

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی نوروبک (*Salvia leriifolia*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

منصوره احمدی^۱، سید علی محمد مدرس ثانوی^{۲*}، محمد کافی^۳، فاطمه سفیدکن^۴ و سعید ملک‌زاده سفارودی^۵

۱. دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه زراعت، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پست الکترونیک: modaresa@modares.ac.ir

۳. استاد، گروه زراعت، دانشگاه فردوسی، مشهد

۴. استاد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۵. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی، مشهد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹

چکیده

نوروبک (*Salvia leriifolia*) گیاهی دولپه و چندساله از خانواده نعنائیان و بومی استان‌های خراسان و سمنان است. وجود ۵۶ درصد روغن در مغز دانه، مواد مؤثره دارویی در برگ و ریشه و علوفه با کیفیت، این گیاه را در زمره گیاهان بالقوه روغنی، دارویی و علوفه‌ای قرار می‌دهد. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۴۴ ژنوتیپ مربوط به ۱۰ جمعیت گیاه نوروبک از استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و سمنان با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد. از ۱۳ آغازگر مورد استفاده، شش آغازگر به‌عنوان آغازگرهای برتر انتخاب شدند که در بین آنها قطعات تکثیری UBC۸۳۴ بیشترین تعداد آلل و حداکثر چندشکلی را داشت. بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط آغازگرهای برتر، تنوع ژنتیکی بالایی درون و بین جمعیت‌های نوروبک مورد بررسی وجود داشت. بر اساس گروه‌بندی جمعیت‌ها، جمعیت‌های مربوط به استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و سمنان در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. اگرچه نشانگر ISSR به‌خوبی توانست تفاوت بین جمعیت‌ها را آشکار کند، اما بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و پراکنده بودن ژنوتیپ‌های مختلف یک جمعیت در بین ژنوتیپ‌های سایر جمعیت‌ها، به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه‌های طبیعی نوروبک مطابقت نداشت.

واژه‌های کلیدی: تنوع درون‌گونه‌ای، نشانگرهای مولکولی، نواحی بین‌توالی‌های ساده تکراری، گروه‌بندی مولکولی.

مقدمه

دارویی، ایجاد اشتغال، توسعه اقتصادی، امنیت غذایی، حفظ ذخایر ژنتیکی و حضور فعال در بازارهای جهانی بر کسی پوشیده نیست. گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و درمان و پیشگیری از

امروزه اهمیت گیاهان دارویی و طب ایرانی و شناساندن نقش حیاتی آن در پیشبرد اهداف ملی، منطقه‌ای و جهانی برای تحقق سلامت و نشاط جوامع، خودکفایی

مختلفی از نشانگرها در عرصه علوم ژنتیک، رده‌بندی و به‌نژادی به‌کار رفته‌اند. اصول کاربرد آنها تفاوت چندانی با یکدیگر ندارد، ولی هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. مطالعات در سطح جمعیت نشان می‌دهد که نشانگرهای DNA کارآیی زیادی در تشخیص تنوع در این سطح دارند و اطلاعات زیادی را فراهم می‌آورند. نشانگر ISSR یک روش مبتنی بر PCR است که می‌تواند تفاوت‌های افراد با خویشاوندی نزدیک را به‌سرعت از یکدیگر جدا کند و ثابت شده است که نشانگر مولکولی مفیدی در مطالعات انگشت‌نگاری ژنومی، بررسی‌های فیلوژنتیکی و نشان‌گذاری ژن است. این تکنیک از یک آغازگر منفرد طراحی شده بر اساس توالی ریزماهواره که در انتهای ۵' یا ۳'، با ۲ تا ۴ نوکلئوتید انتخابی قلاب شده است، استفاده می‌کند و برای طراحی آغازگر به اطلاع قبلی از ژنوم نیاز ندارد. نشانگر ISSR مزایایی مشابه RAPD که یکی از کم‌هزینه‌ترین نشانگرهای مولکولی است، دارد. نشانگر ISSR به‌علت طول نسبتاً بلندتر آغازگرها و دمای اتصال بالاتر، قابل اطمینان‌تر از RAPD است و می‌تواند به‌طور گسترده خصوصاً برای ارزیابی ژرم‌پلاسم گیاهی و تنوع ژنتیکی استفاده شود (Wang et al., 2009). این روش به‌ویژه در مطالعه ژنوم‌های ناشناخته، کاربرد و اهمیت زیادی دارد (Reddy et al., 2002). این روش ارزیابی سریع و آسانی از ترکیب ژنتیکی افراد با خویشاوندانی نزدیک ارائه می‌دهد و به‌علت سرعت و سهولت کار می‌تواند در ارزیابی تنوع ژنتیکی تعداد زیادی از گیاهان به‌کار رود (Wang et al., 2009). همچنین نتایج آن قابل اعتماد و کارآمد و ارزان‌قیمت است (Semagn et al., 2006). بنابراین با توجه به نبود گزارشی مبنی بر کاربرد نشانگر مولکولی ISSR بر روی جمعیت‌های نوروزک، پژوهش حاضر به‌عنوان اولین مطالعه در این زمینه و با هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های نوروزک انجام شد.

بیماری‌ها برخوردار هستند. نوروزک با نام علمی *Salvia leriifolia* گیاهی دولپه و چند ساله از خانواده نعنائیان *Lamiaceae* است. رویشگاه‌های این گیاه، تنها در ایران در استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی، سمنان و بخش‌هایی از کشور افغانستان است (Rechinger, 1982). نوروزک در ایران در رویشگاه‌های مختلف به‌نام‌های محلی چبَلِه، چبَلِک، چبَلِه و دم‌گاو خوانده می‌شود. مغز دانه این گیاه منبع بسیار غنی از روغن (۵۶-۵۰ درصد) و پروتئین (۳۰ درصد) است که برای طبخ‌های خام‌خواری مطلوب می‌باشد. برگ‌های نوروزک حاوی کلسیم، فسفر و آهن بوده و دانه و برگ آن حاوی اسید چرب است، به‌همین دلیل جزو علوفه‌های خوش‌خوراک محسوب می‌شود. همچنین برگ‌های این گیاه حاوی اسانس هستند که در تولید محصولات دارویی، بهداشتی و آرایشی کاربردهای وسیعی دارد. به‌دلیل توانایی در گستراندن ریشه تا عمق ۹۰ سانتی‌متر و شعاع ۱۶۰ سانتی‌متر، این گیاه در حفاظت از خاک در برابر فرسایش نیز جایگاه ویژه‌ای دارد. همچنین نوروزک دارای خواص دارویی ارزشمند بسیاری است و گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی این گیاه وجود دارد. تمامی قسمت‌های گیاه اعم از گل‌ها، سرشاخه‌ها، بذرها و حتی ریشه‌ها به‌منظور مصارف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

از آنجا که شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی، امری بنیادی برای طراحی موفق برنامه‌های به‌نژادی بوده و در آسان‌کردن مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی نقش بسزایی دارد، مطالعه در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی ضرورت پیدا می‌کند (Dastmalchi et al., 2011). وجود تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی مواد گیاهی از نظر انتخاب ترکیب والدینی مناسب برای تولید جمعیت‌های مناسب، طراحی برنامه‌های اصلاحی مؤثر، پاسخ به گزینش طولانی‌مدت و کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشد (Troyer et al., 1998). انواع

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور جمع‌آوری نمونه برگ تازه از جمعیت‌های نوروژک با هدف استخراج DNA، اواسط اردیبهشت ۱۳۹۱ با مراجعه حضوری به رویشگاه‌های اصلی این گیاه، نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها داخل فالكون ۵۰

میلی‌لیتری در یخ نگهداری شدند و در اولین زمان ممکن به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند. اطلاعات مربوط به موقعیت، طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا برای مناطق مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات محل جمع‌آوری جمعیت‌های نوروژک مورد استفاده

استان	شهر / منطقه	عرض جغرافیایی (درجه، دقیقه، ثانیه)	طول جغرافیایی (درجه، دقیقه، ثانیه)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
خراسان رضوی	مشهد- کوهسنگی	۳۶° ۲۷' ۹۵"	۵۹° ۹۹' ۹۸"	۱۰۷۵
خراسان رضوی	سبزوار- ایستگاه آبخوان	۳۶° ۳۰' ۶۳"	۵۷° ۲۰' ۱۷"	۱۱۲۸
خراسان رضوی	بردسکن- روستای برجک	۳۵° ۳۲' ۹۵"	۵۷° ۸۵' ۵۰"	۱۱۲۲
خراسان رضوی	کاشمر- روستای قوچ پلنگ	۳۵° ۳۱' ۰۳"	۵۸° ۵۶' ۹۲"	۱۳۹۶
خراسان رضوی	بجستان	۳۴° ۵۰' ۰۸"	۵۸° ۲۳' ۱۸"	۱۳۲۸
خراسان رضوی	هلالی- روستای خارفیروزی	۳۴° ۵۰' ۲۴"	۵۸° ۳۸' ۸۹"	۱۲۷۶
خراسان رضوی	بجستان- رودگز	۳۴° ۴۸' ۶۵"	۵۸° ۳۱' ۴۴"	۱۳۸۱
خراسان جنوبی	فردوس- کلاته خوار	۳۴° ۲۱' ۹۴"	۵۸° ۱۳' ۰۹"	۱۵۴۰
خراسان رضوی	درونه	۳۵° ۱۸' ۹۷"	۵۷° ۳۴' ۳۵"	۹۹۰
سمنان	گرماب	۳۵° ۳۶' ۰۷"	۵۶° ۸۸' ۶۳"	۱۳۲۵

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از ۴۴ نمونه متعلق به ۱۰ جمعیت، با استفاده از برگ‌های تازه و جوان نوروژک و به کمک روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) با اندکی تغییرات انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد تعیین شد.

تکثیر قطعات DNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای بهینه‌سازی شرایط واکنش به منظور افزایش تکرارپذیری، غلظت‌های مختلف هر کدام از ترکیبات واکنش، مقدار آغازگر و DNA الگو مورد

ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه مخلوط PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، مواد اولیه به مقدار ۱ میکرولیتر DNA ژنومی ۱۰۰ ng/μl، ۲ میکرولیتر آغازگر ۱۰۰ pmol/μl، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰mM، ۱ میکرولیتر ۲۵mM Mg Cl₂، ۰/۳ میکرولیتر پلیمرز Taq ۵ unit/μl و ۱۷/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل با هم مخلوط شدند. همچنین از ۱۳ آغازگر استفاده شد (Li et al., 2008) که مشخصاتشان در جدول ۲ ارائه شده است. برنامه دمایی مورد استفاده به صورت مرحله واسرشت‌سازی مقدماتی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۵ دقیقه، مرحله واسرشت‌سازی با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله اتصال که دمای این مرحله با توجه به نوع آغازگر از ۴۱/۴ تا ۶۰/۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود،

و رنگ GreenViwer (۱۰ میکرولیتر به ازای ۱۰۰ میلی گرم ژل) بارگذاری و با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت (به ازای هر سانتی متر فاصله دو الکتروود تانک، ۷ ولت) به مدت ۲ ساعت الکتروفورز و بعد با استفاده از ژل داک از ژل‌ها عکس برداری شد.

به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط دما ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی یا تکمیل بسط رشته‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. تعداد چرخه مراحل ۲ تا ۴ نیز ۳۵ مرتبه بود. سپس ۵ میکرولیتر محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی $\times 0/5$ TAE

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های نوروژک

ردیف	نام آغازگر	موتیف	توالی (۳' → ۵')	دمای اتصال بهینه شده (درجه سانتی‌گراد)
۱	UBC۸۰۷	(AG) ₈ T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	۴۲/۵
۲	UBC۸۰۸	(AG) ₈ C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۴۶/۸
۳	UBC۸۱۰	(GA) ₈ T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۴۲/۹
۴	UBC۸۱۱	(GA) ₈ C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۴۳/۳
۵	UBC۸۱۲	(GA) ₈ A	GAGAGAGAGAGAGAGAA	۴۴/۴
۶	UBC۸۱۴	(CT) ₈ A	CTCTCTCTCTCTCTCTA	۴۱/۴
۷	UBC۸۱۵	(CT) ₈ G	CTCTCTCTCTCTCTCTG	۴۵
۸	UBC۸۳۴	(AG) ₈ YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۴۹/۸
۹	UBC۸۴۰	(GA) ₈ YT	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	۵۲/۹
۱۰	UBC۸۴۱	(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	۴۵/۷
۱۱	UBC۸۵۵	(AC) ₈ YT	ACACACACACACACACYT	۶۰/۲
۱۲	UBC۸۶۴	(ATG) ₆	ATGATGATGATGATGATG	۵۱/۳
۱۳	UBC۸۶۸	(GAA) ₆	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	۴۷/۸

جمع‌آوری داده‌ها

استفاده در دسته‌بندی نمونه‌ها حاصل گردید. با کمک نرم‌افزار DARwin ضریب عدم تشابه به دو روش جاکارد و دایس محاسبه و دندروگرام هر ماتریس با الگوریتم‌های WPGMA، Single، Complete linkage، و UPGMA ترسیم شد. سپس ضرایب کوفنتیک آنها محاسبه و روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب تعیین شد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.1 انجام شد. با توجه به اینکه ISSR جزو نشانگرهای غالب محسوب می‌شود، میزان اطلاعات چندشکلی هر یک از آغازگرها با استفاده از معادله (۱) زیر محاسبه شد (Hourai & Ferchichi, 2008).

تصویر ژل‌های الکتروفورز حاصل از آغازگرهایی که باندهای چندشکل با وضوح مناسب تولید کرده بودند، با استفاده از نرم‌افزار Total Lab Tl 120 v. 2009 و به صورت دستی تجزیه شد. سپس به حضور یا عدم حضور یک باند در هر نمونه، با استفاده از اعداد صفر و یک امتیازدهی و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار NTedit v1.07c به ماتریس تبدیل شد. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc v2.02، روش SIMQUAL و ضریب تشابه Jaccard محاسبه شد و با تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، دندروگرام مورد

$$\text{PIC} = 1 - p^2 - q^2 \quad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله p بیانگر فراوانی وجود باند و q فراوانی فقدان باند بود.

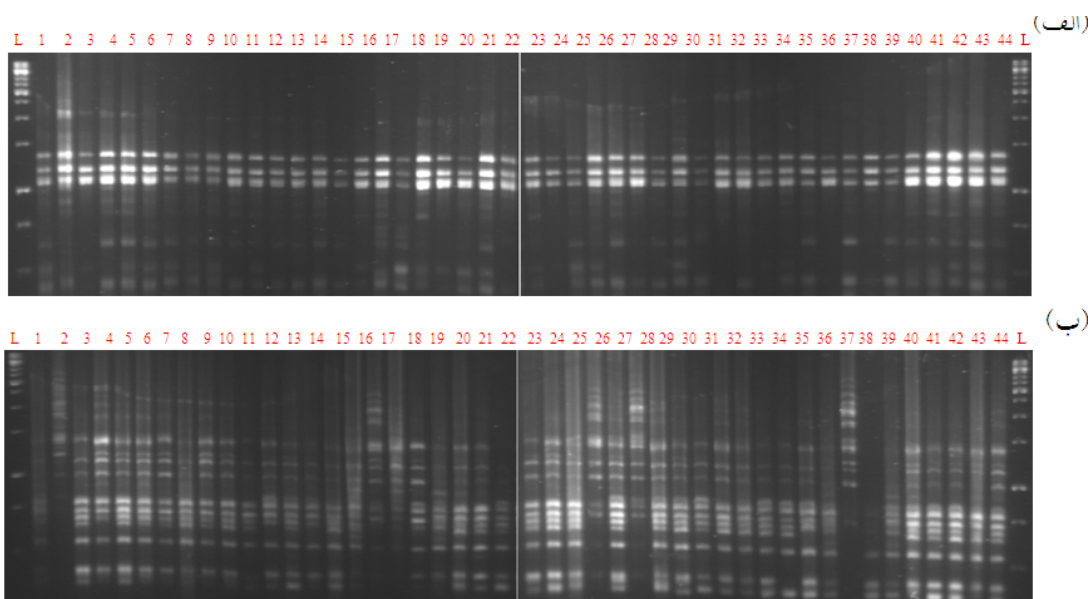
نتایج

با ارزیابی اولیه تصاویر الکتروفورزی، نتایج حاصل از

آغازگرهای فاقد باند چند شکل با وضوح کافی شامل UBC۸۰۷، UBC۸۱۱، UBC۸۱۲، UBC۸۱۴، UBC۸۴۰، UBC۸۴۱ و UBC۸۵۵ از ادامه بررسی حذف شدند. به عبارت دیگر از میان سیزده آغازگر مورد مطالعه، شش آغازگر، DNA الگو را به خوبی تکثیر کردند و چندشکلی مطلوبی را نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- دامنه اندازه مولکولی آلل‌ها، تعداد آلل‌های تولید شده، درصد و محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرهای ISSR منتخب

نام آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	تعداد آلل‌ها	تعداد و فراوانی باندهای چندشکل	محتوای اطلاعات چندشکلی	دامنه اندازه آلل‌های مشاهده شده (جفت نوکلئوتید)
UBC۸۰۸	۴۶/۸	۱۵	۱۰ (۶۶٪)	۰/۴۶	۱۰۰-۱۷۰۰
UBC۸۱۰	۴۲/۹	۱۷	۱۲ (۷۰٪)	۰/۴۰	۲۰۰-۱۵۰۰
UBC۸۱۵	۴۵	۱۳	۹ (۶۹٪)	۰/۴۶	۲۰۰-۱۵۰۰
UBC۸۳۴	۴۹/۸	۲۱	۲۰ (۹۵٪)	۰/۴۹	۱۰۰-۲۶۰۰
UBC۸۶۴	۵۱/۳	۱۸	۱۰ (۵۵٪)	۰/۴۶	۳۰۰-۲۰۰۰
UBC۸۶۸	۴۷/۸	۱۷	۱۲ (۷۰٪)	۰/۴۵	۲۰۰-۲۵۰۰
بازه تغییرات		۱۳-۲۱	۵۵٪-۹۵٪	۰/۴۰ - ۰/۴۹	۱۰۰-۲۶۰۰
میانگین		۱۶/۸۳	۱۲/۱۶ (۷۱٪)	۰/۴۵	---

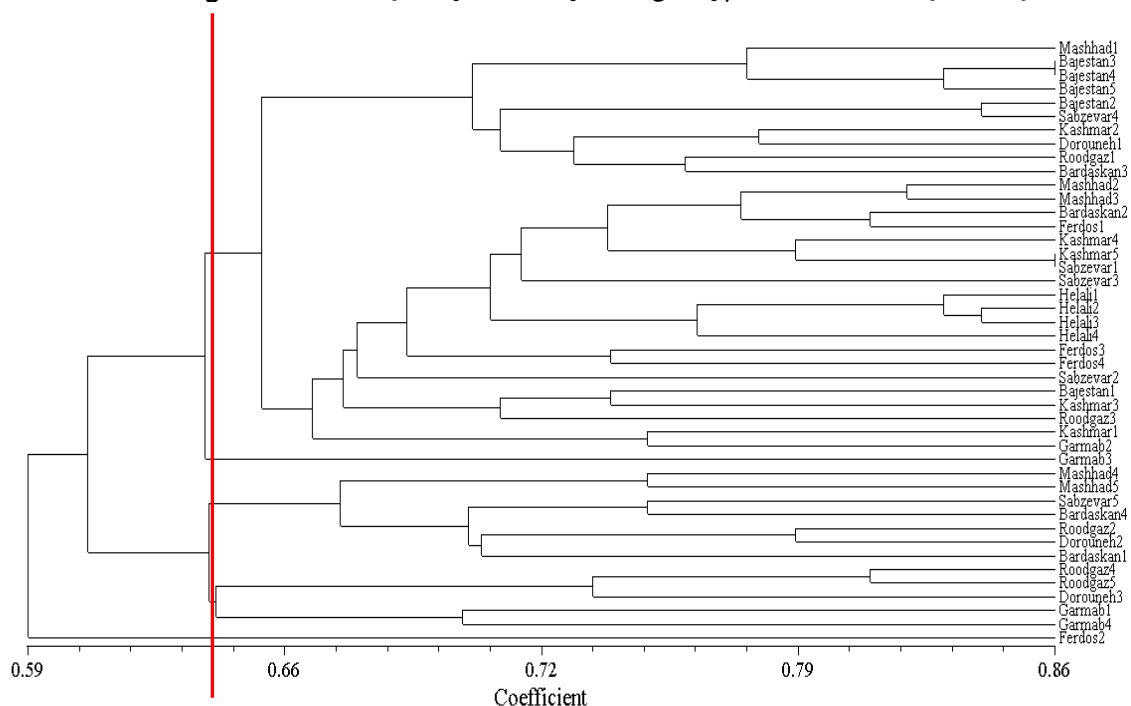


شکل ۱- الگوی باندهای نشانگر ISSR در ۴۴ نمونه نوروبزک مربوط به آغازگرهای UBC۸۱۵ (الف) و UBC۸۶۴ (ب)

آغازگر UBC۸۳۴ بیشترین تعداد آلل و حداکثر چندشکلی و PIC را ایجاد کرد (جدول ۳) و بر اساس اینکه تعداد آلل‌های هر مکان ژنی، مناسب بودن آن را برای تخمین تنوع و پراکندگی ژنتیکی یک جمعیت نشان می‌دهد (Haji *et al.*, 2011)، بنابراین می‌توان آغازگر UBC۸۳۴ را به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگر ISSR برای مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های نوروژک پیشنهاد کرد. شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های جغرافیایی نیز با استفاده از ضریب تشابه Jaccard و به‌کمک نرم‌افزار PopGen 32 محاسبه شد که بر اساس آن بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از بردسکن و درونه با ضریب تشابه ۰/۹۴ بود. همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های بردسکن و هلالی با ضریب تشابه ۰/۷۵ بود. گروه‌بندی نمونه‌ها نیز بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc v2.02 انجام شد که دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آن در شکل ۲ آمده است.

آغازگرهای برتر در مجموع ۱۰۱ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کردند که اندازه آنها در محدوده ۲۶۰۰-۱۰۰ جفت‌باز بود. درصد چند شکلی در آغازگرهای مختلف متفاوت بود. حداکثر چندشکلی ایجاد شده ۹۵ درصد مربوط به آغازگر UBC۸۳۴ با فرمول $(AG)_8YT$ و حداقل آن ۵۵ درصد بود که مربوط به آغازگر UBC۸۶۴ با فرمول $(ATG)_6$ بود. بیشترین و کمترین چندشکلی ایجاد شده به‌ترتیب در آغازگرهای با دونوکلئوتید تکراری و با سه‌نوکلئوتید تکراری مشاهده شد. الگوی بانندی حاصل از آغازگرهای UBC۸۱۵ و UBC۸۶۴ در شکل ۱ نشان داده شده است.

علاوه بر تعداد آلل‌های شناسایی شده و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) میزان اطلاعات چندشکلی هر آغازگر نیز محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر UBC۸۳۴ برابر ۰/۴۹ و کمترین آن مربوط به آغازگر UBC۸۱۰ معادل ۰/۴ بود. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر



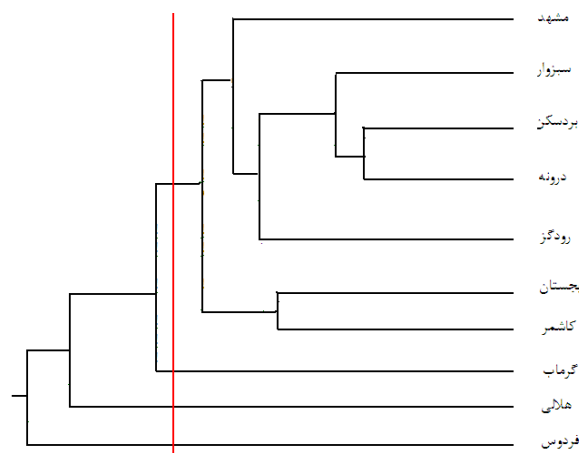
شکل ۲- دندروگرام و گروه‌های حاصل از روابط ژنتیکی ۴۴ نمونه مربوط به ۱۰ جمعیت نوروژک با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc v2.02 بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard روی داده‌های حاصل از شش آغازگر برتر ISSR مورد استفاده

الگوریتم‌های مختلف محاسبه شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که در همه الگوریتم‌های مورد بررسی، ماتریس عدم تشابه مربوط به روش جاکارد مطابقت بیشتری با دندروگرام داشت. به طوری که بیشترین مقدار ضریب کوفنتیک ($r=0/9$) مربوط به روش جاکارد و الگوریتم UPGMA بود. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده بهترین روش محاسبه ماتریس عدم تشابه روش جاکارد، و مناسب‌ترین الگوریتم برای رسم دندروگرام، روش UPGMA بود.

همچنین بر اساس ضرایب عدم تشابه به دست آمده از نرم‌افزار DARwin، در هر دو روش دایس و جاکارد، کمترین ضریب عدم تشابه بین جمعیت‌های کاشمر و سبزواری و بیشترین مقدار این ضریب بین جمعیت‌های بجزستان و بردسکن وجود داشت. به منظور تعیین بهترین روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب برای داده‌های حاصل از نشانگر ISSR در گیاه نوروژک، ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس عدم تشابه به دست آمده از دو روش دایس و جاکارد با دندروگرام‌های حاصل از

جدول ۴- مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک دو روش دایس و جاکارد در الگوریتم‌های مختلف

روش	الگوریتم		
	WPGMA	Single	Complete linkage
دایس	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۴
جاکارد	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۵



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ۴۴ نمونه مربوط به ۱۰ جمعیت نوروژک با استفاده از نرم‌افزار PopGen 32 بر اساس فاصله ژنتیکی نی (Nei) به روش UPGMA

جمعیت‌ها بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های مورد بررسی (جدول ۵) نیز تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها و شباهت بین جمعیت‌ها را تأیید کرد.

بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، اغلب ژنوتیپ‌های مربوط به یک جمعیت به صورت پراکنده در بین ژنوتیپ‌های مربوط به سایر جمعیت‌ها قرار گرفتند. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون جمعیت‌ها و شباهت ژنتیکی بین

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۴۴ نمونه مربوط به ۱۰ جمعیت نوروک

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	سطح معنی دار
بین جمعیت‌ها	۹	۲۵۱/۶	۲۷/۹۵۷	۱۶	۰/۰۱**
درون جمعیت‌ها	۳۴	۵۲۵/۵۵	۱۵/۴۵۷	۸۴	
کل	۴۳	۷۷۷/۱۵		۱۰۰	

** : اختلاف معنی دار در سطح ۱٪

ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های بجزستان، هلالی و رودگز در کنار هم قرار گرفتند که این مسئله بیانگر قرابت ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مربوط به این جمعیت‌ها می‌باشد. چهار ژنوتیپ مربوط به جمعیت گرماب از استان سمنان نیز به طور مساوی در دو گروه منفک از یکدیگر و در بین جمعیت‌های استان خراسان رضوی و جنوبی قرار گرفتند. جمعیت‌های مربوط به استان سمنان (جمعیت گرماب) و استان خراسان جنوبی (فردوس) به‌طور جداگانه نسبت به جمعیت‌های مربوط به استان خراسان رضوی گروه‌بندی شدند که این گروه‌بندی با محدوده پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها انطباق بیشتری داشت. اگرچه مارکر مولکولی ISSR به‌خوبی توانست وجود تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های نوروک را آشکار کند، اما در تفکیک جمعیت‌ها از یکدیگر کاملاً موفق نبود. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و پراکنده بودن ژنوتیپ‌های مختلف یک جمعیت در بین ژنوتیپ‌های سایر جمعیت‌ها (شکل ۲)، نیز می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه‌های طبیعی نوروک مطابقت نداشت.

بحث

در این تحقیق تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های بومی گیاه دارویی نوروک با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری‌که پی‌بردن به ساختار تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی برای مدیریت پایدار حیات آنها به‌خصوص در اکوسیستم‌های طبیعی از اهمیت بالایی برخوردار است (White et al., 2007). یکی از

نشانگرهایی که در مطالعات تنوع ژنتیکی موجودات زنده و گیاهان کاربرد دارد، نشانگر ISSR است. نشانگر ISSR نشانگری مبتنی بر PCR است که قطعه DNA موجود و قابل تکثیر بین دو ریز ماهواره را که در جهت مخالف هم قرار دارند، تکثیر می‌کند (Terzopoulos & Bebeli, 2008). بنابراین باید گفت که PIC بیانگر ارزش یک نشانگر برای تشخیص چندشکلی در یک جمعیت می‌باشد، که بر اساس تعداد آلل‌های شناسایی شده و نحوه پراکنش آنها در جمعیت محاسبه می‌شود و در حال حاضر به‌عنوان پرکاربردترین آماره ارزشیابی نشانگرها شناخته می‌شود (Nagy et al., 2012). میانگین PIC آغازگرهای مورد آزمون در این مطالعه ۰/۴۵ بود که با توجه به اینکه حداکثر PIC در نشانگرهای غالب ۰/۵ است (Nagy et al., 2012)، حکایت از آن داشت که مجموعه آغازگرهای انتخاب شده پراکندگی مناسبی در ژنوم جمعیت‌های مورد بررسی داشتند. در ضمن Naghavi و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشتند که هرچه نمونه‌های مورد مطالعه شباهت ژنتیکی بیشتری به هم داشته باشند، نشانگرهای قوی‌تری برای تشخیص چندشکلی در آنها مورد نیاز خواهد بود. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر آغازگر UBC۸۳۴ با فرمول (AG)₈YT توانست چندشکلی بالایی را ایجاد نماید، از این رو می‌توان نتیجه گرفت که این آغازگر توانایی بالاتری نسبت به سایر آغازگرها در تعیین تنوع ژنتیکی در گیاه نوروک دارد. از طرف دیگر دامنه PIC در شش آغازگر برتر مورد استفاده، بین ۰/۴ تا ۰/۴۹ بود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها بود. به‌طور کلی، با توجه به اینکه درصد باندهای چندشکل

مشترک در کنار هم با پراکنش جغرافیایی وسیع آنها و همچنین تأثیر نیروهای تکاملی بر ساختار ژنتیکی آنها مرتبط است (Abdollahi-Sisi *et al.*, 2012). در یک مطالعه Mohammadi و همکاران (۲۰۱۴) تنوع ژنتیکی ۱۳ جمعیت *Aegilops cylindrica* را با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده توسط آنها روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نتوانست جمعیت‌ها را به طور کامل از هم تفکیک کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها بود. عدم مطابقت الگوی گروه‌بندی با منشأ جغرافیایی در تجزیه خوشه‌ای، می‌تواند دو دلیل داشته باشد، دلیل اول کافی نبودن تعداد نشانگرهای استفاده شده و در نتیجه عدم پوشش تمامی ژنوتیپ‌ها، و عامل دوم وجود یکسری مضاعف‌شدگی‌ها در ژرم پلاسما پس از ذخیره طولانی مدت و استفاده مجدد، که باعث بروز یکسری اشتباهات و در نتیجه عدم تفکیک ژنوتیپ‌های یکسان از یکدیگر می‌شود (Chen *et al.*, 2012). البته برخی از پژوهش‌ها نیز انطباق فواصل ژنتیکی با فواصل جغرافیایی را اثبات کردند. به عنوان مثال Karimi و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی تنوع و ساختار ژنتیکی چهار جمعیت گردو مشتمل بر ۸۲ ژنوتیپ در استان همدان را با استفاده از ۱۱ نشانگر ISSR بررسی کردند. آنان نشان دادند که دسته‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آنها بر اساس موقعیت جغرافیایی انطباق پیدا کرد. همچنین Shuorvazdi و همکاران (۲۰۱۴) تنوع و ساختار ژنتیکی ۵۵۱ ژنوتیپ بومی جو از کشورهای مختلف و ۲۱ رقم تجاری و لاین اصلاحی را با استفاده از ۴۱ جفت آغازگر ریزوماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution و ضریب فاصله P-distance ژنوتیپ‌ها را به سه گروه متناسب کرد که گروه‌بندی تا حدودی با مناطق جغرافیایی ژنوتیپ‌ها مطابقت داشت. تعیین مقدار ضریب کوفتیک به منظور

سازگاری پایینی نسبت به هر تغییر محیطی نشان می‌دهد، می‌تواند به عنوان شاخصی برای تعیین مقدار تنوع و فرسایش ژنتیکی در نظر گرفته شود (Hao *et al.*, 2006). بر اساس ماتریس تشابه ژنتیکی بر مبنای ضریب نی (Nei, 1972) که توسط نرم‌افزار PopGene 32 به دست آمد، بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از بردسکن و درونه با ضریب تشابه ۰/۹۴ بود که این تشابه با فاصله جغرافیایی کم بین آنها انطباق داشت. اگرچه مارکر مولکولی ISSR به خوبی توانست تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها را آشکار کند، اما بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و پراکنده بودن ژنوتیپ‌های مختلف یک جمعیت در بین ژنوتیپ‌های سایر جمعیت‌ها، به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه‌های طبیعی آنها مطابقت نداشت. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها را اثبات کرد. البته تفاوت ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌تواند ناشی از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت‌های ژنتیکی و خویشاوندی‌های احتمالی، اشتقاق جمعیت‌ها از یکدیگر و داشتن اجداد مشترک باشد (Hartl & Clark, 1994). محققان دیگری نیز به نتایجی مشابه با نتایج به دست آمده در این پژوهش دست پیدا کردند. به عنوان مثال Ehteshamnia و همکاران (۲۰۰۹) تنوع ژنتیکی در ۹۶ ژنوتیپ از ۵ جمعیت طبیعی گردوی ایرانی در استان گلستان را با استفاده از ۱۱ مکان ژنی ریزوماهواره مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به دست آمده دسته‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آنها بر اساس موقعیت جغرافیایی انطباق پیدا نکرد. بنابراین معنی‌دار نبودن همبستگی بین فواصل جغرافیایی جمعیت‌ها و فواصل ژنتیکی آنها نشان‌دهنده وجود ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌های جدا از هم از طریق جریان ژنی است (Alikhani *et al.*, 2014). البته قرارگرفتن ژنوتیپ‌های بومی گیاه جو با منشأ جغرافیایی

ژنتیکی به منظور حفظ این گیاه ارزشمند و در معرض انقراض اقدام به جمع‌آوری جمعیت‌های بومی نوروک کرد.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi-Sisi, N., Mohammadi, S.M., Alavi-kia, S.S. and Sadeghzadeh, B., 2012. Efficiency of EST-SSR markers in determination genetic diversity and relationships of barley landraces. *Cereal Research*, 93:123- 133.
- Alikhani, L., Rahmani, M.S., Shabanian, N. and Badakhshan, H., 2014. Genetic diversity assessment of *Quercus infectoria* and *Q. libani* populations in North-Zagros forests based on ISSR and IRAP markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22:79-90.
- Chen, Z.W., Lu, R.J., Zou, L., Du, Z.Z., Gao, R.H., He, T. and Huang, J.H., 2012. Genetic diversity analysis of barley landraces and cultivars in the Shanghai region of China. *Genetic and Molecular Research*, 11: 644-650.
- Dastmalchi, T., Omidi, M., Torabi, S., Madah-Arefi, H., Etmnan, A., Hasani, M. H. and Behzadi-Rad, M., 2011. Evaluating genetic diversity in medicinal plant *Althaea & Alcea* spp L. with molecular marker of AFLP. *Novin Genetics*, 6: 79- 87.
- Doyle J.J., and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Ehtesham-Nia, A., Sharifani, M., Vahdati, K. and Erfani, V., 2009. Investigation of genetic diversity among native populations of walnut (*Juglans regia*) in Golestan province. *Journal of Plant Production*. 16:39-58.
- Haji, K., Naghavi, M. R., Taleii, A. R. and Aghaii, M. J., 2011. Evaluation of genetic diversity of *Aegilops tauschii* from Northern area of Iran using SSR markers. *Iranian Journal of Biology*, 24: 390-399.
- Hao, B., Li, W., Linchun, M., Li, Y., Rui, Z., Mingxia, T. and Weikai, B., 2006. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana* an endangered endemic of China, using ISSR markers. *Biochemical Genetics*, 44: 29-43.
- Hartl, D.L. and Clark, G.C., 1994. *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland.
- Hourai, M., and Ferchichi, A., 2008. Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 7: 44-50.
- Karimi, R., Ershadi A. and Vahdati, K., 2009. Analysis of genetic diversity among some persian

تعیین بهترین روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب برای داده‌های حاصل از نشانگر ISSR در گیاه نوروک، نشان داد که بیشترین مقدار ضریب کوفتیک ($r=0/9$) مربوط به روش جاکارد و الگوریتم UPGMA بود. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده بهترین روش محاسبه ماتریس عدم تشابه، روش جاکارد و مناسب‌ترین الگوریتم برای رسم دندروگرام، روش UPGMA بود.

در نهایت لازم به ذکر است، با توجه به ویژگی‌های خاص گیاه نوروک و تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌های آن، در درجه اول حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود. از طرف دیگر نیز مصرف آجیلی دانه نوروک توسط بومیان منطقه، خطر هجوم آفاتی مانند ملخ‌ها، تعلیف برگ‌های گیاه توسط دام‌ها و کندرشدبودن، این گیاه ارزشمند را در معرض خطر انقراض قرار داده است. همچنین جلب شدن توجه محققان جوان برای مطالعه خصوصیات دارویی، روغنی و ... این گیاه نیز سبب شده است که بذره‌های این گیاه بیش از پیش در معرض جمع‌آوری از طبیعت قرار داشته باشد. موارد مذکور لزوم توجه هر چه بیشتر مسئولان ذیربط به حفظ و نگهداری خارج از محل و تکثیر این گیاه ارزشمند را نیز اثبات می‌کند. بنابراین در صورتی که اقدامات لازم در زمینه حفاظت خارج از محل و ایجاد بانک ژرم پلاسما برای این گونه با استفاده از بذره‌های جمعیت‌های مختلف انجام نشود، متأسفانه در آینده نزدیک شاهد نابودی این نعمت خدایی خواهیم بود. در آخر با توجه به اینکه گزارش حاضر اولین گزارش از کاربرد نشانگر ISSR در بررسی تنوع و پراکندگی جمعیت‌های نوروک در ایران است، می‌توان با امتداد بررسی‌ها روی جمعیتی متشکل از تمامی جمعیت‌های نوروک و با استفاده از آغازگرهای بیشتر با توالی‌های جدید یا متشکل از قطعات تکراری انتخاب شده بر اساس نتایج این تحقیق و یا با ترکیب آغازگرهای منتخب، به الگوی نشانگری اشیاع‌تری دست پیدا کرد و با استفاده از آنها برای ایجاد بانک

- Semagn, K., Bjornstad, A. and Ndjiondjop, M.N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2540-2568.
- Shuorvazdi, A., Mohammadi, S.A., Norozi, M. and Sadeghzadeh, B., 2014. Molecular Analysis of Genetic Diversity and Relationships of Barley Landraces Based on Microsatellite Markers. *Journal of Plant Genetic Research*, 1:51-64.
- Terzopoulos, P.J. and Bebeli, P.J., 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108: 39-44.
- Troyer, A.F., Openshaw, S.J. and Knittle, K.H., 1998. Measurement of genetic diversity among popular commercial corn hybrids. *Crop Science*, 28: 481-485.
- Wang, K., Kang, J., Zhou, H., Sun, Y., Yang, Q., Dong, J. and Meng, L., 2009. Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinesis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Biotechnology*, 8: 4856-4863.
- White, T.L., Adams, W.T. and Neale, D.B., 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts, USA. 682 pp.
- walnut populations of hamedan province using SSR markers. *Plant Production Technology*, 9:43-53.
- Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. and Wang, Y.P., 2008. Genetic diversity in main parents of sweet potato in China as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 34: 972-977.
- Mohammadi, S., Ashraf Mehrabi, A., Arminian, A. and Fazeli, A., 2014. Genetic Diversity Structure of *Aegilops cylindrica* Accessions Revealed by Genomic ISSR Markers. *Journal of Plant Genetic Research*, 1:13-26.
- Naghavi, M.R. Gharayazi, B. and Hossieni Salekdeh, Gh., 2007. *Molecular Markers*. Tehran University Publication Institute. Tehran. 380 p.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernak, I., Mousapour Gorji, A., Hegedus, G., and Taller, J., 2012. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50:670-672.
- Rechinger, K. H. 1982. *Flora Iranica*. No. 150. Academiche Druck. U. Verlag sustalt Gratz, pp: 551-558.
- Reddy, M.P., Sarla, N., and Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.

Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal plant Nowruzak (*Salvia leriifolia*) using ISSR markers

M. Ahmadi¹, S.A.M. Modarres-Sanavy^{2*}, M. Kafi³, F. Sefidkon⁴
and S. Malekzadeh Shafaroudi⁵

1. Ph.D student, Faculty of Agriculture, Tarbiat Madares University, Tehran, I.R.Iran

2*. Prof., Faculty of Agriculture, Tarbiat Madares University, Tehran I.R.Iran

Email: modaresa@modares.ac.ir

3. Prof., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran

4. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran I.R.Iran

5. Assist., Prof., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran

Received: 08.02.2015

Accepted: 03.05.2015

Abstract

Nowruzak (*Salvia leriifolia*) is a dicotyledonous and perennial plant from Lamiaceae family, which is grown in Khorasan and Semnan provinces of Iran. About 56 percent oil in kernel, essence, and secondary metabolites in its roots and shoots, and its qualitative forage make it suitable as a potential oil seed, medicinal and forage crop. This study was conducted to investigate genetic diversity of 44 genotypes taken from 10 populations of Nowruzak from Khorasan Razavi, South Khorasan and Semnan provinces. We used 13 Primers of Inter Simple Sequence Repeat markers, of which 6 primers were selected as the best primers. The most polymorphic alleles and PIC created by UBC834 with formula $(AG)_8YT$. Results showed that there was high genetic diversity within and between the studied plant populations. According to the results of grouping of the populations, they were classified in separate groups. However, ISSR markers could reveal differences between the populations, but the results of cluster analysis of the different populations illustrated that the genetic distances between the populations of Nowruzak were not matched with their geographic distances.

Keywords: Intra-species diversity, molecular markers, ISSR, molecular grouping.