ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیتهای گیاه خارمریم با استفاده از نشانگر مولکولی

نوید زمانی[۱]، خالد میرزایی[۲*] و وحید زمانی[۳]

[۱] بهبهان، دانشگاه صنعتی خاتم‌النبیاء بهبهان، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست

[۲] سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

[۳] فرانسه، گرونوبل، دانشگاه ژوزف‌فوریر، دانشکده اکولوژی آلپین

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۱

چکیده

خارمریم از خانواده کاسنی، یکی از گیاهان دارویی با خصوصیات دارویی منحصر به فرد در درمان بیماریهای کبد است که در بسیاری از مناطق ایران رشد می‌کند. در این مطالعه از نشانگر SCoT برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۶ نمونه خارمریم از مناطق مختلف استانهای خوزستان و ایلام استفاده شد. در مجموع ۱۴۶ قطعه تکثیر شد و ۶۹ درصد از آنها چندشکلی بودند. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر SCoT10 با ۱۲ قطعه و کمترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای SCoT22، SCoT47 و SCoT55 با شش قطعه بود. متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۸/۵۸ و متوسط باندهای چندشکلی ۶ بود. محتوی اطلاعات چندشکلی و قدرت تفکیک (PIC_D) بین ۰/۰۸۹ در آغازگر SCoT22 و ۰/۲۱۹ در آغازگر SCoT31 با میانگین ۰/۱۵۱ متغیر بود. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد، تجزیه خوشه‌ای با الگوریتم UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی انجام شد. براساس تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های خارمریم به ۳ گروه تقسیم شدند. براساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت (۰/۴۴) مربوط به دو نمونه ایوان و بهبهان، و همچنین بیشترین شباهت (۰/۹۲) بین دو نمونه از میان‌آب از یک منطقه جغرافیایی مشابه بود. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که سطح بیشتری از تنوع به درون جمعیتها (۸۹ درصد) تعلق داشت، درحالی که تنها ۱۱ درصد تنوع در بین جمعیتها مشاهده شد. در نهایت نتایج نشان‌دهنده تنوع زیاد در بین ژنوتیپهای مورد مطالعه بود.

واژه های کلیدی: گیاه دارویی، نشانگر SCoT، محتوی اطلاعات چندشکلی، قدرت تفکیک، *Silybum marianum* L

* نویسنده مسئول، تلفن : ۰۹۳۹۴۸۷۵۷۳۸، پست الکترونیکی: khaled.mirzayi@gmail.com

مقدمه

خارمریم یا مارتیغال گیاهی یک یا دوساله از خانواده کاسنی است که بومی مناطق مدیترانه‌ای و به صورت خودرو در مناطق شمال، غرب و جنوب ایران می‌روید (۳). خارمریم ($2n = 2x = 34$) بدون کرک، با ارتفاع ۱۵۰-۵۰ و ریشه ضخیم و ساده در مناطق گرم و مرطوب به خوبی رشد می‌کند. برگهای این گیاه خاردار و در اطراف رگبرگها دارای لکه‌های سفید است. خارمریم گیاهی خودگشن با گلهای صورتی یا ارغوانی رنگ است و زمان گلدهی آن در ماههای اردیبهشت و خرداد است. روش تکثیر این گیاه از طریق بذر است و تمام قسمتهای این گیاه اعم از ریشه، اندام هوایی و بذر برای مصارف دارویی به کار می‌رود (۱ و ۱۷). بذرهای خارمریم غنی از فلاونولیگان‌های سیلامارین است که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی دارند و در درمان بیماریهای شدید کبدی و تحریک تکثیر سلولهای کبدی اثرات مفیدی از آن مشاهده شده است. از دیگر اثرات درمانی خارمریم کاهش چربی خون، کاهش قند

خون و خواص ضد سرطانی است (۱۷ و ۲۵). به واسطه اهمیت دارویی که در خارمریم مشاهده شده سالیان درازی است که این گیاه در مناطق مختلفی از اروپا، آمریکا و آفریقا کشت می‌شود و همچنین ارقام اصلاح شده‌ای از خارمریم نیز در این کشورها معرفی شده است (۱۲).

تقریباً ۶۶ درصد از ۵۰ هزار گونه گیاهی دارویی متفاوت مورد استفاده، از توده‌های وحشی جمع‌آوری می‌شوند. در عوض فقط ۱۰ درصد از گونه‌های دارویی تجاری، تحت کشت هستند. نگرانیها در خصوص از بین رفتن توده‌ها، کاهش تنوع ژنتیکی و تخریب زیستگاهها در حال افزایش است (۶). تعداد زیادی از گونه‌های دارویی وجود دارد که در خطر انقراض هستند و این مخاطرات به این دلیل به وجود می‌آید که منابع طبیعی نامحدود هستند و برای مدت طولانی نمی‌توان از آن بهره گرفت (۱۵). با افزایش جمعیت انسان در چند ده اخیر و افزایش تقاضا برای گیاهان دارویی برداشتهای بی‌رویه در رویشگاههای طبیعی تهدیدی بزرگ برای از بین بردن ذخایر ژنتیکی خواهد بود که خارمریم نیز با اهمیت دارویی که دارد در آینده از این مشکل مستثنی نخواهد بود.

مطالعه تنوع ژرم‌پلاسمهای موجود و شناخت روابط ژنتیکی آنها یک هدف با ارزش برای بهبود راهکارهای حفاظت از گونه‌ها و اصلاح آنها است. اطلاعات حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های مختلف کمکی مؤثر در انتخاب افراد برای ورود ژنهای مطلوب از ژرم پلاسمهای متنوع به درون پایه زراعی است و همچنین تنوع ژنتیکی به عنوان یک جزء بنیادی از تنوع زیستی، کلیدی برای بقای طولانی مدت و تکامل گونه یا جمعیت در محیطهای در حال تغییر است (۱۳ و ۲۳). بنابراین، دسترسی به دانش مناسب از سطوح و الگوهای تنوع ژنتیکی در جهت تدوین راهکارهای حفاظت مؤثر و بهره‌برداری پایدار از منابع ژنتیکی، ضروری است.

امروزه روشهای مختلفی مانند استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای ژنتیکی برای برآورد تنوع در گیاهان استفاده می‌شود که درمیان این روشها، استفاده از نشانگرهای مولکولی نتایج مطمئن‌تری را در اختیار محققان قرار می‌دهد. نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی برای مطالعه و تخمین ساختار ژنتیکی جمعیتهای گیاهی، فراهم آورده‌اند (۲۱). نشانگر SCoT از جمله نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر PCR است که براساس تنوع در ناحیه‌های مجاور حفاظت شده کدون آغاز ATG طراحی شده است. در این تکنیک درون نواحی ژنی، شبه‌ژنها و عناصر قابل انتقال با استفاده از یک آغازگر منفرد ۱۸ نوکلئوتیدی که محتوی GC آن بین ۵۰ تا ۷۲ درصد است تکثیر می‌شود. نشانگر SCoT به صورت غالب ظهور می‌کند البته ممکن است به خاطر جهشهایی از نوع درج و یا حذف به صورت هم‌بارز نیز ظهور یابد. یکی از مزایای مهم این نشانگر آسان و کم هزینه بودن نسبت به سایر نشانگرهاست و به آسانی در آزمایشگاههایی که فقط ابزار استفاده از ژل آگارز در آن وجود دارد برای تجزیه و تحلیلهای ژنتیکی قابل استفاده است (۹). از نشانگر SCoT اخیراً در مطالعاتی که مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مهمی مانند سیاه‌دانه، داودی و گیاه رامی به کارگرفته شده که در مقایسه با سایر نشانگرهای دیگر عملکرد بهتری را نشان داده است (۱۱، ۱۴ و ۲۳). هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای مختلف خارمریم، با استفاده از نشانگر SCoT در استانهای خوزستان و ایلام بود.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه ها با جمع‌آوری بذر از درون توده های هر منطقه به صورت تصادفی و قرار دادن آنها در کیسه مجزا صورت گرفت. در این مطالعه، از ۳۶ نمونه خارمریم که شامل ۹ توده جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام و خوزستان بود استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- مناطق جمع آوری نمونه‌های خارمریم

شماره	اسامی نقاط نمونه برداری	استان	تعداد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	دزفول	خوزستان	۴	۴۹° ۸۰'	۳۰° ۶۶'
۲	بهبهان	خوزستان	۴	۵۰° ۲۳'	۳۰° ۵۹'
۳	رامهرمز	خوزستان	۵	۴۹° ۳۵'	۳۱° ۱۵'
۴	میان‌آب	خوزستان	۴	۴۸° ۴۵'	۳۱° ۹۷'
۵	شوش	خوزستان	۵	۴۸° ۲۶'	۳۲° ۰۸'
۶	ایذه	خوزستان	۳	۴۹° ۸۴'	۳۱° ۸۱'
۷	دهلران	ایلام	۴	۴۷° ۲۷'	۳۲° ۶۸'
۸	دره شهر	ایلام	۳	۴۷° ۳۸'	۳۳° ۱۴'
۹	ایوان	ایلام	۴	۴۶° ۳۰'	۳۳° ۸۱'

پس از کشت بذرهای نمونه‌های مختلف در تشتک، استخراج DNA از جوانه‌های هر نمونه بر اساس روش دویل-دویل با کمی تغییرات (۱۰) انجام گرفت. در بافتها و برگهای خارمریم بالغ ترکیبات ثانویه و مواد بازدارنده به وفور یافت می‌شوند که استخراج DNA را با مشکل مواجه می‌کنند به همین دلیل از جوانه‌های حاصل از بذر استفاده گردید، چون مقدار این ترکیبات در آنها نسبت به گیاه بالغ کمتر بود. تعیین کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز برروی ژل آگارز یک درصد و تعیین غلظت با روش اسپکتروفتومتری انجام شد. ۳۰ آغازگر SCoT در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و تنها آغازگرهایی که دارای قطعات واضح و تکرار پذیر بودند برای ارزیابی استفاده گردید که در نهایت از ۱۷ آغازگر SCoT در این مطالعه استفاده شد (جدول ۲). آغازگرها بر اساس آغازگرهای استفاده شده در بررسی تنوع ژنوتیپهای برنج و انبه طراحی شده و توسط شرکت تکاپو زیست ساخته شد (۹ و ۱۹). واکنشهای زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر بافر X۱۰، میکرولیتر کلریدمنیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs (ساخت شرکت فرمنتاز)، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر SCoT با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک‌پلی‌مراز (۱/۵ واحد) (ساخت شرکت فرمنتاز) و ۱۲/۶ میکرولیتر آب مقطر استریل با استفاده از دستگاه ترمال‌سایکلر شرکت Bio-Rad انجام شد. مراحل واکنشهای زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک دوره ۴ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، سپس ۳۵ دوره دماهای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، دمای اتصال با توجه به نوع آغازگر از ۴۵ تا ۶۲ درجه متغیر و برای همه آغازگرها یک دقیقه بود، ۷۲ درجه دو دقیقه و در نهایت یک دوره دوازده دقیقه‌ای در ۷۲ درجه بود. سپس محصولات واکنشهای زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل ۱/۵ درصد آگارز برای انجام الکتروفورز بارگیری شدند. پس از الکتروفورز، ژل در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و بعد از شستن ژلها با آب مقطر از ژلها توسط دستگاه UV عکس‌برداری به عمل آمد. با توجه به اینکه نشانگر SCoT دارای الگوی غالب است، بنابراین امتیاز دهی قطعات حاصل از الکتروفورز ژلهای آگارز به صورت صفر (عدم وجود قطعه) و یک (وجود قطعه) برای هرکدام از آللها صورت گرفت. عملیات تجزیه خوشه‌ای که شامل محاسبه ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد (Jaccard)، دایس (Dice)، اوشیایی (Ochiai) و Simple matching و خوشه‌بندی با استفاده از ضرایب تشابه یادشده و الگوریتمهای UPGMA، Single، Complete linkage و WPGMA بود با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc-2.02 انجام شد. سپس ضرایب کوفنتیک آنها محاسبه و روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب

تعیین شد (۲۱). تست مانتل، تجزیه به مختصات اصلی برای نمونه‌ها و عملیات تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc-2.02 انجام شد (۲۸).

جدول ۲- خصوصیات و نتایج حاصل از تعداد باندهای هر کدام از آغازگرهای SCoT

نشانگر	توالی بازی آغازگرها ′۳-′۵	تعداد کل قطعات	تعداد قطعات چند شکل	درصد قطعات چندشکل	شاخص محتوای چندشکلی و تفکیک‌پذیری PIC_D
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	۹	۷	٪۷۸	۰/۱۸
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	۱۲	۹	٪۷۵	۰/۱۹
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	۸	۵	٪۶۲/۵	۰/۱۲۴
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	۹	۷	٪۷۸	۰/۱۷۴
SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC	۶	۴	٪۶۶/۶	۰/۰۸۹
SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG	۱۱	۶	٪۵۴/۵	۰/۱۱۹
SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG	۹	۵	٪۵۵/۵	۰/۱۲۱
SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	۱۰	۸	٪۸۰	۰/۲۱۹
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	۷	۵	٪۷۱/۵	۰/۱۷۵
SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA	۱۰	۷	٪۷۰	۰/۱۹۶
SCoT45	ACAATGGCTACCACTGAC	۱۱	۸	٪۷۲/۵	۰/۲
SCoT46	ACAATGGCTACCACTGAG	۸	۴	٪۵۰	۰/۱۲۱
SCoT47	ACAATGGCTACCACTGCC	۶	۴	٪۶۶/۵	۰/۱۴۷
SCoT54	ACAATGGCTACCACCAGC	۷	۶	٪۸۵/۵	۰/۱۹۵
SCoT55	ACAATGGCTACCACTACC	۶	۴	٪۶۶/۵	۰/۱۲۴
SCoT61	ACAATGGCTACCACTACC	۹	۷	٪۷۷/۵	۰/۲۰۱
SCoT74	CCATGGCTACCACCGGCA	۸	۶	٪۷۵	۰/۱۹۷
تعداد کل	-	۱۴۶	۱۰۲	-	-
میانگین	-	۸/۵۸	۶	٪۶۹	۰/۱۵۱

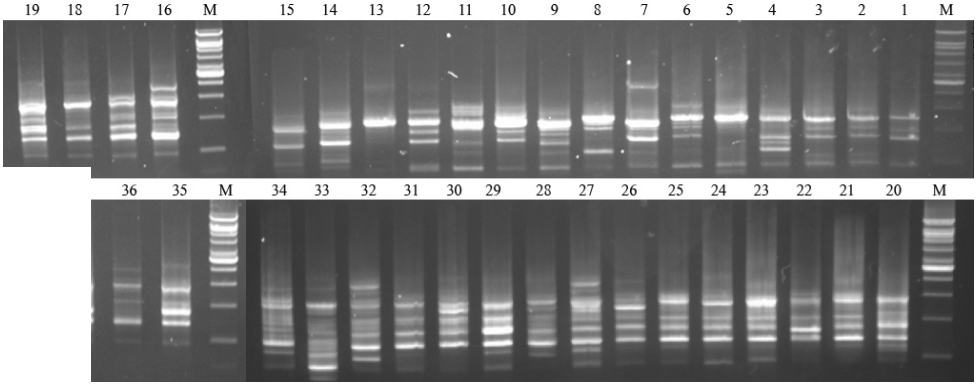
همبستگی ماتریس محل جغرافیایی نمونه‌ها با ماتریس داده‌های مولکولی به وسیله تست مانتل و توسط نرم افزار xlstat ارزیابی شد. شاخص تنوع ژنی، تجزیه به مختصات اصلی برای جمعیتها، فاصله و شباهت بین جمعیتها و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.1 برآورد گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگر با استفاده از رابطه۱ (۲۴) و شاخص تفکیک پذیری (D) با استفاده از رابطه۲ (۲۶) محاسبه شد. pi فراوانی حضور قطعه و pj فراوانی عدم حضور قطعه است. k تعداد گروههای ایجاد شده، nj تعداد افراد در هر گروه و N تعداد گروه ممکن در هر جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. شاخص محتوای چندشکلی و تفکیک‌پذیری PIC_D نشانگر با استفاده از فرمول $PIC_D = PIC \times D$ برای هر آغازگر با نرم افزار Excel برآورد گردید (۲۰).

$$PIC = 1 - \sum_{i-1}^{n} p_i^2 - 2\sum_{i-1}^{n-1} \sum_{j-i+1}^{n} p_i^2 - p_j^2 \quad \text{رابطه۱}$$

$$D = 1 - \frac{\sum_{j=1}^{k} n_j (n_j - 1)}{N(N-1)} \quad \text{رابطه۲}$$

نتایج

با ارزیابی اولیه تصاویر حاصل از الکتروفورز ژلها، آغازگرهای فاقد باند چندشکل با وضوح کافی از ادامه مراحل بررسی حذف شدند. به عبارتی دیگر از میان ۳۰ آغازگر استفاده شده در این تحقیق ۱۷ آغازگر SCoT که قطعات چندشکل و تکرارپذیر تکثیر کرده بودند برای بررسی تنوع ۳۶ نمونه خارمریم جمع‌آوری شده از استانهای خوزستان و ایلام استفاده شد. آغازگرهایی که از ادامه بررسی آنها در این تحقیق انصراف به عمل آمد شامل SCoT1، SCoT2، SCoT3، SCoT6، SCoT14، SCoT16، SCoT18، SCoT19، SCoT21، SCoT24، SCoT32، SCoT48 و SCoT71 بود. در شکل ۱ ژل مربوط به آغازگر SCoT33 نشان داده شده است. آغازگرهای مورد مطالعه در کل ۱۴۶ قطعه تکثیر (۸/۳۶ قطعه نسبت به هر آغازگر) کردند که از میان آنها ۱۰۲ قطعه (۶۹ درصد) چندشکل بود و اندازه قطعات تکثیر شده از ۱۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز نیز متغیر بود (جدول ۲). درصد چندشکلی درمیان آغازگرها از ۳۷ درصد برای آغازگر SCoT46 تا ۸۵ درصد برای آغازگر SCoT54 متغیر بود. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر SCoT10 با ۱۲ قطعه و کمترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای SCoT22، SCoT47 و SCoT55 با شش قطعه بود. متوسط تعداد باند برای همه آغازگرها ۸/۵۸ و متوسط تعداد باندهای چندشکل نیز ۶ بود.



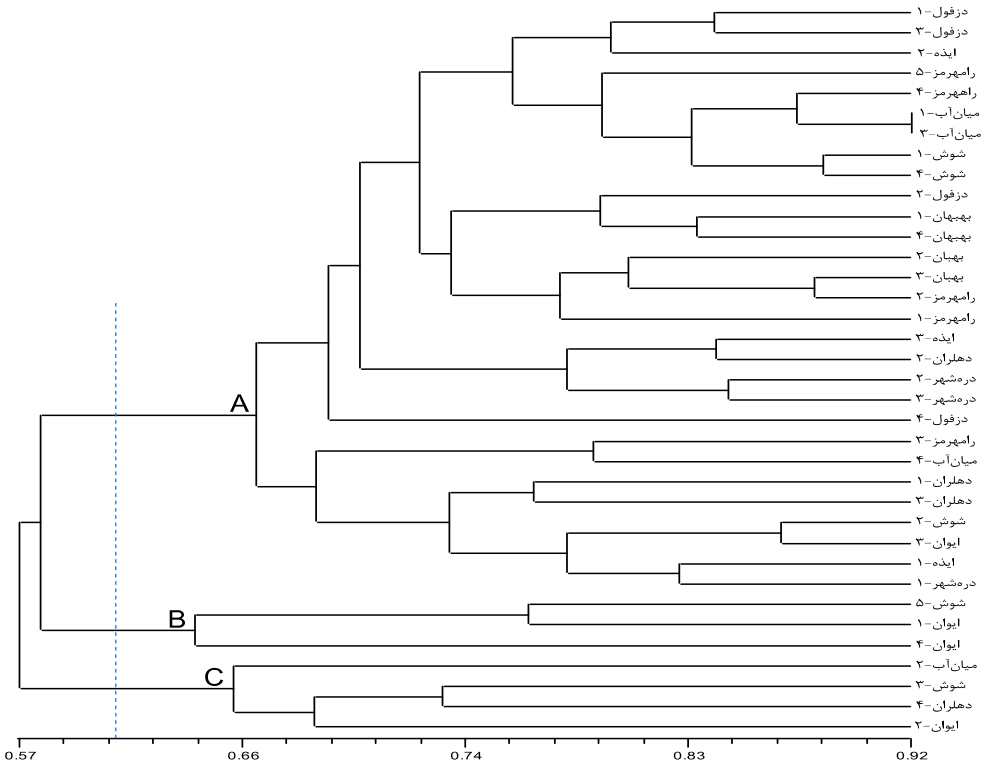
شکل ۱- نمونه عکس مربوط به الکتروفورز محصول PCR حاصل از آغازگر SCoT33. مارکر استفاده شده در این ژل ۱۰۰bp (ساخت شرکت فرمنتاز) بود.

میانگین شاخص PIC_D حاصل از کل آغازگرها ۰/۱۵۱ بود که بیشترین شاخص PIC_D در آغازگر SCoT31 با ۰/۲۱۹ و کمترین شاخص PIC_D در آغازگر SCoT22 با ۰/۰۸۹ مشاهده شد (جدول ۲). ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه به‌دست آمده از روشهای دایس، اوشیایی، جاکارد و Simple matching با دندروگرامهای حاصل از الگوریتمهای مختلف محاسبه شد که براساس نتایج به دست آمده در جدول ۳ ماتریس تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA بیشترین مقدار ضریب کوفنتیک (۰/۹) را به خود اختصاص دادند. بنابراین براساس نتایج به دست آمده بهترین روش محاسبه ماتریس تشابه روش جاکارد، و مناسب‌ترین الگوریتم برای رسم دندروگرام، روش UPGMA تعیین شد. براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نقطه برش دندروگرام در نقطه‌ای قرار می‌گیرد که مقدار واریانس بین گروههای ایجاد شده نسبت به واریانس داخل گروهها در بیشترین حالت خود باشد که در این مطالعه با تغییر نقطه برش و محاسبه واریانس بین و داخل گروهها، بیشترین مقدار واریانس بین گروههای ایجاد شده نسبت به واریانس داخل گروهها در نقطه ۰/۶ دندروگرام بود (۲۱). بر اساس نتایج حاصل از دندروگرام رسم شده، ۳۶ نمونه خارمریم در ۳ گروه دسته‌بندی شدند و مقایسه ماتریسهای فواصل جغرافیایی و داده‌های

مولکولی حاکی از عدم تطابق الگوی تنوع نمونه‌های خارمریم با مکان جغرافیایی آنها بود (شکل ۲). دامنه ضریب تشابه جاکارد در بین نمونه‌ها از ۴۵ درصد تا ۹۲ درصد با میانگین ۶۸ درصد متغیر بود که بیشترین شباهت در بین نمونه‌های میان‌آب-۱ و میان‌آب-۲ با ۹۲ درصد تشابه مشاهده شد. کمترین میزان شباهت نیز براساس داده‌های حاصل از ماتریس تشابه، ۴۴ درصد بود که بین نمونه‌های ایوان-۴ و بهبهان-۲ با فاصله جغرافیایی زیاد از هم مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۳- مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک با روشهای متفاوت در الگوریتمهای مختلف

روش	الگوریتم			
	UPGMA	Single	WPGMA	Complete linkage
دایس	۰/۸۵	۰/۷۴	۰/۸۳	۰/۸۱
جاکارد	۰/۹	۰/۸	۰/۸۸	۰/۸۵
سیمپل‌مچینگ	۰/۸۴	۰/۸۱	۰/۸۳	۰/۸۲
اوشیایی	۰/۷۳	۰/۶۹	۰/۷۲	۰/۷۲



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه داده‌های مربوط به نمونه‌های خارمریم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایلام و خوزستان با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد

با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.1 مقدار فاصله ژنتیکی و تشابه ژنتیکی بین جمعیتهای هرمنطقه برآورد شد که کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیتهای دهلران و شوش مشاهده شد و بیشترین فاصله مربوط به جمعیتهای بهبهان و ایوان بود. همچنین شاخص تنوع‌ژنی (He) در گروهها از ۰/۱۱۹ در نمونه‌های بهبهان و ۰/۲۶۲ در نمونه‌های شوش متغیر بود (جدول ۴). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیتهای ایجاد شده نشان داد که

تنوع بالایی داخل گروههای خارمریم وجود دارد و همچنین شباهت زیادی بین گروههای مورد مطالعه وجود داشت (جدول ۵). نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی جمعیتهای مورد مطالعه به خوبی از هم تفکیک کرد که در شکل ۳ نشان داده شده است. دو مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مختصات اصلی باهم ۷۰ درصد از تغیرات را توجیه کردند که نشان‌دهنده توزیع مناسب آغازگرها در ژنوم است. براساس 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 جمعیتها بود که نتایج حاصل از تجزیه واریانس نیز مؤید آن بود.

جدول ۴- مقدار شاخص تنوع ژنی (He)، فاصله ژنتیکی (بالای قطر) و همسانی ژنتیکی (پایین قطر) در گروهها

	شاخص تنوع ژنی (He)		دزفول	بهبهان	رامهرمز	میان‌آب	شوش	ایذه	دهلران	دره‌شهر	ایوان
دزفول	۰/۱۷۶ ±۰/۰۱۸	دزفول	***	۰/۰۸۷	۰/۰۷۹	۰/۱۲۷	۰/۰۸۷	۰/۰۹۹	۰/۱۳۸	۰/۱۳۹	۰/۱۷۳
بهبهان	۰/۱۱۹ ±۰/۰۱۵	بهبهان	۰/۹۱۷	***	۰/۰۷۸	۰/۲۰۶	۰/۱۴۱	۰/۱۳۲	۰/۱۴۷	۰/۱۷۱	۰/۲۳۲
رامهرمز	۰/۱۷۴ ±۰/۰۱۸	رامهرمز	۰/۹۲۴	۰/۹۲۵	***	۰/۱۰۳	۰/۱۰۲	۰/۰۹۹	۰/۱۲۷	۰/۱۰۹	۰/۱۹۶
میان‌آب	۰/۲۰۲ ±۰/۰۱۹	میان‌آب	۰/۸۸۱	۰/۸۱۴	۰/۹۰۲	***	۰/۰۸۰	۰/۱۹۰	۰/۱۴۵	۰/۱۴۹	۰/۱۵۷
شوش	۰/۲۶۲ ±۰/۰۱۸	شوش	۰/۹۱۷	۰/۸۶۸	۰/۹۰۳	۰/۹۲۳	***	۰/۰۹۳	۰/۰۵۷	۰/۰۹۱	۰/۰۶۴
ایذه	۰/۱۶۴ ±۰/۰۱۸	ایذه	۰/۹۰۵	۰/۸۷۶	۰/۹۰۶	۰/۸۲۷	۰/۹۱۱	***	۰/۰۹۰	۰/۰۶۹	۰/۱۸۱
دهلران	۰/۲۵۵ ±۰/۰۱۵	دهلران	۰/۸۷۱	۰/۸۴	۰/۸۸۱	۰/۸۶۵	۰/۹۴۴	۰//۹۱۴	***	۰/۰۸۸	۰/۰۸۹
دره‌شهر	۰/۱۵۱ ±۰/۰۱۴	دره‌شهر	۰/۸۷	۰/۸۴۳	۰/۸۹۷	۰/۸۶۱	۰/۹۱۳	۰/۹۳۳	۰/۹۱۶	***	۰/۱۵۳
ایوان	۰/۱۹۴ ±۰/۰۱۲	ایوان	۰/۸۴۱	۰/۷۹۳	۰/۸۲۲	۰/۸۵۵	۰/۹۳۸	۰/۸۳۵	۰/۹۱۵	۰/۸۵۸	***

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نه توده خارمریم مربوط به استان ایلام و خوزستان

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	سطح معنی‌دار
بین جمعیتها	۸	۲۲۳/۳	۲۷/۹	٪۱۱	۰/۰۱*
درون جمعیتها	۲۷	۵۰۹/۲	۱۸/۸	٪۸۹	
کل	۳۵	۷۳۲		٪۱۰۰	

*اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

شکل ۳- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی در توده‌های خارمریم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در استان ایلام و خوزستان

بحث

شناخت توان ژنتیکی گیاهان دارویی و درک گستره اکوفیزیولوژیک آنها برای تضمین رشد و عملکرد شیمیایی مناسب ضروری است و در مدیریت مؤثر جمعیتهای گیاهی وحشی نیز نقش مؤثری را ایفاء می‌کند. تاکنون تنها بخش کوچکی از تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر ژنی برای اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و بیشتر ذخایر ژنی ناشناخته و بدون استفاده مانده است (۴، ۵ و ۱۳). بنابراین جمع‌آوری، شناسایی صفات، طبقه‌بندی و بررسی تنوع گونه‌هایی مانند خارمریم که از اهمیت دارویی برخوردارند یک ضرورت و اساس تحقیقات در برنامه‌های اصلاحی آینده می‌باشد. آنالیز تنوع ژنتیکی در مجموعه ژرم‌پلاسم می‌تواند دسته‌بندی ارقام را به طور واقع گرایانه و همچنین شناسایی زیرمجموعه‌هایی با احتمال سودمندی بهتر را برای اهداف اصلاحی خاص تسهیل کند (۲۷ و ۲۹). در این مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه دارویی خارمریم که از مناطق مختلف استانهای خوزستان و ایلام جمع‌آوری شده بود با استفاده از نشانگر SCoT و با شاخصهای متفاوتی که اندازه‌گیری شد مورد بررسی قرار گرفت.

به علت افزایش تحقیقات در زمینه ژنومیکس تمایل برای استفاده از نشانگرهایی که به صورت تصادفی نواحی از ژنوم را تکثیر می‌کنند به سوی استفاده از نشانگرهایی که ژنها را مورد هدف قرار می‌دهد سوق یافته است. نشانگرهایی که ژنها را مورد هدف قرار می‌دهند در مقایسه با سایر نشانگرها که به صورت تصادفی (RAPD) و یا نواحی غیر ژنی (SSR) را تکثیر می‌کنند در ارزیابیهای ژنتیکی توانمندتر خواهند بود (۱۸). نشانگر SCoT که در سال ۲۰۰۹ ابداع شده است تفاوت بین ارقام یا ژنوتیپها را بر اساس تنوع اطراف کدون ATG در ژنوم گیاهان مورد مطالعه نشان می‌دهد. یکی از شاخصهای تنوع ژنتیکی در مطالعات جمعیتها، نسبت درصد قطعات چندشکل به کل قطعات تولید شده است که مقدار این شاخص در این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌های صورت گرفته با استفاده از آغازگر SCoT در گیاهان دارویی مختلفی مانند گل داودی، جاترفا و ارکیده از مقدار تنوع کمتری برخوردار بود (۸، ۱۱ و ۲۲) اما در مقایسه با مطالعات صورت گرفته با استفاده از نشانگر SCoT در سیاه‌دانه با ۳۲/۱۳ درصد قطعات چندشکل و در گیاه Jojoba با ۵۸ درصد قطعات چند شکل از مقدار تنوع بیشتری برخوردار بود (۱۴ و ۲۰). قدرت تفکیک یک مارکر بر اساس توانایی تفکیک بین افرادی که باهم ارتباطی ندارند تعیین می‌شود و این به وسیله تعداد گروه تفکیک شده و فراوانی نسبی آنها مشخص می‌شود. PIC_D یکی از شاخصهایی است که به تنهایی هم حاوی اطلاعات آللی، تعداد گروه تفکیک شده و فراوانی نسبی گروههاست. این شاخص از ضرب شاخص تنوع سیمپسون یا شاخص تفکیک پذیری در شاخص اطلاعات چندشکلی حاصل می‌شود. مقدار این شاخص در مارکرهای غالب بین صفر تا ۰/۳۷۵ است و هرچه PIC_D به دست آمده به ۰/۳۷۵ نزدیک‌تر باشد نشانگر هم از محتوی چندشکلی بالا و هم از تفکیک‌پذیری بالایی برخوردار بوده است (۲۰). میانگین شاخص PIC_D در این تحقیق ۰/۱۵۱ بود که در مقایسه با PIC_D به دست آمده در سیاه‌دانه (۰/۰۶۱) بیشتر بود و نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر SCoT در تفکیک نمونه‌های خارمریم در مقایسه با سیاه‌دانه بود. با توجه به اینکه آغازگرهای SCoT61، SCoT54، SCoT45، SCoT31 و SCoT34 نسبت به سایر آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه از مقدار PIC_D بالاتری برخوردار بودند بنابراین می‌توان آنها را به عنوان مناسب‌ترین آغازگرهای SCoT در مطالعات بعدی مربوط به جمعیتهای خارمریم پیشنهاد کرد.

در این مطالعه نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی گروههای مورد مطالعه نشان داد که دو مؤلفه اول ۷۰ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند و درمقایسه با مطالعات صورت گرفته در گیاههای آفتابگردان، ارکیده و

جاتروفا با استفاده از نشانگرهای ISSR، RAPD، SCoT و AFLP از مقدار توجیه بیشتری برخودار بود (۱۱، ۱۵، ۲۰ و ۲۴). در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب داشته باشند و بتوانند با مؤلفه‌های کم تغییرات زیاد را توجیه نماید. از تجزیه به مختصات اصلی همواره به صورت توأم به همراه تجزیه خوشه‌ای در گروه‌بندی و روشن ساختن روابط بین متغیرها و توجیه کل تغییرات داده‌ها استفاده می‌شود (۷).

میزان بالای قطعات چندشکلی و مقدار بالای شاخص PIC_D آغازگرهای SCoT حاکی از توانایی مناسب این تکنیک در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه خارمریم بود. به طور کلی نتایج حاصل از خوشه‌بندی حاکی از تنوع بالا در بین نمونه‌های خارمریم بود و این تکنیک قادر به تفکیک نمونه‌های با ناحیه جغرافیایی مشابه و نزدیک به هم بود. تعیین مقدار ضریب کوفنتیک به‌منظور تعیین بهترین روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب برای داده‌های حاصل از نشانگر SCoT در گیاه خارمریم، نشان داد که بیشترین مقدار ضریب کوفنتیک مربوط به روش جاکارد و الگوریتم UPGMA بود. براساس نتایج حاصل از دندروگرام نمونه‌های همه مناطق به سه گروه A، B و C دسته بندی شدند، اما براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و پراکنده بودن ژنوتیپهای مختلف یک جمعیت در بین سایر جمعیتها به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین جمعیتها با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاههای طبیعی آنها مطابقت نداشت و با مطالعات انجام شده در زیره ایرانی، آفتابگردان و سیاه‌دانه مشابه بود (۲ و ۱۶). بنابراین معنی‌دار نبودن همبستگی بین فواصل جغرافیایی جمعیتها و فواصل ژنتیکی آنها نشان‌دهنده وجود ارتباطات ژنتیکی بین جمعیتهای جدا از هم و جابه جایی ژرم‌پلاسمی است.

نتایج حاصل از واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین افراد در گروهها از تنوع بین خود گروهها زیادتر بود که می‌تواند ناشی از جابه جایی ژرم‌پلاسمی، نزدیک بودن زمان پیدایش و مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت ژنتیکی و خویشاوندیهای احتمالی و داشتن اجداد مشترک باشد (۱، ۲، ۳ و ۵). همچنین با توجه به اینکه سیستم تولید مثل تأثیر فراوانی برروی تنوع بین افراد و تنوع بین گروهها می‌گذارد و این الگوی تنوع زیاد در بین افراد داخل گروهها نسبت به تنوع بین گروهها، بیشتر در گیاهان دگرگشن مشاهده شده است پس می‌توان گفت امکان دارد که خارمریم از قبل گیاهی دگرگشن بوده و اکنون به صورت خودگشن درآمده است به همین دلیل این مقدار تفاوت بین افراد در هر گروه وجود دارد (۲۱). در این مطالعه بیشترین فاصله مربوط به جمعیتهای بهبهان و ایوان بود که از لحاظ شرایط جغرافیایی کاملا متفاوت بودند و کمترین فاصله ژنتیکی درون جمعیتهای دهلران و شوش مشاهده شد. همچنین شاخص تنوع‌ژنی (He) در گروهها از ۰/۱۱۹ در نمونه‌های بهبهان و ۰/۲۶۲ در شوش با میانگین ۰/۱۸۸ متغیر بود. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر وجود تنوع زنتیکی زیاد دربین ژنوتیپهای مورد مطالعه بود که با نتایج حاصل از بررسی تنوع اکوتیپهای ایرانی خارمریم با استفاده از صفات مورفولوژیک مشابه بود (۳).

انتخاب نیازمند تنوع است و بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامه توانایی انتخاب ژنوتیپهای برتر افزایش می‌یابد، ارزیابی تنوع در ژرم‌پلاسمهای گیاهی گامی مهم در برنامه‌های اصلاحی و مدیریت آنها به حساب می‌آید. میزان تنوع زیاد در نمونه‌های خارمریم باعث افزایش کارآیی انتخاب در اصلاح و افزایش بهره‌وری بیشتر از خارمریم برای مصارف دارویی است و در نهایت این مطالعه در مدیریت و حفاظت از ژرم‌پلاسمهای با ارزش خارمریم دراستان خوزستان و ایلام مفید و موثر خواهد بود. با توجه به نتایج، تلاقی توده‌ها با فاصله ژنتیکی دور از مناطقی مانند بهبهان و ایوان توصیه می‌شود و همچنین با توجه به

تنوع‌ژنتیکی بالای مشاهده شده درون جمعیت خارمریم، حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود اما چون برداشت‌های بی‌رویه از گیاهان دارویی مانند خارمریم در آینده باعث نابودی این ذخایر باارزش نیز می‌شود، حفظ و نگهداری خارج از محل و ایجاد بانک ژرم‌پلاسم و تکثیر این گیاه نیز توصیه می‌شود.

منابع

۱ – احمدی، م، محمّد ثانوی، ع، کافی، م، سفیدکن، ف، ملک‌زاده، س. ۱۳۹۴. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. دو فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۳(۱): ۱–۱۲.

۲ – پژمان مهر، م، حسنی، م، طباطبایی، م، هادیان، ج. ۱۳۸۸. بررسی تنوع و تفرق ژنتیکی برخی جمعیت های زیره پارسی ((*Bunium persicum* (*Boiss*)) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. فصلنامه علوم محیطی ۲۶ (۲): ۶۳.

۳ – حمید، ر، سیاهپوش، م، مامقانی، ر. ۱۳۹۳. ارزیابی تنوع ژنتیکی ده اکوتیپ خارمریم (*Silybum marianum*) با استفاده از صفات مورفولوژیک، فنولوژیک و فیتوشیمیایی. مجله تولیدات گیاهی ۳۷ (۱): ۳۷–۴۷.

۴ – روحانی، ل، زمانی، م، فتوت، ر. ۱۳۹۴. تنوع در ابعاد و تراکم روزنه ژنوتیپ های جو تحت تنش خشکی و شرایط نرمال. مجله پژوهشهای گیاهی. ۲۸(۵):۹۸۶–۹۹۴.

۵ – میرزایی، ج، حیدری، م عطار روشن، س. ۱۳۹۴. تغییرات پوشش و تنوع زیستی گونه های گیاهی در اثر بهره برداری صنعتی در جنگل شفارود گیلان. مجله پژوهشهای گیاهی. ۲۸(۲): ۴۳۵–۴۴۴.

6- Aguilar-Støen M, Moe S. 2007. Medicinal plant conservation and management: distribution of wild and cultivated species in eight countries. Biodiversity and Conservation 16: 1973-1981.

7- Basaki T, Mardi M, Kermani JM, Pirseyedi SM, Ghafari MR, Haghnazari A, Shanjani PS, Kobaz P. 2009. Assessing *Rosa persica* genetic diversity using amplified fragment length polymorphisms analysis. Scientia Horticulturae 120: 538–543.

8- Bhattacharyya P, Kumaria S, Kumar S, Tandon P. 2013. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of Dendrobium nobile Lindl., an endangered medicinal orchid species. Gene 529: 21-26.

9- Collard BY, Mackill D. 2009. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. Plant Molecular Biology Reporter 27: 86-93.

10- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bulletin 19:11–15.

11- Feng SG, He RF, Jiang MY, Lu JJ, Shen XX, Liu JJ, Wang ZA, Wang HZ. 2016. Genetic diversity and relationships of medicinal Chrysanthemum morifolium revealed by start codon targeted (SCoT) markers. Scientia Horticulturae 201: 118-123.

12- Gresta F, Avola G, Guarnaccia P. 2007. Agronomic characterization of some spontaneous genotypes of milk thistle (*Silybum marianum* L. *Gaertn*.) in Mediterranean environment. Journal of herbs, spices & medicinal plants 12: 51-60.

13- Grime J. 2002. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. Journal of Ecology 86: 902-910.

14- 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 box-derived polymorphism (CBDP) markers. Meta gene 5: 90-97.

15- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MT, Underwood N, Vellend M (2008). Ecological consequences of genetic diversity. Ecology letters 11: 609-623.

16- Jannatdoust M, Darvishzadeh R, Ebrahomi MA .2014 Studying Genetic Diversity in Confectionery Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Using Microsatellite Markers. Crop Biotechnology 6: 61-72.

17- Karkanis A, Bilalis D, Efthimiadou A. 2011. Cultivation of milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn.), a medicinal weed. Industrial Crops and Products 34: 825-830.

18- Kumar P, Gupta V, Misra A, Modi D, Pandey B. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics Journal 2: 141-162.

19- Luo C, He XH, Chen H, Hu Y, Ou SJ. 2012. Genetic relationship and diversity of Mangifera indica L.: revealed through SCoT analysis. Genetic resources and crop evolution 59(7): 1505-1515.

20- Mirzaei K and Mirzaghaderi G. 2017. Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. landraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. Plant Genetic Resources 15: 64-71.

21- Mohammadi S, Prasanna B. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Science 43: 1235-1248.

22- Mulpuri S, Muddanuru T, Francis G .2013. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. Plant science 207: 117-127.

23- Satya P, Karan M, Jana S, Mitra S, Sharma A, Karmakar PG, Ray DP. 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea L. Gaudich*.), a premium textile fiber producing species. Meta gene 3: 62-70.

24- Shete S, Tiwari H, Eleston RC. 2000. On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value. Theoretical Population Biology 57: 265-271

25- Shokrpour M, Mohammadi SA, Moghaddam M, Ziai SA, Javanshir A. 2008. Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 13: 55-69.

26- Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. Nature 163:688.

27- Ramanatha-Rao V, Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant cell, tissue and organ culture 68: 1-19.

28- Rohlf FJ. 1992. NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).Version 1.70.Exeter, Setauket, NY.

29- Tripathi L, Tripathi JN. 2005. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.

Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal Milk thistle using molecular marker

Zamani N.[1], Mirzaei K.[2] and Zamani W.[3]

[1] **College of Environment and Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia Technology University, Behbahan, I.R. of Iran**

[2] **Agricultural Biotechnology Dept., University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran**

[3] **Laboratory of Alpine Ecology, Joseph Fourier University, Grenoble, France**

Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum* L.) belongs to *Compositae* family, is a medicinal plant with unique pharmaceutical properties for treating liver diseases and grows throughout various geographical areas in Iran. In this study, SCoT markers were employed to investigate the genetic diversity of 36 samples of milk thistle from different geographical regions of Ilam and Khuzestan provinces. A total of 146 fragments were amplified and 69% of them were polymorphic. The most amplified fragments were related to the SCoT10 with 12 fragments and the lowest amplified bands were related to the SCoT22, SCoT47 and SCoT55 with 6 fragments. Mean number of amplified bands for primers was 8.58, while the mean number of polymorphic bands was 6.00. Polymorphic information content and discrimination power (PIC_D) varied between 0.089 in SCoT22 and 0.219 in SCoT31 with an average of 0.151. Similarity matrix was generated using the Jaccard coefficient, Cluster analysis was carried out by UPGMA algorithm and Principle Coordinate Analysis. According to cluster analysis, Milk thistle samples were divided into 3 groups. Based upon similarity matrix, the lowest similarity (0.44) was found for two samples from Eyvan and Behbahan and also the highest similarity (0.92) found between two samples from Mian-Ab within the same geographical region. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that a larger proportion of genetic variation (89%) belonged to within the populations, while only a small proportion (11%) observed among the studied populations. The results finally indicated high genetic diversity among the studied genotypes.

Key words: Medicinal plant, SCoT marker, Polymorphic information content, discrimination power, *Silybum marianum* L.