گروه هشتم، که تنوع درون و بین جمعیت نمونه‌ها را نشان می‌دهد و علت تنوع بین جمعیت در روانسر می‌تواند این باشد که این منطقه تنها منطقه‌ی مورد مطالعه از استان کرمانشاه بوده، به همین علت تاحدی با وجود فواصل جغرافیایی، متفاوت‌تر از جمعیت-های دیگر است. اراک به تنهایی در ۲ زیر شاخه در گروه ششم قرار گرفته است که اراک خالص‌ترین جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها بوده و شباهت ژنتیکی کمتری به سایر جمعیت‌ها دارد که علت آن فاصله دور جغرافیایی و شرایط آب و هوایی متفاوت این استان نسبت به ۳ استان دیگر است. تنها بعضی از نمونه‌های روانسر در این گروه قرار دارد که می‌توان این شباهت ژنتیکی روانسر به نمونه‌های اراک را شرایط رویشی شبیه به هم یا جا به جایی ژرم پلاسم توسط پرندگان، باد و یا انسان‌ها نسبت داد. حق‌پناه و همکاران (۱۳۹۱) نیز در بررسی انجام داده بر روي گیاه گزنه با استفاده از نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی بالایی را در اکوتیپ‌هاي گزنه در استان مازندران گزارش کردند. برای برنامه‌های اصلاحی بن‌سرخ به ویژه برنامه‌های مبتنی بر تلاقی، از دو جمعیت اراک و مهاباد می توان بهره برد. به علاوه، با بهره‌گیری از نتایج مولکولی و ارزیابی تنوع فیتوشیمیایی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از آن‌ها وجود خواهد داشت.

منابع

جبارزاده، ز.، خوشخوي، م.، صالحی، ح. و شهسوار، ع.، ۱۳۹۰. بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی گونه‌هاي ورد با استفاده از نشانگر ISSR. هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۷-۱۴شهریور، ۱۰۱-۱۰۰.

حق‌پناه، م.، کاظمی‌تبار، س.ک. و هاشمی پطرودي، س.ح.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی گیاه گزنه با استفاده از نشانگر ISSR در استان مازندران. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. تهران، دانشگاه شهید بهشتی

رستمی احمدوندي، ح.، چقامیرزا، ک. و کهریزي، د.، ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌هاي زیره سبز (*Cuminum cyminum*) براساس نشانگر مولکولی ISSR. هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۷-۱۴ شهریور، ۸۹-۸۷.

زاجی، ب.، زاجی، غ. و علائی، ش.، ۱۳۸۸. بیوتکنولوژي، راهکاري کاربردي در تولید و فرآوري گیاهان دارویی. همایش منطقه‌اي غذا و بیوتکنولوژي، ۱۴-۱۳ اسفند، دانشگاه آزاد واحد کرمانشاه. ۵-۱.

شهریاری احمدي، ف.، صالحی، م.، قاسمی عمران، و. و رمضانی مقدم، م.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی بین برخی از ژنوتیپ‌هاي پنبه (*Gossypium sp.*) موجود در ژرمپلاسم ایران با استفاده از نشانگر مولکولی بین ریزماهواره‌اي ISSR. پژوهش‌هاي زراعی ایران. ۱۰(۴): ۶۸۰-۶۷۴

فارسی، م. و باقری، ع.، ۱۳۸۶، اصول اصلاح نباتات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد،۳۷۶ صفحه.

فخرشاهی، م. و شهریاری، ف.، ۱۳۹۱. انگشت‌نگاری ژنتیکی اکوتیپ‌های سیر(*Allium sativum* L.) ایران با استفاده از نشانگرهاي مولکولي ISSR و M13. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.

Alamdary, S.B.L., Safarnejad, A. and Nematzadeh, G.A., 2012. Using RAPD marker for genetic diversity assessment of several *Thymus* Species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20 (2): 192-201.

Chen, S.H., Chen, W., Shen, X., Yang, Y., Qi, F., Liu, Y. and Meng, H. (2014). Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits. Biochemical Systematics and Ecology, 55, 260-267.

Doyle, J.J. and Doyle J.L. (1987). Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phtichemecal Bulletin, 19, 11-15.

Ebadi, A., Rezaie, A., Nazeri, M. and Jaferi, B. (2011). Evaluating the antibacterial effects of *Allium jesdianum* Boiss extract. Reserch Journal of Biological Sciences, 6 (11), 608-610.

Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14 (8), 2611-2620.

Hao, J., Lee, D., Seunglee, J. and Sook lee, N, (2002). A study of taxonomical relationships a mong species of Korean *Allium* sect. *sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 43, 63-68

Hashemi, H., Safar Nejad, A. and Bagheri, A. (2009). Investigation of genetic variation among Iran's Persian Zira (*Bunium persicum* Boiss) landraces using RAPD marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16(2), 238-246.

Kumar, J. and Kumar Gupta, P. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reporats Journal, 2, 93-112.

Mezzena, L., Paris, A., Gimenes, M.A., Bonine, C. and Valle, C.F. (2001). Identification of ISSR (inter simple sequence repeat) codominant markers in Eucalyptus grandis. Journal of Plant and Animal Genome IX Conference, San Diego, CA. P24.

Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Science. 43, 1235-1248.

Mukherjee, A., Sikdar, B., Ghosh, B. and Banerjee, A. (2013). RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae). Turkish Journal of Botany, 37, 605-618.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2, 225-238.

Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2000).

Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Journal of Euphytica, 128 (1), 9-17

Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Journal of Chromosoma, 109 (6), 363-371.

Vahdani, R., Mehrabi, S., Malekzadeh, J., Jannesar, R., Sadeghi, H. and Shafaeifar, A. (2011). Effect of Hydrophilic Extract of *Allium Jesdianum* on Ethylene Glycol-Induced Renal Stone in Male Wistar Rats. Armaghane-danesh. Yasuj University of Medical Sciences Journal, 16(6), 557-566.