Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Valuation of the genetic diversity of the plant plant, *Plantago major* L., with ISSR molecular markers in Borujerd region[1]

Narjes Azadbar Masters, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. na.azadbar@gmail.com

Zahra Sadat Mousavi Khansari Masters, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. zmkh33@gmail.com

Mohammad Mehdi Dehshiri Associate Professor, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. dehshiri2005@yahoo.com

Reza Yari Assistant Professor, Department of Biology, Medicinal Plants, Health and Food Security Research Center, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran **(Corresponding author).** rezayari@yahoo.com

Abstract

Objective: Borujerd region in Lorestan province is one of the best and less known natural habitats of plantago major L. The aim of the current study is to identify its natural habitats in Borujerd region and to evaluate genetic diversity in ecotypes with ISSR molecular markers.

Materials and methods: In this research, the genetic diversity of 23 samples from 6 populations of Plantago major L. was studied. The extracted DNA of all 23 samples was done by the kit method. 10 primers with international codes were used for PCR reaction. The presence or absence of the band was stored as a one/zero matrix in the SPSS program.

Findings: Out of the total 1632 bands produced, 200 bands (alleles) were polymorphism, which was calculated as 24% of polymorphism. The length of the generated fragments varied between 300 and 1650 bp. Primer P8 produced the most common bands with 61 bands and primer P9 produced the least common bands with 7 bands in the populations. The highest number of amplified bands was 206 bands related to P8 primer and the lowest number of produced bands was 125 bands related to P5 primer.

Conclusion: The results show that the ISSR genetic markers, especially the P8 primer, can be used in phylogenetic studies of leek plant. Despite its small area, Borujerd region is suitable for the growth of various ecotypes of the Plantago major L, and therefore the preservation and maintenance of this natural habitat and the propagation of different ecotypes should be considered.

Keywords: Borujard, Genetic diversity, ISSR, Plantago major L, UPGMA.

1. **Received:** 2021/12/27 ; **Received in revised form:** 2022/01/22 ; **Accepted:** 2022/03/02 ; **Published online:** 2022/03/21

© the authors http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Publisher: Qom Islamic Azad University **Article type:** Research Article

زیست‌شناسی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه بارهنگ *Plantago major* L. با نشانگر مولکولی ISSR در منطقه بروجرد[1]

نرجس آزادبر کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. na.azadbar@gmail.com
زهرا سادات موسوی خوانساری کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. zmkh33@gmail.com
محمدمهدی دهشیری دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. dehshiri2005@yahoo.com
رضا یاری استادیار، گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، سلامت و امنیت غذایی؛ واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران (**نویسنده مسئول**). rezayari@yahoo.com

چکیده

هدف: منطقه بروجرد در استان لرستان یکی از بهترین مناطق کم‌تر شناخته‌شده رویشگاه‌های طبیعی بارهنگ است. هدف مطالعه حاضر شناسایی رویشگاه‌های طبیعی آن در منطقه بروجرد و ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌ها با مارکر مولکولی ISSR است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۲۳ نمونه از ۶ جمعیت بارهنگ (*Plantago major* L.) مورد مطالعه قرار گرفت. DNA استخراج شده هر ۲۳ نمونه، با روش کیت انجام پذیرفت. جهت واکنش PCR از ۱۰ پرایمر با کدهای بین‌المللی استفاده شد. حضور یا عدم حضور باند به‌صورت ماتریس یک/صفر در برنامه SPSS ذخیره شد.

یافته‌ها: از کل ۱۶۳۲ باند تولیدشده، ۲۰۰ باند (آلل) پلیمرف بودند که معادل ۲۴٪ پلیمرفیسم محاسبه شد. طول قطعات ایجادشده بین ۳۰۰ bp تا ۱۶۵۰ متغیر بود. پرایمر P8 بیشترین باند مشترک به تعداد ۶۱ باند و پرایمر P9 کم‌ترین باند مشترک به تعداد ۷ باند را در جمعیت‌ها تولید کرده‌اند. بیشترین تعداد باند تکثیرشده ۲۰۶ باند مربوط به آغازگر P8 و کم‌ترین تعداد باند تولیدشده ۱۲۵ باند مربوط به آغازگرP5 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که مارکرهای ژنتیکی ISSR بویژه پرایمر P8 به خوبی می‌تواند در مطالعات فیلوژنتیکی گیاه بارهنگ بکار رود. منطقه بروجرد با وجود وسعت کم، جهت رویش اکوتیپ‌های متنوع گیاه بارهنگ مناسب است؛ لذا حفظ و نگهداری این رویشگاه طبیعی و نیز تکثیر اکوتیپ‌های مختلف باید مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: بروجرد، تنوع ژنتیکی، ISSR، *Plantago major* L.، UPGMA، گیاه بارهنگ.

---

۱. **پژوهش حاضر برگرفته از:** پایان‌نامه کارشناسی ارشد نرجس آزادبر، با عنوان: **ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه بارهنگ *Plantago major* L. با نشانگر مولکولی ISSR در منطقه بروجرد**، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۱۱/۰۲؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۲/۱۱؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۱/۰۱

© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم **نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

۱. مقدمه

جنس بارهنگ با ۲۵ گونه شناخته شده و در مناطق وسیعی از قاره آسیا، اروپا و شمال آفریقا، آمریکا و در ایران نیز در اکثر نقاط رویش دارد. بارهنگ کبیر یا *Plantago major* L. گیاهی علفی با برگ‌های ساده از راسته اسپرماتوفیت‌ها و خانواده Plantaginaceae با عدد کروموزومی n=6 است. این گیاه چند ساله به ارتفاع ۱۴-۳۱ سانتیمتر، بدون ساقه و دارای ریزوم است. بارهنگ گیاهی پایا، بی‌کرک و دارای ریشه کوتاه بوده و زمان گلدهی اواسط بهار تا اواخر تابستان است (۱، ۲).

گیاهان دارویی از جمله گیاه بارهنگ از گیاهان مهم اقتصادی هستند که اهمیت فراوانی در صنایع داروسازی، بهداشتی و آرایشی دارد. برخی جنبه‌های دارویی بارهنگ عبارتند از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ترمیم زخم و نیز خصوصیات دارویی پلی ساکاریدهای موجود در دانه بارهنگ است. از موسیلاژ موجود در دانه بارهنگ به‌عنوان یک ماده ارزان‌قیمت که به‌آسانی در دسترس است، برای تصفیه پساب‌های صنعتی استفاده می‌شود (۳،۴). بسته به گونه و حتی اکوتایپ، گیاه بارهنگ دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی است (۵). در استان لرستان با توجه به اختلاف ارتفاع از سطح دریا و نواحی مسطح و کوهستانی، سه ناحیه اقلیمی نیمه‌خشک، معتدل مرکزی و نیمه گرم جنوبی وجود دارد که بستر مناسبی برای رشد و نمو و تنوع بخشیدن به انواع گیاهان دارویی است. شهرستان بروجرد با قرار گرفتن در نیمه شمالی استان و میانگین بارش سالیانه ۴۶۰ میلی‌متر و نیز مجاورت با دشت پهناور سیلاخور و کوه‌های مرتفع گرین، یکی از بهترین رویشگاه‌های کشور برای گیاهان دارویی است (۶). به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، از مارکرهای متعددی نظیر STS[1]، ISSR[2]، RFLP[3]، RAPD[4] و غیره استفاده می‌شود (۷). ISSR از نشانگرهای غالب و مبتنی بر PCR بوده و به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حضور یک آغازگر مکمّل با یک توالی ریزماهواره در ژنوم تکثیر می‌یابد (۸).

به علت غالبیت، سادگی، سرعت عمل و قدرت تفکیک بالا، نشانگر ISSR قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارد (۳،۹). محققان از روش‌های متعددی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی

1. Sequence-Tagged Sites
2. Inter simple sequence repeat
3. Restriction Fragment Length Polymorphism
4. Random Amplification of Polymorphic DNA

استفاده می‌کنند. کاسوان و همکاران (۲۰۱۳) از RAPD و ISSR، ونگساواد و همکاران (۲۰۱۴) از ISSR، محمدی و همکاران (۲۰۲۰) از ISSR، امیری و همکاران (۲۰۱۸) از ISSR و سلامی و همکاران (۲۰۱۸) از ISSR در مطالعه ارقام انجیر، کدو، گندم، بارهنگ و ابریشم آبی با کمک نرم‌افزارهایی مانند Mega، Bioedit و NTSYSpc استفاده کردند. آن‌ها در مطالعات خود از روش‌های مختلف ترسیم دندروگرام مانند UPGMA، NJ و... با ضرایب متفاوت Nei & Li، جاکارد و... استفاده کردند (۱۰-۱۵).

با توجه به مطالعات متعدد در کشور بر روی گیاه بارهنگ و عدم مطالعه بر روی اکوتیپ‌های بارهنگ در استان لرستان، هدف پژوهش حاضر شناسایی مکان‌های طبیعی رویش گیاه، جمع‌آوری و بررسی تنوع ژنتیکی ۶ جمعیت با روش ISSR است، تا با اثبات وجود تنوع، راه برای سایر مطالعات مولکولی، تکثیر با روش‌هایی نظیر کشت بافت و حفظ خزانه ژنی در منطقه بروجرد فراهم گردد.

۲. مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری نمونه: از ۶ منطقه محل رویش بارهنگ در شهرستان بروجرد با ارتفاع ۱۵۵۰ تا ۱۵۷۱ متر از سطح دریا، شامل روستای برکت‌آباد (BAR)، روستای ونایی (VEN)، روستای ده ترکان (DEH)، ناحیه گلدشت (GOL)، ناحیه دانشسرا (DAA) و ناحیه باغ فدک (FAD) که محل رویش طبیعی این گیاه بود، با ثبت مشخصات جغرافیایی GPS[1] و تهیه عکس، نمونه‌برداری شد (جدول۱). به دلیل وسعت منطقه و یا تعداد بیشتر نمونه‌ها، از بعضی مناطق، نمونه بیشتری جمع‌آوری گردید. فاصله بین هر نمونه حداقل ۲۰ متر بوده و نمونه‌ها پس از تأیید جنس، گونه و کدگذاری مطابق جدول (۱)، در هرباریوم گیاهی دانشگاه آزاد بروجرد نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده، تفاوت مرفولوژیکی چندانی با یکدیگر نداشته و جهت مشخص شدن قرابت و تنوع ژنتیکی موجود در این گیاه، بررسی آن‌ها با مارکرهای مولکولی انجام شد (شکل ۱،۲).

۲) استخراج DNA: ابتدا مقدار ۴۰۰ گرم نمونه برگ بارهنگ جمع‌آوری شده، برای شروع عمل استخراج، جدا و استریل شد. نمونه‌ها تا شروع مراحل استخراج در دمای ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند. در مرحله بعد، توزین ۱۰ تا ۳۰ میلی گرم بافت گیاهی (برگ) و پودر کردن کامل با کمک

1. Global Positioning System

ازت مایع انجام شد. باید نمونه برگ گیاهی تازه، بدون آب و آلودگی و بدون صدمه دیدگی باشد. افزودن ۲۸۰ میکرولیتر بافر Buffer PL به پودر و ورتکس آرام، به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و سپس افزودن ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K و ورتکس آرام یا وارونه نمودن چندین باره میکروتیوب انجام شد. انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ تا ۲ ساعت تا حصول محلول شفاف (اگر محلول شفاف نشد تا ۲۴ ساعت انکوباسیون ادامه یابد) انجام گردید. طی این ۱ تا ۲ ساعت، باید چندین مرتبه میکروتیوب‌ها وارونه شوند. محلول در ۱۵ هزار g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، بعد به آرامی سوپرناتانت (محلول رویی) را که حاوی DNA بود، به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل گردید. در گام بعدی افزودن ۲۰ میکرولیتر از آنزیم RNase A به محلول فوق و مخلوط کردن آن‌ها و سپس انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انجام گرفت. در این فاصله هرچند دقیقه، میکروتیوب‌ها وارونه می‌شدند. سپس افزودن ۶۴۰ میکرولیتر از بافر Buffer PB به میکروتیوب و ورتکس آرام یا وارونه نمودن چندباره تیوب تا حصول محلول هموژن انجام شد. در گام بعدی انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول خالص و مخلوط کردن سریع و سروته نمودن تیوب انجام شد. در مرحله بعد انتقال حداکثر ۹۰۰ میکرولیتر از محلول فوق به ستون حاوی Collection Tube انجام شد. سپس سانتریفیوژ در ۱۰ هزار g به مدت یک دقیقه و دور ریختن محلول انتهای ستون صورت گرفت. این مرحله را می‌توان دوباره با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر Buffer PB به داخل ستون سانتریفیوژ تکرار کرد تا اگر مسیر ستون بسته است، دوباره باز شود. در این مرحله باید از تکان دادن شدید و حتی آرام میکروتیوب‌ها در سانتریفیوژ و خارج کردن آن جداً پرهیز کرد. موقعیت میکروتیوب‌ها در دستگاه سانتریفیوژ باید کاملاً محکم باشد. شستشوی ستون با ۷۵۰ میکرولیتر از بافر Wash Buffer و سانتریفیوژ در ۱۰ هزار g به مدت یک دقیقه انجام شد. محلول انتهای ستون را دور ریخته و اگر رنگی در غشای ستون‌ها باقی مانده بود، این مرحله باید مجددا تکرار شود. سانتریفیوژ مجدد ستون در ۱۰ هزار g به مدت یک دقیقه برای حذف اتانول باقیمانده در ستون انجام می‌شود. حالا ستون را در یک میکروتیوب کوچک تمیز استریل دیگر قرار داده و ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حرارت دیده Elution Buffer و یا آب مقطر استریل، مستقیماً به مرکز غشای ستون اضافه شده و پس از دو دقیقه، سانتریفیوژ در ۱۰ هزارg برای یک دقیقه انجام می‌شود. محلول را که حاوی DNA خالص است، در ۴ درجه یا ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود. برای

اطمینان از کیفیت DNA استخراجی، ژل الکتروفورز با آگارز ۰/۷ % انجام شد.

DNA با کیت خریداری شده از شرکت سینا کلون (Cat No. GF- PT-050) در شرایط استریل استخراج شد. جهت حذف RNA و پروتئین از RNase A و پروتئاز K همین شرکت استفاده گردید. قرائت جذب نوری در طول‌موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر جهت تعیین کیفیت DNA انجام شد.

۳) آغازگرهای ISSR: ده پرایمر الیگونوکلئوتیدی با کدهای بین‌المللی و جذب نوری بین ۳ تا ۵ از شرکت سینا کلون خریداری شد. در جدول (۲) کد و توالی پرایمرهای مورد استفاده ارائه شده است.

۴) اجزاء واکنش و شرایط واکنش PCR: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰µl شامل ۱۱ µl آب مقطر، ۲/۵µl بافر X ۱۰، ۱µl از پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲µl dNTP mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۲µl $MgCl_2$ (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۱µlDNA الگو (غلظت ۲۰ نانوگرم) و ۰/۵µl آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰µl) انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Biorad-T100 با شرایط ۵ دقیقه‌ای واسرشته شدن در دمای ۹۵°C و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۳۶°C به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد و در نهایت محصولات در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. امپلیکون‌ها در ژل آگارز ۱/۵% واجد سایبر گرین، الکتروفورز شدند. تصاویر ژل‌ها با کمک Gel-Doc ذخیره گردیدند.

۵) نرم‌افزارها و روش‌های آماری: در این مطالعه از نرم‌افزارهای[1]MVSP ver.3.1,[2]SPSS ver.22 [3]NTSYS pc ver 2.02 و Band Leader استفاده شد. جهت قرائت دقیق باندها از نظر تعداد و اندازه باندها علاوه بر بررسی چشمی با کمک DNA مارکر DNA Ladder PR901633 bp از برنامه باند لیدر ۳ هم استفاده شد. از دو برنامه ترسیم دندروگرام MVSP و NTSYS برای ترسیم دندروگرام تک‌بعدی (Clustering) و رسته‌بندی دو و سه‌بعدی (Ordination) با روش‌های

1. Multvariate Statistical Package
2. Statistical Package for the Social Sciences
3. Numerical Taxonomy and Multvariate Analysis System

مختلفی نظیر UPGMA، NJ و ضرایب Nei & Li و Jaccard استفاده شد. هرچند الگوهای ترسیم درختچه و نمودار در هر دو نرم‌افزار تقریباً مشابه هم بودند.

شکل ۱- مناطق نمونه‌برداری شده اطراف شهرستان بروجرد

شکل ۲- نمونه بارهنگ از ناحیه دانشسرا

۳. یافته‌ها

تمامی ۱۰ آغازگر ISSR باندهای واضح و تکرارپذیر ایجاد کردند. تعداد کل باندهای تکثیرشده توسط آغازگرها، ۱۶۳۲ باند است که ۲۰۰ باند پلیمرف بودند. آغازگر P6 با ۲۴ باند دارای بیشترین باند پلیمرف و آغازگر P9 با ۸ باند دارای کم‌ترین باند پلیمرف بودند. همچنین بیشترین تعداد باند تکثیرشده ۲۰۶ باند، مربوط به آغازگر P8، کم‌ترین تعداد باند تولیدشده ۱۲۵ باند، مربوط به آغازگر P5 بود. میانگین کلی پلیمرفیسم حاصل از ۱۰ پرایمر برای ۲۳ نمونه حاضر، ۲۴% بود. بهترین پرایمر در ایجاد باندهای پلیمرف به میزان ۲۴% پرایمر P6، با ایجاد ۲۴ باند پلیمرف است. اندازه کلی باندها در محدوده ۳۰۰bp و ۱۶۵۰ محاسبه گردید. با استفاده از پرایمر P1 تعداد ۱۵۴ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۶/۶ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۰ باند پلیمرف و چند شکل و ۲ باند منومورف بودند.

جدول ۱- کد اختصاری و موقعیت جغرافیایی نمونه‌های بارهنگ شهرستان بروجرد

ردیف	کد اختصاری نمونه	محل برداشت نمونه	موقعیت جغرافیایی
۱	GOL1	گلدشت	33’54’4/01N 48’43’9/59E
۲	GOL2	گلدشت	33’54’4/00N 48’43’6/24E
۳	GOL3	گلدشت	33’534’7/54N 48’43’1/07E
۴	GOL4	گلدشت	33’54’12/94N 48’42’54/90E
۵	GOL5	گلدشت	33’54’27/31N 48’41’58/34E
۶	FAD1	باغ فدک	33’53’58/46N 48’43’42/9E
۷	FAD2	باغ فدک	33’53’55/98N 48’43’42/58E
۸	FAD3	باغ فدک	33’53’53/20N 48’43’41/41E
۹	FAD4	باغ فدک	33’53’55/42N 48’43’41/57E
۱۰	VEN1	روستای ونایی	33’54’50/45N 48’35’31/35E
۱۱	VEN2	روستای ونایی	33’54’46/83N 48’35’29/94E
۱۲	VEN3	روستای ونایی	33’55’14/81N 48’35’15/59E
۱۳	BAR1	روستای برکت آباد	33’56’19/96N 48’37’12/62E
۱۴	BAR2	روستای برکت آباد	33’56’27/75N 48’37’12/11E
۱۵	BAR3	روستای برکت آباد	33’56’32/96N 48’37’14/25E
۱۶	DEH1	روستای ده ترکان	33’59’29/55N 48’42’36/54E
۱۷	DEH2	روستای ده ترکان	33’59’28/55N 48’4239/69E
۱۸	DAA1	منطقه دانشسرا	33’54’58/45N 48’39’40/63E
۱۹	DAA2	منطقه دانشسرا	33’54’57/58N 48’39’39/54E
۲۰	DAA3	منطقه دانشسرا	33’55’0//56N 48’39’38/42E
۲۱	DAA4	منطقه دانشسرا	33’55’1/57N 48’39’39/85E
۲۲	DAA5	منطقه دانشسرا	33’54’58/93N 48’39’37/02E
۲۳	DAA6	منطقه دانشسرا	33’54’56/21N 48’39’38/44E

جدول ۲-کد و توالی‌های پرایمرهای ISSR مورد استفاده در PCR

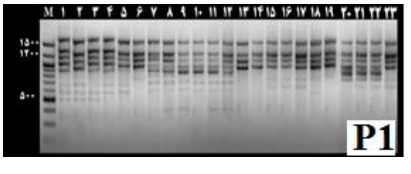
Primer name	OD	MW	GC%	TM	Sequence(5′→3′)
P1	۵/۶	۵۳۶۶	۵۲/۹	۵۲/۸	AGA GAG AGA GAG AGA GC
P2	۶/۰	۵۳۸۱	۴۷/۱	۵۰/۴	GAG AGA GAG AGA GAG AT
P3	۴/۰	۵۷۱۱	۵۰	۵۳/۷	GAG AGA GAG AGA GAG ATG
P4	۵/۴	۵۶۸۶	۴۴/۴	۵۱/۴	AGA GAG AGA GAG AGA GTT
P5	۲/۸	۳۸۲۸	۵۳/۸	۴۱/۴	CTC TCT CTC TCT G
P6	۴/۲	۳۸۱۲	۴۶/۲	۳۸/۲	CTC TCT CTC TCT A
P7	۶/۰	۵۳۹۰	۴۷/۱	۵۰/۴	GAG AGA GAG AGA GAG AA
P8	۳/۴	۴۱۵۵	۵۰	۳۴/۴	CAC ACA CAC ACA AC
P9	¼	۴۱۸۶	۵۰	۴۳/۴	CAC ACA CAC ACA GT
P10	۵/۵	۴۲۱۱	۵۷/۱	۴۶/۳	CAC ACA CAC ACA GG

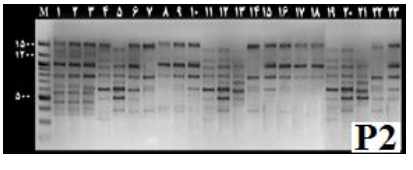
بزرگ‌ترین باند با ۱۵۵۰ bp و کوچک‌ترین باند با ۳۰۰ bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P2 تعداد ۱۶۴ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۷/۱ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۳ باند پلیمرف و چند شکل و ۳ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند با ۱۶۵۰ bp و کوچک‌ترین باند با ۳۵۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P3 تعداد ۱۶۲ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۰/۰۷۰ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۰ باند پلیمرف و چند شکل و ۲ باند منومرف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۵۰bp و کوچک‌ترین باند ۴۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P4 تعداد ۱۴۴ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۶/۲ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۳ باند پلیمرف و چند شکل و ۶ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۵۰bp و کوچک‌ترین باند ۴۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P5 تعداد ۱۲۵ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۵/۴ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۲ باند پلیمرف و چند شکل و ۱ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۰۰bp و کوچک‌ترین باند ۳۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P6 تعداد ۱۹۱ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۸/۳ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۴ باند پلیمرف و چند شکل و ۵ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۵۰bp و کوچک‌ترین باند ۴۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P7 تعداد ۱۲۸ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۵/۵ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۱ باند پلیمرف و چند شکل و ۴ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۵۰ و کوچک‌ترین باند ۴۰۰ مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P8 تعداد

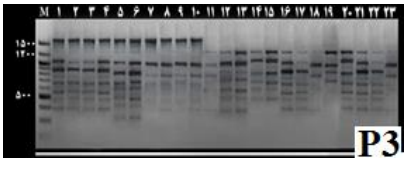
۲۰۶ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۸/۹ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۲۲ باند پلیمرف و چند شکل و ۱ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۰۰bp و کوچک‌ترین باند ۳۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P9 تعداد ۱۵۳ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۶/۶ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۸ باند پلیمرف و چند شکل و ۲ باند منومورف بودند. بزرگ‌ترین باند با ۱۵۰۰bp و کوچک‌ترین باند با ۴۰۰bp مشاهده شد. با استفاده از پرایمر P10 تعداد ۲۰۵ باند قابل کدگذاری ایجاد شد که معرف میانگین ۸/۹ باند برای هر جمعیت است. تعداد ۱۸ باند پلیمرف و چند شکل و ۲ باند منومرف بودند. بزرگ‌ترین باند ۱۶۰۰bp و کوچک‌ترین باند با ۵۵۰bp مشاهده شد (شکل ۳؛ جدول ۳).

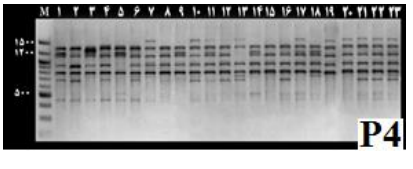
جدول ۳- شماره چاهک‌های ژل الکتروفورز و نام نمونه‌های هر چاهک

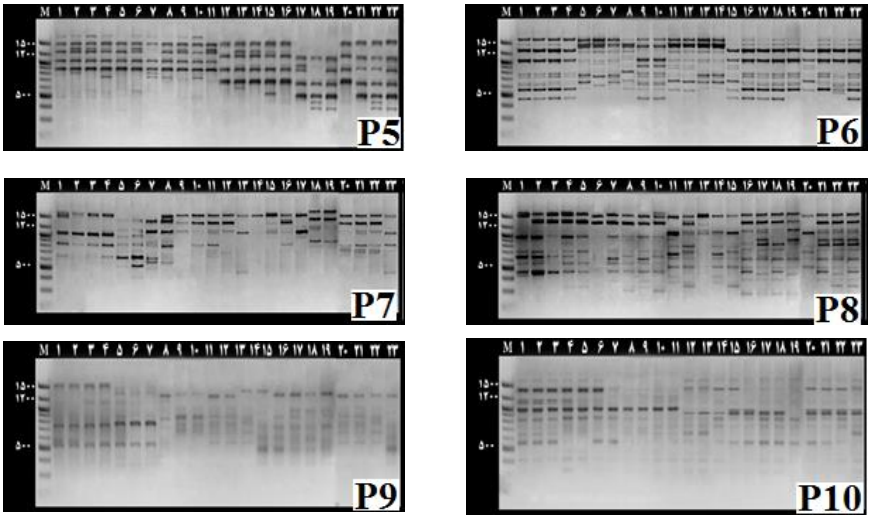
اکوتایپ Ecotype	منطقه جمع‌آوری Collection area	نام اختصاری Abbr. Name	اکوتایپ Ecotype	منطقه جمع‌آوری Collection area	نام اختصاری Abbr.Name
1	Goldasht گلدشت	GOL1	13	Deh torkan ده ترکان	DEH1
2	Goldasht گلدشت	GOL2	14	Deh torkan ده ترکان	DEH2
3	Goldasht گلدشت	GOL3	15	Barkat Abad برکت‌آباد	BAR1
4	Goldasht گلدشت	GOL4	16	Barkat Abad برکت‌آباد	BAR2
5	Goldasht گلدشت	GOL5	17	Barkat Abad برکت‌آباد	BAR3
6	Fadak فدک	FAD1	18	Daneshsara دانشسرا	DAA1
7	Fadak فدک	FAD2	19	Daneshsara دانشسرا	DAA2
8	Fadak فدک	FAD3	20	Daneshsara دانشسرا	DAA3
9	Fadak فدک	FAD4	21	Daneshsara دانشسرا	DAA4
10	Vanai ونایی	VEN1	22	Daneshsara دانشسرا	DAA5
11	Vanai ونایی	VEN2	23	Daneshsara دانشسرا	DAA6
12	Vanai ونایی	VEN3	–	–	–





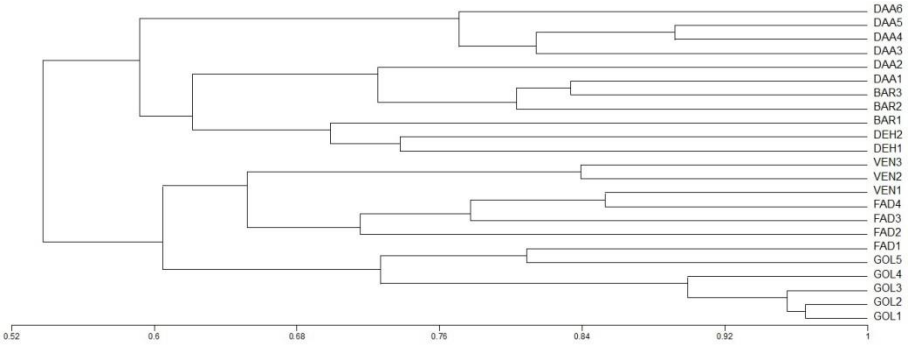






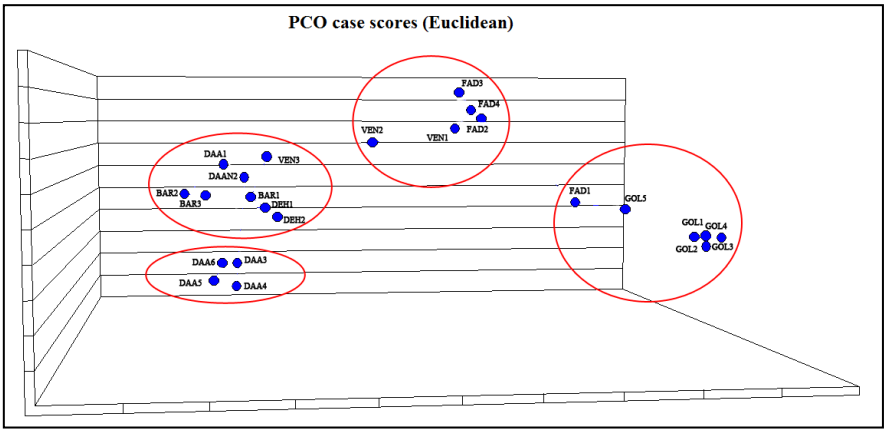
شکل ۳- الگوی باندهای حاصل از ده پرایمر ISSR برای ۲۳ نمونه از ٦ جمعیت

ماتریس یک و صفر باندهای حاصل از هر PCR با هر پرایمر برای ۲۳ نمونه مورد مطالعه جداگانه به برنامه SPSS وارد شد. سپس با استفاده از برنامه‌های MVSP و NTSYS ابتدا ماتریس تشابه یا Similarity Matrix محاسبه و دندروگرام تک‌بعدی (شکل ۴) و سپس رسته‌بندی دو و سه‌بعدی ترسیم شد (شکل ۵). بر اساس محاسبات ماتریس تشابه با ضریب Jaccard بیشترین تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های (FAD1 و FAD2) یا فدک ۱ و ۲ به میزان ۰/۹۳۲۴ واحد و حداقل شباهت بین نمونه‌های (FAD2 و BAR1) یا فدک ۲ و برکت‌آباد ۱ به میزان ۰/۲۸۰۹ واجد مشاهده شد.



شکل ٤- خوشه‌بندی تک‌بعدی Clustering با روش UPGMA و ضریب Nei & Li

خوشه‌بندی باندها (آلل‌ها) با روش‌های UPGMA و ضرایب جاکارد و Nei & Li با استفاده از نرم‌افزار MVSP 3.22 و NTSYS pc 2.02 انجام شد که نتایج حاصل از خوشه‌بندی، بیانگر ایجاد ۴ گروه ژنتیکی متفاوت در فاصله تقریبی ۰/۶۰ بین نمونه‌های مورد مطالعه در سطح منطقه بروجرد بود (شکل ۵).



شکل ۵- رسته‌بندی سه‌بعدی PCoA[1] ۲۳ نمونه جمعیت بارهنگ با استفاده از نرم‌افزار MVSP 3.22

٤. بحث

چهار گروه متفاوت ژنتیکی شامل گروه اول گلدشت ۱ تا ۶ (GOL 1-6) و فدک ۱ (FAD1)، گروه دوم ونایی ۱ و ۲ (VEN 1-2) و فدک ۲ تا ۴ (FAD 2-4)، گروه سوم شامل دانشسرا ۳ تا ۴ (DAA 3-4) و گروه چهارم شامل برکت‌آباد ۱ تا ۳(BAR 1-3)، ونایی ۳ (VEN 3)، دانشسرا ۱ و ۲ (DAA 1-2) و ده ترکان ۱ و ۲ (DEH 1-2) با کمک ۱۰ پرایمر ISSR ایجاد شدند. نمونه‌های گلدشت، فدک، ونایی و برکت‌آباد تقریباً در نزدیکی یکدیگر و دیگر نمونه‌ها دارای فاصله جغرافیایی نسبتاً بیشتری هستند. این فاصله‌ها مخصوصاً در خوشه‌های اول، دوم و سوم احتمالاً می‌تواند قرار گرفتن‌شان را در یک گروه جمعیتی به لحاظ ژنتیکی توجیه کند، زیرا ۳ گروه اول به‌طور جداگانه تقریباً در نزدیکی یکدیگر قرار دارند. گروه چهارم، از نمونه‌های مناطق مختلف تشکیل‌شده است که برخلاف سه گروه ژنتیکی قبلی، فاقد نزدیکی مکانی هستند. همچنین با توجه به شکل (۵) که

1. Principal Coordinates Analysis

حاکی از تنوع نسبتاً بالای ژنتیکی در ۶ جمعیت مورد بررسی در ۴ گروه ژنتیکی متفاوت است، می‌توان منطقه بروجرد را ناحیه‌ای مستعد ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی دانست و با شناسایی نقاط رویش این گیاه سعی در حفظ تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های وحشی نمود.

در مطالعه حاضر از ۱۰ پرایمر ISSR گروه P جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاه بارهنگ استفاده شد، اما در برخی مطالعات از تعداد پرایمرهای متفاوتی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. ونگساوا و همکاران (۲۰۱۴) از ۱۸ پرایمر، کاسوان و همکاران (۲۰۱۳) از ۲۲ پرایمر و محمدی و همکاران (۲۰۲۰) از ۱۷ پرایمر گروه‌های دیگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی *Spirogyra ellipsospora*، *Plantago ovate* و *Aegilops cylindrical* استفاده کردند که حاکی از کاربرد گروه‌های مختلف پرایمرهای ISSR در شناسایی بهتر تنوع در گیاهان متفاوت است (۱۰-۱۵). با توجه به درصد پلیمرفیسم حاصل از پرایمرها، توصیه می‌شود از پرایمر P8 جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های بارهنگ استفاده گردد، اما در بررسی تنوع در سایر گیاهان و جانوران، پرایمرهای دیگری باندهای قابل ارزش‌گذاری مناسب‌تری تولید کردند، مانند پرایمر UBC841 در مطالعه محمدی و همکاران (۲۰۲۰)، پرایمرهای UBC-429 و OPA-09 از نوع RAPD و پرایمرهای UBC-810 و UBC-414 از نوع ISSR در مطالعه قیطرانی و همکاران (۲۰۱۸)، پرایمرهای IS 7, 8, 9 در مطالعه امیری و همکاران (۲۰۱۸) و پرایمرهای ۹ و ۱۷ در مطالعه سلامی و همکاران (۲۰۱۸) که نتایج بهتری در خوشه‌بندی و رسته‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه نشان دادند (۱۲-۱۵).

۵. نتیجه‌گیری

مارکرهای ژنتیکی ISSR بویژه پرایمر P8 به خوبی می‌توانند در مطالعات فیلوژنتیکی گیاه بارهنگ به‌کار روند. غالبیت، سادگی و سرعت عمل بالای این نشانگر بخوبی توانست ۲۳ نمونه جمع‌آوری شده در قالب ۶ جمعیت مختلف را در ۴ گروه ژنتیکی متفاوت خوشه‌بندی نماید. مهم‌ترین مانع جهت اصلاح، تکثیر و حفظ این گیاه برای تولید فرآورده‌های استاندارد گیاهی، وجود تنوع ژنتیکی در گیاه بارهنگ است که پیامد آن متابولیت‌ها و فرآورده‌های شیمیایی متفاوت از یک جنس و گونه است. از طرفی این تنوع باید به عنوان خانه ژنی حفظ و نگهداری شود و چه‌بهتر که این صیانت در ناحیه رویش طبیعی گیاه بارهنگ یعنی منطقه بروجرد صورت پذیرد.

٦. تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در تحقیق حاضر وجود ندارد.

۷. سپاسگزاری

نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد که با صبر و حوصله و همکاری ارزنده، شرایط مناسبی جهت انجام مطالعه حاضر فراهم نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Ghasemi F, Jalili A, Mirzadeh Vaghefi S & Kazemi S. Cytogenetic study of *Plantago major* populations in North West of Iran. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. 2016; 24(2): 305-314. (In persian)
2. Najafian Y, Hamedi SS, Farshchi MK & Feyzabadi Z. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electron Physician.* 2018; 10(2): 6390-6399.
3. Ramezani M & Rahimi M. Study of phylogenetic relationships and genetic diversity of *Plantago ovata* ecotypes using morpho-phenological traits and ISSR markers. *Plant Genetic Resources*. 2017; 4(1): 63-74. (In persian)
4. Keivani M, Mehregan I & Albach D. Genetic diversity and population structure of *Plantago major* (Plantaginaceae) in Iran. *Biologia.* 2020; 26: 111-124.
5. Nejati V & khaneshi F. Effect of hydroalcoholic extract of *Plantago major* leaf on the testis morphology, sperm parameters and testosterone level in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Horizon of Medical Sciences*. 2014; 20(1): 49-55. (In persian)
6. Jafari R & Kamali K. Faunestic study of ladybird (Col.: Coccinellidae) in Lorestan rrovince and report of new records in Iran. *New Findings in Agriculture*. 2007; 1(4): 349-359. (In persian)
7. Hashemi M, Nabipour F, Yari R & Jafari R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of *Hippodamia variegate* (Col.:Coccinellidae) in Lorestan provinces, Iran. *Journal of Entomological Research*. 2018; 9(4): 393-400. (In persian)
8. Hassani M, Babaii A & Moslemkhani K. Study of *Chelidonium majus* genetic diversity by ISSR markers in Iran. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2016; 6(22): 91-96. (In persian)
9. Shazdehahmadi M & Kharrazi M. Application of ISSR molecular markers for genetic diversity study of some Tobacco genotypes. *Plant Genetic Resources*. 2016; 2(2): 33-46. (In persian)
10. Wongsawad P & Peerapornpisal Y. Molecular identification and phylogenetic relationship of green Algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014; 21: 505-510.
11. Kaswan V, Joshi A & Maloo AR. Assessment of genetic diversity in Isabgol (*Plantago ovata* Forsk.) using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers for developing crop improvement strategies. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 12(23): 3622-3635.
12. Mohammadi S, Mehrabi AA, Arminian A & Fazeli A. Genetic diversity structure of *Aegilops cylindrica* accessions revealed by genomic ISSR markers. *Plant Genetic Resources*. 2014; 1(1): 13-26. (In persian)
13. Gheitarani B, Erfani-Moghadam J & Fazeli A. Evaluation of genetic diversity among some common Fig using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genetic Resources*.

2019; 6(2): 43-54. (In persian)

14. Amiri P, Ismaili A & Hadian J. Evaluation of genetic diversity of *Styrian pumpkin* (*Cucurbita pepo* var. styriaca) populations, using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Resources*. 2018; 4(2): 17-28. (In persian)
15. Salami A, Pahlevani M, Zenalinezhad K & Esmaeilzadeh Moghaddam M. Genetic variation pattern of Iranian *Wheat landraces* Based on ISSR molecular markers and morphological traits. *Plant Genetic Resources*. 2018; 5(1): 87-100. (In persian)