

ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه دارویی نائین هاوندی بر اساس نشانگرهای پروتئینی و SRAP

داریوش طالعی^۱، مجتبی خیام نکویی^{۲*}، سعید کدخدایی^۳

۱-دانشیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲-دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳-استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۴۱۵-۱۱۱، تهران، ایران

khayam@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۴

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۱۰ توده مختلف گیاه نائین هاوندی با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و SRAP بررسی شد. در مرحله روی‌شنی گیاه از برگ‌ها، پروتئین و DNA استخراج شد. نتایج پروفایل پروتئینی در مجموع ۲۰ نوار با ۶۴/۱۵ درصد چندشکلی نشان داد. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح DNA، ترکیب آغازگری SRAP استفاده شد که در مجموع ۵۸۳ نوار قابل امتیازدهی مشاهده شد. تعداد ۵۴۹ نوار آن دارای چندشکلی با میانگین ۹۱/۵ برای ترکیبات آغازگری مورد بررسی بود. بیشترین چندشکلی (۹۹/۱۲ درصد) در ترکیب آغازگری E1/M1 و کمترین چندشکلی (۸۴/۲۱ درصد) در ترکیب E2/M2 مشاهده شد. آنالیز خوشه‌ای، توده‌ها را در ۴ گروه اصلی طبقه‌بندی کرد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای تمام مکان‌های ژنی، از جمله میانگین تنوع ژنتیکی نی (h) با مقدار ۰/۲۷ و میانگین شاخص شانون (I) با مقدار ۰/۴۱ محاسبه شد. سطح بالایی از تمایز جمعیت (Gst=۰/۷۹) و سطح مناسبی از جریان ژنی (Nm=۱/۳) بین جمعیت‌های گروه‌بندی شده برآورد شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که واریانس درون جمعیتی (۵۸ درصد) بیشتر از واریانس میان جمعیت‌ها (۴۲ درصد) است. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی بالایی هم در الگوی الکتروفورگرام پروتئین و هم در نوارهای چندشکل تفکیک شده با استفاده از نشانگرهای SRAP با تاکید بر کارایی بیشتر نشانگرهای SRAP نسبت به نشانگر پروتئین نشان داد که می‌تواند در انتخاب والدین با فاصله ژنتیکی زیاد جهت تولید جمعیت‌های در حال تفرق و نقشه‌یابی در برنامه‌های دو رگ‌گیری و به‌نژادی یا بهبود صفات مطلوب و همچنین، برای محافظت و مدیریت ژرم‌پلاسما این گیاه استفاده شود.

کلید واژگان: *Andrographis paniculata*، پروتئین، تنوع ژنتیکی، SRAP

۱- مقدمه

اثرات جانبی داروهای شیمیایی و بروز مشکلات ناشی از آنها و الزامات زیست محیطی سبب شده که روند استفاده از گیاهان دارویی بویژه در صنایع داروسازی به دلیل افزایش تقاضای مراکز طب سنتی و صنعت داروسازی در جهان افزایش یافته و تحقیقات گسترده در جهت توسعه کشاورزی پایدار با بهره‌گیری از گیاهان دارویی را ضروری می‌سازد [۱]. بنابراین، انجام مطالعات از جنبه‌های مختلف زیست‌شناختی از قبیل، بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص‌های رشد، ویژگی‌های فیزیولوژیک، کمیت و کیفیت تولید متابولیت‌های ثانویه و اسانس و همچنین نشانگرهای پروتئینی و مولکولی برای شناسایی گونه‌های برتر و به‌نژادی گیاه ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا تولید ارقام اصلاح شده با عملکرد و مواد موثره بالا و یا گزینش اکوتیپ‌های مناسب برای تولید انبوه حائز اهمیت است. کشور ایران از لحاظ جغرافیایی، اقلیمی و آب و هوایی موقعیتی ممتاز و با رتبه بالا از نظر غنای گیاهی و تنوع زیستی و دارای ۱۱ اقلیم از ۱۳ اقلیم شناخته شده جهانی است و رویشگاه بسیاری از گونه‌های گیاهی و از جمله گیاهان دارویی است [۲]. به واسطه تنوع اقلیم در ایران کمتر گیاه دارویی در جهان وجود دارد که تقریباً همان گونه و یا گونه‌های مشابه آن در ایران وجود نداشته باشد. *آندروگرافولاید* *پانیکولاتا* گیاهی از خانواده *Acanthaceae* است. این گیاه با نام فارسی نائین هاوندی در ایران و با نام انگلیسی *King of bitters* (سلطان تلخی‌ها) در جهان شهرت دارد [۳]. نائین هاوندی گیاهی علفی، پایا، دارای برگ‌های متقابل، بدون کرک، صاف و با گل‌های سفید می‌باشد. این گیاه سرشار از ترکیبات فعال با خواص دارویی است. عصاره این گیاه حاوی سه ترکیب عمده یعنی دی‌ترپنوئیدها^۱، فلاونوئیدها^۲ و

و استیگما استرول‌ها^۴ با ترکیبات فعال شناخته شده به نام‌های آندروگرافولاید، نئوآندروگرافولاید و داکسی آندروگرافولاید^۵ می‌باشد. به‌طور کلی تحقیقات نشان داده است که اندام‌های هوایی گیاه دارویی نائین هاوندی به‌ویژه برگ آن، با دامنه وسیعی از خواص دارویی از جمله ضد HIV، ضد H1N1، ضد سرطان، ضد هپاتیت، ضد اسهال استفاده می‌شود [۴ و ۵].

تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بقاء موجودات از جمله گیاهان در برابر تغییرات زیست محیطی و برای سازگاری با این تغییرات می‌باشد [۶]. مطالعه روی تنوع زیستی، به کشف تنوع و ساختار ژنتیکی یک جمعیت خاص کمک می‌کند و این مطالعات اساس مولکولی را برای درک ویژگی‌های زیست‌شناختی، فیولوژی و پتانسیل سازگاری فراهم می‌کند [۷]. با اطلاع از فاصله ژنتیکی توده‌های بومی یک گیاه، می‌توان ژرم پلاسِم مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی فراهم کرد. بانک‌های ژن با جمع‌آوری، شناسایی و ارزیابی دقیق و حفاظت از ذخایر توارثی و توده‌های گیاهی، اطلاعات مورد نیاز محققان را تامین می‌کنند. در روش‌های متداول، اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب از بین جوامع دارای تنوع ژنتیکی می‌باشد، بنابراین، آگاهی از تنوع ژنتیکی پیش شرط اصلی و اولین گام در اصلاح گیاهان می‌باشد [۶].

برای تعیین تنوع ژنتیکی بین توده‌های گیاهی از نشانگرهای مبتنی بر DNA در کنار نشانگرهای مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک استفاده می‌شود. در میان نشانگرهای مبتنی بر DNA نشانگر SRAP (-Sequence-related amplified polymorphism) که نخستین بار توسط لی و کوپروس توسعه یافت [۸]، به دلیل سادگی، قابلیت اطمینان، اثربخشی، هزینه کم، تطبیق پذیری و

5 Andrographolide

6 Neoandrographolide

7 14-Deoxy-11, 12-didehydroandrographolide

1 *Andrographis paniculata* L.

2 Diterpenes

3 Flavonoids

4 Stigmasterols

جمعیت هایی از گیاه نائین هاوندی با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و مولکولی به منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش و ژنوتیپ های برتر برای برنامه های اصلاحی می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ نمونه های گیاهی

در مجموع تعداد ۱۰ توده مختلف گیاه نائین هاوندی از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهیه شد (جدول ۱). این توده ها به صورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در گلدان های حاوی پومیس و خاک به نسبت ۲:۱ در گلخانه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد در تابستان سال ۱۳۹۹ کشت شدند.

۲-۲ نشانگرهای پروتئینی

۲-۲-۱ استخراج پروتئین و سنجش کمی و کیفی آنها

جهت ارزیابی تنوع پروتئین ها، مقدار ۱ گرم برگ از هر توده انتخاب و با ازت مایع به خوبی پودر شدند. سپس، ۲/۵ میلی لیتر از بافر استخراج HEPES به هر نمونه اضافه شد.

پوشش زیاد در سطح ژنوم، نسبت به نشانگرهای غالب مانند RAPD، ISSR و AFLP برتری دارد و در دهه گذشته به طور گسترده و با موفقیت در تعداد بسیار زیادی از مطالعات شناسایی منابع ژنتیکی گیاهی و توده های طبیعی مورد استفاده قرار گرفته اند [۱۰ و ۹]. تکنیک SRAP، در اصل بر مبنای تکثیر اختصاصی نواحی کدکننده ژنوم با استفاده از آغازگرهایی است که اگزون های غنی از GC (پرایمرهای فوروارد) و پروموتورها، اینترون ها و اسپیسرهای غنی از AT (پرایمرهای ریورس) را هدف قرار می دهند [۸ و ۱۱]. این نشانگر مولکولی قابلیت تشخیص میزان زیادی از چندشکلی را در بین گونه ها دارد. گزارش ها نشان می دهد که نشانگر SRAP به دلیل تکثیر توالی های کدکننده که با بروز صفات مورفولوژیکی در ارتباط مستقیم هستند، بیشترین هماهنگی را با تغییرات مورفولوژیکی نسبت به سایر نشانگرها دارد [۱۲]. از این مزیت می توان به طور موثری برای شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش (informative) از طریق تلفیق نشانگرهای مورفولوژی/بیوشیمیایی و مولکولی برای استفاده در مطالعات به نژادی بهره برد.

با توجه به اهمیت دارویی گیاه نائین هاوندی، هدف اصلی در این پژوهش ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی درون و بین

جدول ۱ محل جمع آوری بذر توده های گیاه نائین هاوندی

| Accession No. | Region | State | Latitude | Longitude | Altitude (m) |
|---------------|----------------|-------------|-----------|-------------|--------------|
| 179 | Kuala Langat | Selangor | 2.8038°N | 101.4951° E | 6 |
| 216 | Broga | N. Sembilan | 2.5683°N | 101.5423° E | 71 |
| 228 | Felda Sendayan | N. Sembilan | 2.6813° N | 101.8466° E | 54 |
| 249 | Tanjung Ipoh | N. Sembilan | 2.7408° N | 102.1836° E | 104 |
| 264 | Kuala Kurau | Perak | 5.0164° N | 100.4318° E | 4 |
| 265 | Kuala Kurau | Perak | 5.0235° N | 100.4355° E | 5 |
| 266 | Kuala Kurau | Perak | 5.0164° N | 100.4318° E | 6 |
| 314 | Mentakab | Pahang | 3.4846° N | 102.3503° E | 39 |
| 329 | Tumpat | Kelantan | 6.1991° N | 102.1694° E | 5 |
| 348 | Besut | Terengganu | 5.8290° N | 102.5524° E | 9 |

شد [۱۵]. پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. میزان جذب DNA محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰-۲۸۰ به دست آمد. با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد کیفیت نوار DNA هر نمونه مشخص شد. از روی تصویر ژل، وجود DNA، غلظت و کیفیت آن ارزیابی شد. به این ترتیب که غلظت DNA هر نمونه از طریق مقایسه‌ی شدت درخشندگی نوارهای حاصل با شدت درخشندگی نوارهای DNA استاندارد تخمین زده شد.

۲-۳-۲ آغازگرهای مورد استفاده

در این پژوهش مجموعاً ۶ ترکیب آغازگر SRAP (۲) فرورارد و ۴ ریورس) از طریق غربالگری اولیه ترکیبات آغازگر مختلف بر مبنای تکثیر نوارهای چندشکل واضح و تکرارپذیر بر روی تعدادی از نمونه‌های DNA انتخاب و نهایتاً بر روی کل توده‌ها استفاده شد (جدول ۲).

نمونه‌ها برای ۵ دقیقه ورتکس شدند و ۲-۳ مرتبه در ۲۰ هزار دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند [۱۳]. بررسی کمی پروتئین‌های محلول با استفاده از روش برادفورد انجام شد [۱۴] و برای بررسی کیفی پروتئین‌ها از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین استخراج شده در ۴ میکرولیتر بافر نمونه حل شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها درون چاهک‌های ژل جداسازی پلی‌اکریل‌امید بارگذاری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ برای ۹۰ دقیقه با استفاده از سیستم الکتروفورز Bio-Rad به انجام رسید.

۳-۲ نشانگرهای SRAP

۲-۳-۱ استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

برای استخراج DNA ژنومی، در اوایل مرحله رشد رویشی ۱ گرم برگ تازه از هر نمونه به‌طور جداگانه برداشت شد و روش CTAB تغییر یافته برای استخراج DNA استفاده

جدول ۲ اسامی و توالی آغازگرهای SRAP مورد استفاده

| شماره | ترکیب آغازگر | توالی آغازگر | | دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) |
|-------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | E* | M* | |
| ۱ | Em1Me1 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3' | 5'- GAC TGC GAC GAA TT ATT-3' | ۵۰ |
| ۲ | Em1Me2 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3' | 5'- TGA GTC CAA ACC GG AGC-3' | ۵۰ |
| ۳ | Em1Me4 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3' | 5'- TGA GTC CAA ACC GG TTG-3' | ۵۰ |
| ۴ | Em2Me2 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3' | 5'- TGA GTC CAA ACC GG AGC-3' | ۵۰ |
| ۵ | Em2Me3 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3' | 5'- TGA GTC CAA ACC GG AAT-3' | ۵۰ |
| ۶ | Em2Me4 | 5'- GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3' | 5'- TGA GTC CAA ACC GG TTG-3' | ۵۰ |

واکنش‌های تکثیری SRAP-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۴ میلی‌مولار از هر کدام از

۲-۳-۳ واکنش‌های SRAP-PCR

شاخص نشانگر ۱۲ (MI)، شاخص تنوع ژنتیکی نی ۱۳ (H) و قدرت تفکیک ۱۴ (RP) برآورد شد.

جهت نمایش درجه چندشکلی برای نشانگرهای غالب، شاخص PIC با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۰]:

$$PIC = 2 fi \times (1 - fi) \quad (1)$$

که در این فرمول fi فراوانی قطعه نشانگر نام در هنگام وجود و $(1 - fi)$ فراوانی قطعه نشانگر نام در حالت عدم وجود نوار می‌باشد [۱۶].

شاخص MI که برای انعکاس اطلاعات چندشکلی هر جفت آغازگر در نظر گرفته می‌شود به صورت زیر محاسبه شد [۱۷]:

$$MI = PIC \times NPB \quad (2)$$

آگاهی بخشی نوارهای حاصل ۱۵ (Ib) با استفاده از فرمول زیر اندازه‌گیری شد [۱۸]:

$$Ib = 1 - (2 \times |0.5 - pi|) \quad (3)$$

که در آن pi فراوانی نوار تکثیر شده در جمعیت مورد بررسی است.

شاخص RP به صورت زیر محاسبه شد:

$$RP = \sum Ib \quad (4)$$

قدرت تمایز (DP) که بیانگر احتمال ایجاد تمایز بین دو فرد با گزینش تصادفی در جمعیت مورد بررسی و با استفاده از الگوهای نواربندی متفاوت می‌باشد از طریق iMEC محاسبه شد [۱۹]. برای محاسبه تعداد آل (Na)، تعداد موثر آل ها (Ne)، شاخص اطلاعات شانون (I)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار نا اریب (uHe) و مقادیر PhiPT (Fst) در میان

آغازگرها، ۱/۵ واحد آنزیم پلیمرز Taq، بافر PCR با غلظت ۱X، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله وا سرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل وا سرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه و در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر با زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، و زمان و دمای توسعه رشته به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تفکیک قطعات تکثیر شده در واکنش‌های SRAP-PCR از طریق الکتروفورز محتویات هر تیوب به میزان ۵ میکرولیتر همراه با ژل رد (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain - Biotium) در ژل آگارز ۱/۸ درصد حاوی بافر TAEIX انجام شد. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از سایز مارکر با اندازه ۱۰۰ DNA bp (071100050). ساخت شرکت Solis Biodyne که دارای قطعات ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت باز بود استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۱۸۰ دقیقه با جریان ۷۵ ولت انجام شد و قطعات DNA تحت نور UV توسط دستگاه Gel Documentation مشاهده شدند و عکس‌برداری از ژل انجام شد.

۲-۴ آنالیز داده‌های مولکولی

برای ایجاد ماتریس باینری داده‌ها، تنها باندهای با شدت و وضوح مناسب و بدون ابهام که دارای اندازه بیش از ۱۰۰ جفت باز بودند به صورت وجود (۱) یا عدم وجود (۰) امتیازدهی شدند. تعداد باندهای چندشکل ۸ (NPB) محاسبه و توانایی ایجاد تمایز هر کدام از نشانگرهای SRAP با محاسبه درصد باندهای چندشکلی ۹ (PPB)، محتوای اطلاعات چندشکلی ۱۰ (PIC)، قدرت تمایز ۱۱ (DP)،

12 marker index
13 Nei's genetic diversity
14 resolving power
15 band informativeness

8 number of polymorphic bands
9 percentage of polymorphic bands
10 polymorphic information content
11 discriminating power

۳- نتایج و بحث

۱-۳ بررسی کمی پروتئین‌ها

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین توده‌های مورد آزمایش براساس محتوای پروتئین کل در سطح احتمال یک درصد وجود دارد که نشان دهنده وجود تنوع بین توده‌های مورد مطالعه از نظر مقدار کمی پروتئین است (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین میزان پروتئین کل بین توده‌های مختلف گیاه *آندروگرافیس پانیکولاتا* نشان داد که بین توده‌های مختلف بر اساس میزان پروتئین کل اختلاف معنی‌داری وجود دارد. کمترین میزان پروتئین کل (۰/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاهی) در توده شماره ۲۶۴ و بیشترین میزان پروتئین کل (۰/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاهی) در توده شماره ۲۱۶ مشاهده شد.

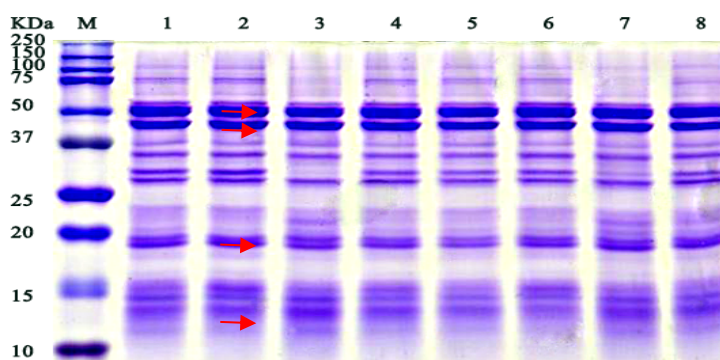
گروه‌های جغرافیایی از برنامه GenAlex 6.51 استفاده شد [۲۰].

برای انجام گروه‌بندی در سطح ژرم پلاسما، ضریب فاصله P Distance به روش Neighbor Net با ۱۰۰۰ تکرار به دست آمد و صحت گروه‌بندی از طریق آنالیز Bootstrap بررسی شد. همچنین، آنالیز PCoA (principal coordinates analysis) به عنوان مکمل روش تجزیه خوشه‌ای برای توصیف بهتر روابط ژنتیکی میان توده‌های مورد بررسی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های پروتئینی و مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه تابع تشخیص و تجزیه به عامل‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و JMP انجام شد.

جدول ۳ تعداد نوارهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE

| تعداد نوارهای پروتئینی | کد توده | تعداد نوارهای پروتئینی | کد توده | تعداد نوارهای پروتئینی | کد توده | تعداد نوارهای پروتئینی | کد توده |
|------------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|---------|
| ۱۴ | ۳۴۸ | ۱۶ | ۲۶۶ | ۱۷ | ۲۱۶ | ۱۷ | ۱۷۹ |
| ۱۷ | ۳۲۹ | ۱۸ | ۲۶۵ | ۱۷ | ۲۱۶ | ۱۸ | ۲۲۸ |



شکل ۱ پروفایل پروتئینی حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE؛ M: مارکر، ۱: ۱۷۹، ۲: ۲۱۶، ۳: ۳۴۸، ۴: ۲۶۵، ۵: ۲۶۴، ۶: ۲۲۸، ۷: ۳۲۹ و ۸: ۲۶۵ اعداد سمت چپ وزن مولکولی (kDa).

۲-۳ بررسی کیفی پروتئین‌ها

از پروفایل پروتئین‌های محلول در برگ ۱۰ توده آندروگرافیس پانیکولاتا مورد مطالعه به روش SDS-PAGE در مجموع ۱۸ نوار قرائت شد. بیشترین تعداد نوار پروتئینی در توده‌های ۲۲۸ و ۲۶۵ (۱۸ نوار) و کمترین آن در توده ۳۴۸ (۱۴ نوار) مشاهده شد (شکل ۱). در پروفایل پروتئینی، دامنه وزن مولکولی نوارها بین ۱۵ تا ۱۵۰ کیلودالتون متغیر بود و نوارها تنوع متمایزتری در سه ناحیه ۱۵ کیلودالتون، ۲۰ تا ۳۷ کیلودالتون و ۵۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون نشان دادند.

۳-۳ بررسی معیارهای تنوع ژنتیکی

نتایج نشان داد که از مجموع ۱۸ نوار پروتئینی، ۱۱ نوار (۴۸/۱ درصد) چند شکل با محتوای اطلاعاتی چندشکلی ۰/۱۴ نشان داد و میزان تنوع ژنی آن ۰/۱۸۴ به دست آمد. ضریب تشابه جاکارد برای تمام حالت‌های ممکن بین ۱۰ توده مورد مطالعه محاسبه شد (جدول ۴). بیشترین شباهت ژنتیکی بین توده ۱۷۹، ۲۲۸ و ۲۴۹ (۰/۹۵) و کمترین تشابه بین ۲۶۴، ۲۱۶ و ۲۶۶ (۰/۶۷) مشاهده شد. بر این اساس، تشابه ژنتیکی بین توده‌ها مستقل از مکان‌های جمع‌آوری آنها بود، زیرا برخی توده‌ها که از نظر

جغرافیایی نزدیک هستند، الگوی نوارهای پروتئینی آنها متفاوت بود. در مقابل برخی توده‌ها که فاصله جغرافیایی نسبتاً دوری دارند شباهت‌های فراوانی با یکدیگر نشان دادند. در برخی مطالعات مشابه دیگر که بر روی تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای در گونه‌های گیاهی انجام شده است، نتایج مشابهی گزارش شده است [۲۱]. بر طبق مطالعات حسن و همکاران چندشکلی مشاهده شده بر اساس ایزوزایم و پروتئین بذر ریحان در مطالعات تنوع ژنتیکی، روابط تاکسونومی در سطح گونه و زیرگونه قابل اعتماد می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر، تنوع قابل قبولی در الگوی پروتئین‌های محلول در برگ آندروگرافیس پانیکولاتا نشان داد. این تنوع ممکن است به عواملی از جمله شرایط جغرافیایی، فصل کشت، ارتفاع، میزان بارندگی و دمای سالیانه وابسته باشد [۲۲]. تنوع پروتئین‌ها ماهیت تصادفی ندارد و به بیان ژنوم وابسته است. وجود این تنوع فرصت مناسبی را برای تعیین چندشکلی ژن‌های مهم در راستای اهداف اصلاحی فراهم می‌کند. بهبود ژنتیکی گیاهان به وسیله گزینش صفات مطلوب به‌ویژه صفاتی که اساس ژنتیکی آنها به دلیل زیستگاه‌های متفاوت می‌باشد، در این حوزه، اهمیت پیدا می‌کند [۲۳].

جدول ۴ ماتریس تشابه جاکارد بین توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا بر اساس نتایج آنالیز پروتئین‌ها

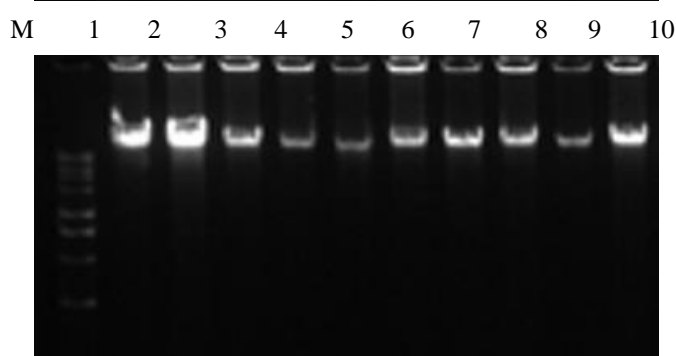
| کد توده | ۱۷۹ | ۲۱۶ | ۲۲۸ | ۲۴۹ | ۲۶۴ | ۲۶۵ | ۲۶۶ | ۳۱۴ | ۳۲۹ | ۳۴۸ |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ۱۷۹ | ۱/۰۰ | | | | | | | | | |
| ۲۱۶ | ۰/۸۱ | ۱/۰۰ | | | | | | | | |
| ۲۲۸ | ۰/۹۰ | ۰/۹۰ | ۱/۰۰ | | | | | | | |
| ۲۴۹ | ۰/۹۵ | ۰/۸۶ | ۰/۹۵ | ۱/۰۰ | | | | | | |
| ۲۶۴ | ۰/۸۴ | ۰/۶۷ | ۰/۷۵ | ۰/۸۰ | ۱/۰۰ | | | | | |
| ۲۶۵ | ۰/۸۹ | ۰/۷۱ | ۰/۸۰ | ۰/۸۵ | ۰/۹۴ | ۱/۰۰ | | | | |
| ۲۶۶ | ۰/۸۱ | ۰/۹۰ | ۰/۸۱ | ۰/۸۶ | ۰/۶۷ | ۰/۷۱ | ۱/۰۰ | | | |
| ۳۱۴ | ۰/۸۹ | ۰/۸۰ | ۰/۸۹ | ۰/۸۵ | ۰/۸۳ | ۰/۷۹ | ۰/۷۱ | ۱/۰۰ | | |
| ۳۲۹ | ۰/۸۰ | ۰/۸۰ | ۰/۸۹ | ۰/۸۵ | ۰/۷۴ | ۰/۷۹ | ۰/۷۱ | ۰/۷۹ | ۱/۰۰ | |
| ۳۴۸ | ۰/۸۰ | ۰/۸۰ | ۰/۸۰ | ۰/۸۵ | ۰/۷۴ | ۰/۷۹ | ۰/۸۰ | ۰/۷۰ | ۰/۸۹ | ۱/۰۰ |

۳-۴ کیفیت سنجی استخراج DNA ژنومی

جهت تعیین کیفیت استخراج DNA ژنومی، نداشتن آلودگی‌های RNA و پروتئینی و عدم شکستگی، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. کیفیت مناسب DNA از به دست آمدن نتایج کاذب (ناشی از تکثیرهای غیراختصاصی) و کاهش تکرارپذیری جلوگیری می‌کند (شکل ۲).

۳-۵ کمیت سنجی استخراج DNA ژنومی

برای تعیین غلظت مناسب از DNA نمونه‌های آندروگرافیس پانیکولاتا، برای انجام مراحل بعدی SRAP مقدار آنها توسط دستگاه نانو دراپ خوانده شد (جدول ۵). وجود کمیت و کیفیت مناسب DNA ژنومی امکان استفاده بهینه آن را در مرحله بعدی فراهم می‌کند.



شکل ۲ کیفیت DNA استخراج شده برخی از نمونه‌های استخراج شده در آگارز ۱ درصد

جدول ۵ کمیت DNA استخراج شده توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا توسط دستگاه نانو دراپ

| توده | غلظت (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 | توده | غلظت (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|------|--------------|-----------|-----------|------|--------------|-----------|-----------|
| ۱۷۹ | ۶۰۱/۰ | ۱/۸۵ | ۲/۵۵ | ۲۶۵ | ۷۱۲/۰ | ۱/۹۵ | ۲/۶۵ |
| ۲۱۶ | ۷۴۱/۵ | ۱/۹۳ | ۲/۶۲ | ۲۶۶ | ۳۶۴/۰ | ۱/۸۱ | ۲/۳۰ |
| ۲۲۸ | ۷۲۹/۵ | ۱/۹۵ | ۲/۶۰ | ۳۱۴ | ۵۴۹/۰ | ۱/۸۸ | ۲/۴۳ |
| ۲۴۹ | ۵۴۵/۵ | ۱/۸۴ | ۲/۴۶ | ۳۲۹ | ۶۲۸/۰ | ۱/۹۱ | ۲/۵۸ |
| ۲۶۴ | ۵۶۵/۵ | ۱/۸۴ | ۲/۴۷ | ۳۴۸ | ۳۴۳/۰ | ۱/۸۳ | ۲/۳۳ |

۳-۶ بررسی صحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در مرحله تکثیر اولیه به دلیل تکثیر تعداد زیاد قطعات در خلال PCR روی ژل آگارز اسمیر مناسبی نشان داده شد. در مرحله بعدی (تکثیر انتخابی) به دلیل حضور آغازگرهای با دو یا سه نوکلئوتید انتخابی حجم قطعات تکثیر یافته کاهش پیدا می‌کند.

برای بررسی کیفیت و اطلاع از بهینه بودن شرایط PCR، الگوی نواری ترکیب آغازگرها ابتدا توسط ژل آگارز الکتروفورز شد. سپس، ترکیب آغازگرهایی که دارای الگوی نواری مناسب بودند برای تفکیک کامل قطعات تکثیر یافته توسط ژل پلی اکریل آمید و سرشته‌ساز الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز عمودی، از ژل‌ها تصاویری تهیه شد. در شکل ۳ الگوی نواری قطعات تکثیر

به صورت جداگانه محاسبه شد، بیشترین PIC (۰/۴۸)، MI (۲۶/۲۸) و DI (۰/۲۹) در ترکیب آغازگری E2M3 و کمترین PIC و DI (به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۲۵) در ترکیب آغازگری E1M1 و E2M2 به دست آمد. اما، کمترین شاخص نشانگر (۱۳/۷۹) در E2M2 مشاهده شد. میانگین MI در ترکیب‌های آغازگری مقدار بالایی را نشان داد که بیانگر سودمندی نشانگر در تمایز و تخمین چندشکلی‌های موجود در قطعات تکثیر یافته می‌باشد (جدول ۶).

در پژوهشی بر روی *Hibiscus tiliaceus* با استفاده از هشت ترکیب آغازگر ۵۶۶ نوار در ۱۲۵ فرد از ۹ جمعیت تولید شد که در صد چند شکلی آن ۸۸/۵۲ در صد بود و درصد چندشکلی درون جمعیت‌ها بین ۷۱/۳۸ و ۴۷/۸۸ درصد متغیر بود [۲۵].

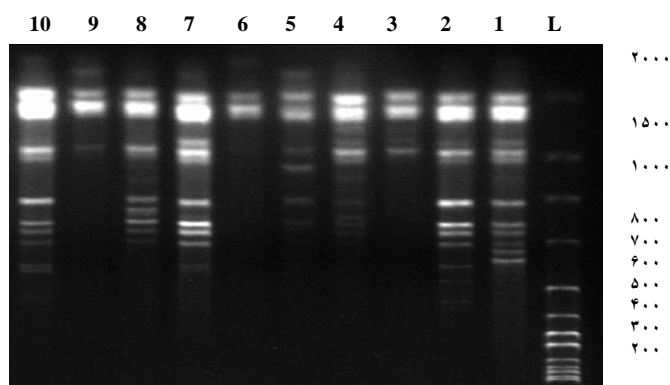
رضایی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی جمعیت‌های گوناگون گل راعی با استفاده از نشانگر SRAP، ۲۳۵ نوار مشاهده کردند که ۹۷ درصد آنها چندشکل بودند و شاخص PIC بین دو مقدار ۰/۳۱ و ۰/۴۵ با میانگین ۰/۳۸ محاسبه شد. میزان تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها از ۰/۲۹ تا ۰/۸۹ متغیر بود.

یافته ترکیبات آغازگری مربوط به Em2Me3 نشان داده شده است. نوارها در دامنه وسیع بیش از ۱۰ کیلو باز تا کمتر از ۳۰۰ جفت باز قابل تفکیک بودند. برخی از توده‌ها در محدوده با وزن مولکولی کمتر، نوارهای بسیار چندشکل نشان دادند که در شکل ۳ به وضوح قابل مشاهده می‌باشد.

این چندشکلی در نوارها مربوط به توالی‌های تکثیر یافته می‌باشد و ممکن است به صورت حضور و یا عدم حضور نوار به دلیل اختلاف در جایگاه‌های پرایمینگ (اتصال آغازگر) در اثر حذف و یا اضافه شدن توکلوتیدها در محل اتصال آغازگر یا درون قطعه قابل تکثیر باشد [۲۴].

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰ توده آندروگرافیس پانیکولاتا، ۶ ترکیب آغازگری، دارای الگوی نواری مناسب و واضح استفاده شد که در مجموع ۵۸۳ نوار قابل امتیازدهی مشاهده شد. از این تعداد، ۵۴۹ نوار دارای چندشکلی و با میانگین ۹۱/۵ نوار برای ترکیبات آغازگری مورد بررسی بود. بیشترین چندشکلی (۹۹/۱۲ درصد) در ترکیب آغازگری E1M1 و کمترین چندشکلی (۸۴/۲۱ درصد) در ترکیب E2M2 مشاهده شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و تنوع ژنی (DI) برای هر ترکیب آغازگری



شکل ۳ الگوی نواری قطعات تکثیر یافته ترکیب آغازگری Em2Me3 در مرحله تکثیر انتخابی قطعات برش یافته توسط ژل آگارز ۱/۸ درصد؛ L: DNA استاندارد مارکر ۱: ۱۷۹، ۲: ۲۱۶، ۳: ۲۲۸، ۴: ۲۴۹، ۵: ۲۶۴، ۶: ۲۶۵، ۷: ۲۶۶، ۸: ۳۱۴، ۹: ۳۲۹، ۱۰: ۳۴۸.

جدول ۶ پارامترهای مربوط به چند شکلی نشانگر SRAP

| ترکیب آغازگری | N | N _p | %P | PIC | MI | DI |
|---------------|-------|----------------|-------|-------|--------|------|
| E1M1 | ۱۱۴ | ۱۱۳ | ۹۹/۱۲ | ۰/۱۹ | ۲۶/۲۸ | ۰/۲۸ |
| E1M2 | ۸۰ | ۷۷ | ۹۶/۲۵ | ۰/۲۰ | ۱۷/۰۴ | ۰/۲۸ |
| E1M4 | ۸۶ | ۸۲ | ۹۵/۳۵ | ۰/۳۶ | ۱۷/۵۵ | ۰/۲۷ |
| E2M2 | ۹۵ | ۸۰ | ۸۴/۲۱ | ۰/۳۶ | ۱۳/۷۹ | ۰/۲۵ |
| E2M3 | ۱۱۴ | ۱۰۸ | ۹۴/۷۴ | ۰/۴۸ | ۲۲/۶۰ | ۰/۲۷ |
| E2M4 | ۹۴ | ۸۹ | ۹۴/۶۸ | ۰/۲۳ | ۱۹/۷۷ | ۰/۲۹ |
| کل | ۵۸۳ | ۵۴۹ | ۹۹/۱۲ | ۰/۳۰۳ | ۱۱۷/۰۳ | ۱/۶۲ |
| میانگین | ۱۷,۹۷ | ۹۱/۵۰ | ۱۶/۵۲ | ۰/۰۵ | ۱۹/۵ | ۰/۲۷ |

N: تعداد کل نوارها، N_p: تعداد نوارهای چند شکلی، %P: درصد چندشکلی، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، MI: شاخص نشانگر، DI: تنوع ژنی

بیشترین شاخص‌ها را به ترتیب با مقدار ۰/۵۰ و ۰/۶۹ و ترکیب آغازگری E1M1 کمترین آنها را با مقدار ۰/۱ و ۰/۲ داشت. بالا بودن این دو شاخص در ترکیب آغازگر E2M3 نشان می‌دهد که این ترکیب آغازگر با فراوانی آلی مناسب توانسته تنوع بین کل توده‌ها را بهتر از سایر ترکیب‌های آغازگری نشان دهد (جدول ۷).

۳-۸ فاصله ژنتیکی بین توده‌ها

مقادیر شباهت و فاصله ژنتیکی بین توده‌ها به ترتیب در پایین و بالای قطر جدول ۷ نشان داده شده است. بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۳۷۳) بین توده‌های ۲۱۶ و ۲۴۹ بود. کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۰۳۵) بین توده‌های ۳۲۹ و ۲۶۵ مشاهده شد (جدول ۸). دلیل تشابه توده‌ها می‌تواند شرایط جغرافیایی نسبتاً نزدیک به هم باشد. این تشابهات را می‌توان به حضور دو نوع تغییرات تکاملی سازگار با محیط مرتبط دانست، که از این منبع سازگار با فاصله ژنتیکی نسبتاً زیاد می‌توان برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد.

به‌طور کلی هر چه نمونه‌های مورد مطالعه به یکدیگر نزدیک‌تر باشند، نشانگرهایی با قدرت بیشتر تشخیص چندشکلی مورد نیاز خواهند بود. Belja و همکاران (۲۰۰۳) کارایی و قدرت تفکیک نشانگرهای مولکولی SRAP، SSR، EST-SSR را در ارقام زیتون مورد مقایسه قرار دادند و بیشترین تعداد نوار چندشکلی و کمترین میزان هتروزیگوستی قابل انتظار، در مورد نشانگر SRAP حاصل شد. همچنین، بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به SRAP بود که خود قابلیت تفکیک بالای این نشانگر را به تایید می‌رساند [۲۶].

۳-۷ فراوانی آلل‌ها و معیارهای مرتبط با ترکیب‌های آغازگر SRAP

فراوانی آلل‌ها در نشانگر غالب SRAP متغیر می‌باشد. بیشترین فراوانی آلل موثر (۱/۹۹) در ترکیب E2M3 و کمترین آن (۱/۱۱) در ترکیب E1M1 بدست آمد. برای بررسی توزیع مناسب و یکنواخت آلل‌ها در طول ژنوم تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون برای کل توده‌ها در هر ترکیب آغازگری محاسبه شد. ترکیب آغازگری E2M3

جدول ۷ میانگین شاخص‌های تنوع ژنتیکی مربوط به نشانگر SRAP

| ترکیب آغازگری | N | Na* | Ne* | H* | I* | Ht | Hs | Gst | Nm* |
|---------------|-----|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| E1M1 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۱۱۳۵ | ۰/۱۰۱۹ | ۰/۲۰۹۷ | ۰/۲۱۵۹ | ۰/۰۸۶۲ | ۰/۶۰۰۹ | ۰/۳۳۲۱ |
| E1M2 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۱۸۱۳ | ۰/۱۵۴۹ | ۰/۲۸۹۹ | ۰/۱۰۱۹ | ۰/۰۵۵۴ | ۰/۵۴۶۴ | ۰/۵۹۵۴ |
| E1M4 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۸۸۵۷ | ۰/۴۶۹۷ | ۰/۶۶۲۵ | ۰/۱۵۴۹ | ۰/۰۹۲۳ | ۰/۴۰۴۱ | ۰/۸۳۷۲ |
| E2M2 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۵۷۰۳ | ۰/۳۶۳۲ | ۰/۵۴۹۳ | ۰/۴۶۹۷ | ۰/۲۴۰۰ | ۰/۴۸۹۰ | ۰/۵۲۲۴ |
| E2M3 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۹۸۸۲ | ۰/۴۹۷۰ | ۰/۶۹۰۲ | ۰/۳۶۳۲ | ۰/۱۴۷۷ | ۰/۵۹۳۴ | ۰/۳۴۲۷ |
| E2M4 | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۴۵۰۶ | ۰/۳۱۰۷ | ۰/۴۸۹۶ | ۰/۴۹۷۰ | ۰/۱۸۴۶ | ۰/۶۲۸۶ | ۰/۲۹۵۵ |
| Mean | ۱۳۰ | ۲ | ۱/۵۳۱۹ | ۰/۳۱۶۲ | ۰/۴۸۱۸ | ۰/۳۰۰۴ | ۰/۱۳۴۳ | ۰/۵۲۸۷ | ۰/۴۷۰۸ |

Na: تعداد آلل، Ne: آلل موثر، I: شاخص شانون، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، H: درجه هتروزیگوتی، I: شاخص شانون، Ht: هتروزیگوتی مورد انتظار، Hs: هتروزیگوتی مشاهده شده، Gst: شاخص تمایز ژنی، Nm: جریان ژنی

جدول ۸ ماتریس شباهت و فواصل ژنتیکی توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا بر اساس داده‌های نشانگر SRAP

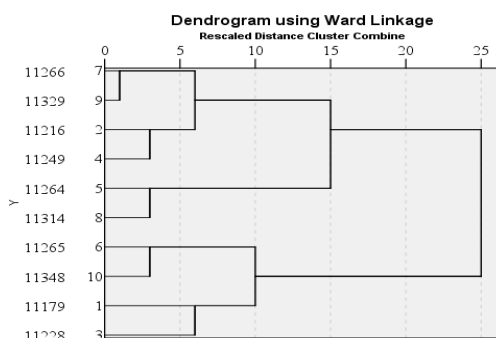
| کد جمعیت | ۱۷۹ | ۲۱۶ | ۲۲۸ | ۲۴۹ | ۲۶۴ | ۲۶۵ | ۲۶۶ | ۳۱۴ | ۳۲۹ | ۳۴۸ |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ۱۷۹ | *** | ۰/۸۲۷ | ۰/۷۹۰ | ۰/۷۳۱ | ۰/۸۳۵ | ۰/۷۲۳ | ۰/۷۶۳ | ۰/۷۷۳ | ۰/۷۵۲ | ۰/۷۹۰ |
| ۲۱۶ | ۰/۱۹۰ | *** | ۰/۷۰۲ | ۰/۶۸۹ | ۰/۷۳۶ | ۰/۶۹۹ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۲۱ | ۰/۷۰۴ | ۰/۷۴۳ |
| ۲۲۸ | ۰/۲۳۶ | ۰/۳۵۴ | *** | ۰/۸۹۳ | ۰/۸۱۵ | ۰/۸۵۷ | ۰/۸۳۹ | ۰/۸۳۳ | ۰/۸۴۰ | ۰/۸۷۸ |
| ۲۴۹ | ۰/۳۱۴ | ۰/۳۷۳ | ۰/۱۱۳ | *** | ۰/۸۴۱ | ۰/۷۹۲ | ۰/۸۰۴ | ۰/۷۶۵ | ۰/۷۸۸ | ۰/۸۱۹ |
| ۲۶۴ | ۰/۱۸۱ | ۰/۳۰۷ | ۰/۲۰۴ | ۰/۱۷۳ | *** | ۰/۷۵۴ | ۰/۸۰۷ | ۰/۷۹۲ | ۰/۷۸۶ | ۰/۷۸۰ |
| ۲۶۵ | ۰/۳۲۴ | ۰/۳۵۹ | ۰/۱۵۵ | ۰/۲۳۴ | ۰/۲۸۲ | *** | ۰/۸۷۹ | ۰/۹۲۳ | ۰/۹۶۶ | ۰/۹۳۳ |
| ۲۶۶ | ۰/۲۷۰ | ۰/۳۰۵ | ۰/۱۷۵ | ۰/۲۱۸ | ۰/۲۱۴ | ۰/۱۲۹ | *** | ۰/۹۴۰ | ۰/۹۱۴ | ۰/۹۳۵ |
| ۳۱۴ | ۰/۲۵۸ | ۰/۳۲۸ | ۰/۱۸۳ | ۰/۲۶۷ | ۰/۲۳۳ | ۰/۰۸۰ | ۰/۰۶۲ | *** | ۰/۹۴۰ | ۰/۹۳۶ |
| ۳۲۹ | ۰/۲۸۶ | ۰/۳۵۱ | ۰/۱۷۵ | ۰/۲۳۸ | ۰/۲۴۰ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۹۰ | ۰/۰۶۲ | *** | ۰/۹۴۱ |
| ۳۴۸ | ۰/۲۳۶ | ۰/۲۹۷ | ۰/۱۳۱ | ۰/۲۰۰ | ۰/۲۴۸ | ۰/۰۶۹ | ۰/۰۶۸ | ۰/۰۶۶ | ۰/۰۶۱ | *** |

گروه اول شامل ۴ توده، گروه دوم شامل ۲ توده و گروه سوم شامل ۴ توده بود.

در مطالعه زین‌الدینی و همکاران تجزیه خوشه‌ای برخی گونه‌های نعنای به روش UPGMA ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در ۳ گروه قرار داد که در این گروه‌بندی گونه‌های مختلف از جنس نعنای در یک گروه قرار گرفت [۲۷]. گزارش‌های مشابه در پژوهش Rahim Malek (۲۸) و Shasany (۲۹) نیز، روی گونه‌های دیگری از گیاه نعنای انجام شد که دلیل این پدیده وجود تلاقی‌های بین گونه‌ای طبیعی در گیاه نعنای اعلام شد.

۳-۹ تجزیه خوشه‌ای توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب فاصله Distance به روش Neighbor Net با ۱۰۰۰ تکرار به‌دست آمد و صحت گروه‌بندی توسط آنالیز Bootstrap بررسی شد (شکل ۴). این روش گروه‌بندی نسبت به سایر روش‌ها دارای ضریب کوفتیک بالاتر ($t=0/99$) بود. بالا بودن ضریب کوفتیک نشان دهنده برازش بسیار خوب نمودار حاصل می‌باشد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا به سه گروه طبقه‌بندی شدند.



شکل ۴ دندروگرام تجزیه خوشه‌ای با ۱۰ توده آندروگرافیس پانیکولاتا بر اساس داده‌های نشانگر SRAP

جدول ۹ تجزیه واریانس مولکولی داده‌های نشانگر SRAP در توده‌های آندروگرافیس پانیکولاتا

| منبع تغییر | df | SS | MS | Est. Var. | % |
|------------|----|---------|--------|-----------|-----|
| بین جمعیت | ۹ | ۲۶۴/۸۲۳ | ۱۰/۵۹۳ | ۱/۶۶۲ | ۴۲ |
| درون جمعیت | ۵۰ | ۲۳۷/۲۰۰ | ۲/۲۸۱ | ۲/۲۸۱ | ۵۸ |
| کل | ۵۹ | ۵۰۲/۰۲۳ | | ۳/۹۴۳ | ۱۰۰ |

۳-۱۰ تجزیه واریانس مولکولی

در تجزیه واریانس مولکولی، درصد تغییرات محاسبه شد. از کل تغییرات، ۴۲ درصد مربوط به بین توده‌ها و ۵۸ درصد به درون توده‌ها وابسته بود (جدول ۹). همچنین، فاصله ژنتیکی میان و درون گروه‌ها توسط آماره F_{st} با مقدار ۰/۰۲ محاسبه شد.

در مطالعه‌ای که توسط Tiwari و همکاران برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR، SCoT و CDBP انجام شد، عدم تفکیک آگرو-اکولوژیکی در توده‌های جمع‌آوری شده از ۵ منطقه هند گزارش شد [۳۰]. همچنین، تجزیه واریانس مولکولی درصد عمده تغییرات را در درون جمعیت نشان داد. مطالعه دیگری که در خصوص تنوع ژنتیکی این گیاه بر روی ۱۰۳ نمونه از ۷ منطقه در چین با استفاده از نشانگرهای SRAP و SNP انجام شد، نشان دهنده تنوع کم در ژرم پلاسما مورد بررسی بود. دلیل این تنوع کم به واسطه خودباروری این گیاه و منشا مشترک نمونه‌های مورد بررسی گزارش شد [۳۱].

زین‌الدینی و همکاران در بررسی تنوع ژنتیکی برخی گونه‌های جنس نعناع، میانگین در صد چند شکلی مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی را ۹۴/۷۰ گزارش کردند [۲۷]. میزان تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد از ۰/۱۷ تا ۰/۵۶ متغیر بود که نشان دهنده تنوع بالا در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. تجزیه واریانس مولکولی ۹۸ درصد تغییرات را برای تنوع درون گونه‌ها و ۲ درصد تغییرات را بین گونه‌ها نشان داد. در این مطالعه مشاهده شد به دلیل وجود دو رگ‌گیری بین گونه‌ای در دوران تکامل نعناع، شباهت بین گونه‌ای بیشتر از شباهت درون گونه‌ای می‌باشد.

توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها در نتیجه وجود جریان ژنی در میان افراد یک جمعیت یا بین جمعیت‌های مختلف است و گسترش جریان ژنی در یک گونه بستگی به اندازه و درجه ایزوله بودن جمعیت و جابجایی گرده و بذر در میان جمعیت‌ها دارد. در جمعیت‌های دگرگشن تنوع به فواصل جغرافیایی و میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها وابسته است و با توجه به جریان ژنی بالا در

گونه‌های دگرگشن، بنابراین میزان تنوع کم بین جمعیت‌ها و تنوع زیاد درون جمعیت‌ها امری طبیعی است.

۴- نتیجه‌گیری

مطابق نتایج حاصل از آنالیز نشانگرهای SRAP، بیشترین شباهت بین توده‌های ۲۱۶ و ۲۴۹ و کمترین شباهت بین توده‌های ۳۲۹ و ۲۶۵ بود. می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌بندی توده‌ها بر اساس داده‌های مولکولی، بهتر و معتبرتر از نتایج نشانگرهای پروتئینی است، زیرا تنوع پروتئینی همیشه انعکاس واقعی از تنوع ژنتیکی نمی‌باشد و از سوی معمولاً ویژگی‌های پروتئینی از چند شکلی نسبتاً اندکی برخوردارند. بنابراین، تنوع پروتئینی نمی‌تواند به تنهایی انعکاس دهنده تنوع ژنتیکی کلی باشد که برای برنامه‌های اصلاحی جهت ایجاد ژنوتیپ‌های جدید آندروگرافیس پانیکولاتا مورد نیاز است. تنوع مولکولی به دلیل نشان دادن تفاوت در سراسر ژنوم طی زمان در اثر پدیده‌هایی مانند جهش، حذف و جابجایی و غیره و قرار نگرفتن تحت تاثیر شرایط رشدی و محیطی، از ارجحیت بیشتری در مطالعات تنوع ژنتیکی برخوردارند. علاوه بر این، جستجوی گسترده نشانگرها مانند پروتئین، ایزوزایم، نشانگرهای مولکولی و ویژگی‌های کمی، ابزار و همچنین چشم اندازی وسیع از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آندروگرافیس پانیکولاتا را در راستای اهداف به‌نژادی فراهم خواهد کرد. با وجود موارد بالا، برای انتخاب توده‌های مناسب‌تر و سازگارتر با شرایط جغرافیایی، بهتر است که از تنوع مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی و نشانگرهای پروتئینی به‌صورت مکمل یکدیگر استفاده شود. آگاهی از تنوع ژرم‌پلاسما و رابطه ژنتیکی در میان مواد اصلاحی می‌تواند کمکی ارزشمند در استراتژی بهبود و اصلاح گیاهان باشد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت بیشترین تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها است و از این اکوتیپ‌ها می‌توان به‌عنوان منبع بالقوه برای ژن‌های مختلف در برنامه‌های اصلاحی استفاده

کرد. این نتیجه را می‌توان در گونه‌هایی با دگر گرده‌افشانی بالا انتظار داشت.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت تنوع ژنتیکی زیادی بین توده‌های مورد مطالعه نائین هاوندی وجود دارد و این تنوع ژنتیکی می‌تواند در نتیجه وجود جریان ژنی در میان افراد یک جمعیت یا بین جمعیت‌های مختلف باشد که می‌توان به‌عنوان منبع بالقوه برای ژن‌های مختلف در برنامه‌های اصلاحی از آنها استفاده کرد. بنابراین، با توجه به اینکه برخورداری از ژنوتیپ‌های والدینی با حداکثر تفاوت ژنتیکی از لحاظ صفات مختلف برای به‌دست آوردن هتروزیس، یزای انجام برنامه‌های به‌نژادی مناسب و موفق، ضروری است، می‌توان گفت که بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و انتخاب گونه‌های دور از هم برای رسیدن به هتروزیس بالا مفید خواهد بود.

۵- منابع

- [1] دل آزاد خ، جعفری او تانلوغ، (۱۳۹۶). جایگاه طب سنتی و گیاهان دارویی در ایران، کنفرانس بین‌المللی علوم کشاورزی، گیاهان دارویی و طب سنتی، مشهد. ۱۹-۱.
- [2] شاکری م، طرحی ش، علی نیا ا (۱۳۹۳). نقش گیاهان دارویی در بهره‌برداری از منابع طبیعی و تاثیر آن در توسعه پایدار منابع طبیعی، دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، همدان. ۱۴-۱.
- [3] طالعی د، عمر ف، (۱۳۹۲). واکنش شاخص‌های رشد به سطوح مختلف چای کمپوست در گیاه دارویی (*Andrographis paniculata* L) نائین هاوندی، همایش ملی گیاهان دارویی آمل. ۷-۱.
- [4] Valdiani, A., Mihdzar, A.K., Tan, S.G., Talei, D., Puad, M.A., Nikzad, S. (2012) Nain-e Havandi (*Andrographis paniculata*) present yesterday, absent today: A plenary review on underutilized herb of Iran's pharmaceutical plants. *Molecular Biology Reports*, 39:5409-5424.
- [5] Hossain, S., Urbi, Z., Karuniawati, H., Mohiuddin, R.B., Moh Qrimida, A., Allzrag, A.M.M., Ming, L.C., Pagano, E., Capasso, R. (2021). *Andrographis paniculata* (burm. F.) wall. Ex Nees: An updated review of phytochemistry,

- The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238.
- [18] Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and applied Genetics*, 98(1), 107-112.
- [19] Amiryousefi, A., Hyvönen, J. and Poczai, P. (2018). iMEC: online marker efficiency calculator. *Applications in plant sciences*, 6(6).
- [20] Smouse, R.P.P. and Peakall, R. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- [21] Ciaffi, M., Lafiandra, D., Porceddu, E., Benedettelli, S. (1993). Storage protein variation in wild emmer (*Triticum turgidum* ssp.) *dicoccoides* from Jordan and Turkey. *Theoretical and applied genetics* 86: 518-525.
- [22] Vollmann, J., Christina, N.F., Helmut, W., and Peter, R. (2000). Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1300-1306.
- [23] Ghafoor, A., and Muhammad, A. (2008). Multivariate analyses for quantitative traits to determine genetic diversity of blackgram *Vigna mungo* L. Hepper germplasm. *Pakistan Journal of Botany* 40: 2307-2313.
- [24] نقوی، م.، قره‌یاضی، ب. و ق، حسینی سالکده، (۱۳۹۲). نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران.
- [25] Tang, T., Yang Z, Shuguang J and Suhua S. (2003). Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China assessed using SRAP markers. *Annals of Botany* 92: 409-414.
- [26] Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of EST-SSR, SRAP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 736-744.
- [27] زین‌الدینی آ، فرشادفر م، صفری ه، مرادی ف، شیروانی ه (۱۳۹۲). مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از نشانگر ISSR. فصلنامه علمی — پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. ۳(۵)، ۱۱-۲۱.
- [28] Rahimmalek, M. (2011). Study of genetic relationships of some mint species using R-ISSR markers. *Agricultural Biotechnology*, 10(1), 11-17.
- antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. *Life*, 11(4):348-386.
- [6] فارسی، م.، باقری، ع. (۱۳۷۷). اصول اصلاح نباتات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، صفحه ۲۳۰.
- [7] Saeed, S., and Khan Barozai, M.Y. (2012). A review on genetic diversity of Wild plants by using different genetic markers. *Pure and Applied Biology* 1: 68-71.
- [8] Li, G. and Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and applied genetics*, 103(2), 455-461.
- [9] Ojwang, R.A., Muge, E.K., Nyaboga, E.N., Mbatia, B.N. and Ogoyi, D.O. (2021). Genetic diversity and relationships among populations of jackfruit, an underutilized nutrient-rich climate-smart fruit tree crop in Kenya and Uganda. *Journal of Crop Improvement*, 1-19.
- [10] Yi, L., Dong, Z., Lei, Y., Zhao, J., Xiong, Y., Yang, J., Xiong, Y., Gou, W. and Ma, X. (2021). Genetic Diversity and Molecular Characterization of Worldwide Prairie Grass (*Bromus catharticus* Vahl) Accessions Using SRAP Markers. *Agronomy*, 11(10), 2054.
- [11] Robarts, D.W. and Wolfe, A.D. (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in plant sciences*, 2(7), 14-17.
- [12] Ferriol, M., Pico, B., de Cordova, P.F. and Nuez, F. (2004). Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Science*, 44(2), 653-664.
- [13] Talei, D., Valdiani, A., and Puad, M.A. (2013). An effective protein extraction method for two-dimensional electrophoresis in the anticancer herb *Andrographis paniculata* Nees. *Biotechnology and applied biochemistry* 60: 521-526.
- [14] Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- [15] Aras, S., Duran, A. and Yenilmez, G. (2003). Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(4), 461-462.
- [16] Ebrahimi, M.A. (2019). The relationship of ISSR markers to agronomic traits in rice under flooding and drought conditions. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(1), 87-97.
- [17] Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996).

diversity and population structure in Kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees]. Industrial Crops and Products, 86, 1-11.

[31] Chen, R., Wang, X.Y., Song, Y.N., Zhu, Y.F., Wang, P.L., Li, M. and Zhong, G.Y. (2014). Genetic diversity analysis of *Andrographis paniculata* in China based on SRAP and SNP. China journal of Chinese materia medica, 39(23), 4559-4565.

[29] Shasany, A.K., Shukla, A.K., Gupta, S., Rajkumar, S. and Khanuja, S.P.S. (2005). AFLP analysis for genetic relationships among *Mentha* species. Plant Genetic Resources Newsletter.

[30] Tiwari, G., Singh, R., Singh, N., Choudhury, D.R., Paliwal, R., Kumar, A. and Gupta, V. (2016). Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic

Assessment of the genetic diversity among Nain-e Havandi medicinal plant accessions based on protein and SRAP markers

Daryush Talei¹, Mojtaba Khayam Nekouei^{2,*}, Saeid Kadkhodaei³

¹Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

²Associate Professor, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Tehran, Iran

mojtabhakhayam@gmail.com

Receipt: 2021/06/14

Accepted: 2021/12/19

Abstract

In this study, the genetic diversity of 10 different accessions of *Andrographis paniculata* was investigated using protein and SRAP markers. In the vegetative stage, protein and DNA were extracted from the leaves. The results of the protein profile indicated a total of 20 bands with 64.15% polymorphism. To evaluate genetic diversity at the DNA level, 6 SRAP primers were used and a total of 583 scalable bands were observed. A total of 549 bands had polymorphism with an average of 91.5 for the studied primers. The highest polymorphism (99.12%) and the lowest polymorphism (84.21%) were observed in E1/M1 E2/M2 primers, respectively. Cluster analysis produced four main clusters. Genetic diversity indices were calculated for all gene loci, including the average genetic diversity of Nei's (0.27) and the mean of Shannon's index with a value of 0.41. High level of population differentiation ($G_{st} = 0.79$) and good level of gene flow ($N_m = 1.3$) were estimated between the grouped populations. Molecular analysis of variance showed that intra-population variance (58%) was higher than inter-population variance (42%). Overall, the results of the study showed a high genetic diversity in both protein electrophoresis pattern and in polymorphic bands separated using SRAP markers with emphasis on the greater efficiency of SRAP markers than protein markers, which can be selected in parents with genetic distance. It is widely used to produce dispersing and mapping populations in hybridization programs and to breed or improve desirable traits, as well as to protect and manage the germplasm of this plant.

Keywords: *Andrographis paniculata*, Genetic diversity, Protein, SRAP