

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی ختمی (*Althaea & Alcea spp L.*)

با استفاده از نشانگرهای AFLP

ترانه دستمالچی^{*}، منصور امیدی^۲، سپیده ترابی^۳، حسن مداد عارفی^۴، علیرضا اطمینان^۵، محمدحسین حسنه^۶، مرجان بهزادی راد^۷

۱، ۳ و ۶- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ایران
۲- به ترتیب استاد گروه اصلاح نباتات و دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴، ۵- به ترتیب رئیس موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر کرج و سرپرست بخش مولکولی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Dastmalchi.tarane@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ نمونه گیاه دارویی ختمی (*Althaea & Alcea spp L.*) از ایران و چند کشور اروپایی و آسیایی با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر انتخابی AFLP انجام گرفت. در مجموع از ۱۰۲۲ نوار مشاهده شده، جملاً ۲۵۶ نوار (۲۵/۰۴ درصد) چند شکل بودند. تعداد نوار برای هر ترکیب آغازگری از ۵ تا ۶۰ متغیر بود. ترکیب آغازگری (EcoRI(AGG) MseI(GAG) با ۶۰ نوار و ترکیب آغازگری (EcoRI(ACT) EcoRI(ACG) با ۵ نوار به ترتیب یافته شدند. ترکیب آغازگری (M(CAA) E(ACT) M(CAA) E(AGG) و E(ACT) M(GAG) با ۱۶/۶۰ محاسبه شدند. ترکیب آغازگری (PIC) و شاخص نشانگر (MI) در کل ۴۷ نمونه به ترتیب برای با ۰/۷۸۶ و ۰/۷۸۶ میزان اختصاص دادند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) در کل ۴۷ نمونه به ترتیب برای با ۰/۷۸۶ و ۰/۷۸۶ میزان اختصاص دادند. ترکیب آغازگری (UPGMA) و با ضریب تشابه Dice، نمونه‌های مورد مطالعه را در تشابه ژنتیکی ۷۳ درصد به ۳ گروه اصلی تقسیم نمود، که تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز آن را تایید کرد. دامنه تغییر تشابه ژنتیکی بین ۲۵/۵۵ درصد تا ۹۳/۵۵ درصد و با میانگین ۵۹/۵۵ درصد در ۴۷ نمونه مورد مطالعه و با ضریب تشابه Dice، نمونه‌های مورد مطالعه را در نمونه‌های ایرانی اندازه گیری شد. براساس این نتایج چنین استنباط می‌شود که نمونه‌های مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی پائینی برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
چندشکلی،
گیاه دارویی ختمی،
.AFLP نشانگر

مقدمه

ختمی گیاهی دارویی، از خانواده پنیرک (*Malvaceae*)^(۸)، با پراکندگی عمده در مناطق گرمسیری است (۱۶). ویژگی دارویی گونه‌های بیشماری از آن در سبک‌های درمانی مختلف در طول تاریخ مورد استفاده قرار گرفته است (۲۹). ختمی دارای دو جنس *Althaea* و *Alcea* می‌باشد (۲۱). هر دو جنس به دلیل داشتن سلول‌های لعاب دهنده (موسیلاتر) در اندام‌ها (برگ، گل و ریشه)، در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی (۲) و صنعت نفت (۳۱) کاربرد فراوان دارند، هم‌چنین در حفاظت خاک، احیاء پوشش گیاهی و تثبیت وضع مراتع نیز حائز اهمیت‌اند (۳). در سال‌های اخیر، به دلیل جایگزین شدن گونه‌های زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از گونه‌ها و ارقام بومی و محلی دارویی به فراموشی سپرده شده و از سیستم‌های زراعی ایران حذف شده‌اند.

جنس متفاوت اعلام کردند که AFLP یک ابزار قوی و قابل اعتماد برای انگشت نگاری DNA و نشان دادن ارتباط ژنتیکی در سطوح مختلف تاکسونومیکی Malvaceae می‌باشد. تانگ و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی تنوع ژنتیکی درون و میان ۹ جمعیت از Hibiscus tiliaceus AFLP اعلام کردند، عامل‌های اکو جغرافیایی و فواصل پراکنش داده‌ها نقش مهمی در تنوع و ساختمان ژنتیکی این گونه‌ها بازی می‌کند. های لریوک و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP و مشخصات مورفولوژی ۳ گونه Hibiscus بومی چین و مقاوم به سرما دریافتند، هر دو روش به خوبی ۳ گونه را تمیاز می‌کند، اما شاخص برگ کولتیوارهای متفاوت را در گروه‌های کوچک‌تری گروه‌بندی می‌کند. این پژوهش به منظور، ارزیابی پتانسیل به کارگیری AFLP، بهینه‌سازی این روش، بررسی‌های مولکولی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی در گیاه ختمی و رتبه‌بندی ذخایر توارثی این گیاه دارویی از نظر تنوع ژنتیکی موجود در آن، به عنوان اساس برنامه‌های اصلاحی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۴۷ نمونه آسیایی و اروپایی & (Althaea spp) که از ۱۲ استان شامل آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کرج، قزوین، تهران، مرکزی، کرمانشاه، خراسان رضوی، لرستان، اصفهان، یزد و چهارمحال بختیاری جمع آوری شدند و هم‌چنین تعدادی توده که از بانک ژن موسسه جنگل‌ها و مراتع به علاوه توده‌هایی متعلق به کشورهای انگلستان، اسپانیا و ژاپن که از بانک ژن پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شدند، استفاده گردید (جدول ۱). لازم به ذکر است نمونه‌های شماره ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴ (Althaea officinalis) و نمونه‌های ۴۵، ۴۶، ۴۷ (Alcea rosa) و نمونه‌های ۱ تا ۴۰، به عبارتی نمونه‌های ایرانی مخلوطی از Althaea & Alcea spp بودند. ۱۵ بذر از هر نمونه در سه تکرار پس از تیمار با اسید جیبریلیک ۵۰۰ ppm و قرارگیری در سرما به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی در سرما به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (کیلومتر ۵۵ اتوبان تهران - قزوین) در داخل گلدان‌های پلاستیکی کاشت شدند.

بنابراین بررسی وضعیت تولید گیاهان دارویی و معطر و نقش این گیاهان در ایجاد تنوع در بوم نظامهای زراعی ایران بسیار مورد اهمیت می‌باشد (۹). تاکنون هیچ تحقیقی در جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گیاه ختمی با کمک نشانگرهای DNA در جهان انجام نشده است و از آنجا که شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی، امری بنیادی برای طراحی موفق برنامه‌های به نژادی بوده و در آسان نمودن مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی نقش بسزایی دارد (۷)، انجام چنین پژوهشی ضرورت پیدا می‌کند. جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود. در بین این روش‌ها، نشانگرهای DNA دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین نشانگرها (۱۷) به دلیل کمک به ترسیم نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی، عدم تاثیرپذیری از محیط داخلی و خارجی موجود و توزیع پذیری در سطح ژنوم محسوب می‌شوند (۱۰). روش AFLP در سال ۱۹۹۵ توسط Vos و همکاران ارائه شد و اساس آن تکثیر انتخابی برخی قطعه‌های برش یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد (۳۵). تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیر حساس بودن به غلظت DNA الگو و تولید تعداد زیاد نوار تکرار پذیر در مدت زمان کوتاه از مزایای این روش می‌باشد (۲۷). در تحقیقی که توسط جونز و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تکنیک AFLP تکرار پذیری بالایی در بین هفت آزمایشگاه اروپایی داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند (۱۵). به همین دلیل، در پژوهش حاضر از AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی توده‌های ختمی استفاده گردید. پاکروان و همکاران (۱۳۸۰) با بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ختمی (Alcea) با استفاده از الکتروفورز با روش SDS-PAGE در ۲۸ گونه و ۴ واریته، نشان دادند گونه‌های نزدیک از نظر تاکسونومی، در شاخه‌های مجاور هم قرار گرفتند و تنها برخی از آن‌ها در شاخه‌های دور از هم واقع شدند. شاهین و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی ارتباط فنتیکی^۱ و تنوع داخل و بین ۱۳ گونه مالواسه متعلق به ۵

^۱ Phenetic relationships

جدول ۱- محل جمع آوری (*Althaea & Alcea spp*) مورد ارزیابی

شماره نمونه	محل جمع آوری	شماره نمونه	محل جمع آوری
۱	کوه های غرب امام زاده داود	۲۶	اصفهان ۵
۲	شهران، پارک جنگلی کوهسار	۲۷	روانسر ۲
۳	محمدشهر ۱	۲۸	پژوهشکده گیاهان دارویی (قزوین)
۴	چهارمحال بختیاری ۱	۲۹	کرمانشاه
۵	چهارمحال بختیاری ۲	۳۰	تهران ۲
۶	تهران ۱	۳۱	تبریز
۷	آبسرد دماوند	۳۲	کاشان
۸	محمدشهر ۲	۳۳	ارومیه
۹	اصفهان ۱	۳۴	پرند ۱
۱۰	روانسر ۱	۳۵	نجف آباد
۱۱	اصفهان ۲	۳۶	پرند ۲
۱۲	دریند	۳۷	البرز ۱
۱۳	جوانود	۳۸	شهر ری
۱۴	محمدشهر ۳	۳۹	ساوه
۱۵	اصفهان ۳	۴۰	البرز ۲
۱۶	روستای مراء گیلاند	۴۱	اسپانیا ۱
۱۷	کرج	۴۲	انگلیس ۱
۱۸	گیلاند	۴۳	اسپانیا ۲
۱۹	خرم آباد	۴۴	انگلیس ۲
۲۰	فریدون شهر	۴۵	ژاپن
۲۱	محمدشهر ۴	۴۶	انگلیس ۳
۲۲	اصفهان ۴	۴۷	انگلیس ۴
۲۳	مشهد		
۲۴	محمدشهر ۵		
۲۵	موسی آباد کاشان		

با ۵ واحد از آنزیمهای محدودگر *EcoRI* و *MseI* تهیه شده از شرکت Fermentas به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C یک ساعت در دمای ۶۵°C و در مرحله تکمیلی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C برش داده شده سپس آداتورهای *EcoRI* و *MseI* در مدت ۴ ساعت در دمای ۲۵°C و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C به انتهای قطعات برشی متصل شدند. تکثیر قطعات متصل شده به آداتورها طی دو مرحله انجام گرفت. ابتدا نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت ۳:۱ رقیق شدند و با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' با توالی (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') برای آغازگر *EcoRI* و با توالی (5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C-) برای آغازگر *MseI* مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. (۳) برای آغازگر *MseI* مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی در این مرحله به تعداد ۲۷ عدد و با برنامه ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و

DNA استخراج DNA پس از رشد گیاهچه‌ها، از هر گلدان ۵ گیاه به صورت تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و جوان نمونه- برداری صورت گرفت. نمونه‌های گیاهی پس از قرارگیری در ازت مایع بلافضله به فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA منتقل شدند. استخراج DNA از برگ‌های جوان و سالم با روش تغییر یافته سقایی معروف و همکاران (۴، ۲۵) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از نانودراب و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. برای اسیدهای نوکلئوتیکی که از منابع بیولوژیکی استخراج می‌شوند، محاسبه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برآورده از میزان پروتئین را در اختیار قرار می‌دهد. در صورتی که DNA عاری از پروتئین باشد این نسبت ۱/۸ خواهد شد و در صورت آلودگی نمونه با پروتئین یا فل، نسبت مذکور به پایین تر از ۱/۸ کاهش پیدا می‌کند (۲۸).

AFLP تجزیه

تجزیه AFLP بر اساس روش ووس و همکاران (۳۵) با اندکی تغییر صورت گرفت. ۲۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی

نمودار دو بعدی جهت گروه‌بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر روی ۴۷ نمونه گیاه ختمی (Althaea & Alcea spp)، در مجموع تعداد ۱۰۲۲ نوار حاصل شد که از این تعداد ۲۵۶ نوار (۴۰٪ درصد) چند شکل بودند. برای تفکیک صحیح نمونه‌ها و هم‌چنین تخمین درست میزان تشابه موجود بین آن‌ها و دقت کافی در امتیاز بندی، حذف نوارهای کاذب (نوارهایی که در اثر رویت اشتباه، تغییر شرایط PCR، هضم ناقص، کدورت ژل و غیره به صورت باند دیده می‌شوند) در آنالیز منظور گردید. زیرا عدم دقت در امتیازبندی وجود نوارهای کاذب سبب می‌شود تا برآورد روابط ژنتیکی بین افراد نادرست باشد (۱۹). میانگین تعداد نوار تکثیر شده و چند شکل به ازای هر ترکیب آغازگری به ترتیب ۷۸/۶۱ و ۱۹/۶۹ بود. مقادیر محتوای اطلاعات چند شکل برای هر جفت آغازگر، به همراه نوع آغازگرهای، تعداد نوارهای چند شکل و شاخص نشانگر در جدول ۲ نشان داده شده است. تعداد نوار برای هر جفت آغازگر از ۵ تا ۶۰ متغیر بود. بیشترین تعداد نوار چند شکل مشاهده شده در آغازگر (AGG), M(GAG) با مجموع ۶۰ نوار و کمترین آنها در آغازگرهای (ACT), M(CAA) و E(AGG) با ۵ نوار، به ترتیب مشاهده شدند (شکل ۲). تفاوت در تعداد نوارهای مشاهده شده می‌تواند به دلیل منشاء و خصوصیات متفاوت نمونه‌های مورد استفاده و نیز ماهیت تفاوت در نشانگرهای AFLP مورد مطالعه باشد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) به طور جداگانه‌ای برای هر جفت آغازگر در کل نمونه‌ها محاسبه شد. آغازگر (AGG), M(GAG) دارای بیشترین مقدار PIC و برابر با ۰/۹۴۰ و آغازگر (CAA), M(CAA) دارای کمترین مقدار PIC و برابر با ۰/۵۰۴ بود و میانگین این شاخص ۰/۷۸۶ محاسبه شد. بنابراین آغازگر (AGG), M(GAG) با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای بکار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص سازد.

۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تکثیر شدند. سپس محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۹:۱ رقیق شدند و با ۱۳ جفت آغازگر دارای ۳ نوکلئوتید انتخابی در انتهای^۱ (جلد ۲) تحت چرخه حرارتی استاندارد مانند مرحله تکثیر پیش انتخابی و با دمای اتصال ۶۰°C تکثیر گردیدند. قطعات DNA تکثیر شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد (۳۵) جدا شدند (شکل ۱). الکتروفوروز به مدت ۲ ساعت با بافر ۱X TBE و ولتاژ ۱۲۰۰ ولت انجام (۱۱) و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره (۲۶) صورت گرفت و از الگوی باندی بدست آمده با استفاده از دستگاه Densitometer عکس‌برداری شد.

تجزیه داده‌ها

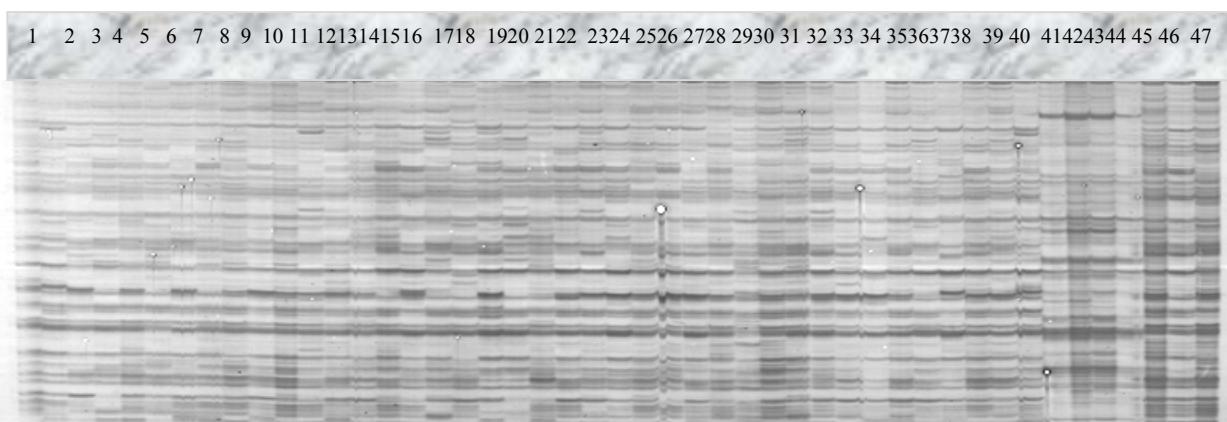
هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمایش داده شد. داده‌های از دست رفته نیز بصورت نقطه(.) مشخص گردیدند. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) براساس فرمول شماره یک (۲۰) محاسبه گردید.

$$\text{PIC} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i^2}{n} \quad (1)$$

به طوریکه در این فرمول P_i فراوانی نوار i ام و n تعداد نوارها می‌باشد. هم‌چنین شاخص نشانگر (MI) با استفاده از فرمول شماره دو: (۲) $MI = PIC \cdot N \cdot \beta$ برای کلیه آغازگرها محاسبه شد، که PIC میانگین میزان اطلاعات چند شکلی، N تعداد کل نوارها و β درصد چندشکلی (تعداد جایگاه‌های چند شکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر جفت آغازگر می‌باشد. این شاخص علاوه بر مزایای شاخص PIC، تعداد کل نوار و نسبت چند شکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (۱۹). برای بررسی روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها، داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار (۲۳) NTSYS-pc Ver 2.02 انتقال یافت. تجزیه خوش‌های با استفاده از روش UPGMA و با ضرایب تشابه Dice انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم افزار DARWIN5.0 مکمل با روش تجزیه خوش‌های انجام گرفت و با دو مؤلفه اول که بیشترین درصد تنوع را توجیه می‌کردند،

جدول ۲- تعداد باندها، درصد چند شکلی، محتوای داده‌های چند شکلی و شاخص نشانگر برای ترکیب‌های آغازگری مورد بررسی

شماره	نام آغازگری	توالی آغازگری	تعداد کل باند	تعداد باند چند شکل	محتوای داده‌های چند شکلی		شاخص نشانگر
					درصد چند شکلی	MI	
1	E11-M35	*E-AGG/M-GAG	۸۵	۶۰	۷۰/۵۸	۰/۹۴۰	۵۶/۴۲
2	ETG-M35	E- CTG/M-GAG	۹۴	۲۶	۲۷/۶۵	۰/۸۶۹	۲۲/۶۱
3	E2-M35	E-AAC/M-GAG	۶۸	۲۳	۳۳/۸۲	۰/۸۶۴	۱۹/۸۹
4	E2-M20	E-AAC/M-CAT	۷۹	۲۳	۲۹/۱۱	۰/۸۶۲	۱۹/۸۳
5	E46-M17	E-GTC/M-CAA	۷۶	۲۱	۲۷/۶۳	۰/۸۴۵	۱۷/۷۴
6	E11-M20	E-AGG/M-CAT	۶۳	۲۰	۳۱/۷۴	۰/۸۵۰	۱۷/۰۱
7	E2-M17	E-AAC/M-CAA	۶۹	۱۹	۲۷/۵۳	۰/۸۲۱	۱۵/۶۰
8	E46-M35	E-GTC/M-GAG	۱۰۳	۱۷	۱۶/۵۰	۰/۸۱۴	۱۳/۸۴
9	E8-M20	E-ACT/M-CAT	۱۱۲	۱۴	۱۲/۵	۰/۸۰۰	۱۱/۲۰
10	ETG-M17	E- CTG/M-CAA	۶۴	۱۴	۲۱/۸۷	۰/۷۸۱	۱۰/۹۴
11	ETG-M22	E- CTG/M-CCC	۷۸	۸	۱۰/۲۵	۰/۶۷۹	۵/۴۳
12	E11-M17	E-AGG/M-CAA	۵۶	۶	۱۰/۷۱	۰/۸۹۰	۳/۵۴
13	E8-M17	E-ACT/ M-CAA	۷۵	۵	۶/۶۶	۰/۸۰۴	۲/۵۲
میانگین							۱۶/۶۵

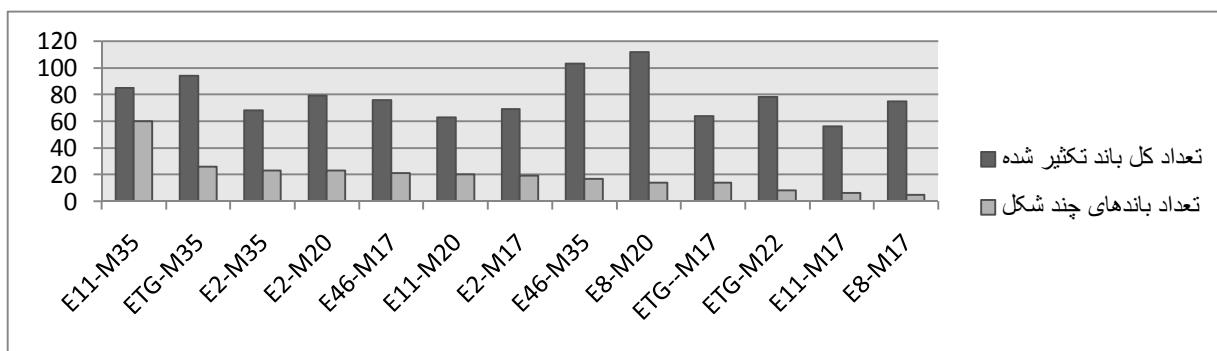
*آغازگرهای ECORI با E و آغازگرهای *Mse*I با M نشان داده شده‌اند.شکل ۱- الگوی نواری حاصل از ترکیب آغازگری E-AGG/M-GAG در بین ۴۷ نمونه (*Althaea & Alcea spp*) مورد بررسی با استفاده از نشانگر

به طوری که گروههای حاصل از دسته‌بندی نمونه‌ها براساس تجزیه خوش‌های در نمودار تجزیه به مختصات اصلی دیده می‌شود که این مساله موید قطع نمودار تجزیه خوش‌های از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح نمونه‌هاست. گروه یک و دو شامل تمام نمونه‌های ایرانی از مناطق مختلف جغرافیایی کشور، به همراه ۳ نمونه خارجی در گروه یک بود و گروه ۳ شامل فقط نمونه‌های خارجی بود. در تحقیقی که توسط دریسی گاکر و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت، مشاهده شد که ارقام کشت شده در مناطق مختلف جغرافیایی، لزوماً در دسته‌های جداگانه قرار نمی‌گیرند و این حالت چند دلیل می‌تواند داشته باشد: طولانی نبودن انتخاب بر اساس شرایط مختلف محیطی؛ آنقدر که بتواند منجر به ایجاد تفاوت در ژرم پلاسم شود، توانایی ژن‌های وفق پذیر به یک محیط، در ایجاد سازش به چند محیط و احتمالاً کارایی کم و یا ناکافی بودن تعداد مکان‌های ژنی مورد مطالعه را نیز می‌تواند نشان دهد، هم چنین تمایز کم بین نمونه‌ها می‌تواند وابسته به ویژگی دگرگشتنی گیاه و مکانیسم انتشار گرده که منجر به افزایش جریان ژنی و افزایش تجانس آلل‌ها و اختلاط و هم پوشانی جمعیت‌ها می‌شود، باشد. قرارگیری اکسشن‌های ژاپن و انگلیس ۳ و انگلیس ۴ از جنس *Alcea* با اکسشن‌های ایرانی (Althaea & *Alcea spp*) در گروه یک، بیانگر این مطلب است، که احتمالاً دارای نیای مشترک بوده و از منشاء اقلیمی مورد رویش خود، آسیای جنوب غربی (۳) در اثر جایه جایی فیزیکی ژرم پلاسم انتقال یافته و در سطح پایینی تحت تاثیر فرآیندهای انتخاب طبیعی، تکاملی، فعالیت‌های بهزارعی و بهزادی بشر قرار گرفته به طوری که هم چنان با اجداد پیشین خود دارای شباهت‌های قابل توجهی هستند که این امر می‌تواند بدلیل خاصیت دارویی کمتر و محتوای موسیلاژ پایین تر آن نسبت به جنس *Althaea* باشد (۶) و قرارگیری نمونه‌های اسپانیا ۱، انگلیس ۱، اسپانیا ۲ و انگلیس ۲ از جنس *Althaea* در گروه سه و جدا از اکسشن‌های ایرانی نیز، تایید کننده این امر بود.

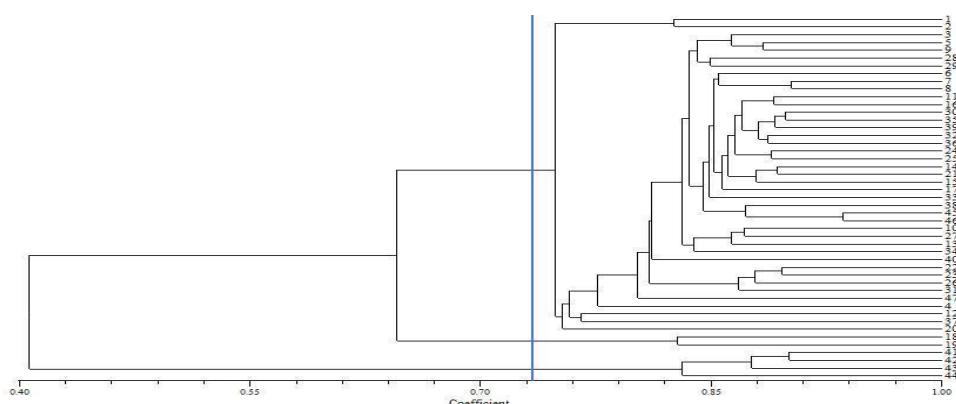
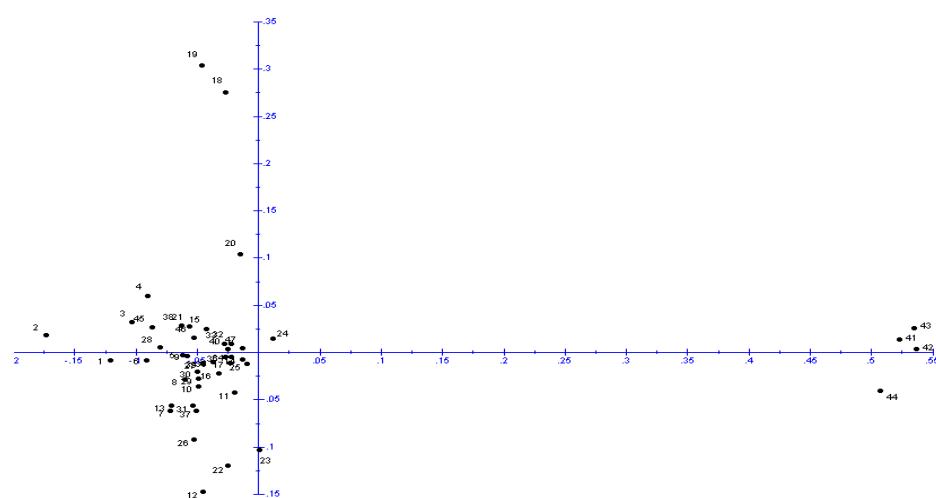
میزان PIC به عواملی مانند تعداد نوارهای هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده (که هم بستگی مبنی با میزان چند شکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است (۲۲). محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده، نشان داد که بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر E(AGG), M(GAG) و برابر با ۵۶/۴۲ و کمترین مقدار مربوط به آغازگر E(ACT), M(CAA) و برابر با ۲/۵۲ بود و میانگین این شاخص ۱۶/۶۵ محاسبه شد. این شاخص پتانسیل هر آغازگر در تولید نوار بیشتر را نشان می‌دهد (۱۹). تفاوت MI نسبت به PIC این است که در MI تعداد کل نوارها در نظر گرفته می‌شود ولی در PIC تعداد نوارهای چند شکل در نظر گرفته می‌شود.

ضریب کوفتیک برای تجزیه خوش‌های به روش^۱ UPGMA^۲ و دورترین همسایگی^۳ و سه ضریب تشابه تطابق ساده (SM) (۳۳)، جاکارد (۱۴) و دایس (۱۸)، نشان داد که گروه‌بندی بر اساس ضریب دایس با ضریب کوفتیک^۴ ۰/۹۸۳ بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های فوق به دلیل داشتن بیشترین تطابق بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی است (شکل ۳). بیشترین شباهت مشاهده شده مربوط به نمونه‌های ۴۵ و ۴۶ از ژاپن و انگلیس ۳ و برابر ۹۳/۵۵ درصد و در نمونه‌های ایرانی مربوط به نمونه ۷ و ۸ از محمدشهر ۲ و آبسرد دماوند و برای ۹۰/۱۸ درصد بود. بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به نمونه شماره ۴۳ و ۲ از اسپانیا ۲ با شهران برابر ۲۵/۵۵ درصد تشابه نسبت به سایر نمونه‌ها و در میان نمونه‌های ایرانی مربوط به نمونه شماره ۱۲ از دربند با ۱۹ از خرم آباد با ۵۲/۶۷ درصد تشابه بود. بنابراین میانگین شباهت ژنتیکی در کل ۴۷ نمونه برابر ۵۹/۵۵ درصد و در نمونه‌های ایرانی ۷۱/۴۲ درصد محاسبه شد. پس از برش خوش‌بندی داده‌های حاصل از AFLP در ضریب تشابه ۷۳ درصد، ۴۷ اکسشن مورد مطالعه در سه گروه، قرار گرفته، به صورتی که گروه یک و سه خود شامل ۲ زیر گروه مجزا بود. نتایج تجزیه (PCoA) نیز گروه‌بندی تجزیه خوش‌های را تائید کرد.

¹ Unweighted pair group method with arithmetic mean² Weighted pair group method with averaging³ Complete linkage⁴ Cophenetic coefficient



شکل ۲- تعداد باندهای تکثیر شده و چند شکل آغازگرها در نمونه‌های مورد مطالعه

شکل ۳- گروه‌بندی نمونه‌های گیاه ختمی (*Althaea & Alcea spp*) با روش AFLP بر اساس داده‌های UPGMA (نمونه‌ها بر اساس جدول ۱ شماره گذاری شده‌اند)شکل ۴- نمودار دو بعدی تجزیه PCoA در ۴۷ نمونه از گیاه ختمی (*Althaea & Alcea spp*)

این مطالعه نشان داد که بهدلیل وجود تعداد کم نوارهای پلی مورفیک برای گروه‌بندی نمونه‌های ختمی، متوسط ضریب تشابه بالا در نمونه‌های ایرانی (۷۱/۴۲ درصد) و در کل نمونه‌ها (۵۹/۵۵ درصد) و در نتیجه مشاهده تنوع پایین برای یافتن تنوع مطالعه، تجزیه و تحلیل AFLP پتانسیل پایینی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌های ختمی با ۱۳ جفت ترکیب آغازگری معرفی شده در این پژوهش دارد و ضرورتی برای افزایش تعداد آغازگر تشخیص داده می‌شود. لذا اظهار نظر قطعی در این زمینه، نیازمند بررسی تعداد نمونه بیشتری از هر منطقه، استفاده از تعداد آغازگر بیشتر، آنژیم‌های مختلف و همچنین استفاده از نشانگرهای دیگر است. این اولین مطالعه در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای DNA در گیاه ختمی دارویی در جهان می‌باشد و می‌تواند به عنوان اولین گام برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسنده این مقاله برخود لازم می‌دارد، از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (کیلومتر ۵۵ اتوبان تهران-قزوین) بدليل تامین هزینه مالی و از جانب آقای دکتر نقوی (مدیر گروه پژوهشی بیوتکنولوژی پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران) به خاطر راهنمایی‌های علمی‌شان، سپاسگزاری نماید.

۴. دستمالچی ت، امیدی م، ترابی س، مداح عارفی ح، بهزادی م، اطمینان ع ر، و حسنی م ح (۱۳۸۹) روش جامع استخراج DNA از گیاهان دارویی: مطالعه موردی روی ختمی، درمنه، مشگک، فندق، همایش ملی گیاهان دارویی، ۱۱ الی ۱۲ اسفند، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد مازندران، ایران.

۵. رهایی م، سید طباطبائی ب، شاه نجات بوشهری ع، عبدمیشانی س، و ملبوی م ع (۱۳۸۲) استفاده از تکنیک AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در کلزا (*Brassica nupus* L)، نهال و بذر ۴۸۱-۱۹:۴۶۹.

۶. زرگری ع (۱۳۶۸) گیاهان دارویی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران.

نتایج گروه‌بندی داده‌های مولکولی با مناطق جغرافیایی در بسیاری از موارد با یکدیگر تطابق داشت، رولدن رویز و همکاران (۲۰۰۰) معتقدند در مواردی که نامتجانسی و تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی زیاد باشد، احتمال عدم تطابق بین تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی بیشتر است، بنابراین این تطابق در نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین در بین آنها می‌باشد. برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین ارقام و هم‌چنین مشاهده آن به صورت چند بعدی، تجزیه به مختصات اصلی نیز مکمل با روش تجزیه خوشای انجام شد (۵). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) (شکل ۴) نشان داد که مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۵۰/۲۴ و ۱۰/۶۵ درصد از تغییرات نمونه‌ها را (که توسط آغازگرها مشاهده شد)، در بر می‌گیرند، به طوری که در نمودار دو بعدی در مجموع ۶۰/۸۹ درصد تغییرات توجیه می‌شود. در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها توزیع یکنواخت داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را تا حدودی پوشش دهند، بنابراین اگر نشانگر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، هم‌بستگی بین آنها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مولفه برای توجیه تغییرات کل آنها لازم است (۱). نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان می‌دهد که آغازگرها مورد آنالیز در این تحقیق، تنها بخشی از ژنوم را مورد پوشش قرار داده‌اند چرا که درصد بیشتری از تنوع بین ارقام به وسیله مولفه اصلی اول توجیه گردیده است (۵). در نهایت نتایج

منابع

۱. احکامی ا (۱۳۸۴) استفاده از نشانگرهای AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم *Triticum durum*، پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۲. بقالیان ک (۱۳۷۸) اثر رطوبت خاک و هوا بر کمیت و کیفیت موسیلاژ اسفرزه، پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته علوم باگبانی، دانشگاه تهران.
۳. پاکروان فرد م (۱۳۸۰) بررسی سیستماتیک جنس ختمی (Alcea) از تیره پنیرک (Malvaceae) در ایران، رساله برای دریافت درجه دکتری در رشته گیاه‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

20. Prasad M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS and Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100: 584-592.
21. Rechinger KH and Hedge IC (1986) Umbilliferae. In: Rechinger K H. *Flora Iranica*.Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, (Vol 162).
22. Roder MS,Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P and Ganap MW (1998) Amicrosatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
23. Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter software, Setauket. New York.
24. Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van-Bockstaele E, Depicker A and De-Loose M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). *Mol Breed*, 6, 125–134.
25. Saghai-Marcoof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allad RW (1984) DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc.National. Acad. Sci. USA*. 81: 8014-8018.
26. Sanguinetti CJ, Dias Neto E and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17, 915-919.
27. Sasanuma T, Chabane K, Endo TR and Valkoun J (2002) Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. *Euphytica* 127: 81-93.
28. Seidman LA (2008) Basic laboratory calculations for biotechnology. Pearson Pub. P. 482.
29. Shaheen N, Khan MA,Yasmin G and Hayat MQ (2009) Pollen morphology of 14 species of Abutilon and Hibiscus of the family Malvaceae(sensu stricto). *J. Medical Plants Research*.3(11),921-929.
30. Shaheen N,Pearce S R, Khan MA, Mahmood T, Gh Yasamin and Hayat MQ (2010) AFLP mediated genetic diversity of malvaceae species. *Medicinal Plant Research Vol. 4(2)*, pp. 148–154.
31. Simpson BB and ogorzaly MC (1986) Economic botany.McGraw-Hill,Inc., Singapore.640p.
32. Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy(Freeman, San Francisco), pp. 227-240.
33. Sokal RR and Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin* 38: 1409-1438.
34. Tang T, Zhong Y, Jian S and Shi S (2003) Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China Assessed using AFLP markers. *Annals of Botany*,92,409-414.
35. Vos P, Hogers R,Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M,Frijters A, Pot J, Wheeler T, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP:a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*,23:4407-4414.
۷. شاهسواران ا (۱۳۸۰) کاربردهای بیوتکنولوژی گیاهی و اهمیت آن برای کشور، شبکه تحلیلگران تکنولوژی ایران.
۸. قهرمان ا (۱۳۸۵-۱۳۵۴) فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مرتع-بخش گیاهشناسی.
۹. کوچکی ع، نصیری محلاتی م، و نجفی ف (۱۳۸۳) تنوع زیستی گیاهان دارویی و معطر در بوم نظام های زراعی ایران، مجله پژوهش های زراعی ایران، ج ۲، ش ۲: ۲۰۸-۲۱۶.
۱۰. نقوی م، قره یاضی ب، و سالکده ق (۱۳۸۶) نشانگر های مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران.
11. Chen MM, Feng F,Xin S and Han S (2010).Genetic linkage maps of *Pinus Koraiensis* Sieb.et Zucc.based on AFLP markers. *African journal of Biotechnology*.Vol.9(35), pp 5659-5664.
12. Dreisigacker S, Zhang P, Warburton ML, Van Ginkel M, Hoisington D, Bohn M and Melchinger AF (2004) SSR and pedigree analysis of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega environments. *Crop Science*, 4, 381-388.
13. Huylebroeck JM, Riek JD and Loose MD (2000) Genetic relationships among *Hibiscus Syriacus*, *Hibiscus Sinosyriacus* and *Hibiscus Paramutabilis* revealed by AFLP, morphology and ploidy analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47,335-343.
14. Jaccard P(1901) Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura, *Bulletin Societe Vandoise des sciences naturelles* 37: 547-579.
15. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO,Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B,Matthes M, Daly A,Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M,Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R,Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A and Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP andSSR markers in plants by network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3:381-390.
16. La Duke JC and Doebley J (1995) The chloroplast DNA based phylogeny of the Malvaceae. *Syst. Bot.* 20(3),259-271.
17. Naghavi MR,Mardi M,Ramshini HA and Fazelinasab B (2004) Comparative analysis of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(3), 195 – 202.
18. Nei M and Li W(1979)Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academic Science, (USA)* 76:5269-5273.
19. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S and Rafalsky A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding* 2,225-238.