

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گزنه (*Urtica dioica* L.) استان مازندران با استفاده از نشانگر ISSR

سید کمال کاظمی تبار^۱، مصطفی حق پناه^{۲*}، سید حمیدرضا هاشمی^۳ و سید محمد علوی^۴

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

چکیده

گزنه (*Urtica dioica* L.) گیاهی دائمی و دوپایه است که در مناطق معتدل می‌روید. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ گیاه گزنه از ۱۷ آغازگر ISSR استفاده شد و در مجموع ۲۳۳ باند تشکیل گردید که ۱۷۱ باند چند شکل بودند. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه Jaccard از ۰/۶۴ تا ۰/۸ برآورد شد. بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های جمع آوری شده از قائمشهر و آمل و کمترین شباهت مربوط به توده‌های مناطق عباس‌آباد و صاحبی مشاهده گردید. تجزیه کلاستر انجام شده ۵ گروه اصلی را تشکیل داد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی تنوع وسیع گیاه گزنه را در استان مازندران نشان داد. این مطالعه نشان داد نشانگر ISSR توانایی تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف گیاه گزنه استان مازندران را دار بوده و می‌تواند ابزاری مناسب جهت انجام برنامه‌های به‌نژادی باشد.

واژگان کلیدی: تجزیه به مختصات اصلی، تنوع ژنتیکی، گزنه (*Urtica dioica* L.)، نشانگر ISSR

^۱ دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

^۲ کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

masoudhgh@gmail.com

^۳ پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۴ پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

ارتفاعات و دامنه‌ها وجود دارد. در آن تحقیق از مجموع ۱۳۴ باند بدست آمد که ۲۰/۲ درصد باندها چند شکل بودند (Bharmauria et al., 2009). تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ گیاه وج (*Acorus calamus*) نقاط مختلف هندوستان با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت و میزان چند شکلی آغازگرها را ۵۱/۵۳ درصد بدست آمد (Kareem et al., 2012). آنها بیان داشتند که تنوع درون جمعیت گیاه مذکور بسیار کم بوده است و نتیجه گرفتند که این کمبود تنوع داخل جمعیت به واسطه تکثیر غیر جنسی این گیاه می‌باشد. مطالعات تنوع ژنتیکی انجام شده از ۱۳ جمعیت گیاه ریواس چین ۱۶۰ نمونه را با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR نشان داد ۹۲/۹۴ درصد باندهای بدست آمده چندشکل بودند و این حد بالای چند شکلی احتمالاً به دلیل نحوه تکثیر جنسی این گیاه می‌باشد (Hu et al., 2010). تنوع ژنتیکی ۳۶ ژنوتیپ گل داوودی (*Chrysanthemum indicum*) با استفاده از ۲۴ آغازگر ISSR را مورد بررسی قرار گرفت و اعلام شد که از ۲۳۸ باند بدست آمده ۲۰/۸ باند معادل (۸۶/۱۳ درصد) چندشکل بودند، تنوع مشاهده شده ژنوتیپ‌های گیاه داوودی را در ۶ گروه اصلی قرار داد (Fang et al., 2012). بررسی تنوع زیستی ۱۵ ژنوتیپ گیاه دارویی *Rhodiola rosea L.* متعلق به نقاط مختلف دنیا با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR حاکی از آن بود که این نشانگر قابلیت بالایی در تفکیک کردن تنوع درون جمعیت و بین جمعیت دارد (Kozyrenko et al., 2001). هدف از این مطالعه تعیین میزان تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه گزنه دوپایه *Urtica dioica* در استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

سی و دو ژنوتیپ گیاه گزنه در مهر ماه ۱۳۹۰ از نقاط مختلف استان مازندران جمع آوری (جدول ۱) و نمونه‌ها بلافاصله در مخزن ازت مایع قرار گرفت و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان منتقل شدند.

گزنه (*Urtica dioica L.*) گیاهی است دائمی و دوپایه که در مناطق معتدل می‌روید و دارای ترکیبات دارویی نظیر کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، تانن‌ها، اسیدهای چرب، ایزولکتین‌ها و خواص دارویی بسیاری مانند خاصیت ضد ویروسی عصاره و بازدارنده سلول‌های سرطانی به خصوص در مورد بیماری پروستات و... می‌باشد (Koch., 2010). این گیاه تتراپلوئید دارای دو فرم ژنومی $2n=4x=48$ و $2n=4x=52$ (Taylor., 2009) می‌باشد که به طور عادی دو پایه هستند اما برخی از جمعیت‌های آن به طور تک پایه نیز مشاهده گردیده است و گرده افشانی آن به کمک باد انجام می‌گردد (Taylor., 2009).

شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور از اهمیت خاصی برخوردار بوده و قبل از هر نوع اقدام اصلاحی شناخت تنوع و ظرفیت ژنتیکی هرگونه گیاهی ضروری است (نقوی و همکاران، ۱۳۹۰). گیاه گزنه بطور گسترده در شمال ایران می‌روید و از این روشناخت و حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه دارای اهمیت می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی روش‌های مختلفی دارد که امروزه به وفور از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی میزان قرابت بین ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی استفاده می‌گردد (نقوی و همکاران، ۱۳۹۰).

نشانگر ISSR به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه از ژنوم، کاربرد فراوانی در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی دارد (Lu et al., 2006). این نشانگر به‌طور تصادفی موتیف‌های SSR را تکثیر کرده و بسیار شبیه نشانگر RAPD می‌باشد. اما بر خلاف RAPD دارای تکرار پذیری بالایی می‌باشد (Lu et al., 2006). علی‌رغم پیشینه تاریخی گیاه گزنه و مصارف شناخته شده آن مطالعات تنوع ژنتیکی این گیاه بسیار محدود بوده است. تنوع ژنتیکی گیاه گزنه ارتفاعات هیمالیا با استفاده از ۸ نشانگر RAPD بررسی شد و اعلام گردید که شباهت اندکی بین نمونه‌های گرفته شده از

جدول ۱. محل‌های جمع‌آوری نمونه از نقاط مختلف استان مازندران

شماره نمونه	محل جمع‌آوری نمونه	ارتفاع از سطح دریا	E	N
۱	صاحبی (از توابع میانرود)	۳۸-	۳۳° ۰۸' ۴۵.۸۳"	۳۶° ۴۰' ۳۸.۵۳"
۲	سورک (میانرود رود)	۱۰۹	۳۳° ۱۲' ۲۵.۱۳"	۳۶° ۳۵' ۵۱.۸۰"
۳	نکا	۱۴۱	۳۳° ۱۷' ۲۶.۱۸"	۳۶° ۳۸' ۳۸.۷۴"
۴	رستم کلا	۱۰۵	۳۳° ۲۵' ۴۹.۱۲"	۳۶° ۴۰' ۳۰.۴۹"
۵	بهشهر	۷۸	۳۳° ۳۲' ۳۰.۳۸"	۳۶° ۴۱' ۲۷.۲۵"
۶	علی تپه (از توابع بهشهر)	۳۷۶	۳۳° ۳۵' ۰۹.۴۵"	۳۶° ۴۰' ۵۵.۸۹"
۷	علی تپه (از توابع بهشهر)	۳۷۶	۳۳° ۳۵' ۰۹.۴۵"	۳۶° ۴۰' ۵۵.۸۹"
۸	عباس‌آباد (بهشهر)	۱۲۷۵	۳۳° ۳۵' ۳۰.۵۵"	۳۶° ۳۹' ۴۷.۳۹"
۹	ساری	۹۴	۳۳° ۰۳' ۴۵.۸۳"	۳۶° ۳۳' ۴۸.۳۲"
۱۰	قائم شهر	۲۹	۳۲° ۴۴' ۵۴.۶۷"	۳۶° ۳۰' ۴۴.۰۴"
۱۱	پلیس راه بابل	۶	۳۲° ۳۶' ۲۶.۲۸"	۳۶° ۳۱' ۲۴.۵۰"
۱۲	آمل	۳۱۶	۳۲° ۱۹' ۳۲.۱۷"	۳۶° ۲۷' ۳۶.۵۰"
۱۳	(بابل) بیجی کلا	۵۸	۳۲° ۲۹' ۰۱.۱۹"	۳۶° ۲۹' ۴۹.۷۳"
۱۴	کمانگر کلا (بابل)	۱۴۹	۳۲° ۲۰' ۳۵.۲۰"	۳۶° ۳۰' ۴۱.۴۲"
۱۵	کلوده (محمود آباد)	۲۳	۳۲° ۱۸' ۳۵.۴۰"	۳۶° ۳۳' ۰۲.۹۳"
۱۶	محمود آباد	۸۱-	۳۲° ۱۵' ۰۱.۸۷"	۳۶° ۳۸' ۰۱.۳۹"
۱۷	نور	۶۱-	۳۲° ۰۱' ۰۱.۱۶"	۳۶° ۴۰' ۳۸.۵۳"
۱۸	سیسنگان	۱۳۹	۳۱° ۳۰' ۰۲.۳۸"	۳۶° ۳۴' ۲۲.۹۴"
۱۹	نوشهر	۶۰-	۳۱° ۰۸' ۴۵.۸۳"	۳۶° ۴۰' ۳۸.۵۳"
۲۰	چالوس	۷۱	۳۱° ۲۵' ۲۰.۲۵"	۳۶° ۳۹' ۱۷.۸۰"
۲۱	تنکابن	۴۹-	۳۰° ۴۸' ۵۰.۲۳"	۳۶° ۵۰' ۲۴.۳۴"
۲۲	کریم‌آباد (تنکابن)	۶۹-	۳۰° ۴۶' ۵۱.۵۸"	۳۶° ۵۱' ۵۶.۲۸"
۲۳	رامسر (ارتفاعات آزارک)	۲۴۸۵	۳۰° ۳۵' ۰۲.۱۵"	۳۶° ۵۲' ۵۱.۵۸"
۲۴	رامسر	۵۰-	۳۰° ۴۰' ۰۰.۵۶"	۳۶° ۵۴' ۵۹.۴۷"
۲۵	نیاسته (رامسر)	۱۴۲	۳۰° ۴۳' ۲۲.۹۵"	۳۶° ۵۱' ۴۹.۸۱"
۲۶	چپک رود (جویبار)	۵۹-	۳۲° ۵۳' ۱۴.۰۸"	۳۶° ۴۱' ۲۱.۵۷"
۲۷	فریدون کنار	۷۹	۳۲° ۳۱' ۲۰.۸۲"	۳۶° ۴۱' ۳۸.۰۹"
۲۸	بهنمیر	۶۱-	۳۲° ۴۵' ۴۸.۱۸"	۳۶° ۴۰' ۱۷.۲۹"
۲۹	اجاکسر (بابلسر)	۷۷-	۳۰° ۳۶' ۳۴.۹۷"	۳۶° ۴۱' ۲۸.۴۴"
۳۰	کوهی خیل (جویبار)	۵۷-	۳۲° ۵۴' ۵۸.۱۴"	۳۶° ۴۱' ۲۴.۹۴"
۳۱	جویبار	۲۷-	۳۲° ۵۴' ۳۹.۸۴"	۳۶° ۳۸' ۱۲.۴۲"
۳۲	کردخیل (ساری)	۶۷	۳۲° ۵۷' ۰۱.۴۳"	۳۶° ۳۰' ۰۰.۳۳"

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

استخراج DNA به روش CTAB با کمی تغییرات صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۷ درصد بررسی و بر اساس نتایج کمیت و کیفیت سنجی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به مقدار ۱۲.۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد. تعداد ۳۲ آغازگر ISSR از

آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان تهیه و بعد از ارزیابی تعداد ۱۷ آغازگر که وضوح و چند شکلی بالایی داشتند انتخاب شد (جدول ۲). هر واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری PCR شامل: ۱/۲ تا ۱/۷ میلی مولار، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۷۵ میکرومولار آغازگر، یک واحد آنزیم تک‌پلی‌مراز و ۶۰ نانوگرم DNA الگو بود.

جدول ۲ - نتایج حاصل از بررسی ۳۲ ژنوتیپ گزنه استان مازندران با استفاده از نشانگر ISSR

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد بانهای چند شکلی	درصد چند شکلی	محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)	شاخص نشانگر
issr-2	(GA)9-C	۷	۴	۵۷	۰/۵۹	۳۳/۶۳
issr-5	(GT)9-C	۵	۴	۸۰	۰/۱۳	۱۰/۴
issr-6	(GT)9-T	۱۸	۱۴	۷۸	۰/۳۳	۲۵/۷۴
issr-7	(GA)8C	۷	۳	۴۳	۰/۲۳	۹/۸۹
issr-8	(CT)8G	۶	۱	۱۷	۰/۰۹	۱/۵۳
issr-9	(AG)8C	۲۱	۱۵	۷۱	۰/۱۵	۱۰/۶۵
issr-10	(AG)8G	۶	۲	۳۳	۰/۲۸	۹/۲۴
issr-11	(GA)8C	۹	۵	۵۶	۰/۲۴	۱۳/۴۴
issr-12	(GA)8A	۳۶	۲۶	۷۲	۰/۱۶	۱۱/۵۲
issr-13	(TC)8C	۸	۶	۷۵	۰/۲۸	۲۱
issr-14	(TC)8G	۸	۷	۸۸	۰/۲۵	۲۲
issr-15	(AC)8G	۸	۵	۶۳	۰/۲۳	۱۴/۴۹
issr-16	(TG)8A	۱۳	۱۲	۹۲	۰/۳۵	۳۲/۲
issr-17	(AC)8C	۲۹	۲۴	۸۳	۰/۲۱	۱۷/۴۳
issr-18	(ATC)6T	۱۷	۱۳	۷۶	۰/۰۸	۶/۰۸
issr-19	(ATC)6C	۱۹	۱۶	۸۴	۰/۱۲	۱۰/۰۸
issr-20	(ATG)6G	۱۷	۱۴	۸۲	۰/۱۸	۱۴/۷۶
میانگین کل		۱۳.۷	۱۰	۶۸	۰/۲۳	۱۵/۵۷

تجزیه آماری

بر اساس وجود و عدم وجود باند، ماتریس صفر و یک توسط نرم افزار (Domyati et al., Total Lab 2011) تهیه گردید و سپس از این ماتریس برای به دست آوردن ماتریس تشابه، آزمون مانتل و رسم دندروگرام از نرم افزار (Rohlf., NTSYS Ver 2.02) تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نرم افزار (GenAlex ver 6.5 و آزمون Bootstrapping با استفاده از نرم افزار Winboot انجام شد (Yap and Nelson., 1996).

برای محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC) از فرمول $PIC = \sum 2f(1-f)/n$ (Mohammadi and Prasanna., 2003) استفاده شد، در این رابطه f فراوانی نسبی باندهای مشاهده شده و n تعداد لوکوسهای محاسبه شده است.

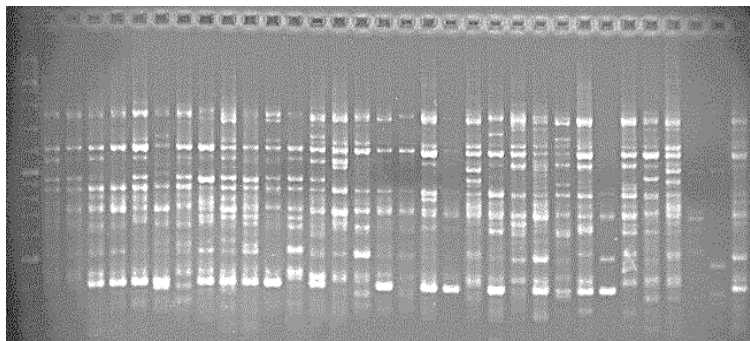
مراحل تکثیر در دستگاه ترمال سایکلر (MJ BIO Mini™ Personal Thermal Cycler) انجام گرفت و در جدول ۳ تشریح شده است.

جدول ۳. مراحل حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	چرخه
واشرشت سازی اولیه	۹۵	۵	۱
واشرشت سازی اتصال	۵۵-۵۹	۱	۳۵
بسط	۷۲	۱	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

سپس محول PCR در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور آشکارسازی باندها از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و عکسبرداری UVP استفاده شد.

باند نیز منومورف بودند. اندازه باندها بین ۲۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغییر بود. تعداد باندها حاصله از ۵ تا ۳۶ باند برای هر آغازگر متفاوت بود. درصد چند شکلی هر آغازگر از ۱۷ درصد (آغازگر ISSR-8) تا ۱۰۰ درصد (آغازگر ISSR-16) متغییر بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به ترتیب ۱۳/۷ و ۱۰ بود (جدول ۲). شکل ۱ باندهای تشکیل شده با استفاده از آغازگر ISSR-17 را به عنوان نمونه نشان می‌دهد.



شکل ۱- الگوی باندی ISSR با استفاده از آغازگر ISSR-17.

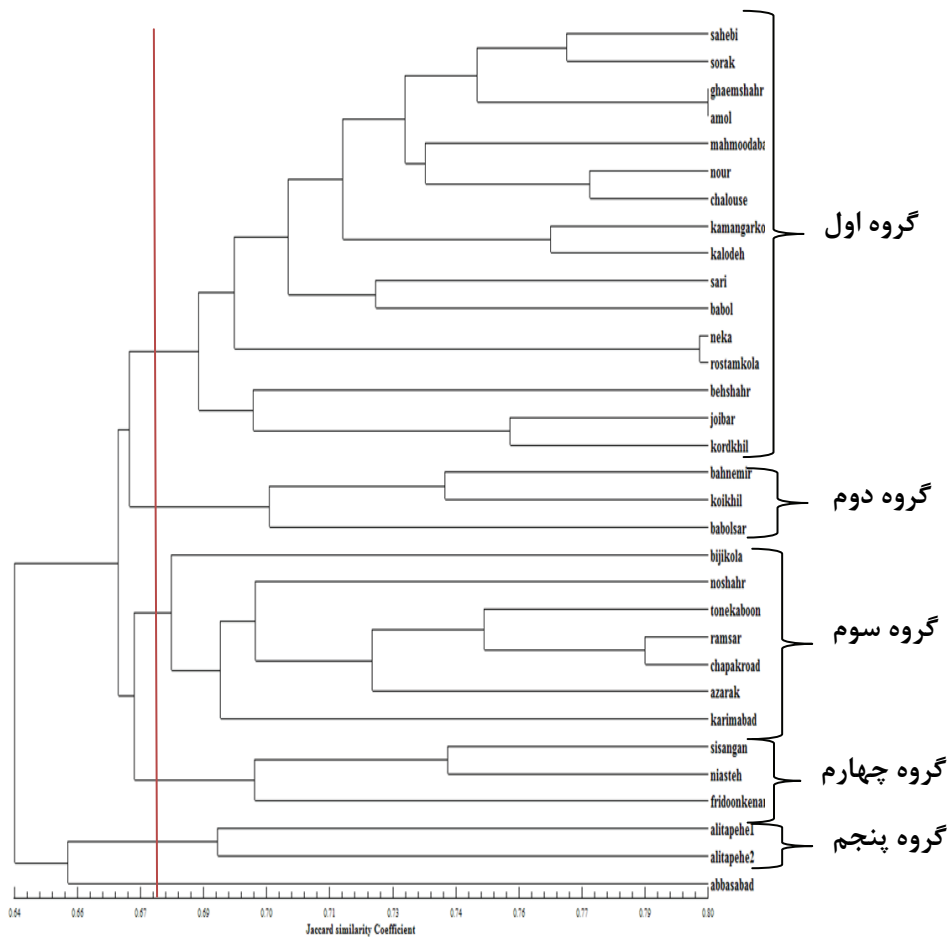
کمترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ساری و بابل بوده. ضریب همبستگی کوفنینگ بین ماتریس تشابه و دندروگرام حاصل از آن با استفاده از ضریب جاکارد (۰/۸۲) نسبت به Dice (۰/۶۷) بزرگ‌تر بوده از این رو در تجزیه‌های بعدی نیز از مورد اول استفاده گردید.

شاخص‌های تعداد کل باند، درصد چند شکلی و تعداد باندهای چند شکل با استفاده از نرم افزار Popgen Ver32 (Yeh et al., 1996) و شاخص نشانگر (MI) از حاصل ضرب درصد چندشکلی در محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) محاسبه گردید (Powell et al., 1996).

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ توده گزنه دوپایه استان مازندران از ۳۲ آغازگر ISSR استفاده شد که ۱۷ آغازگر باندهای واضح و چند شکل تولید کردند. از کل ۲۳۳ باند تشکیل شده ۱۷۱ باند چند شکل و ۶۲

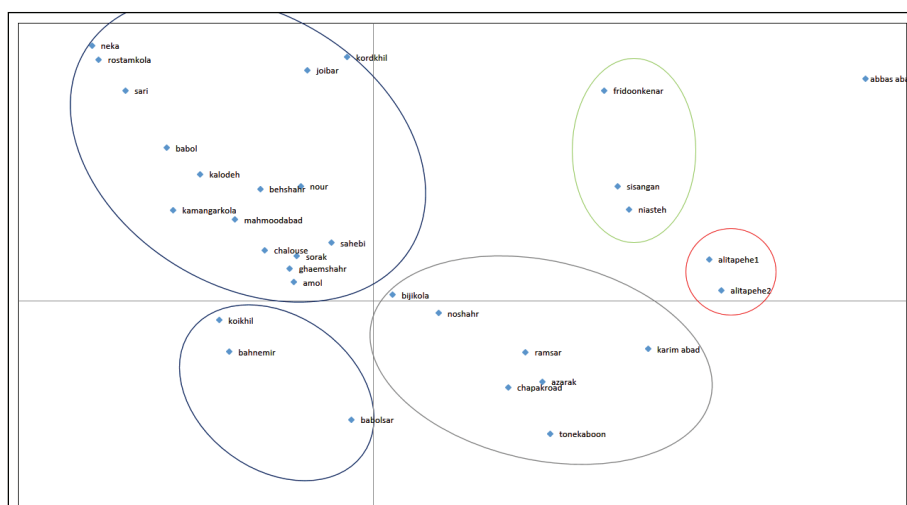
تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه Jaccard از ۰/۶۴ تا ۰/۸ متغیر بود. بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های جمع آوری شده از قائمشهر و آمل و کمترین شباهت بین توده‌های جمع آوری شده از مناطق عباس‌آباد و صاحبی مشاهده گردید اما بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی Dice



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ۳۲ ژنوتیپ گزنه استان مازندران به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه Jaccard با استفاده از نشانگر ISSR

می‌باشد ۴۶/۲۴ درصد، مختصات دوم ۱۷/۰۶ درصد و مختصات سوم ۱۶/۶۷ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. بر اساس تجزیه به مختصات اصلی الگوی پراکنش میان ژنوتیپ‌ها رسم گردیدند (شکل ۳). مقادیر بالای سه مولفه اول تجزیه مختصات اصلی نشان دهنده عدم پوشش کامل کل ژنوم مورد مطالعه، توسط نشانگرهای ISSR مورد استفاده می‌باشد (محبوب و همکاران، ۱۳۹۳) که این بدلیل توزیع نامتقارن موتیف‌های SSR در سرتاسر ژنوم است.

توزیع مقادیر PIC بین ۰/۰۸ تا ۰/۵۹ متغیر بود. مقادیر شاخص نشانگر (MI) محاسبه شده بین ۰/۰۸ تا ۰/۳۳ قرار داشت. بیشترین مقدار شاخص نشانگر که نشان دهنده قدرت تفکیک بالای آغازگر نسبت به سایر آغازگرها بود مربوط می‌شود به نشانگر ISSR-17 (جدول ۲). برش دندروگرام بر اساس تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) جایی که بیشترین اختلاف بین گروه‌ها بود انجام گرفت (جدول ۴) و تعداد ۵ گروه اصلی حاصل گردید. تجزیه PCoA نشان داد که سه مختصات اول حدود ۵۸ درصد واریانس کل را توجیه می‌کنند. اولین مختصات که بزرگ‌ترین مختصات نیز



شکل ۳- نمودار پراکندگی ژنوتیپ‌ها در تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگر ISSR

جدول ۴. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)

منابع تغییرات	Df	SS	MS	Est. Var	Var/.
بین جمعیت‌ها (بین خوشه‌ها)	۴	۱۲/۶۱	۳/۱۵	۰/۳۷	٪۲۹
درون جمعیت‌ها (درون خوشه‌ها)	۲۷	۲۴/۵	۰/۹۱	۰/۹۱	٪۷۱
کل	۳۱	۳۷/۱۲		۱/۲۸	٪۱۰۰

Est. Var: واریانس تخمینی

Var/.: در صد واریانس هر منبع به کل:

می‌دهد اما همبستگی معناداری بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی مشاهده نشد این تحلیل نشان می‌دهد نمونه‌هایی که از لحاظ جغرافیایی نیز نزدیک به هم هستند الزاما از لحاظ ژنتیکی تشابه بیشتری را ندارند. برای مثال می‌توان نمونه‌های بسیاری دور از هم را که از شرق و غرب مازندران جمع‌آوری شدند را در گروه اول مشاهده کرد. نمونه جمع‌آوری شده از منطقه عباس‌آباد در هیچ یک از پنج گروه اصلی قرار نگرفت. تنها دو ژنوتیپ جمع‌آوری شده از علی‌تپه همانطور که انتظار می‌رفت در یک گروه قرار گرفتند ولی بر اساس ضریب تشابه جاکارد تنها ۶۹ درصد شباهت داشتند.

گیاهان دارویی عموماً در محیط‌های طبیعی و بصورت خودرو یافت می‌شوند، در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در زمینه تنوع ژنتیکی گیاهان

طبق نتایج بدست آمده، ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق ساحلی و عباس‌آباد بر اساس ضریب تشابه Jaccard کمترین شباهت را داشتند که در تجزیه خوشه‌ای و نمودار حاصل از تجزیه به مختصات اصلی هم در دو گروه مجزا قرار گرفتند. جهت تأیید زیرگروه‌های درون کلاستر اصلی، از آزمون Bootstrapping استفاده شد که در اکثر موارد گروه بندی با مقادیر بالای بوت استرپینگ تأیید شد.

چندشکلی بالای مشاهده شده در این گیاه با توجه به ابعاد جغرافیایی جمع‌آوری نمونه نشان دهنده تنوع وسیع در استان مازندران می‌باشد. گونه‌های دگرگشن گیاهی معمولاً دارای تنوع بالای ژنتیکی درون جمعیت می‌باشند (Brown., 1979).

نتایج حاصل از دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی تنوع بالای گیاه گزنه را در استان مازندران نشان

استان مازندران را دار بوده و می‌تواند ابزاری مناسب جهت انجام برنامه‌های به‌نژادی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان آقای دکتر نعمت-زاده جهت تامین امکانات و هزینه‌های این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم و از دوست خوبمان آقای دکتر علی پاکدین که در این تحقیق همواره یاورمان بودند بسیار سپاس گزاریم.

دارویی صورت گرفته است و سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی مشاهده گردیده است، که این امر می‌تواند به دلیل سازگاری این گیاهان محیط‌های مختلف باشد (Sarwat et al., 2008). بررسی تنوع ژنتیکی در مدیریت ژرم پلاسما گیاه گزنه بسیار مفید می‌باشد. با استفاده از نتایج به دست آمده و نیز ارزیابی تنوع فیتوشیمیایی گیاه گزنه، امکان شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از این گیاه فراهم می‌گردد. همچنین این مطالعه نشان داد، نشانگر ISSR توانایی تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف گیاه گزنه

stinging nettle (*Urtica dioica*): viable alternatives in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia and associated lower urinary tracts symptoms. *Planta medica*, 67(6), 489-500.

Kozyrenko, M. M., Gontcharova, S. B., and Gontcharov, A. A. (2011). Analysis of the genetic structure of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(8), 691-696.

Lu, Z., Wang, Y., Peng, Y., Korpelainen, H., and Li, C. (2006). Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. *Plant Science*, 170(2), 407-412.

Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248.

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(3), 225-238.

Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software.

Sarwat, M., Das, S., and Srivastava, P. S. (2008). Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant cell reports*, 27(3), 519-528.

Taylor, K. (2009). Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *Journal of Ecology*, 97(6), 1436-1458.

Yap, I. V., and Nelson, R. J. (1996). Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *International Rice Research Institute, Manila*, 1-22.

Yen, F. C., Yang, R. C., Mao, J., Ye, Z., and Boyle, T. J. B. (1996). POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Dept. Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada.

منابع

خونانی نقوی، ز، امیدی، م، سبکدست، م، و طالبی کویخی، ا. (۱۳۹۰). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ های باریجه (*Ferula gummosa*) مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگر AFLP، فصلنامه گیاهان دارویی، ۳۸، ۱۱۷-۱۲۶.

محبوب، ب، نجفی زرینی، ح، و هاشمی، س. ح. (۱۳۹۳). ارزیابی روابط ژنتیکی بین ۳۶ ژنوتیپ از گونه های کلزا (*Brassica* spp.) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، پژوهشنامه گیاهان زراعی، ۱۴، ۹۶-۱۰۶.

Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., and Sharma, S. (2009). Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(3), 166-170.

Brown, A. H. D. (1979). Enzyme polymorphism in plant populations. *Theoretical Population Biology*, 15(1), 1-42.

Domyati, F. M., Rania, A., Younis, A., Edris, S., Mansour, A., Sabir, G., and Bahieldin, A. (2011). Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), 200-210.

Fang, H. L., Guo, Q. S., Shen, H. J., and Li, Y. C. (2012). Genetic diversity evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. by medicinal compounds and molecular biology tools. *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 26-34.

Hu, Y., Wang, L., Xie, X., Yang, J., Li, Y., and Zhang, H. (2010). Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(3), 264-274.

Kareem, V. A., Rajasekharan, P. E., Ravish, B. S., Mini, S., Sane, A., and Kumar, T. V. (2012). Analysis of genetic diversity in *Acorus calamus* populations in South and North East India using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40, 156-161.

Koch, E. (2001). Extracts from fruits of saw palmetto (*Sabal serrulata*) and roots of