

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی دم‌شیر (*Leonurus cardiac L.*) با استفاده از نشانگرهای AFLP

ابوذر سورنی^{۱*}، وحیده ناظری^۲ و محمدرضا فتاحی مقدم^۳

*^۱- نویسنده مسؤل مکاتبات، دانشجوی دکترای علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
پست الکترونیک: soorni64@ut.ac.ir

^۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

^۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۰

چکیده

دم‌شیر (*Leonurus cardiaca*) گیاهیست دارویی از تیره نعنائیان که به دلیل اثرات رقیق‌کنندگی خون و آرام‌کنندگی عضلات قرن‌هاست که مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه در ایران دارای پراکندگی و تنوع بالایی است، به‌طوری‌که از ۴ زیر گونه موجود در دنیا، ۳ زیر گونه آن در ایران وجود دارد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ از ۶ جمعیت دم‌شیر و تعیین روابط خویشاوندی بین آنها از نشانگر AFLP استفاده شد. چهار جفت ترکیب آغازگری *EcoRI/MseI* در مجموع ۶۰۸ نوار قابل امتیازدهی ایجاد نمود که ۳۵۵ نوار (۵۸ درصد) چندشکل بودند. متوسط شباهت ژنتیکی نمونه‌های مورد آزمایش بر پایه ضریب Nei، ۰/۲۶ (۰/۳۰-۰/۲۱) تخمین زده شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی به طور عمده در درون جمعیت‌های مورد بررسی (۵۷ درصد) بیشتر از بین جمعیت‌ها (۴۳ درصد) بود. دندروگرام بدست آمده با استفاده از روش UPGMA، ۴۷ ژنوتیپ دم‌شیر را به ۵ گروه اصلی تقسیم کرد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه به ترتیب بیشترین و کمترین تشابه را بین نمونه‌های طالقان ۶ و طالقان ۷ با مقدار ۰/۷ و نمونه‌های درگز ۱ و طالقان ۷ با مقدار ۰/۰۶ نشان داد. تمامی تجزیه و تحلیل‌ها نشان از الگوی نواری کاملاً متفاوت زیر گونه *Leonurus cardiaca* subsp. *turkestanicus* از منطقه درگز بود. ضریب تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها (G_{ST}) به مقدار ۰/۳۷ (۳۷ درصد) و برآورد جریان ژنی (N_m)، به طور متوسط تعداد مهاجرت رد و بدل شده در هر نسل در میان جمعیت‌ها برابر ۰/۸۵ (۸۵ درصد) با فرض تعادل هاردی واینبرگ محاسبه شد. تبادل پایین ژن در بین جمعیت‌های دم‌شیر می‌تواند به دلیل فاصله زیاد بین رویشگاه‌ها باشد. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد که جمعیت درگز می‌تواند به‌عنوان یکی از والد‌ها در انجام کارهای اصلاحی و تلاقی با سایر جمعیت‌ها و زیرگونه‌ها استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ارتباط ژنتیکی، AFLP، چندشکلی، جریان ژنی.

مقدمه

موجود از جنس *Leonurus* در ایران است (Mozafarian, 1996). استفاده از این گیاه به زمان‌های بسیار قدیم نسبت داده شده است. در اوایل قرن ۱۵ میلادی بود که اقدام به

دم‌شیر (*Leonurus cardiaca L.*) از تیره Lamiaceae (نعنائیان) و زیر تیره Lamioideae تنها گونه

برای درمان و پیشگیری بیماریهای قلبی عروقی استفاده می‌شود (Trumbeckaite, 2006). اولئونیک و اورسلیک اسید دوتری‌ترین شناسایی شده در این گیاه هستند که به دلیل مشابهت ساختار شیمیایی دارای اثرات درمانی مشابه هستند. امروزه اثبات شده است که ترکیب‌های فوق دارای اثرات ضد تورم، ضد تومور، ضد HIV، ضد باکتری و قارچی بوده و برای درمان دیابت بکار می‌روند (Janicsak, 2006).

تنوع ژنتیکی از ملزومات اصلاح گیاهان می‌باشد که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است (Rubatzky & Yamaguchi, 1998; Abdemishani & Shahnejatbooshehri, 1997). به طور حتم اطلاع از محتوی و سطح تنوع ژنتیکی منابع گیاهی هر محصول اولین و مهمترین گام در جهت برآورد اهداف اصلاحی می‌باشد. از مهمترین اهمیت‌های دیگر تنوع ژنتیکی پایداری جمعیت‌های گیاهیست (Wang et al., 2007). مدیریت حفاظت از گونه‌ها، دانش تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و ارزیابی خطر انقراض و پتانسیل تکاملی در جهان در حال تغییر می‌تواند از مزایای دیگر بررسی تنوع ژنتیکی باشد (Hedrick, 2001). حفاظت مؤثر از گونه‌های آسیب‌پذیر مقدار زیادی بستگی به آگاهی از الگوهای تنوع ژنتیکی دارد. به‌عنوان مثال، ساختار فضایی از تنوع ژنتیکی می‌تواند اطلاعات لازم را برای نمونه‌برداری از راهبردهای حفاظت در محل و یا خارج از محل فراهم کند (Spataro et al., 2007).

نشانگرهای مولکولی در درک ساختار ژنتیکی محصولات کشاورزی ابزار مناسبی می‌باشند. پیشرفت‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی سبب شده است که محققان و به‌نژادگران تفاوت‌های بین دو یا چند فرد را به درستی مشاهده نمایند

پرورش آن در بعضی صومعه‌های شمال ایتالیا شد و به آن نام Cardiacia اطلاق گردید (Asen, 2009). از آن تاریخ به بعد، کنجکاوای مردم درباره اختصاصات درمانی این گیاه افزایش یافت و بررسی‌های دقیقی بر روی آن بعمل آمد، به‌طوری‌که از قرن ۱۶ میلادی به بعد، از آن به‌عنوان ضد تشنج، قابض، مدر و خلط‌آور استفاده شد و حتی در اواخر قرن هجدهم میلادی، اثر قاعده‌آور آن اعلام شد.

دم‌شیر گیاهی دگرگشن، علفی پایا با ریزومی گسترده به ارتفاع ۰/۵ تا ۱/۵ متر با ساقه مستقیم، منشعب، چهار-گوش، کم و بیش تو خالی با بافت نسبتاً چوبی و دارای ۲۰ تا ۲۵ چرخه گل در هر ساقه است. برگ‌ها مخروطی، متقابل، پوشیده از کرک‌های تک سلولی با کوتیکول زگیل مانند یا مرکب از دو تا چهار سلول با کوتیکول صاف، بزرگ و منقسم به سه لوب با بریدگی‌های عمیق، به‌طوری‌که برگ‌های واقع در وسط ساقه آن منقسم به ۵ تا ۷ لوب جلوه می‌کنند. گل‌ها پوشیده از کرک‌های تک سلولی با کوتیکول نازک به رنگ قرمز با خال‌های ارغوانی که به شکل مجتمع (۸ تا ۱۱ گل) در زاویه برگ‌های قسمت فوقانی ساقه قرار دارند (Zargari, 1990; Ali & Nasir, Omidbeigi, 2010; Popescu, 2009; Leonurus, 1990). جنس Leonurus دارای ۱۲ گونه است که در سرتاسر دنیا پراکنده شده‌اند. مهمترین این گونه‌ها عبارتند از: *L. gjaucescens*, *L. cardiaca*, *L. marrubiastrum* (Ali & Nasir, 1990). از چهار زیر گونه *cardiaca* موجود در منطقه فلور ایرانیک، سه زیر گونه *Leonurus cardiaca* ssp. *Cardiaca* *Leonurus cardiaca* ssp. *turkestanicus* و *Leonurus cardiaca* ssp. *persicus* در ایران می‌رویند.

فلاونوئیدهایی نظیر کوئرستین، کوئرستین، هیپروسید، روتین و کامفرول از مهمترین ترکیبات این گیاه هستند که

سرخارگل (*Echinacea ssp*) را به خوبی از هم تفکیک کند. در این مطالعه نشانگر AFLP به خوبی نشان داد که سه گونه سرخارگل از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم دارند (Russi et al., 2009).

در کشور ایران به دلیل عدم شناخت کافی از ذخایر ژنتیکی و ژن‌های مطلوب گیاهان دارویی برنامه‌های مدون اصلاحی طراحی نشده است؛ بنابراین می‌توان با شناسایی جمعیت‌های مختلف و ارزیابی آنها، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققان را در دسترس آنها قرار داد. از جمله این گیاهان، گیاه دم‌شیر است که تاکنون گزارشی از مطالعه مولکولی آن در محدوده پراکنش جهانی آن جهت بررسی ژرم‌پلاسم با هدف مطالعه روابط ژنتیکی برای اصلاح، اهلی‌سازی و تولید ارقام متناسب با نیاز صنایع وابسته صورت نگرفته است. در این راستا تحقیق حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین برخی از جمعیت‌های دم‌شیر در ایران با استفاده از نشانگر AFLP پرداخته است تا تنوع ژنتیکی موجود را بررسی و روابط بین آنها را گزارش نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش شامل ۴۷ نمونه گیاهی از ۶ جمعیت جمع‌آوری شده از ۶ استان مختلف ایران است. نام، علامت اختصاری و محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در جدول ۱ ارائه شده است. نمونه‌های برگی گیاهان در بهار سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری و با نگهداری در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از چند بار شستشو با آب مقطر و خشک کردن آب روی برگ‌ها، با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد.

(Bosland & Votava, 2000). نشانگرهای مبتنی بر DNA به‌ویژه نشانگرهای AFLP مناسب‌ترین روش برای برآورد تنوع ژنتیکی بشمار می‌روند (Odonougue et al., 1994; Maguire, 2002). روش مولکولی AFLP روشی مبتنی بر PCR بوده با ترکیبی از نقاط قوت و غلبه بر نقاط ضعف دو نشانگر RAPD و RFLP (Vos et al., 1995). مزایای این نشانگر موجب ارائه گزارش‌هایی در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی، ادویه و معطر شده است.

در مطالعه‌ای Yu و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از مارکر AFLP تنوع ۱۶ ژنوتیپ *Leonurus japonicus* را نیز مورد بررسی قرار دادند. از ۱۸۲ نوار تولیدی ۱۴۴ نوار چندشکلی نشان دادند. نه آغازگر AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۷ توده بومادران متعلق به ۵ گونه توانست سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در میان ارقام شناسایی کند. این نشانگر به خوبی گونه‌های مورد بررسی را از هم تفکیک نمود و دندروگرام حاصل ۵ گونه مورد نظر را کاملاً از هم تفکیک کرد و نشان داد که دو گونه *Achillea santolina* و *Achillea teunifolia* به ترتیب کمترین و بیشترین تنوع را نشان می‌دهند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق نزدیک ژنوتیپ‌ها با منشأ جغرافیایی را نشان داد (Rahimmalek et al., 2009).

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲۰ توده ریحان از ۵ گونه مختلف با استفاده از ۸ ترکیب آغازگر AFLP با تولید ۱۵۰ نوار چندشکل (۵۹/۵ درصد) همراه بود. دندروگرام حاصل کلیه توده‌ها را در دو گروه اصلی جای داد. گونه *Ocimum ciliatum* با قرار گرفتن در دسته جداگانه تفاوت زیادی با گونه‌های دیگر در سطح پایداری ۱۰۰ تجزیه خوشه‌ای نشان داد (Moghaddam et al., 2011).

۱۴ آغازگر AFLP با تولید ۵۶۵ نوار چندشکل از کل ۹۹۴ نوار تولید شده توانست ۳۰ ژنوتیپ متعلق به سه گونه

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه جمعیت‌های دم‌شیر

ردیف	استان	محل جمع‌آوری	تعداد نمونه جمع‌آوری شده	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	کرمان	مادون	۷	۲۶۰۰	E۵۶°۵۰'۳۱/۴۹"	N۲۹°۱۸'۳۶/۷۱"
۲	خراسان شمالی	درگز	۸	۲۱۹۴	E۵۸°۴۲'۱/۴۷"	N۳۷°۳۴'۴۲/۹۱"
۳	البرز	طاقان	۸	۱۸۵۰	E۵۰°۴۵'۳۴/۵۱"	N۳۶°۱۰'۲۷/۸۰"
۴	اصفهان	خوانسار	۸	۲۲۱۰	E۵۰°۱۷'۵۷/۶۵"	N۳۳°۱۵'۵۰/۶۳"
۵	اردبیل	سراب	۸	۱۶۸۷	E۴۷°۳۱'۴۰/۲۴"	N۳۷°۵۵'۵۹/۲۸"
۶	مازندران	ساری	۸	۲۱۷۰	E۵۳°۱۲'۳/۵۸"	N۳۶°۳۳'۳۷/۷۸"

استخراج DNA

استخراج DNA از ۵ تک بوته هر جمعیت با استفاده از روش تغییر یافته Pirttila و همکاران (2001) (استفاده از زغال فعال در مرحله اضافه کردن بافر جهت حذف ترکیبات فنلی و استات پتاسیم در بین دو مرحله شستشو با کلروفورم ایزوآمیل الکل) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد و به کمک آن غلظت یکسان از DNA نمونه‌ها (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد.

شرایط آزمایش نشانگر AFLP

آزمایش نشانگر AFLP براساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اعمال تغییرات جزئی انجام شد. مراحل این تکنیک به ترتیب شامل: تیمار DNA ژنومی با دو آنزیم برشی، اتصال سازگارها به قطعات برشی، تکثیر اولیه، تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهایی با سه باز انتخابی، الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی قطعات تکثیر شده با نیترات نقره بود که شرح آن در زیر آمده است.

برش آنزیمی

اولین مرحله در انجام آزمایش AFLP، برش DNA ژنومی با دو آنزیم برشی (بطور معمول *MseI* و *EcoRI*) می‌باشد. در این تحقیق از آنزیم برشی *Tru9I* به جای *MseI* استفاده شد. این آنزیم ایزوشیزومر (توالی تشخیص و الگوی برش یکسان) آنزیم *MseI* می‌باشد، به عبارتی با استفاده از آن تغییری در الگوی برشی DNA ژنومی رخ نمی‌دهد. مزیت کاربرد این آنزیم بهای بسیار کمتر آن در مقایسه با *MseI* است. در این واکنش از ۴/۴ ماکرولیتتر بافر مشترک تانگو ۱۰ برابر، ۵ واحد *EcoRI*، ۵ واحد *MseI*، ۵۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ میلی مولار ATP و رسانیدن به حجم ۴۰ ماکرو لیتر با آب مقطر استفاده شد. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ ساعت انجام شد. به‌منظور متوقف کردن واکنش برش آنزیمی، لوله‌ها در دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند.

اتصال سازگارها به قطعات DNA

برای محل برش هر آنزیم برشی آداپتور اختصاصی وجود دارد که به انتهای چسبنده قطعات برش یافته اتصال می‌یابد. اجزای حجمی واکنش ۱۰ میکرولیتری جهت

دقیقه. مرحله دوم: ۳۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله سوم: یک چرخه شامل: ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی در ۶۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه.

تکثیر انتخابی DNA

در این مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزای ۰/۸ میلی‌مولار از آغازگرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (*dNTPs*)، یک واحد آنزیم تک (*Taq*)، ۶ میکرولیتر از DNA رقیق شده تکثیر مقدماتی (به نسبت ۱ به ۱۵) و آب دوبار تقطیر انجام شد. آغازگرهای *EcoRI* و *Tru9I* در این واکنش دارای توالی یکسان با آغازگرهای مرحله تکثیر اولیه می‌باشند. با این تفاوت که سه باز انتخابی اضافی داشتند. چرخه‌های حرارتی PCR تکثیر انتخابی بشرح زیر بود: مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه، مرحله دوم: شامل ۱۳ چرخه: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (کاهش دما به میزان ۰/۷ درجه در هر چرخه)، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله سوم: شامل ۲۴ چرخه: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله چهارم: بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه. کلیه واکنش‌های PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio-Rad انجام گردید.

الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل

فرآورده حاصل از تکثیر انتخابی جهت واسرشته‌سازی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت

اتصال آداپتور برای هر نمونه عبارت بود از: ۱ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر مرحله اتصال، ۱۰ میلی‌مولار *ATP*، ۵ میکرولیتر آداپتور *EcoRI* (مستقیم 5'-CTC GTA) (5'-AAT و معکوس GAC TGC GTA CC-3') (5'-TGG TAC GCA GTC TAC-3') و ۵ میکرولیتر آداپتور *MseI* (مستقیم 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3') و معکوس (5'-TACTCAGGACTCAT-3')، ۵ واحد آنزیم *T4 DNA Ligase* و آب دوبار تقطیر. این محلول پس از تهیه به محصول واکنش برش اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور متوقف کردن واکنش برش آنزیمی، لوله‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند.

تکثیر اولیه DNA

DNA حاصل از واکنش‌های برش و اتصال آداپتور به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد و ۶ میکرولیتر از آن به‌عنوان DNA الگو در تکثیر اولیه استفاده گردید. غلظت DNA الگو نباید کمتر از ۲۵ نانوگرم باشد. در این واکنش از آغازگرهای با یک باز اضافی استفاده شد (*EcoRI* 5'-GACTGCGTACCAATTC-C3') و (*Tru9I* 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-A3'). اجزای واکنش ۲۵ میکرولیتری تکثیر مقدماتی عبارت بود از: ۰/۸ میلی‌مولار از آغازگرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (*dNTPs*)، یک واحد آنزیم تک دی. ان. ای پلی‌مرز (*Taq DNA Polymerase*) و آب دوبار تقطیر. چرخه‌های حرارتی PCR به صورت زیر بود: مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه در ۷۲ درجه به مدت ۲

محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از جمع مربع فراوانی آلی (p) و جمع مربع فراوانی عدم وجود آل (q) و حذف لوکوس منومورف از طریق رابطه ۲ محاسبه شد. رابطه ۲:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{P_i^2}{n} + \sum_{i=2}^n \frac{q_i^2}{n} \right)$$

همچنین تنوع کل (H_t)، تنوع درون جمعیت‌ها (H_s)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (G_{st})، تخمین جریان ژنی از G_{st} یا G_{cs} (N_m) برای هر یک از مکان‌های آلی توسط نرم‌افزار Popgene محاسبه شد که میانگین هر یک از آنها در زیر آمده است.

شاخص MI نیز با استفاده از رابطه $MI = PIC \times EMR$ محاسبه شد (Powell et al., 1996). در این رابطه EMR نسبت چندگانه مؤثر می‌باشد که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژنوتیپ است و برحسب رابطه $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه می‌شود. در این رابطه n_p تعداد کل جایگاه‌های ژنی چندشکل و β از رابطه $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$ به دست می‌آید. n_p تعداد نوارهای چندشکل و n_{np} تعداد نوارهای یک شکل می‌باشد (Powell et al., 1996).

نتایج

تکثیر و چندشکلی DNA

از ۶ ترکیب آغازگر مورد استفاده در تجزیه AFLP در مجموع ۶۰۸ نوار در فاصله ۵۰۰-۵۰ bp تولید شد (شکل ۱) که از این تعداد ۳۵۶ نوار چندشکلی نشان دادند (۵۸ درصد). تعداد نوارهای تولید شده توسط آغازگرها تا حدودی متفاوت (۱۲۶-۸۰ نوار) اما درصد قطعات

و بعد ۱۰ میکرولیتر از آن در ژل ۶ درصد پلی‌اکریل‌امید و اسرشته قرار داده شد. در نهایت الکتروفورز در شرایط ولتاژ ثابت ۱۵۰۰، زمان ۹۰ دقیقه و جریان ثابت ۴۵ میلی‌آمپر انجام گردید. قبل از عمل الکتروفورز اصلی یک مرحله الکتروفورز مقدماتی نیز با همان شرایط الکتروفورز اصلی انجام شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از نیترات نقره انجام گردید (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از انجام مراحل آزمایشگاهی، برای بررسی مراحل چندشکلی بین نمونه‌ها به حضور یک نوار عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc (Ver 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA محاسبه گردید. تجزیه پلات به صورت سه بعدی صورت گرفت. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم‌افزار TreeView (FreeTree) ترسیم شد. ماتریس فاصله جمعیت‌ها به روش نی (Nei, 1972) و با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx (Ver 6.41) انجام شد. تنوع ژنتیکی برای همه مکان‌های آلی با کمک تجزیه نی محاسبه شد (Nei, 1972). قدرت تفکیک آغازگرها (R_p) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (جدول ۲).

رابطه ۱:

$$R_p = \sum I_b$$

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

به منظور بررسی همبستگی بین فواصل ژنتیکی و جغرافیایی (کیلومتر)، در میان جمعیت‌ها، آزمون مانتل با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx (Ver 6.41) انجام شد.

Rahimmalek و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های بومادران بود اما درصد چندشکلی تولید شده نسبت به دیگر مطالعات کمتر بود. یکی از دلایل پایین بودن درصد چندشکلی بررسی روابط ژنتیکی میان جمعیت‌های یک گونه است، درحالی‌که به طور قطع بررسی روابط ژنتیکی میان گونه‌های یک جنس تفاوت بیشتر و درصد چندشکلی بالاتری را تولید می‌نماید. البته ترکیب آغازگری مورد استفاده و توان آنها در تولید باندهای چندشکلی بی‌تأثیر نیست.

کمترین تعداد نوار تکثیر شده با آغازگر C3 با تعداد ۸۰ نوار و بیشترین تعداد نوار تکثیر شده با آغازگرهای C4 با ۱۲۶ نوار حاصل گردید. بیشترین تعداد نوار چندشکل مربوط به آغازگر C4 با تعداد ۷۲ نوار بود. مقدار قدرت تفکیک برای هر جفت آغازگر در جدول ۲ نشان داده شده است. متوسط قدرت تفکیک آغازگرها ۳۰/۸ محاسبه شد. به ترتیب بیشترین و کمترین قدرت تفکیک مربوط به آغازگرهای C2 و C3 بود.

چندشکل آنها تقریباً مشابه (۶۸-۴۵ درصد) بود. به طور میانگین تعداد ۱۰۱/۱ نوار به ازای هر آغازگر بدست آمد که تعداد ۵۹/۹ نوار از آنها چندشکل بودند. ارزیابی سطوح تنوع ژنتیکی در میان الحاقیه‌های بوزیدان (*Withania somnifera*)، بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های چریش (*Azadirachta indica*)، ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان گونه‌های ریحان و بومادران در ایران و تعیین ارتباط ژنتیکی در میان گونه‌های گل محمدی (*Rosa damascene*) با توجه به محدوده باندی تولید شده و درصد چندشکلی نشان از قدرت بالای این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی است (Gokturk Baydar et al., 2004; Rahimmalek et al., 2009; Moghaddam et al., 2011; Singh et al., 2002; Negi et al., 2006). مطالعه حاضر به طور متوسط تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر جفت آغازگر ۵۹/۱ نوار بود که به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد نوارهای چندشکل تولید شده توسط Russi و همکاران (۲۰۰۹) بررسی روابط تجاری میان گونه‌های سرخارگل با استفاده از نشانگر AFLP

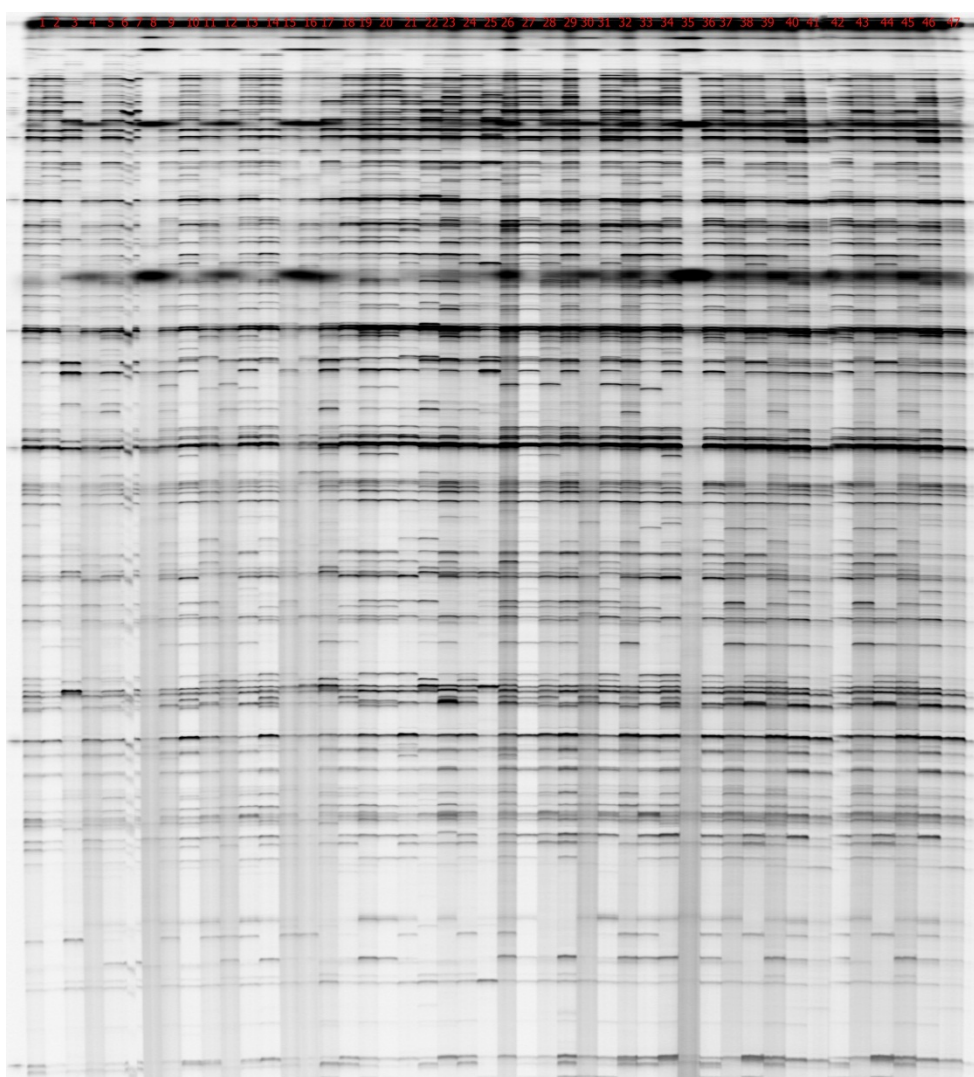
جدول ۲- ترکیب آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش AFLP

شماره	کد	ترکیب آغازگرها	تعداد کل نوارهای تولید شده	تعداد نوارهای چندشکل	درصد چندشکلی	قدرت تفکیک (Rp)	محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)	شاخص آغازگری (MI)
۱	C1	E ACA M CAA	۹۴	۴۹	۵۲/۱	۲۹/۲	۰/۳۰	۷/۶۶
۲	C2	E ACA M CAC	۱۰۰	۶۸	۶۸	۳۸/۷	۰/۳۱	۱۴/۳۳
۳	C3	E AAG M CAC	۸۰	۳۶	۴۵	۱۷/۵	۰/۲۶	۴/۲۱
۴	C4	E AGC M CAT	۱۲۶	۷۲	۵۷/۱	۳۴/۵	۰/۲۶	۱۰/۶۹
۵	C5	E AAG M CAG	۹۹	۶۹	۶۹/۷	۳۲/۳۸	۰/۲۳	۱۱/۰۶
۶	C6	E ACT M CTG	۱۰۸	۶۲	۵۷/۴	۳۲/۸	۰/۲۷	۹/۶۱
		جمع کل	۶۰۸	۳۵۵	-	-	-	-
		میانگین	۱۰۱/۱	۵۹/۱	۵۸	۳۰/۸	۰/۲۷	۹/۵۴

E آغازگر ECoRI و M آغازگر MseI است.

پوشش بالای ژنوم توسط آغازگر نسبت داده می‌شود (Milbourne *et al.*, 1997). محاسبه شاخص آغازگری در گونه‌های مختلف ریحان در بررسی روابط ژنتیکی جمعیت‌های مختلف لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) بالا بودن شاخص آغازگری AFLP را نسبت به RAPD و ISSR نشان می‌دهد (Badfar-Chaleshtori, 2012).

بالا بودن محتوای اطلاعات چندشکل آغازگر C2 و نیز شاخص آغازگری نسبت به سایر ترکیبات نشان از قدرت بالاتر این نشانگر در تفکیک ژنوتیپ‌ها دارد. بالا بودن شاخص آغازگری نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد نوار چندشکل بیشتر است. شاخص آغازگر یک برآورد مناسب برای کارایی آغازگر است که به تعداد باندهای پلی‌مورفیسم بدست آمده و



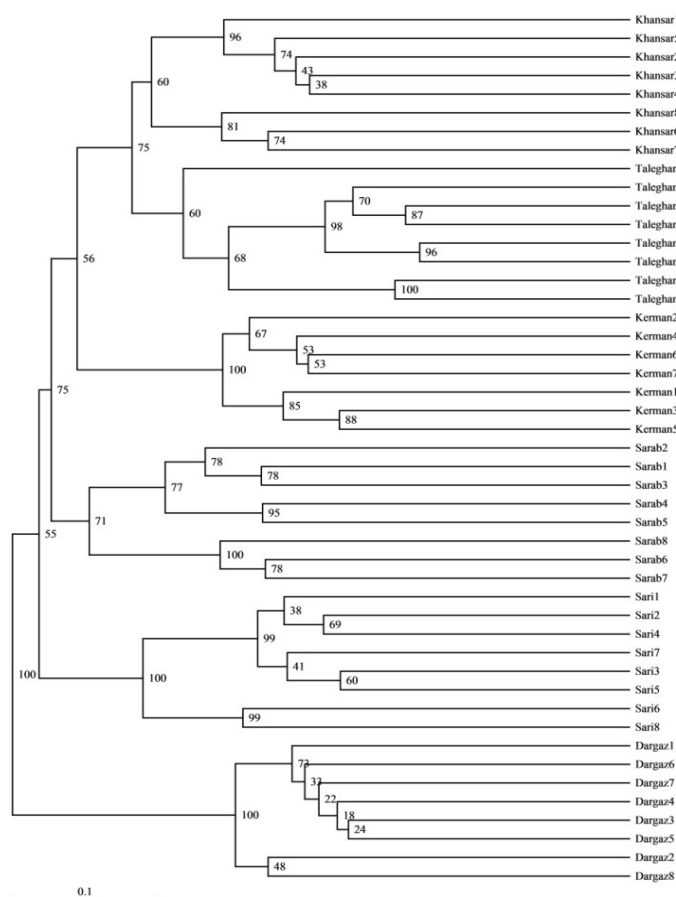
شکل ۱- الگوی نواری حاصل از قطعات تکثیر آغازگر C4 مربوط به ۶ جمعیت گیاه دم‌شیر

(۱-۷) جمعیت کرمان، ۸-۱۵ جمعیت درگز، ۱۶-۲۳ جمعیت طالقان، ۲۴-۳۱ جمعیت خوانسار، ۳۲-۳۹ جمعیت سراب و ۴۰-۴۷ جمعیت ساری).

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه جاکارد به روش UPGMA روابط ژنتیکی میان ۴۷ ژنوتیب مربوط به سه زیر گونه از ۶ جمعیت گیاه دارویی دم شیر را نشان داد. دندروگرام ارتباط نزدیک ژنوتیب‌های هر جمعیت با هم و تفاوت آنها با ژنوتیب‌های دیگر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۲). ضریب کوفتتیکسی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد $F=0/93$ به دست آمد که نمایانگر برازش مناسب دندروگرام به ماتریس تشابه بوده است. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم‌افزار TreeView پایداری بالایی (۱۰۰-۵۵) را در

تفکیک جمعیت‌ها نشان داد. دندروگرام حاصل در فاصله تقریبی ۲۷ جمعیت‌ها را به پنج گروه اصلی تقسیم کرد. تشابه نسبتاً بالای میان ژنوتیب‌های هر جمعیت آن‌ها را به گونه‌ای دقیق و خاص در دسته‌های منظم مربوط به جمعیت مورد نظر قرار داد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه به ترتیب بیشترین و کمترین تشابه را میان نمونه طالقان ۶ و طالقان ۷ با مقدار ۰/۷ و نمونه درگز ۱ و طالقان ۷ با مقدار ۰/۰۶ نشان داد. تمامی تجزیه و تحلیل‌ها نشان از الگوی نواری کاملاً متفاوت زیرگونه *Turkestanicus* واقع در منطقه درگز داشت.



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیب‌های شش جمعیت دم شیر مورد مطالعه براساس ماتریس تشابه به روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد

فاصله ژنتیکی نی (h) در بین شش جمعیت محدوده- ای در حدود ۰/۱۴ تا ۰/۲۰ در جمعیت طالقان تا ۰/۲۰ در جمعیت سراب نشان می‌دهد. ضریب تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها (G_{st} , $G_{st}=(H_t-H_s)/H_t$) به مقدار ۰/۳۷ (۳۷ درصد) و برآورد جریان ژنی ($N_m = 0.5 (1 - G_{st})/G_{st}$)، به طور متوسط تعداد مهاجرت در هر نسل در میان جمعیت-ها برابر ۰/۸۵ (۸۵ درصد) با فرض تعادل هاردی واینبرگ محاسبه شد. تمایز ژنتیکی یک جمعیت گیاهی نشان‌دهنده فعل و انفعالاتی مانند قطعه‌قطعه شدن زیستگاه، رانش ژنتیکی، نظام تولید مثلی و جریان ژن در میان طیف وسیعی از فرایندهای مختلف در طول تاریخچه تکاملی آن گونه گیاهیست (Schaal *et al.*, 1998; Templeton, 2006). سطح نسبتاً پایین تمایز جمعیت‌های دم‌شیر ممکن است ناشی از سیستم تکثیر رویشی و جریان ژنی مکرر ($N_m=0/85$) بین جمعیت‌ها باشد. تنوع ژنتیکی محدود بر این نکته دلالت دارد که احتمالاً ژنوتیپ‌های یک جمعیت، با توجه به وجود تکثیر رویشی در این گیاه و محدودیت گستره رشد جغرافیایی در هر منطقه، دارای منشأ یکسان می‌باشند. همچنین با توجه به تعلق تمامی این جمعیت‌ها به یک گونه سطح تنوع ژنتیکی بالاتری انتظار نمی‌رود. گزارش شده که تنوع ژنتیکی بالا دارای اثرات مثبت بر تداوم طولانی مدت یک گونه و توانایی انطباق آن گونه با تغییرات زیست محیطی دارد (Vrijenhoek, 1985). بر این اساس کاهش تنوع ژنتیکی بر زنده ماندن جمعیت یا کاهش شایستگی افراد جمعیت اثر می‌گذارد (Hattemer, 1991). به طور کلی برداشت بیش از حد از منابع وحشی و در نتیجه کاهش اندازه جمعیت و انقراض محلی گونه بر انطباق با محیط در حال تغییر و پتانسیل تکاملی اثر می‌گذارد. به‌عنوان مثال برداشت تصادفی جینسینگ آمریکایی

آنچه که نتایج ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های یک جمعیت نشان می‌دهد نشان از تفاوت نسبتاً پایین بین ژنوتیپ‌ها با توجه به دگرگشتن بودن این گیاه است.

ساختار ژنتیکی جمعیت

در این ارزیابی شاخص تنوع ژنتیکی نی (Nei's, 1972) و شاخص اطلاعاتی شانون برای هر یک از جمعیت‌ها (جدول ۳) و تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر برای هر آغازگر (جدول ۴) محاسبه شد. براساس ارزیابی انجام شده قدرت هر آغازگر در تولید نوارهای چندشکل برای هر جمعیت مشخص شد. به طور کلی مقادیر بالای ۰/۲۵ نشان‌دهنده تفاوت زیاد بین مناطق یا جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. این مسئله نشان می‌دهد که به دلیل دگرگشتی بین ژنوتیپ‌ها، نزدیکی بیشتری بین گیاهان دم‌شیر یک منطقه با گیاهان بین جمعیت‌ها دیده می‌شود. بر این اساس می‌توان از ژنوتیپ-های مناطق مختلف که دارای صفات مطلوبی هستند و از نظر ژنتیکی دور از هم هستند برای دورگ‌گیری استفاده کرد.

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های

طبیعی گیاه دم‌شیر

جمعیت‌ها	تعداد افراد	h	I	PPB(%)
کرمان	۷	۰/۱۷	۰/۲۵	۴۴/۳۸
درگز	۸	۰/۱۹	۰/۲۸	۴۹/۱۶
طالقان	۸	۰/۱۴	۰/۲۱	۴۲/۹۸
خوانسار	۸	۰/۱۶	۰/۲۴	۴۹/۷۲
سراب	۸	۰/۲۰	۰/۳۰	۶۴/۸۹
ساری	۸	۰/۱۹	۰/۲۹	۵۷/۵۸

h : شاخص تنوع ژنتیکی نی، I : شاخص اطلاعاتی شانون، PPB(%):

درصد نوارهای چندشکل

ها وجود دارد، درحالی که این مقدار در درون جمعیت‌ها ۵۷ درصد می‌باشد. به طور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. در گونه‌های دگرگشن به علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است. در مورد این گونه‌ها در صورتی که جریان ژنی بین رویشگاه‌ها تحت تأثیر عوامل غیر طبیعی مانند تخریب رویشگاه قطع شود، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های منقطع افزایش می‌یابد و به علت افزایش هموزنی و افتراق جمعیت‌ها فرسایش ژنتیکی آغاز خواهد شد (Hamrick & Godt, 1989). ثابت شده است که سیستم پرورش و اصلاح-نژاد، پراکندگی دانه و توزیع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت ارتباط نزدیکی دارد (Hamrick & Godt, 1989). بنابراین پراکندگی بذر گیاه دم‌شیر توسط باد و یا آب می‌تواند نقش مهمی در حفظ جریان ژنی داشته باشد.

نتایج حاصل از بررسی تعداد آلل مؤثر و مشاهده شده حکایت از آن دارد که هر چه مقدار آلل مشاهده شده آغازگر به مقدار ۲ (گیاه دم‌شیر 2n است) نزدیکتر باشد نشان از قدرت بالای آن آغازگر در تولید نوار چندشکل در بین جمعیت‌هاست. که به نحوی می‌توان آن را به تولید تعداد نوارهای اختصاصی برای آن جمعیت ربط داد. به گونه‌ای که تعداد آغازگر بیشتری در جمعیت‌های درگزر و ساری نسبت به سایر جمعیت‌های (بیشترین تعداد آلل) مشاهده شده را دارا بودند.

منجر به کاهش قابل توجهی از تنوع ژنتیکی آن شده است (Cruse-Sanders *et al.*, 2005). علاوه بر این، Buchert و همکاران (۱۹۹۷) کاهش ۷۵ درصد تراکم یک گونه کاج به همراه کاهش ۲۵ درصد تعداد کل آلل‌ها، به خصوص آلل‌های نادر یا آلل‌هایی با فراوانی پایین را گزارش کردند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) نشان می‌دهد که تنوع بین جمعیت‌ها در حدود ۴۳ درصد و تنوع موجود در درون جمعیت‌ها در حدود ۵۷ درصد می‌باشد. شاخص تنوع ژنتیکی نی و تجزیه و تحلیل AMOVA، درصد تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. البته تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌های گیاه دم‌شیر است.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی

(AMOVA) جمعیت‌های دم‌شیر

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۵	۱۳۵۳/۳۰	۲۷۰/۶۶	۲۹/۵۴	۴۳٪
درون جمعیت‌ها	۴۱	۱۶۱۱/۹۲	۳۹/۳۱	۳۹/۳۱	۵۷٪
کل	۴۶	۲۹۶۵/۲۳		۶۸/۸۶	۱۰۰٪

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها نشان می‌دهد که هر چه محل‌های جمع‌آوری دو ژنوتیپ به هم نزدیکتر بوده شباهت‌های ژنتیکی بیشتری با هم داشتند. همان‌گونه که نتایج مربوط به تجزیه واریانس نشان داد ۴۳ درصد تنوع بین جمعیت-

جدول ۵- پارامترهای تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر برای هر آغازگر در جمعیت‌های طبیعی گیاه دم‌شیر

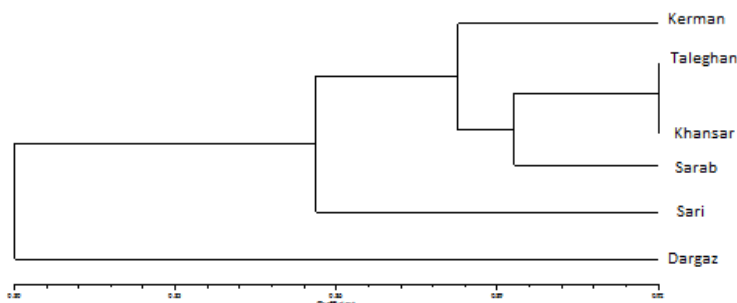
نام آغازگر	na						ne					
	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری
C1	۰/۸۹	۱/۳۶	۰/۸۷	۱/۱۲	۱/۴۳	۱/۲۴	۱/۳۱	۱/۴۹	۱/۱۹	۱/۳۰	۱/۴۰	۱/۳۶
C2	۰/۹۴	۱/۰۰	۱/۰۴	۱/۲۲	۱/۰۷	۱/۰۱	۱/۳۰	۱/۳۰	۱/۳۴	۱/۳۲	۱/۳۱	۱/۲۷
C3	۰/۷۵	۱/۴۷	۰/۹۰	۰/۸۳	۱/۲۲	۰/۸۶	۱/۲۵	۱/۴۴	۱/۲۳	۱/۱۶	۱/۳۰	۱/۳۰
C4	۱/۰۵	۰/۹۱	۰/۸۳	۱/۰۰	۱/۲۳	۱/۱۵	۱/۳۶	۱/۳۰	۱/۱۶	۱/۲۳	۱/۳۶	۱/۳۴
C5	۱/۰۳	۰/۸۱	۰/۸۰	۰/۹۲	۱/۶۰	۱/۲۰	۱/۳۰	۱/۲۷	۱/۲۰	۱/۲۴	۱/۲۸	۱/۳۵
C6	۰/۸۷	۱/۰۱	۱/۰۸	۱/۰۶	۱/۳۰	۱/۵۱	۱/۲۸	۱/۳۳	۱/۲۷	۱/۳۱	۱/۲۸	۱/۳۵

نتایج حاصل از بررسی میزان تشابه ژنتیکی جمعیت‌های دم‌شیر اطلاعات بدست آمده از دندروگرام ژنوتیپ‌ها را تأیید می‌کند. فاصله زیاد جمعیت درگز با دو جمعیت طالقان و کرمان با پایین بودن میزان تشابه این جمعیت‌ها

مطابقت دارد. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین میزان تشابه میان جمعیت‌های طالقان و خوانسار و کمترین تشابه میان درگز و خوانسار است.

جدول ۶- میزان تشابه بین شش جمعیت مورد مطالعه گیاه دم‌شیر

جمعیت	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری
کرمان	۱/۰۰					
درگز	۰/۷۹	۱/۰۰				
طالقان	۰/۸۷	۰/۷۷	۱/۰۰			
خوانسار	۰/۸۹	۰/۷۱	۰/۹۲	۱/۰۰		
سراب	۰/۹۰	۰/۸۴	۰/۸۹	۰/۹۱	۱/۰۰	
ساری	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۸۶	۰/۸۷	۰/۸۹	۰۰/۱



شکل ۳- گروه‌بندی شش جمعیت دم‌شیر مورد مطالعه براساس ماتریس تشابه

بحث

این مطالعه نشان داد که نشانگر AFLP ابزاری سریع، قدرتمند و مؤثر است که می‌تواند مکان‌های ژنی زیادی را هدف قرار داده و در مقایسه با روش‌های دیگر در همان زمان و با صرف هزینه مساوی کارایی بالاتری نشان دهد و در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی براساس داده‌های حاصل از آن برای نمونه‌های متفاوت به دست آورد. یکی از اهداف اصلی حفاظت از طبیعت، حفظ تنوع ژنتیکی است. بسیاری از گیاهان دارویی و اقتصادی مانند سرخدار، *Paris polyphylla* و *Lamiophlomis rotata* با مشکل مشابه استفاده معقول و حفاظت از منابع خود مواجه شده‌اند (Liu et al., 2006; He et al., 2007; Shah et al., 2008). با توجه به تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌ها، راهبرد حفاظت باید شامل هر دو روش در محل و خارج از محل باشد. روش در محل بیشتر به بازگرداندن و تهیه زیستگاه با اندازه جمعیت مناسب می‌پردازد. جدا افتادن رویشگاه درگز از دیگر جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از فاصله جغرافیایی زیاد آنها با یکدیگر باشد که موجب کاهش جریان ژنی این رویشگاه با رویشگاه‌های دیگر می‌شود. همین امر این جمعیت را از نظر تاکسونومی از دیگر جمعیت‌ها جدا می‌کند. تنوع مشاهده شده در این تحقیق می‌تواند ناشی از انحرافات کروموزومی و موتاسیون‌های نقطه‌ای در طول زمان باشد که توانسته جمعیت درگز را از دیگر جمعیت‌ها با یک فاصله ژنتیکی زیاد جدا نماید. بنابراین طبق نتایج بدست آمده، تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها در بیشتر مناطق وجود دارد که حاصل از ذخیره ژنتیکی قوی، شرایط آب و هوایی مختلف و اثر انتخاب می‌باشد. با وجود این از دگرگشتن بودن این گیاه

وجود تنوع بالای بین و درون جمعیت نمی‌توان صرف نظر کرد. بنابراین می‌توان از نمونه‌های مناطق دور از هم به‌عنوان والد جهت تلاقی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد، از جمله تلاقی ژنوتیپ‌های جمعیت درگز با دیگر جمعیت‌ها می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید هیبریدهایی با عملکردهای مورد نظر باشد. نزدیکی دو جمعیت خوانسار با شرایط اقلیمی نسبتاً مشابه و افزایش جریان ژنی موجب نزدیکی این دو رویشگاه از نظر ژنتیکی شده است، هر چند از نظر تاکسونومی به زیر گونه‌های متفاوتی تعلق دارند. جمعیت طالقان متعلق به زیر گونه *Persicus* اندمیک و انحصاری ایران می‌باشد، در حالی که جمعیت خوانسار متعلق به زیر گونه *Cardiaca* است. خوپذیری این جمعیت و سازگاری ژن‌ها با شرایط اقلیمی منطقه خوانسار و احتمالاً تبادل مواد رویشی موجب شباهت بسیار آن با رویشگاه طالقان شده است. در خصوص جمعیت‌هایی که تنوع کمتری نشان می‌دهند و از فراوانی بیشتری برخوردار هستند حفاظت برون‌جا توصیه می‌شود. برای حفاظت برون‌جا نیاز به طراحی دقیق و ایجاد یک بانک ژرم‌پلاسما برای این گونه‌هاست. جمع‌آوری بذر و انتقال دانه‌ها از جمعیت‌های مختلف به رویشگاه مناسب و افزایش مصنوعی جریان ژنی بین جمعیت‌ها از پارامترهای حفاظت برون‌جا برای این جمعیت‌هاست. استفاده از جمعیت کرمان به‌عنوان یک والد و تلاقی آن با جمعیت‌های طالقان و ساری به دلیل فاصله ژنتیکی بیشتر با دیگر جمعیت‌ها می‌تواند گزینه مناسب دیگر برای انجام کارهای اصلاحی باشد.

- detected by ISSR markers. *Planta Medica*, 73: 1316-1321. (SCI)
- Janicsak, G., Veres, K., Kakasy, A & Mathe, I., 2006. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the *Lamiaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34: 392-396.
- Liu, J.M., Wang, L., Geng, Y.P., Wang, Q.B., Luo, L.J. and Zhong, Y., 2006. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (*Lamiaceae*), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau. *Genetica*, 128: 385-394.
- Maguire, T. L., Peakall, R. and Saenger, P., 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) vierh. (*Avicenniaceae*) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 388-398.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R., 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.
- Moghaddam, M., Omidbiagi, R. and Naghavi, M.R., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian accessions of *Ocimum* spp. using AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 619-626.
- Mozafarian, V., 1996. lexicon of Iranian Plant Names. Publishing Contemporary Vocabulary, 740pp. (In Persian).
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 282-283.
- Negi, M.S., Sabharwal, V., Wilson, N. and Lakshmikumaran, M.S., 2006. Comparative analysis of the efficiency of SAMPL and AFLP in assessing genetic relationships among *Withania somnifera* genotypes. *Current Science*, 25: 464-472.
- Odonougue, L. S., Souza, E., Tanksley, S. D. and Sorrell, M. E., 1994. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. *Crop Science*, 34: 1251-1258.
- Omidbeigi, R., 2010. Production and Processing of Medicinal Plants. Publication of Astan Quds Razavi, 423pp. (In Persian).
- Pirttila, A.M., Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Jaakola, L. and Hohtola, A., 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 273a-273f.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 3: 225-238.
- Popescu, M.L., Dinu, M. and Toth, O., 2009. Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study on *Leonurus cardiac* (*Lamiaceae*). *Farmacial*, 57: 4.
- منابع مورد استفاده**
- Abdemishani, S. and Shahnejatbooshehri, A., 1998. *Plant Breeding*. Vol:1-2, Tehran University Publishing, 320pp. (In Persian).
- Ali, S.I. and Nasir, Y.J., 1990. *Flora of Pakestan*, 192:152-154.
- Asen, A., 2009. Plants of possible monastic origin, growing in the past or present, at medieval monastery grounds in Norway. *Agder Natural History Museum and Botanical Garden*, 320pp.
- Badfar-Chaleshtori, S., Shiran, B., Kohgard, M., Mommenia, H., Hafizi, A., Khodambashi, M., Mirakhorli, N. and Sorkheh, K., 2012. Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42: 35-48.
- Bosland, P.W. and Votava, E.J., 2000. *Peppers: Vegetable and spice capsicums*. CABI Publishing, 294pp.
- Buchert, G.P., Rajora, O.P., Hood, J.V. and Dancik, B.P., 1997. Effects of harvesting on genetic diversity in old growth stands of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) in Ontario. Ontario Forest Research Institute, Ministry of Natural Resources, Sault Ste. Marie, Ontario, 43pp.
- Cruse-Sanders, J.M., Hamrick, J.L. and Ahumada, J.A., 2005. Consequences of harvesting for genetic diversity in American ginseng (*Panax quinquefolius* L.): a simulation study. *Biodiversity and Conservation*, 14: 493-504.
- Gokturk Baydar, N., Baydar, H. and Debener, T., 2004. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *Journal of Biotechnology*, 111: 263-267.
- Hamrick, J.L. and Godt, N.J., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD., Clegg MT., Kahler AL. and Weir BS (Ed.s). *Plant Population Genetics; Breeding and Genetic Resources*. Sinaurec Associates, Sunderland, MA, 43-63.
- Hatterer, H.H., 1991. Measuring genetic variation. In: Muller-Starck, G., Ziehe, M. (Eds.), *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. Sauerlander's Verlag, Frankfurt, MA, 2-19.
- Hedrick, P.W., 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 629-636.
- He, J., Wang, H., Li, D.Z. and Chen, S.F., 2007. Genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, A traditional Chinese medicinal herb,

- collection of *Isatis tinctoria* L. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 573–584.
- Templeton, A.R., 2006. Population Genetics and Microevolutionary Theory. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA. 705pp.
- Trumbeckaite, S., 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. Biomedicine & Pharmacotherapy, 60: 245–248.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J. and Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407–4414.
- Vrijenhoek, R.C., 1985. Animal population genetics and disturbance: The effects of local extinctions and recolonizations on heterozygosity and fitness. In: Pickett, S.T.A., White, P.S. (Eds.), The Ecology of Natural Disturbance and Path Dynamics. Academic Press, London, MA, 265–285.
- Wang, W., Chen, L., Yang, P., Hou, L., He, C., Gu, Z. and Liu, Z., 2007. Assessing genetic diversity of populations of topmouth culter (*Culter alburnus*) in China using AFLP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 662–669.
- Yu, Q., Shen X., Shen, Y., Chen, J., Shi, C. and Wang, Z., 2009. AFLP Analysis of genetic diversity of *Leonurus japonicus* germplasm resources. Zhongcaoyao, 40: 1296–1299.
- Zargari, A., 1990. Medicinal plant. Publication of Tehran University, 923pp. (In Persian).
- Rahimmalek, M., Ebrahim, B., Arzani, A. and Etemadi, N., 2009. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Biochemical Systematics and Ecology, 37: 354–361.
- Russi, L., Moretti, C., Raggi, L., Albertini, E. and Falistocco, E., 2009. Identifying commercially relevant *Echinacea* species by AFLP molecular markers. NRC Research Press, 52: 912–918.
- Rubatzky, V. E. and Yamaguchi, M., 1997. World Vegetables: Principles, Production, and Nutritive Values. (2nd ed). Chapman and Hall, NY. 704pp.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T. and Smith, W.A., 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology, 7: 465.
- Shah, A., Li, D.Z., Gao, L.M., Li, H.T. and Moller, M., 2008. Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (*Taxaceae*) from Pakistan and implications for its conservation. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 183–193.
- Singh, A., Chaudhury, A., Srivastava, P.S. and Lakshmikumaran, M., 2002. Comparison of AFLP and SAMPL markers for assessment of intra-population genetic variation in *Azadirachta indica*. Asian Journal of Plant Science, 162: 17–25.
- Spataro, G., Taviani, P. and Negri, V., 2007. Genetic variation and population structure in a Eurasian

Evaluation of genetic variability of several populations of medicinal plant *Leonurus cardiaca* in Iran using fragment length polymorphism (AFLP)

A. Soorni^{1*}, V. Nazeri² and M. R. Fattahi³

1*-Corresponding author, PhD. Student, Department of Horticulture Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran. Email:soorni64@ut.ac.ir

2-Assoc. Prof., Department of Horticulture Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran

3-Assoc. Prof., Department of Horticulture Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran

Received:05.31.2013

Accepted: 11.20.2013

Abstract

Leonurus cardiaca is a medicinal plant of the family Lamiaceae, due to the effects of blood dilution, the species is used for centuries. The species has a high diversity and widely distributed in Iran, so that from 4 sub species in the world, 3 sub-species are grown in Iran. In this study AFLP markers were used to investigate genetic diversity among 47 samples of 6 motherwort populations and the kinship ties between them. The results showed that 6 selected AFLP primer combinations (*MseI* / *EcoRI*) amplified 608 scorable DNA bands, of which 355 were polymorphic (polymorphic 58%). The average genetic similarity of samples was estimated based on the Nei coefficient, 0.26 (0.21-0.30). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic variation was mainly within populations (57%), but variance among the populations was only 43%. A UPGMA dendrogram based on genetic distance also revealed five major branches in accordance to geographical regions. Maximum and minimum values of genetic similarity of the populations were recorded between "Taleghan 6" and "Taleghan 7" (0.7) and "Dargaz 1" and "Taleghan 7" (0.06) respectively. Data showed a completely different banding pattern of subspecies *L. Cardiaca* subsp *Turkestanicus*. of Dargaz region. Coefficient of genetic differentiation among the populations (G_{st}) and gene flow (N_m), average number of emigration exchanged per generation estimated among the populations, were estimated 0.37 and 0.85, respectively.

Keywords: Genetic relatedness, AFLP, Polymorphism, Gene flow.