



Original Article

## Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in *Hedera L.* (Araliaceae) Germplasm by RAPD Markers

Somayeh Esfandani-Bozchaloyi \* 1

1. Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article history

Submitted: 2025-1-2

Revised: 2025-2-12

Accepted: 2025-3-28

### KEYWORDS

Gene flow, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Hedera* cultivars

### ABSTRACT

Assessing the genetic diversity in the population is the prerequisite to start and develop plant breeding projects. The genus *Hedera L.* occupies forest understories and riparian vegetation in temperate latitudes throughout Europe, North Africa and Asia. Therefore, we collected and analyzed 35 *Hedera* genotypes, from five provinces of Iran. Our objectives were 1) to assess genetic diversity among some Iranian *Hedera* cultivars, 2) to examine the correlation between the genetic and geographical distance of species, and 3) to study the genetic structure of populations and taxa. Significant differences in quantitative morphological characters in plant species were found. *Hedera colchica* demonstrated unbiased expected heterozygosity (UHe) in the range of 0.19. High Shannon index (0.39) was observed in *Hedera helix* cultivars while *Hedera colchica* cultivars showed the lowest value, 0.23. Gene flow (Nm) was relatively low (0.29) in *Hedera* cultivars. The Mantel test showed significant correlation ( $r = 0.86, p = 0.0001$ ) between genetic and geographical distances. According to the findings, a high genetic diversity exists, which clearly shows that some Iranian *Hedera* cultivars can adapt to changing environments since high genetic diversity is linked to species adaptability. Current results highlight the utility of RAPD markers and morphometry methods to investigate genetic diversity among *Hedera* cultivars.

\* Corresponding author: *Somayeh Esfandani-Bozchaloyi*


✉ E-mail: [somayehesfandani@znu.ac.ir](mailto:somayehesfandani@znu.ac.ir)



مقاله پژوهشی

## تشخیص پلی مورفیسم DNA و تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسِم جنس *Hedera* با

### نشانگر RAPD

سمیه اسفندانی بزچلوبی 

۱. دانش آموخته دکترای زیست شناسی سیستماتیک گیاهی، پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

#### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۳-۱۰-۳۰  
بازنگری: ۱۴۰۳-۱۱-۲۳  
پذیرش: ۱۴۰۴-۱-۱۵

**چکیده:** عشقه گیاهی است پیچنده، بالارونده، با برگ‌های کوچک، سبز و قلبی شکل که در صورت نزدیک بودن به درخت، دیوار، داربست یا صخره از آن بالا می‌رود؛ در غیر این صورت روی زمین می‌خزد و به عنوان گیاه پوششی عمل می‌کند. جهت درمان زخم‌ها، به عنوان خلط آور و به علت سایونین‌های استروئیدی موجود در آن به عنوان محرک جنسی استفاده می‌شود. برگ این گیاه اثر صفراور، تصفیه‌کننده خون و خلط آور داردارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت، پیش‌نیاز شروع و توسعه پروژه‌های اصلاح نباتات است. جنس *L. Hedera* در مناطق جنگلی و ساحلی در عرض‌های جغرافیایی معتدل در سراسر اروپا، شمال آفریقا و آسیا را دربرمی‌گیرد. از این رو ۳۵ ژنوتیپ *Hedera* از پنج استان ایران جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان برخی از ژنوتیپ‌های *Hedera* ایرانی، بررسی همبستگی بین فاصله ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌ها و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌ها می‌باشد. گونه *Hedera colchica* هتروزیگوسیتی مورد انتظار (UHe) را در محدوده (۰/۱۹) نشان داد. گونه *Hedera helix* دارای اندکس شانون بالا (۰/۳۹) در حالیکه ارقام *Hedera colchica* با ۰/۲۳ کمترین مقدار را نشان دادند. جریان ژن (Nm) نسبتاً کم در بین ژنوتیپ‌های *Hedera* مشاهده شد (۰/۲۹). آزمون منتل همبستگی معنی‌داری ( $r=86/0$   $p=0.0001$ ) را بین فواصل ژنتیکی و جغرافیایی نشان داد. بررسی‌های این تحقیق تنوع ژنتیکی بالایی را گزارش می‌دهد، که به وضوح در میان برخی از ژنوتیپ‌های *Hedera* ایرانی می‌تواند با محیط‌های متغیر سازگار شوند، زیرا تنوع ژنتیکی بالا با سازگاری گونه‌ها مرتبط است. نتایج حاضر کارایی کاربرد نشانگرهای RAPD را برای بررسی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های *Hedera* نشان می‌دهد.

#### واژگان کلیدی:

جریان ژن، DNA چندشکلی تکثیر شده تصادفی (RAPD)، *Hedera*

\*نویسنده مسئول: سیمیه اسفندانی بزچلوبی

## مقدمه

می کند (Meusel et al., 1965; Mabberley, 1997) مقالات .

تاکسونومیکی در ارتباط با جنس *Hedera* که در نیمه دوم قرن بیستم منتشر شد، بین سه تا ۱۹ گونه را شناسایی کرد (Seemann, 1868; Tobler, 1912; Lawrence and Schulze, 1942; Pojarkova, 1951). مطالعات مولکولی و سیتوژنتیک سابق دو مرکز اصلی تنوع را در بخش‌های شرقی و غربی منطقه مدیترانه برای *Hedera* شناسایی کردند. تجزیه و تحلیل صریح از صفات کلیدی برای بررسی الگوهای جغرافیایی و وضعیت خصوصیات اجدادی دودمان پیچک انجام شد. جالب اینجاست که بیشترین تنوع *Hedera* در غرب مدیترانه یافت شده است. از زمان مک آلیستر و رادرفورد، شناسایی و تعیین حدود گونه‌های *Hedera* عمدتاً بر اساس ترکیبی از مورفولوژی کرک‌ها (ستاره‌ای-چند گوشه‌ای، ستاره‌ای-چرخشی، و موی فلس مانند (stellate-multiangulate, stellate-rotate, and scale like hairs; Seemann, 1868; Lum and Maze, 1989; McAllister and Rutherford, 1990; Ackerfield and Wen, 2002; Valca'rcel and Vargas, 2010)،

تنوع ژنتیکی یک ویژگی حیاتی است که به گونه‌های گیاهی کمک می‌کند در یک محیط دائماً در حال تغییر زنده بمانند، و قرابت فیلولوژنتیکی را در بین گونه‌ها روشن می‌کند (Erbano et al., 2015). تعداد قابل توجهی از برنامه‌های ژنتیکی برای حفظ گونه‌های گیاهی در سراسر جهان انجام شده است. داده‌های علمی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی نقش محوری در برنامه‌های حفاظت ایفا می‌کند (Gomez et al., 2005). عشقه گیاهی است پیچنده، بالارونده، با برگ‌های کوچک، سبز و قلبی شکل که در صورت نزدیک بودن به درخت، دیوار، داربست یا صخره از آن بالا می‌رود؛ در غیر این صورت روی زمین می‌خزد و به عنوان گیاه پوششی عمل می‌کند. عشقه پیچک، پاپیتال و داردوست، از دیگر اسامی رایج این گیاه در زبان فارسی است.

جنس *Hedera* L. مناطق جنگلی و پوشش گیاهی ساحلی را در عرض‌های جغرافیایی معتدل در سراسر اروپا، شمال آفریقا و آسیا اشغال

(e.g., 1996). چندین نویسنده (Lawrence & Schulze, 1942) تاکسون را به عنوان *H. helix* subsp. *hibernica*، می شناسند، در حالی که دیگران آن را به عنوان یک گونه متمایز می شناسند (Bean, 1915; Mcallister, 1990; Rose, 1996). Mcallister (1990) تفاوت در تعداد کروموزوم بین *H. helix* subsp. *helix* و *H. hibernica* را گزارش کرد. گونه های آسیایی *Hedera* از نظر تاکسونومیکی نسبتاً کم مورد توجه قرار گرفته اند (Rutherford et al., 1993). اکثر نویسندگان چهار گونه از آسیا را شناسایی کرده اند: *H. nepalensis* var. *nepalensis*, *H. nepalensis* var. *sinensis*, *H. pastuchovii*, and *H. rhombea* ریخت شناسی کرک یا Trichome به طور گسترده ای برای تعیین تاکسون ها در *Hedera* استفاده شده است (Seemann, 1868; Lawrence & Schultze, 1942; Mcallister, Ackerfield, 1981; Rose, 1996) Wen, (2002) & بر اساس شواهد cpDNA، ولدین مادر را برای چندین گونه آلوپلیپلوئید فرض کردند. فیلوژنی ITS (Vargas et al., 1999) نشان

های جوان (از کامل تا ۳-۷ لوب)، (from entire to 3-7 lobate; Rutherford et al., 1993; Ackerfield and Wen, 2002; Valca'rcel and Vargas, 2010) و سطح پلوئیدی از ۲۹-۸۹ (from 29 to 89; Vargas et al., 1999). است.

فرآورده های حاصل از عشقه از ریشه و جوانه های بلند و نازک آن به نام مویه های ریشه تهیه می شوند. عناصر ترکیبات شیمیایی اصلی موجود در عشقه آسیایی عبارت است از جنسنوید (با نشان Rg1 گلوکان (پانکراس)، پلی ساکارید ۲-۳ DPG، پپتید، مالتول و رغن مایع. از این گیاه جهت درمان زخم ها، به عنوان خلط آور و به علت ساپونین های استروئیدی موجود در آن به عنوان محرک جنسی استفاده می شود. برگ این گیاه اثر صفرابر، تصفیه کننده خون و خلط آور دارد و از آن در درمان سیاه سرفه، التهاب نای، برونشیت های مزمن، روماتیسم و نفرس، ترشحات مهلبلی و پایین آوردن فشار خون استفاده می شود.

وضعیت *Hedera hibernica* نیز بحث برانگیز بوده است (Rose,

تصادفی) برای تشخیص تنوع در بین افراد گونه‌ها حساسیت بیشتری نشان می‌دهد. نشانگر RAPD مقرون به صرفه است و می‌تواند با مقادیر نمونه محدود کار کند. علاوه بر این، RAPD می‌تواند مناطق ژنومی با پتانسیل و چندین نشانگر را تقویت و هدف قرار دهد (Esfandani-Bozchaloyi et al., 2017). مطالعات تاکسونومیکی در گذشته برای شناسایی ژنوتیپ‌های ایرانی *Hedera* انجام شده است. تا کنون در مورد این جنس، هیچ داده RAPD در مورد بررسی‌های تنوع ژنتیکی در ایران وجود ندارد. ۳۵ نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. هدف از این تحقیق ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های ایرانی *Hedera* بررسی همبستگی بین ژنوتیپ‌ها و فاصله جغرافیایی، و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌ها می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی

سی و پنج نمونه متعلق به *Hedera helix* و *Hedera colchica* از پنج استان کرمانشاه، گرگان، تهران، مازندران و گیلان جمع‌آوری شدند (جدول ۱، شکل ۱). برای شناسایی

می‌دهد که هگزاپلوئید *H. maderensis* subsp. *iberica* (2n=144) در نتیجه دورگ‌گیری بین یک تاکسون دیپلوئید با موهای قرمز مایل به قرمز (احتمالاً *H. canariensis* به عنوان جد مادری) و تتراپلوئید *H. hibernica* (2n=96) ایجاد شده است. ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی ارزش تشخیصی خوبی برای شناسایی بسیاری از گونه‌ها، اساساً در سطح گونه‌ها هستند. تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی گرده با موفقیت به عنوان یک سند اضافی برای تعیین حدود گونه استفاده می‌شود (Amini et al. 2018; 2019).

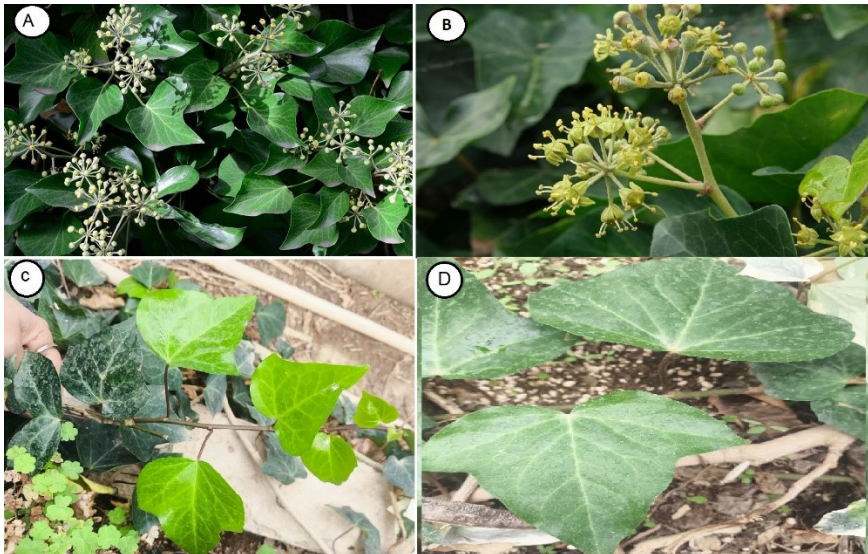
Punt و Van Helvoort (۱۹۸۴) در فلور گرده اروپای شمال غربی اشاره کردند که گرده جنس هدرا 3-zonocolporate است، زیر عمود تا نیمه ایستاده با تزئینات مشبک. مطالعات تنوع ژنتیکی معمولاً با استفاده از نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نشانگرهای مولکولی روشی عالی برای فهم ارتباط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها و جمعیت‌ها می‌باشند. در میان روش‌ها یا نشانگرهای مولکولی، نشانگر RAPD (DNA چند شکلی تکثیر شده

McAllister and Rutherford,  
1990; Ackerfield and Wen,  
2002)

صحیح گونه های *Hedera* از مراجع  
مختلفی استفاده شد (Seemann,  
1868; Lum and Maze, 1989;

جدول ۱. فهرست گونه های *Hedera* که برای ارتباط ژنتیکی با استفاده از سیستم نشانگر RAPD در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

No	Sp.	Locality
Sp1	<i>Hedera helix</i> L.	Kermanshah; Paveh
Sp1	<i>Hedera helix</i> L.	Gorgan; Ziyarat Village
Sp1	<i>Hedera helix</i> L.	Tehran, Darakeh
Sp2	<i>Hedera colchica</i> (K.Koch) K.Koch	Giulan; Talesh
Sp2	<i>Hedera colchica</i> (K.Koch) K.Koch	Giulan; Astara; Lisa Rood
Sp2	<i>Hedera colchica</i> (K.Koch) K.Koch	Mazandaran; Ramsar



شکل ۱: A, B: گل آذین *Hedera helix*; C, B: نمایی از برگ *Hedera helix*

### ژنوتیپ‌سنجی با نشانگر RAPD

ابتدا DNA از برگ های تازه استخراج شدند. بدین منظور برگها به روش های مختلف خشک شدند. استخراج DNA طبق پروتکل قبلی انجام شد (Esfandani-Bozchaloyi et al., 2019). DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. DNA با کمک پرایمرهای RAPD (تکنولوژی Operon، Alameda، کانادا) تکثیر شدند. این پرایمرها متعلق به مجموعه های OPA، OPB، OPC، OPD (جدول ۲). پرایمرهایی انتخاب شدند

که می توانستند نوارهای شفاف و پلی مورفیسم را نشان دهند (جدول ۲). به طور کلی، واکنش زنجیره ای پلیمرز حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم بود (جدول ۳). واکنش های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ میلی مولار بافر Tris-HCl در pH= ۸ انجام شد. ۵۰ میلی مولار KCl؛ ۱/۶ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTP (Bioron، آلمان)؛ ۰/۴ میکرومولار از یک پرایمر واحد؛ ۲۰ نانوگرم DNA Taq DNA و 1U از انزیم (جدول ۳-۴) پلیمرز (Bioron، آلمان) استفاده شد. چرخه ها و شرایط زیر را

میکرولیترا از هر نمونه DNA Stock) نمونه رقیق نشده DNA) در داخل چاهک های ژل آگارز بارگذاری شد. سپس ژل بارگذاری شده در تانک الکتروفورز تحت جریان ۱۰۰ ولت قرار گرفت، هنگامی که باندهای DNA به میانه ژل رسید جریان برق از تانک الکتروفورز قطع شده و از ژل مربوطه با دستگاه UV-transilluminator تصویرگیری تهیه شد. باندهایی که در بالا قرار گرفته اند در واقع نشان دهنده DNA هستند که وزن مولکولی بالایی دارند. در این ارزیابی از لدر ۱۰۰ bp (Fermentas، آلمان) به عنوان نشانگر استفاده شد.

برای تکثیر DNA ژنومی مشاهده کردیم. پنج دقیقه مرحله اولیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد پس از این چهل چرخه ۱ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد مشاهده شد. سپس چرخه ۱ دقیقه ای در دمای ۵۷-۵۲ درجه سانتی گراد و سپس دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. در نهایت مرحله نهایی اکستنشن به مدت هفت تا ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد (جدول ۴). پس از انجام مراحل استخراج DNA از نمونه های مورد مطالعه، به منظور بررسی کیفیت DNA، از روش ژل آگارز و دستگاه الکتروفورز استفاده گردید. مقدار ۵

جدول ۲. نشانگرهای RAPD و سایر پارامترها: TNB - تعداد باندهای کل، NPB: تعداد باندهای چندشکلی، PPB (%): درصد باندهای چندشکلی، PI: شاخص چندشکلی، EMR، نسبت چندتایی موثر. MI، شاخص نشانگر؛ PIC، محتوای اطلاعاتی چندشکلی برای هر یک از آغازگرهای CDBP.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	TN B	NP B	PPB	PIC	PI	EMR	MI
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	10	10	100.00%	0.22	4.19	10.5 5	3.6 6
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'	9	9	100.00%	0.17	3.22	4.55	4.7 8
OPD-02	5'-GGACCCAACC-3'	11	11	100.00%	0.1 9	3.1 7	5.33	2.2 9
OPD-03	5'-GTCGCCGTCA-3'	18	16	88.88%	0.4 2	3.4 9	7.55	5.2 2

OPD-05	5' TGAGCGGACA-3'	-	15	12	80.00%	0.4	3.6	6.67	4.9
						6	6		9
Mean			12.6	11.6	90.24%	0.3	3.7	7.5	4.2
						5			
Total			63	58					

جدول ۳- برنامه دمایی PCR-RAPD مورد استفاده در تاکسون های جنس *Hedera*

تعداد سیکل	زمان و دما	مرحله
۱	۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد	واسرشت اولیه (First Denaturation)
	۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد	واسرشت (Denaturation)
۴۰	۱ دقیقه در دمای ۵۷-۵۲ درجه سانتیگراد	اتصال (Annealing)
	۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد	توسعه (Extension)
۱	۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد	توسعه نهایی (Final Extension)

جدول ۴- مواد و حجم محلول PCR-RAPD مورد استفاده در تاکسون های جنس *Hedera*

غظت نهایی	مقدار مورد نیاز برای حجم	غظت محلول ذخیره	اجزای واکنش
	23μL		
-	18 μL	-	Steriled ddH2O
1 X	2.5 μL	10 X	PCR buffer
1.6 mM	0.7 μL	100 mM	MgCL2
200 μ M(each)	0.5 μL	10m M(each)	dNTP
0.4 μM	1 μL	10 μM	Primer
1 U / μL	0.5 μL	5 U / μL	Enzyme
	2 μL	-	DNA

### تجزیه و تحلیل داده ها

### بررسی های آماری بخش مطالعه

### تنوع مولکولی RAPD

باندهای مشاهده شده به صورت

صفات دو حالتی کد گذاری شدند (

حضور = ۱ ، عدم حضور = ۰

(پارامترهای تنوع ژنتیکی (Shen et

al., 2017) از جمله تعداد آللهای

(2000). برای پرهیز از اشتباهات احتمالی محاسباتی در تعیین اختلاف معنی دار، مقادیر Fst و آنالیز AMOVA برای داده های RAPD توسط نرم افزار Hickory (ver.1) در میان جمعیت ها به صورت دو به دو (جفت شده) محاسبه شد. همچنین به منظور بررسی تبادلات ژنی بین جمعیت ها آنالیز Reticulation با نرم افزار DARwin (2012) ver. 5 انجام شد. برای آزمون Reticulation یک درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش NJ ساختیم و با انشعاب که میزان حداقل مربعات (Least - square) را در هر مرحله از الگوریتم به حداقل میرساند آنالیز را ادامه دادیم. طبقه بندی پیوستگی ژنتیکی جمعیت ها با دو روش بررسی شد. ابتدا آنالیز STRUCTURE انجام شد. STRUCTURE Harvester برای متصور ساختن نتایج STRUCTURE و همچنین برای انجام روش Evanno به منظور شناسایی گروه های ژنتیکی متمایز در جمعیت مطالعه شده از K استفاده شد (Pritchard et al. 2000;

موثر، اندیس شانون، هتروزیگوتی و میزان پلی مورفیسیم در هر جمعیت مشخص شد (Ismail et al., 2019). محاسبه فاصله ژنتیکی Nei's در میان جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از خوشه بندی Neighbor Joining (NJ) و روش شبکه ای NeighborNet با 1000 بار بوت استرپ (Huson and Bryant, 2006; Freeland et al., 2011) استفاده شد. دو روش برای مشخص شدن تفاوت ژنتیکی معنی دار در میان جمعیت های مورد مطالعه و استان ها بکار گرفته شد:

۱. آزمون AMOVA (Analysis of molecular variance) که توسط نرم افزار GenAlex ver. 6,4 انجام شد (Peakall and Smouse 2006).
۲. پارامترهای جدید تمایز Gest و Dest با GenoDive ver.1 (2013) محاسبه شدند (TFPGA; Miller, 1997).
۳. آزمون Mantel برای مطالعه ارتباط بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار PAST و GenAlex انجام شد (Podani

پنهان موجود در پس زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت ها را نیز مورد ارزیابی قرار می دهد برای این منظور از نرم افزار LFMM Ver. 1.2 استفاده شده است. از جمله نرم افزارهای آماری دیگر مورد استفاده در این مقاله برای رسم خوشه ها و گراف ها می توان به نرم افزارهای زیر اشاره کرد: (Hammer et al., 2001).

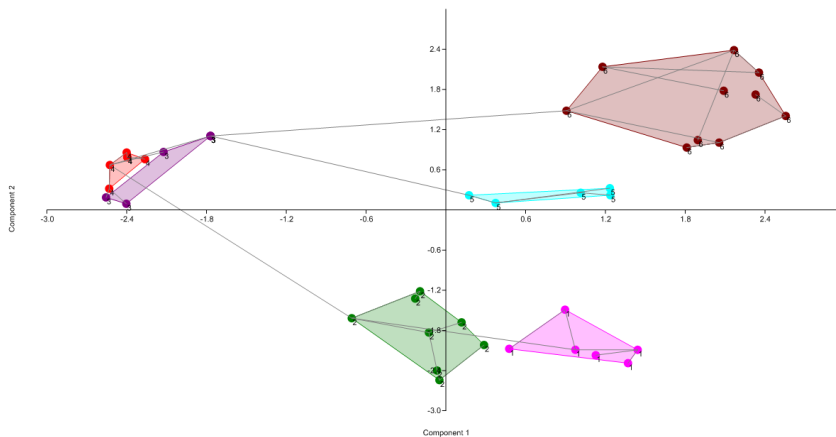
PAST ver. 2.17, DARwin ver. 5, SplitsTree4 V4.13.1

### نتایج

#### مورفومتری

خصوصیات مورفولوژیکی دو گونه *Hedera* در نمودار PCA نشان داده شده است (شکل ۲). هر گونه بر اساس خصوصیات ریخت شناسی گروه های جداگانه ای تشکیل دادند. تجزیه و تحلیل ریختی تفاوت واضحی را بین گونه های *Hedera* نشان داد و هر گروه را جدا کرد.

(Falush et al. 2007). شناسایی گروه های ژنتیکی متمایز در جمعیت مطالعه شده (K)، احتمالات لگاریتم داده ها را برای هر مقدار k انجام میدهد (Meirmans, 2012). خوشه بندی K-Means در نرم افزار GenoDive ver. 1. (2013) که نتیجه ی این تست با استفاده از دو پارامتر pseudo-F-1 و 2- Bayesian مشخص شد. جهت گروه بندی افراد و جمعیت ها از PCoA (Principal coordinate analysis) استفاده شد. آنالیز- (MDS) (metric multidimensional scaling) ) برای فاصله ژنتیکی جمعیت ها با استفاده از برنامه PAST ver. 2,17، استفاده شد. در این تحقیق از روش LFMM که نشان دهنده ارتباط بین تنوعات ژنتیکی و شرایط زیست محیطی می باشد نیز استفاده شد. (Yeh et al., 1999)، این روش برآوردی از اثر عامل های



شکل ۲. نمودار PCA از ژنوتیپ های گونه *Hedera* بر اساس خصوصیات ریختی.

### شناسایی گونه ها و تنوع ژنتیکی

بیست و پنج نشانگر RAPD با ده ژنوتیپ *Hedera* به عنوان الگوهای DNA مورد آزمایش قرار گرفتند. همه پرایمرها باند های چند شکلی تولید کردند و فقط پرایمرهایی که الگوهای باند واضح و قابل تکرار را نشان می دادند برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند. اندازه قطعات تکثیر شده بین ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز بود. سپس پنج نشانگر برای شناسایی ژنوتیپ ها و تجزیه فیلوژنتیک انتخاب شدند. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، هر پنج نشانگر برای تجزیه و تحلیل RAPD استفاده شده است. در مجموع ۶۶ باند چندشکلی تولید و

تکثیر شدند. بالاترین باندهای چندشکلی را برای OPD-03 ثبت کردیم. OPC-04 کمترین باندهای چندشکلی را داشتند. میانگین باندهای چند شکلی برای هر نشانگر تا ۱۲ عدد متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) دارای مقادیری در محدوده ۰/۱۷ تا ۰/۴۶ (OPD-05) بود. پرایمرها دارای میانگین ارزش محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۳۵ بود.

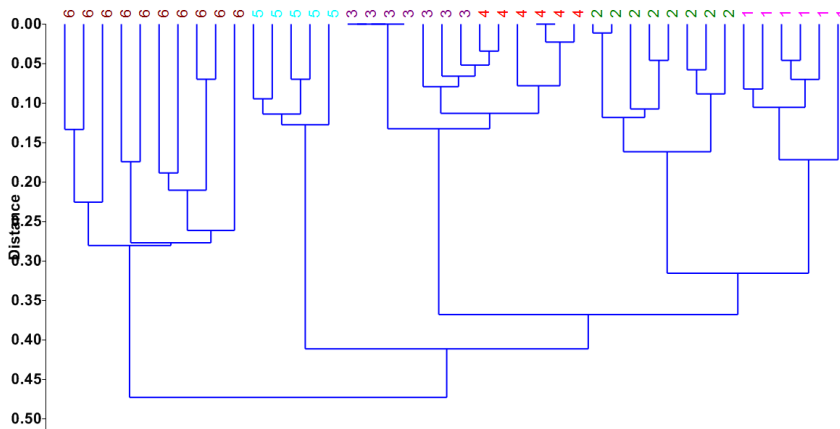
مقادیر شاخص نشانگر از محدوده (MI) ۲/۲۹ (OPD-02) تا ۵/۲۲ (OPD-03) بود. میانگین ۴/۲ در هر پرایمر. مقادیر نسبت چندگانه موثر (EMR) برای تشخیص ژنوتیپ ها مفید است. در این مطالعه،

داد که ۶۵ درصد تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ ها رخ می دهد. تنوع ژنتیکی کمتر (۰/۳۵) درون ژنوتیپ ها گزارش شد. تشابه و عدم تشابه ژنتیکی ارزیابی شده از طریق آمار ژنتیکی (GST) تفاوت معنی داری را نشان داد، یعنی (0.222, P = 0.001) و مقادیر  $D_{est}$  (0.137, p = 0.001). علاوه بر این، AMOVA تفاوت ژنتیکی معنی داری را تقریباً در بین تمام ژنوتیپ های مورد مطالعه نشان داد. این نتایج نشان می دهد که ژنوتیپ های *Hedera* از نظر ژنتیکی تمایز یافته اند و می توانیم از این تفاوت ژنتیکی در برنامه های اصلاحی آینده این گونه گیاهی ارزشمند استفاده کنیم. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی در درون نمونه های مورد مطالعه نسبتاً پایین است.

خوشه بندی *UPGMA* درخت حاصل از نمودار *NJ* را که در ارتباط باهمدیگر بودند تایید کرد و حضور دو گروه اصلی را نشان داد (شکل ۳). اولین گروه ژنوتیپی *Hedera colchica* و گروه دوم *Hedera helix* را تشکیل دادند.

مقادیر EMR از OPC-04 (۴/۵۵) تا OPA-06 (۱۰/۵۵) را گزارش کردیم. مقادیر EMR به طور متوسط ۷/۵ در هر پرایمر بود (جدول ۲). تمام پارامترهای ژنتیکی لازم در جمعیت های *Hedera* محاسبه شده و نشان داده شده است.  $POP_6$  هتروزیگوسیتی مورد انتظار بی طرفانه (UHe) را در محدوده ۰/۱۹ ( *Hedera colchica* ) نشان داد. بیشترین مقدار اندکس شانون در  $POP_3$  بود (۰/۳۹) (*Hedera helix*) کمترین مقدار، ۰/۲۳ ( *Hedera colchica* ) را نشان داد. تعداد آلل های مشاهده شده (Na) از ۱/۱۶ تا ۲/۷۰۰ در  $pop_5$  و  $pop_6$  ( *Hedera colchica* ) متغیر بود. تعداد الل های موثر (Ne) برای  $pop_5$  و ( *Hedera colchica* )  $pop_6$  در محدوده ۱/۰۷۸-۱/۴۶۲ بود. جریان ژن (Nm) در بین ارقام *Hedera* نسبتاً کم بود (۰/۲۹).

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ های مورد مطالعه را مشخص کرد (P = 0.001). AMOVA نشان



شکل ۳: دندروگرام UPGMA بر اساس داده های RAPD

خوشه بندی K-Means—1 که مبتنی بر رویکرد maximum likelihood است و 2—Evanno که مبتنی بر تجزیه و تحلیل STRUCTURE و روشی مبتنی بر رویکرد بیزین می باشد. K-Means خوشه بندی بر اساس شبه F و BIC (معیار اطلاعات بیزین) ۲ گروه ژنتیکی را تشخیص داده است. این نتایج در توافق با نتایج AMOVA می باشد که تفاوت ژنتیکی معنی دار بین جمعیت *Hedera* را نشان می دهد. آزمون Evan بر اساس دلتا k تعداد دو گروه های ژنتیکی را شناسایی کرد. برای شناسایی گروه های ژنتیکی، تجزیه و تحلیل انالیز

جریان ژن (Nm) در ژنوتیپ های *Hedera* نسبتاً کم بود (۰/۲۹). تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی در اعضای ژنوتیپ *Hedera* ذکر شده است (جدول موجود نیست). جولان؛ تالش و جولان؛ آستارا؛ ژنوتیپ های لیزا رود از نظر ژنتیکی نزدیک به یکدیگر (۰/۸۲۳) بودند. مازندران؛ ژنوتیپ های رامسر و تهران، در که به دلیل تشابه ژنتیکی کم (۰/۶۴۵) با هم متفاوت بودند. آزمون منتل همبستگی معنی داری ( $r = 0.86, p = 0.0001$ ) بین فواصل ژنتیکی و جغرافیایی را نشان داد.

### ساختار ژنتیکی جمعیت

تعداد گروه های ژنتیکی با دو روش

دادن درجه بالایی از طبقه‌بندی ژنتیکی در ژنوتیپ‌های *Hedera* همخوانی دارند .

### بحث

جنس *Hedera* یک گروه تاکسونومیکی نسبتاً پیچیده است ، و چندین ویژگی مورفولوژیکی شناسایی و طبقه بندی گونه های *Hedera* را دشوار می کند (Lawrence and Schulze, 1942; Pojarkova, 1951). به همین منظور، لازم است روش‌های دیگری را که می‌توانند مکمل رویکرد طبقه‌بندی سنتی باشند، بررسی کنیم (Erbano et al., 2015). ظهور و پیشرفت در تکنیک‌های مولکولی، تاکسونومیست‌های گیاهی را قادر می‌سازد تا از پروتکل‌های مولکولی برای مطالعه گروه‌های گیاهی استفاده کنند (Erbano et al., 2015). تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Hedera* را با روش‌های ریخت شناسی و مولکولی بررسی کردیم . ما از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و قرابت ژنتیکی در ژنوتیپ‌های *Hedera* استفاده کردیم . تکنیک‌های خوشه‌بندی و رسته بندی الگوهای

STRUCTURE را بر اساس  $k = 2$  انجام دادیم. در پلات فوق ارقام از *Hedera colchica* (سبز رنگ) در گروه اول ژنتیکی قرار می گیرند، در حالی که جمعیت های *Hedera helix* (زرد رنگ) گروه دوم ژنتیکی را تشکیل می دهند . این گروه‌های ژنتیکی مختلف ممکن است در برنامه‌های اصلاحی و هیبریداسیون ژنوتیپ‌های هدرای ایران در آینده مورد استفاده قرار گیرند .

میانگین  $Nm = 29/0$  برای همه لوکوس ها ی RAPD به‌دست آمد که نشان‌دهنده مقدار کم جریان ژن در بین جمعیت‌ها است و از طبقه‌بندی ژنتیکی که توسط K-Means و آنالیز STRUCTURE نشان داده شده است پشتیبانی می‌کند. این نتایج با گروه بندی که در نمودار PCA به دست آوردیم، مطابقت دارد ، زیرا این جمعیت ها همانطور که توسط نمودار STRUCTURE بر اساس مدل admixture نشان می‌دهد نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند ، این آلل‌های مشترک بخش بسیار محدودی از ژنوم‌های این جمعیت‌ها را تشکیل می‌دهند و همه این نتایج در نشان

مشابهی را نشان دادند. نتایج مورفومتری به وضوح استفاده اهمیت صفات مورفولوژیکی در ژنوتیپ‌های *Hedera* را نشان داد. نتایج روش UPGMA نیز کاربرد صفات مورفولوژیکی برای جداسازی ژنوتیپ‌های *Hedera* را تایید کرد. در مطالعه حاضر، ویژگی‌های مورفولوژی و تنوع ژنتیکی در ۳۵ ژنوتیپ *Hedera* برای اولین بار به تفصیل بیان می‌شود. هدف از مطالعه حاضر یافتن ویژگی‌های تشخیصی برای جداسازی ژنوتیپ‌های *Hedera* در ایران بود. همانطور که قبلاً اشاره کردیم، خصوصیات مورفولوژیکی به عنوان ابزار مفیدی برای شناسایی گونه‌ها در نظر گرفته می‌شوند (McAllister and Rutherford, 1990; Ackerfield and Wen, 2002).

علیرغم استفاده دارویی از *Hedera helix*، تنوع مولکولی آن بر اساس نشانگرهای DNA عملاً ناشناخته است. تنها اطلاعات مربوط به کاربردهای نشانگرهای چندشکل برای cpDNA، ITS و RAPD گزارش شده است (Clarke et al., 2006; Green et al., 2011; Valcárcel et al., 2003).

Grivet و Petit (2002) گزارش کرده‌اند که پیچک‌های اروپایی متعلق به هشت هاپلوتیپ کلروپلاست مختلف با ویژگی‌های زیر است: پیچک‌های اسکاتلندی از هاپلوتیپ C<sup>۱</sup> هستند. پیچک‌های اسلواکی از A<sup>۲</sup>، G، D و C<sup>۱</sup> هستند. کروات‌ها از A<sup>۱</sup>، A<sup>۲</sup> و H هستند. پیچک‌های آلمانی از هاپلوتیپ C<sup>۱</sup>، A<sup>۱</sup> و A<sup>۲</sup> و اسپانیایی از E و G هستند. این توزیع در ختلیج پلی مورفیسم مبتنی بر PBA قابل مشاهده است، زیرا نمونه اسپانیایی متمایزترین نمونه نسبت به سایرین است و هاپلوتیپ رایج A<sup>۲</sup> در گروه بندی نمونه‌های اسلواکی و کرواسی قابل مشاهده است و هاپلوتیپ C<sup>۱</sup> نمونه‌های اسکاتلند و آلمان را از سایر نمونه‌ها متمایز کرده است.

نشانگر RAPD به طور مستقیم برای تجزیه و تحلیل چندشکلی *Hedera helix* استفاده نشده است، اما جمعیت‌های مهاجم از *Hedera hibernica* (Kirchner) و *Hedera helix* بر اساس داده‌های RAPD شناسایی شدند (Clarke et al., 2006). اولین غربالگری برای نشانگرهای مبتنی بر ریزماهوره، رتروترانسپوزون و

دلیل زمینه ژنتیکی محلی خاص، فشار تولید مثل و/یا تبادل محدود مواد ژنتیکی. ماهیت منحصر به فرد ژرم پلاسما هدرای ایران که توسط نتایج ما آشکار شد، از این مورد برای اجرای استراتژی‌های شناسایی، حفاظت و اصلاح استفاده میکنند. همچنین نشانگرهای RAPD مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Hedera* در ایران مفید بودند.

miRNA برای *Hedera helix* که توسط Žiarovská و همکاران (2016) گزارش شده است. در این مطالعه، انواع نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون - IRAP و iPBS برای تجزیه و تحلیل تنوع پیچک عالی هستند، نشانگرهای ریزماهواره بر اساس نوع تکرار موفق هستند و miRNA به عنوان یک نوع جدید از نشانگرهای DNA اثبات شده است که برای تجزیه و تحلیل تنوع پیچک بسیار امیدوارکننده است Bošelová and Žiarovská (2016) .  
سیتوکروم P450 را مبتنی بر پلی مورفیسم توسط تکنیک PBA ارزیابی کردند. با استفاده از مجموعه ای از سه آغازگر PBA و ترکیبات آنها، تعداد قطعات تکثیر شده توسط ترکیبات پرایمر منفرد برای هر دو ۱۱ عدد و پلی مورفیسم بدست آمده به ترتیب ۹۱٪ یا ۱۰۰٪ بود.

تجزیه و تحلیل PCoA انجام شد و ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف با هم گروه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل حاضر نشان داد که ژرم پلاسما *Hedera* کشت شده در ایران بسیار متغیر است، احتمالاً به

- invading populations. **منابع**  
 Biological Invasion, 8: 149-157
- Erbano M, Schühli Gse, Santos Épd. (2015). Genetic variability and population structure of *Salvia lachnostachys*: implications for breeding and conservation programs. *Int J Mol Sci.* 16(4):7839-7850.
  - Esfandani -Bozchaloyi S, Sheidai M, Keshavarzi M, Noormohammadi Z. (2018c). Morphometric and ISSR-analysis of local populations of *Geranium molle* L. from the southern coast of the Caspian Sea. *Cytol Genet.*, 52(4):309-321.
  - Esfandani -Bozchaloyi S, Sheidai M. 2018d. Molecular diversity and genetic relationships among *Geranium pusillum* and *G. pyrenaicum* with inter simple sequence repeat (ISSR) regions. *Caryologia.* 71(4):1-14.
  - Esfandani-Bozchaloyi S, Sheidai M, Kalalegh M (2019). Comparison of DNA extraction methods from *Geranium* (Geraniaceae).
  - Ackerfield J, Wen J (2002). A morphometric analysis of *Hedera* L. (the ivy genus, Araliaceae) and its taxonomic implications. *Adansonia*, 324:197-212.
  - Amini E, Nasrollahi F, Sattarian A, Khormali A, Habibi M (2019). Micro-morphological and molecular study of four species of *Lonicera* (Caprifoliaceae) in Iran. *Phytol Balc*, 25(2):181-190.
  - Amini E, Kazempour-Osaloo Sh, Maassoumi AA, Zare- Maivan H (2018). Phylogeny, biogeography and divergence times of *Astragalus* section *Incani* DC. (Fabaceae) inferred from nrDNA ITS and plastid rpl32-trnL(UAG) sequences. *Nord J Bot* 37. DOI: 10.1111/njb.02059
  - Bean W.J. (1915). — Trees and shrubs hardy in the British Isles. E.P. Dutton and Co., New York.
  - Clarke, M.M., Reichard, S.H., Hamilton, C.W., 2006. Prevalence of different horticultural taxa of ivy (*Hedera* spp., Araliaceae) in

- Geranium (Geraniaceae). *Acta Botanica Hungarica* 61(3-4):251-266.  
<https://doi.org/10.1556/034.61.2019.3-4.3>
- Evanno G., Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 14:2611–2620.
  - Falush D, M. Stephens, J.K. Pritchard (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes.* 7:574–578.
  - Freeland Jr, Kirk H, Peterson Sd. (2011). *Molecular ecology* (2nd ed). UK: Wiley-Blackwell.
  - Green, A. F., Ramsey, T. S., Ramsey, J., (2011). Phylogeny and biogeography of ivies (*Hedera* spp., Araliaceae), a polyploid complex of woody vines. *Systematic Botany*, 36: 1114–1127.
  - Green, A.F., Ramsey, T.S., Ramsey, J., (2013). Polyploidy and invasion of English ivy (*Hedera* spp., *Acta Bot. Hung.* 61(3-4):251-266.
  - Esfandani-Bozchaloyi S, Sheidai M, Keshavarzi M, Noormohammadi Z. (2018a). Species Relationship and Population Structure Analysis In *Geranium* Subg. *Robertium* (Picard) Rouy With The Use of ISSR Molecular Markers. *Act Bot Hung.* 60(1–2):47–65.
  - Esfandani-Bozchaloyi S, Sheidai M, Keshavarzi M, Noormohammadi Z. (2018b). Species Identification and Population Structure Analysis In *Geranium* Subg. *Geranium* (Geraniaceae) . *Hacquetia.* 17(2):235–246.
  - Esfandani-Bozchaloyi S, Sheidai M, Keshavarzi M, Noormohammadi Z. (2017). Genetic and morphological diversity in *Geranium dissectum* (Sec. *Dissecta*, Geraniaceae) populations. *Biologia.* 72(10):1121- 1130.
  - Esfandani-Bozchaloyi S, Sheidai M, Kalalegh M (2019). Comparison of DNA extraction methods from

- box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Meta Gene*. 5:90-97.
- Huson Dh, Bryant D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 23:254-267.
  - Ismail Na, Rafii My, Mahmud Tmm, Hanafi Mm, Miah G. (2019). Genetic Diversity of Torch Ginger Germplasm Revealed by ISSR and SSR Markers. *BioMed Res*. 2019:5904804.
  - Lawrence GHM, Schulze AE (1942) The cultivated *Hederas*. *Gentes Herbariorum* 6:107-173
  - Lum C, Maze J (1989) A multivariate analysis of the trichomes of *Hedera L*. *Watsonia* 17:409-418
  - Mabberley DJ (1997) The plant-book. Cambridge University Press, Cambridge
  - Mcallister HA, Rutherford A (1990) *Hedera helix L*. and *H. Hibernica* (Kirchner) bean (Araliaceae) in the British Isles. *Watsonia*, 18:7-15
  - Meusel H, Ja"nger E, Weinert E (1965) Vergleichende Chorologie der Zentraleuropa"ischen Flora. Araliaceae) in North American forests. *Biological Invasions*, 15: 2219-2241.
  - Grivet, D., Petit, R.J., (2002). Phylogeography of the common ivy (*Hedera sp.*) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, 11: 1351-1362.
  - Gomez A, Vendramin Gg, González-Martínez Sc, Alia R. (2005). Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Divers Distrib*. 11(3): 257-263.
  - Hammer O, Harper Dat, Ryan Pd. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 4:9.
  - Heikrujam M, Kumar J, Agrawal V.( 2015). Genetic diversity analysis among male and female *Jojoba* genotypes employing gene targeted molecular markers, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT

- ivies from the Mediterranean area and Macaronesia. *The Plantsman* 15:115–128
- Rose P.Q. (1996). — The gardener's guide to growing ivies. David & Charles, London.
  - Seemann B (1868) Revision of the natural order Hederaceae. L. Reeve and Co., London
  - Shen Z, Zhang K, Ma L, Duan J, Ao Y. (2017). Analysis of the genetic relationships and diversity among 11 populations of *Xanthoceras sorbifolia* using phenotypic and microsatellite marker data. *Electron J Biotechnol.* 26:33-39.
  - Tobler F (1912) Die Gattung *Hedera*. Gustav Fischer, Jena
  - Valca'rcel V (2008) Taxonomy, systematics and evolution of *Hedera* L. (Araliaceae). Ph.d. dissertation, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain (in English but two sections, introduction and conclusions, in Spanish)
  - Valca'rcel V, Vargas P (2010) Quantitative morphology and species
  - Veb Gustav Fischer Verlag, Jena
  - Meirmans Pg. (2012). AMOVA-based clustering of population genetic data. *J. Heredity.* 103: 744–750.
  - Pritchard Jk, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype Data. *Genetics.* 155:945–959.
  - Peakall R, Smouse Pe. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes.* 6:288–295.
  - Podani J. 2000. Introduction to the exploration of multivariate data [English translation]. Leide (Netherlands): Backhuyes.
  - Pojarkova AI (1951) The Chinese species of ivy and their taxonomic and geographic connections. *Natulae systematicae ex herbario botanici nomine V.L. Komarovii academiae scientiarum URSS* XIV:224–264
  - Rutherford A, McAllister HA, Mill RR (1993) New

different markers for *Hedera helix*, L. germplasm evaluation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5, 23-26.

delimitation under the general lineage concept: optimization for *Hedera* (Araliaceae). *Am J Bot* 97:1555–1573

- Valcárcel, V., Fiz, O., Vargas, P., (2003). Chloroplast and nuclear evidence for multiple origins of polyploids and diploids of *Hedera* (Araliaceae) in the Mediterranean basin. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 27: 1–20.
- Vargas, P., Mcallister, H.A., Morton, C., Jury, S.L., Wilkinson, M.J., (1999). Polyploid speciation in *Hedera* (Araliaceae): phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 219: 165–179.
- Yeh Fc, Yang R, Boyle T (1999). POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. University of Alberta 1-31.
- Žiarovská, J., Bošková, D., Zeleáková, L., Bežo, M. (2016) Utilization of