

ارزیابی تنوع ژنتیکی بوم‌جورهای خار مریم (*Silybum marianum* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

علیه گنج‌خانلو^۱، علیرضا طالعی^{۲*}، پرویز مرادی^۳ و منیژه سبکدست^۴

۱. ۲ و ۴. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

۳. بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۲۳)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۷۷ نمونه خارمریم یا مارتیغال گردآوری شده از ۲۰ منطقه ایران (۷ استان) و یک رقم خارجی از بوداپست مجارستان، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ایستگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان با سه تکرار اجرا شد. در این بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی بوم‌جور (اکوتیپ)‌های مختلف خارمریم با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد. از دوازده آغازگر مورد استفاده ده آغازگر توانستند نوار چندشکل ایجاد کنند. بیشترین میزان محتوای چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای (0.492) UBC809، (0.487) UBC 842 و (0.443) UBC 826 کمترین میزان آن مربوط به آغازگر UBC1 (0.121) بود. تجزیه خوشه‌ای بر پایه الگوریتم UPGMA نمونه‌های مورد بررسی را در ۹ گروه قرار داد. به منظور تجزیه واریانس مولکولی یک تقسیم‌بندی اولیه بر پایه منطقه جغرافیایی بوم‌جورها را در هشت گروه تقسیم‌بندی کرد. نتایج برای کل جمعیت (۷۷ نمونه) و برای گروه‌های مورد بررسی نشان داد، واریانس درون جمعیت (۸۴ درصد) نسبت به واریانس بین جمعیت (۱۶ درصد) بیشتر بود طبیعت دگرگشن این گیاه و گرده‌افشانی باز دلیل تنوع بیشتر درون‌گروهی نسبت به بین‌گروهی است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، در مجموع شش مؤلفه با ۸۷/۵ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه کرد. توجیه درصد کمی از تغییرات کل توسط هر مؤلفه می‌تواند بیانگر پوشش ژن‌گانی (ژنومی) مناسب نشانگرهای ISSR انتخاب شده باشد. در مجموع نتایج به دست آمده از ISSR نشان داد که این روش، روش مناسبی برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت خارمریم است.

واژه‌های کلیدی: تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، محتوای اطلاعات چندشکلی، نشانگر ISSR.

Assessment of Genetic Variation in *Silybum marianum* L. Using ISSR Markers

Elieh Ganjkhano¹, Alireza Taleei^{2*}, Parviz Moradi³ and Manije sabokdast⁴

1, 2, 4. Ph.D. Student, Professors and Assistant Professor of University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Research Division of Natural Resources, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, AREEO, Zanjan, Iran

(Received: January 22, 2017 - Accepted: April 12, 2017)

ABSTRACT

To study the genetic diversity in 77 samples of *Silybum marianum* consisting 20 ecotypes (from 7 provinces of Iran) and 1 foreign ecotype originated from Budapest, Hungary were evaluated in a randomized complete block design with three replications in Agricultural site of University of Zanjan. Using ISSR markers, the genetic diversity of some ecotypes of *Silybum marianum* along with their classification were studied. Out of 12 ISSR primers, 10 were amplified. Results revealed that the highest polymorphism information content (PIC) value belongs to primers UBC809 (0.492), UBC842 (0.487), and UBC826 (0.443), and lowest value was that of primer UBC1 (0.121). Cluster analysis using UPGMA algorithm divided the lines into 9 separate groups. For molecular analysis of variance of ecotypes a primary classification based on the geographical area used which divided them into 9 groups. Results of molecular analysis of variance revealed that within population variance was higher than between group variance due to its open pollinating nature. Regarding to principal component analysis, the first six components explained 87.5 % of the total variance and each component accounts for a small percentage of the total variance that emphasizes on good genomic distribution of selected ISSR markers. In general, the results obtained for using ISSR markers showed that this technique is a suitable one to study the genetic structure of the population *Silybum marianum*.

Keywords: ISSR marker, polymorphism information content, cluster analysis, principal component analysis.

* Corresponding author E-mail: ataleei@ut.ac.ir

مقدمه

خار مریم یا ماریتیغال با نام علمی *Silybum marianum* از تیره کلاهپوک‌سانان (*Asteraceae*) است. خارمریم در کشورهای اروپایی، آسیایی و آمریکایی رویش دارد و در ایران در مناطق گنبدکاووس، گرگان، کلاردشت، دشت مغان، شوش (خوزستان)، کازرون، زنجان و ... پراکنش دارد (Ghahreman, 1983). عصاره به‌دست‌آمده از برگ این گیاه به‌ویژه دانه آنکه به‌اصطلاح سیلی مارین گفته می‌شود به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های کبدی مصرف می‌شود (Rainone et al., 2005).

آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان اجزای مهم پروژه اصلاح نباتات تلقی می‌شوند. خارمریم گیاهی دیپلوئید است و شمار کروموزوم‌های آن $2n=34$ است. روش‌های مختلفی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جامعه‌های گیاهی وجود دارد. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی به‌طور گسترده از نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای DNA استفاده می‌شود (Morago et al., 2010; Chen et al., 2006). از بین نشانگرهای DNA نشانگرهای ISSR، نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با تکرارپذیری بالا و چندشکلی زیاد هستند. این نشانگرها برتری‌های هریک از نشانگرهای RAPD، AFLP و SSR را به‌تنهایی دارند که این برتری به ترتیب عبارت‌اند از: به لحاظ روشی ساده و تصادفی بوده و از سوی دیگر تکرارپذیری نشانگرهای SSR را به دلیل دراز بودن طول آغازگرهایشان (Wang et al., 2008) دارد و بدون کاستی‌هایی از جمله تکرارپذیری کم و هزینه بالا است (Mohammadi farsani et al., 2008). این نشانگرها قابلیت افزونش بین جایگاه‌های ریز ماهواره را داشته و به اطلاعات پیشین از توالی ژنگان (ژنوم) موردنظر، نیاز ندارد. این نشانگرها به‌طور معمول به‌عنوان یک نشانگر غالب در نظر گرفته می‌شود (Gupta & Varshney., 2000). در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۱ نمونه خارمریم گردآوری‌شده استان کرمانشاه از ۱۶ نشانگر ISSR استفاده شد که ۹ آغازگر توانستند نوار (باند)های چندشکل ایجاد کنند. میزان میانگین چندشکلی ۹۳/۱۱ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای ۶۱ تک بوته را در ۸ گروه جداسازی کرد و نتایج نشان داد،

نشانگرهای ISSR می‌توانند نمونه‌های مختلف جمعیت خارمریم را به‌خوبی جداسازی کنند (Aminjorabadi et al., 2012). در تحقیقی از ۳۲ جمعیت مختلف ماریتیغال در ایران و ۲ جمعیت خارجی استفاده شد. ۴۱۵ نوار چندشکلی (پلی مورفیزم) توسط ۳۷ نشانگر AFLP ایجاد شد که محتوای اطلاعات چندشکلی بین ۰/۲۴ تا ۰/۴۴ با میانگین ۰/۳۵ متغیر بود. میانگین ضریب تنوع نی و شاخص تنوع شانون به ترتیب ۰/۲۰۱ و ۰/۲۹۶ بود و کل جمعیت به سه گروه اصلی خوشه (کلاستر)بندی شد (Mohammadi et al., 2011) در بررسی تنوع ژنتیکی بومادران (*Achillea micrantha*) از ۱۴ نشانگر ISSR استفاده شد. از ۲۲۸ نوار تولیدشده ۱۹۹ نوار چندشکلی بودند و میزان چندشکلی برابر ۸۷/۲۸ درصد بود. اختلاف بین و درون جمعیت‌ها ۴۰/۹۴ و ۲۶/۵۱ درصد بود و میانگین میزان اطلاعات چندشکلی ۰/۳۱۶ درصد برای ۴۱ جمعیت بود (Gharibi et al., 2011). از ۱۰ نشانگر ISSR برای ۲۳ جمعیت بایونه استفاده شد که از ده آغازگر استفاده‌شده ۱۹۳ نوار چندشکل ایجاد شد و در کل جمعیت به ۴ گروه جداسازی شد و بالاترین میزان تنوع ژنی در جمعیت مناطق مرکزی ایران نزدیک به ۰/۲۵ مشاهده شد (Ahmadi et al., 2014). به‌رغم اطلاعات سودمند به‌دست‌آمده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی در ماریتیغال تحقیقات کمی در مورد استفاده از این نشانگر در ارزیابی و گروه‌بندی بوم‌جور (اکوتیپ)ها وجود دارد و بررسی‌های محدودی از نظر بررسی‌های ژنتیکی و اصلاحی روی گیاه ماریتیغال صورت گرفته است. با توجه به کاربردهای پرشمار غذایی و دارویی این گیاه و نیاز کشور به این محصول با ارزش هدف از این تحقیق ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی بوم‌جورها با استفاده از نشانگرهای ISSR است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش بذره‌های ۷۷ نمونه از ۲۱ بوم‌جور ماریتیغال گردآوری‌شده از مناطق مختلف کشور بررسی شد. طرح آزمایشی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نمونه برگی گیاهان انتخابی، برای استخراج DNA استفاده شدند. نمونه‌های

آغازگر روی ژل بر پایه هم‌ردیفی نوارها و به صورت صفر (نیود نوار) و یک (وجود نوار) به صورت غالب (Dominant) امتیازدهی شد و سپس ماتریس همانندی بین افراد تشکیل و از ضریب همانندی نی (Nei) برای محاسبه همانندی بین افراد استفاده شد و گروه‌بندی نژادگان‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها UPGMA با نرم‌افزار Mega5 توسط شاخص Nei محاسبه و نمودار خوشه‌ای آن ترسیم شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تعیین اجزاء واریانس بین و درون جمعیتی با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی PCOA و رسم نمودار دوبعدی با استفاده از GenAIEx 6.5 انجام گرفت. میزان اطلاعات چندشکلی PIC از رابطه $PIC = \sum [2 \pi (1 - \pi)]$ (Powell et al., 1996) صورت محاسبه شد که در آن، فراوانی نوار نام تقسیم بر شمار نژادگان‌هاست، n شمار نوارهای ایجاد شده و شاخص نشانگری (MI=Marker Index) برای هر آغازگر با استفاده از رابطه $MI = PIC \times EMR$ محاسبه شد که EMR (شمار آل مؤثر) (Powell et al., 1996) از نسبت نشانگرهای چندشکل به کل نشانگرها، به دست آمد. همچنین شاخص‌های نشانگری شامل شاخص تنوع شانون (I)، میانگین شمار آل مؤثر در هر مکان ژنی (ne) و ... نیز با استفاده از GenAIEx 6.5 محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی PCOA و رسم نمودار دوبعدی با استفاده از GenAIEx 6.5 انجام گرفت.

برگ از مزرعه برداشت و درون نیتروژن مایع فریز شده و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد تا برای استخراج DNA استفاده شدند. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته انجام شد. کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) و الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. برای شناسایی دمای اتصال بهینه آغازگرهای مورد بررسی از PCR گرادپانت استفاده شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی بوم‌جورهای مورد بررسی از نشانگرهای مولکولی ISSR استفاده شد (جدول ۲).

اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی DNA ۱ میکرولیتر، منیزیم + بافر ۲ میکرولیتر، آغازگر ۱ میکرولیتر (۱۰ میکرومولار)، d NTP ۰/۳ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مولار)، آنزیم DNA Taq پلی‌مرز ۰/۳ میکرولیتر (۵ واحد)، و آب مقطر دیونیزه ۱۵/۴ میکرولیتر بود. برنامه دمایی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ چرخه واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (برابر جدول ۱)، مرحله توسعه رشته جدید به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت توسعه نهایی به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد در بافر ۲ X TBE با ولتاژ ۱۶۵ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی پس از ثبت اطلاعات، نوارهای به دست آمده از هر

جدول ۱. بوم‌جورهای خارمریم مورد بررسی در آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر ISSR

Table 1. Profile populations of *Silybum marianum*

Population numbers	Gathering location		Population numbers	Gathering location	
	Province	City		Province	City
1	Gene Bank	Karaj	12	Khuzestan	Khuzestan
2	Yazd	Shahdieh	13	Khuzestan	Shush
3	Ardabil	Ardabil	14	Khuzestan	Ramhormoz
4	Esfahan	Najafabad	15	Khuzestan	Getvand
5	Gilan	Manjil	16	Khuzestan	Behbahan
6	Gilan	Rudbar	17	Khuzestan	Shushtar
7	Gene bank	Karaj	18	Ardabil	Jafar abad
8	Khuzestan	Ahvaz	19	Ardabil	Pars abad
9	Khuzestan	Haft tape	20	Mazandaran	Sari
10	Khuzestan	Andimeshk	21	Majarestan	Bodapest
11	Khuzestan	Andimeshk	12	Khuzestan	Khuzestan

جدول ۲. توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی بوم‌جورهای خارمریم

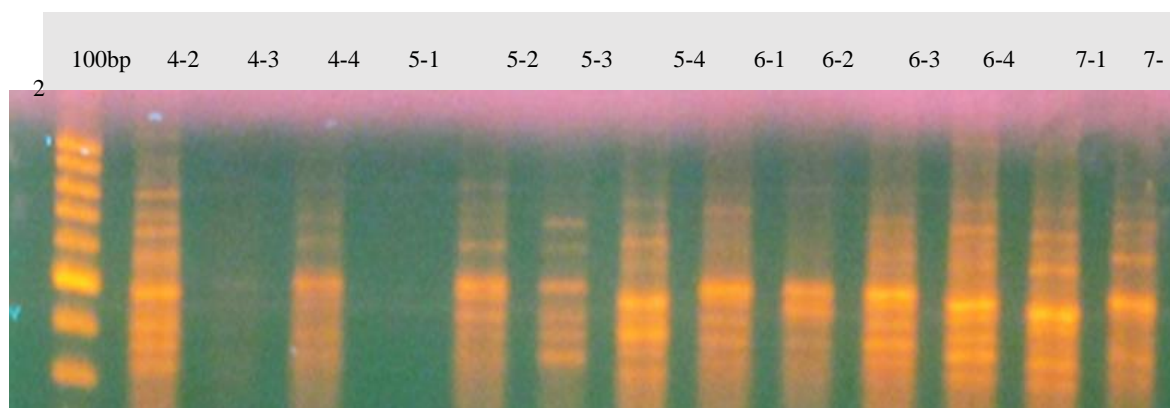
Table 3. ISSR primer sequences used in ecotypes review *Silybum marianum*

Primer	Primer sequences	Anealling	Lenght
UBC 855	5'ACACACACACACACACYT3'	55	18
UBC 815	5'CTCTCTCTCTCTCTCTG3'	51	17
UBC 810	5'GAGAGAGAGAGAGAGAT3'	52	17
UBC 824	5'TCTCTCTCTCTCTCTCC3	50	17
UBC857	5'ACACACACACACACACYG3'	54	18
UBC834	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYTT3'	52	18
UBC826	5'ACACACACACACACACC3'	52	17
UBC807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3'	52	17
UBC842	5'GAGAGAGAGAGAGAYG3'	58	16
UBC1	5'CACACACACACACACYT3'	53	18
UBC2	5'CACACACACACACACAG3'	51	17
UBC809	5'AGAGAGAGAGAGAGAGG3'	52	17

نتایج و بحث

میانگین شاخص نشانگری (MI) برای آغازگرهای مورد استفاده ۳/۳۷۳ بود و آغازگرهای UBC 826 (7.09) و UBC 842 (5.844) و UBC 809 (5.415) بیشترین میزان MI را داشتند (جدول ۴). با توجه به میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) بالا که نشان‌دهنده کارایی و توان جداسازی بیشتر است (Powell *et al.*, 1999). سه آغازگر UBC809، UBC 842 و UBC 826 از بین آغازگرهای مورد بررسی مناسب‌ترین آغازگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط تبارزایی (فیلوژنتیکی) و تکاملی گیاه دارویی خارمریم می‌توانند استفاده شوند. تنوع ژنتیکی بالا با استفاده از نشانگرهای ISSR توسط محققان دیگر در سایر گیاهان خانواده کلاهپرک‌سانان (*Asteraceae*) مانند بابونه (Ahmadi *et al.*, 2014) و آفتابگردان (Garyalde *et al.*, 2011) گزارش شده است.

از ۱۲ آغازگر ارزیابی شده ISSR در این تحقیق ده آغازگر الگوی نواربندی مناسب برای بررسی‌های مولکولی ۷۷ نمونه از جمعیت خارمریم توانستند ایجاد کنند (جدول ۳). ده آغازگر ISSR در مجموع ۱۰۷ نوار افزونش کردند که ۱۰۵ شمار نوار چندشکل بودند. در شکل ۱ الگوی نواربندی محصولات افزونشی شماری از نمونه خارمریم با آغازگر UBC826 نشان داده شده است. بیشترین شمار نوار چندشکل مربوط به آغازگر UBC826 (۱۶) و کمترین شمار نوار چندشکل مربوط به آغازگر UBC1 (۶ نوار) بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر ISSR محاسبه شد. (جدول ۴). بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای UBC809 (0.492) و UBC 842 (0.487) و کمترین میزان آن مربوط به آغازگر UBC 1 (0.121) بود.



شکل ۱. الگوی نواری بوم‌جورهای شماره ۴، ۵، ۶ و ۷ خارمریم با شماره نمونه متعلق به هر بوم‌جور با استفاده از آغازگر UBC

826

Figure 1. Banding pattern produced by primer UBC 826 in number of samples of *Silybum marianum*

جدول ۳. ویژگی‌های و فراوانی آلل‌ها بر پایه آغازگرهای مورد بررسی

Table 4. Characteristics and Allele frequency evaluated based primer

Primer	Mean of number alleles	Mean of effective alleles	Shannon index	Number of amplified bands	Number of polymorph bands	Polymorphism information content	Marker index
ubc810	1	1.265	0.228	10	10	0.276	2.762
UBC826	1.513	1.355	0.352	10	10	0.343	3.436
UBC1	0.958	1.211	0.2	9	9	0.121	1.0902
UBC824	0.857	1.242	0.205	7	6	0.253	1.775
UBC857	1	1.245	0.219	14	14	0.213	2.994
UBC826	1.266	1.337	0.302	16	16	0.443	7.09
UBC809	1.216	1.34	0.305	11	10	0.492	5.415
UBC842	1.219	1.301	0.271	12	12	0.487	5.844
UBC2	0.953	1.213	0.197	8	8	0.157	1.262
UBC834	1.0375	1.301	0.261	10	10	0.206	2.068
میانگین کل	1.10195	1.281	0.254	10.7	10.5	0.2991	3.37362

۰/۹۴ متغیر بود. کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به بوم‌جورهای متعلق به مناطق اردبیل و خوزستان (۰/۹۴) و بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین همانندی ژنتیکی مربوط به بوم‌جورهای متعلق به مناطق مازندران و اصفهان (۰/۷۲) بود. از این بوم‌جورها در صورت داشتن صفات مطلوب می‌توان در برنامه‌های دورگ‌گیری برای بهره‌برداری از بیشترین دورگ برتری (هتروزیس) استفاده کرد.

در این بررسی با توجه به نتایج تجزیه واریانس مولکولی و نظر محقق، با برش نمودار درختی ۷۷ نمونه به ۹ گروه جداسازی شد که نتایج نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها بود (شکل ۲). در خوشه اول که بزرگ‌ترین خوشه است بیشتر بوم‌جورهای شماره ۲، ۴، ۵، ۶، ۱۴، ۱۶، ۲۱ قرار دارند که متعلق به مناطق گیلان، یزد، مجارستان، اصفهان و خوزستان هستند. در خوشه دوم بیشتر بوم‌جورهای متعلق به منطقه خوزستان (بوم‌جور شماره ۱۱ و ۱۲) قرار گرفتند. در خوشه سوم بوم‌جورهای شماره ۸ و ۱۰ که شامل اندیمشک و اهواز (خوزستان) هستند قرار گرفتند. در خوشه چهارم بوم‌جورهای شماره ۱۸ و ۱۹ که متعلق به منطقه اردبیل هستند. در خوشه پنجم، ششم و هشتم بیشتر نمونه‌ها به صورت پراکنده و تک نمونه قرار گرفتند در خوشه هفتم بوم‌جورهای ۹ و ۱۶ غالب هستند و خوشه نهم شامل بوم‌جورهای شماره ۱، ۱۱،

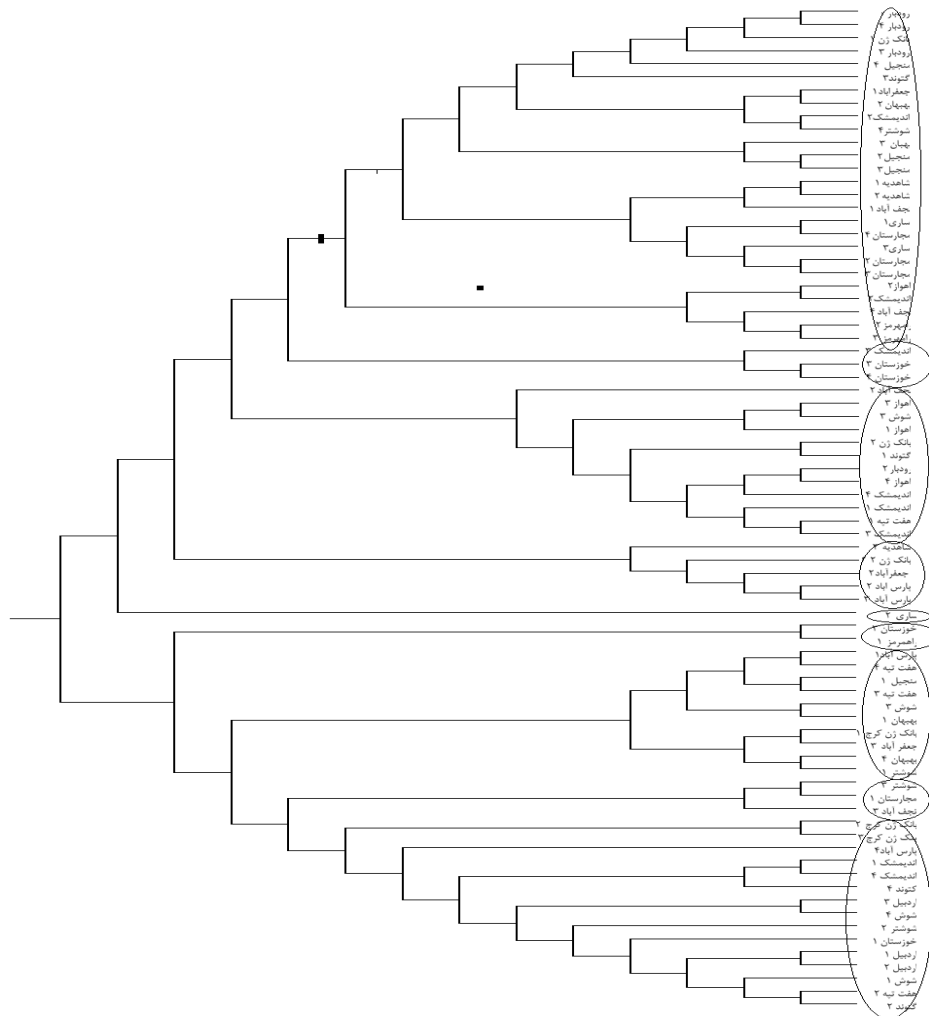
بررسی تنوع ژنتیکی بر پایه شاخص اطلاعات شانون نشان داد (جدول ۴) که بیشترین میزان این شاخص در آغازگرهای UBC 809 (0.305) و UBC 862 (0.302) بود و کمترین آن مربوط به نشانگر UBC2 (0.197) بود و میانگین شاخص شانون در همه آغازگرها ۰/۲۵۴ بود.

میانگین شمار ال‌ها برای نشانگرها ۱/۲۸ بود که بیشترین میانگین شمار ال مؤثر در جمعیت کل مربوط به نشانگر UBC815 (۱/۳۵۵) و کمترین آن مربوط به UBC 1 (۱/۲۱۱) بود. هرچه شمار ال مشاهده‌شده و مؤثر بیشتر باشد نشان‌دهنده تنوع بیشتر در جمعیت مورد بررسی است (Lopez *et al.*, 2004).

برای ارزیابی همانندی‌ها و اختلاف‌های ژنگانی بین و درون جمعیت‌های خار مریم و گروه‌بندی بوم‌جورها بر پایه فاصله‌های ژنتیکی تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس ضریب‌های همانندی نی (Nei) استفاده شد. هرچند که همه بوم‌جورهای خارمریم موجود در کشور ایران به دلیل نداشتن دسترسی به بذرها در این بررسی به کار گرفته نشدند ولی با این وجود بوم‌جورهای به کار گرفته‌شده در این پژوهش نشان از وجود تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در بین جمعیت‌های خارمریم در سطح کشور ایران را دارد. بر پایه ضریب همانندی نی دامنه همانندی از ۰/۷۲ تا

گرفتند که ممکن است به دلیل جابه‌جایی ذخایر توارثی (ژرم پلاسما) و یا به دلیل پراکنش گستره این گیاه در کشور باشد، به عبارتی احتمال مهاجرت توسط عامل‌های محیطی مانند باد و آب و ... باعث جابه‌جایی یک بوم‌جور (تیپ) از یک محل به محل‌های دیگر شده و پس از استقرار در محیط جدید بعضی از ویژگی‌های ژنتیکی خود را حفظ کرده باشند و یا قسمتی از ذخایر توارثی آن‌ها در نتیجه تلاقی در ذخایر توارثی محل‌های جدید نفوذ یابد و باعث ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و نهایت تنوع جدید شود.

۳، ۵، ۱۳، و ۱۵ که شامل مناطق کرج، اردبیل و مناطق مختلف خوزستان بود قرار داشتند. از سویی نتایج تا حدی با پراکندگی جغرافیایی مطابق بود. دسته‌بندی بوم‌جورهای استان خوزستان در کنار هم ممکن است به دلیل نزدیکی ژنتیکی و خویشاوندی احتمالی موجود در بین برخی از توده‌های مورد بررسی باشد. در مواردی هم بخش‌هایی از نمودار درختواره‌ای (دندروگرام) نبود همخوانی توزیع جغرافیایی با تنوع مولکولی را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که نمونه‌های از نظر جغرافیایی به نسبت دور مانند اردبیل و خوزستان و همین‌طور اصفهان با گیلان در یک زیر گروه قرار



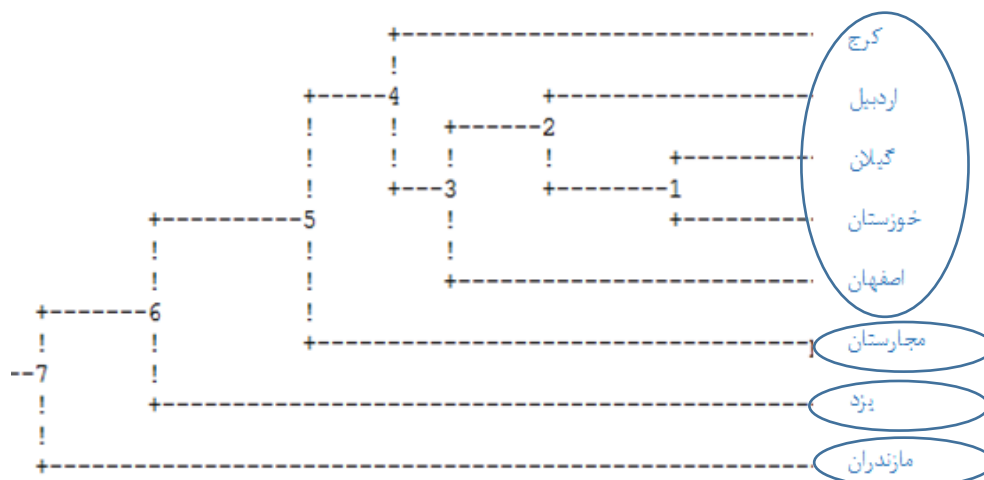
شکل ۲. گروه‌بندی نمونه‌های خار مریم با استفاده از ضریب همانندی Nei و الگوریتم UPGMA
 Figure 2. Classification of *Silybum marianum* by using Nei similarity coefficient and UPGMA algorithm

(۷۲/۳۱) حدود سه برابر تنوع بین بوم‌جورها (۲۷/۹۶) بود. یکی از دلایل تنوع بین بوم‌جوری کم از کل تنوع می‌تواند ناشی از ادغام و همپوشانی زیاد بوم‌جورهای خارمریم باشد که در نتیجه پدیده جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها به خاطر طبیعت دگرگشن و پراکنش گستره این گیاه در ایران به دست آمده است. بنابراین این عامل‌ها باعث همپوشانی ژنتیکی بین بوم‌جورهای خارمریم نسبت به یکدیگر شده است توجه ۸۴ درصد از تنوع کل بر پایه تنوع درون جمعیتی، ناشی از تفاوت خیلی زیاد بین گیاهان و نژادگان‌های درون بوم‌جورها است.

بهرحال طبیعت دگرگشن این گیاه و گرده‌افشانی باز و ناخالصی (هتروزیگوتی) بالا و نزدیکی ژنتیکی بالای بوم‌جور و پراکنش گستره این گیاه در ایران دلیل تنوع بیشتر درون‌گروهی نسبت به بین‌گروهی است. ضریب تمایز ژنتیک بین گروه‌ها (GST) نیز ۰/۱۶۱ محاسبه شد. در گونه‌های دگر بارور این نتایج مورد انتظار است. چون، سطح پایینی از درجه تمایز ژنی در آن‌ها دیده می‌شود و بیشترین میزان تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها است. الگوهای تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های، دلالت بر همبستگی واریانس ژنتیکی بین جمعیتی با ویژگی‌های خاص نظام زادآوری، به‌ویژه دگرباروری و نیز دگرگرده‌افشانی با تبادل ژنی دارد (Hamric & Got, 1997).

تجزیه واریانس مولکولی برای کل جمعیت (۷۷) و برای گروه‌های مورد بررسی به دست آمد (جدول ۴). تجزیه خوشه‌ای بر پایه ۹ گروه مورد بررسی با نرم‌افزار POPGENE توسط شاخص Nei و روش UPGEMA انجام شد (شکل ۳). نتایج به دست آمده از گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف بر پایه مراکز استان‌ها کل جمعیت را در چهار گروه جداگانه قرار داد. بوم‌جورهای متعلق به مناطق اردبیل، گیلان، خوزستان، کرج و اصفهان در یک گروه و بوم‌جورهای متعلق به منطقه مازندران، یزد و مجارستان هرکدام در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. قرار گرفتن بوم‌جورهای متعلق به منطقه اردبیل و خوزستان در یک گروه با توجه به نتایج به دست آمده از فاصله ژنتیکی قابل توجه بود. بوم‌جورهای گیلان و کرج نیز با توجه به نزدیکی و همانندی اقلیمی با اردبیل در یک گروه بودند.

تقسیم‌بندی واریانس‌های ژنتیکی مشاهده شده به واریانس بین و درون گروه‌های خارمریم نشان داد، واریانس درون گروه‌ها نسبت به واریانس بین گروه‌ها بیشتر بود به طوری که بین گروهی ۱۶ درصد و درون‌گروهی ۸۴ درصد از تنوع کل را توجه کردند. تنوع در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. تفاوت درون گروه‌ها بیشتر از تفاوت بین گروه‌ها است. Shokrpour et al. (2008) در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۴ بوم‌جور خارمریم با نشانگرهای مولکولی تنوع بین و درون بوم‌جورها معنی‌دار به دست آورد و تنوع درون



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای بر پایه ۹ گروه مورد بررسی با نرم‌افزار POPGENE توسط شاخص Nei و روش UPGEMA
Figure 3: Cluster analysis software based on 8 Group examined by POPGENE by Nei index and UPGEMA

جدول ۴. تجزیه واریانس بین و درون‌گروهی جمعیت‌های خارمریم

Table 5. Analysis of variance between groups and within populations of *Silybum marianum*

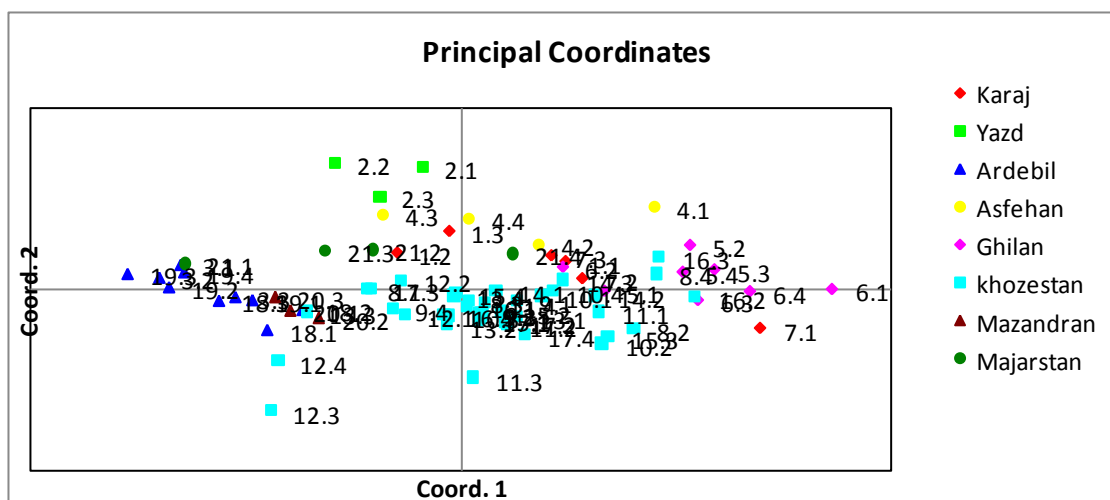
S.O.V	Degrees of freedom	Sum of square	Mean of square	Estimate Variance	Percent of diversity
Between group	7	300.392	42.913	3.320	16%
Within group	69	1194.028	17.305	17.305	84%
total	76	1494.420		20.624	100%

***معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

The coefficient of genetic differentiation between groups: 0.161
P Value= 0.010

است. و توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنگان به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنگان است (Fazeli & Cheghamirza., 2011). در این بررسی گروه‌بندی بوم‌جورها با استفاده از شش مؤلفه اصلی اول تا حدودی با نتایج تجزیه خوشه‌ای در توافق بود (شکل ۳). تطابق بین گروه‌بندی به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای با تجزیه به مختصات اصلی در آفتابگردان نیز گزارش شده است (Hatami Maleki, et al., 2014).

تجزیه به مختصات اصلی (PCO) برای کاهش حجم داده‌ها و تجزیه و تحلیل بهتر نتایج صورت گرفت (جدول ۶). با توجه به نتایج تجزیه به مختصات اصلی مؤلفه اول ۲۲/۷۷ درصد و مؤلفه دوم ۱۹/۲۹ درصد و مؤلفه سوم ۱۷/۸۹ درصد، مؤلفه چهارم ۱۰/۴۱، مؤلفه پنجم ۸/۸۱ و مؤلفه ششم ۸/۱۷ درصد از تغییرات کل داده‌ها و مجموع شش مؤلفه ۸۷/۵ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه می‌کنند. توجیه درصد کمی از تغییرات توسط هر مؤلفه در این بررسی می‌تواند بیانگر پوشش ژنگانی مناسب نشانگرهای ISSR انتخاب شده



شکل ۳. پراکنش بوم‌جورهای مورد بررسی بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه به مختصات اصلی

Figure 3. Distribution of studied ecotypes based on results produced from principle coordinate analysis.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش از ۱۲ آغازگر ISSR برای بررسی ۷۷ بوم‌جور خارمریم استفاده شد. نتایج نشان دادند، تنوع بین بوم‌جورهای بررسی‌شده وجود دارد. سه آغازگر UBC809، UBC842 و UBC 826 بهترین آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه خارمریم هستند.

به علت اهمیت کلی گیاه دارویی خارمریم درک ساختار ژنتیکی این گیاه برای استفاده کامل از ذخایر توارثی گسترده آن برای اجرای برنامه‌های اصلاحی ضروری است. سطح پلوپیدی این گیاه دیپلوئید و شمار کروموزم‌های پایه گیاه خارمریم $2n=34$ است.

در نهایت نتایج نشان داد، با توجه به اینکه انتخاب بر پایه نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه‌های اصلاحی است اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، بنابراین برای انتخاب نژادگان‌های برتر ارزش بالاتری دارند همچنین با توجه به مقادیر همانندی بین نژادگان‌ها در این بررسی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین نژادگان‌هایی که کمترین همانندی (بیشترین فاصله) را دارند بهترین نتیجه را در دستیابی به دورگ (هیبرید)‌ها و یا دستیابی به بیشترین جداسازی پس از F1 خواهند داشت.

بالاتر بودن میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص شانون (MI) نشان‌دهنده توان جداسازی بالاتر این آغازگرها در مقایسه با دیگر آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق بود. پراکنش مناسب آغازگرهای به کاررفته در سطح ژنگان نیز نشان‌دهنده کارایی آن‌ها نیز بوده است. در مجموع نتایج به دست آمده از ISSR نشان داد، این روش، روش مناسبی برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت خارمریم است و برای هدف‌های مختلف از جمله گزینش نژادگان‌های والدی به منظور ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق با تنوع ژنتیکی زیاد و یا گزینش به کمک نشانگر قابلیت کاربرد را دارد.

REFERENCES

- Ahmadi, H., Rahimmalek, M. & Zeinali, H., (2014). Assessment of the genetic variation of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) populations using phytochemical, morphological and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol 54. Pp 190-197.
- Aminjorabadi, F., Cheghamirza, K. & Bahraminejad, S. (2012). Assessment of Genetic Variation in *Silybum marianum* Using Molecular Markers, *12 th Iranian Genetics Congress, Sh Beheshti University*. (In Farsi)
- Asghari-Zakaria, R., Kazemi, H., Aghayev, Y.M., Valizadeh, M. & Moghaddam, M., (2002). Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in *Henrardia persica* (Boiss.) C.E. *Hubb. Caryologia* 55(4): 289-293.
- Azdet, T., Iglesias, J., & Martinez, F., (1993). Flavonolignans in the fruits of *Silybum* genus taxa: A chromatographic and mass spectrometric survey. *Plants Medicinales*. 26 :117- 129
- Bramwell, D. (2002). How many plant species are there? *Plant Talk Science*. 28: 32–34.
- Chen, J., Gituru, W., Wang, Y. & Wang, Q. (2006). The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany* 27: 45-52.
- Fazeli, F & Cheghamirza, K . (2011). Investigation of genetic diversity in iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Modern genetic*, vol6(2), 97-104.
- Garayalde, A. F., Poveren, M. & Carrera, A. D. (2011). Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers an approach for conservation and breeding programmers. *Annals of Applied Biology* 158: 305-317.
- Gahreman, A. (1983). Collered Flore of Iran. *Research Institute of Forests and Rangelands*. 9: 1095-1099.
- Gharibi, Sh., Rahimmalek, M., Mirlohi, A. & Majidi, M. (2011). Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. *Illefolium* and *Achillea illefolium* subsp. *Elbursensis* using morphological and ISSR markers . *Jornal Medici Research* vol .5 (11): 2413-2423.
- Golkar , P., Arzani , A. & Abdolmajid, R. (2011). Genetic Variation in Safflower (*Carthamus tinctorious* L.) for Seed Quality-Related Traits and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker. *Molecular Sciences*. 12: 2664-2677.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. (1997). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. 102-118. In: Silvertown J., (ed.). *Plant Life Histories*. Ecology, Phylogeny and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 307.
- Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R. & Mohseni, Z., (2014). Evaluation of genetic diversity and classification of advanced sun flower lines using ISSR markers, *Agricultural Biotechnology*, 6(3), 33-45. (In Farsi)
- Krasnikov, A.A., Zhirova, O.S., Lomonosova, M.N. & Smirnov, S.V. (2003). Chromosome numbers of Asteraceae from the southern Siberia and Kazakstan. *Euphytica*. 88: 151–153.
- Kren V, Ulrichova J, Kosina P, Stevenson D, Sedmera P, Prikrylova V, Halada P. & Simanek V., (2000). Chemoenzymatic preparation of silybin β - glucuronides and their biological evaluation. *Drug*

- Metabolism and Disposition.*; 28: 1513-1517.
16. Lopez-Pujol, J., Bosch, M., Simon, J. & Blanche, C. (2004). Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (laminaceae). *Annals of Botany*, 93,0323-332.
 17. Mohammadi, S., Shokrpour, M., Moghaddam, M. & Javanshir, A., (2011). AFLP-based molecular characterization and population structure analysis of *Silybum marianum* L. *Plant Genetic Resources* 9 (3) : 445-453.
 18. Mohammadi, S.A. & Prassanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
 19. Moraga, A., Traperro-Mozos, A., Gómez-Gómez, L. & Ahrazem, O. ,(2010). Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. albus. *Ind. Crop Science*. 123–132 .
 20. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vgel, J., Tingey, S., and Rafalaski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
 21. Rainone, F., (2005). Milk thistle. *American Family Physician*; 72(7): 1285-1288
 22. Ram, G. Bhan, M.K. Gupta, K.K. Brijesh Thaker, U. Jamwal, S. Pal. 2005. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. *Fitoterapia*. 76: 143-147.
 23. Rasmieh, H., Siahposh, M., Mameghani, R. & Siahposh, M.R. (2014). Assessment of Genetic Variation in ten Ecotype *Silybum marianum* Using Morphologic, phenologic and phytochemical characters, *Plant Production technology*, 1(37), 35-45 .(In Farsi)
 24. Sepehry Javan, Z., Rahmani, F. & Heidari, R., (2012). Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 6(6):1068-1073.
 25. Sharaf1. A., Ahmed Bahieldin. A., Ibrahim. S. & Khalil, A. (2010). Biochemical and genetic characterization of 12 *Silybum marianum* accessions collected from Borg El-Arab, an Egyptian Habitat, *Functional Plant Science and Biotechnolog*. 12 (5) : 22-27
 26. Shokrpour, M., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Ziai, S.A. & Javanshir, A. (2008). Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants (In Farsi)*.
 27. Wang, X., Zhao, F., Hu, Z. & Critchley, A. (2008). Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *Chondrus crispus* populations from North Atlantic. *Aquatib Botany*.31: 145-154.