

بررسی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های ایرانی گیاه پنیرک (*Malva neglecta*) با استفاده از کدونهای آغاز هدف واقع شده (SCoT)



عبدالمهدی نوریان*

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۵

چکیده

پنیرک از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که در طب کاربرد فراوان دارد. استخراج DNA به روش CTAB برای ۱۹ ژنوتیپ پنیرک از مناطق جغرافیایی مختلف ایران انجام گرفت و با استفاده از ۱۵ نشانگر مولکولی SCoT تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. نشانگر SCoT در بین ژنوتیپ‌ها چندشکلی مطلوبی نشان داد و اکثر آغازگرها برای بررسی‌های این گونه مناسب بودند. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۸۳ باند تولید کنند، که ۷۶ باند چند شکل مشاهده شد. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۹ ژنوتیپ برابر ۴/۳۶ بود که آغازگرهای SC36، SC11 و SC5 بیشترین تعداد باند (۸) و آغازگرهای SC26 و SC15 کمترین تعداد باند (۳) را نشان دادند. نتایج نشان داد که بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های G18 و G19 و کمترین تشابه را ژنوتیپ G15 با ژنوتیپ G3 داشتند. گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفته و تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تأیید گردید.

واژه‌های کلیدی: گیاه دارویی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی، تنوع ژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۴۶۳۰۹۰۲، پست الکترونیکی: Mehdi_Noorian@yahoo.com

مقدمه

مختلف پنیرک در نقاط دیگر دنیا توسط برخی محققین گزارش شده است (۱۹). نتایج مطالعات انجام شده بر روی خواص ضد میکروبی پنیرک حاکی از آن است که این گیاه دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی علیه بسیاری از پاتوژن‌های انسان است (۲۲). تنوع گونه‌های گیاهی در یک محیط موجب پایداری و افزایش قابلیت تولید آن اکوسیستم می‌گردد، اما تنوع داخل گونه‌ها می‌تواند نقش مهمی را در میزان تولید یک اکوسیستم ایفاء کند (۱۵). آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد دقیق آن در ژرم‌پلاسمهای گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی است. اهمیت تنوع ژنتیکی در گیاهان از دو دیدگاه مورد توجه-

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصاً گیاهان دارویی، در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شد و در عین حال مواد اولیه در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت. توجه به گیاهان دارویی که بخش عمده‌ای از طب سنتی ایران را تشکیل می‌دهد و ارائه اطلاعات درست و علمی درباره پرورش، نگهداری و استفاده از آنها بر پایه یافته‌های جدید روز به روز اهمیت ویژه‌ای می‌یابد (۲۱). پنیرک (*Malva*) گیاهی علفی یک ساله، دوساله یا پایا با خواص شناخته شده دارویی است. گونه‌های مختلف پنیرک همانند *M. neglecta* در کشورهای مختلف دنیا کشت می‌گردد یا به طور خودرو رشد می‌کند (۴). خواص آنتی‌اکسیدانی گونه‌های

کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) استفاده شده است که در مقایسه با نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع بیشتری را نشان داده است (۱۶ و ۲۴). از آنجایی که نشانگر مولکولی SCoT تنوع را براساس مناطق ژنی نشان می‌دهد (تکثیر نواحی با کدون آغاز)، استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی در جهت هتروزیس به منظور اصلاح و افزایش ترکیبات می‌تواند مفید باشد، در نهایت می‌توان از این اطلاعات نیز جهت حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسما استفاده نمود.

مواد و روشها

در تحقیق انجام شده بذره‌های ۱۹ ژنوتیپ از گیاه دارویی پنیرک به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر کد ژنوتیپ و محل دریافت یا جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۹) برای هر ژنوتیپ انجام گرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق اطلاعات جدول ۲ انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود.

همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

است: نخست تنوع ژنتیکی شرط لازم برای رسیدن به محصول بیشتر و پایداری عملکرد است. از سوی دیگر تنوع ژنتیکی، منابع ژنتیکی مفید برای برنامه‌های اصلاحی را شناسایی کرده و باعث حفظ آنها می‌شود (۷). انواع مختلفی از نشانگرها در عرصه علوم ژنتیک، رده‌بندی و به‌نژادی به کار رفته‌اند که اصولاً کاربرد آنها تفاوت چندانی با یکدیگر ندارد ولی هر کدام از این نشانگرها دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. مطالعات در سطح جمعیتها نشان می‌دهد که نشانگر DNA کارآیی بالایی در تشخیص تنوع دارد (۲۳). نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشد. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA تحت تأثیر شرایط محیط قرار نمی‌گیرند و تعداد زیادی از این نشانگرها را می‌توان به راحتی در کل ژنوم جستجو نمود (۱۳). نشانگر مولکولی SCoT یا در ترجمه فارسی، کدونهای آغاز هدف واقع شده، روشی است که در آن پرایمرها بر اساس توالیهای آغاز (ATG) طراحی شده و نواحی بین کدونهای آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر، و تفاوتها آشکار می‌شود. پرایمرهای SCoT معمولاً ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی هستند و محتوای C و G آنها ۵۰ تا ۷۲ درصد است (۱۲). مبنای عملکرد این نشانگر غالبیت است. دو پرایمر تک رشته‌ای در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به رشته‌های مخالف DNA الگو، در جهت عکس هم متصل می‌شوند. چنانچه جهشهای حذف یا اضافه در محل اتصال پرایمر رخ دهد، عدم اتصال پرایمر و عدم سنتز قطعه DNA به وجود خواهد آمد (۶). طول پرایمرها در تکرارپذیری این نشانگر اثر مستقیم دارد. هو و وییک (۱۱) با مقایسه پرایمرهای ۱۲ و ۱۸ نوکلئوتیدی و بررسی قابلیت تکرارپذیری آنها به این نتیجه رسیدند که پرایمرهای ۱۸ نوکلئوتیدی قابلیت تکرارپذیری بالایی دارند. از نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مانند جاتروفا (*Jatropha curcas*) و

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق

ژنوتیپ	استان	شهرستان	کد بانک ژن	ژنوتیپ	استان	شهرستان	کد بانک ژن
G1	یزد	یزد	10534	G11	هرمزگان	بندر عباس	22521
G2	گستان	گنبد	12926	G12	هرمزگان	قشم	22900
G3	همدان	نهادند	14342	G13	هرمزگان	میناب	22903
G4	یزد	شاهدیه	15504	G14	کرمان	کرمان	26408
G5	یزد	تفت	15843	G15	سمنان	دامغان	30789
G6	یزد	صدوق	15922	G16	یزد	طیس	33487
G7	آذربایجان شرقی	هریس	20011	G17	ایلام	دهلران	34327
G8	یزد	صدوق	21113	G18	ایلام	دهلران	34338
G9	یزد	بافق	21122	G19	هرمزگان	بندر عباس	34808
G10	سمنان	سمنان	21601				

جدول ۲- اجزای مخلوط واکنش SCoT بهینه سازی شده

اجزای یک نمونه	جهت تهیه ۲۰ میکرولیتر
آب دوبار تقطیر	۱۲/۳ میکرولیتر
بافر PCR (۱۰x)	۲ میکرولیتر
MgCl ₂ (۵۰ میلی مولار)	۱/۵ میکرولیتر
مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی مولار)	۰/۴ میکرولیتر
آغازگر (۱۰ میکرومولار)	۱/۵ میکرولیتر هر یک
Taq پلیمرز (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳ میکرولیتر
DNA (۱۰ ng)	۲ میکرولیتر
جمع	۲۰ میکرولیتر

در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور بارگذاری نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت. پس از حرکت ژل، جهت رنگ‌آمیزی آن را در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت مشاهده نوارهای DNA استفاده گردید. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$ محاسبه شد، در اینجا p برابر با مجموع نوارهای هر لوکوس برای کلیه ژنوتیپها است (۱۰).

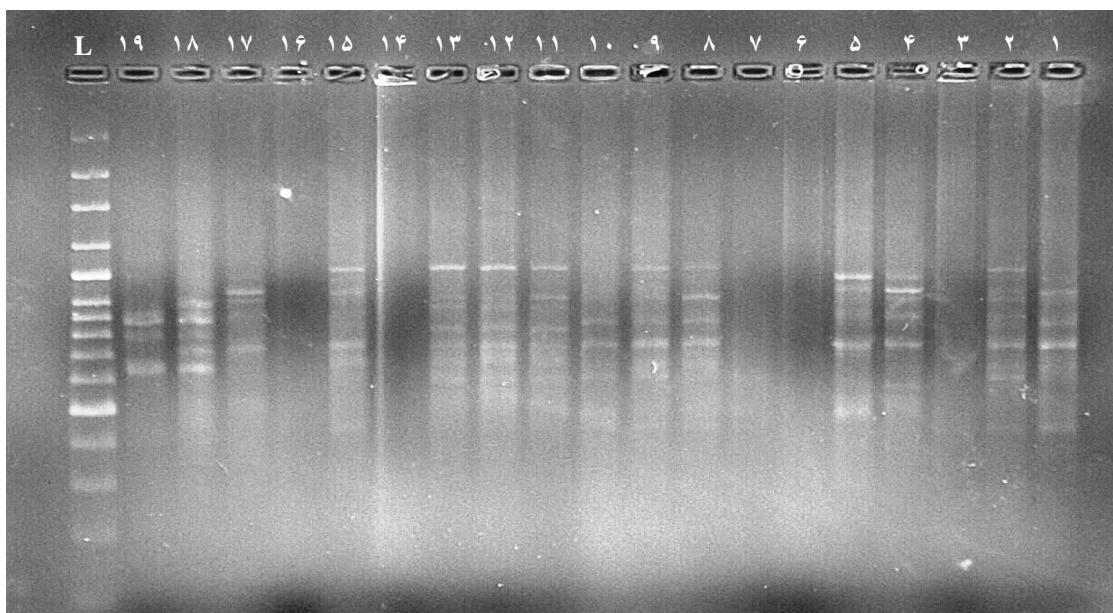
در پایان نیز با استفاده از نرم افزارهای Ntsys 6، DARwin و GenAIEx 6.2 ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای پنیرک مورد مطالعه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ الگوی بانندی ژنوتیپها با استفاده از آغازگر SC28 را برای ۱۹ ژنوتیپ نشان می‌دهد. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۸۳ مکان را تکثیر کنند که از این تعداد ۷ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند، که آغازگرهای SC36، SC11 و SC5 بیشترین تعداد باند (۸) و آغازگرهای SC26 و SC15 کمترین تعداد باند (۳) را نشان دادند. میانگین درصد چند شکلی برابر ۹۲/۷۸ درصد بود که کمترین میزان درصد چند شکلی را آغازگرهای SC40 (۶۶/۶۷ درصد) و SC11، SC36 و SC13 (۷۵ درصد) داشتند و درصد چند شکلی برای سایر آغازگرها ۱۰۰ درصد می‌باشد. همچنین متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۹ ژنوتیپ برابر ۴/۳۶ به دست آمد. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای SC11، SC40 و SC44 بود

توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپها نداشتند نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپها را مشخص کنند. آغازگر SC26 و SC15 با کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)



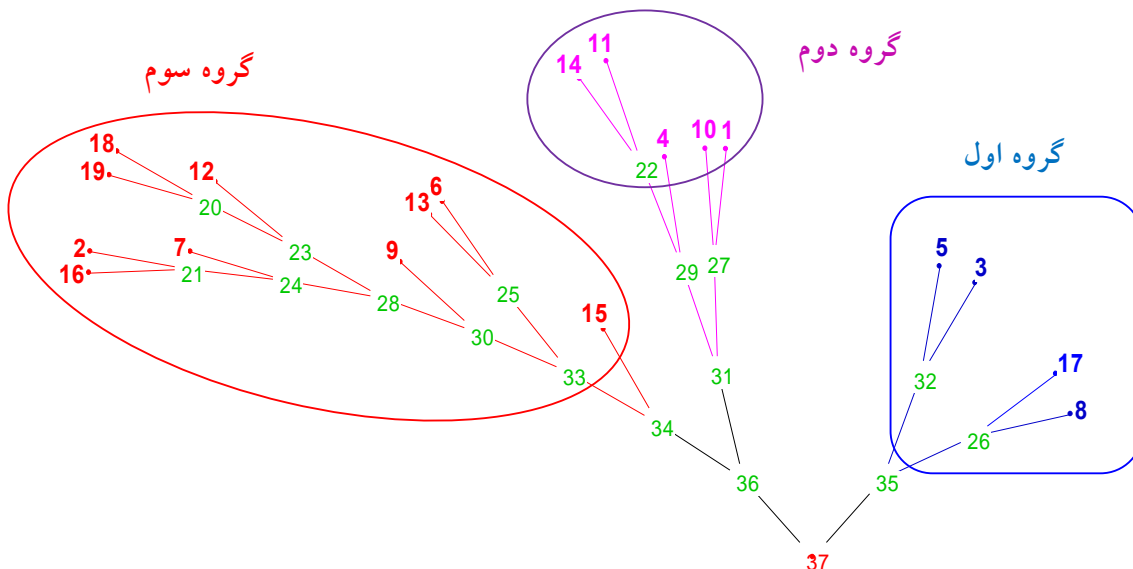
شکل ۱- الگوی باندهای ۱۹ ژنوتیپ پنیوک با استفاده از آغازگر SC28 و ژل آگارز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید

جدول ۳- درصد چند شکلی، تعداد کل باند و محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای مورد استفاده

کد آغازگر	توالی آغازگر	دما	درصد G و C	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	منبع
SC36	5'-GCAACAATGGCTACCAC-3'	۵۲	٪۵۲/۹۴	۸	۶	۷۵	۰/۳۱	Collard and Mackill (2009) (۵)
SC35	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	۵۸	٪۷۰/۵۸	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۲	
SC40	5'-CAATGGCTACCACTACAG-3'	۵۴	٪۵۰	۶	۴	۶۶/۶۷	۰/۴۵	
SC59	5'-ACAATGGCTACCACCATC-3'	۵۴	٪۵۰	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۶	
SC44	5'-CAATGGCTACCATTAGCC-3'	۵۴	٪۵۰	۴	۴	۱۰۰	۰/۴۸	
SC63	5'-ACCATGGCTACCACGGG-3'	۵۶	٪۶۴/۷۰	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۴	
SC28	5'-CCATGGCTACCACCGCC-3'	۵۸	٪۷۰/۵۸	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۹	
SC26	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'	۵۶	٪۶۴/۷۰	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۷	
SC20	5'-ACCATGGCTACCACCGC-3'	۵۴	٪۶۴/۷۰	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۵	
SC15	5'-CCATGGCTACCACCGGC-3'	۵۸	٪۷۰/۵۸	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۲	
SC11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۵۴	٪۵۰	۸	۶	۰/۷۵	۰/۴۷	
SC5	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۵۴	٪۵۰	۸	۸	۱۰۰	۰/۳۳	
SC13	5'-ACGACATGGCGACCATC-3'	۵۸	٪۷۰/۵۸	۴	۳	۰/۷۵	۰/۳۶	
SC21	5'-AACCATGGCTACCACCG-3'	۵۴	٪۶۴/۷۰	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۰	
SC10	5'-CAACAATGGCTACCAGC-3'	۵۲	٪۵۲/۹۴	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۳	
میانگین				۵/۵۳	۵/۰۷	۹۲/۷۸	۰/۳۶	

تشابه را ژنوتیپ‌های G1۸ و G1۹ از گروه ۳ و کمترین تشابه را ژنوتیپ G1۵ از گروه ۲ و ژنوتیپ G۳ از گروه ۳ داشتند (جدول ۵).

ماتریس تشابه: تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۶۸۵ تا ۰/۹۷ متغیر بود، میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۸۲۰ بود. بیشترین



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر SCoT برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

صحیح انجام گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروه‌ها برابر ۸۲ درصد و در بین گروه‌ها تنوع برابر ۱۸ درصد مشاهده گردید.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۴)، که ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. بر اساس آماره PhiPT در بین گروه‌ها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی به صورت

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر SCoT

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد از واریانس	PhiPT
بین گروه	۲	۲۲/۵۲۱	۱۱/۲۶۱	۱/۱۰۴	٪۱۸	۰/۱۸۵*
درون گروه	۱۶	۱۷/۹۰۰	۴/۸۶۹	۴/۸۶۹	٪۸۲	
کل	۱۸	۱۰۰/۴۲۱		۵/۹۷۳	٪۱۰۰	

* اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار

ژنوتیپ‌های این گروه، ژنوتیپ‌های G۸ و G۱۷ دارای بیشترین تشابه بودند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های G۱، G۴، G۱۰، G۱۱ و G۱۴ قرار گرفتند. میانگین تشابه این گروه ۰/۸۶۵، که ژنوتیپ‌های G۱۱ و G۱۴ بیشترین تشابه را با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های G۵، G۲، G۷، G۹، G۱۲،

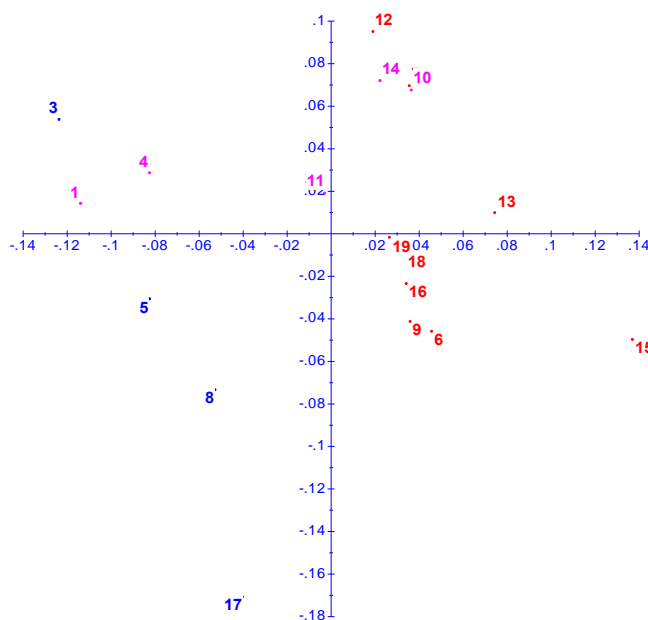
تجزیه خوشه‌ای: نمودار خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد در شکل ۲ آمده است. که بر اساس آن ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های G۳، G۵، G۸ و G۱۷ بود. میانگین تشابه ژنوتیپ‌های این گروه برابر ۰/۸۰۱ می‌باشد که در بین

بیشترین تشابه می‌باشند. G_{13} ، G_{15} ، G_{16} ، G_{18} و G_{19} است. میانگین تشابه در این گروه ۰/۸۷۵ بود که ژنوتیپهای G_{18} و G_{19} دارای

جدول ۵- ماتریس تشابه ژنوتیپها برای پرایمرهای SCoT استفاده شده بر اساس ضریب جاکارد

ژنوتیپ	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19
G1	۱																		
G2	۰/۸۷۲	۱																	
G3	۰/۸۵۱	۰/۸۴۶	۱																
G4	۰/۸۶۳	۰/۹۱۶	۰/۸۵۷	۱															
G5	۰/۸۱۶	۰/۸۵۱	۰/۸۲۶	۰/۸۵۷	۱														
G6	۰/۷۸۵	۰/۸۸۵	۰/۷۵۴	۰/۸۵۱	۰/۷۷۹	۱													
G7	۰/۷۹۲	۰/۹۳۱	۰/۸۴۰	۰/۸۵۱	۰/۸۰۷	۰/۸۴۳	۱												
G8	۰/۸۶۳	۰/۸۳۳	۰/۷۶۱	۰/۸۱۸	۰/۸۵۷	۰/۸۰۸	۰/۸۰۸	۱											
G9	۰/۸۳۶	۰/۹۰۰	۰/۷۶۹	۰/۸۵۱	۰/۷۳۶	۰/۸۵۷	۰/۸۰۶	۰/۸۰۸	۱										
G10	۰/۸۸۸	۰/۸۹۷	۰/۷۴۴	۰/۸۴۴	۰/۷۳۹	۰/۸۲۳	۰/۸۴۶	۰/۸۰۰	۰/۸۸۰	۱									
G11	۰/۸۶۷	۰/۸۶۲	۰/۷۶۰	۰/۸۸۸	۰/۸۰۷	۰/۸۵۷	۰/۸۳۸	۰/۸۴۴	۰/۸۰۶	۰/۸۸۰	۱								
G12	۰/۸۰۷	۰/۸۷۷	۰/۸۱۶	۰/۸۳۳	۰/۷۴۵	۰/۸۲۷	۰/۹۰۹	۰/۸۳۳	۰/۸۴۲	۰/۸۵۷	۰/۸۰۰	۱							
G13	۰/۷۶۳	۰/۸۶۶	۰/۷۶۹	۰/۸۲۶	۰/۸۰۷	۰/۹۰۶	۰/۸۷۰	۰/۷۸۲	۰/۸۳۸	۰/۸۵۷	۰/۸۷۰	۰/۸۴۲	۱						
G14	۰/۸۶۹	۰/۹۲۰	۰/۷۷۲	۰/۸۶۹	۰/۸۱۶	۰/۸۵۱	۰/۹۰۹	۰/۸۲۶	۰/۸۳۰	۰/۹۰۱	۰/۹۴۳	۰/۸۸۰	۰/۸۴۶	۱					
G15	۰/۷۰۵	۰/۸۲۱	۰/۶۸۵	۰/۷۱۴	۰/۸۰۰	۰/۸۰۷	۰/۸۵۱	۰/۷۶۱	۰/۸۲۱	۰/۷۹۰	۰/۷۷۸	۰/۷۵۴	۰/۸۵۷	۰/۸۱۸	۱				
G16	۰/۸۲۱	۰/۹۵۰	۰/۷۹۲	۰/۸۷۵	۰/۸۱۳	۰/۹۰۹	۰/۹۰۶	۰/۸۷۵	۰/۸۵۷	۰/۸۴۶	۰/۸۷۵	۰/۸۶۲	۰/۸۷۵	۰/۹۰۹	۰/۸۷۷	۱			
G17	۰/۸۲۳	۰/۸۲۱	۰/۷۵۰	۰/۸۰۹	۰/۷۷۷	۰/۸۵۲	۰/۷۴۵	۰/۹۰۴	۰/۸۸۱	۰/۷۳۹	۰/۷۷۹	۰/۷۱۶	۰/۷۷۹	۰/۷۳۴	۰/۷۶۹	۰/۸۵۲	۱		
G18	۰/۸۵۷	۰/۹۴۳	۰/۸۰۸	۰/۸۵۷	۰/۷۸۴	۰/۹۲۸	۰/۹۱۲	۰/۸۵۷	۰/۹۴۵	۰/۸۶۷	۰/۸۷۲	۰/۹۴۳	۰/۸۸۸	۰/۸۹۲	۰/۸۵۱	۰/۹۴۷	۰/۸۶۲	۱	
G19	۰/۸۵۷	۰/۹۴۳	۰/۸۰۸	۰/۸۵۷	۰/۸۰۷	۰/۹۱۲	۰/۹۳۱	۰/۸۵۷	۰/۹۲۸	۰/۸۵۱	۰/۸۹۲	۰/۹۴۳	۰/۸۷۲	۰/۹۱۲	۰/۸۵۱	۰/۹۳۱	۰/۸۴۶	۰/۹۷۰	۱

Factorial analysis: Axes 1 / 2



شکل ۳- بای پلات ژنوتیپها برای نشانگر SCoT بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

تجزیه به مختصات اصلی (PCo): بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای ژنوتیپها انجام شد، نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۱/۲۳ و ۱۷/۱۵ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۳۸/۳۸ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپها رسم گردید (شکل ۳)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری

با استفاده از آغازگرهای SCoT همان‌طور که مشاهده گردید تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپهای پنیرک وجود داشت و چند شکلی مطلوبی بر اساس نشانگر SCoT در بین ژنوتیپها مشاهده شد. در بررسی Shabaniyan و همکاران (۲۰) که بر روی جمعیت‌های بلوط ایرانی با استفاده از ۱۰ آغازگر SCoT انجام گردید گزارش شد که این آغازگرها تنوع ژنتیکی بالایی را آشکار کردند. از نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مانند جاتروفا (*Jatropha curcas*) و کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) استفاده شده است که در مقایسه با نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع بیشتری را نشان داده است (۱۶ و ۲۴). در مطالعه‌ای که توسط Hasani و همکاران (۸) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه دارویی رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی انجام شد، نتایج به دست آمده نشان دادند که نشانگرهای مولکولی دارای توانایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپهای تحت بررسی می‌باشد با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهای SC36، SC11 و SC5 که شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) درصد

چندشکلی بالایی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپهای پنیرک در تحقیقات بعدی استفاده گردد. نتایج حاصل از این بررسی با مطالعات دیگری که با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT بر روی انبه (*Mangifera indica*) و رمی (*Boehmeria nivea*) انجام گردیده شباهت داشت (۱۴ و ۱۸). میانگین تشابه بین ژنوتیپها برابر ۰/۸۲۰ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع پایین در بین ژنوتیپهای پنیرک بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. این موضوع می‌تواند به سبب طول بلند آغازگرهای SCoT و تکثیر انتخابی‌تر این نشانگر باشد. با توجه به نتایج، هیبریداسیون بین ژنوتیپها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در پنیرک باشد. از آنجایی که نشانگر مولکولی SCoT تنوع را براساس مناطق ژنی نشان می‌دهد (تکثیر نواحی با کدون آغاز)، استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی در جهت هتروزیس به منظور اصلاح و افزایش ترکیبات می‌تواند بسیار مؤثر باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی پایین درون ژنوتیپهای پنیرک کشور، حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسما و استفاده از روشهای تکثیر مناسب این گیاه توصیه می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌گردد از ژنوتیپهایی مانند G۱۵ و G۳ که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. فرشادفر و همکاران (۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌هایی از رازیانه با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی SCoT بر اساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشانگر مولکولی گزارش کردند که تنوع قابل قبول در بین توده‌های رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد استفاده وجود دارد و پیشنهاد کردند از توده‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپها در ۳ گروه

تشابه جاکارد و روش اتصال کامل و قطع دندروگرام ارقام و لاینهای گندم را در ۷ گروه قرار دادند، همچنین تجزیه هماهنگ اصلی نیز توانست ژنوتیپهای گندم مورد مطالعه را به خوبی بر اساس فاصله فضائی گروه‌بندی کند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود به نحوی که بر اساس آماره PhiPT در بین گروهها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی به صورت صحیح انجام گرفته است. از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیتها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به عنوان یک جمعیت و ژنوتیپها درون آن به عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام گیرد. نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروهها به وجود آید، به عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. زمانی و همکاران (۲) در ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیتهای گیاه خارمریم با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT گزارش کردند 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 با استفاده از نشانگر SCoT بود.

قرار گرفتند از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی توده‌ها استفاده گردید چون این ضریب نسبت به ضریبهای تطابق ساده و دایس ضریب کوفتیک (۸۶ درصد) بالاتری داشت. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت نداشت و تنها ۳۸/۳۸ درصد از واریانس با دو محور بیان گردید، این موضوع به نوبه خود می‌تواند نشان‌دهنده پراکنش گسترده آغازگرهای مختلف بر روی سطح ژنوم و همه کروموزومهای پنیوک باشد. همچنین نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطبیق ندارد که ممکن است علت این موضوع جدایی منشأ جغرافیایی ژنوتیپها یا ایجاد و تجمع جهشهای ژنتیکی مجزا در سطح ژنوم باشد که باعث ایجاد تنوع در آنها نسبت به یکدیگر شده است. در حالی که در تعداد دیگری از ژنوتیپها چنین تطابقی دیده نشده که این امر می‌تواند به دلیل منشأ مشترک، مهاجرت و انتقال باشد. نیک کردار و همکاران (۱۷) در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های ایرانی رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی توده‌ها استفاده کردند و گزارش نمودند که این ضریب نسبت به ضریبهای تطابق ساده و دایس ضریب کوفتیک (۹۱ درصد) بالاتری دارد. اسماعیلی و همکاران (۱) با استفاده از نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی اقدام به گروه‌بندی گندم دیم نمودند که در تجزیه خوشه‌ای ضرایب

منابع

- ۱- اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف.، سمیعی، ک.، دریکوند، ر.، ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گندم دیم با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی ایترونی-آگزونی. مجله پژوهش‌های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۲): ۱۱۷-۱۲۶.
- ۲- زمانی، ن.، میرزایی، خ.، زمانی، خ.، ۱۳۹۶. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیتهای گیاه خارمریم با استفاده از نشانگر مولکولی. مجله پژوهش‌های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۲): ۱۱۷-۱۲۶.
- ۳- فرشادفر، م.، مرادزاده، ن.، فرشادفر، ع.، شیروانی، ه.، ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌هایی از رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) براساس صفات ریخت‌شناختی و نشانگر مولکولی SCoT. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۵ (۲): ۲۱۲-۲۳۱.

4- Azimova, S.S., Glushenkova A.I. (Eds.), (2012). Lipids, Lipophilic Components and Essential

Oils from Plant Sources. Springer, Tashkent, Republic of Uzbekistan, 609-633.

- 5- Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (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.
- 6- Davis, T.M., Haigis, Y.U.H., Mc Gowan, P.J. (1995). Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 582-8.
- 7- Gepts, P., Papa, R. (2003). possible effects of (Trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research* 2: 89-103.
- 8- Hasani, M.H., Torabi S., Omid, M., Etmnan, A.R., Dastmalchi T. (2011). The study of genetic variation *Foeniculum vulgare* Mill. Using AFLP molecular marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 42(3):597-604 (In Persian).
- 9- Hosseinzadeh Colagar, A., Saadati, M., Zarea, M., Ahmadi Talei S.. (2010). "Genetic variation of the Iranian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments". *Biotechnology (Pakistan)*. 9(1): 67-72.
- 10- Hou, Y., Yan, Z., Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Genetics Newsletter* 35:9-22.
- 11- Hu, J., Vick, B.A. 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 289-94.
- 12- Kalendar, R. (2007). FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm; 2007
- 13- Kochaki, A., Nasiri, M., Najafi, F. (2004). The agro biodiversity of medical and aromatic plants in Iran. 2(2): 209-214.
- 14- Luo, C., He, X. H., Chen, H., Hu, Y., Ou, S.-J. (2012). Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59:1505-1515.
- 15- Michaud, R., Tremblay, G.F., Belanger, G., Michaud, J. (1991). *Agriculture and Agri-Food Canada, Soils and Crops Research and Development Center, 2560 Hochelaga Blvd, Sainte-Foy, Quebec, Canada, G1V 2H3.*
- 16- 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.
- 17- Nikkerdar, F., Farshadfar, M., Ebrahimi, M A., and Shirvani H. (2018) Genetic Diversity among Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Landrace using SCoT Markers. *jcb*. 9 (24) :95-102.
- 18- Pratik, S., Maya, K., Sourav, J., Sabyasachi, M., Amit, S., Karmakar, P.G., Ray, D.P. (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.
- 19- Samavati, V., Manoochehrizade, A. (2013), Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 427-436.
- 20- Shabanian, N., Alikhani, L. and Rahmani, M.S. (2015). Phenotypic and genotypic diversity in rant oak (*Quercus brantii*) populations of declining north-Zagros forests using biochemical characteristics and molecular SCoT marker. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23(1): 23-29. (In Persian)
- 21- Shahoedi, A. (2005). *Medicinal Plants Eastern Iran's Zagros*. Farabi Publications. Pp117 (In Persian).
- 22- Shale, T.L., Stirk, W.A., van Staden, J. (2005). Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *J Ethnopharmacol.*:96(1-2):325-30 (Persian).
- 23- Zahid, N. Y., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., Ahmad, Z. (2009) Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare*. Germplasm in Pakistan assessed By RAPD markers. *Pakistan Journal of Botany* 41(4): 1759-1767.
- 24- Zamani, N., Zamani, W., Mirzaei, K. (2016). Genetic diversity analysis of *Ziziphora tenuior* L. using SCoT markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24 (2): 176-189. (In Persian).

Genetic variation among Iranian genotypes of *Malva* (*Malva neglecta*) using Start codon targeted (SCoT)

Noorian A.M.¹ and Shirvani H.²

¹ Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Malva is one of the well-known medicinal and aromatic plants. The juice is one of the oldest herbs that are widely used in medicine. DNA extraction was carried out using CTAB method for 19 genotypes of different regions of Iran. Using SCoT molecular markers, genetic diversity was investigated. The SCoT marker showed favorable polymorphism among genotypes and most primers were suitable for this species. SCoT primers were able to produce 83 strips in total, with 76 multidimensional bands. The average number of bands produced by each primer for 19 genotypes was 4.36, with SC36, SC11 and SC5 primers having the highest number of bands (8), and the SC26 and SC15 primers showed the least number of bands (3). The results showed that the most similarities were genotypes G18 and G19 and the least similarity was genotypes G15 with G3 genotype. The cluster analysis showed that the genotypes were classified into three groups and genetic variation was not consistent with geographical variation. The results of cluster analysis were grouped using molecular variance analysis (AMOVA).

Key words: aromatic plants, cluster analysis, coordinate analysis, Genetic variation