مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۸۹

بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از اکوتیپ‌های گیاه دارویی چویل با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

سهیلا بوستانی[۱]، اسد معصومی اصل[۱]*، مسعود دهداری[۱]

چکیده

گیاه چویل یکی از گیاهان دارویی مهم است و با اینکه توده‌های مختلفی از آن در ایران وجود دارد ولی گزارشی از بررسی تنوع ژنتیکی آن موجود نیست. در این مطالعه برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۸ اکوتیپ چویل، از نشانگرهای مولکولی استفاده گردید. پس از تهیه اکوتیپ‌ها از رویشگاه‌ها و شرکت پاکان بذر اصفهان، استخراج DNA انجام و سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR انجام شده و داده‌های مولکولی بدست آمده تجزیه و تحلیل شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده باندهایی تولید کرد که میزان چندشکلی آنها بین ۲۳ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. آغازگرهای F6, F8, F9 و F11 بیشترین و آغازگر F10 کمترین درصد چندشکلی را نشان دادند. همچنین بالاترین مقدار PIC برای آغازگرهای F6 و F11 بدست آمد. متوسط شاخص شانون در این مطالعه ۰/۳۸ بود که کمترین آن مربوط به آغازگر F10 و بالاترین آن متعلق به آغازگر F11 بود. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، ۸ اکوتیپ را به چهار گروه متفاوت تقسیم کرد. بیشترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زردکوه و گایونه و کمترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های وزگ و آب نهر مشاهده شد. به نظر می‌رسد مهاجرت اکوتیپ‌ها بین چهار استان همجوار چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، فارس و اصفهان صورت گرفته است. تحقیق حاضر نشان داد که نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی چویل مناسب است.

کلمات کلیدی: گیاه داروئی، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

[۱]گروه زراعت واصلاح نباتات-دانشگاه یاسوج. * نویسنده مسئول: masoumiasl@yu.ac.ir

مقدمه

گیاه چویل با نام علمي *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss متعلق به خانواده Apiaceae مي‌باشد. این جنس داراي حدود ۳۵ گونه در سراسر دنیا مي‌باشد که هفت گونه آن در ایران رویش دارد (مظفریان، ۱۳۹۲). اسانس این گیاه دارای خواص ضدعفونی کننده، ضد میکروبي و تسکین دهنده بوده و همچنین دارای تاثیرات حفاظتي و نگهدارنده مواد غذایي می‌باشد. علاوه بر این، در درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Taran et al., 2010). همچنین به علت عطر خوشایند، قابلیت استفاده در صنایع عطرسازي را داراست و از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان آن برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود (ابرازه، ۱۳۸۳).

بهنژادی گیاهی مبتنی بر وجود تنوع ژنتیکی و گزینش انواع مطلوب گیاهی است و لذا اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر توارثی گیاهی ضروری است. نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان هستند طوریکه استفاده از نشانگرها برای ردیابی مکان‌های ژنی و نواحی ژنومی گیاهان زراعی در بیشتر برنامه‌های اصلاحی مرسوم شده است (Lorz and Wanzel, 2005). نشانگرهای مولکولی می‌توانند برای شناخت ظرفیت طبیعی گیاهان و مدیریت آنها کمک زیادی نمایند. از نشانگرهای مولکولی برای تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها، انگشت نگاری ژنتیکی و یا تهیه شناسنامه ارقام و نیز شناسنامه ژرم پلاسم بانک‌های گیاهی استفاده نمود. نشانگرهای مولکولی را به طور کلی به دو دسته تقسیم می‌کنند که شامل نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای در سطح DNA می‌باشند (نعمت زاده و کیانی، ۱۳۹۰). نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR از جمله ISSR به‌دلیل سرعت عمل بالا، هزینه کم و عدم نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم، دارای کاربرد وسیعی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان هستند. ISSR (ردیف-های تکراری ساده بینابینی) یکی از نشانگرهای ریزماهواره به شمار می‌آید که به منظور بهبود اختصاصی بودن نشانگر SSR ایجاد شده‌اند و بصورت تکرارهای دوتایی یا سه تایی هستند که در دو یا یکی از انتهاها با دو تا چهار نوکلئوتید قلاب می‌شوند و به عنوان آغازگرهای تکی PCR استفاده می‌شوند. این نشانگر سریع، ارزان، بسیار تنوع پذیر و مناسب برای مطالعات تنوع ژنتیکی می باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸).

نشانگرهای مولکولی تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در قالب شاخص‌های چندشکلی نشان می‌دهند. برای مثال، بالا بودن میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) نشان دهنده کارایی بالای نشانگر و پراکندگی جغرافیایی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است (Ramachandra and Ravishankar, 2002). شاخص شانون (I) بیانگر میزان تنوع در هر آغازگر می‌باشد. آلل‌های متفاوت (Na)، بیان کننده تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد واقعی آلل‌هایی است که در جمعیت پیدا می‌شوند. قدرت نشانگرهای مولکولی معمولا از طریق محاسبه مقدار چندشکلی تعیین می‌شود. این مقدار چندشکلی بیشتر تحت تاثیر مقدار جهش در جایگاه‌های ژن هدف است. فراوانی جهش در ریز ماهواره‌ها و ماهوارک‌ها بیشتر به دلیل تغییر در واحدهای

تکرار شونده از ردیف مرکزی است. فراوانی جهش در ریزماهواره‌ها و ماهوارک‌ها به ترتیب برابر $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۳}$ و $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۵}$ در هر میوز است که بسیار زیاد است. بقیه نشانگرها عموما سطوح متوسط چندشکلی را نشان می‌دهند. چندشکلی مشاهده شده در این نوع نشانگرها به دلیل جایگزینی، کمبود و ازدیاد باندهاست که ممکن است جایگاه اتصال آغازگرها و جایگاه تشخیص برش توسط آنزیم‌های محدودگر و یا اندازه قطعه‌های برشی (و یا قطعه‌های تکثیر شونده) را تغییر دهند (نقوی و همکاران،۱۳۹۲). بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ اسفرزه (*Plantago psyllium*) با استفاده از ۱۲ نشانگر مولکولی ISSR نشان داده که میزان میانگین PIC نشانگرها بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۴ بود. آغازگر UBC814 با ۱۴ نوار بیشترین و آغازگرهای UBC824 و UBC876 با تعداد ۷ باند کمترین نوار چندشکل را تولید کردند. تجزیه خوشه ای بر اساس نشانگر مولکولی، ۱۷ اکوتیپ اسفرزه را در پنج گروه قرار داد (رمضانی و رحیمی، ۱۳۹۶). در تحقیق دیگری، مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) با استفاده از ۵ نشانگر مولکولی ISSR نشان داد که میانگین PIC ۰/۴۷۸ محاسبه گردید. تجزیه خوشه ای بر اساس نشانگر مولکولی ۱۷ اکوتیپ رازیانه را در سه گروه قرار داد (زنگنه و همکاران، ۱۳۹۵). زبرجدی و همکاران (۲۰۱۶) تنوع ژنتیکی ۲۱ دستیافته گیاه داروئی *Peganum harmala* L. را با استفاه از ۱۴ نشانگر مولکولی ISSR بررسی و نشان دادند که همه آغازگرها مناطق چندشکل را با موفقیت تکثیر کردند، زیرا در بین ۱۱۵ منطقه، ۶۸ منطقه چندشکلی (۵۹/۱۳ درصد) نشان دادند. بر این اساس، بیشترین و کمترین شباهت در میان اکوتیپ‌ها به ترتیب ۹۴٪ و ۵۵٪ محاسبه شد. همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه ای، کلیه دستیافته‌ها را به سه گروه طبقه بندی کرد که کاملاً مطابق با الگوی جغرافیایی آنها در محل جمع آوری نیست. نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف درختچه داروئی *Ziziphus spina-christi (L.) Willd* در کشور عربستان سعودی نیز نشان داد که در چهار جمعیت مورد مطالعه، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) ۱/۴۵ در جمعیت جزیره فارسان و ۱/۷۷۳ در جمعیت منطقه عطیف بوده و حداکثر تعداد آلل‌های مؤثر (۱/۵۲۵) در جمعیت عطیف و حداقل تعداد آن (۱/۲۵۲) در جمعیت جزیره فارسان مشاهده شد. بر اساس مقادیر شاخص شانون و میزان چندشکلی، جمعیت جزیره فارسان تنوع ژنتیکی پایین‌تری نشان داد (Alansi et al., 2016). ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت گیاه داروئی *Nilgirianthus ciliatus* با استفاده از ۳۵ نشانگر ISSR و ۳۰ نشانگر RAPD به ترتیب ۲۹۸ و ۹۹ باند تولید کردند. با استفاده از نشانگرهای ISSR، باندهای ۲۰۰-۳۵۰۰ جفت بازی به دست آمد و ۷۷ درصد چندشکلی مشاهده شد. محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگر ISSR ۲۰/۸ بود. خوشه بندی جمعیت *N. ciliatus* بدست آمده از مناطق مختلف جغرافیایی در گروه‌های مجزا می‌تواند نشانه خوبی برای جدایی واضح جمعیت‌ها باشد که با مقادیر بالای بوت استرپ پشتیبانی می‌شود. بطور کلی، هر دو تجزیه و تحلیل ISSR و RAPD برای شناسایی تغییرات ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در جمعیت *N. ciliatus* در سطح DNA ارزشمند بودند (Rameshkumar et al., 2019). از آنجائیکه هیچ اطلاعاتی در مورد توالی ژنومی گیاه چویل در

دست نیست و علیرغم اهمیت این گیاه داروئی، تا کنون تنوع ژنتیکی توده‌های ایرانی آن از طریق نشانگرهای مولکولی بررسی نشده است، لذا این تحقیق اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی برخی از اکوتیپ‌های بومی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۸ اکوتیپ چویل از رویشگاه‌های استان کهگیلویه و بویراحمد و شرکت پاکان بذر (اصفهان) تهیه شدند. اکوتیپ‌ها متعلق به مناطق آب نهر (استان کهگیلویه و بویراحمد)، گایونه (استان کهگیلویه و بویراحمد)، سی-سخت (استان کهگیلویه و بویراحمد)، وزگ (استان کهگیلویه و بویراحمد)، کوه سرخ (استان فارس)، فریدون شهر (استان اصفهان)، سمیرم (استان اصفهان) و زردکوه (استان چهارمحال و بختیاری) بودند.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپهای فوق‌الذکر، ابتدا DNA نمونه‌های گیاهی به روش فاطمی فرد و معصومی اصل (۱۳۹۸) استخراج گردید. پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری، واکنش PCR با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول۱) انجام گردید. پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای موردنظر (جدول ۲) انجام گردید. واکنش PCR با استفاده از PCR Master Mix(2X) شرکت آمپلی‌کون آماده مصرف (تهیه شده از شرکت سیناژن) به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و ۲ میکرولیتر از آغازگر (۱۰ میکرومول) و ۶/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. الگوی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه واسرشت اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به الگو در دمای ۴۰/۸ تا ۶۳/۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (جدول ۲)، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد و به مدت ۱/۳ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ با استفاده از دستگاه الکتروفورز از هم تفکیک شدند. قطعات DNA تکثیر شده به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازبندی و از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوج‌های ژنوتیپی استفاده گردید. جهت به دست آوردن تعداد آلل مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل موثر (N_e)، شاخص شانن (I) و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) از نرم‌افزار GenAlex استفاده گردید. همچنین ترسیم درخت فیلوژنی و نمودار دو بعدی و سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver. 2.02 انجام گردید. جهت تایید گروه‌بندی ارقام، از آزمون T^2 هتلینگ در نرم افزار SAS استفاده گردید. برای محاسبه PIC نیز از نرم‌افزار آنلاین PIC Calculator استفاده گردید.

جدول۱- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده

اسم آغازگر	توالی آغازگر ('۳ → '۵)	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)
F1	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	۶۳/۶
F2	ACA CAC ACA CAC ACA CCG	۵۶/۳
F3	CTC TCT CTC TCT CTC TG	۵۲/۴
F4	GAT AGA TAG ACA GAC A	۴۳/۲
F5	GGG TGG GGT G	۳۶
F6	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	۵۲/۶
F7	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	۵۶/۳
F8	CTC TCT CTC TCT CTA	۴۳/۵
F9	CAG CAG CAG GC	۳۸
F10	GTG TGT GTG TGT CC	۴۳/۷
F11	CAC ACA CAC ACA AC	۴۰/۸
F12	CAC ACA CAC ACA GT	۴۰/۸

نتایج و بحث

دوازده آغازگر مورد استفاده در مجموع ۱۰۶ باند تولید کردند که از این میان ۷۳ باند دارای چندشکلی بودند. بالاترین درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) متعلق به آغازگرهای F6، F8، F9 و F11 بود و کمترین آن (۲۳/۰۷ درصد) متعلق به آغازگر F10 می‌باشد. با توجه به مقدار متوسط درصد چندشکلی بدست آمده (۶۸/۹۸ درصد) و نیز با توجه به اینکه اکثر اکوتیپ‌ها از استان کهگیلویه و بویراحمد بوده و فقط چهار اکوتیپ خارج از استان هستند، لذا عدد بدست آمده بیانگر پراکنش موجود هست، ولی بایستی در پژوهش‌های بعدی گستره نمونه‌برداری را افزایش دهیم.

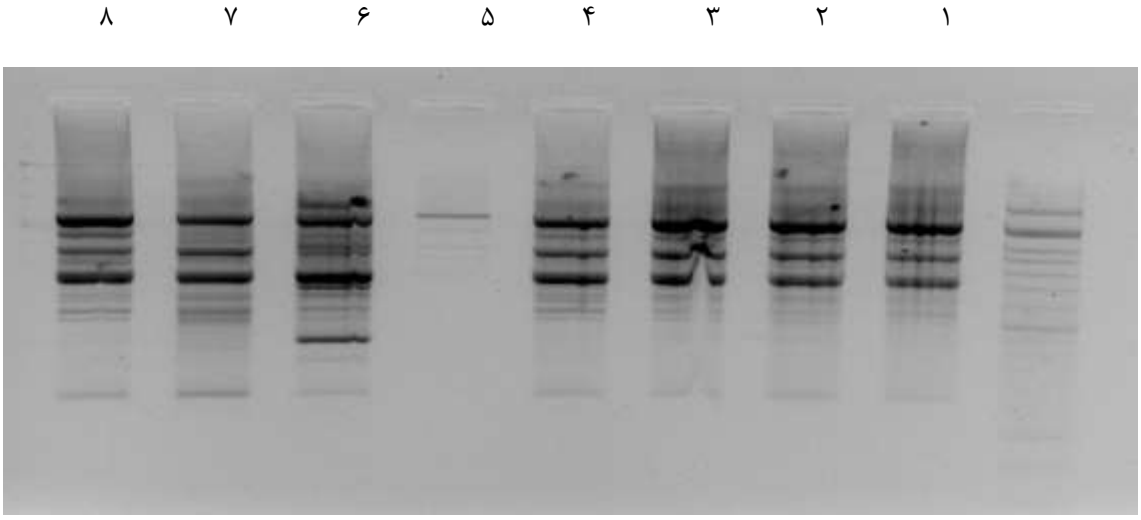
PIC قدرت تفكيك يك نشانگر را بواسطه تعداد آلل‌هاي چندشكل و فراواني نسبي آنها در جمعيت نشان مي‌دهد (Ramachandra and Ravishankar, 2002). در پژوهش حاضر بیشترین مقدار PIC متعلق به دو آغازگر F6 و F11 بود و آغازگر F7 کمترین مقدار این شاخص را دارد. این پارامتر، کارآیی نشانگر مولکولی را در آشکار کردن چندشکلی بین گیاهان مشخص می کند، نشانگرهای مورد استفاده از نظر نشان دادن اطلاعات چندشکلی اطلاعاتی به این صورت دسته بندی میشوند: PIC بزرگتر از ۰/۵ بسیار خوب؛ PIC بین ۰/۲۵ تا ۰/۵نسبتاً خوب و PIC کمتر از ۰/۲۵ ضعیف (Botstein et al., 1980). در این تحقیق بیشترین اطلاعات چندشکلی را دو نشانگر F6 و F11 نشان دادند چون میزان PIC آنها بزرگتر از ۰/۵ است.

شاخص شانون (I) بیانگر میزان تنوع در هر آغازگر می‌باشد. شاخص شانون ممکن است از ۰ تا ۱ باشد ، تنوع ژنتیکی کمتر با مقادیر نزدیک به صفر نشان داده می شود (Silva et al., 2008). مقدار میانگین شانون در این پژوهش ۰/۳۸ بود که در این میان کمترین مقدار به دست آمده مربوط به آغازگر F10 و بیشترین آن مربوط به آغازگر F11 بود. مقدار شاخص شانون در این مطالعه برای اکثر آغازگرها متوسط بود و این امر نشان دهنده انتخاب نسبتا مناسب آغازگرهای به کار رفته در این پژوهش می‌باشد با اینحال دو آغازگر F6 و F11 بهترین آغازگرها از نظر نشان دادن تنوع

در این پژوهش بودند. حداقل و حداکثر آلل موثر (Ne) به دست آمده در این پژوهش، به ترتیب مربوط به آغازگرهای F7 و F11 بود. یکي از معیارهاي مهم در انتخاب آغازگرهاي مناسب، تعداد آلل‌هاي موثر است (Zhu et al., 1998)، بالاترین مقدار آلل موثر متعلق به آغازگرهای F6 و F11 می باشد لذا این دو آغازگر بطور خاص و در مجموع همه آغازگرهای مورد استفاده (با میانگین ۱/۴۵) در بررسی تنوع این گیاه داروئی خوب عمل کرده اند و می‌توان در پژوهش‌های آتی نیز از آنها بهره گرفت. آلل‌های متفاوت (Na) نیز بیان کننده تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد واقعی آلل‌هایی است که در جمعیت پیدا می‌شوند. کمترین مقدار Na، برای آغازگر F10 و بیشترین آن مربوط به آغازگرهای F6، F8، F9 و F11 بود. بطورکلی، تعداد آلل‌های موثر کمتر از تعداد مشاهده شده آلل‌هاست. قدرت نشانگرهای مولکولی معمولا از طریق محاسبه مقدار چندشکلی تعیین می‌شود. این مقدار چندشکلی بیشتر تحت تاثیر مقدار جهش در جایگاه‌های ژن هدف است. آغازگر F8 بیشترین باند چندشکل و آغازگرهای F1 و F5 کمترین تعداد باند چندشکل را تولید کردند. دو آغازگر اخیر برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های چویل مورد بررسی بسیار ضعیف هستند، البته آغازگر F10 نیز چنین است چون از ۱۳ باند تولیدی آن فقط ۳ باند چندشکلی نشان داده و در مجموع درصد چندشکلی بسیار کمی نشان داده است (جدول ۲ و شکل ۱). زیاد بودن تعداد نوار به ازای هر نشانگر، نشان از تنوع زیاد در بین زنوتیپ‌های مورد مطالعه است (Agrama and Tuinstra, 2003). زیاد بودن تعداد نشانگر می‌تواند ناشی از سطح پلوئیدی نیز باشد (Kidwell *et al*, 1994).

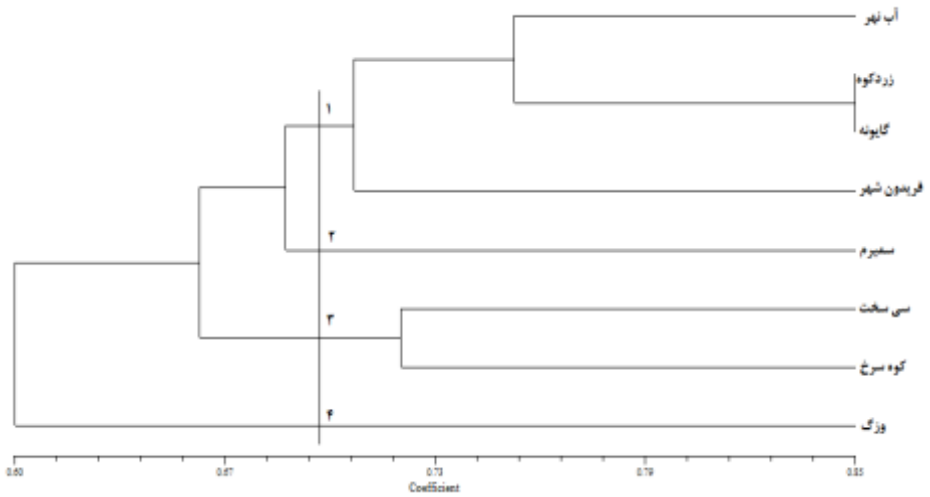
جدول ۲- مقادیر مربوط به شاخص‌های چندشکلی آغازگرهای مورد مطالعه

نام آغازگر	PIC	He	I	Ne	Na	تعداد باند	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی
F_1	۰/۲۱۱	۰/۱۱۹	۰/۱۶۷	۱/۲۲۶	۱/۲۵۰	۴	۱	۲۵
F_2	۰/۳۵۳	۰/۲۷۲	۰/۴۱۲	۱/۴۴۷	۱/۸	۱۱	۹	۸۱/۸۱
F_3	۰/۲۷۴	۰/۲۰۸	۰/۳۲۶	۱/۳۱۵	۱/۷	۱۰	۷	۷۰
F_4	۰/۳۴۵	۰/۲۳۷	۰/۳۳۹	۱/۴۳۱	۱/۵۲۹	۱۷	۹	۵۲/۹۴
F_5	۰/۲۹۹	۰/۲۰۷	۰/۳۰۲	۱/۳۵۴	۱/۵	۲	۱	۵۰
F_6	۰/۵۲	۰/۴۵۰	۰/۶۴۱	۱/۸۳۲	۲	۸	۸	۱۰۰
F_7	۰/۰۹۷	۰/۰۸۱	۰/۱۶۰	۱/۰۹۲	۱/۶۶۷	۳	۲	۶۶/۶۶
F_8	۰/۳۹۸	۰/۳۲۴	۰/۴۹۴	۱/۵۳۴	۲	۱۱	۱۱	۱۰۰
F_9	۰/۴۴۸	۰/۳۶۲	۰/۵۳۵	۱/۶۴۳	۲	۹	۹	۱۰۰
F_{10}	۰/۱۳۹	۰/۰۸۲	۰/۱۲۳	۱/۱۳۸	۱/۲۳۱	۱۳	۳	۲۳/۰۷
F_{11}	۰/۵۲	۰/۴۵۷	۰/۶۵۰	۱/۸۴۲	۲	۶	۶	۱۰۰
F_{12}	۰/۴۲۱	۰/۲۱۴	۰/۳۱۴	۱/۳۸۹	۱/۵۸۳	۱۲	۷	۵۸/۳۳
میانگین	۰/۳۳۵	۰/۲۵۷	۰/۳۸۰	۱/۴۵۰	۱/۶۸۹	۸/۸۳	۶/۰۸	۶۸/۹۸

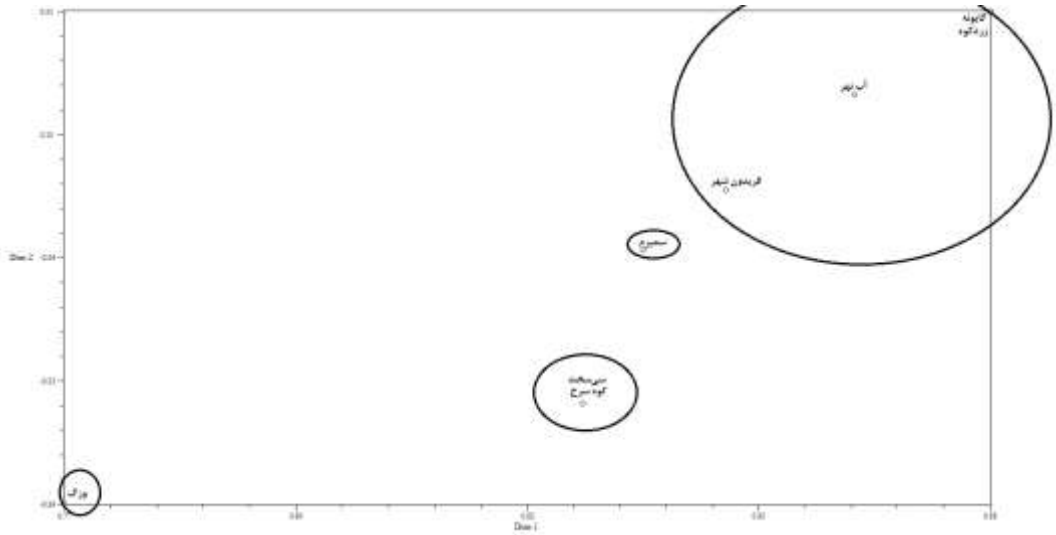


شکل ۱- الگوی باندی ۸ اکوتیپ چویل با آغازگر F8 بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، چاهک‌های ۱ تا ۸ به ترتیب: ۱- آبنهر، ۲- زردکوه، ۳- گایونه، ۴- سی سخت، ۵- وزگ، ۶- کوه سرخ، ۷- سمیرم و ۸- فریدون شهر و M نشانگر راهنما (50-1500bp، ساخت شرکت سیناژن)

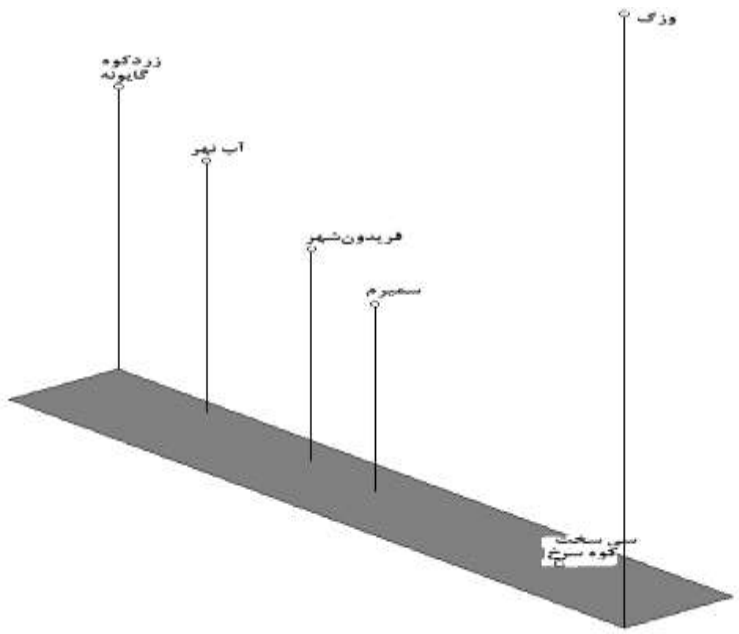
خط برش در دندروگرام از محل فاصله ژنتیکی ۰/۶۹۲، بهترین گروه‌بندی را نشان داد که توسط آزمون T^2 هتلینگ و CCC تعیین گردید (شکل ۲). بر این اساس، با رسم خط برش در محل تعیین شده بر روی نمودار، چهار گروه ایجاد گردید که شامل گروه‌های: (۱) شامل سه زیر گروه می‌باشد: الف) آب نهر، ب) زردکوه و گایونه و ج) فریدون شهر، (۲) سمیرم، (۳) سی‌سخت و کوه سرخ و (۴) وزگ می‌باشند. اکوتیپ‌های استان کهگیلویه و بویراحمد (آب نهر، گایونه، سی سخت و وزگ در سه گروه مختلف پراکنده شده اند. آب نهر و گایونه در گروه یک قرار گرفته‌اند ولی دو اکوتیپ دیگر یعنی سی سخت و وزگ به ترتیب در گروه ۳ در کنار اکوتیپ کوه سرخ و در گروه ۴ قرار گرفته اند. تجزیه خوشه‌ای یک روش آماری چند متغیره جهت گروه‌بندی افراد بر اساس میزان تشابه آنهاست و افراد مشابه از نظر نشانگرهای مورد بررسی، در یک خوشه کنار هم قرار می‌گیرند. ولی باید توجه داشت که درخت ترسیم شده بیشتر ژئومتریک است تا عددی و لذا ممکن است صحت و دقت یک بخش از درخت کمتر یا بیشتر از صحت بخش‌های دیگر باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸) و همین مسئله موجب می‌شود تا برای بررسی صحت گروه بندی به بررسی پراکنش دو بعدی و سه بعدی اکوتیپ‌ها نیز پرداخته شود. پراکنش اکوتیپ‌ها در نمودارهای دو بعدی (شکل ۳) و سه بعدی (شکل ۴) نیز نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید کردند. نتایج گروه بندی مطالعه حاضر با نتایج زبرجدی و همکاران (۲۰۱۶) از جهت عدم تطابق گروه‌بندی مولکولی با محل جمع آوری اکوتیپ‌ها همخوانی دارد.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای



شکل ۳- پلات دو بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی برای نشانگرهای ISSR در اکوتیپ‌های چویل موردمطالعه



شکل ۳- پلات سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی برای نشانگرهای ISSR در اکوتیپ‌های چویل موردمطالعه

فاصله ژنتيكي بين دو موجود به منزله تفاوت قابل توجيه بين آن دو موجود با استفاده از تنوع آللي است. به عبارت ديگر فاصله ژنتيكي بيانگر ميزان تفاوت‌هاي ژني بين جمعيت‌ها يا گونه‌هاست كه با استفاده از برخي كميت‌هاي عددي قابل اندازه گيري مي‌باشد (رمضانی و رحیمی، ۱۳۹۶). جالب است که در این پژوهش بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو اکوتیپ آب نهر و وزگ وجود دارد که هر دو متعلق به استان کهگیلویه و بویراحمد می باشند در حالیکه کمترین فاصله ژنتیکی بین دو اکوتیپ گایونه و زردکوه است که یکی متعلق به استان کهگیلویه و بویراحمد و دیگری متعلق به استان چهار محال و بختیاری می‌باشد. دو اکوتیپ متعلق به استان اصفهان (فریدون شهر و سمیرم) نیز در دو گروه مختلف واقع شده اند. این وضعیت گروه-بندی اکوتیپ‌ها، احتمال مهاجرت آنها بین چهار استان مجاور (اصفهان، چهار محال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد و فارس) را تقویت می‌کند ولی متاسفانه گزارشی در این خصوص موجود نیست تا در مورد میزان صحت این ادعا بتوان قضاوت نمود. چندشکلی نسبتا بالا در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای نشانگر ISSR و پراکندگی جغرافیایی نسبت داد. این میزان چندشکلی از یک طرف نشان دهنده کارایی کاربرد این نشانگرها در مطالعه اکوتیپ‌های چویل و از طرف دیگر نشان دهنده توزیع جغرافیایی این گیاه می‌باشد.

نتيجه گيري كلي

ذخاير ژرم پلاسم گياهي گنجينه‌هاي ارزشمندی در دست بشر بوده و به طلای سبز مشهورند که بصورت وحشي در طبيعت وجود دارند. اطلاعاتي كه بشر در مورد مصارف داروئی و تغذیه ای آنها کسب کرده نیز بسیار گرانبها می باشند. ارزیابی تنوع ژنتيكي گياهان داروئی کشور در جهت

شناسایی و حفاظت از آنها از پژوهشهای پایه‌ای و ضروری در هر کشور می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهاي مولكولي نيز يك روش مطمئن و سريع بوده و اطلاعات حاصل از آن می‌تواند در طراحی انواع برنامه‌هاي بهنژادی نقش مهمي ايفا كند. نتايج اين پژوهش بيانگر وجود تنوع نسبتا بالا در يبن اكوتيپ‌هاي مورد بررسي چويل است ولی چون بسیاری از اکوتیپ‌های این گیاه داروئی هنوز شناسایی و جمع‌آوری نشده، لذا لازم است این پژوهش با استفاده از اکوتیپ‌های کل کشور و همچنین بررسی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی تکمیل گردد.

منابع

ابرازه، م. (۱۳۸۳). بررسی برخی از خصوصیات اکولوژیکی چویل (*Ferulago angulata*) در منطقه حفاظت شده دنا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

رمضانی، م. و رحیمی، م. (۱۳۹۶). گروه بندی و ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ هایی مختلف گیاه داروئی *Plantago psyllium* L. با استفاده از نشانگر ISSR. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۰(۲)، ۱۴۱-۱۵۱.

زنگنه، ک.، فاخری، ب.، اروجی، ف.، افضلی‌فر، ا. و مخدومی م.ا. (۱۳۹۵). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌هایی از گیاه داروئی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. زیست فناوری گیاهان داروئی، ۲(۴)، ۱۰-۲۰.

فاطمی فرد، س. ز. و معصومی اصل، ا. (۱۳۹۸). استخراج DNA نمونه های خشک شده گیاه و قارچ با روشی سریع، ایمن و بدون استفاده از نیتروژن مایع. فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی، ۱۴(۳)، ۱۹-۲۷.

مظفریان، و. (۱۳۹۲). شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران. ناشران فرهنگ معاصر، ۱۳۰۰ ص.

نعمت زاده، ق. و کیانی، غ. (۱۳۹۰). اصلاح نباتات (روشهای مولکولی). نشر آوای مسیح و انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. چاپ اول. ۳۲۶ص.

نقوی، م.ر. ، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۸). نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۶۰ ص.

Agrama, H.A. and Tuinstra, M.R. (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology, 2, 334-340.

Alansi, S., Tarroum, M., Al-Qurainy, F., Khan S. and Nadeem, M. (2016). Use of ISSR markers to assess the genetic diversity in wild medicinal *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. collected from different regions of Saudi Arabia. Biodiversity and Ecosystems, 30(5), 942-947.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32, 314-331.

Kidwell, K.K., Austin, D.F. and Absorn, T.C. (1994). RFLP evaluation of nine Medicago accessions representing the original germplasm sources of North American alfalfa cultivars. Crop Science, 34, 230-236.

Lörz, H. and Wenzel, G. (2005). Biotechnology in Agriculture and Forestry: Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Springer, NewYork.

Ramachandra, R.S. and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20, 101-153.

Rameshkumar, R., Pandiana, S., Rathinapriya, P., TamilSelvi, Ch., Satishb, L., Gowrishankar, Sh., Leung D.W.M and Ramesh, M. (2019). Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Nilgirianthus ciliatus* populations using ISSR and RAPD markers: Implications for conservation of an endemic and vulnerable medicinal plant. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18, 101072.

Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R. T., Nunes, R.S., Carvallo, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marcal, R.M., Cavalcanti, S.C.H. (2008). Effects of essential oils on Aedes aegypti larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresources Technology, 99, 3251-3255.

Taran, M., Ghasempour, H.R. and Shirinpour, E. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. Carduchorum. Jundishapur Journal of Microbiology, 3, 10-4.

Zebarjadi, A.R., Rostami Ahmadvandi, H., Kahrizi, D. and Cheghamirza, K. (2016). Assessment of Genetic Diversity by Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Primers on Iranian Harmal (*Peganum harmala* L.) Germplasm as an Important Medicinal Plant. Journal of Applied Biotechnology Reports. 3(3), 441-445.

Zhu, J., Gale, M.D. and Guarrie, S. (1998). AFLP markers for the study of rice biodiversity. Theoretical and Applied Genetic, 96, 602-611.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 5, No 2, Autumn & Winter 2020

Investigating the genetic diversity of some of Chavil medicinal plant ecotypes using ISSR molecular markers

Soheila Boostani[1], Asad Masoumiasl[1]*, Masoud Dehdari[1]

Abstract

Chavil is one of the most important medicinal plants and although there are different accessions of it in Iran, there is no report on the study of its genetic diversity. In this study, molecular markers were used to evaluate the genetic diversity of eight Chavil ecotypes. After preparing the ecotypes from habitats and Isfahan Pakan Bazr Company, DNA extraction was performed and then the polymerase chain reaction was performed using 12 ISSR primers and the obtained molecular data were analyzed. The polymerase chain reaction produced bands using used primers its polymorphism content were varied from 23 to 100 percent. The F6, F8, F9 and F11 primers showed the highest and the F10 primer showed the lowest polymorphism percentage. Also, the highest PIC values were obtained for F6 and F11 primers. The average Shannon index in this study was 0.38, with the lowest data for the F10 primer and the highest for the F11 primer. The cluster analysis of molecular data divided the eight ecotypes into four different groups. The highest genetic similarity between Zardkooh and Gayoneh ecotypes and the lowest genetic similarity between Wezg and Abnahr ecotypes was observed. Ecotypes migration between four neighboring provinces of Chaharmahal and Bakhtiari, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad, Fars and Isfahan appears to have taken place. The present study showed that the ISSR markers were appropriate for the study of the genetic diversity of Chavil.

Keywords: Medicinal plant, Cluster analysis, Polymorphism, PCR

[1] Agronomy and Plant Breeding Dep. Yasouj University, Iran. * Corresponding author: masoumiasl@yu.ac.ir