ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم خاکشیر تلخ با استفاده از نشانگر ISSR

Evaluation of Genetic Diversity in *Sisymbrium irio* Germplasm Using ISSR Marker

هدایت باقری[۱*] و عادل جعفری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۱۴

چکیده

گیاه خاکشیر تلخ، دارای خواص دارویی زیادی می‌باشد. مدیریت تنوع ژنتیکی و گیاهان بومی از برنامه‌های حفاظتی ضروری و مهم هر کشوری است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۳۳ توده از خاکشیر تلخ با نشانگر مولکولی Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع۱۸۳ مکان کروموزومی ارزیابی شده و در مجموع ۱۵۳۷ باند ایجاد شده و امتیازدهی شدند. ۱۱ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۰۰درصد چندشکلی را نشان دادند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۳۱/۵ درصد به‌دست آمد. کمترین مقدار PIC برای آغازگر (AG)8T برابر با مقدار ۲۴/۵ درصد و بیشترین مقدار هم برای آغازگر GGGC(GA)8 با مقدار ۳۸/۵ بود. حداکثر شاخص نشانگری در آغازگر (AG)8YT برابر با مقدار ۶/۹۳ بود بنابراین به‌عنوان آغازگر برتر برای مطالعات بعدی روی انواع خاکشیر معرفی می‌شود. الگوی کلی از توزیع تنوع مولکولی برای نشانگرها نشان داد که ۱۷ درصد تنوع مربوط به بین گونه‌ها و ۸۳ درصد تنوع مربوط به درون گونه‌ها می‌باشد. به‌طورکلی می‌توان گفت که تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها و گروه‌بندی کردن نمونه‌ها در نقطه برش، با فاصله جغرافیایی که بین استان‌های مورد مطالعه وجود دارد، هم‌خوانی دقیقی ندارد. ازجمله دلایل این پدیده می‌تواند انتقال ژرم‌پلاسم‌ها بین این مکان‌ها و یا اختلاط بذور یا جریان ژنی بین جمعیت‌ها در هنگام برداشت برای مصارف خوراکی و دارویی و خاستگاه مشترک نمونه‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: نشانگرهای مولکولی، تجزیه به مختصات اصلی، شاخص نشانگر، محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه واریانس مولکولی

۱ و ۲. به‌ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: bagheri.hedayat@gmail.com

مقدمه

گیاه خاکشیر تلخ با نام علمی *Sisymbrium irio* ازجمله گیاهان دارویی مهم در خانواده *Brassicaceae* می‌باشد *اوریت* و همکاران (Everitt *et al.*, 2007). این گیاه خواص مشابه با خاکشیر شیرین داشته ولی به‌علت ترکیبات متفاوت، دارای خواص ویژه‌ای نیز می‌باشد. ارتفاع این گیاه یک متر و در مواردی به دو متر هم می‌رسد *زرگای* (Zargai, 1997). میوه آن به‌صورت خورجین استوانه‌ای و باریک به طول ۱۵ تا ۴۵ میلی‌متر و عرض ۱ تا ۲ میلی‌متر (راشدمحصل و همکاران، ۱۳۷۹)، است که به‌صورت عمودی روی ساقه قرار دارند *امین*؛ *دریایی* (Amin, 2000; Daryaei, 2007). بذر آن ریز و کمی دراز بوده و به دو رنگ قرمز کمرنگ و تیره وجود دارد (خضری، ۱۳۸۲). اندازه بذرها کمتر از ۱/۵ میلی‌متر بوده و از یک طرف دارای شیار هستند (راشدمحصل و همکاران، ۱۳۷۹). این گیاه در گستره زیادی از نواحی آب و هوایی رشد می‌کند و بومی اروپا، اکثر مناطق قاره آسیا، ازجمله ایران، چین، پاکستان، افغانستان، مراکش و الجزیره می‌باشد *ژانگ* (Zhang, 2003). در ایران در نواحی غربی، شمال (آمل)، مرکز (تهران، کرج و یزد)، جنوب (فارس و کرمان) و در نواحی مرطوب معتدل رشد می‌کند *دوبلین* و همکاران؛ *افشار* (Dublin *et al.*, 2000; Afshar, 1991). از خاکشیر برای درمان آنفولانزا، اسهال، دردهای زنانگی و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود *اقبال و صدیقی* (Iqbal and Saddiqi, 2011). در طب سنتی چین هم برای درمان بیماری‌های قلبی، رفع سرفه، کاهش ورم و افزایش دفع ادرار مورد استفاده قرار گرفته است *سان* و همکاران (Sun *et al.*, 2005). دانه خاکشیر، ملین و برطرف‌کننده یبوست، مقوی معده، التیام‌دهنده زخم و جراحات، برطرف‌کننده لکه‌های پوستی و خارش، مؤثر در درمان تنبلی معده و در درمان سرگیجه، تب، دفع کرم روده، دفع سنگ‌های کلیه و بهبود برونشیت مزمن می‌باشد (خضری، ۱۳۸۲). عصاره حاصل از اندام‌های هوایی این گیاه در مرکز آسیا برای درمان بیماری‌های گلو، همچنین به‌عنوان تب‌بر برای بیماری‌های سرخک و آبله استفاده می‌شود بکر و همکاران (Bekker *et al.*, 2005). بذر خاکشیر دارای ۲۵ درصد پروتئین، ۲۲ تا ۴۴ درصد روغن، ۳/۵ تا ۴ درصد خاکستر و ۷/۶ درصد فیبر می‌باشد *تکاچوک و ملیش*؛ *دوک و آینسو*؛ *پنگ* و همکاران (Tkachuk and Mellish, 1997; Duke and Ayensu, 1985; Peng *et al.*, 1997). به‌طور میانگین ۷۱/۴ درصد از روغن بذر شامل اسیدهای چرب اشباع نشده‌ای مثل اسیداولئیک، اسیدلینولئیک و اسیدلینولنیک می‌باشد *گروزدین و بگدونیت* (Gruzdiene and Bagdonaite, 2003) که از بین این‌ها اسیدلینولنیک به‌عنوان اسید چرب ضروری برای انسان، با حداکثر ۴۴ درصد غالب است *مارسالکین* و همکاران (Marsalkiene *et al.*, 2009). نتایج بررسی اسانس‌های گرفته شده از خاکشیر در نقاط مختلف ایران، نشان داده که این گیاهان تفاوت‌های ژنتیکی و محیطی زیادی را نسبت به هم نشان می‌دهند *باقی‌زاده و آقاعباسی* (Baghizadeh and Aghaabasi, 2012). با توجه به اینکه در ایران بیشتر گیاهان دارویی از مراتع طبیعی برداشت شده و کمتر لاین زراعی برای آنها معرفی شده‌است، رفته‌رفته شاهد کاهش و یا از بین رفتن ژرم‌پلاسم‌های وحشی و باارزش خواهیم بود (*باقی‌زاده و آقاعباسی*، 2012). به همین دلیل اطلاع داشتن از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی از برنامه-های مهم در پروژه‌های اصلاح نباتات است *کرسویچ و مک فرسون* (Kresovich and McFerson, 1992). امروزه استفاده از روش‌های مولکولی و آنالیز تنوع ژنتیکی به‌طور وسیعی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد *فارسی و زلالا* (Farsi and Zolala, 2003).

در مطالعات مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی معمولاً از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌شود. نشانگر ISSR در ابتدا توسط *زیتکوویچ* و همکاران (Zietkiewicz *et al.*, 1994) ارایه شد و به سرعت در زمینه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. این نشانگر ازجمله نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشد که در آن قطعه‌ای از DNA که در یک فاصله قابل تکثیر بین دو میکروستلایت شبیه به هم که به‌طور عکس هم آرایش یافته‌اند، تکثیر می‌شود. برای استفاده از این نشانگر نیاز به داشتن اطلاعات در مورد توالی مورد مطالعه نیست. این نشانگر شباهت زیادی به نشانگر RAPD دارد و به میزان زیادی در نواحی بین میکروستلایتی در سرتاسر ژنوم پراکنده شده‌است *گوپتا و ورشنی* (Gupta and Varshney, 2000). همچنین سریع، ساده، ارزان و تکرارپذیر است *گنزالز* و همکاران (Gonzalez *et al.*, 2000). از این نشانگر برای طبقه‌بندی مولکولی، حفاظت و اصلاح برنج *بلیر* و همکاران (Blair *et al.*, 1999)، بررسی تنوع در گونه‌های درختی *گنزالز* و همکاران؛ چای *لی* و همکاران (Li *et al.*, 2004)، تمشک *هوانگ و سان* (Huang and Sun, 2000) و همچنین در انگشت‌نگاری و تشخیص ارقام و واریته‌ها *فانگ و روس*؛ *مورنو* و همکاران (Fang and Roose, 1997; Moreno *et al.*, 1998) استفاده شده است. تحقیقی که به‌وسیله *شی* و همکاران (Shi *et al.*, 2010) بر روی ۲۲ گونه از گیاه زغال‌اخته با استفاده از ۱۹ آغازگر ISSR صورت گرفت، نشان داد که این نشانگر می‌تواند به‌عنوان ابزاری مناسب برای

انگشت‌نگاری DNA استفاده شود. جدیدترین بررسی تنوع ژنتیکی با کمک نشانگر در گیاه خاکشیر شیرین، توسط *ساکی* و همکاران (Saki *et al.*, 2016) صورت گرفته است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۳۲ اکوتیپ ژرم‌پلاسم خاکشیر شیرین، توسط نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. انواع کلم و همچنین گیاه آرابیدوپسیس نیز از خانواده براسیکا مورد بررسی‌های مولکولی قرار گرفته اند. هیجده ژنوتیپ بروکلی توسط ۷۴ آغازگر RAPD و ۸ آغازگر ISSR مورد آنالیز قرار گرفتند و به‌ترتیب ۳۴۴ و ۶۷ باند چندشکلی تولید کردند *لو* و همکاران (Lu *et al.*, 2009). براساس این آنالیز تمام ۱۸ ژنوتیپ بروکلی به دو زیر گروه اصلی تقسیم شدند. همچنین ۵۶۰ نمونه آرابیدوپسیس جمع‌آوری شده از ۱۹ ناحیه در مناطق شمال غربی و شرق چین با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR و ۱۱ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. به‌طوری‌که آغازگرهای ISSR تولید ۱۶۸ و آغازگرهای RAPD تولید ۱۶۲ باند چندشکل کردند. هر دو نشانگر الگوهای مشابهی از تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها نشان دادند *هی* و همکاران (He *et al.*, 2007). در این تحقیق با استفاده از نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی خاکشیر تلخ مورد بررسی قرار گرفته تا اطلاعات بیشتری در مورد وضعیت پراکندگی و تنوع آن حاصل شود.

مواد و روش‌ها

بذرهای مربوط به توده‌های خاکشیر تلخ از مناطق مختلف استان‌های یزد، فارس، اردبیل، همدان، گیلان و قم در بهار و تابستان سال‌های ۹۱ و ۹۲ جمع‌آوری شده و کشت گردیدند. برای جوانه‌زنی آنها از تیمارهای آب مقطر، سرمایی و نیترات پتاسیم استفاده شد. از هر جمعیت ۱۰ تا ۱۵ بذر جوانه زده در سه گلدان کشت گردید. بعد از طی شدن دوره رشد سه الی چهار ماهه و شناسایی کامل آنها از نظر گیاه‌شناسی، گیاهان رشد کرده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). نشانگر ISSR جزو نشانگرهای غالب است، بنابراین در تفسیر ژل از سیستم امتیازدهی وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) باند استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها از تجزیه واریانس مولکولی استفاده گردید *اکسکافیر* و همکاران (Excoffier *et al.*, 1992). برای تعیین تعداد مطلوب خوشه‌ها که در آن بیشترین تمایز بین گروه‌ها حاصل شود، از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در نقاط مختلف برش دندروگرام استفاده شد. محاسبه AMOVA با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex صورت گرفت. به‌منظور بررسی توزیع فضایی اکوتیپ‌ها براساس فاصله آن‌ها از یکدیگر از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب جاکارد با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex استفاده گردید. رابطه تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی توسط تجزیه IBD، (Identity by distance) بررسی گردید.

استخراج DNA

از هر گلدان چهار برگ گرفته شد و طبق دستورالعمل *دویل و دویل* (Doyle and Doyle 1990) با روش ستیل تری‌متیل‌آمونیوم بروماید و یا CTAB استخراج DNA صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA به‌ترتیب به‌وسیله الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفوتومتر برآورد شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

دستورالعمل PCR مطابق با روش *ونترپ و همکاران* (Wanntorp *et al.*, 2006) با کمی تغییر در مورد آغازگرهای ISSR در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (نصیری و همکاران، ۱۳۹۰). ۱۱ آغازگر استفاده شده (جدول ۲) از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند. آنزیم Taq polymerase، PCR buffer (10X)، $MgCl_2$، از شرکت سینا ژن و dNTP از شرکت تکاپوزیست تهیه گردید. برای هر آغازگر، محلول ۲۵ میکرولیتری از ترکیبات PCR تهیه شده و با انجام دادن گرادیان دمایی، دمای اتصال مربوط به آنها به‌دست آمد. بعد از محاسبه دمای اتصال، فرآیند PCR برای هر پرایمر در مورد همه توده‌ها اعمال شد. در انتها محصولات PCR حاصل برای الکتروفورز بعدی در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جدول ۱: مشخصات توده‌های مورد مطالعه

Table 1: Characteristics of the studied landraces

نام توده Landrace	نام محل جمع‌آوری Collection place
H16	همدان- حیدره (Hamedan, Heidare)
H14	همدان- گنجنامه (Hamedan, Ganjname)
H45	همدان- ملایر (Hamedan, Malayer)
H20	همدان- مرادبیگ (۱) (Hamedan, Moradbeig1)
H17	همدان- مرادبیگ (۲) (Hamedan, Moradbeig2)
H36	همدان- ملایر- جوزان (Hamadan, Malayer, Jozan)
H9	همدان- گنجنامه (۱) (Hamedan, Ganjname1)
H7	همدان- گنجنامه (۲) (Hamedan, Ganjname2)
H44	همدان- ملایر (۲) (Hamedan, Malayer2)
H8	همدان- ملایر (۳) (Hamedan, Malayer3)
H31	همدان- سد اکباتان (Hamedan, Ekbatan)
H37	همدان- ملایر- جوزان (۲) (Hamadan, Malayer, Jozan2)
H18	همدان- ارتفاعات مراد بیگ (Hamedan, Moradbeig2)
H28	همدان -سد اکباتان (۲) (Hamedan, Ekbatan)
H15	همدان- حیدره (۲) (Hamedan, Heidare)
H26	همدان- سد اکباتان (۳) (Hamedan, Ekbatan)
H13	همدان- گنجنامه (۳) (Hamedan, Ganjname3)
H51	همدان- تویسرکان (Hamedan, Tuyserkan)
H11	همدان- گنجنامه (۴) (Hamedan, Ganjname4)
H49	همدان- تویسرکان (۲) (Hamedan, Tuyserkan2)
F8	فارس- کازرون (Fars, Kazerun)
F9	فارس- کازرون (۲) (Fars, Kazerun2)
GI1	گیلان- منجیل (Gilan, Makjil)
GI2	گیلان- منجیل (۲) (Gilan, Makjil2)
GI3	گیلان- بام لاهیجان (Gilan, Lahijan top)
G2	قم- جعفریه (Ghom, Jafarie)
G3	قم- آوه (۱) (Ghom, Aveh1)
G4	قم- آوه (۲) (Ghom Aveh2)
Y16	یزد- ابرکوه (Yazd, Abarkuh)
Y18	یزد- ابرکوه (۲) (Yazd, Abarkuh2)
Y19	یزد- اردکان (Yazd, Ardakan)
A1	اردبیل- خلخال (Ardabil, Khalkhal)
A3	اردبیل- مشکین شهر (Ardabil, Meshkin shahr)

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوم اکوتیپ‌های خاکشیر تلخ

Table 2: Characteristics of primers used in the study of genetic diversity of *Sisymbrium irio* landraces

کد آغازگر Primer code	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد نوکلئوتید Nucleotide number	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Ta*(°C)	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm*(°C)
P1	(AG)8T	17	54	50
P2	(AG)8Y*T	18	53	53
P3	(AC)8YT	18	54	53
P4	(CA)8G	17	53	52
P5	(CT)8R*C	18	54	55
P6	(CT)8RG	18	42.5	55
P7	(GA)8C	17	51	52
P8	(GA)8T	17	52	50
P9	(GA)8YC	18	53	55
P10	(TC)8C	17	54	52
P11	GGGC(GA)8	20	56	64

Y*= C or T, R*= G or A، دمای ذوب Tm* =Melting temperature، دمای اتصال Ta* =Annealing temperature

جدول ۳: تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از آغازگرها

Table 3: Analysis of molecular variance of primer data

	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	درصد واریانس Variance percent	F
بین گروه Between	5	239.7	17	0.168*
درون گروه Within	27	718.05	83	
کل Total	32	957.75		

*: بین گروه‌ها و درون گروه‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد

*: There is significant difference between groups (p1%)

جدول ۴: مقادیر محاسبه شده اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) برای ۱۱ آغازگر استفاده شده در این تحقیق

Table 4: The calculated values of polymorphic information content and marker index of 11 primers used in this study

آغازگر Primer	اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص نشانگری MI
P1	0.245	4.9
P2	0.315	6.93
P3	0.318	4.77
P4	0.266	3.19
P5	0.295	5.60
P6	0.281	5.62
P7	0.371	5.19
P8	0.325	4.22
P9	0.333	5.66
P10	0.337	5.39
P11	0.385	5.77
میانگین Mean	0.315	5.20

نتایج و بحث

تمامی ۱۱ آغازگر به‌کار رفته در این تحقیق باندهای چندشکلی مناسبی را ایجاد کردند. انتخاب باندهای چند شکل برای تجزیه و تحلیل، بر مبنای درجه وضوح و تکرارپذیری آنها *ماتیونی* و همکاران (Mattioni *et al.*, 2002) و مقایسه باندها با نوارهای نشانگرهای مولکولی صورت گرفت. تعداد کل باندها ۱۵۳۷ و تعداد کل مکان‌های ایجاد شده ۱۸۳ عدد بود که همه باندها و مکان‌های ایجاد شده ایجاد چندشکلی کردند. بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر GGGC(GA) با ۲۰۱ عدد و کم‌ترین تعداد باند هم مربوط به آغازگر CA)8G) با ۷۳ عدد بود. همچنین متوسط تعداد باندهای تولید شده برای هر آغازگر برابر با ۱۳۹/۷۲۹ و متوسط تعداد مکان تکثیر شده برای هر آغازگر ۱۶/۶۳۶ برآورد گردید. متوسط تعداد باند آغازگرها برای هر نمونه ۴/۲۳ برآورد شد که بیشترین میزان مربوط به آغازگر GGGC(GA)8 با ۶/۰۹ و کمترین مقدار هم مربوط به آغازگر CA)8G) با ۲/۲۱ بود دو توده H16 و H45 با تشابه ۷۵ درصدی در یک گروه مشترک قرار گرفته‌اند و همچنین دو توده F8 و F9 بعد از نقطه برش دارای شباهت حدود ۴۶ درصدی بوده و در یک گروه مشترک قرار دارند. وجود تنوع بالا در سطح این گونه (داخل گروه‌ها) باعث شد تا در ۳۳ توده مورد بررسی، تفکیک واضحی براساس ناحیه جغرافیایی صورت نگیرد. به این صورت که نمونه‌های استان اردبیل در نقطه برش در دو گروه متفاوت قرار گرفتند، توده H9 هم در گروهی جدا از دیگر توده‌های همدان قرار گرفت. توده Y19 با اینکه از نظر مکانی نزدیک به دو توده Y16 و Y18 قرار دارد، ولی نسبت به آنها در دو گروه مجزا قرار گرفته است. در استان همدان نیز این عدم تفکیک توده‌ها بر اساس نواحی جغرافیایی مشاهده می‌شود، به عنوان مثال دو توده H26 و H28 (همدان- سد اکباتان) که در ارتفاعات کمی قرار دارند، به‌ترتیب با دو توده H13 و H11 (همدان- گنجنامه) که در ارتفاعات زیاد قرار دارند، در یک گروه مشترک با شباهت ۰/۵۵ و ۰/۲۷ درصدی قرار دارند. همچنین توده H7 (همدان- ارتفاعات گنجنامه) با توده H36 (همدان-ملایر-جوزان) که در ارتفاعات معمولی قرار دارد نسبت به هم دارای شباهت ۷۰ درصدی بوده و در یک گروه مشترک قرار دارند. همچنین توده H31 (همدان-سد اکباتان) که در ارتفاعات کمی قرار دارد، نسبت به توده H8 دارای شباهت ۶۱ درصدی بوده و در یک گروه قرار گرفته‌اند (شکل ۱). تنوع بالا در بین افراد یک گونه می‌تواند ناشی از سازگار شدن آنها به شرایط جغرافیایی منطقه باشد. در بین افراد یک اکوتیپ، این تنوع می‌تواند ناشی از انتقال ژرم‌پلاسم بین مکان‌ها، اختلاط بذور و یا جریان ژنی بین جمعیت‌ها در هنگام برداشت برای مصارف خوراکی و دارویی توسط انسان باشد. همچنین عدم‌تفکیک و یا شباهت ژنتیکی می‌تواند دلیلی برخاستگاه مشترک نمونه‌ها باشد. به‌طوری‌که محل اصلی رشد خاکشیر در ایران در استان‌های مناطق شمالی، رشته جبال زاگرس و البرز می باشد. بررسی قبلی روی ۱۵ اکوتیپ خاکشیر شیرین در استان کرمان نیز (*آقاعباسی* و *باقی زاده*، 2012) تنوع بالایی را در سطح اکوتیپ‌های مورد بررسی نشان داده است. البته با اضافه نمودن نشانگرهای دیگر و بالا بردن تعداد نشانگرها می‌توان بررسی کامل‌تری در سطح مولکولی صورت داد.

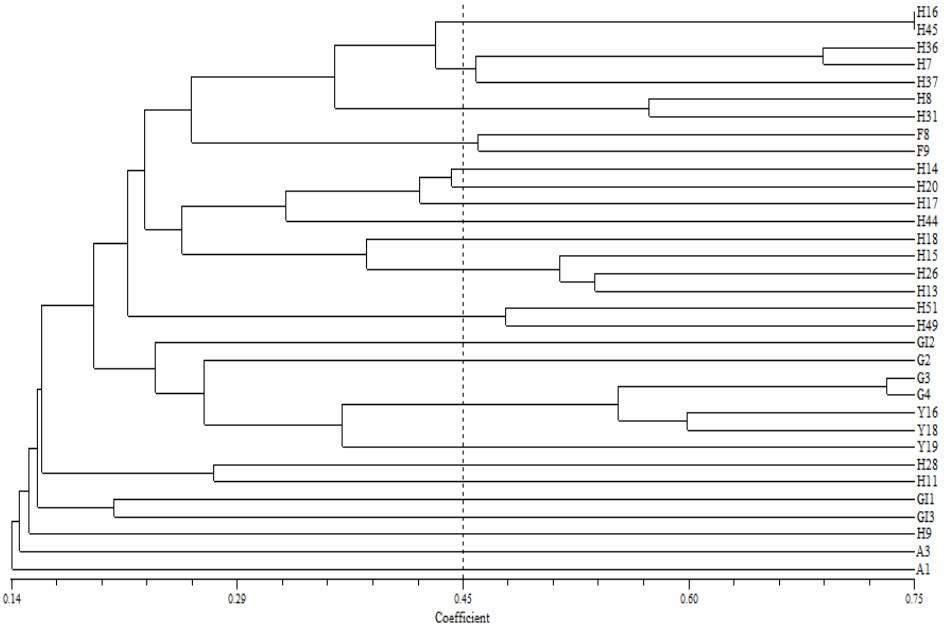
نتیجه واریانس مولکولی نشان داد که بیشترین تمایز درون گروه‌ها، در نقطه برش با ۲۲ گروه در سطح شباهت ۰/۴۵ درصد به‌دست آمد. الگوی کلی از توزیع تنوع مولکولی برای نشانگرها نشان داد که ۱۷ درصد تنوع مربوط به بین توده‌ها و ۸۳ درصد تنوع مربوط به درون توده‌ها می‌باشد (جدول ۳). این نتایج نشان‌دهنده این است که درون نمونه‌های هر یک از گروه‌های یزد، همدان، فارس، اردبیل، گیلان و قم آن قدر اختلاف وجود دارد که امکان معرفی آنها به‌صورت دو گروه مجزا وجود ندارد. این تنوع بالا از این جهت ارزشمند می‌باشد که قدرت انتخاب را برای اصلاح و معرفی لاین‌ها با ویژگی‌های دارویی متفاوت را بالا می‌برد.

دو توده H16 و H45 در یک گروه مشترک قرار گرفته‌اند و دو توده F8 و F9 نیز دارای شباهت حدود ۴۶ درصدی هستند. با مقایسه فواصل فضایی نمونه‌ها در این نمودار با فواصل ژنتیکی حاصل شده از روش تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌ها به‌طور مشابهی از همدیگر جدا شده‌اند. در این روش اکوتیپ‌هایی که در دو ناحیه با فاصله‌ای مشخص از هم قرار دارند، در تجزیه خوشه‌ای نیز به صورت دو گروه اصلی اولیه با سطح شباهت ۱۴ درصد که قبل از نقطه برش در شکل یک قابل مشاهده است، مطابقت دارند (شکل ۲).

جدول ۵: رابطه تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی (IBD)

Table 5: Identity by distance analysis on *Sisymbrium* ecotypes of six locations

	همدان Hamedan	فارس Fars	گیلان Gilan	قم Ghom	یزد Yazd
فارس Fars	0.858	1.000			
گیلان Gilan	0.952	0.815	1.000		
قم Ghom	0.875	0.793	0.882	1.000	
یزد Yazd	0.879	0.811	0.874	0.901	1.000
اردبیل Ardebil	0.946	0.808	0.942	0.868	0.870



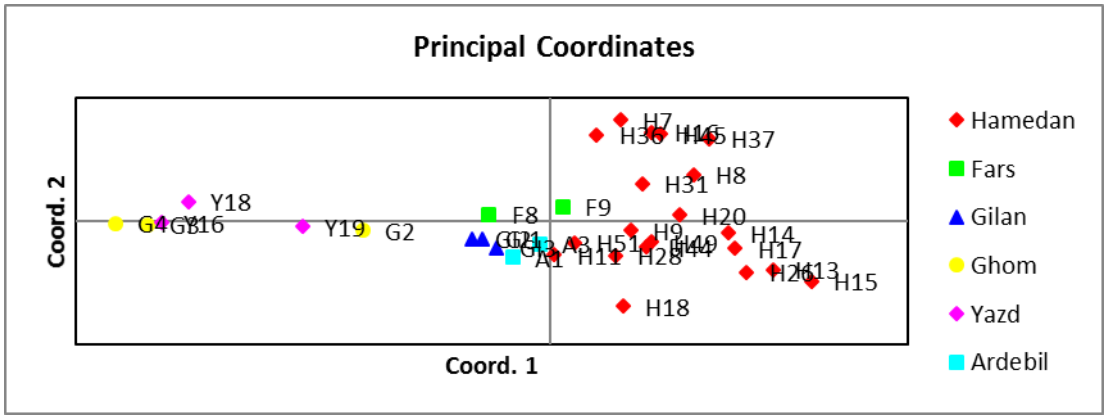
شکل ۱: دندروگرام حاصل از ۱۱ نشانگر ISSR با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد برای ۳۳ اکوتیپ خاکشیر تلخ

Fig. 1: Dendrogram of the 11 ISSR primers using Jaccard's similarity matrix For 33 accessions of bitter *Sisymbrium irio*

محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فراوانی آللی برای هر آغازگر به‌صورت جداگانه به‌دست آمد. کمترین مقدار برای آغازگر (AG)8T با مقدار۲۴/۵ درصد و بیش‌ترین مقدار هم برای آغازگر GGGC(GA)8 با مقدار ۳۸/۵ می‌باشد. همچنین متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی ۳۱/۵ به‌دست آمد. آغازگری که PIC بالاتری را نشان داده است، بدین معنا است که بهتر از بقیه آغازگرها توانسته فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها را مشخص کند. بنابراین می‌توان از این آغازگر جهت مطالعات مشابه بر روی انواع خاکشیر استفاده کرد (جدول ۴).

شاخص نشانگر (MI) معیار کارآیی آغازگر در تخمین چند-شکلی و یا یک معیار کلی برای کارآیی نشانگر در یک ژرم-پلاسم است. حداکثر شاخص نشانگری در آغازگر (AG)8YT با مقدار ۲۱/۸۲ بوده و کم‌ترین هم برای آغازگر (CA)8G با مقدار ۱۱/۹۱ بود. نتایج حاصل از خوشه‌بندی نشان داد که به علت وجود تنوع بالای درون گروهی، تمام اکوتیپ‌های مورد بررسی از استان‌های همدان، یزد، فارس، اردبیل، گیلان و قم به شکل مطلوب جغرافیایی از هم تفکیک نشدند. نتایج تجزیه IBD (Identity by distance) برای بررسی رابطه تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی نشان می‌دهد که نمونه‌های دو استان گیلان و همدان شباهت ژنتیکی بیشتری نسبت به هم داشته درحالی‌که نمونه‌های دو استان فارس و قم از فاصله ژنتیکی بیشتری برخوردار هستند (جدول ۵). اضافه نمودن نمونه‌های بیشتری از هر منطقه، می‌تواند به ارائه تصویری بهتر کمک نماید. استفاده از نشانگرهای دیگر در انواع مختلف نیز می‌تواند

به بررسی دقیق‌تر این توده‌ها کمک نماید. این عدم تطابق تنوع جغرافیایی می‌تواند در اثر عوامل مختلفی ازجمله خاستگاه مشترک نمونه‌ها و یا مهاجرت نمونه‌ها به منطقه‌ای جدید و دور شدن از منشأ اولیه خود نیز باشد.



شکل ۲: نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر مبنای ماتریس تشابه جاکارد

Fig. 2: Two-dimensional plot of principal coordinates analysis based on Jaccard's similarity matrix

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۹-۱۸ متن انگلیسی مراجعه شود.