دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ijrfpbgr.2018.120704.1291
جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۲۷۸-۲۶۸ (۱۳۹۷)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه (*Tanacetum polycephalum*) آذربایجان‌غربی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

مهران مجرد آشنا آباد[1G]، سیاوش حسینی سرقین[2]، علی سنبلی[3] و رضا حیدری[4]

۱- نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، پردیس دانشگاهی دانشگاه ارومیه، ارومیه

پست الکترونیک: Mojarrad2017@gmail.com

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- دانشیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه غیرانتفاعی صبا، ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۳

چکیده

گونه *Tanacetum polycephalum* متعلق به قبیله بابونه از تیره کاسنی (Asteraceae-Anthemideae) و یکی از گونه‌های مرتعی با پراکنش وسیع در شمال‌غرب، شرق و مرکز ایران است که از تنوع مورفولوژیکی بالایی برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ جمعیت از گونه مذکور در آذربایجان‌غربی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بود. از ۱۴ نشانگر ISSR مورد استفاده ۱۰ نشانگر چند شکلی بالاتری داشتند و بر اساس وجود یا عدم وجود باند امتیازدهی شدند. در مجموع ۲۰۸ باند تکثیر شد که تعداد آنها از ۱۵ (برای نشانگر IS۲۴) تا ۲۸ (برای نشانگر IS۲۰) متغیر و میانگین باندهای تولید شده ۲۰/۸ بود. از نظر درصد باندهای چندشکل (P٪) نشانگرهای IS8، IS1، IS10، IS13 و IS20 بیشترین درصد (۱۰۰) و نشانگر IS24 کمترین درصد (۸۰) را نشان داد و میانگین درصد چندشکلی برای کل نشانگرها ۹۶/۰۳ درصد بود. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، قدرت تفکیک (RP)، نسبت سهم مؤثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI) به‌ترتیب برابر با ۰/۳۰، ٦/۰٦، ۱۹/٥ و ٦/۱۳ به‌دست آمد. در مجموع نشانگرهای IS8، IS1 و IS10 مؤثرترین نشانگر در بررسی تنوع جمعیت‌های گونه مورد مطالعه بودند.گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جمعیت‌ها در دو گروه و چهار زیرگروه قرار گرفتند و جمعیت‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه در گروه‌ها و زیرگروه‌های مشابه قرار گرفتند؛ ازاین‌رو ارتباط نزدیکی بین مناطق جغرافیایی و تنوع زنتیکی وجود داشت. به این ترتیب شرایط جغرافیایی و اقلیمی می‌تواند یکی از عوامل تنوع بالای جمعیت‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: آذربایجان‌غربی، تجزیه خوشه‌ای، نشانگر ISSR، *Tanacetum polycephalum*

مقدمه

گونه *Tanacetum polycephalum* با نام فارسی مینا یا مخلصه یکی از گونه‌های رایج و چندشکل جنس *Tanacetum* در ایران است که در محدوده رشته‌کوه‌های البرز و زاگرس پراکنده است. گیاهان جنس *Tanacetum* به‌دلیل ارزش دارویی که دارند همواره توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بررسی فیتوشیمیایی گیاه برای بررسی خواص درمانی و کاربردهای دیگر آن حائز اهمیت است. اسانس این گونه شامل ترکیبات طبیعی ازجمله مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنی آنها می‌باشد (Javidnia *et al*., 2008). در

مطالعه‌ای که بر روی تجزیه‌وتحلیل اسانس جمعیت‌های جمع‌آوری شده این گونه در استان آذربایجان‌غربی انجام شده، مقادیر بالایی از ترکیب ۱و۸ سینئول گزارش شده است (Rezaee *et al*., 2012). ازجمله خواص درمانی این گونه فعالیت ضدسرطانی آن است (Amiri, 2007). همچنین فعالیت‌های بیولوژیکی ضدمیکروبی و ضدقارچی این گونه نیز گزارش شده است (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2009). عصاره این گیاه شامل ترکیبات فنولی است که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی می‌باشد (Malekpoor *et al*., 2015) و از آزاد شدن هیستامین جلوگیری می‌کند (Mahdavi *et al*., 2013). با توجه به اینکه شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر ژنتیکی در طراحی برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی نقش به‌سزایی دارد و موجب تسهیل در مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی می‌شود، مطالعه در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی ضرورت پیدا می‌کند (Dastmalchi *et al*., 2011). امروزه تنوع ژنتیکی زیاد همراه با تعیین روابط ژنتیکی مواد گیاهی برای تولید جمعیت‌های مناسب، طراحی روش‌های اصلاحی و کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی دارای اهمیت فراوان است.

حفاظت و استفاده پایدار از منابع ژنتیک گیاهی نیاز به شناسایی دقیق نمونه‌ها دارد و ظهور نشانگرهای مبتنی بر DNA، شیوه تکنیک‌های شناسایی گونه‌ها را تغییر داده است (Arif *et al*., 2010). در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی، برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، یک ابزار مهم در مطالعه جمعیت گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد (Liu *et al*., 2006). پیشرفت چشمگیر در ژنتیک مولکولی در سال‌های اخیر، تکنیک‌های جدید برای شناسایی قابل اطمینان و آسان گونه‌های گیاهی را فراهم کرده است که برای مطالعه وسعت و توزیع تنوع در ذخیره ژنی گونه‌ها و حتی پاسخ مشخص به سئوالات تاکسونومیکی و تکاملی استفاده شده است (Arif *et al*., 2010). از انواع مختلف نشانگرهای مولکولی، نشانگر ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) به‌علت چندشکلی بالا، تکرارپذیری خوب، عدم نیاز به توالی‌یابی DNA برای طراحی آغازگر، یکی از پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی ژرم‌پلاسم گیاهی می‌باشد (Zhao *et al*., 2007; Wang *et al*., 2009). از این نشانگر به‌منظور تکثیر قطعه‌ای از DNA بین دو ریزماهواره که در ژنوتیپ یک گونه در حالت عکس یکدیگر قرار گرفته‌اند استفاده می‌شود(Kumar *et al*., 2009). نشانگرهای ISSR و RAPD در بررسی ژنتیکی گیاهان نزدیک به‌هم و خویشاوند (مانند جمعیت‌ها) به‌کار گرفته می‌شوند. نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است ولی میزان تکثیرپذیری و تنوع‌پذیری بیشتری دارد. در مجموع نشانگر ISSR میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تر نسبت به سایر نشانگرها دارد و نیازی به طراحی آغازگر ندارد(Ahmadi et al., 2015). این تکنیک دارای سرعت و سهولت اجرا و هزینه کم است. از نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهان خانواده آفتابگردان استفاده شده است. در مطالعه‌ای بر روی جمعیت-های گونه بابونه در ایران (*Matricaria chamomilla* L.)، نشانگر ISSR قدرت تفکیک بالایی را نشان داد (Ahmadi *et al*., 2014). همچنین در مطالعات گونه درمنه گزارش شده است که این نشانگر کارایی بالایی در تخمین چندشکلی دارد (Mohammad Shafie, 2011). در مطالعه-ای توسط Baliyan و همکاران (۲۰۱۴)، این نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعات انتخاب والدین گل داوودی کارا بوده است. در بررسی جمعیت‌های دو زیرگونه از جنس بومادران نیز نشانگر ISSR توانست تنوع بین جمعیت و درون جمعیت را نشان دهد (Gharibi *et al*., 2011). در جنس *Tanacetum* نیز در گونه *Tanacetum vulgar* میزان تنوع درون جمعیت و بین جمعیت این گونه توسط نشانگر ISSR گزارش شده است (Clasen *et al*., 2011). در یک بررسی، برای تعیین موقعیت فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی جنس *Tanacetum* از توالی‌های nrDNA ITS و *trn*H-*psb*A استفاده شده است (Sonboli *et al*., 2012). البته گزارش‌های دیگری مبنی بر کاربرد نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی سایر گیاهان نیز وجود دارد. با توجه به

اهمیت اقتصادی، دارویی و صنعتی گیاهان جنس *Tanacetum*، تهیه شناسنامه ژنتیکی ضروری بوده و نظر به نبود گزارشی مبنی بر ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *T. polycephalum*، این تحقیق با هدف مذکور و با کاربرد نشانگر مولکولی ISSR انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی ۲۰ جمعیت از گونه *T. polycephalum* از استان آذربایجان‌غربی جمع‌آوری و به هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی منتقل و شناسایی شدند. اطلاعات نمونه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- کد نمونه و مشخصات محل جمع‌آوری جمعیت‌های گونه ***Tanacetum polycephalum***

کد نمونه	محل جمع‌آوری	موقعیت جغرافیایی	ارتفاع	کد هرباریومی
P1	ارومیه، روستای آشناآباد	۰۳۷ ۳۸′ ۵۵″ N; ۰۴۴ ۵۷′ ۵۶″ E	۱۴۴۵	MPH-2511
P2	ارومیه، روستای بند	۰۳۷ ۲۹′ ۱۰″ N; ۰۴۴ ۵۸′ ۲۶″ E	۱۴۷۷	MPH-2512
P3	ارومیه، دره شهداء-۱	۰۳۷ ۱۸′ ۴۵″ N; ۰۴۵ ۶۰′ ۶۵″ E	۱۳۷۷	MPH-2513
P4	ارومیه، دره شهداء-۲	۰۳۷ ۱۸′ ۳۶″ N; ۰۴۵ ۶۰′ ۰۶″ E	۱۴۶۹	MPH-2514
P5	ارومیه، دره شهداء-۳	۰۳۷ ۱۸′ ۲۶″ N; ۰۴۵ ۶۰′ ۳۲″ E	۱۵۲۴	MPH-2515
P6	جاده سلماس، گردنه قوشچی	۰۳۸ ۰۰′ ۳۷″ N; ۰۴۴ ۵۶′ ۵۸″ E	۱۸۵۸	MPH-2516
P7	جاده نقده - پیرانشهر-۱	۰۳۶ ۵۵′ ۱۰″ N; ۰۴۵ ۱۵′ ۳۳″ E	۱۵۳۰	MPH-2518
P8	جاده نقده - پیرانشهر-۲	۰۳۵ ۵۵′ ۰۸″ N; ۰۴۵ ۱۵′ ۴۷″ E	۱۵۲۱	MPH-2519
P9	ماکو-۱	۰۳۹ ۱۷′ ۰۳″ N; ۰۴۴ ۲۵′ ۱۶″ E	۱۶۵۵	MPH-2520
P10	ماکو-۲	۰۳۹ ۱۷′ ۰۳″ N; ۰۴۴ ۲۵′ ۱۶″ E	۱۶۵۵	MPH-2521
P11	ماسو	۰۳۶ ۴۶′ ۱۱″ N; ۰۴۵ ۳۲′ ۴۵″ E	۱۷۸۵	MPH-2522
P12	شوط-۱	۰۳۹ ۰۹′ ۳۱″ N; ۰۴۴ ۴۱′ ۵۴″ E	۱۲۸۵	MPH-2523
P13	شوط-۲	۰۳۹ ۰۸′ ۴۰″ N; ۰۴۴ ۳۹′ ۴۹″ E	۱۵۹۷	MPH-2524
P14	ارومیه، ابشار سلوک	۰۲۷ ۲۹′ ۲۶″ N; ۰۴۴ ۴۵′ ۳۷″ E	۲۰۱۵	MPH-2525
P15	نقده، سلطان یعقوب -۱	۰۳۶ ۵۵′ ۷۶″ N; ۰۴۵ ۲۲′ ۳۱″ E	۱۴۲۲	MPH-2526
P16	نقده، سلطان یعقوب -۲	۰۳۶ ۵۵′ ۰۷″ N; ۰۴۵ ۲۲′ ۳۰″ E	۱۴۲۹	MPH-2527
P17	نکاب، روستای مائین بلاغ-۱	۰۳۶ ۳۰′ ۳۰″ N; ۰۴۶ ۵۸′ ۳۸″ E	۲۰۵۵	MPH-2528
P18	نکاب، روستای مائین بلاغ-۲	۰۳۶ ۳۱′ ۰۱″ N; ۰۴۶ ۵۷′ ۴۶″ E	۲۰۷۲	MPH-2529
P19	نکاب، روستای مائین بلاغ-۳	۰۳۶ ۳۱′ ۱۲″ N; ۰۴۶ ۵۷′ ۴۶″ E	۲۰۶۵	MPH-2530
P20	سرو، روستای گل شیخان	۰۳۷ ۴۰′ ۳۵″ N; ۰۴۴ ۴۰′ ۲۲″ E	۱۸۹۹	MPH-2517

استخراج DNA ژنومی با استفاده از مینی کیت کیاژن (DNeasy Plant Mini Kit Qiagene, Germany) و روش‌های مربوط به آن انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و ژل آگارز ۰/۸ درصد (رنگ‌آمیزی شده با DNA Green Viewer) تعیین شد و

بعد DNAهای استخراج شده در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. برای انجام واکنش‌های تکثیر، بهینه‌سازی غلظت‌های مختلف هریک از ترکیبات واکنش و مقدار آغازگر مورد بررسی قرار گرفت و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر، به‌مقدار ۳ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۷ میکرولیتر آغازگر ISSR، ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ٤/۸ میکرولیتر کیت مسترمیکس تک دی اِن اِ پلیمراز (× ۲/۰ *Taq* DNA polymerase master mix Red, Amplicon) مخلوط شدند (جدول ۲).

جدول ۲- غلظت و میزان هریک از اجزاء واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نشانگرهای ISSR

اجزاء واکنش	غلظت	میزان (µl)	حجم کلی واکنش (µl)
آغازگر	pmol/µl۱۰	۰/۷	۱۰
مستر میکس	X۲	۴/۸	
DNA	-	۳	
آب سترون	-	۱/۵	

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *T. polycephalum*

ISSRآغازگر	توالی (3 → 5)	ISSR آغازگر	توالی (3 → 5)
IS1	GTCTCTCTCTCTCTCTCTG	IS14	AGAGAGAGAGAGAGAGC
IS7	ACGACGACGACGACGG	IS20	HVHTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC
IS8	ACGACGACGACGACGC	IS22	TCCTCCTCCTCCTCCYR
IS10	TCGTCGTCGTCGTCGC	IS24	ACACACACACACACACT
IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT

جدول ۴- شرایط دمایی و زمانی مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

چرخه	تعداد تکرار	مراحل	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
۱	۱	واسرشته سازی اولیه	۹٤	۲٤۰
		واسرشته سازی	۹٤	٦۰
۲	۷	اتصال آغازگر	٤۹	٤۰
		بسط آغازگر	۷۲	٤۰
		واسرشته سازی	۹٤	٤۰
۳	۲٦	اتصال آغازگر	۵۷	٤۵
		بسط آغازگر	۷۲	٤۵
٤	۱	بسط نهایی	۷۲	٤۲۰
۵	۱	پایان برنامه	٤	٦۰۰

در این مطالعه ۱۴ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت Bioneer که در آزمایش‌های قبلی از نظر تعداد باند تکثیر شده و چند شکلی سطح بالاتری را نشان داده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند که ۱۰ آغازگر چندشکلی بهتری را نشان دادند(Hadian et a.l, 2015) (جدول ۳).

در این مطالعه ۱۴ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت Bioneer که در آزمایش‌های قبلی از نظر تعداد باند تکثیر شده و چند شکلی سطح بالاتری را نشان داده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند که ۱۰ آغازگر چندشکلی بهتری را نشان دادند(Hadian et a.l, 2015) (جدول ۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient, Germany) انجام شد و برنامه دمایی مورد استفاده در جدول ۴ ارائه شده است.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۱۰ دقیقه با اختلاف قابلیت ۹۰ ولت و درون بافر تریس بوریک اسید بارگذاری شد. اندازه مارکر ۱۰۰bp از شرکت Fermentas، برای تخمین وزن باندهای تکثیری استفاده شد. پس از الکتروفورز در دستگاه مخصوص عکس‌برداری از ژل، تحت نورUV نوارهای تکثیرشده DNA مشاهده و عکس‌برداری شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌های ژنتیکی باندهای تکثیری مشاهده شده به‌صورت اعداد صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) برای تمامی نمونه‌ها و آغازگرها نمره‌دهی و به‌صورت ماتریس داده تهیه شد. سپس تعداد باند تکثیر شده (N)، تعداد باند چند شکل (NP)، درصد باندهای چندشکل از رابطه ($\%P= \frac{NP}{N} \times 100$) به‌دست آمد.

قدرت تفکیک (RP) از رابطه $Rp=\sum I_b$ (Prevost & Wilkinson, 1999)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از رابطه PIC = 1-p2-q2 به‌دست آمد که p بیانگر فراوانی وجود باند و q فراوانی نبود باند است (Hourai & Ferchichi, 2008). همچنین نسبت سهم مؤثر (EMR) از رابطه $EMR= NP \times ß$ و $ß = \frac{NP}{N}$ (Kumar et al., 2009) و شاخص نشانگر (MI) از رابطه MI=EMR× PIC محاسبه شد (Varshney et al., 2007).

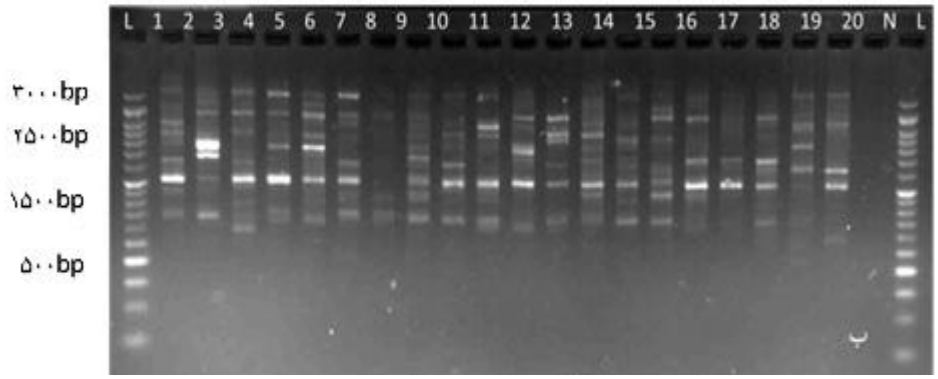
شباهت ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و بر اساس ضریب تشابه دایس محاسبه و تجزیه خوشه‌ای نیز به‌روش UPGMA تعیین و دندروگرام ترسیم شد.

نتایج

محاسبه چندشکلی

با مشاهده تصاویر به‌دست آمده از الکتروفورز، از ۱۴ آغازگر ISSR، ۱۰ آغازگر که چندشکلی بالاتری داشتند بر اساس وجود یا عدم وجود باند امتیازدهی شدند. در مجموع ۲۰۸ باند در محدوده ۳۰۰ تا ۱۹۰۰ جفت باز تکثیر شد. تعداد باندها از ۱۵ تا ۲۸ متغیر بود و میانگین باندهای تولید شده، ۲۰/۸ به‌دست آمد.

در بین آغازگرهای مورد بررسی، آغازگر IS20 با ۲۸ باند، بیشترین و آغازگر IS24 با ۱۵ باند کمترین تعداد باند تکثیر شده را داشتند. شکل ۱ الگوی باندی حاصل از ۲۰ جمعیت مورد بررسی را با استفاده از آغازگر IS20 نشان می‌دهد. بالاترین درصد چندشکلی (۱۰۰) در آغازگرهای IS1، IS8، IS10، IS13 و IS22 و کمترین آن (۸۰٪) مربوط به آغازگر IS24 بود و آغازگرهای IS14، IS7، UBC810 و IS20 دامنه درصد چندشکلی ۹۶/۴۳٪–۹۴/۱۲٪ را نشان دادند. میانگین درصد چندشکلی در آغازگرهای مورد مطالعه ۹۶/۰۳٪ بود (جدول ۵).



شکل ۱- الگوی باندی نشانگر UBC 810 در ۲۰ جمعیت گونه *T. polycephalum* در استان آذربایجان‌غربی

جدول ۵- مشخصات چندشکلی نشانگرهای ISSR در گونه *T. polycephalum*

نشانگر	تعداد باند تکثیرشده (N)	تعداد باند چند شکل (NP)	درصد باندهای چند شکل (%P)	قدرت تفکیک (RP)	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	نسبت سهم مؤثر (EMR)	شاخص نشانگر (MI)	دامنه اندازه قطعات تکثیری (BP)
IS1	۲۳	۲۳	۱۰۰	۷/۲	۰/۳۶	۲۳	۸/۲۸	۶۰۰-۱۹۰۰
IS7	۲۰	۱۹	۹۵	۸/۶	۰/۴۳	۱۸/۰۵	۷/۷۶	۳۰۰-۱۸۰۰
IS8	۲۵	۲۵	۱۰۰	۸/۶	۰/۴۳	۲۵	۱۰/۷۵	۴۰۰-۱۹۰۰
IS10	۲۶	۲۶	۱۰۰	۶/۶	۰/۳۳	۲۶	۸/۵۸	۶۰۰-۱۹۰۰
IS13	۱۹	۱۹	۱۰۰	۵/۶	۰/۲۸	۱۹	۵/۳۲	۳۰۰-۱۸۰۰
IS14	۱۷	۱۶	۹۴/۱۲	۴/۲	۰/۲۱	۱۵/۰۶	۳/۱۶	۴۰۰-۱۸۰۰
IS20	۲۸	۲۷	۹۶/۴۳	۴/۸	۰/۲۴	۲۶/۰۴	۶/۲۵	۳۰۰-۱۸۰۰
IS22	۱۶	۱۶	۱۰۰	۵/۲	۰/۲۶	۱۶	۴/۱۶	۶۰۰-۱۸۰۰
IS24	۱۵	۱۲	۸۰	۳/۴	۰/۱۷	۹/۶	۱/۶۳	۷۰۰-۱۹۰۰
UBC810	۱۹	۱۸	۹۴/۷۴	۶/۴	۰/۳۲	۱۷/۰۵	۵/۴۶	۶۰۰-۱۹۰۰
جمع	۲۰۸	۲۰۱	-	-	-	-	-	-
بازه تغییرات	۱۵-۲۸	۱۲-۲۷	۸۰-۱۰۰	٤/۲-۸/٦	۰/۱۷-۰/۳٤	۹/٦-۲٦/۰٤	۱/٦۳-۱۰/۷۵	۳۰۰-۱۹۰۰
میانگین	۲۰/۸	۲۰/۱	۹۶/۰۳	۶/۰۶	۰/۳۰	۱۹/۵	۶/۱۳	-

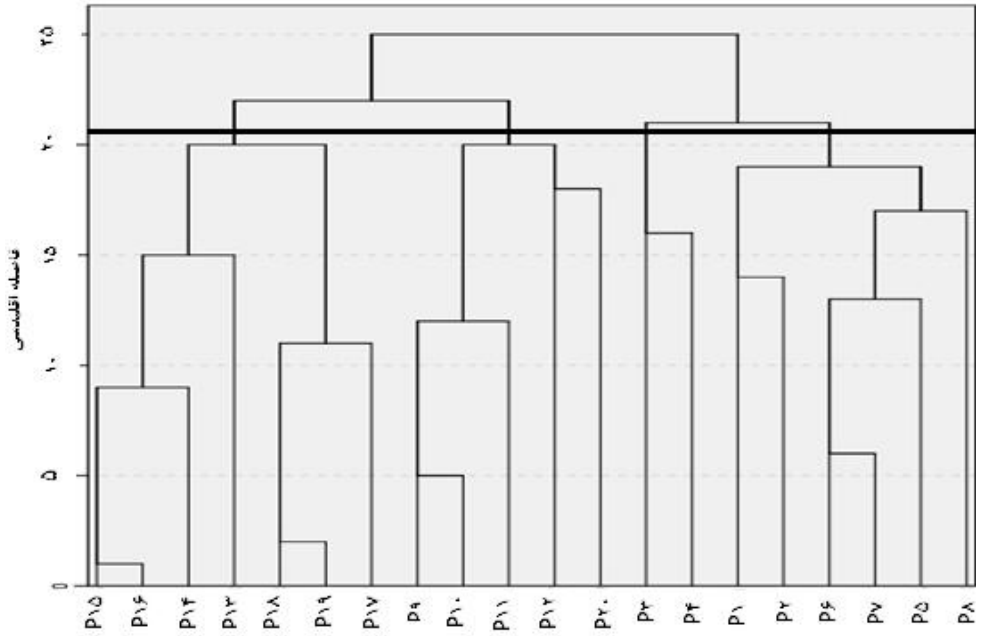
محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر

میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت سهم مؤثر (EMR)، قدرت تفکیک (RP) و همچنین شاخص نشانگر (MI) برای هریک از آغازگرهای به‌کار رفته محاسبه شد. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۴۳) برای آغازگرهای IS7 و IS8 و کمترین میزان (۰/۱۷) برای آغازگر IS24 بود و میانگین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی نیز ۰/۳ به‌دست آمد. بر اساس شاخص میزان محتوای چندشکلی، آغازگرهای IS7 و IS8 بهتر توانستند فاصله ژنتیکی را تشخیص بدهند. با محاسبه

محتوای اطلاعات چندشکلی، بیشترین میزان قدرت تفکیک (۸/۶) برای آغازگرهای IS7 و IS8 و کمترین میزان آن (۳/۴) در آغازگر IS24 به‌دست آمد. میانگین میزان قدرت تفکیک ۶/۰۶ برآورد شد. آغازگر IS24 با کمترین میزان قدرت تفکیک، توانایی خوبی در تشخیص فاصله ژنتیکی نداشت. نسبت سهم مؤثر با استفاده از تعداد باندهای چندشکل و درصد باندهای چندشکل محاسبه شد و بیشترین و کمترین مقدار آن به‌ترتیب در آغازگرهای IS20و IS24 به‌مقدار ۲۶/۰۴ و ۹/۶ گزارش شد. میانگین نسبت سهم مؤثر ۱۹/۵ به‌دست آمد. شاخص نشانگر نیز با محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی و نسبت سهم مؤثر محاسبه گردید. نتایج در جدول ۵ ارائه شده است.

تجزیه خوشه‌ای

گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و با روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTsys انجام شد. درخت تبارزایی حاصل در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲- درخت تبارزایی حاصل از ۱۰ نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه دایس در ۲۰ جمعیت *T. polycephalum* در آذربایجان‌غربی

بر اساس درخت تبارزایی به‌دست آمده، جمعیت‌های مورد بررسی گونه T. polycephalum آذربایجان‌غربی به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. که در گروه اول، ۱۲ جمعیت ماکو ۱، ماکو ۲، ماسو، شوط ۱، شوط ۲، آبشار سلوک، سلطان یعقوب نقده ۱، سلطان یعقوب نقده ۲، تکاب ۱، تکاب۲ ، تکاب ۳ و سرو روستای گل شیخان و در گروه دوم ۸ جمعیت روستای آشنا آباد ارومیه، روستای بند ارومیه، دره شهداء ارومیه ۱، دره شهداء ارومیه ۲، دره شهداء ارومیه ۳، گردنه قوشچی، جاده نقده پیرانشهر۱ و جاده نقده پیرانشهر ۲ قرار گرفتند. همچنین گروه اول خود به دو زیرگروه تقسیم‌بندی شدند که زیرگروه اول شامل جمعیت-های شوط ۲، آبشار سلوک، سلطان یعقوب نقده ۱، سلطان یعقوب نقده ۲، تکاب ۱، تکاب ۲ و تکاب ۳ و زیرگروه دوم شامل ماکو ۱، ماکو ۲، ماسو، شوط ۱ و سرو روستای گل شیخان بودند و گروه دوم به دو زیرگروه که خود شامل دو زیرگروه دره شهداء ارومیه ۱، دره شهداء ارومیه ۲ و

زیرگروه دوم شامل روستای آشناآباد ارومیه، روستای بند ارومیه، دره شهداء ارومیه ۳، گردنه قوشچی، جاده نقده پیرانشهر۱ و جاده نقده پیرانشهر ۲ بودند. نتایج به‌دست آمده از درخت تبارزایی نشان داد که بین مناطق جغرافیایی که نمونه جمع‌آوری شده بود و تنوع ژنتیکی آنها ارتباط نزدیکی داشت جمعیت‌های جمع‌آوری شده در یک منطقه در گروه‌ها و زیرگروه‌های مشابهی قرار گرفتند که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این جمعیت‌ها بود.

بحث

تحقیق انجام شده اولین ارزیابی مولکولی جمعیت‌هایی از گونه T. polycephalum از ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR می‌باشد. نتایج نشان داد که تنوع بسیاری در بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد که نشانگر کارایی بالای آغازگرهای ISSR در شناسایی تنوع درون جمعیتی گیاهان هستند. طبق نتایج به‌دست آمده ۲۰۸ باند تکثیر شد که ۹۶/۰۳ درصد باندهای چندشکل بودند. تعداد باندها بین ۱۵ تا ۲۸ با میانگین ۲۰/۸ برای هر آغازگر به‌دست آمد. در این زمینه در یک بررسی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳ جمعیت بابونه (هم‌طایفه گیاه Tanacetum) در ایران (*Matricaria chamomilla* L)، Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) پس از مشاهده باندهای چندشکل و تجزیه خوشه-ای گزارش کردند که درخت تبارزایی شامل چهار گروه بوده که گروه‌بندی مطابق با مناطق جغرافیایی جمعیت نمونه‌ها بودند و بدین‌ترتیب جمعیت شمال‌غرب، جنوب‌شرق، مرکز ایران و اروپا به‌طور جداگانه طبقه‌بندی شدند. در مطالعات تنوع ژنتیکی با توجه به اینکه تعداد باندهای تکثیرشده توسط آغازگر می‌تواند دلیل مناسب بودن آن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی باشد، بر اساس محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی که یک شاخص مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز است و نیز بر اساس شاخص نشانگر، آغازگرهای IS8، IS1 و IS10 با داشتن بالاترین میزان شاخص نشانگر به‌ترتیب ۱۰/۷۵، ۸/۵۸ و ۸/۲۸ نشان‌دهنده کارایی بالا و قدرت تفکیک بهتر جمعیت‌ها توسط این آغازگرها در بررسی تفاوت‌های ژنتیکی می‌باشند. با توجه به اینکه شاخص نشانگری به‌عنوان یک مقیاس برای کارایی آغازگر در نظر گرفته می‌شود (Tagizad et al., 2010)، می‌توان آغازگرهای IS8، IS1 و IS10 را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در T. polycephalum در نظر گرفت. با توجه به چندشکلی قابل ملاحظه در الگوی باندی به‌دست آمده، آغازگر ISSR به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های T. polycephalum ایران مناسب است. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌های T. polycephalum در ایران وجود دارد که برای آغاز مطالعات اصلاحی مناسب می‌باشد. با توجه به گروه‌بندی انجام شده توسط درخت تبارزایی، دو جمعیت سلطان یعقوب نقده ۱ و سلطان یعقوب نقده ۲ در یک زیرگروه قرار گرفتند. همینطور جمعیت‌های تکاب ۱ و تکاب ۲ در یک زیرگروه جداگانه و جمعیت‌های ماکو ۱ و ماکو ۲ که در شکل ۲ مشاهده می‌شود نیز در یک زیرگروه جداگانه قرار گرفتند. به این ترتیب بسیاری از جمعیت‌ها که دارای مناطق جغرافیایی مشابهی نسبت به بقیه مناطق بودند در یک گروه قرار گرفتند که این مورد، دلیل شباهت ژنتیکی بیشتر این جمعیت‌ها بود و شرایط اقلیمی می‌تواند یکی از عوامل تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها باشد. همچنین جمعیت‌های دره شهداء ارومیه ۱، دره شهداء ارومیه ۲، شوط ۱ و سرو روستای گل شیخان هریک به تنهایی در یک زیرگروه جداگانه قرار گرفتند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها بود. با توجه به تنوع پراکندگی بالای این گیاه در مناطق مختلف ایران، جمع‌آوری و حفاظت از ژنوتیپ‌های آن ضروری به‌نظر می‌رسد. یکی از اهداف به‌نژادگران گیاهی، حفاظت از ذخایر ژنتیکی می‌باشد که تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها و در نتیجه بقای گونه می‌شود. از آنجا که مطالعه بر روی روابط ژنتیکی برای اصلاح گیاهان و همچنین حفاظت از منابع ژنتیکی ضروری می‌باشد (Aghaei et al., 2012)، این بررسی نشان داد با وجود در معرض خطر بودن گونه‌های گیاهی، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌ها

وجود دارد و می‌توان تدابیری برای حفاظت و برنامه‌های اصلاحی بر روی این گونه انجام داد. از آنجایی که برنامه-های اصلاحی به تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌ها نیاز دارند، تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌تواند کمک شایانی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی بکند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از سرکار خانم زیبا بختیار به‌سبب راهنماییهای ارزنده قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده:

– Aghaei, M., Darvishzadeh, R. and Hassani, A. 2012. Molecular characterisation and similarity relationships among Iranian basil *(Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. Revista Ciencia Agronomica, 43: 312-320.
– Ahmadi, H., Rahimmalek, M. and Zeinali, H., 2014. Assessment of the genetic variation of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) populations using phytochemical, morphological and ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology, 54: 190–197.
– Ahmadi, M., Modarrea-Sanavy, S.A.M., Kafi, M. and Sefidkon, F., 2015. Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal plants Nowruzak (*Salvia leriifolia*) using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forest Plant Breeding and Genetic Reseaerch, 23(1): 1-12(In Persian).
– Amiri, H., 2007. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Tanacetum polycephalum* Schutz. Bip. International Journal of Botany, 3:321–324.
– Arif, I.A., Khan, H.A., Shobrak, M., Al Homaidan, A.A., Al Farhan, A.H. and Al Sadoon, M., 2010. Measuring the genetic diversity of Arabian Oryx using microsatellite markers: implication for captive breeding. Genes & Genetic Systems, 85:141–145.
– Baliyan, D., Sirohi, A., Kumar, M., Kumar, V., Malik, S., Sharma, S. and Sharma, S., 2014. Comparative genetic diversity analysis in *chrysanthemum*: A pilot study based on morpho-agronomic traits and ISSR markers. Scientia Horticulturae, 167: 164–168.
– Clasen, B.M., Moss, N.G., Chandler, M.A. and Smith, A.G., 2011. A preliminary genetic structure study of the non-native weed, common tansy (*Tanacetum vulgare*). Canadian Journal of Plant Sciences, 91: 717–723.
– Dastmalchi, T., Omidi, M., Torabi, S., Madah-Arefi, H., Etminan, A., Hasani, M.H. and Behzadi-Rad, M., 2011.Valuating genetic diversity in medicinal plant *Althaea* & *Alcea* spp L.with molecular marker of AFLP. Novin Genetics, 6:79- 87
– Gharibi, Sh., Rahimmalek, M., Mirlohi, A., Majidi, M. M. and Tabatabaei, B. E. S. 2011. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* and *Achillea millefolium* subsp. *elbursensis* using morphological and ISSR markers. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 2413–2423.
– Ghasemi Pirbalouti, A., Bahmani, M. and Avijgan, M., 2009. Anti-Candida activity of some of the Iranian medicinal plants. Electronic Journal of Biology, 5: 85–88.
– Javidnia, K., Miri, R., Soltani, M. and Khosravi, A.R., 2008. Composition of the essential oil of *Tanacetum polycephalum* Schultz Bip. subsp. farsicum Podl. Journal of Essential Oil Research, 20:209–211.
– Hadian, J., Karimi, A., Azizi, A. and Khadivi-Khube, A., 2015. Ubiqutous genetic diversity among and within wild populations of *Satureja rechingeri* assessed with ISSR markers. Plant Systematic and Evolution. 301:923-930.
– Houri, M. and Ferchichi, A., 2008. Study of genetic polymorphism of *Artemisisa herba – alba* from Tunisia using ISSR markers. African Journal of Biotechnology, 7: 44-50.
– Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P K. and Singh, Sh. B., 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts *Marianum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24: 278–292.
– Liu, J., Wang, L., Geng, Y., Wang, Q., Luo, L. and Zhong Y., 2006. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotate* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau. Genetica, 128:385–394.
– Mahdavi, M., Jouri, M., Mahmoudi, J., Rezazadeh, F. and Mahzooni-Kachapi, S. 2013. Investigating the altitude effect on the quantity and quality of the essential oil in *Tanacetum polycephalum* Sch.-Bip. In the Baladeh region of Nour, Iran. Chinese Journal of Natural Medicines, 11: 553–559.
– Malekpoor, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Salimi, A., Shabani, L., Sharifi, M. and Hamedi, B., 2015. Antimicrobial and antioxidant activities and total phenolic content of *Tanacetum polycephalum* Schutz.Bip. as a folkloric herb in South western Iran. Indian Journal of Traditional Knowledge, 14: 370–375.
– Mohammad Shafie, B. Shafie., Sayed, M. Zain Hasan., Abdullah, M. Zain. and Ramisah, M. Shah.

2010. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1: 6–16.

– Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K. and Graner, A., 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. Plant Science, 173:638–649.

– 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.

– Zhao, K.G., Zhou, M.Q. and Chen, L.Q., 2007. Genetic diversity and discrimination of *Chimonanthus praecox* (L.) Link germplasm using ISSR and RAPD markers. Horticulture Science, 42: 1144–1148.

2011. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 4426–4451.

– Prevost, A. and Wilkinson M. J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 98*:* 107–112.

– Rezaee, M.B., Jaimand, K. and Naderi, M., 2012. Chemical composition of the essential oil of *Tanacetum polycephalum* subsp. *polycephalum* from different locations of Azerbaijan Province, Iran. Journal of Medicinal Plants and By-products, 1: 71–74.

– Sonboli, A., Stroka, K., Kazempour Osaloo, Sh. and Oberprieler, Ch., 2012. Molecular phylogeny and taxonomy of *Tanacetum* L. (Compositae, Anthemideae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA *trn*H–*psb*A sequence variation. Plant Systematics and Evolution, 298: 431–444.

– Tagizad, A., Ahmadi, J., Haddad, R. and Zarrabi, M.,

Genetic variability of *Tanacetum polycephalum* populations in West Azarbaijan using ISSR molecular markers

M. Mojarrad Ashenaabad[1]G, S. Hosseini Sarghein[2], A. Sonboli[3] and R. Heidari[4]

1*- PhD Student, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University Pardis, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.
Email: Mojarrad2017@gmail.com
2- Corresponding author, Assist. Prof, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.
3- Assoc. Prof., Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. Iran.
4- Prof., Saba Nonprofit University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 13.02.2018 Accepted: 14.07.2018

Abstract

Tanacetum polycephalum from Anthemideae tribe of Asteraceae family is a rangeland species with high morphological diversity and vast dispersal in Northwest, East and centre parts of Iran. The purpose of this research was studying genetic diversity of 20 populations of T. polycephalum in West Azarbayjan using ISSR molecular marker. Ten ISSR primers out of 14 primers could be scored based on presence or absence of each band. Over all 208 bands were produced .The range number of bands was between 15(IS24) to 28 (IS20) and the average was 20.8. Regarding the polymorphism bands percentage, IS8, IS1, IS10, IS13, IS20 markers had high percentage (100) and IS24 marker had the lower percentage (80) and mean percentage of polymorphism of the primers was %96.03. PIC, RP, EMR and MI means were 0.30, 6.06, 19.5 and 6.13 respectively. Over all the most effective markers were IS8, IS1 and IS10. Results of cluster analysis revealed the grouping of studied populations in 2 main and 4 subgroups, in which the different populations collected from the same locality were located in the same group. Therefore, a close relationship was characterized between geographic location and genetic diversity and it may be concluded that geographic and climatic factors could be one of the responsible main factor for genetic diversity.

Keywords: Cluster analysis, ISSR marker, *Tanacetum polycephalum*, West Azarbaijan.