

ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در هفت گونه مختلف بومادران با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR

The evaluation of genetic diversity between and within species in seven different species of *Achillea* accessions using SSR molecular markers

فاطمه نژادی^۱، عزت کرمی^{۱*}، فرزاد فیاض^۱، هوشمند صفری^۲، عبدالرحمن رحیمی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سنندج، دانشگاه آزاد

اسلامی، سنندج، کردستان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

Nezhadi F¹, Karami E^{*1}, Fayyaz F¹, Safari H², Rahimi A¹

1- PhD Student, Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Kurdistan, Iran

2- Assistant Professor, Faculty member of Kermanshah Agricultural Education and Research Center, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ezzatut81@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳)

چکیده

بومادران (*Achillea. spp. L*) یکی از گیاهان دارویی مهم در درمان بیماری‌ها و صنایع غذایی محسوب می‌شود، با این وجود هنوز گزارش‌های محدودی در مورد تنوع و روابط ژنتیکی گونه‌های بومادران در کشور وجود دارد. لذا تحقیق حاضر به منظور (۱) ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای برخی گونه‌های خودروی جنس بومادران (*Achillea*) در سطح شهرستان سنندج و حومه با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و (۲) بررسی کارایی و پتانسیل نشانگرهای ریزماهوره‌ای (SSR) در تفکیک و تمایز گونه‌ها و اکسشن‌های مورد بررسی جنس بومادران انجام گرفت. برای نائل شدن به این هدف، تنوع ژنتیکی در ۲۸ اکسشن بومادران متعلق به هفت گونه خودروی با استفاده از ۱۶ جفت نشانگر SSR ارزیابی شد. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB از برگ‌های تازه و نرم گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای حاصل از کشت بذر اکسشن‌ها به صورت بالک صورت گرفت. محصولات حاصل از تکثیر با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز متافور ۲/۵ درصد جدا شده و با دستگاه ژل داکيومنت عکس‌برداری شد. از نرم‌افزارهای GenAEx 6.2، PopGene، DARwin 5 و PASTv3.18 برای محاسبه پارامترهای ژنتیکی، تجزیه واریانس مولکولی، ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد. تعداد ۱۲ جفت آغازگر پلی مورف SSR، مجموعاً ۵۶ آلل را در بین گونه‌های مورد بررسی جنس بومادران شناسایی نمودند. متوسط درصد چند شکلی و تعداد آلل چند شکل به ترتیب برابر ۸۲/۵۶ درصد و ۳/۹۲ بود. متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برابر ۰/۳۲۴ بود. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی ۶۴ درصد واریانس موجود، درون گونه‌ای و ۳۶ درصد به واریانس بین گونه‌ای اختصاص داشت. متوسط ضریب تشابه کل بین گونه‌ها و بین جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۵۸۸ بود. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها را تا حد بالایی از همدیگر تفکیک نمود (۸۲٪) و گونه‌های مورد مطالعه را نیز در سه گروه مجزا قرار داد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای و ماتریس تشابه قابل مقایسه و تا حدود زیادی آن‌ها را تأیید نمود. به طور کلی اکسشن‌های مورد بررسی بومادران تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی نشان دادند، به طوری که بیشترین مقدار آن متعلق به تنوع درون گونه‌ای بود. همچنین نشانگرهای SSR سودمندی و پتانسیل بالایی در تشخیص تنوع ژنتیکی، تفکیک و تمایز جمعیت‌ها و گونه‌ها داشتند. لذا این نشانگرها در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های اهلی نمودن و به‌نژادی این گیاهان کمک شایانی خواهند نمود.

واژه‌های کلیدی

آغازگر

تجزیه به مختصات اصلی

تجزیه خوشه‌ای

ضریب تشابه

محتوی اطلاعات چند شکلی

مقدمه

جنس بومادران^۱ دارای حدود ۱۳۰ گونه است که پراکنش آن از جنوب شرق اروپا تا جنوب شرقی آسیا بوده و از طریق اوراسیا به آمریکای شمالی گسترش یافته است. گونه‌های این جنس سازگاری قابل توجه با شرایط زیست محیطی متفاوت نشان می‌دهند و از بیابان‌ها و سواحل دریایی تا مناطق صخره‌ای گسترش دارند. گیاهان این جنس چند ساله و دگرگرده افشان هستند که گرده افشانی آن‌ها توسط حشرات می‌باشد (Guo et al. 2004). در ایران ۱۹ گونه علفی از این جنس وجود دارد، دیگر گونه‌های این جنس علاوه بر ایران در عراق، آناتولی، سوریه، قفقاز، لبنان، فلسطین، روسیه مرکزی، ماورای قفقاز، ترکمنستان، افغانستان، آسیای جنوب غربی و آسیای مرکزی نیز می‌رویند (Mozaffarian 2009). از این گیاه در طب سنتی به‌عنوان اشتهاآور، التیام دهنده‌ی زخم، ادرار آور، ضد نفخ، ضد تب، ضد التهاب و مسکن سرفه استفاده شده است (Trumbeckaite et al. 2011). علاوه بر این گیاه بومادران از اهمیت بسزایی در صنایع آرایشی و بهداشتی برخوردار است (Cavalcanti et al. 2006). با وجود اینکه بومادران یکی از گیاهان دارویی پرمصرف بازار جهانی در درمان بیماری‌ها و صنایع غذایی محسوب می‌شود، هنوز در کشور ما اطلاعات کافی در زمینه توده‌های بومی خالص شده موجود در کشور وجود نداشته و رقم اصلاح شده‌ای از آن معرفی نشده است (Taheri et al. 2016b).

تنوع ژنتیکی اساس مطالعات اصلاحی در گونه‌های گیاهی است، اما تاکنون فقط یک گام مقدماتی برای شناسایی پتانسیل وسیع آن برداشته شده است. کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر، امکان سازمان‌دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی را فراهم می‌سازد (Guo et al. 2008). مطالعات تنوع ژنتیکی گونه‌های دارویی در دو دهه گذشته عمده‌تاً با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی، متابولیتی و اخیراً مولکولی انجام شده است. در بررسی تنوع توده‌های یک گیاه دارویی هر یک از انواع این

نشانگرها با توجه به هدف و شرایط ممکن است از کارایی بالاتری برخوردار باشند (Taheri et al. 2016b). با تحقیقات متعدد ثابت شده است که نشانگرهای مولکولی ابزارهای ارزشمندی برای توصیف و ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها و جمعیت‌ها هستند. همچنین نشان داده شده است که نشانگرهای مختلف ممکن است انواع مختلفی از تغییرات را نشان دهند (Powell et al. 1996). (Wallner et al. 1996) کارایی تکنیک RFLP و روش‌های انگشتنگاری مبتنی بر PCR برای تعیین ویژگی کلونی‌های ریز اذیادی شده *Achillea* را ثابت نمودند. (Wallner et al. 1996) پایداری انگشت نگاره‌های الیگونوکلوئیدی و نشانگرهای RAPD را برای تشخیص ۲ گونه *Achillea* در طول ریزازدیادی این گونه‌ها را ارزیابی نمودند. در همین راستا (Morsy 2007) تنوع مولکولی ۵ جمعیت (*Forssk*) *Achillea fragrantissima* در مصر با استفاده از نشانگرهای RAPD و ایزوزیمی^۲ را گزارش نمود. (Gharibi et al. 2011) نشانگرهای ISSR را برای بررسی تنوع ژنتیکی در دو زیرگونه بومادران *Achillea millefolium* مورد استفاده قرار دادند. (Gharibi et al. 2011) نشانگرهای ISSR و مورفولوژیکی را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در چندین اکسشن بومادران از مناطق مختلف جغرافیایی ایران به‌کار گرفتند. با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR ۲۲۸ نوار تکثیر شد که ۱۹۹ مورد از آن‌ها (۸۷/۲۸٪) چند شکل بودند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای و مختصات اصلی^۳ نشان داد که اکثر ژنوتیپ‌ها بر اساس مناطق جغرافیایی آن‌ها گروه‌بندی شده‌اند. نتایج تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی در اکثر موارد با نتایج به‌دست آمده از طریق تجزیه و تحلیل مولکولی مطابقت داشت. (Rahimalek 2012) از نشانگرهای مولکولی ISSR و نشانگرهای مورفولوژیکی برای تشخیص تنوع ژنتیکی در چندین ژنوتیپ *Achillea tenuifolia* از مناطق مختلف جغرافیایی ایران استفاده نمود. طوری‌که با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ISSR مجموع ۲۴۷ باند حاصل شد که از این تعداد، ۲۱۴ باند (۸۷٪) چند شکل بودند. داده‌های حاصل، گروه‌های مناطق شمالی، شمال غربی و مناطق مرکزی را از همدیگر تفکیک نمود. تعداد ۳۷

^۲ Isozyme^۳ PCoA^۱ *Achillea*

اکسشن از گونه‌ی *A. millefolium* با استفاده از ۷ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۷۲ باند تولید شد که همه‌ی آن‌ها چند شکل بودند، که بر اساس الگوی باندی به دست آمده اکسشن‌ها در ۶ گروه قرار گرفتند و زیر گونه‌ی *Elburcensis* که بومی شمال ایران بود از دیگر اکسشن‌ها تفکیک شد (Farajpour et al. 2012). (Ebrahimi et al. 2012) با استفاده از هفت آغازگر ISSR و نه آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی ۱۶ اکسشن بومادران متعلق به دو گونه بومی ایران را مورد بررسی قرار دادند. مجموعاً ۱۸۷ قطعه تکثیر شدند، که از این تعداد ۱۵۹ قطعه چند شکل (۸۵٪) بود. ضریب شباهت میان توده‌های *Achillea tenuifolia* بین ۶۱ تا ۸۶ درصد و از ۴۰ تا ۸۴ درصد میان اکسشن‌های *A. santolina* متغیر بود. شباهت کمی بین این دو گونه مشاهده شد (میانگین شباهت = ۰/۳۶)، طوری که این شباهت کم با توزیع جغرافیایی آن‌ها نیز مطابقت داشت. (2016) Badr at al. در آزمایشی تنوع ژنتیکی ۲۰ جمعیت بومادران از گونه *A. fragrantissima* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مصر را با استفاده از نشانگر ISSR و ۲۸ صفت کمی و کیفی مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به دست آمده در میان جمعیت‌های جمع‌آوری شده از ارتفاعات سینا و مناطق دیگر، تنوع معنی‌داری وجود داشت، همچنین تعداد هفت باند اختصاصی مرتبط با خصوصیات کیفی شناسایی شد. در آزمایشی تنوع درون گونه‌ای تعداد ۱۸ جمعیت بومادران گونه *A. collina* با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت که در مجموع ۱۸۸ باند تولید شد، از این تعداد ۹۷/۳۴ درصد از آن‌ها چند شکل بودند و بر همین اساس گزارش شد که نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومادران اطلاعات مناسبی را ارائه می‌نماید (Inotai et al. 2016). استفاده از میکروساتلیت‌های SSR رویکرد موفقی را برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاح نباتات فراهم می‌نماید (Powell et al. 1996).

توسعه و استفاده از توالی‌های ساده تکرار شونده (نشانگرهای SSR) مرتبط با صفات خاص، امکان انتخاب ژنوتیپ‌های مطلوب را به جای فنوتیپ‌ها می‌دهد و از این رو می‌تواند برنامه‌های اصلاح نباتاتی را تسریع نماید. بنابراین، توسعه نشانگرهای SSR

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط فیلوژنتیکی گونه‌های *Achillea* و حتی جنس‌های مربوط به آن در قبیله Anthemideae بسیار مهم و حیاتی است. (Rahimmalek et al. 2011) با استفاده از ۳۰ جفت آغازگر SSR تنوع ژنتیکی ۲۶ اکسشن *A. millefolium* را مورد بررسی قرار دادند که ۱۶ جفت از آن‌ها چند شکل بودند. میانگین تعداد آل‌های تکثیر شده توسط نشانگر SSR برابر ۸/۵ در هر مکان بود و برای تمام مکان‌ها از ۲ تا ۱۴ متغیر بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده^۱ از ۰ تا ۰/۹۶ با میانگین ۰/۵۲ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار^۲ از ۰/۰۷ تا ۰/۴۹ با میانگین ۰/۳۹ متغیر بود. بیشترین و کمترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکلی میان آغازگرهای مورد استفاده به ترتیب مربوط به آغازگرهای Am142 و Am59 با میانگین ۰/۳۳ بود. تجزیه کلاستر و مختصات اصلی^۳ اکسشن‌های *A. millefolium* را با توجه به توزیع جغرافیایی آن‌ها طبقه‌بندی نمودند و گونه *A. tenuifolia* را به طور کامل از ژنوتیپ‌های *A. millefolium* جدا نمودند. Mason (2016) در بررسی نشانگر SSR بیان داشت که SSRها از نشانگرهای بسیار مطلوب برای بررسی ژنوتیپ‌های گیاهی هستند، که در ۲۰ سال اخیر به دلیل نشان دادن سطح بالایی از چند شکلی در بین جمعیت‌های گونه‌های گیاهی استفاده وسیعی داشته است و برای سال‌های آینده نیز به عنوان یکی از ابزارهای مهم بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی مورد استفاده خواهد بود. (Meyer et al. 2017) تنوع ژنتیکی گونه *Ambrosia artemisiifolia* L. را بر اساس ۱۳ آغازگر SSR و ۱۳ آغازگر EST-SSR مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌های شمال آمریکا و جمعیت‌های اروپا وجود دارد، همچنین آن‌ها بیان داشتند که نشانگر SSR دارای کارایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه‌ی مورد بررسی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر (۱) ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای برخی گونه‌های خودروی جنس بومادران در سطح شهرستان سمنان و حومه با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و (۲) بررسی کارایی و پتانسیل این

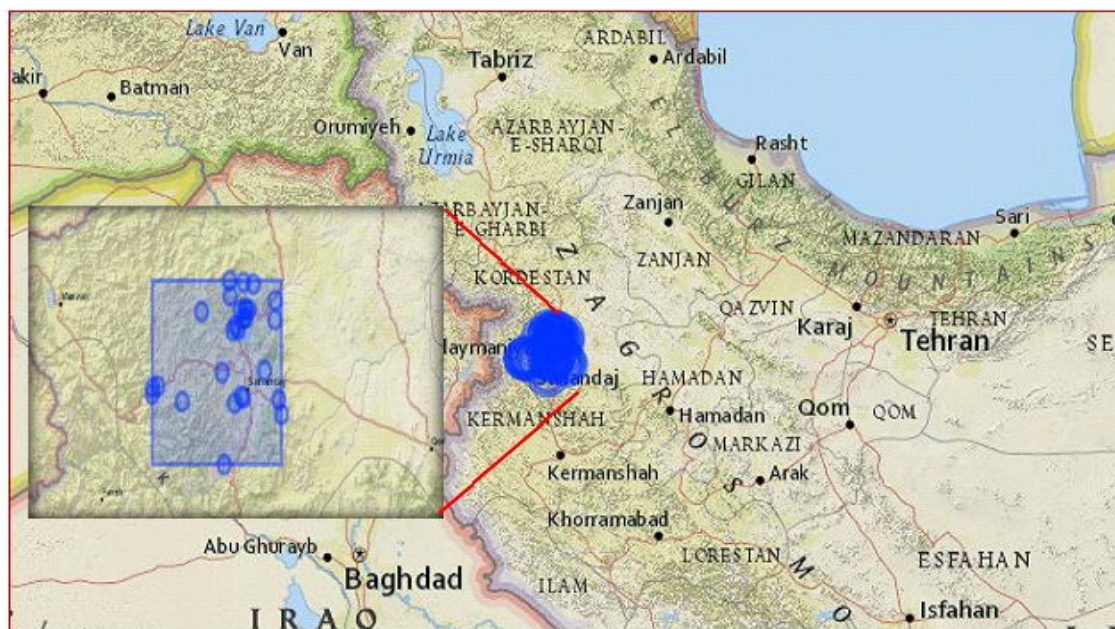
¹ HO² HE

نشانگرها در تفکیک و تمایز گونه‌ها و اکسشن‌های مورد بررسی جنس بومادران بود.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در برخی گونه‌های خودروی جنس بومادران با استفاده از شاخص‌های مولکولی، ۲۸ جمعیت (با ۳ نمونه) از ۷ گونه شامل *A. aleppica*, *A. tenuifolia*, *A. vermicularis*, *A. millefolium*, *A. talagonica* و *A. wilhelmsii*, *A. biebersteinii* جغرافیایی شهرستان سندج و حومه آن جمع‌آوری شد. این منطقه در طول جغرافیایی $35^{\circ}19'00''N$ و عرض $59^{\circ}46'45''E$ شرقی و

شمالی واقع شده است. برای این منظور، ابتدا ۴ جمعیت از هر گونه را شناسایی و پس از آن موقعیت جغرافیایی و اطلاعات زمین شناسی آن‌ها با دقت ثبت شد. برای شناسایی هر گونه، نمونه‌ای از هر نقطه جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی ذکر شده در فلور گیاهی ایران، نوع گونه در آزمایشگاه به دقت تشخیص داده شد (Ahmadi et al. 2013). شکل (۱) موقعیت جغرافیایی دقیق هر مکان را نشان می‌دهد. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر نام گونه، کد جمعیت، منشاء و مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- موقعیت نمونه‌های جمع‌آوری شده روی نقشه جغرافیایی منطقه

جدول ۱- کد جمعیت، منشاء و مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌های ۲۸ جمعیت مورد بررسی از ۷ گونه‌ی جنس *Achillea*

کد جمعیت	گونه	منشاء	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا
AL1	<i>A. Alppica</i>	Park kodak	۶۷۹۷۳۸	۳۹۰۷۶۶۲	۱۶۹۶
AL2	<i>A. Alppica</i>	Salvat Abad	۶۹۴۱۴۰	۳۹۰۷۲۲۳	۲۰۱۴
AL3	<i>A. Alppica</i>	Hassan Abad	۶۷۶۳۹۲	۳۹۰۶۰۱۹	۱۸۷۷
AL4	<i>A. Alppica</i>	Goyran	۶۴۳۶۲۲	۳۹۰۹۵۷۱	۱۵۱۰
BI1	<i>A.biebersteinii</i>	Savarian	۶۷۲۵۳۸	۳۸۱۹۳۲۱	۱۳۱۲
BI2	<i>A.biebersteinii</i>	Pichon	۶۴۵۵۹۹	۳۹۱۰۲۵۱	۱۴۲۵
BI3	<i>A.biebersteinii</i>	Danikesh	۶۴۳۳۵۲	۳۹۰۷۷۶۷	۱۳۵۷
BI4	<i>A.biebersteinii</i>	Chelgazii	۶۷۵۱۹۴	۳۹۲۵۷۹۳	۱۶۲۰
MI1	<i>A.millefolium</i>	Salvat Abad	۶۹۵۲۲۷	۳۹۰۳۲۶۵	۱۹۴۶
MI2	<i>A.millefolium</i>	Babareiz	۶۸۸۲۰۱	۳۹۱۵۱۳۴	۱۳۸۸

۲۰۰۹	۳۹۲۹۱۳۰	۶۹۱۸۳۹	Dolbandi	<i>A.millefolium</i>	MI3
۱۶۳۸	۳۹۳۴۴۴۴	۶۹۱۹۴۲	Jebreillian	<i>A.millefolium</i>	MI4
۱۶۹۲	۳۹۲۷۱۷۳	۶۷۶۱۹۵	Chrandoo	<i>A. talagonica</i>	TA1
۲۰۰۰	۳۹۳۹۰۴۹	۶۷۹۲۵۱	Biaenchob	<i>A. talagonica</i>	TA2
۱۹۷۵	۳۹۲۹۱۷۴	۶۷۹۴۸۲	Sofla Mamox	<i>A. talagonica</i>	TA3
۲۱۸۵	۳۹۳۱۹۲۱	۶۷۰۰۵۷	Chrandoo	<i>A. talagonica</i>	TA4
۱۸۶۸	۳۹۲۹۴۲۸	۶۸۰۳۰۰	Mamox	<i>A.tenuifolia</i>	TE1
۱۶۹۸	۳۹۳۱۳۵۳	۶۷۸۰۹۹	Chrandoo	<i>A.tenuifolia</i>	TE2
۱۹۳۶	۳۹۳۸۶۶۲	۶۸۳۲۸۳	Bazi Rabab	<i>A.tenuifolia</i>	TE3
۱۵۹۸	۳۹۲۶۰۲۴	۶۷۷۵۵۶	Sarab Ghamish	<i>A.tenuifolia</i>	TE4
۲۲۶۰	۳۹۳۵۲۷۹	۶۷۳۹۴۱	Ghalvazei	<i>A.vermicularis</i>	VE1
۲۰۷۵	۳۹۳۱۴۶۰	۶۸۰۳۱۷	Sofla Mamox	<i>A.vermicularis</i>	VE2
۲۱۷۶	۳۹۳۹۳۸۸	۶۷۳۸۱۹	Sangi Sefied	<i>A.vermicularis</i>	VE3
۱۸۵۱	۳۹۰۸۰۲۷	۶۷۹۰۳۴	Dole Rahman	<i>A.vermicularis</i>	VE4
۲۰۳۹	۳۹۳۱۷۱۴	۴۸۱۴۷۲	Sofla Mamox	<i>A.willhelmsii</i>	WI1
۱۸۷۵	۳۹۱۴۳۹۹	۶۷۱۰۹۹	Arandan	<i>A.willhelmsii</i>	WI2
۲۱۴۰	۳۹۰۶۱۲۴	۶۵۵۳۲۴	Klatei	<i>A.willhelmsii</i>	WI3
۱۹۷۰	۳۹۳۰۸۱۳	۶۶۵۲۳۰	Gav Dareh	<i>A.willhelmsii</i>	WI4

استخراج DNA ژنومی ۲۸ اکسشن بومادران از ۷ گونه مختلف با روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید^۱) مطابق روش ارائه شده توسط Doyle and Doyle (1990) با لحاظ نمودن تغییرات اعمال شده توسط Dharajiya et al. (2017) از برگ‌های تازه و نرم گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای حاصل از کشت بذر اکسشن‌ها به صورت بالک صورت گرفت.

تمام نمونه‌های DNA ژنومی در بافر TE 1X (Tris-EDTA) حل شده و برای استفاده بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از ۲۸ اکسشن بومادران با روش چشمی، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی شد (Primrose and Twyman 2013). کیفیت و کمیت با استفاده از اسپکتروفتومتر نانو قطره^۲ (BioSpectrometer, Eppendorf, Germany) بررسی شد. نسبت A260/A280 برای هر نمونه محاسبه و برای انتخاب نمونه‌هایی با کیفیت خوب DNA مورد استفاده قرار گرفت. کمیت (مقدار DNA) به طور مستقیم به صورت نانوگرم/میکرولیتر اندازه‌گیری شد و بر اساس داده‌های کمی، بخشی از نمونه‌های DNA با مقدار مناسب بافر TE 1X برای تولید غلظت ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر جهت انجام

آنالیزهای مولکولی و همچنین ذخیره در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بیشتر در آینده رقیق شد.

واکنش PCR در حجم ۱۴ میکرولیتر حاوی: DNA الگو ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر^۳ (۲ میکرولیتر)، آغازگرهای مستقیم و معکوس^۴ با غلظت 20 pmole/μl به میزان ۲ میکرولیتر، آب دیونیزه به مقدار ۳ میکرولیتر، اجزای مسترمیکس^۵ PCR شامل: بافر 10X PCR Taq dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۵ MgCl₂ میلی‌مولار و ۱ واحد از Taq DNA پلیمرز مجموعاً به میزان ۷ میکرولیتر انجام شد. در این آزمایش از ۱۲ آغازگر SSR استفاده شد. توالی و مشخصات این آغازگرها در جدول (۲) آورده شده است. آغازگرهای مورد استفاده بر اساس گزارش Rahimmalek et al. (2011) تهیه شدند. پس از مخلوط شدن اجزای واکنش و تعیین بهترین دمای اتصال برای هر جفت آغازگر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در یک دستگاه ترموسایکر (Eppendorf, Germany) انجام شد.

چرخه‌های حرارتی برای تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای SSR در PCR به شرح زیر تنظیم و بهینه‌سازی شد: واسرشت‌سازی اولیه^۶ (در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه) و پس از آن ۳۸ چرخه، طوری که هر چرخه‌ی آن شامل

³ ng/μl

⁴ Forward and reverse primers

⁵ Master mix

⁶ Initial denaturation

¹ cetyl trimethyl ammonium bromide

² Nano-Drop Spectrophotometer

(Prevost and Wilkinson 1999). درصد چند شکلی با فرمول زیر محاسبه شد.

$100 \times (\text{تعداد کل نوارها/تعداد نوارهای چندشکلی}) = \text{چندشکلی } (\%)$
از نرم‌افزارهای PopGene، GenAlEx 6.2 و DARwin 5 برای محاسبه پارامترهای ژنتیکی، تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها، تجزیه واریانس مولکولی^۴، ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای استفاده شد.

نتایج

تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها و روابط بین گونه‌ای برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از ۱۶ جفت آغازگر SSR ارزیابی شد. از مجموع ۱۶ جفت آغازگر مورد استفاده، ۴ جفت آغازگر شامل AmK436، AmK28، AmK111 و AmK31 قابل امتیازدهی نبودند. ۱۲ جفت آغازگر SSR در مجموع توانستند ۵۶ آلل را در بین گونه‌های جنس بومادران شناسایی نمایند، که از این تعداد ۹ آلل یک شکل و ۴۷ آلل چند شکل بودند.

میانگین تعداد آلل تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر SSR برابر ۴/۶۷ بود (البته بدون در نظر گرفتن چهار جفت آغازگری که تکثیر نداشتند) و متوسط تعداد آلل چند شکل ۳/۹۲ بود. بیشترین تعداد آلل (۷ آلل) متعلق به لوکوس‌های AmK416 و AmK142 و کمترین (۲ آلل) آن مربوط به لوکوس AmK59 بود.

⁴ AMOVA

مرحله واسرشت‌سازی (در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه)، اتصال آغازگر^۱ (بسته به دمای ذوب آغازگرها (°C) به مدت ۴۵ ثانیه) و توسعه رشته (در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱:۲۰ دقیقه) بود. همچنین توسعه نهایی^۲ (در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) انجام گرفت و سپس محصولات حاصل از تکثیر PCR بعد از خنک شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به همراه نشانگر استاندارد DNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز متافور ۲/۵ درصد جدا شده و تحت نور UV با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت FluorChem FC2، (Alpha Innotech Corporation, USA) عکس‌برداری شد.

داده‌های مربوط به حضور (۱) یا عدم حضور (۰) نوارهای قطعات DNA تکثیر شده با PCR به عنوان داده‌های دوتایی ثبت شد. ماتریس‌ها برای داده‌های باینری با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard 1908) و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی^۳ تولید شدند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با فرکانس بوت استرپ $n = 500$ در نرم‌افزار PAST_{v3.18} انجام شد (Hammer et al. 2001). از نرم‌افزار AlphaEaseFC نسخه ۶،۰،۰ برای تعیین وزن مولکولی نوارهای جدا شده روی ژل استفاده شد. مقدار محتوای اطلاعات چند شکلی بر اساس فراوانی آلل‌ها با فرمول داده شده محاسبه شد.

¹ Annealing

² Final extension

³ UPGMA

جدول ۲- کد، مشخصات توالی و دمای اتصال ۱۲ جفت آغازگر پلی مورف SSR مورد استفاده در تحقیق حاضر (Rahimmalek et al. 2011)

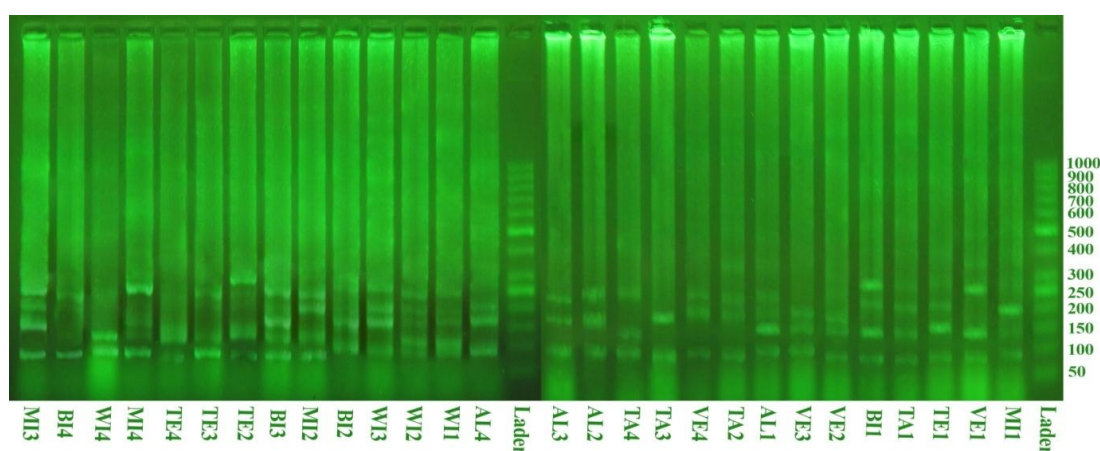
کد آغازگر	توالی مستقیم (Forward Sequence)	توالی معکوس (Reverse Sequence)	دمای اتصال (°C)
Amk416	CCCTCATCTCCTTGTTGGTGT	GGGGTCTTGGTGTAACCTTAGC	۵۷
Amk142	CAAAGTAAGGTGGAACGACGA	CGCAAAATATTATCCTCCTTTGG	۵۴
Amk344	CTAAGTGGGGGCATAAAATACG	GGGTGGTAGATGATGAACAAGA	۵۲
AmK230a	CAGAAGCCCCACAACAATC	GAAATGGACAGAGTGCGTTG	۵۴
AmK435	AGCTTGGACTIONTACTATCAATAGGG	AGGGAGTTTGCCATGATAGA	۵۴
Amk439	GCAGCCGCATATGGTATTCT	ATGGCAAGTTCTCCTCCTC	۵۶
Amk206	GTTTCACTTCAATCGCCACA	GGGTAAACAAGTTAAATGACATGA	۵۴
AmK54	GCCGTGCTAATGCAAGTGAT	TGATCAGGGTGTGTGACCAG	۵۲
AmK329	CCTTGAATCGTTCCCAAGC	CGCTTACTGGAGCCACAAAT	۵۵
AmK230b	CGATCTGTGGGGAAGATGAT	CTAAGTGGGGGCATAAAATACG	۵۵
AmK59	GGAAGGGTCCATTGGTGTTA	TCTGGGACCATTTGATGTAAAC	۵۱
AmK244	TGGCTCACTCAACATCAAAC	CCATTGCATGCGGAACCTA	۵۳

۸۲/۵۶ درصد بود. متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی برابر ۰/۳۲۴ بود. جفت آغازگرهای AmK416، AmK230a و AmK59 با داشتن PIC بیشتر از ۰/۴ نسبت به دیگر جفت آغازگرها در نشان دادن تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای جمعیت‌های مورد بررسی برتر بودند. از طرف دیگر آغازگرهای AmK416 و AmK230a با داشتن بیشترین میزان شاخص نشانگر^۱، برتری خود را نشان دادند (جدول ۳).

¹ MI

بیشترین تعداد الل تکثیر شده مربوط به جمعیت‌های TE₄، WI₂، AL1 و BI₁ با تعداد ۴۲ الل و کمترین تعداد آن مربوط به جمعیت MI₂ با ۳۰ الل بود. شکل (۲) الگوی بانندی جمعیت‌های مورد بررسی برای لوکوس AmK435 را نشان می‌دهد.

سه جفت آغازگر AmK416، AmK230a و AmK59 دارای صد در صد چند شکلی بودند و در دیگر جفت آغازگرها درصد چند شکلی بین ۶۶/۶۷ تا ۸۵/۷۱ درصد بود. کمترین درصد چند شکلی به جفت آغازگرهای AmK329 و AmK230b به میزان ۶۶/۶۷ درصد اختصاص داشت و متوسط درصد چند شکلی



شکل ۲- الگوی بانندی جفت آغازگر AmK439 در جمعیت‌های مورد بررسی

جدول ۳- تعداد کل باند، باند چند شکلی، درصد چندشکلی و شاخص‌های PIC، MI، RP و EMR در آغازگرهای SSR مورد بررسی برای جمعیت‌های جنس بومادران

کد آغازگر (نام لوکوس)	تعداد الل چند شکلی	تعداد الل تکثیر شده	درصد چند شکلی	PIC	MI	EMR	RP
Amk416	۷	۷	۱۰۰	۰/۴۳۲	۳/۰۳	۷/۰۰	۷/۵۷
Amk142	۷	۶	۸۵/۷۱	۰/۳۷۲	۱/۹۲	۵/۱۴	۷/۴۳
Amk344	۶	۵	۸۳/۳۳	۰/۲۹۰	۱/۲۱	۴/۱۷	۷/۶۴
AmK230a	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۰۳	۲/۰۲	۵/۰۰	۷/۰۰
AmK435	۴	۳	۷۵	۰/۲۳۴	۰/۵۳	۲/۲۵	۵/۶۴
Amk439	۵	۴	۸۰	۰/۳۳۴	۱/۰۷	۳/۲۰	۶/۹۶
Amk206	۶	۵	۸۳/۳۳	۰/۳۵۷	۱/۴۹	۴/۱۷	۷/۹۳
AmK54	۴	۳	۷۵	۰/۲۱۱	۰/۴۷	۲/۲۵	۶/۷۹
AmK329	۳	۲	۶۶/۶۷	۰/۱۵۹	۰/۲۱	۱/۳۳	۵/۳۶
AmK230b	۳	۲	۶۶/۶۷	۰/۲۴۷	۰/۳۳	۱/۳۳	۴/۶۴
AmK59	۲	۲	۱۰۰	۰/۴۹۷	۰/۹۹	۲/۰۰	۲/۰۰
AmK244	۴	۳	۷۵	۰/۳۵۱	۰/۷۹	۲/۲۵	۵/۷۱
میانگین	۴/۶۷	۳/۹۲	۸۲/۵۶	۰/۳۲۴	۱/۱۷	۳/۳۴	۶/۲۲

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)؛ شاخص نشانگر (MI)؛ نسبت چندگانه مؤثر (EMR)؛ قدرت تفکیک (RP)

جدول ۴- تجزیه واریانس ملکولی برای جمعیت‌های جنس بومادران با استفاده از نشانگرهای SSR

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	واریانس اجزا	درصد واریانس کل	Φ
بین گونه‌ها	۶	۲۱/۰۵	۳/۶۳	۳۶٪	۰/۳۵۷**
درون گونه‌ها	۲۱	۶/۵۴	۶/۵۴	۶۴٪	
کل	۲۷	-	۱۰/۱۶	۱۰۰٪	

** معنی‌دار در سطح ۱٪

تشابه ۰/۸۳۶ بود و در مرتبه دوم بین دو گونه‌ی *Ac. Alppica* و *Ac. talagonica* با متوسط ضریب تشابه ۰/۸۱۶ بود. کمترین تشابه نیز بین گونه‌های *Ac. biebersteinii* و *Ac. vermicularis* با متوسط ضریب تشابه ۰/۶۵۱ بود و در مرتبه دوم گونه‌های *Ac. talagonica* و *Ac. willhelmsii* با متوسط ضریب تشابه ۰/۶۹۶ دارای کمترین تشابه بودند (جدول ۵).

ماتریس تشابه بر مبنای ضریب تشابه جاکارد برای الگوی باندی نشانگر SSR در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد (جدول ۶) که متوسط تشابه بین جمعیت‌ها ۰/۵۸۸ می‌باشد. سه جمعیت WI1، WI2 و WI3 دارای بیشترین شباهت با همدیگر بودند، طوری‌که ضریب تشابه بین آن‌ها به ترتیب برابر با ۰/۸۸۶، ۰/۸۶۴ و ۰/۸۴۱ بود، همچنین جمعیت AL2 با جمعیت‌های AL3 و AL4 (با متوسط ضریب تشابه ۰/۸۴۲ و ۰/۸۱۰) و جمعیت BI1 با BI3 (با متوسط ضریب تشابه ۰/۸۰۴) دارای شباهت بالایی با همدیگر بودند. در مقابل جمعیت MI2 به ترتیب با ۰/۳۸۸ و ۰/۴۱۹ کمترین میزان تشابه را با جمعیت‌های VE1 و VE3 نشان داد.

برای شاخص EMR نیز، جفت آغازگرهای AmK416، AmK142 و AmK230a دارای بیشترین میزان بودند. بیشترین مقدار شاخص قدرت تفکیک^۱ نیز به جفت آغازگرهای AmK416، AmK142، AmK344، AmK206 و AmK230a اختصاص داشت که در مجموع می‌توان جفت آغازگرهای AmK416 و AmK230a را به عنوان آغازگرهای برتر در شناسایی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مورد بررسی معرفی نمود. هر چند دیگر جفت آغازگرها نیز سطح مناسبی از چند شکلی را نشان دادند. با توجه به اینکه از کاربردهای تجزیه واریانس ملکولی تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد، از این رو به منظور تعیین تفاوت ژنتیکی بین هفت گونه‌ی مورد بررسی تجزیه واریانس ملکولی انجام شد و بر اساس آماره PhiPT در بین گونه‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود داشت و ۶۴ درصد از واریانس کل به واریانس بین جمعیت‌های درون گونه‌ها و ۳۶ درصد آن به واریانس بین گونه‌ای اختصاص یافت (جدول ۴). ماتریس تشابه بر مبنای ضریب دایس برای الگوی باندی نشانگر SSR در گونه‌ها محاسبه شد (جدول ۵). متوسط ضریب تشابه کل بین گونه‌ها ۰/۷۶۰ بود. بیشترین تشابه بین گونه‌های *Ac. tenuifolia* و *Ac. millefolium* با متوسط ضریب

¹ RP

جدول ۵- ماتریس تشابه بین گونه‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس برای نشانگر SSR

گونه	<i>Ac. Alppica</i>	<i>Ac. biebersteinii</i>	<i>Ac. millefolium</i>	<i>Ac. talagonica</i>	<i>Ac. tenuifolia</i>	<i>Ac. vermicularis</i>
<i>Ac. biebersteinii</i>	۰/۷۴۸					
<i>Ac. millefolium</i>	۰/۷۹۸	۰/۷۶۵				
<i>Ac. talagonica</i>	۰/۸۱۶	۰/۷۵۱	۰/۷۲۵			
<i>Ac. tenuifolia</i>	۰/۷۶۸	۰/۷۵۲	۰/۸۶۳	۰/۷۵۳		
<i>Ac. vermicularis</i>	۰/۷۶۰	۰/۶۵۱	۰/۷۷۹	۰/۷۹۸	۰/۷۹۱	
<i>Ac. willhelmsii</i>	۰/۷۵۴	۰/۷۰۲	۰/۷۷۸	۰/۶۹۶	۰/۷۷۴	۰/۷۶۶

جدول ۶- ماتریس تشابه بین جمعیت‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای نشانگرهای SSR مورد بررسی

جمعیت	AL1	AL2	AL3	AL4	BI1	BI2	BI3	BI4	MI1	MI2	MI3	MI4	TA1	TA2
AL2	۰/۵۷۱													
AL3	۰/۵۴۰	۰/۸۴۲												
AL4	۰/۶۹۴	۰/۸۱۰	۰/۷۶۷											
BI1	۰/۶۴۷	۰/۶۰۴	۰/۶۰۴	۰/۶۶۰										
BI2	۰/۵۷۷	۰/۵۶۳	۰/۵۶۳	۰/۶۵۳	۰/۷۸۳									
BI3	۰/۶۹۴	۰/۵۲۰	۰/۵۲۰	۰/۶۰۸	۰/۸۰۴	۰/۷۶۱								
BI4	۰/۶۱۲	۰/۶۰۰	۰/۵۶۵	۰/۶۲۵	۰/۷۹۵	۰/۶۷۴	۰/۷۷۳							
MI1	۰/۵۸۳	۰/۵۳۳	۰/۵۳۳	۰/۶۳۰	۰/۵۸۳	۰/۵۴۲	۰/۵۳۱	۰/۵۷۸						
MI2	۰/۵۰۰	۰/۴۷۷	۰/۴۷۷	۰/۵۴۳	۰/۵۳۲	۰/۴۸۹	۰/۵۴۳	۰/۴۸۹	۰/۵۶۱					
MI3	۰/۵۸۳	۰/۵۳۳	۰/۵۶۸	۰/۵۶۳	۰/۵۸۳	۰/۵۷۴	۰/۵۶۳	۰/۵۷۸	۰/۶۱۹	۰/۴۸۸				
MI4	۰/۵۴۹	۰/۵۳۲	۰/۵۳۲	۰/۶۲۵	۰/۶۸۱	۰/۶۳۸	۰/۵۹۲	۰/۶۴۴	۰/۷۷۵	۰/۶۳۴	۰/۶۱۴			
TA1	۰/۶۶۰	۰/۵۷۸	۰/۵۷۸	۰/۶۰۴	۰/۶۶۰	۰/۶۱۷	۰/۶۰۴	۰/۵۸۷	۰/۴۸۹	۰/۵۰۰	۰/۵۵۶	۰/۵۵۳		
TA2	۰/۵۳۷	۰/۶۱۷	۰/۶۱۷	۰/۶۴۰	۰/۶۲۷	۰/۵۸۸	۰/۶۰۸	۰/۵۹۲	۰/۵۶۳	۰/۴۷۹	۰/۵۰۰	۰/۵۶۰	۰/۶۰۴	
TA3	۰/۵۰۰	۰/۵۸۱	۰/۶۱۹	۰/۵۷۴	۰/۵۰۰	۰/۴۹۰	۰/۴۸۰	۰/۴۸۹	۰/۵۲۳	۰/۴۳۲	۰/۵۲۳	۰/۵۲۲	۰/۵۶۸	۰/۶۸۲
TA4	۰/۶۲۰	۰/۶۸۲	۰/۷۲۱	۰/۷۰۲	۰/۵۸۸	۰/۵۸۰	۰/۵۶۹	۰/۵۲۰	۰/۵۲۱	۰/۴۶۸	۰/۵۵۳	۰/۴۹۰	۰/۶۳	۰/۷۷۸
TE1	۰/۵۹۶	۰/۴۷۸	۰/۵۱۱	۰/۵۴۲	۰/۶۳۰	۰/۵۲۱	۰/۶۰۹	۰/۵۲۲	۰/۵۲۳	۰/۵۳۷	۰/۵۹۵	۰/۵۹۱	۰/۵۶۸	۰/۵۴۲
TE2	۰/۶۵۲	۰/۴۶۸	۰/۴۶۸	۰/۵۳۱	۰/۶۵۲	۰/۵۴۲	۰/۵۹۶	۰/۵۱۱	۰/۵۸۱	۰/۵۶۱	۰/۵۸۱	۰/۶۵۱	۰/۵۵۶	۰/۵۳۱
TE3	۰/۷۱۱	۰/۵۵۶	۰/۵۹۱	۰/۶۵۲	۰/۶۷۴	۰/۵۹۶	۰/۶۱۷	۰/۵۳۲	۰/۵۶۸	۰/۵۴۸	۰/۶۰۵	۰/۵۶۵	۰/۵۷۸	۰/۵۲۰
TE4	۰/۷۵۰	۰/۵۱۰	۰/۵۴۰	۰/۵۶۶	۰/۶۱۵	۰/۵۷۷	۰/۶۶۰	۰/۶۱۲	۰/۵۸۳	۰/۴۴۰	۰/۶۸۹	۰/۵۸۰	۰/۵۹۲	۰/۵۶۶
VE1	۰/۶۳۳	۰/۵۲۱	۰/۵۲۱	۰/۵۴۹	۰/۵۶۹	۰/۵۲۹	۰/۵۴۹	۰/۵۳۱	۰/۵۳۲	۰/۳۸۸	۰/۶۰۰	۰/۵۶۳	۰/۶۴۴	۰/۵۸۰
VE2	۰/۵۱۰	۰/۶۲۸	۰/۵۹۱	۰/۶۵۲	۰/۶۳۸	۰/۵۶۳	۰/۶۱۷	۰/۶۰۰	۰/۵۳۳	۰/۵۸۵	۰/۶۰۵	۰/۶۷۴	۰/۴۷۹	۰/۶۱۷
VE3	۰/۴۶۰	۰/۵۷۱	۰/۵۳۵	۰/۵۳۲	۰/۵۲۱	۰/۴۷۹	۰/۵۰۰	۰/۴۷۸	۰/۴۴۴	۰/۴۱۹	۰/۵۱۲	۰/۵۱۱	۰/۴۵۷	۰/۵۶۵
VE4	۰/۴۷۱	۰/۵۸۱	۰/۵۴۵	۰/۶۰۹	۰/۵۰۰	۰/۴۶۰	۰/۵۱۰	۰/۴۵۸	۰/۵۲۳	۰/۵۰۰	۰/۵۲۳	۰/۵۵۶	۰/۵۳۳	۰/۶۴۴
WI1	۰/۶۲۷	۰/۵۵۱	۰/۵۸۳	۰/۶۷۳	۰/۶۲۷	۰/۶۲۰	۰/۶۰۸	۰/۵۹۲	۰/۵۹۶	۰/۵۱۱	۰/۷۰۵	۰/۶۲۵	۰/۵۷۱	۰/۵۴۷
WI2	۰/۶۴۷	۰/۶۰۴	۰/۶۰۴	۰/۷۲۹	۰/۶۱۵	۰/۶۰۸	۰/۵۹۶	۰/۶۱۲	۰/۶۵۲	۰/۵۶۵	۰/۶۸۹	۰/۶۱۲	۰/۵۶۰	۰/۵۹۶
WI3	۰/۶۴۰	۰/۵۶۳	۰/۵۶۳	۰/۶۵۳	۰/۶۴۰	۰/۶۰۰	۰/۵۸۸	۰/۵۷۱	۰/۵۴۲	۰/۴۵۸	۰/۶۴۴	۰/۵۷۱	۰/۵۵۱	۰/۵۲۸
WI4	۰/۶۲۷	۰/۵۵۱	۰/۵۵۱	۰/۶۷۳	۰/۶۲۷	۰/۵۸۸	۰/۵۷۷	۰/۵۲۹	۰/۵۳۱	۰/۵۷۸	۰/۵۹۶	۰/۵۲۹	۰/۶۰۴	۰/۶۰۸
جمعیت	TA3	TA4	TE1	TE2	TE3	TE4	VE1	VE2	VE3	VE4	WI1	WI2	WI3	
TA4	۰/۷۵۶													
TE1	۰/۵۰۰	۰/۵۶۵												
TE2	۰/۵۵۸	۰/۵۲۱	۰/۷۶۳											
TE3	۰/۵۱۱	۰/۶۰۹	۰/۷۸۹	۰/۷۶۹										
TE4	۰/۵۰۰	۰/۵۸۸	۰/۶۶۷	۰/۶۱۷	۰/۶۰۴									
VE1	۰/۶۱۴	۰/۵۷۱	۰/۶۱۴	۰/۶۰۰	۰/۵۵۳	۰/۷۳۹								
VE2	۰/۵۴۵	۰/۵۷۴	۰/۶۱۹	۰/۵۶۸	۰/۵۵۶	۰/۶۰۴	۰/۵۸۷							
VE3	۰/۵۲۴	۰/۵۵۶	۰/۵۶۱	۰/۵۱۲	۰/۴۶۷	۰/۶۲۲	۰/۶۸۳	۰/۷۸۴						
VE4	۰/۵۳۵	۰/۶۰۰	۰/۵۷۱	۰/۴۸۹	۰/۵۱۱	۰/۵۶۳	۰/۶۵۱	۰/۷۴۴	۰/۷۷۸					
WI1	۰/۵۴۲	۰/۵۶۹	۰/۶۰۹	۰/۵۹۶	۰/۶۱۷	۰/۶۹۴	۰/۶۴۶	۰/۶۸۹	۰/۵۶۵	۰/۶۰۹				
WI2	۰/۵۶۳	۰/۶۲۰	۰/۵۹۶	۰/۵۸۳	۰/۶۳۸	۰/۶۸۰	۰/۶۰۰	۰/۶۷۴	۰/۵۵۳	۰/۵۹۶	۰/۸۸۶			
WI3	۰/۵۵۳	۰/۵۸۰	۰/۵۸۷	۰/۶۰۹	۰/۶۳۰	۰/۶۴۰	۰/۵۹۲	۰/۶۳۰	۰/۵۱۱	۰/۵۲۱	۰/۸۴۱	۰/۸۶۴		
WI4	۰/۴۲۳	۰/۵۶۹	۰/۵۷۴	۰/۵۰۰	۰/۵۸۳	۰/۶۲۷	۰/۵۸۰	۰/۶۱۷	۰/۵۳۲	۰/۶۴۴	۰/۷۰۸	۰/۷۲۹	۰/۶۵۳	

به منظور تعیین بهترین شاخص فاصله و روش محاسبه‌ی ماتریس فاصله برای ترسیم بهتر نمودار خوشه‌ای ضریب کوفتیک شاخص‌های دایس، جاکارد، اوشیایی و سوکال در برابر روش‌های اتصال میانگین^۱ و اتصال مجاور^۲ محاسبه شد و بیشترین مقدار به ضریب فاصله‌ی جاکارد با استفاده از روش UPGMA اختصاص

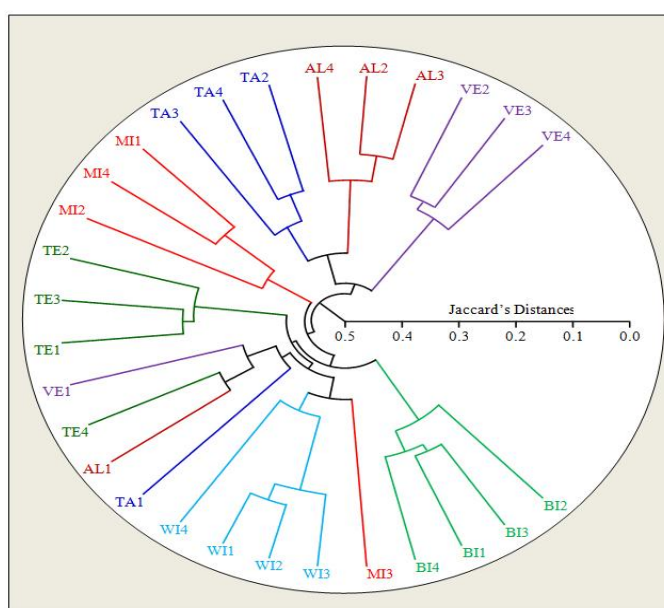
^۱ UPGMA

^۲ NJ

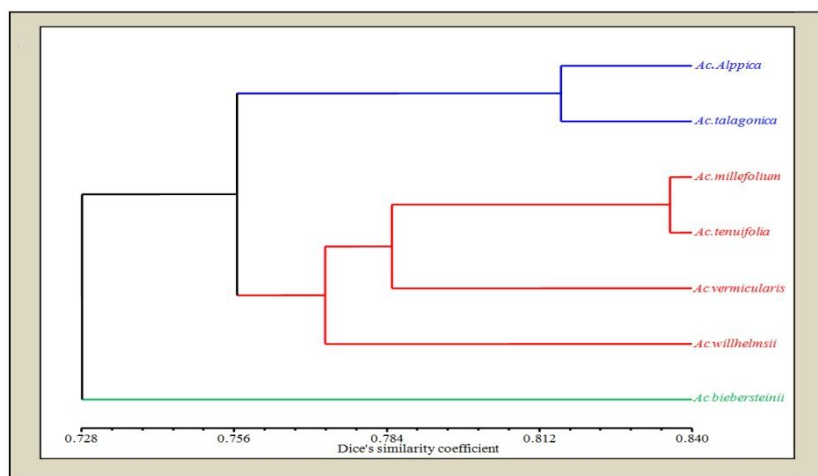
یافت، لذا برای ترسیم نمودار از ضریب فاصله جاکارد و روش UPGMA استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای توانست جمعیت‌های گونه‌های جنس بومادران تا حد بالایی از همدیگر تفکیک نماید، که در این میان تفکیک جمعیت‌ها از سایر گونه‌ها برای دو گونه‌ی *Ac.willhelmsii* و *Ac.biebersteinii* به طور کامل انجام شد، همچنین مشاهده شد که جمعیت MI3 از گونه‌ی *Ac.millefolium* از گروه خود جدا شده و فاصله‌ی نزدیکی با جمعیت‌های گونه‌ی

تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها با روش UPGMA بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR و ضریب فاصله دایس گونه‌های مورد مطالعه را در سه گروه مجزا قرار داد، طوری که گونه‌ی *Ac.biebersteinii* بیشترین فاصله را با دیگر گونه‌های این جنس داشت. همچنین دو گونه‌ی *Ac. Alppica* و *Ac. Talagonica* در یک گروه و چهار گونه‌ی دیگر نیز در یک گروه قرار گرفتند که از میان این چهار گونه دو گونه‌ی *Ac. millefolium* و *Ac. tenuifolia* کمترین فاصله را از همدیگر داشتند.

برای جمعیت گونه‌های *Ac.willhelmsii* داشت. برای جمعیت گونه‌های *Ac. Alppica*، *Ac. millefolium*، *Ac. talagonica* و *Ac. tenuifolia* تفکیک جمعیت‌ها کامل نبود و از هر گونه سه جمعیت تفکیک یافت. جمعیت‌های TA1، AL1، TE4 و VE1 با فاصله‌ی نزدیکی در یک گروه قرار گرفتند. در هر حال مشاهده شد که ۵ جمعیت از ۲۸ جمعیت مورد بررسی در گروه متعلق به گونه‌های خود قرار نگرفتند و در مجموع ۸۲/۱۴ درصد از جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس نشانگر SSR تفکیک شدند و تنها ۱۷/۸۶ درصد از جمعیت‌ها تفکیک نشدند (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر SSR در جمعیت‌ها با استفاده از ضریب جاکارد و به روش UPGMA



شکل ۴- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها بر اساس نشانگر SSR با ضریب فاصله دایس و به روش UPGMA

همچنین براساس داده‌های مولکولی تجزیه به مختصات اصلی برای ۲۸ جمعیت جنس بومادران به منظور ارزیابی روابط بین جمعیت‌ها انجام شد. سه محور نخست مختصات در مجموع ۳۴/۹۱ درصد از واریانس موجود در ساختار داده‌ها را توضیح دادند. نمودار دو بعدی بر اساس مختصات اول و دوم نیز ترسیم شد (شکل ۶).

نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که جمعیت‌های متعلق به گونه‌های *Ac.vermicularis*، *Ac.biebersteinii*، *Ac.tenuifolia* و *Ac.willhelmsii* هرکدام به‌طور جداگانه‌ای در نزدیک همدیگر و با فاصله‌ی کمی از هم قرار دارند (شکل ۶). مشاهده شد که یک جمعیت از هرکدام از سه گونه‌ی *Ac.Alppica*، *Ac.talagonica* و *Ac.millefolium* فاصله‌ی بیشتری با دیگر جمعیت‌های آن گونه داشت (TA1)، AL1 و MI3)، لذا به‌طور کامل تفکیک نشدند. در هر حال سه جمعیت از گونه‌ی *Ac.Alppica* و سه جمعیت از گونه‌ی *Ac.Talagonica* در یک منطقه‌ی نمودار قرار داشتند. جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.vermicularis* به تنهایی در یک منطقه‌ی نمودار قرار گرفتند. جمعیت‌های گونه‌های *Ac.willhelmsii* و *Ac.tenuifolia* به‌همراه جمعیت MI3 در یک منطقه‌ی نمودار و در نهایت جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.Alppica* به‌همراه سه جمعیت گونه‌ی *Ac.millefolium* و جمعیت‌های TA1 و AL1 در یک منطقه‌ی نمودار جایی گرفتند و کمترین فاصله را با توجه به تجزیه به مختصات اصلی نشان دادند (شکل ۶).

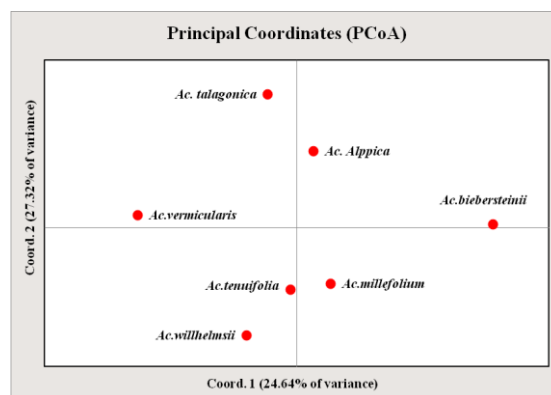
شاخص‌های ژنتیکی برای گونه‌های مورد بررسی در جدول ۹ ارائه شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین درصد چند شکلی در مکان‌های آلی مربوط به جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.millefolium* (۵۱/۷۹) و کمترین درصد چند شکلی متعلق به جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.biebersteinii* (۳۳/۹۳) و گونه *Ac.willhelmsii* (۳۳/۹۳) بود. متوسط درصد چند شکلی برابر ۴۲/۰۹ با خطای استاندارد ۰/۹۷ درصد بود. بیشترین میزان اختلاف آلی^۱ به جمعیت گونه‌ی *Ac.Talagonica* (۱/۳۸) اختصاص داشت و کمترین اختلاف آلی در بین جمعیت‌های

نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه محور نخست مختصات در مجموع ۷۰/۰۸ درصد از واریانس موجود در ساختار داده‌ها را توجیه می‌نمایند (جدول ۷). نمودار دو بعدی مختصات بر اساس دو مؤلفه‌ی اول و دوم ترسیم شد (شکل ۵).

جدول ۷- نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی برای گونه‌های مورد بررسی جنس بومادران براساس نشانگر SSR

گونه	محور ۱	محور ۲	محور ۳
<i>Ac. Alppica</i>	۰/۰۹۹	۰/۵۵۱	۰/۵۴۳
<i>Ac.biebersteinii</i>	۱/۱۶۴	۰/۰۲۳	-۰/۱۶۱
<i>Ac.millefolium</i>	۰/۱۹۹	-۰/۴۰۱	-۰/۲۲۲
<i>Ac. talagonica</i>	-۰/۱۷۵	۰/۹۵۸	۰/۰۳۸
<i>Ac.tenuifolia</i>	-۰/۰۳۷	-۰/۴۴۴	-۰/۵۹۵
<i>Ac.vermicularis</i>	-۰/۹۴۹	۰/۰۸۹	-۰/۴۳۵
<i>Ac.willhelmsii</i>	-۰/۳۰۱	-۰/۷۷۶	۰/۸۳۳
درصد از واریانس	۲۷/۳۲	۲۴/۶۴	۱۸/۱۱
واریانس جمعی	۲۷/۳۲	۵۱/۹۶	۷۰/۰۸

با توجه به نمودار، مشاهده شد که گونه‌های جنس بومادران در چهار منطقه‌ی نمودار قرار گرفتند. گونه‌های *Ac.Alppica* و *Ac.biebersteinii* در یک منطقه و گونه‌های *Ac.Talagonica* و *Ac.vermicularis* در یک منطقه و گونه‌های *Ac.tenuifolia* و *Ac.willhelmsii* در منطقه‌ای دیگر از نمودار قرار گرفتند، همچنین گونه‌ی *Ac.millefolium* به تنهایی در یک منطقه‌ی جداگانه از نمودار قرار گرفت. در مجموع نتایج تجزیه به مختصات اصلی نتایج تجزیه کلاستر و ماتریس تشابه را تا حدود زیادی تأیید نمود (شکل ۵).

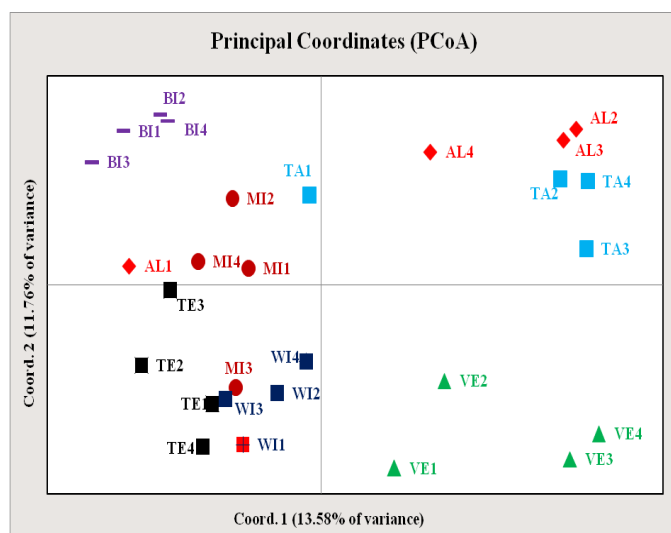


شکل ۵- نمودار پراکنش حاصل از تجزیه به مختصات گونه‌های مورد بررسی در جنس بومادران بر اساس الگوی بانندی نشانگر SSR

¹ Na

در رابطه با شاخص هتروژنی مورد انتظار^۲، مشاهده شد که جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.millefolium* دارای بیشترین میزان (۰/۲۱) و جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.vermicularis* دارای کمترین میزان (۰/۱۳) هتروژنی مورد انتظار بودند. همچنین جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.millefolium* و جمعیت‌های گونه‌ی *Ac.vermicularis* به ترتیب بیشترین (۰/۲۴) و کمترین (۰/۱۵) مقدار شاخص هتروژنی مورد انتظار بدون اربیب^۳ را دارا بودند.

گونه‌های *Ac.willhelmsii* (۱/۲۱)، *Ac.biebersteinii* (۱/۲۰) مشاهده شد. برای شاخص تعداد آل‌های مؤثر^۱ یا به عبارتی تعداد آل‌های مؤثر در چند شکلی بیشترین میزان (۱/۳۸) در جمعیت گونه‌ی *Ac.millefolium* و کمترین میزان (۱/۲۲) در بین جمعیت‌های گونه‌های *Ac.vermicularis* مشاهده شد. جمعیت گونه‌ی *Ac.millefolium* بیشترین میزان (۰/۳۱) و جمعیت گونه‌ی *Ac.vermicularis* کمترین مقدار شاخص شانون به میزان (۰/۲۰) را به خود اختصاص دادند.

^۲ He^۳ UHe^۱ Ne

شکل ۶- نمودار پراکنش حاصل از تجزیه به مختصات جمعیت‌های مورد بررسی در جنس بومادران بر اساس الگوی باندی نشانگر SSR

جدول ۹- شاخص‌های ژنتیکی محاسبه شده برای گونه‌های مورد بررسی جنس بومادران بر اساس نشانگر SSR

گونه	%P	میانگین شاخص‌ها و انحراف استاندارد				
		Na + Se	Ne + Se	I + Se	He + Se	UHe + Se
<i>Ac. Alppica</i>	۴۴/۶۴	۱/۳۶ ± ۰/۰۹	۱/۲۹ ± ۰/۰۵	۰/۲۵ ± ۰/۰۴	۰/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۱۹ ± ۰/۰۳
<i>Ac.biebersteinii</i>	۳۳/۹۳	۱/۲۰ ± ۰/۰۹	۱/۲۷ ± ۰/۰۵	۰/۲۱ ± ۰/۰۴	۰/۱۴ ± ۰/۰۳	۰/۱۷ ± ۰/۰۳
<i>Ac.millefolium</i>	۵۱/۷۹	۱/۳۶ ± ۰/۱۰	۱/۳۸ ± ۰/۰۶	۰/۳۱ ± ۰/۰۴	۰/۲۱ ± ۰/۰۳	۰/۲۴ ± ۰/۰۳
<i>Ac. talagonica</i>	۴۳/۵۶	۱/۳۸ ± ۰/۰۹	۱/۲۹ ± ۰/۰۵	۰/۲۶ ± ۰/۰۴	۰/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۳
<i>Ac.tenuifolia</i>	۴۲/۸۶	۱/۳۲ ± ۰/۰۹	۱/۲۴ ± ۰/۰۴	۰/۲۲ ± ۰/۰۴	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۱۶ ± ۰/۰۳
<i>Ac.vermicularis</i>	۴۱/۰۷	۱/۲۷ ± ۰/۰۹	۱/۲۲ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۳	۰/۱۳ ± ۰/۰۲	۰/۱۵ ± ۰/۰۳
<i>Ac.willhelmsii</i>	۳۳/۹۳	۱/۲۱ ± ۰/۰۹	۱/۲۶ ± ۰/۰۵	۰/۲۱ ± ۰/۰۴	۰/۱۴ ± ۰/۰۳	۰/۱۶ ± ۰/۰۳
کل	۴۲/۰۹	۱/۳۰ ± ۰/۰۳	۱/۲۸ ± ۰/۰۲	۰/۲۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۶ ± ۰/۰۱	۰/۱۸ ± ۰/۰۱

%P = درصد چندشکلی؛ Na = اختلاف آللی؛ Ne = تعداد آل‌های مؤثر؛ I = شاخص شانون؛ He = هتروژنی مورد انتظار؛ UHe = هتروژنی مورد انتظار تصحیح شده؛ Se = خطای استاندارد

بحث

در تحقیق حاضر میانگین تعداد الل تکثیر شده و تعداد الل چند شکل در هر لوکوس به ترتیب $4/67$ و $3/92$ بود. (2011) Rahimmalek et al. به طور متوسط $8/5$ باند به ازای هر آغازگر SSR تولید کردند که تولید باندها برای آغازگرهای مورد استفاده در دامنه‌ی بین ۲ تا ۱۴ باند بود. به طور کلی، آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر تکثیر خوبی داشتند و می‌توان از آن‌ها در تجزیه تنوع ژنتیکی در بومادران استفاده کرد. میانگین درصد چندشکلی ژنوتیپ‌های بومادران، شناسایی شده توسط آغازگرهای مورد استفاده SSR در تحقیق حاضر ۸۳ درصد بود که با یافته‌های گزارش‌های قبلی مطابقت و همخوانی داشت (Meyer et al. 2017). از این رو، نتیجه‌گیری می‌شود که آغازگرهای مورد استفاده دارای قدرت خوبی در تمایز ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند. نتایج نشان داد که آغازگرهای SSR مورد استفاده در مطالعه حاضر درصد پلی مورفیسم خوبی دارند که امکان استفاده از آن‌ها را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت فراهم می‌نماید. میانگین مقدار PIC برای ۱۲ آغازگر SSR برابر $0/324$ بود. آغازگرهای AmK230a، AmK416 و AmK59 با داشتن PIC بیشتر از $0/4$ نسبت به دیگر آغازگرها در نشان دادن تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای جمعیت‌های مورد بررسی برتر بودند. از طرف دیگر آغازگرهای AmK416 و AmK230a با داشتن بیشترین میزان شاخص نشانگر (MI)، برتری خود را نشان دادند که نشان‌دهنده انتخاب مناسب آغازگرها در مطالعه حاضر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است. بسیاری از مطالعات قبلی فاقد محاسبه PIC در تجزیه تنوع ژنتیکی بومادران توسط مارکرهای مولکولی SSR، ISSR و RAPD بودند. با این حال، (2011) Rahimmalek et al. مقدار متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی جمعیت‌های بومادران با استفاده از آغازگرهای SSR را ($PIC = 0.33$)، (2011) Gharibi et al. و (2012) Rahimmalek با استفاده از آغازگرهای ISSR میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی جمعیت‌های بومادران را به ترتیب برابر با $0/316$ و $0/306$ گزارش نمودند. از آنجایی که آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر دارای مقادیر PIC نسبتاً بالایی هستند، استفاده از آن‌ها در تجزیه تنوع ژنتیکی

بومادران امیدوار کننده می‌باشد. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، ۶۴ درصد واریانس موجود به واریانس بین جمعیت‌های درون گونه‌ها و ۳۶ درصد به واریانس بین گونه‌ای اختصاص یافت. (2012) Rahimmalek با انجام تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR واریانس بین و درون جمعیت‌های بومادران را به ترتیب ۶۸ و ۳۲ درصد گزارش نمودند. (2011) Gharibi et al. با تجزیه واریانس مولکولی نشان دادند که تفاوت میان گروه‌ها $32/55\%$ از واریانس کل را به خود اختصاص داد، در حالی که تفاوت میان و درون جمعیت‌ها به ترتیب $40/94\%$ و $26/51\%$ از واریانس کل را توجیه نمودند. ماتریس تشابه بر مبنای ضریب دایس نشان داد گونه‌های *Ac.tenuifolia* و *Ac.millefolium* با متوسط ضریب تشابه $0/836$ و گونه‌های *Ac.vermicularis* و *Ac.biebersteinii* با متوسط ضریب تشابه $0/651$ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان شباهت ژنتیکی را دارند. (2012) Ebrahimi et al. متوسط ضریب تشابه دو گونه *Achillea tenuifolia* و *Achillea santolina* را در مقایسه با متوسط ضرایب تشابه درون گونه‌ای بسیار کم و برابر با $0/36$ گزارش نمودند. متوسط تشابه بین جمعیت‌های درون گونه‌ای بر مبنای ضریب تشابه جاکارد برابر $0/588$ بود. سه جمعیت WI1، WI2 و WI3 دارای بیشترین شباهت با همدیگر بودند، در مقابل جمعیت MI2 به ترتیب با $0/388$ و $0/419$ کمترین میزان تشابه را با جمعیت‌های VE1 و VE3 نشان داد. (2012) Ebrahimi et al. متوسط ضریب تشابه میان اکسشن‌های *Achillea tenuifolia* $0/61$ تا $0/86$ و میان اکسشن‌های *Achillea santolina* $0/40$ تا $0/84$ بیان نمودند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب فاصله جاکارد و روش UPGMA توانست جمعیت‌های گونه‌های جنس بومادران را تا حد بالایی از همدیگر تفکیک نماید، که در این میان تفکیک جمعیت‌ها از سایر گونه‌ها برای دو گونه‌ی *Ac.biebersteinii* و *Ac.willhelmsii* به طور کامل انجام شد، در حالی که برای جمعیت گونه‌های *Ac.talagonica*، *Ac.Alppica*، *Ac.vermicularis*، *Ac.millefolium* و *Ac.tenuifolia* تفکیک جمعیت‌ها کامل نبود و در مجموع $82/14$ درصد از جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی نشانگر SSR تفکیک شدند. همچنین

نمودار دو بعدی مختصات بر اساس دو مؤلفه‌ی اول و دوم ترسیم شد. با توجه به نمودار، مشاهده شد که ۷ گونه مورد مطالعه جنس بومادران در تحقیق حاضر در چهار منطقه‌ی نمودار قرار گرفتند. به طوری که گونه‌های *Ac.biebersteinii* و *Ac.Alppica* در یک منطقه، گونه‌های *Ac.Talagonica* و *Ac.vermicularis* در یک منطقه و گونه‌های *Ac.tenuifolia* و *Ac.willhelmsii* در منطقه‌ای دیگر از نمودار قرار گرفتند، همچنین گونه‌ی *Ac.millefolium* به تنهایی در یک منطقه‌ی جداگانه از نمودار قرار گرفت. در مجموع نتایج تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای و ماتریس تشابه قابل مقایسه بود و تا حدود زیادی آن را تأیید نمود. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه به مختصات اصلی علی‌رغم برخی تفاوت‌های جزئی با تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. به طور مشابه، اختلافات جزئی نیز توسط (Oduwaye et al. 2014) در تجزیه آغازگرهای ISSR گزارش شده است. قابل توجه است که در گذشته، (Ray and Roy 2007) از تجزیه به مختصات اصلی برای پشتیبانی از تجزیه خوشه‌ای برای آغازگرهای ISSR استفاده کردند.

در مطالعات اخیر نیز توسط (Kapur et al. 2019) و (Chaudhari et al. 2019) از تجزیه PCA برای تجزیه تنوع ژنتیکی و پشتیبانی تجزیه خوشه‌ای به ترتیب با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR استفاده شده است. تجزیه به مختصات اصلی برای ۲۸ جمعیت جنس بومادران به منظور ارزیابی روابط بین جمعیت‌ها انجام شد، طوری که سه محور نخست مختصات در مجموع ۳۴/۹۱ درصد از واریانس موجود در ساختار داده‌ها را توضیح دادند. نمودار دو بعدی با استفاده از دو مؤلفه نخست حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که جمعیت‌های متعلق به گونه‌های *Ac.biebersteinii*، *Ac.vermicularis* و *Ac.tenuifolia* و *Ac.willhelmsii* هرکدام به طور جداگانه‌ای در نزدیک همدیگر و با فاصله‌ی کمی از هم قرار دارند. در اینجا نیز همانند تجزیه خوشه‌ای مشاهده شد که یک جمعیت از هرکدام از سه گونه‌ی *Ac.Alppica*، *Ac.talagonica* و *Ac.millefolium* فاصله‌ی بیشتری با دیگر جمعیت‌های آن گونه داشت (TA1، AL1 و MI3)، لذا به طور کامل تفکیک نشدند. در حال حاضر رؤیای اصلاح گیاه دارویی بومادران با استفاده از برنامه‌های ژنتیک

تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها با روش UPGMA بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR و ضریب فاصله دایس، گونه‌های مورد مطالعه را در سه گروه مجزا قرار داد، طوری که گونه‌ی *Ac.biebersteinii* بیشترین فاصله را با دیگر گونه‌های این جنس داشت. همچنین دو گونه‌ی *Ac.Alppica* و *Ac.Talagonica* در یک گروه و چهار گونه‌ی دیگر نیز در یک گروه قرار گرفتند که از میان این چهار گونه دو گونه‌ی *Ac.millefolium* و *Ac.tenuifolia* کمترین فاصله را از همدیگر داشتند. (Farajpour et al. 2012) تعداد ۳۷ اکسشن از گونه‌ی *A.millefolium* را با استفاده از ۷ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار دادند، بر اساس الگوی باندها دست آمده اکسشن‌ها در ۶ گروه قرار گرفتند و زیر گونه‌ی *Elburcensis* که بومی شمال ایران بود از دیگر اکسشن‌ها تفکیک شد. (Rahimmalek et al. 2011) بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR و تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی اکسشن‌های دو گونه‌ی *A.millefolium* و *A.tenuifolia* را بر اساس پراکنش جغرافیایی آن‌ها گروه‌بندی کردند، طوری که جمعیت‌های دو گونه‌ی *A. tenuifolia* و *A. millefolium* کاملاً از همدیگر تفکیک شدند. از آنجایی که گزارش‌های بسیار کمی برای تجزیه تنوع بین و درون گونه‌ای در بومادران با استفاده از نشانگر SSR وجود دارد (Rahimmalek et al. 2011) از این رو، این مطالعه می‌تواند با تجزیه ویژگی‌های مولکولی و تجزیه تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های بومادران برای کمک به برنامه‌های اصلاحی جهت توسعه ارقام زراعی بومادران در مقیاس بزرگ مؤثر باشد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی برای بررسی تنوع بین گونه‌ای نشان داد که سه محور نخست مختصات به ترتیب ۲۷/۳۲، ۲۴/۶۴ و ۱۸/۱۱ درصد و مجموعاً ۷۰/۰۸ درصد از کل تنوع ژنتیکی بین گونه‌های مورد بررسی جنس بومادران را توجیه می‌نمایند. لذا سه مؤلفه نخست را می‌توان برای تجزیه PCA استفاده کرد، زیرا بیشتر از ۵۰٪ تغییرات موجود در واریانس را توجیه می‌نمایند. (Rajwade et al. 2010) بیان می‌دارند که تجزیه به مختصات اصلی در ترکیب با تجزیه خوشه‌ای ابزار مفیدی برای استخراج حداکثر اطلاعات علمی از داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی است، با این شرط که دو یا سه مؤلفه نخست بیش از ۲۵ درصد از تغییرات اصلی را توجیه نمایند.

تحقیقاتی به روز و منسجم بر روی این گیاهان در رویشگاه‌های طبیعی و مراکز تنوع آن‌ها در رابطه با تنوع مورفولوژیکی، تنوع فیتوشیمیایی و تنوع ژنتیکی صورت پذیرد. نتایج مطالعه حاضر بر اساس شاخص‌های تعیین کننده کارایی سیستم نشانگری، بیانگر کارایی بالا و مناسب نشانگرهای SSR مورد استفاده در این تحقیق برای ارزیابی مولکولی، انگشتنگاری و بررسی روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های بومادران می‌باشد. این آغازگرها توانستند تا حدود زیادی اکسشن‌های متعلق به گونه‌های مختلف مورد بررسی بومادران را از هم تفکیک و گروه‌بندی نمایند. پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده و تجزیه واریانس مولکولی از وجود سطح نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در اکسشن‌های گونه‌های خودروی مورد بررسی بومادران در تحقیق حاضر حکایت دارد، طوری‌که بیشتر این تنوع ژنتیکی نیز به تنوع درون گونه‌ای اختصاص داشت. نتیجه کلی اینکه (۱) با اطمینان خاطر می‌توان از سیستم نشانگری ریزماهواره‌ای در مطالعات ژنتیکی و گروه‌بندی تعداد بیشتری از جمعیت‌های بومادران از گونه‌های مختلف بهره جست و (۲) وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا میان جمعیت‌های خودروی بومادران در یک محدوده جغرافیایی کوچک نوید بخش امکان یافتن ژنوتیپ‌های برتر و معرفی آن‌ها به عنوان ارقام زراعی جهت توسعه کشت و بهبود کمیت و کیفیت محصول این گیاه دارویی با اهمیت می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنجند و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی کرمانشاه به‌خاطر همکاری در انجام بخشی از آزمایشات تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Ahmadi F, Mansory F, Maroofi H, Karimi K (2013) Study of flora, life form and chorotypes of the forest area of West Kurdistan (Iran). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 2:11–18.
- Badr A, El-Shazly H H, Sayed Ahmed HI, Hamouda M, El-Khateeb E, Sakr M (2016) Genetic diversity of *Achillea fragrantissimain* Egypt inferred from phenotypic variations and ISSR markers associated with traits of plant

و به‌نژادی محقق شده و به یک ضرورت جهانی تبدیل شده است. برای بهبود ژنتیکی بومادران، به‌عنوان یک محصول دارویی امیدوارکننده، به دانش خوبی در مورد مجموعه‌های ژرم پلاسما نیاز دارد. با این حال، هنوز تنها شواهد محدودی در مورد تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای و روابط موجود در مجموعه‌های ژرم پلاسما بومادران وجود دارد. لذا نتایج مطالعه حاضر می‌تواند درک جدیدی را در مورد آن گزارش نماید، همچنین نتایج این تحقیق بر کارایی بالای نشانگرهای ریزماهواره‌ای^۱ در مطالعات مرتبط با بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی جمعیت و روابط فیلوژنتیکی بومادران دلالت دارد. (Mason (2016 گزارش نمود که نشانگرهای SSR از جمله نشانگرهای بسیار مطلوب برای بررسی ژنوتیپ‌های گیاهی هستند و به‌عنوان یکی از ابزارهای مهم بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی در سال‌های آینده نیز بیشتر از گذشته مورد استفاده خواهد بود. (Meyer et al. (2017 با بررسی تنوع ژنتیکی گونه *Ambrosia artemisiifolia* L. بر اساس ۱۳ آغازگر SSR و ۱۳ آغازگر EST-SSR بیان داشتند که نشانگر SSR دارای کارایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه‌ای مورد بررسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نیاز کشت و صنعت گیاهان دارویی و صنایع داروسازی کشور به معرفی گونه‌های دارویی جدید با عملکرد بالا از نظر میزان محصول تولیدی و کیفیت مواد مؤثره، بررسی گونه‌های دارای اسانس ارزشمند از جنس بومادران و معرفی اکسشن‌های برتر آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا ضرورت دارد، جهت بهبود پتانسیل کمی و کیفی این دسته از گیاهان و معرفی واریته‌های سازگار با شرایط محیطی مورد نظر،

¹ SSR

- size and seed yield. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 1-9.
- Cavalcanti AM, Baggio CH, Freitas CS, Rieck L, de Sousa RS, Da Silva-Santos JE, Mesia-Vela S, Marques MC (2006) Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology 107:277-284.
- Chaudhari BA, Patel MP, Dharajiya DT, Tiwari KK (2019) Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus*

- communis* L.) using microsatellite markers. Biosciences, Biotechnology Research Asia 16:61-69.
- Dharajiya DT, Khadia SM, Pagi NK, Khatrani TJ, Jasani HV, Khunt AD, Ravindrababu Y (2017) Modified method of high quality genomic DNA extraction from mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] suitable for PCR based amplification. Indian Journal of Science and Technology 10:1-7.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Ebrahimi M, Farajpour M, Rahimmalek M (2012) Inter- and intra-specific genetic diversity of Iranian yarrow species *Achillea santolina* and *Achillea tenuifolia* based on ISSR and RAPD markers. Genetics and Molecular Research 11:2855-2861.
- Farajpour M, Ebrahimi M, Amiri R, Sanjari S (2012) Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker. Biochemical Systematics and Ecology 43:73-79.
- Gharibi S, Rahimmalek M, Mirlohi A, Majidi MM, Tabatabaei BES (2011) Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* and *Achillea millefolium* subsp. *elbursensis* using morphological and ISSR markers. Journal of Medicinal Plants Research 5:2413-2423.
- Guo YP, Ehrendorfer F, Samuel R (2004) Phylogeny and systematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) inferred from nrITS and plastid trnL-F DNA sequences. Taxon 53:657-672.
- Guo YP, Saukel J, Ehrendorfer F (2008) AFLP trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploidy complex *Achillea millefolium* agg. (Asteraceae). Taxon 57:153-169.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron 4:9
- Inotai K, Gyorgy Z, Kindlovits S, Varady G, Nemeth-Zámboi E (2016) Evaluation of yarrow (*Achillea*) accessions by phytochemical and molecular genetic tools. Journal of Applied Botany and Food Quality 89:105-112.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise Des Sciences Naturelles 44:223-270.
- Kapuria M, Dharajiya D, Pachchigar K, Chauhan RM (2019) Molecular characterization and genetic diversity of Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasms using microsatellite and RAPD markers. Biosci Biotechnol Res Commun 12:80-89.
- Mason AS (2016) SSR genotyping. Methods in Molecular Biology 1245:77-89.
- Meyer L, Causse R, Pernin F, Scalone R, Bailly GA, Chauvel B, De Alys Ch, Corre V L (2017) New gSSR and EST-SSR markers reveal high genetic diversity in the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L. and can be transferred to other invasive *Ambrosia* species. PLoS ONE 12:e0176197.
- Morsy AA (2007) Molecular Variations of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) SCH. BIP. Growing in Five Areas of South Sinai. International Journal of Agriculture and Biology 9:11-17.
- Mozaffarian V (2009) Dictionary of Iranian plant names. Contemporary Culture Publications, Tehran. 740 pp.
- Oduwaye O, Baránek M, Cechová J, Raddová J (2014) Reliability and comparison of the polymorphism revealed in amaranth by amplified fragment length polymorphism (AFLPs) and inters simple sequence repeats (ISSRs). Journal of Plant Breeding and Crop Science 6:48-56.
- Powell W, M, Andre C, Hanafey M, J, Tingey S and A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2:225-238.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet 98:107-112.
- Primrose SB, Twyman R (2013) Principles of gene manipulation and genomics. Wiley, New York
- Rahimmalek M (2012) Genetic relationships among *Achillea tenuifolia* accessions using molecular and morphological markers. Plant Omics Journal 5:128-135.
- Rahimmalek M, Sayed Tabatabaei BE, Arzani A, Khorrami M (2011) Development and characterization of microsatellite markers for genomic analysis of yarrow (*Achillea millefolium* L.). Genes and Genomics 33:475-482.
- Rahimmalek M, Sayed Tabatabaei B E, Etemadi N, Hossein Golid S A, Arzania A, Zeinalie H (2009) Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. Industrial crops and products 29:348-355.
- Rajwade AV, Arora RS, Kadoo NY, Harsulkar AM, Ghorpade PB, Gupta VS (2010) Relatedness of Indian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.): an inter-simple sequence repeat (ISSR) primer assay. Molecular Biotechnology 45:161-170.
- Ray T, Roy SC (2007) Phylogenetic relationships between members of Amaranthaceae and Chenopodiaceae of lower gangetic plains using RAPD and ISSR markers. Bangladesh Journal of Botany 36:21-28.
- Taheri A, Shirzadian Khorramabad R, Sharifi Sirchi G, Sabouri A, Abbaszadeh Kh (2016b) Investigation of genetic diversity of three yarrow wild populations (*Achillea wilhelmsii*) in Hormozgan province using morphological traits. Plant Genetics Research 2: 73-82.
- Trumbeckaite S, Benetis R, Bumblaškiene L, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viskelis P, Jakstas V, (2011) *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. Food Chemistry 127:1540-1548.
- Wallner E, Weising K, Rompf R, Kahl G, Kopp B (1996) Oligo-nucleotide fingerprinting and RAPD analysis of *Achillea* species: Characterization and long-term monitoring of micro-propagated clones. Plant Cell Reports 15:647-652.