

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) و دافنه (*Daphne spp*) با استفاده از نشانگر مولکولی (ISSR)

Genetic Diversity of *Dendrostellera* and *Daphne* genotypes Using ISSR Markers

مصطفی علم هولو^۱، سنبل ناظری^{*۱}

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشگاه بو علی سینا، همدان

Alamholo M¹, Nazeri S^{*1}

1- MSc Student, Assistant Professor, Bu-Ali Sina University, Hamedan, iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: snblnazeri@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی (ژرم پلاسما) از فعالیت‌های مهم و ضروری در مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان محسوب می‌شوند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ جنس‌های سیاه گینه و دافنه جمع‌آوری شده از ۱۰ استان کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی شد. از ۱۲ آغازگر که دارای توالی‌های تکراری ساده (ریزماهورهای) بودند، برای تکثیر قطعاتی از DNA ژنومی استفاده شد. ۸۸ مکان چند شکل امتیاز بندی شدند. برای ارزیابی تشابه ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد با روش UPGMA استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به‌ترتیب ۰/۸۶ و ۶/۴۵ بودند. آغازگر P9 بالاترین میزان PIC (۹۳ درصد) و آغازگر P6 بالاترین میزان MI (۱۱/۰۴) را داشت. سهم تنوع ژنتیکی داخل گروه‌ها در تنوع ژنتیکی کل بیش‌تر از تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها (۸۵ درصد در مقابل ۱۵ درصد) برآورد شد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR به‌طور موثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاه گینه و دافنه استفاده شوند. از میان آغازگرهای استفاده شده آغازگر P9 با PIC بالا مناسب‌ترین آغازگر برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی

دافنه

سیاه گینه

نشانگر بین ریزماهورهای

گیاه *Dendrostellera lessertii* از خانواده Thymelaeaceae با نام فارسی سیاه گینه، گیاهی دارویی و تنها گونه جنس دندروستلرا (*Dendrostellera*) در ایران است. این گونه گیاهی بوته‌ای به ارتفاع ۶۰-۲۰ سانتی‌متر، با انشعابات فراوان، شاخه چوبی، شیاردار و بدون کرک و در قسمت‌های جوان کرکدار است. پراکنش این گیاه در مناطق شمال و شمال‌غرب کشور ایران گزارش شده‌است. جنس دافنه (*Daphne*)، با ۷۰ گونه منتشر در اروپا، آسیا، آفریقای شمالی و استرالیا، جنس دیگری از خانواده Thymelaeaceae به‌شمار می‌رود. دافنه درختچه‌ای به ارتفاع ۸۰-۲۰ سانتی‌متر با ساقه‌ای دارای شاخه‌های فراوان است. گونه‌های جنس دافنه به‌عنوان داروی طبیعی برای درمان بیماری‌های انعقاد خون، بیماری‌های پوستی، دندان درد و مالاریا کاربرد دارند و ترکیباتی با خواص دارویی متفاوت در گونه‌های مختلف این جنس شناسایی شده‌اند (Kupchan and Zhang et al. 2004; Baxter 1975). نشانگرهای ژنتیکی اطلاعات مفیدی در مورد مقدار و توزیع اختلافات ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها فراهم می‌کنند (Mohammadi and Parsanna 2003; Cheghamirza et al. 2008; Belletti et al. 2004). میزان چندشکلی به نوع توالی (بدون لنگر، ۳'-لنگر و ۵'-لنگر) به کار رفته برای آغازگر وابسته است. وقتی آغازگرهای بدون قلاب به کار گرفته شوند، این آغازگرها حین PCR در داخل واحدهای تکراری می‌توانند لغزش داشته باشند و در نهایت به جای باندهای واضح بر روی ژل، باندهای اسمیر مشاهده خواهند شد. بر طبق گزارش‌ها،

آغازگرهایی که دارای لنگر در انتهای ۵' هستند از میزان چند شکلی بیش‌تری برخوردارند و آغازگرهایی که در انتهای ۳' خود لنگر دارند تعداد نوارهای کم‌تری با وضوح بیشتر تولید می‌کنند (Pradeep et al. 2002). نشانگر ISSR به‌دلیل پراکندگی یکنواخت در کل ژنوم و عمومیت داشتن بین موجودات مختلف یکی از پرکاربردترین نشانگرهای DNA محسوب می‌شود (Witono and Kondo 2006). این نشانگر، یک نشانگر غالب بوده و به‌دلیل هزینه اندک و عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه از توالی DNA هدف، برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Nagaoka and Ogiara 1997). نشانگر ISSR به‌طور گسترده و موفقیت‌آمیز در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌های ژنتیکی و بیولوژی کامل در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی استفاده شده‌است (Nybom and Bartish 2000; Cheghamirza et al. 2004). تاکنون گزارشی از تنوع ژنتیکی گونه‌های دو جنس سیاه گینه و دافنه ارائه نشده‌است، بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های این دو جنس توسط نشانگر مولکولی ISSR است.

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ دو جنس دندروستلرا و دافنه جمع‌آوری شده از ۱۰ استان مختلف ایران بررسی شد (جدول ۱).

نمونه‌برداری از گیاهچه‌های ۲ تا ۳ هفته‌ای در مرحله ۳ تا ۴ برگی صورت گرفت. DNA ژنومی با روش CTAB (Doyle and Doyle 1990) با اندکی تغییر، استخراج شد.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های سیاه گینه و دافنه

نام علمی	محل جمع‌آوری	کد بانک ژن	نام علمی	محل جمع‌آوری	کد بانک ژن
<i>Dendrostellera lessertii</i> (Dlh)	همدان	۳۵۹۲۱	<i>Daphne mucronata</i> (Dmi)	ایلام	۳۴۳۳۵
<i>Dendrostellera lessertii</i> (Dlg)	گیلان	۲۹۷۲۸	<i>Daphne mucronata</i> (Dml)	یزد (یافق)	۱۳۱۳۹
<i>Daphne mucronata</i> (Dmkh)	لرستان	۱۶۸۰۴	<i>Daphne mucronata</i> (Dmko)	یزد (یافق)	۱۳۰۷۵
<i>Daphne mucronata</i> (Dmko)	کرمانشاه	۱۷۴۲۳	<i>Daphne mucronata</i> (Dme)	یزد (بهباد)	۲۰۹۹۹
<i>Daphne mucronata</i> (Dme)	کردستان (مریوان)	۲۰۲۸۰	<i>Daphne oleoides</i> (Doker)	کرمان	۲۷۵۱۳
	اصفهان (سمیرم)	۲۸۳۰۱	<i>Daphne oleoides</i> (Doch)	چهارمحال (مردل)	۳۹۱۵۸

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاه گینه و دافنه

Ta*	توالی آغازگر	آغازگر	Ta*	توالی آغازگر	آغازگر
۵۱	(GA) 8C	P7	۵۴	(AG) 8T	P1
۵۲	(GA) 8T	P8	۵۳	(AG) 8Y*T	P2
۵۳	(GA) 8YC	P9	۵۴	(AC) 8YT	P3
۵۴	(TC) 8C	P10	۵۳	(CA) 8G	P4
۵۲	(TG) 8G	P11	۵۴	(CT) 8R*C	P5
۵۶	GGGC (GA)8	P12	۴۲/۵	(CT) 8RG	P6

Ta* = دمای اتصال، Y* = C or T, R* = G or A

برای بررسی کمیت DNA ژنومی، از دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf BioPhotometer) استفاده شد. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این نسبت برای یک نمونه مطلوب بین ۱/۸ تا ۲ است. اگر این نسبت از ۱/۸ کمتر باشد، نمونه به پروتئین و یا فنول آلوده است. ولی اگر این نسبت بالاتر از ۲ باشد، نمونه به RNA آلوده می‌باشد. در این تحقیق از ۱۲ آغازگر ISSR که در مطالعات قبلی در گیاه تربچه (Liu et al. 2008) چند شکلی مطلوبی از خود نشان داده بودند استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است.

تمامی مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR از شرکت سیناکلون خریداری شد. مقادیر اجزای واکنش و غلظت‌های مورد استفاده شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش PCR (۱۰ x)، ۱/۵ میکرولیتر نوکلئوتید (۱۰ mM)، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ mM)، دو میکرولیتر آغازگر رقیق شده (۱۰ μM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (۵ U/μL) و دو میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰ ngr/μL) بود. در پایان حجم کل محلول واکنش با آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شده برای این مجموعه از آغازگرها شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه و ۱۵ ثانیه،

مرحله گسترش رشته به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله برای گسترش نهایی به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. برای الکتروفورز محصولات تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد به همراه بافر TBE استفاده و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت و نیم انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی قرار داده شد.

باندهای حاصل از هر آغازگر بر روی ژل بر اساس هم‌ردیفی باندها به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند. از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین ژنوتیپ‌ها استفاده شد. گروه بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین فاصله‌ها (UPGMA) توسط نرم‌افزار NTSYS (Ver.2.02) محاسبه و دندروگرام آن ترسیم شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین ژنوتیپ‌ها و تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار GeneA1Ex استفاده شد.

تمامی ۱۲ آغازگر به کار رفته در این تحقیق، چندشکل مناسبی را نشان دادند. نواحی ISSR در واقع قطعاتی از DNA هستند که می‌توانند ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز طول داشته باشند (Zitkiewicz et al. 1994). قطعات تکثیر شده در این تحقیق نیز اندازه‌ای حدود ۲۰۰ جفت‌باز برای آغازگر P4 تا ۲۵۰۰ جفت‌باز برای آغازگر P3 داشتند. همه باندهای حاصل از ۱۲ آغازگر چند شکلی نشان دادند. بیش‌ترین تعداد باند تکثیر شده مربوط به آغازگر P5

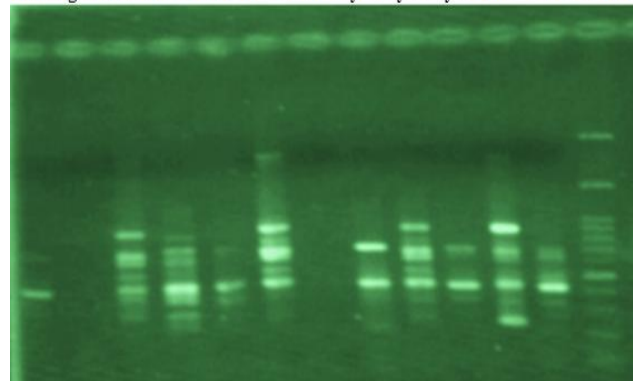
تجزیه خوشه‌ای بین ژنوتیپ‌های سیاه گینه و دافنه با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (Ver.2.02)، بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب جاکارد و دایس به عنوان معیار مقایسه انجام گرفت. بر اساس ضریب جاکارد دامنه تشابه ژنوتیپ‌ها از ۰/۰۴ تا ۰/۴۴۴ بود. این دامنه در واقع نمایانگر تنوع بالا در ژنوتیپ‌های یاد شده- است. بر اساس ضریب تشابه دایس، دامنه شباهت ژنتیکی از ۰/۰۷۸ تا ۰/۶۲۱ متغیر بود. ضریب برازش خوشه‌بندی برای هر دو ضریب تشابه جاکارد و دایس از طریق محاسبه ضریب همبستگی کوفتیک تعیین شد. ضریب همبستگی کوفتیک دندروگرام حاصل از ضریب تشابه جاکارد بزرگتر از ضریب همبستگی کوفتیک دندروگرام حاصل از ضریب تشابه دایس بود. مقادیر تشابه در روش جاکارد کم‌تر بود. که می‌تواند به دلیل حساسیت بیش‌تر این روش در تعیین شباهت‌های ژنتیکی از روش دایس باشد. در نتیجه ادامه تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب جاکارد صورت گرفت.

به‌منظور تعیین تعداد مطلوب خوشه که در آن بیش‌ترین تمایز بین گروه‌ها حاصل شود، از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در نقاط مختلف برش دندروگرام استفاده شد. الگوی کلی از توزیع تنوع مولکولی برای نشانگرهای ISSR نشان داد که ۸۵ درصد از واریانس مولکولی به تفاوت در داخل گروه‌ها و ۱۵ درصد دیگر مربوط به تنوع بین گروه‌ها (یا خوشه‌ها) بر می‌گردد. بر اساس نتایج بدست‌آمده از اختلاف داخل گروه‌ها و شباهت بین گروه‌ها، نمونه‌های سیاه گینه و دافنه را نمی‌توان در دو گروه مجزا قرار داد. بر اساس نتایج مولکولی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً اقلیم نقش مهمی در تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها ندارد.

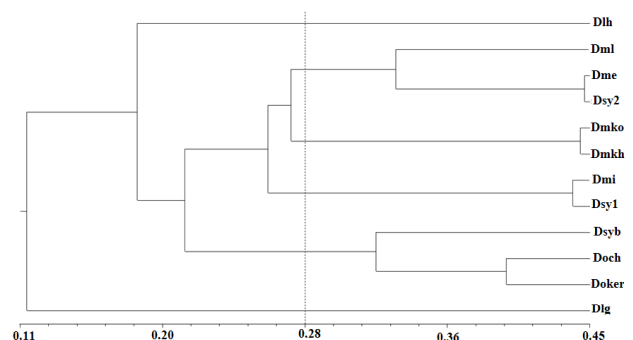
مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که بیش‌ترین تمایز بین گروه‌ها در نقطه برش با ۶ گروه در سطح شباهت ۲۸ درصد بدست آمد (شکل ۲). بدین معنی که برای ۱۲ ژنوتیپ مورد بررسی تفکیک واضحی بر اساس گونه‌ها صورت نگرفت. نمونه‌های جنس دندروستلرا همدان (Dlh) و گیلان (Dlg) به دلیل اختلافات جغرافیایی و آب و هوایی با ضریب تشابه ۱۲ درصد در دو خوشه جداگانه قرا گرفتند. این نتایج بیانگر این است که نمونه‌های سیاه گینه از دید مولکولی با هم اختلافات ژنتیکی دارند.

با ۴۴ عدد و کم‌ترین تعداد مربوط به آغازگر P10 با ۱۴ باند بود. همچنین متوسط تعداد باندهای تولید شده در هر آغازگر برابر با ۲۵/۴۱ عدد بود. میانگین تعداد مکان چندشکل برای هر آغازگر ۷/۳۳ بود. الگوی اکتروفورزی قطعات تکثیر شده توسط آغازگر P5 در شکل ۱ ارائه شده‌است.

Dlh Dlg Dml Dmko Dmkh Dme Dmi Dsy1 Dsy2 Dsyb Doker Doch Ladder



شکل ۱- الگوی اکتروفورزی قطعات DNA تکثیر شده (بر روی ژل آغازگر یک درصد با نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی) از ۱۲ ژنوتیپ مورد مطالعه توسط آغازگر P5



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ۱۲ نشانگر ISSR با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد برای ۱۲ ژنوتیپ مورد مطالعه

جدول ۳- مقادیر میانگین، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص

نشانگری (MI) برای ۱۲ آغازگر ISSR

آغازگر	PIC	MI	آغازگر	PIC	MI
P1	۰/۷۷	۲/۳۱۶	P7	۰/۸۳	۴/۱۵
P2	۰/۷۸	۲/۳۲۲	P8	۰/۹	۵/۴
P3	۰/۸۸۷	۱۰/۶۵۴	P9	۰/۹۳۶	۱۰/۲۹
P4	۰/۹۱۷	۷/۳۳۶	P10	۰/۸۶۹	۳/۴۷۶
P5	۰/۸۸۱	۱۰/۵۷	P11	۰/۸۵	۵/۹۵
P6	۰/۹۲۰	۱۱/۰۴	P12	۰/۷۹۷	۳/۹۸
میانگین				۰/۸۶	۶/۴۵۷

دلیل بالا بودن PIC، جهت مطالعات مشابه بر روی ژنوتیپ‌های نزدیک به این گونه‌ها استفاده نمود. میانگین کل PIC و MI به- ترتیب ۰/۸۶ و ۶/۴۵۷ محاسبه شد.

مطالعات بر روی ژرم پلاسما خربزه و طالبی نشان داد که فاصله ژنتیکی بر اساس ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۳۴ تا ۰/۸۷ بوده و بیش‌ترین مقدار PIC و MI مربوط به آغازگر P8 به‌ترتیب ۹۲ درصد و ۷/۹۶ گزارش شد (Fabriki et al. 2009). بر اساس نتایج Ghandehari et al. (2013) پرایمر P1 بیش‌ترین مقدار PIC (۴۴ درصد) را روی شمشادهای شمال ایران نشان داد. گزارشات این محققان با نتایج تحقیق حاضر اختلاف داشت. بر اساس گزارشات این محققین و تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که این اختلافات تا حد زیادی به نوع گونه‌های گیاهی مربوط است. گاهی مواقع با استفاده از نشانگرهای ISSR نتایج دور از انتظار قابل پیش‌بینی است و ممکن است نتایج آن همسو و گاهی متضاد با مشاهدات مورفولوژیکی باشد. در توجیه این مطلب می‌توان به ارتباط میان نشانگرهای ISSR و نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده ژنوم اشاره کرد. در حالی که نشانگرهای مورفولوژیک فقط با نواحی رمزکننده ژنوم مرتبط می‌باشند (Roldan et al. 2001). با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق چند شکلی قابل توجهی نشان دادند، می‌توان از آن‌ها در مطالعات آینده روی این گیاه و سایر گیاهان دارویی استفاده کرد.

گونه‌های اولئوئید چهار محال (Doch) با کرمان (Doker) با ضریب تشابه ۴۰ درصد در یک گروه و گونه‌های ماکروناتای کرمانشاه (Dmkh) و کردستان (Dmko) با ضریب تشابه ۴۴/۵ درصد نیز در یک گروه قرار گرفتند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های اولئوئید با ماکروناتا در استان‌های مختلف خویشاوندی نزدیکی با هم دارند. ژنوتیپ‌های ماکروناتای اصفهان (Dme) با استافی یزد ۲ (Dsy2) با ضریب تشابه ۴۴/۸ درصد در یک گروه و ماکروناتای ایلام (Dmi) با استافی یزد ۱ (Dsy1) با ضریب تشابه ۴۴ درصد در گروه جداگانه دیگر قرار گرفتند. نمونه‌های گونه استافی یزد ۱ (Dsy1)، یزد ۲ (Dsy2) و یزد بهاباد (Dsyb) در سه گروه جداگانه با ضریب تشابه ۲۱/۵ درصد قرار گرفتند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که اختلافات موجود ناشی از اختلاف درون گونه‌ها است.

شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) به‌عنوان پرکاربردترین شاخص ارزشیابی نشانگرها شناخته می‌شود (Nagy et al. 2012). محتوای اطلاعات چندشکل یک نشانگر با استفاده از رابطه $PIC = 1 - \sum P_i^2$ (P_i: فراوانی آلل iام و n تعداد آلل) محاسبه شد (Powell et al. 1996). این شاخص با استفاده از فراوانی آللی برای هر آغازگر به‌طور جداگانه محاسبه شد (جدول ۳). به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگر (MI) محاسبه شد. بنابراین می‌توان از آغازگرهای P4، P6، P8 و P9 به

منابع

- Belletti P, Monteleone I, Ferrazzini D (2008) A population genetic study in scattered forest species, wild service tree *Sorbus torminalis*, using RAPD markers. European Journal of Forest Research 127: 103-114.
- Cheghamirza K, Koveza OV, Konovalov FA, Gostimskii SA (2004) Identification and mapping of Chi 115 gene and DNA markers linked to it in pea *Pisum sativum* L. Russian Journal of Genetics 40: 909-915.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Fabriki S, Shams Bakhsh M, Jalali Javaran M, Ahmadi J (2009) Analysis of Genetic Diversity of Iranian Melons (*Cucumis melo* L) Using ISSR Markers. Iranian Journal of Biology 22: 271-281. (In Farsi)
- Ghandehari V, AhmadiKhah A, Payamnoor A (2013) Genetic diversity of *Buxus hyrcanapopulations* in north of Iran using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands

- Forests Plant Breeding and Genetic Research 21: 1-12. (In Farsi)
- Kupchan SM, Baxter RL (1975) Mezerin, antileukemic principle isolated from *Daphne mezereum* L. Science 21: 652-653.
- Liu LW, Zhao LP, Gong YQ, Wang MX, Chen LM, Yang JL, Wang Y, Yu FM, Wang LZ (2008) DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. Scientia Horticulturae 116: 240-247.
- Mohammadi SA, Parsanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and consideration. Crop Science 43: 1235-1248.
- Nagaoka T, Ogihara Y (1997) Applicability of Inter Simple Sequence Repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 597-602.

Nagy S, Poczai P, Cernak I, Mousapour Gorji A, Taller J (2012) PICcalc an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics* 50: 670-672.

Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Evolution and Systematic* 3: 293-114.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.

Pradeep R, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.

Roldan Ruiz FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemant J (2001) A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1138-1150.

Witono JR, Kondo K (2006) Genetic analysis of some species of pinanga (*Palmae*) by using ISSR markers. *Berita Biologi* 8: 19-26.

Zhang W, Zhang WD, Li T, Liu RH, Li HL, Chen HSh (2004) A new flavan from *Daphne odora* var. *atrocaulis*. *Fitoterapia* 75: 799- 800.

Zitkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Genetic Diversity of *Dendrostellera* and *Daphne* genotypes Using ISSR Markers

Alamholo M¹, Nazeri S^{*1}

1. MSc Student, Assistant Professor, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

* Corresponding Author, Email: snblnazeri@yahoo.com

ABSTRACT

Understanding of genetic diversity and classification of inheritance reserves (germplasm) are important and necessary activities in the management of preservation plant genetic reserves. In this study, the genetic diversity of twelve genotype of *Daphne* and *Dendrostellera* genera collected from 10 Iran Provinces, were analyzed using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. 12 primers, which contained different simple sequence repeat (microsatellite), were used as single primer, and tested for PCR amplification. 88 polymorphic loci were scored. Cluster analysis method using the Jaccard coefficient with UPGMA method was assessed for genetic similarity among genotypes. The mean polymorphism information contents (PIC) and Marker Index (MI) were 0.86 and 6.45 respectively. P9 primer had the highest PIC (93%) and P6 primer had highest MI (11.04). The contribution of intragroups genetic diversity in total genetic diversity was estimated over than that of intergroups genetic diversity (0.85 versus 0.15). The results of this study revealed that ISSR markers could be efficiently used for genetic diversity of *Daphne* and *Dendrostellera* genotypes. Among used primers, the P9 primer with higher PIC is recommended for further analysis.

Key Words

Dendrostellera lesserti, *Daphne* spp, Genetic diversity, ISSR Markers