ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰
صفحه ۸۷-۷۹

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی ختمی (*Althaea & Alcea spp* L.) با استفاده از نشانگرهای AFLP

ترانه دستمالچی[*۱]، منصور امیدی[۲]، سپیده ترابی[۳]، حسن مداح عارفی[٤]، علیرضا اطمینان[٥]، محمدحسین حسنی[٦]، مرجان بهزادی راد[۷]

۱، ۳ و٦- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه کشاورزی ومنابع طبیعی، تهران، ایران
۷،۲- به‌ترتیب استاد گروه اصلاح نباتات و دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٥،٤- به‌ترتیب رئیس موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر کرج و سرپرست بخش مولکولی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Dastmalchi.tarane@gmail.com

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

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ٤۷ نمونه گیاه دارویی ختمی(*Althaea & Alcea spp* L.) از ایران و چند کشور اروپایی و آسیایی با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر انتخابی AFLP انجام گرفت. در مجموع از ۱۰۲۲ نوار مشاهده شده، جمعاً ۲٥٦ نوار (۲٥/۰٤ درصد) چند شکل بودند. تعداد نوار برای هر ترکیب آغازگری از ٥ تا ٦۰ متغیر بود. ترکیب آغازگری (*Eco*RI(AGG) *Mse*I(GAG)، با ٦۰ نوار و ترکیب آغازگری (*Eco*RI(ACT)، (*Mse*I(CAA با ٥ نوار به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد نوار چند شکل تولیدی را به خود اختصاص دادند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) در کل ٤۷ نمونه به‌ترتیب برابر با ۰/۷۸٦ و ۱٦/٦٥ محاسبه شدند. ترکیب آغازگری M(CAA)، E(ACT) و E(AGG)، M(GAG) بیش-ترین (۰/۹٤۰و٥٦/٤۲) و کم‌ترین (۰/٥۰٤و۲/٥۲) مقدار PIC و MI را به‌ترتیب داشتند. گروه بندی نمونه‌ها با استفاده از الگوریتم UPGMA و با ضریب تشابه Dice، نمونه‌های مورد مطالعه را در تشابه ژنتیکی ۷۳ درصد به ۳ گروه اصلی تفکیک نمود، که تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز آن را تایید کرد. دامنه تغییر تشابه ژنتیکی بین ۲٥/٥٥ درصد تا ۹۳/٥٥ درصد و با میانگین ٥۹/٥٥ درصد در ٤۷ نمونه مورد مطالعه و ٥۲/٦۷ درصد تا ۹۰/۱۸ درصد و با میانگین ۷۱/٤۲ درصد در نمونه‌های ایرانی اندازه گیری شد. براساس این نتایج چنین استنباط می‌شود که نمونه‌های مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی پائینی برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی، چندشکلی، گیاه دارویی ختمی، نشانگرAFLP.

مقدمه

ختمی گیاهی دارویی، از خانواده پنیرک (*Malvaceae*)(۸)، با پراکندگی عمده در مناطق گرمسیری است (۱٦). ویژگی دارویی گونه‌های بیشماری از آن در سبک‌های درمانی مختلف در طول تاریخ مورد استفاده قرار گرفته است (۲۹). ختمی دارای دو جنس *Alcea* و *Althaea* می‌باشد (۲۱). هر دو جنس به دلیل داشتن سلول‌های لعاب دهنده (موسیلاژ) در اندام‌ها (برگ، گل و ریشه)، در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی (۲) و صنعت نفت (۳۱) کاربرد فراوان دارند، هم‌چنین در حفاظت خاک، احیاء پوشش گیاهی و تثبیت وضع مراتع نیز حائز اهمیت‌اند (۳). در سال‌های اخیر، به دلیل جایگزین شدن گونه‌های زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از گونه‌ها و ارقام بومی و محلی دارویی به فراموشی سپرده شده و از سیستم‌های زراعی ایران حذف شده‌اند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

بنابراین بررسی وضعیت تولید گیاهان دارویی و معطر و نقش این گیاهان در ایجاد تنوع در بوم نظام‌های زراعی ایران بسیار مورد اهمیت می‌باشد (۹). تاکنون هیچ تحقیقی در جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گیاه ختمی با کمک نشانگرهای DNA درجهان انجام نشده است و از آنجا که شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی، امری بنیادی برای طراحی موفق برنامه‌های به نژادی بوده و در آسان نمودن مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی نقش بسزایی دارد (۷)، انجام چنین پژوهشی ضرورت پیدا می‌کند. جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود. در بین این روش‌ها، نشانگرهای DNA دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین نشانگرها (۱۷) به دلیل کمک به ترسیم نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی، عدم تاثیرپذیری از محیط داخلی و خارجی موجود و توزیع‌پذیری در سطح ژنوم محسوب می شوند (۱۰). روش AFLP در سال ۱۹۹۵ توسط Vos و همکاران ارائه شد و اساس آن تکثیر انتخابی برخی قطعه‌های برش یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد (۳۵). تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر، غیر حساس بودن به غلظت DNA الگو و تولید تعداد زیاد نوار تکرار پذیر در مدت زمان کوتاه از مزایای این روش می‌باشد (۲۷). در تحقیقی که توسط جونز و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تکنیک AFLP تکرار پذیری بالایی در بین هفت آزمایشگاه اروپایی داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند (۱۵). به‌همین دلیل، در پژوهش حاضر از AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی توده‌های ختمی استفاده گردید. پاکروان و همکاران (۱۳۸۰) با بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ختمی *(Alcea)* با استفاده از الکتروفورز با روش SDS-PAGE در ۲۸ گونه و ٤ واریته، نشان دادند گونه‌های نزدیک از نظر تاکسونومی، در شاخه-های مجاور هم قرار گرفتند و تنها برخی از آن‌ها در شاخه‌های دور از هم واقع شدند. شاهین و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی ارتباط فنتیکی[1] و تنوع داخل و بین ۱۳ گونه مالواسه متعلق به ۵ جنس متفاوت اعلام کردند که AFLP یک ابزار قوی و قابل اعتماد برای انگشت نگاری DNA ونشان دادن ارتباط ژنتیکی در سطوح مختلف تاکسونومیکی *Malvaceae* می‌باشد. تانگ و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی تنوع ژنتیکی درون و میان ۹ جمعیت از*Hibiscus tiliaceus* با نشانگر AFLP اعلام کردند، عامل‌های اکو جغرافیایی و فواصل پراکنش داده‌ها نقش مهمی در تنوع و ساختمان ژنتیکی این گونه‌ها بازی می‌کند. های لربروک و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP و مشخصات مورفولوژی ۳ گونه *Hibiscus* بومی چین و مقاوم به سرما دریافتند، هر دو روش به خوبی ۳ گونه را متمایز می کند، اما شاخص برگ کولتیوارهای متفاوت را در گروه‌های کوچک‌تری گروه‌بندی می‌کند. این پژوهش به‌منظور، ارزیابی پتانسیل به کارگیری AFLP، بهینه‌سازی این روش، بررسی‌های مولکولی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی در گیاه ختمی و رتبه‌بندی ذخایر توارثی این گیاه دارویی از نظر تنوع ژنتیکی موجود در آن، به‌عنوان اساس برنامه‌های اصلاحی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ٤٧ نمونه آسیایی و اروپایی *(Althaea & Alcea spp)* که از ۱۲ استان شامل آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کرج، قزوین، تهران، مرکزی، کرمانشاه، خراسان رضوی، لرستان، اصفهان، یزد و چهارمحال بختیاری جمع آوری شدند و هم‌چنین تعدادی توده که از بانک ژن موسسه جنگل‌ها و مراتع به‌علاوه توده‌هایی متعلق به کشورهای انگلستان، اسپانیا و ژاپن که از بانک‌ژن پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شدند، استفاده گردید (جدول ۱). لازم به ذکر است نمونه‌های شماره ٤١، ٤٢، ٤٣، ٤٤ *(Althaea officinalis)* و نمونه‌های ٤٥، ٤٦، ٤٧ *(Alcea rosa)* و نمونه‌های ۱ تا ٤٠، به‌عبارتی نمونه‌های ایرانی مخلوطی از *(Althaea & Alcea spp)* بودند. ۱۵بذر از هر نمونه در سه تکرار پس از تیمار با اسید جیبرلیک ۵۰۰ppm و قرارگیری در سرما به مدت ٤٨ ساعت در گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (کیلومتر ۵۵ اتوبان تهران –قزوین) در داخل گلدان‌های پلاستیکی کاشت شدند.

[1] Phenetic relationships

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

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

محل جمع آوری	شماره نمونه	محل جمع آوری	شماره نمونه
اصفهان۵	۲۶	کوه های غرب امام زاده داوود	۱
روانسر۲	۲۷	شهران،پارک جنگلی کوهسار	۲
پژوهشکده گیاهان دارویی(قزوین)	۲۸	محمدشهر۱	۳
کرمانشاه	۲۹	چهارمحال بختیاری۱	۴
تهران۲	۳۰	چهارمحال بختیاری۲	۵
تبریز	۳۱	تهران۱	۶
کاشان	۳۲	آبسرد دماوند	۷
ارومیه	۳۳	محمدشهر۲	۸
یزد۱	۳۴	اصفهان۱	۹
نجف آباد	۳۵	روانسر۱	۱۰
یزد۲	۳۶	اصفهان۲	۱۱
البرز۱	۳۷	دربند	۱۲
شهر ری	۳۸	جوانرود	۱۳
ساوه	۳۹	محمدشهر۳	۱۴
البرز۲	۴۰	اصفهان۳	۱۵
اسپانیا۱	۴۱	روستای مراء گیلاوند	۱۶
انگلیس۱	۴۲	کرج	۱۷
اسپانیا۲	۴۳	گیلاوند	۱۸
انگلیس۲	۴۴	خرم آباد	۱۹
ژاپن	۴۵	فریدون شهر	۲۰
انگلیس۳	۴۶	محمدشهر۴	۲۱
انگلیس۴	۴۷	اصفهان۴	۲۲
		مشهد	۲۳
		محمدشهر۵	۲۴
		موسی آباد کاشان	۲۵

استخراج DNA

برای استخراج DNA پس از رشد گیاهچه‌ها، از هر گلدان ۵ گیاه به‌صورت تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و جوان نمونه-برداری صورت گرفت. نمونه‌های گیاهی پس از قرارگیری در ازت مایع بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA منتقل شدند. استخراج DNA از برگ‌های جوان و سالم با روش تغییر یافته سقایی معروف و همکاران (۴،۲۵)، انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. برای اسیدهای نوکلوئیکی که از منابع بیولوژیکی استخراج می‌شوند، محاسبه نسبت ۲۶۰ به۲۸۰ نانومتر برآوردی از میزان پروتئین را در اختیار قرار می‌دهد. در صورتی که DNA عاری از پروتئین باشد این نسبت، ۱/۸ خواهد شد و در صورت آلودگی نمونه با پروتئین یا فنل، نسبت مذکور به پایین تر از ۱/۸ کاهش پیدا می‌کند (۲۸).

تجزیه AFLP

تجزیه AFLP بر اساس روش ووس و همکاران (۳۵) با اندکی تغییر صورت گرفت. ۲۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی با ۵ واحد از آنزیم‌های محدودگر *Eco*RI و *Mse*I تهیه شده از شرکت Fermentas به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C، یک ساعت در دمای ۶۵°C و در مرحله تکمیلی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C برش داده شده سپس آداپتورهای *Eco*RI و *Mse*I در مدت ٤ ساعت در دمای ۲۵°C و ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C به انتهای قطعات برشی متصل شدند. تکثیر قطعات متصل شده به آداپتورها طی دو مرحله انجام گرفت. ابتدا نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت ۳:۱ رقیق شدند و با آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ′۳ با توالی(′5 GACTGCGTACCAATTC+A-3′)برای آغازگر EcoRI و با توالی(5′GATGAGTCCTGAGTAA+C-3′)برای آغازگر *Mse*Iمورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی در این مرحله به تعداد ۲۷ عدد و با برنامه ۹۶ درجه سانتی گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۹۶ درجه سانتی گراد به‌مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲ دقیقه و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

۷۲ درجه سانتی گراد به‌مدت ۵ دقیقه تکثیر شدند. سپس محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۹:۱ رقیق شدند و با ۱۳ جفت آغازگر دارای ۳ نوکلئوتید انتخابی در انتهای '۳ (جدول۲) تحت چرخه حرارتی استاندارد مانند مرحله تکثیر پیش انتخابی و با دمای اتصال ۶۰°C تکثیر گردیدند. قطعات DNA تکثیر شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد (۳۵) جدا شدند (شکل۱). الکتروفورز به مدت ۲ ساعت با بافر 1X TBE و ولتاژ ۱۲۰۰ ولت انجام (۱۱) و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره (۲۶) صورت گرفت و از الگوی باندی بدست آمده با استفاده از دستگاه Densitometer عکس‌برداری شد.

تجزیه داده‌ها

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

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

به‌طوریکه در این فرمول Pi فراوانی نوار i ام و n تعداد نوارها می‌باشد. هم چنین شاخص نشانگر (MI) با استفاده از فرمول شماره دو: (2) MI=PIC.N.β برای کلیه آغازگرها محاسبه شد، که PIC میانگین میزان اطلاعات چند شکلی، N تعداد کل نوارها و β درصد چندشکلی (تعداد جایگاه‌های چند شکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر جفت آغازگر می‌باشد. این شاخص علاوه بر مزایای شاخص PIC، تعداد کل نوار و نسبت چند شکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (۱۹). برای بررسی روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها، داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار (۲۳) NTSYS-pc Ver 2.02 انتقال یافت. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و با ضرایب تشابه Dice انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم افزار DARWIN5.0 مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت و با دو مولفه اول که بیش‌ترین درصد تنوع را توجیه می‌کردند، نمودار دو بعدی جهت گروه‌بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر روی ۴۷ نمونه گیاه ختمی *(Althaea & Alcea spp)*، در مجموع تعداد ۱۰۲۲ نوار حاصل شد که از این تعداد ۲۵۶ نوار (۲۵/۰۴ درصد) چند شکل بودند. برای تفکیک صحیح نمونه‌ها و هم چنین تخمین درست میزان تشابه موجود بین آن‌ها و دقت کافی در امتیاز بندی، حذف نوارهای کاذب (نوارهایی که در اثر رویت اشتباه، تغییر شرایط PCR، هضم ناقص، کدورت ژل و غیره به‌صورت باند دیده می‌شوند) در آنالیز منظور گردید. زیرا عدم دقت در امتیازبندی و وجود نوارهای کاذب سبب می‌شود تا برآورد روابط ژنتیکی بین افراد نادرست باشد (۱۹). میانگین تعداد نوار تکثیر شده و چند شکل به ازای هر ترکیب آغازگری به ترتیب ۷۸/۶۱ و ۱۹/۶۹ بود. مقادیر محتوای اطلاعات چند شکل برای هر جفت آغازگر، به همراه نوع آغازگرها، تعداد نوارهای چند شکل و شاخص نشانگر در جدول ۲ نشان داده شده است. تعداد نوار برای هرجفت آغازگر از ۵ تا ۶۰ متغییر بود. بیشترین تعداد نوار چند شکل مشاهده شده در آغازگر M(GAG), E(AGG) با مجموع ۶۰ نوار و کمترین آنها در آغازگرهای M(CAA), E(ACT) و E(AGG) M(CAA) با ۵ و ۶ نوار، به‌ترتیب مشاهده شدند (شکل۲). تفاوت در تعداد نوارهای مشاهده شده می‌تواند به دلیل منشاء و خصوصیات متفاوت نمونه‌های مورد استفاده و نیز ماهیت تفاوت در نشانگرهای AFLP مورد مطالعه باشد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) به‌طور جداگانه‌ای برای هر جفت آغازگر در کل نمونه‌ها محاسبه شد. آغازگر M(GAG), E(AGG) دارای بیش‌ترین مقدار PIC و برابر با ۰/۹۴۰ و آغازگر M(CAA), E(ACT) دارای کم‌ترین مقدار PIC و برابر ۰/۵۰۴ بود و میانگین این شاخص ۰/۷۸۶ محاسبه شد. بنابراین آغازگر M(GAG),E(AGG) با بیش‌ترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای بکار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص سازد.

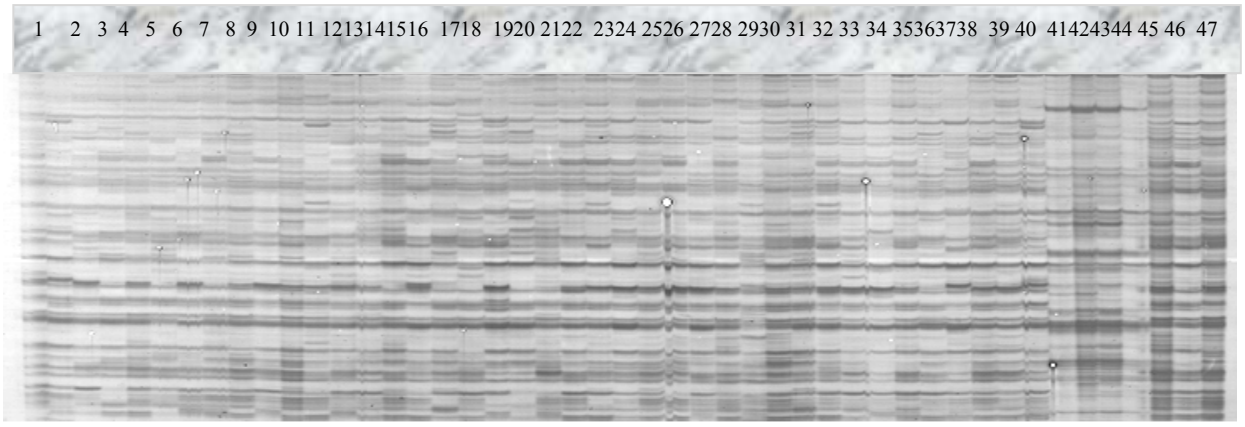
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

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

شماره	نام آغازگر	توالی آغازگری	تعداد کل باند	تعداد باند چند شکل	درصد چند شکلی	محتوای داده های چند شکلی PIC	شاخص نشانگر MI
1	E11-M35	*E-AGG/M-GAG	۸۵	۶۰	۷۰/۵۸	۰/۹۴۰	۵۶/۴۲
2	ETG-M35	E- CTG/M-GAG	۹۴	۲۶	۲۷/۶۵	۰/۸۶۹	۲۲/۶۱
3	E2-M35	E-AAC/M- GAG	۶۸	۲۳	۳۳/۸۲	۰/۸۶۴	۱۹/۸۹
4	E2-M20	E-AAC/M-CAT	۷۹	۲۳	۲۹/۱۱	۰/۸۶۲	۱۹/۸۳
5	E46-M17	E-GTC/M-CAA	۷۶	۲۱	۲۷/۶۳	۰/۸۴۵	۱۷/۷۴
6	E11-M20	E-AGG/M-CAT	۶۳	۲۰	۳۱/۷۴	۰/۸۵۰	۱۷/۰۱
7	E2-M17	E-AAC/M-CAA	۶۹	۱۹	۲۷/۵۳	۰/۸۲۱	۱۵/۶۰
8	E46-M35	E-GTC/M-GAG	۱۰۳	۱۷	۱۶/۵۰	۰/۸۱۴	۱۳/۸۴
9	E8-M20	E-ACT/M-CAT	۱۱۲	۱۴	۱۲/۵	۰/۸۰۰	۱۱/۲۰
10	ETG-M17	E- CTG/M-CAA	۶۴	۱۴	۲۱/۸۷	۰/۷۸۱	۱۰/۹۴
11	ETG-M22	E- CTG/M-CCC	۷۸	۸	۱۰/۲۵	۰/۶۷۹	۵/۴۳
12	E11-M17	E-AGG/M-CAA	۵۶	۶	۱۰/۷۱	۰/۵۹۰	۳/۵۴
13	E8-M17	E-ACT/ M-CAA	۷۵	۵	۶/۶۶	۰/۵۰۴	۲/۵۲
میانگین			۷۸/۶۱	۱۹/۶۹	۲۵/۱۱	۰/۷۸۶	۱۶/۶۵

*آغازگرهای *ECO*RI با E وآغازگرهای *Mse*I با M نشان داده شده‌اند.



شکل۱- الگوی نواری حاصل از ترکیب آغازگری E-AGG/M-GAG در بین ٤٧ نمونه ***(Althaea & Alcea spp)*** مورد بررسی با استفاده از نشانگر AFLP

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

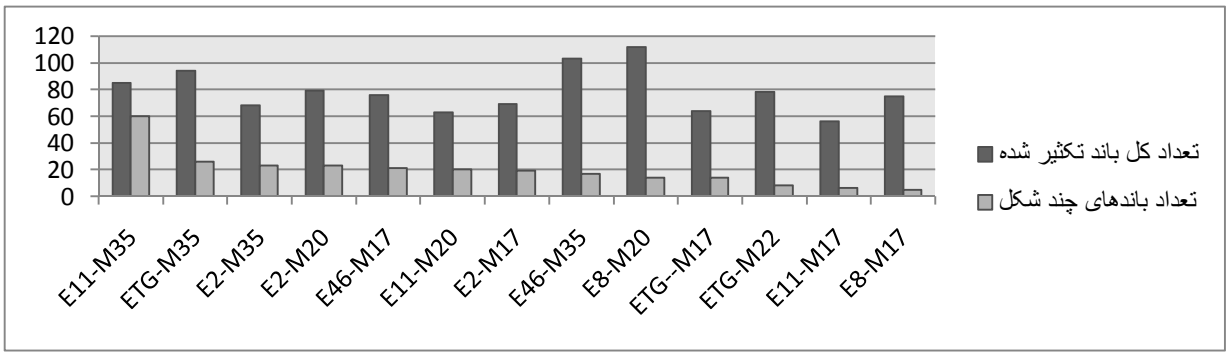
میزان PIC به عواملی مانند تعداد نوارهای هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده (که هم بستگی مثبتی با میزان چند شکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است (۲۲). محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده، نشان داد که بیش‌ترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر M(GAG),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

ضریب کوفنتیک برای تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA[1]، WPGMA[2] (۳۲) و دورترین همسایگی[3] و سه ضریب تشابه تطابق ساده (SM) (۳۳)، جاکارد (۱۴) و دایس(۱۸)، نشان داد که گروه‌بندی بر اساس ضریب دایس با ضریب کوفنتیک[4] ۰/۹۸۳ بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های فوق به دلیل داشتن بیش‌ترین تطابق بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی است (شکل۳). بیش‌ترین شباهت مشاهده شده مربوط به نمونه‌های ۴۵ و ۴۶ از ژاپن و انگلیس ۳ و برابر ۹۳/۵۵ درصد و در نمونه‌های ایرانی مربوط به نمونه ۷ و ۸ از محمدشهر ۲ و آبسرد دماوند و برابر ۹۰/۱۸ درصد بود. بیش‌ترین تنوع ژنتیکی مربوط به نمونه شماره ۴۳ و ۲ از اسپانیا ۲ با شهران برابر ۲۵/۵۵ درصد تشابه نسبت به سایر نمونه‌ها و در میان نمونه‌های ایرانی مربوط به نمونه شماره ۱۲ از دربند با ۱۹ از خرم آباد با ۵۲/۶۷ درصد تشابه بود. بنابراین میانگین تشابه ژنتیکی در کل ۴۷ نمونه برابر ۵۹/۵۵ درصد و در نمونه‌های ایرانی ۷۱/۴۲ درصد محاسبه شد. پس از برش خوشه بندی داده‌های حاصل از AFLP در ضریب تشابه ۷۳ درصد، ۴۷ اکسشن مورد مطالعه در سه گروه، قرار گرفتند، به صورتی که گروه یک و سه خود شامل ۲ زیر گروه مجزا بود. نتایج تجزیه (PCoA) نیز گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تائید کرد.

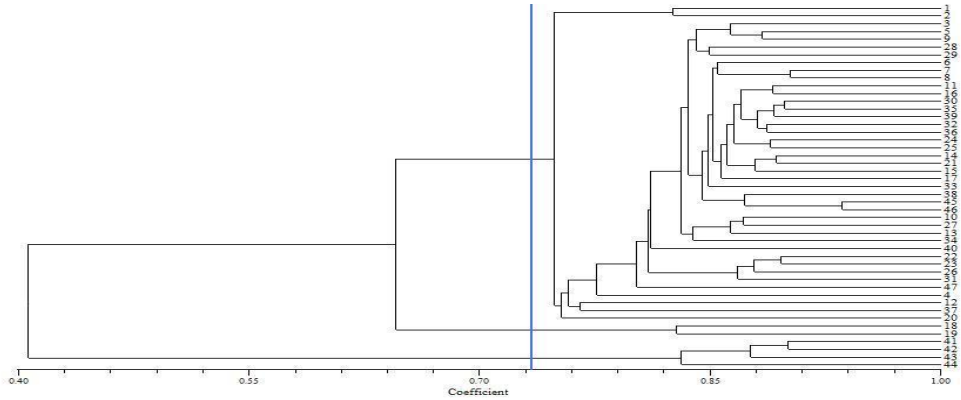
به‌طوری که گروه‌های حاصل از دسته‌بندی نمونه‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای در نمودار تجزیه به مختصات اصلی دیده می‌شود که این مساله موید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح نمونه‌هاست. گروه یک و دو شامل تمام نمونه-های ایرانی از مناطق مخلف جغرافیایی کشور، به همراه ۳ نمونه خارجی در گروه یک بود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

[1] Unweighted pair group method with arithmetic mean
[2] Weighted pair group method with averaging
[3] Complete linkage
[4] Cophenetic cofficient

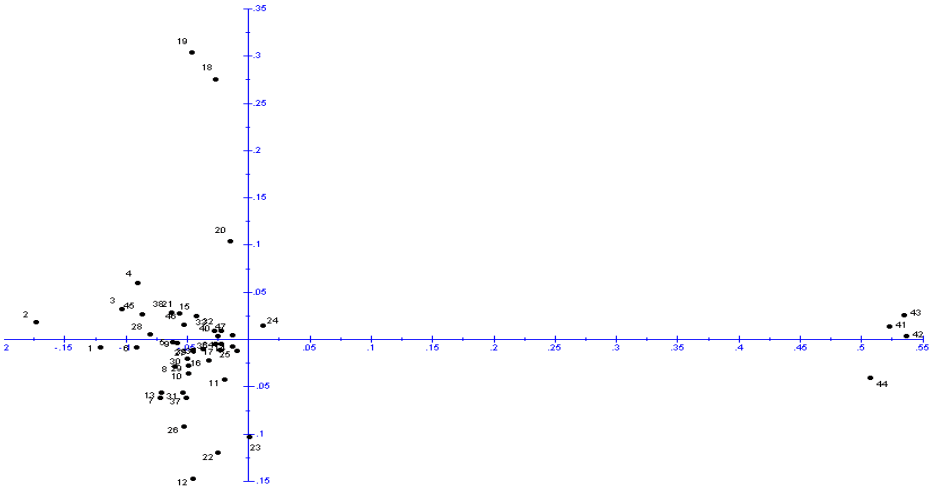
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]



شکل۲- تعداد باندهای تکثیر شده و چند شکل آغازگرها در نمونه‌های مورد مطالعه



شکل۳- گروه‌بندی نمونه‌های گیاه ختمی (*Althaea & Alcea spp*) با روش UPGMA بر اساس داده‌های AFLP
(نمونه‌ها بر اساس جدول ۱ شماره گذاری شده‌اند)



شکل٤- نمودار دو بعدی تجزیه PCoA در ٤٧ نمونه از گیاه ختمی *(Althaea & Alcea spp)*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

نتایج گروه‌بندی داده‌های مولکولی با مناطق جغرافیایی در بسیاری از موارد با یکدیگر تطابق داشت، رولدن رویز و همکاران (۲۰۰۰) معتقدند در مواردی که نامتجانسی و تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی زیاد باشد، احتمال عدم تطابق بین تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی بیش‌تر است، بنابراین این تطابق در نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین در بین آن‌ها می‌باشد. برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین ارقام و هم-چنین مشاهده آن به‌صورت چند بعدی، تجزیه به مختصات اصلی نیز مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد (۵). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) (شکل٤) نشان داد که مولفه‌های اول و دوم به‌ترتیب ۵۰/۲٤ و ۱۰/٦۵ درصد از تغییرات نمونه‌ها را (که توسط آغازگرها مشاهده شد)، در بر می‌گیرند، به‌طوری که در نمودار دوبعدی در مجموع ٦۰/۸۹ درصد تغییرات توجیه می‌شود. در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها توزیع یکنواخت داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را تا حدودی پوشش دهند، بنابراین اگر نشانگر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، هم‌بستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیش‌تری مولفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است (۱). نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد آنالیز در این تحقیق، تنها بخشی از ژنوم را مورد پوشش قرار داده‌اند چرا که درصد بیش‌تری از تنوع بین ارقام به وسیله مولفه اصلی اول توجیه گردیده است (۵). در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که به‌دلیل وجود تعداد کم نوارهای پلی مورفیک برای گروه‌بندی نمونه‌های ختمی، متوسط ضریب تشابه بالا در نمونه‌های ایرانی (۷۱/٤۲ درصد) و در کل نمونه‌ها (۵۹/۵۵ درصد) و در نتیجه مشاهده تنوع پایین در بین نمونه‌های مورد مطالعه، تجزیه وتحلیل AFLP پتانسیل پایینی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌های ختمی با ۱۳ جفت ترکیب آغازگری معرفی شده در این پژوهش دارد و ضرورتی برای افزایش تعداد آغازگر تشخیص داده می شود. لذا اظهار نظر قطعی در این زمینه، نیازمند بررسی تعداد نمونه بیش‌تری از هر منطقه، استفاده از تعداد آغازگر بیش‌تر، آنزیم‌های مختلف و هم‌چنین استفاده از نشانگرهای دیگر است. این اولین مطالعه در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای DNA در گیاه ختمی دارویی در جهان می-باشد و می‌تواند به‌عنوان اولین گام برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسنده این مقاله برخود لازم می‌دارد، از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (کیلومتر ۵۵ اتوبان تهران- قزوین) بدلیل تامین هزینه مالی و از جناب آقای دکتر نقوی (مدیر گروه پژوهشی بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران) به‌خاطر راهنمایی‌های علمی‌شان، سپاسگزاری نماید.

منابع

۱. احکامی ا (۱۳۸٤) استفاده از نشانگرهای AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم *Triticum durum*، پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. بقالیان ک (۱۳۷۸) اثر رطوبت خاک و هوا بر کمیت وکیفیت موسیلاژ اسفرزه، پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته علوم باغبانی، دانشگاه تهران.

۳. پاکروان فرد م (۱۳۸۰) بررسی سیستماتیک جنس ختمی (Alcea) از تیره پنیرک (Malvaceae) در ایران، رساله برای دریافت درجه دکتری در رشته گیاهشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

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

۵. رهایی م، سید طباطبائی ب ا، شاه نجات بوشهری ع ا، عبدمیشانی س، و ملبوبی م ع (۱۳۸۲) استفاده از تکنیک AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در کلزا (Brassica nupus L.)، نهال و بذر۱۹:٤۸۱-٤٦۹.

٦. زرگری ع (۱۳٦۸) گیاهان دارویی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران .

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]

۷. شاهسواران ا (۱۳۸۰) کاربردهای بیوتکنولوژی گیاهی و اهمیت آن برای کشور، شبکه تحلیلگران تکنولوژی ایران.

۸. قهرمان ا (۱۳۵٤-۱۳۸۵) فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها ومراتع-بخش گیاه‌شناسی.

۹. کوچکی ع، نصیری محلاتی م، و نجفی ف(۱۳۸۳) تنوع زیستی گیاهان دارویی و معطر در بوم نظام های زراعی ایران، مجله پژوهش های زراعی ایران، ج ۲، ش۲: ۲۰۸-۲۱٦.

۱۰. نقوی م، قره یاضی ب، و سالکده ق (۱۳۸٦) نشانگر های مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران.

11. Chen MM, Feng F,Xin S and Han S (2010).Genetic linkage maps of *Pinus Koraiensis* Sieb.et Zucc.based on AFLP markers.African journal of Biotechnology.Vol.9(35), pp 5659-5664.

12. Dreisigacker S, Zhang P, Warburton ML, Van Ginkel M, Hoisington D, Bohn M and Melchinger AF (2004) SSR and pedigree analysis of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega environments.Crop Science, 4, 381-388.

13. Huylenbroeck JM, Riek JD and Loose MD (2000) Genetic relationships among Hibiscus Syriacus, Hibiscus Sinosyriacus and Hibiscus Paramutabilis revealed by AFLP, morphology and ploidy analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 47,335-343.

14. Jaccard P(1901) Etude comparative de la distribuition florale dans une portion des Alpes et des. Jura, Bulletin Societe Vandoise des sciences naturelles 37: 547-579.

15. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO,Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B,Matthes M, Daly A,Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M,Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R,Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A and Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP andSSR markers in plants by network of European laboratories. Mol. Breed. 3:381-390.

16. La Duke JC and Doebley J (1995) The chloroplast DNA based phylogeny of the Malvaceae. Syst. Bot. 20(3),259-271.

17. Naghavi MR,Mardi M,Ramshini HA and Fazelinasab B (2004) Comparative analysis of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iranian Journal of Biotechnology, 2(3), 195 – 202.

18. Nei M and Li W(1979)Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of National Academic Science, (USA) 76:5269-5273.

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

20. Prasad M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS and Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theor. Appl. Genet.100: 584-592.

21. Rechinger KH and Hedge IC (1986) Umbilliferae. In: Rechinger K H. Flora Iranica.Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstatit, (Vol 162).

22. Roder MS,Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P and Ganal MW (1998) Amicrosatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023.

23. Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter software, Setauket. New York.

24. Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van-Bockstaele E, Depicker A and De-Loose M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). Mol Breed, 6, 125–134.

25. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allad RW (1984) DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc.National. Acad. Sci. USA. 81: 8014-8018.

26. Sanguinetti CJ, Dias Neto E and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.Biotechniques. 17, 915-919.

27. Sasanuma T, Chabane K, Endo TR and Valkoun J (2002) Genetic diversity of wheat wild relatives in the Near East detected by AFLP. Euphytica 127: 81-93.

28. Seidman LA (2008) Basic laboratory calculations for biotechnology. Pearson Pub. P. 482.

29. Shaheen N, Khan MA,Yasmin G and Hayat MQ (2009) Pollen morphology of 14 species of Abutilon and Hibiscus of the family Malvaceae(sensu stricto). J. Medical Plants Research.3(11),921-929.

30. Shaheen N,Pearce S R, Khan MA, Mahmood T, Gh Yasamin and Hayat MQ (2010) AFLP mediated genetic diversity of malvaceae species.Medicinal Plant Research Vol. 4(2), pp. 148–154.

31. Simpson BB and ogorzaly MC (1986) Economic botany.McGraw- Hill,Inc., Singapore.640p.

32. Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy(Freeman, San Francisco), pp. 227-240.

33. Sokal RR and Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Scientific Bulletin 38: 1409-1438.

34. Tang T, Zhong Y, Jian S and Shi S (2003) Genetic diversity of Hibiscus tiliaceus (Malvaceae) in China Assessed using AFLP markers.Annals of Botany,92,409-414.

35. Vos P, Hogers R,Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M,Frijters A, Pot J, Wheeler T, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP:a new technique for DNA fingerprinting.Nucleic Acids Research,23:4407-4414.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.3.10.2]