Archive of SID

مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۷ شماره ۱ صفحه‌های ۱۰۳ تا ۱۱۶ (۱۳۹۵)

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از نژادگان‌های گل بنفشه ایران (*Viola* spp.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR [1]

Genetic Diversity among Some Iranian Viola (*Viola* spp.) Genotypes Using Molecular Markers ISSR

نرجس اسدی، علی‌رضا بابائی* محمدرضا نقوی[2]

چکیده

بنفشه‌ها (*Viola* spp.) گیاهانی علفی هستند که از قدیم به جهت زیبایی و خاصیت‌های دارویی در اروپا کشت می‌شدند. بومی شرق آسیا، بخش‌هایی از مدیترانه و شمال شرقی اروپا هستند. این پژوهش با هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه‌های خویشاوندی برخی نژادگان‌های بومی جنگل‌های شمال کشور انجام شد تا در صورت وجود تنوع ژنتیکی کافی از نتیجه‌های آن در برنامه‌های به‌نژادی آینده بنفشه استفاده شود. این پژوهش در سال‌های ۹۲-۹۰ و در دو عملیات صحرایی شامل نمونه‌برداری از برگ‌های جوان ۳۷ نژادگان از دو گونه *V. odorata* و *V. alba* بنفشه و آزمایشگاهی شامل استخراج DNA، PCR، الکتروفورز و غیره در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. از ۲۰ آغازگر ISSR استفاده شده در این پژوهش، تعداد ۱۸ آغازگر چند شکلی بالا نشان دادند. در ۳۷ نژادگان بنفشه در مجموع، ۱۱۷ قطعه قابل امتیازدهی در محدوده ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز تولید کردند که ۵۹ قطعه چند شکلی نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس شاخص دایس و آنالیز اتصال همسایه، نژادگان‌های مورد مطالعه را به چهار گروه مجزا تفکیک نمود. همچنین بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نای، دو گونه مورد مطالعه شباهت ژنتیکی بالا (۹۱/۲٪) و فاصله ژنتیکی بسیار کم (۹/۲٪) داشتند.

واژه های کلیدی: بنفشه، تجزیه خوشه‌ای، شباهت ژنتیکی، فاصله ژنتیکی.

مقدمه

کشور ایران رویشگاه گونه‌های بی‌شماری از گیاهان خودروست که جزو منبع‌های با ارزش ژنتیکی در پژوهش‌های بنیادی و کاربردی به‌نژادی گیاهان به شمار می‌آیند و در برطرف کردن نیازهای انسان می‌توانند کمک شایانی نمایند (۱). به طور کلی منبع‌های ژنتیک گیاهی علاوه بر این که به عنوان عامل زیربنایی برای توسعه کشاورزی محسوب می‌شوند، به عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی و همچون سپری در برابر تغییرهای عامل‌های محیطی عمل می‌نمایند. به هر حال توانایی تکامل هر گیاه وابسته به وجود تنوع ژنتیکی به خصوص در سطح درون گونه‌ای است. قبل از انجام هر نوع کار به‌نژادی شناخت تنوع ژنتیکی و پتانسیل ژنتیکی هر گونه گیاهی لازم و ضروری است و در کل وجود تنوع ژنتیکی در کارهای به‌نژادی به عنوان یک برتری تلقی می‌شود (۸). بنفشه‌های معطر، گیاهانی علفی و پایا هستند که از زمان‌های قدیم به جهت زیبایی و خاصیت‌های دارویی در اروپا کشت می‌شدند. بومی شرق آسیا، بخش‌هایی از مدیتراته و شمال شرقی اروپا هستند (۱۱). تیره بنفشه مینی‌پروتئین‌های

۱- تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳۰

۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس و استاد گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (arbabaei@modares.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

حلقوی با خاصیت‌های دارویی ارزشمند دارند. آن‌ها به عنوان پپتیدهای دفاعی با ویژگی ضد میکروبی شناخته می‌شوند (۹). همچنین محدوده وسیعی از فعالیت‌های زنده همانند ویژگی ضد ویروسی HIV و ... نیز دارند (۴، ۵). در تیره بنفشه‌سانان برای مثال در بنفشه‌های *Viola hederaceae* بیشتر از ۶۰ سیکلوتاید شناسایی شده است (۵، ۱۸). بنفشه‌های معطر از زمان‌های دور در اروپا به عنوان گل‌های گلدانی زیبا با کاربرد زینتی محسوب می‌شده‌اند. همچنین این گیاهان می‌توانند به عنوان گیاهان زمین پوش استفاده شوند. از میان گونه‌های مختلف بنفشه، چندگونه در ایران وجود دارد و یا بومی ایران می‌باشند که شامل گونه های زیر هستند:

V. odorata: در پژوهشی که در سال ۲۰۱۰ به منظور تشخیص گونه‌های گیاهی رایج شمال ایران در جنگل‌های جنوب دریای خزر انجام شد، بنفشه معطر *V. odorata* L. بیشترین گونه رایج بنفشه‌ها در جنگل‌های خزری بود (۱۷). *V. caspia*: این گونه نیز از گونه‌های رایج بنفشه در حاشیه دریای خزر است که در گذشته *V. sylvatica* or var. *caspia* نامیده می‌شد. بعدها با پژوهش‌های بیشتر ریخت‌شناسی و پیدا کردن تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی در دسته جداگانه‌ای با نام *V. caspia* قرار گرفت (۱۳). گل‌های *V. caspia* به رنگ سفید و بنفش مایل به آبی هستند که در ایران بیشتر گل‌های سفید آن وجود دارد (۳). *V. alba ssp. Sintenisii*: در منبع-ها گفته شده، بیشترین گستردگی این گونه در جنگل‌های شمال ایران و اطراف شمال ایران است (۱۳). *V. suavis*: این گونه در منطقه‌های حاشیه ساحل‌های خزری وجود و دو رنگ گل سفید و متمایل به آبی دارد (۱۳). *V. cretica*: در منبع‌ها گفته شده، این گونه از گونه‌های بومی و اندمیک در کوه‌های البرز و آسیای صغیر است (۲). به جهت اهمیت این گیاه دارویی زینتی و همچنین پیچیدگی‌های مربوط به تعیین حدود گونه‌های آن، پژوهش‌هایی روی گونه‌های بنفشه با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است؛ توماس مارکوسسن (۱۴) تنوع آلوزایمیک در بنفشه‌های گونه *V. odorata* شایع در اروپای غربی و اروپای مرکزی و اروپای شرقی تا فلات آناتولی و منطقه قفقاز را بررسی کرد و نشان داد که تفاوت زیادی بین جمعیت‌های بومی منطقه قفقاز و فلات آناتولی با جمعیت‌های اروپایی وجود دارد (۱۴). او بنفشه‌های گونه *V. alba* منطقه‌های اروپا و منطقه قفقاز و آذربایجان را نیز بررسی کرد. در آن پژوهش تنوع ژنتیکی با استفاده از ۶ ایزوآنزیم و ویژگی‌های ریخت‌شناسی بررسی شد. نتیجه‌های حاصل از بررسی‌های مولکولی و ریخت‌شناسی، نمونه‌های جمع آوری شده از آذربایجان، قبرس، یونان (منطقه‌های غربی اروپا) را در یک دسته و نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه‌های جنوبی اروپا و شرقی اروپا را در دسته دیگر قرار داد (۱۲). مارکوسسن و لیو بورگن (۱۵) گونه‌های موجود بنفشه‌های منطقه قفقاز و آذربایجان و اطراف دریاچه کاسپین (خزر) را با تأکید بر گونه *V. sieheana* و *مقایسه* آن با گونه *V. alba sub sp caspia* و ۸ ایزوآنزیم آن‌ها بررسی کردند. بر اساس اطلاعات آلوزایمیک، سطح چندگانی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی، مشخص شد که*V. sieheana* و *V.caspia* قرابتی باهم ندارند. آنها پیشنهاد کردند که*V. sieheana* در منطقه قفقاز متعلق به گونه جداگانه *V. caspia* است. در این پژوهش مشخص شده که گونه*V. caspia* که بومی منطقه‌های غربی دریاچه کاسپین و شمال‌شرقی است هیچ نسبت نزدیکی با بنفشه‌های اروپایی و گونه *V. siehana* ندارد. مریدا و همکاران (۱۶) از نشانگر AFLP برای بررسی تنوع بین گونه‌ای در بنفشه‌های *V. suavis* در جمعیت‌های جمع‌آوری شده از اسپانیا و جنوب شرقی اروپا با تمرکز بر جمعیت‌های با گل‌های سفیدرنگ استفاده کردند. کالی و ولف (۶) تنوع ژنتیکی شش جمعیت بنفشه‌های *V. pubescens* که گل‌های زرد داشتند و از جنگل‌های منطقه‌های معتدله در شمال‌شرقی آمریکا جمع‌آوری شده بودند را با استفاده از نشانگرهای ایزوزایمی و ISSR بررسی کردند. نتیجه‌های استفاده از هشت ایزوآنزیم و همچنین نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی قابل توجهی را نشان داد (۶). این پژوهش، به عنوان اولین بررسی در جهت شناسایی ژنتیکی گونه‌های بنفشه بومی ایران اهمیت دارد، که با هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

خویشاوندی برخی نژادگان‌های بومی جنگل‌های شمال کشور صورت گرفت تا در صورت وجود تنوع ژنتیکی کافی از نتیجه‌های آن در برنامه‌های به‌نژادی آینده گیاه بنفشه استفاده شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۹۲-۹۰ و در دو عملیات صحرایی شامل نمونه‌برداری از برگ‌های جوان گیاهان بنفشه و آزمایشگاهی شامل استخراج DNA، PCR و الکتروفورز و غیره در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نمونه‌برداری‌ها از جنگل‌های شمال کشور در سه استان گرگان، مازندران و گیلان صورت گرفت. از محل رویش و بخش‌های مختلف گیاهان جمع‌آوری شده به‌ویژه گل آن‌ها جهت شناسایی دقیق گونه‌ها، عکس‌هایی تهیه شد و ضمن جمع‌آوری تعداد ۳۷ نژادگان، اطلاعات‌های رویشگاهی نژادگان‌های هر منطقه و مکان، نوع گونه و کد مورد استفاده آنها ثبت شد (جدول ۱). موقعیت جغرافیایی مکان‌های مورد بررسی با استفاده از GPS به‌دست آمد و در نرم‌افزار Google earth فراخوانی شد (شکل ۱).

جدول ۱- مکان جغرافیایی و کد نژادگان‌های بنفشه جمع‌آوری شده.

Table 1. Geographical characteristics of collected *Viola* species.

کد (شماره) Number	گونه Species	محل جمع‌آوری Location of collection	استان Province
1	*V. alba*	گرگان- پارک جنگلی نهارخوران	گلستان Golestan
2	*V. alba*	گلوگاه- شهر گلوگاه، پای کوه	مازندران Mazandaran
3	*V. alba*	بهشهر- جاده عباس‌آباد،روستای آل‌تپه منطقه جنگلی عباس آباد	مازندران Mazandaran
4	*V. alba*	نکا، جاده نکا- بهشهر،به سمت ییلاق دو هزار	مازندران Mazandaran
5	*V. alba*	ساری،جاده ساری- نکا،روستای اسبوکلا	مازندران Mazandaran
6	*V. alba*	سوادکوه، جاده شیرگاه- قائمشهر،روستای بشل	مازندران Mazandaran
7	*V. alba*	قائمشهر- جاده نظامی،بعد از دانشگاه آزاد اسلامی	مازندران Mazandaran
8	*V. alba*	شیرگاه- منطقه جنگلی	مازندران Mazandaran
9	*V. alba*	بابل- جاده بابل به آمل،شهر زرین محله،روستای زرین آباد	مازندران Mazandaran
10	*V. alba*	آمل- جاده آمل،چمستان،روستای افرادمحواشی قبرستان	مازندران Mazandaran
11	*V. alba*	چمستان- جاده چمستان، نورپارک جنگلی کشهل	مازندران Mazandaran
12	*V. alba*	نور- جاده نور،نوشهر،پارک جنگلی سیسنگان	مازندران Mazandaran
13	*V. alba*	نوشهر- مناطق جنگلی	مازندران Mazandaran

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۱- مکان جغرافیایی و کد نژادگان‌های بنفشه جمع‌آوری شده.

Table 1. Cont. Geographical characteristics of collected *Viola* species.

کد (شماره) Number	گونه Species	محل جمع‌آوری Location of collection	استان Province
14	*V. alba*	نوشهر- روستای نیرنگ	مازندران Mazandaran
15	*V. alba*	چالوس-جاده‌چالوس،رامسر،شهرک توریستی نمک‌آبرود	مازندران Mazandaran
16	*V. alba*	سلمانشهر- بعد از چالوس- شهرسلمانشهر، جنگل‌های اطراف	مازندران Mazandaran
17	*V. alba*	رامسر- به سمت روستای جواهر دهمنطقه جنگلی صفا رود	مازندران Mazandaran
18	*V. alba*	قاسم آباد- بعد ازشهرچابکسر، روستای قاسم آباد	گیلان Guilan
19	*V. alba*	املش- جاده املش به سمت بلوردکان،اطراف روستای لات ایل	گیلان Guilan
20	*V. alba*	لنگرود، منطقه جنگلی و شهر کومله	گیلان Guilan
21	*V. alba*	سوادکوه، جاده شیرگاه- بابلکنار، روستای لفور بعد از پاسگاه	مازندران Mazandaran
22	*V. alba*	سوادکوه، جاده شیرگاه- بابلکنار، روستای لفور بعد از پاسگاه	مازندران Mazandaran
23	*V. alba*	فومن – جاده سنگر، فومن	گیلان Guilan
24	*V. alba*	سنگر- جاده سنگر به رشت	گیلان Guilan
25	*V. alba*	سیاهکل—شهر سیاهکل، جنگل دیلمان	گیلان Guilan
26	*V. alba*	رشت،جاده سنگر-کوچصفهان به جاده قزوین،روستای ده بنه	گیلان Guilan
27	*V.odorata*	گرگان- منطقه نرگس چال	گلستان Golestan
28	*V.odorata*	هراز- بعدازشهرآمل، جاده هراز	مازندران Golestan
29	*V.odorata*	بابل،جاده بابل - آمل، روستای زرین‌آباده کنار زمین فوتبال	مازندران Mazandaran
30	*V.odorata*	نکا، جادهنکا- بهشهر، داخل روستای رستم‌کلا	مازندران Mazandaran
31	*V.odorata*	لنگرود، منطقه جنگلی و شهر کومله	گیلان Guilan
32	*V.odorata*	سیاهکل—شهر سیاهکل ، جنگل دیلمان	گیلان Guilan
33	*V.odorata*	فومن- جنگل‌های اطراف جاده فومن - ماسوله	گیلان Guilan
34	*V.odorata*	ساری- پارک جنگلی شهید زارع	مازندران Mazandaran
35	*V.odorata*	نور- جاده نور، نوشهر، پارک جنگلی سیسنگان	مازندران Mazandaran
36	*V.odorata*	سوادکوه- جاده تهران، نزدیک روستای دوآب	مازندران Mazandaran
37	*V.odorata*	رامسر- به سمت روستای جواهرده، منطقه جنگلی صفارود	مازندران Mazandaran

www.SID.ir

Archive of SID

Fig.1. Map of sampling points.

شکل ۱- نقشه نقطه‌های نمونه برداری.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB تغییر یافته انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۱٪ تعیین و پس از بررسی کیفیت و کمیت DNA با توجه به غلیظ بودن DNA ژنومی استخراج شده، رقیق‌سازی DNA اصلی در غلظت ۲۰ نانوگرم بر میکرو لیتر انجام شد.

برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرهای ISSR

در این پژوهش از ۲۰ آغازگر ISSR استفاده شده در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف بنفشه، تعداد ۱۸ آغازگر چند شکلی بالا نشان دادند که توالی آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. تعدادی از آغازگرها از شرکت Biolegio و و بقیه آغازگرها و مواد PCR از شرکت سیناژن تهیه شد. مقدار ماده‌های مصرفی در هر واکنش با توجه به نوع آغازگر از راه بهینه‌سازی شرایط PCR تعیین شد.

افزایش قطعه‌های DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (شامل۵ میکرولیتر از DNA با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتید (dNTPs)، ۲ میکرولیتر از آغازگر و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمراز که با آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۵ رسانده شده بود) انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد و چرخه حرارتی PCR برای آغازگرهای ISSR به صورت زیر بود. واسرشته‌سازی اولیه DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۷ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس یک دقیقه، اتصال آغازگرها یک دقیقه و پانزده ثانیه (دمای اتصال هر کدام از آغازگرها در جدول ۳-۷ آمده است)، گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و در آخر چرخه حرارتی با گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ویژگی‌های آغازگرهای ISSR استفاده شده در بررسی تنوع ژنوم گیاه بنفشه.

Table 2. Characteristics of primers by ISSR markers.

ردیف Number	آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequences	تعداد نوکلئوتید Number of nucleotides	دما Temperature (°C)
1	P_1	5'-CTCCTCCTCCTCR*C-3'	14	42
2	P_2	5'-CACCACCACCACRC-3'	14	46
3	P_3	5'-CACACACACACAAG-3'	14	42
4	P_4	5'-CACACACACACAAC-3'	14	42
5	P_5	5'-CACACACACACAGC-3'	14	45
6	P_6	5'-CACACACACACACACAG-3'	17	54
7	P_7	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTRG-3'	18	55
8	P_8	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3'	18	52
9	P_9	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTAC-3'	18	54
10	P_{10}	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTTG-3'	18	54
11	P_{11}	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTGC-3'	18	51
12	P_{12}	5'-CAAGAGAGAGAGA-3'	13	38
13	P_{13}	5'-GGGCCACACACACACACACA-3'	20	63
14	P_{14}	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	17	51
15	P_{15}	5'-ACACACACACACACACY*G-3'	18	53
16	P_{16}	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	18	55
17	P_{17}	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	18	53
18	P_{18}	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTC-3'	18	53

* C یا T =Y و * G یا A =R

الکتروفورز محصول واکنش PCR

برای الکتروفورز نهایی فرآورده‌های افزایشی از ژل آگاروز استفاده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل ۲٪ بارگذاری و از بافر TBE استفاده شد. فرآورده‌های حاصل از PCR پس از مخلوط شدن با مقدار مناسب بافر بارگیری، در چاهک‌های ژل بارگیری شدند. دستگاه الکتروفورز به منبع تأمین نیروی الکتریسیته در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت دو ساعت و بعد ازآن در ولتاژ ۶۰ ولت به مدت یک ساعت متصل شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل‌داک از آن عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

پس از ثبت اطلاع‌های ژل به‌دست آمده برای هر آغازگر امتیازدهی انجام شد. وجود باند یک و نبود آن صفر در نظر گرفته و اطلاع‌ها وارد نرم‌افزار Excel 2010 شد. با استفاده از نرم‌افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر در ردیف‌ها و نام نژادگان‌ها در ستون قرار گرفت. پس از این مرحله ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار DARWIN5 محاسبه و دندوگرام بر اساس الگوریتم NJ و ضریب تشابه دایس رسم شد. با استفاده از نرم‌افزار DARWIN5 و روش تجزیه به مختصات اصلی گروه‌بندی نمونه‌ها در یک پلات دو بعدی بررسی شد. همچنین شاخص اطلاعاتی شانون، شاخص تنوع ژنتیکی نای، تعداد آلل‌های مؤثر، تعداد آلل‌های متفاوت، ضریب تمایز ژنی با استفاده از نرم‌افزار POPGEN32 محاسبه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

در این پژوهش ۱۸ آغازگر استفاده شده در ۳۷ نژادگان بنفشه، در مجموع ۱۱۷ باند قابل امتیازدهی در محدوده ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز تولید کردند که ۵۹ باند چند شکلی نشان دادند. کمترین چند شکلی در آغازگر P_{16} به مقدار ۲۵٪ و بیشترین چند شکلی در آغازگر P_{17} به مقدار ۱۰۰٪ دیده شد. بیشترین مقدار باندهای چند شکل در آغازگر P_9 با ۸ باند چند شکل و کمترین مقدار باند چند شکل در آغازگر P_5 با ۲ باند چند شکل مشاهده شد.

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم NJ و بر اساس شاخص دایس و آنالیز اتصال همسایه و با محاسبه ضریب بوت‌استرپ ۳۰۰ بار تکرار انجام شد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه در شکل ۲ آورده شده است. بر اساس نتیجه‌های حاصل از دندروگرام، نژادگان‌های مورد مطالعه به ۴ گروه مجزا تقسیم شدند.

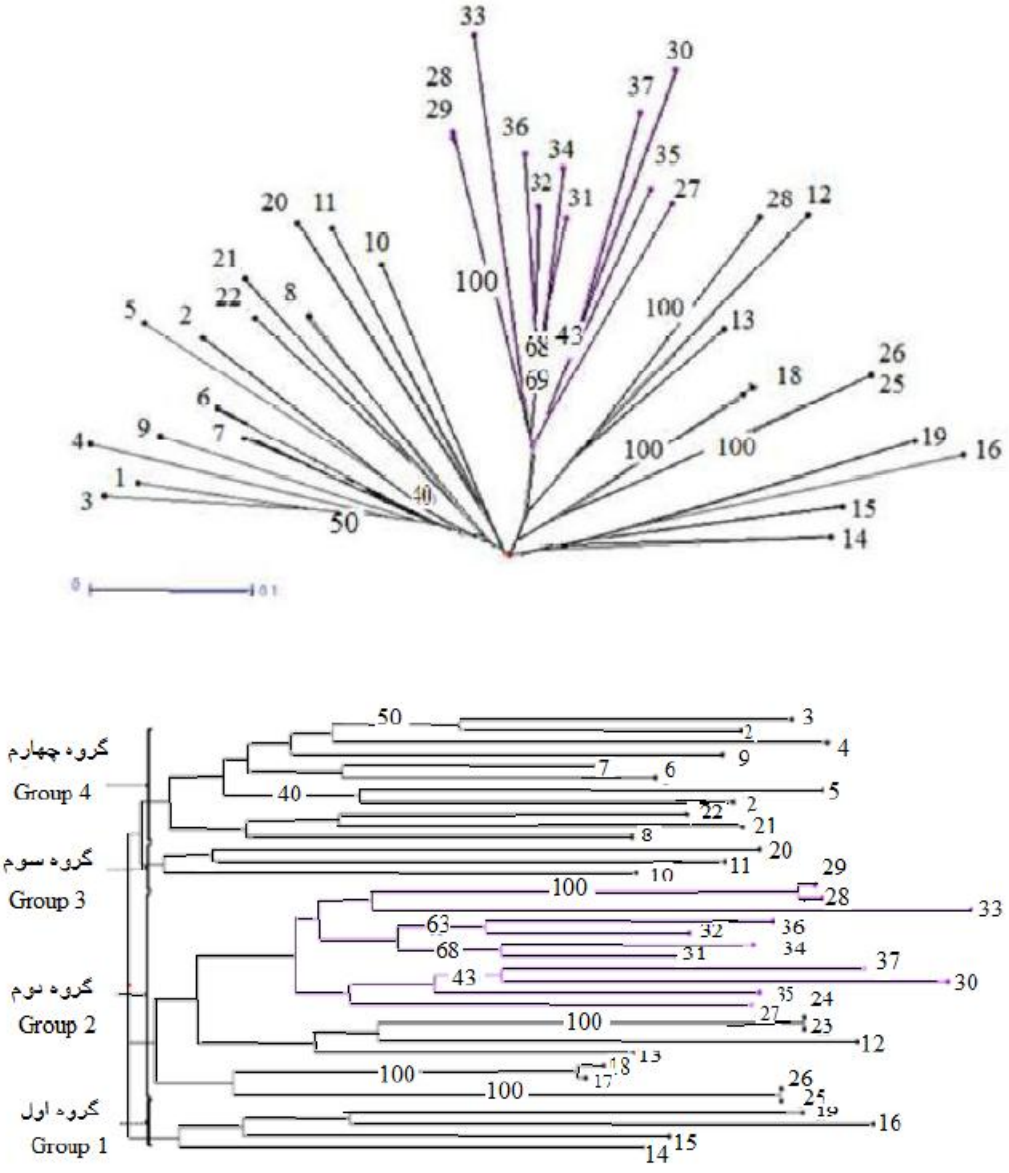

Fig. 2. Dendrogram of 37 *Viola* genotypes constructed by Dice similarity coefficients and NJ method

شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۳۷ نژادگان گل بنفشه بر اساس شاخص دایس و آنالیز اتصال همسایه.

www.SID.ir

Archive of SID

در گروه اول، نژادگان‌های گونه *alba* از منطقه‌های نوشهر، نمک‌آبرود چالوس، سلمانشهر و املش قرار گرفتند. گروه دوم که بیشترین نژادگان‌های جمع‌آوری شده را در بر گرفت شامل برخی نژادگان‌های گونه *alba* و همه نژادگان‌های گونه *odorata* بود. در این گروه همه نژادگان‌های گونه *odorata* شامل گرگان، سیسنگان نور، نکا، صفارود، کومله لنگرود، ساری، سیاهکل، سوادکوه، فومن، هراز، بابل در دسته‌ای مجزا قرار گرفتند و بقیه نژادگان‌های جای گرفته در این گروه شامل نژادگان‌های گونه *alba* از منطقه‌های سیسنگان نور، نوشهر، رشت و فومن و همچنین نژادگان‌های رامسر، قاسم آباد چابکسر، سیاهکل و روستای ده بنه رشت بود. گروه سوم شامل نژادگان‌های گونه *alba* از منطقه‌های آمل، چمستان و کومله لنگرود بود که کمترین نژادگان‌ها را در خود جای داد. در گروه چهارم نیز نژادگان‌های گونه *alba* شامل شیرگاه، روستای لفور شیرگاه، بشل سوادکوه، بابل، قائمشهر، ساری، نکا، عباس آباد بهشهر، گلوگاه و نهارخوران گرگان جای گرفتند.

نتیجه‌های تجزیه به مؤلفه اصلی

برای خلاصه کردن اطلاع‌های داده‌های نشانگرهای مولکولی و وضوح بیشتر به‌خصوص هنگامی‌که ۲ یا ۳ مؤلفه اول بیش از ۲۵٪ تغییرها را توجیه می‌کنند، می‌توان از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در ترکیب با خوشه‌بندی استفاده کرد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب تشابه دایس و آنالیز اتصال همسایه انجام شد. نتیجه‌ها نشان داد که ۵ مؤلفه اصلی اول حدود ۴۹٪ تغییرها را توجیه کردند که این موضوع بیانگر این مطلب است که نشانگرهای ISSR مورد مطالعه به خوبی در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند. نتیجه‌ها نشان داد که اولین مؤلفه ۱۳/۳۱٪ از کل تغییرها و همچنین بیشترین تغییرها را نسبت به سایر مؤلفه‌ها داشت. مؤلفه دوم ۱۱/۴٪ تغییرها را توجیه نمود. کاهش اطلاع‌ها به دو مؤلفه اصلی توانست نژادگان‌ها را مطابق شکل ۳ از یکدیگر تفکیک نماید.

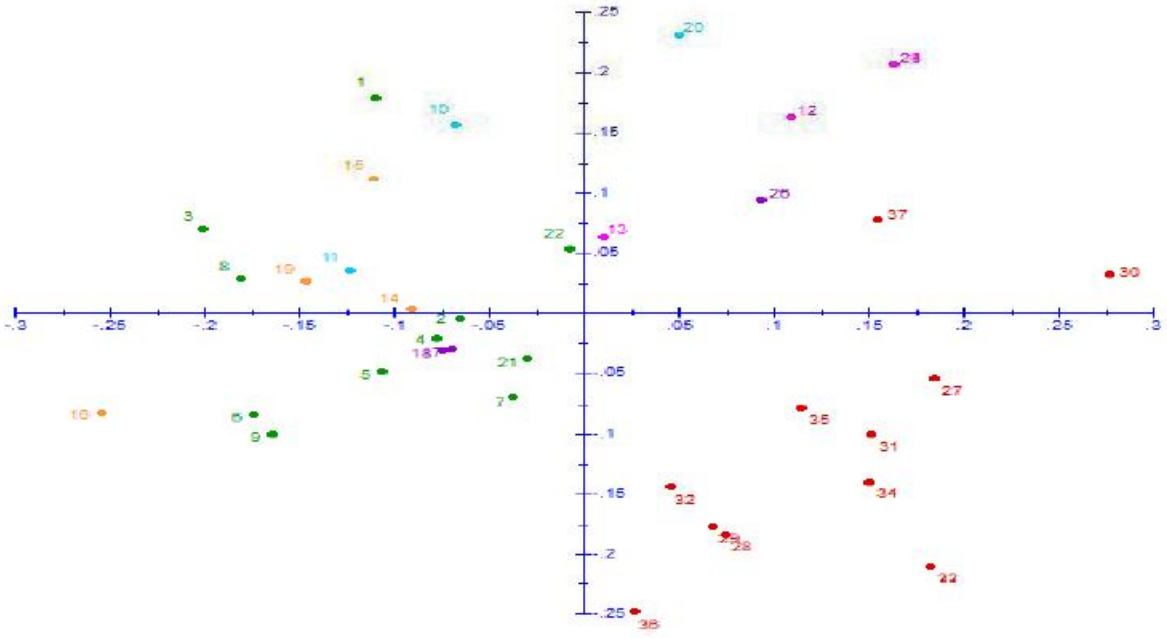

Fig. 3. Distribution of 37 genotypes of *Viola* according to values of two main principal coordinates calculated on the basis of allele composition in Eighteen ISSR primers.

شکل ۳– الگوی پراکنش نژادگان‌های گل بنفشه بر اساس دو مؤلفه اصلی ۱۸ پرایمر نشانگر ISSR.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تنوع درون گونه‌ها با استفاده از میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نای و شاخص اطلاعاتی شانون نیز مطالعه شد. هرگونه‌ای که از مقدار بالاتر ضریب شانون و نای برخوردار باشد، تنوع بالاتری دارد. نتیجه‌ها نشان داد که دو گونه به طور نسبی تنوع‌پذیری درون‌گونه‌ای یکسان و همچنین از تنوع‌پذیری بالای درون‌گونه‌ای برخوردار بودند (جدول ۳).

جدول۳- مقدار پراکندگی درون گونه‌ای نژادگان‌های بنفشه با استفاده از شاخص‌های ژنتیکی نای.

Table 3. Interspecific variation in two *Viola* species using Nie's genetic diversity index.

گونه Species	شاخص اطلاعاتی شانون Shannon information (%) index (I)	شاخص تنوع ژنتیکی نای Nie's genetic diversity index (%) (H)	تعداد آلل‌های مؤثر Number of effective alleles (%) (Ne)	تعداد آلل‌های متفاوت Number of different alleles (%) (Na)	تعداد افراد Number
V. alba	45	30	14.9	19.5	26
V.odorata	45	30	15.1	18.8	11
میانگین بین دو گونه Mean between two species	49	32.7	15.4	20	

همچنین بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نای، دو گونه مورد مطالعه شباهت ژنتیکی بالا (۹۱/۲٪) و فاصله ژنتیکی بسیار کم (۹/۲٪) داشتند.

جهت بررسی رابطه‌های بین‌گونه و درون‌گونه‌ای بنفشه‌های مورد مطالعه، شاخص‌های بین جمعیتی محاسبه شدند. شاخص میانگین تنوع ژنتیکی کل (H_t) معادل۳۲٪، متوسط تنوع ژنی درون‌گونه‌ای (H_s) معادل۳۰٪، ضریب تمایز ژنی بین‌گونه‌ای (G_{st}) معادل ۹٪ و تعداد ژن تبادل یافته در یک دورهٔ زمانی معین (N_m) در مکان‌های نشانگری چند شکل جریان ژنی (N_m) ۴۹/۲٪ برآورد شد. ضریب تمایز ژنی بین‌گونه‌ای (G_{st}) نشان داد که تنها ۹٪ تنوع در جمعیت ناشی از تنوع بین‌گونه‌ای بود و این دو گونه از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک به هم هستند (جدول ۴).

جدول۴- شاخص میانگین تنوع ژنتیکی نهایی: متوسط تنوع ژنی H_s: ضریب تمایز ژنی G_{st}: جریان ژنی N_m.

Table 4. Final genetic diversity index: average genetic diversity (H_s): genetic differentiation coefficient (G_{st}): gene flow (N_m).

	شاخص میانگین تنوع ژنتیکی کل Total genetic diversity index (H_t)	متوسط تنوع ژنی Average genetic diversity (H_s)	ضریب تمایز ژنی Gene differntiation coefficient (G_{st})	تعدا ژن تبادل شده در یک بازه زمانی معین Number of genes exchanged in determined time (N_m)
مقدار محاسبه شده Measured value	0.32 ±0.018	0.3 ±0.016	0.09	4.92

نتیجه‌های تجزیه خوشه‌ای حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، نژادگان‌های مورد مطالعه را در چهار گروه تفکیک نمود. بر این اساس همه نژادگان‌های گونه *odorata* در یک زیر گروه و به همراه برخی نژادگان‌های

www.SID.ir

Archive of SID

گونه *alba* در یک گروه بزرگتر (گروه سوم) قرار گرفتند که نشان‌دهنده نزدیکی و شباهت ژنتیکی بیشتر بین دو گونه است. مشابه چنین نتیجه‌هایی از روی ویژگی‌های تجزیه به مؤلفه اصلی نیز به‌دست آمد. از روی نمودار تجزیه به مؤلفه اصلی نژادگان‌های گونه *odorata* به صورت گروهی جداگانه و به‌طور مشخص از گونه *alba* قرار گرفتند. می‌توان گفت که این نشانگرها قدرت تفکیک خوبی در متمایز کردن گونه‌های بنفشه و در نتیجه کارایی بالایی داشتند. در ادامه نتیجه‌های تجزیه خوشه‌ای، سایر نژادگان‌های گونه *alba*، نژادگان‌های آمل و چمستان (دو منطقه بسیار نزدیک به هم) و نژادگان لنگرود از استان گیلان با فاصله جغرافیایی زیاد از این دو منطقه در یک گروه (گروه اول) قرار گرفتند. نژادگان‌های نوشهر، چالوس، سلمانشهر (سه منطقه بسیار نزدیک به هم) با نژادگان املش از استان گیلان با فاصله جغرافیایی زیاد از سه نژادگان قبلی در یک گروه (گروه دوم) قرار گرفتند. تمامی نژادگان‌های باقی مانده (گونه *alba*) جمع‌آوری شده از مرکز جنگل‌های ساحل‌های خزری به سمت شرق دریای خزر (شامل نژادگان‌های: گرگان، گلوگاه، بهشهر، نکا، ساری، قائمشهر، سوادکوه، بابل، شیرگاه، لفور) در یک گروه (گروه چهارم) قرار گرفتند (شکل ۴).

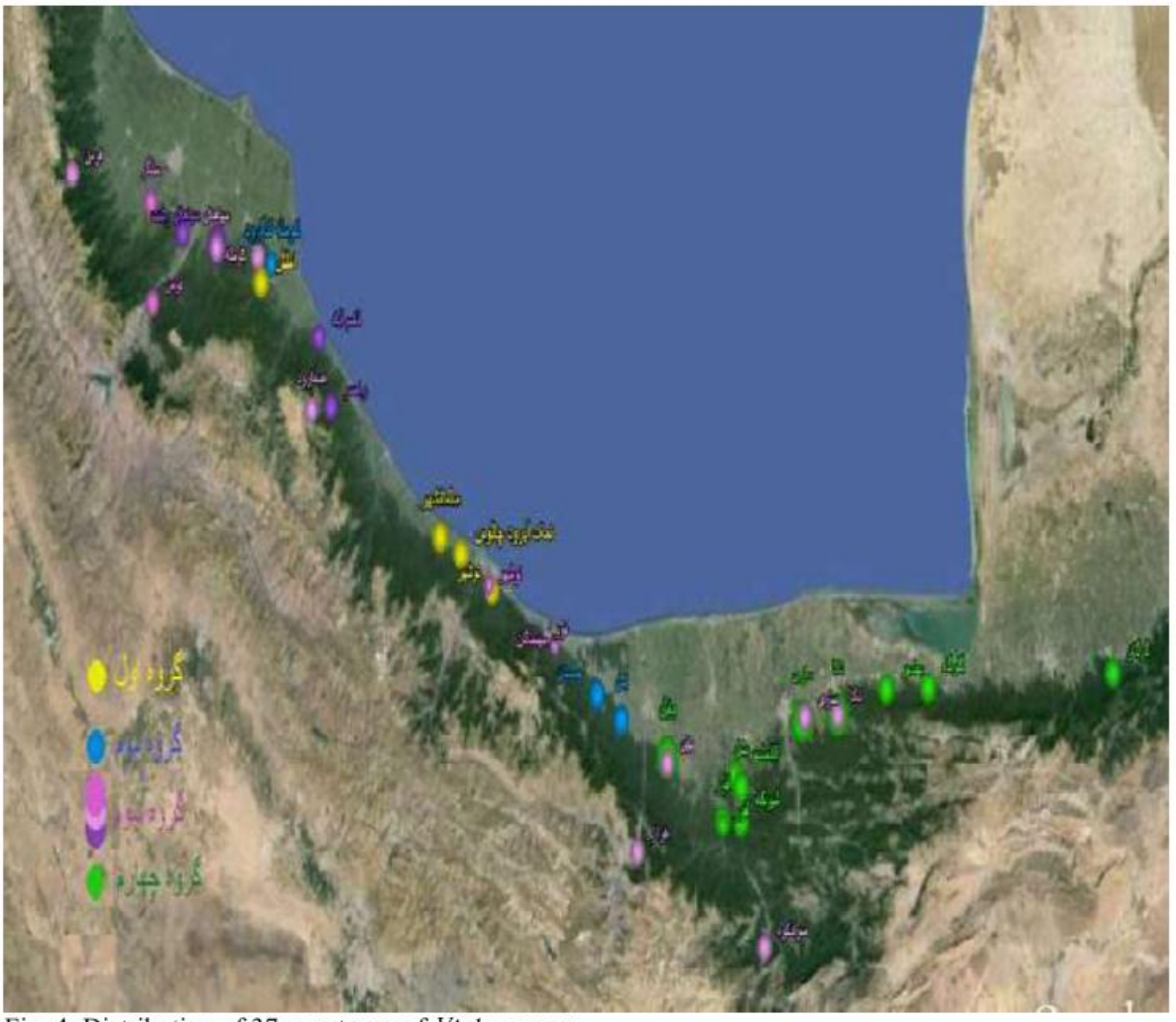

Fig. 4. Distribution of 37 genotypes of *Viola* on map.

شکل۴- دسته‌بندی نژادگان‌های بنفشه بر روی نقشه.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش با استفاده از نشانگرهای ISSR، تنوع بین و درون گونه‌ای برخی نژادگان‌های طبیعی بنفشه‌های معطر در جنگل‌های شمال ایران بررسی شد. با در نظر گرفتن ضریب تنوع ژنتیکی ۳۲/۷٪ بر اساس شاخص نئی و ۴۹٪ بر اساس شاخص شانون، نتیجه‌های این مطالعه حکایت از تنوع ژنتیکی مطلوب در بین نژادگان‌های مورد مطالعه داشت. از آنجا که بر اساس فرمول ژنتیکی Nei (۱۹۸۷) بیشترین تنوع ژنتیکی قابل محاسبه برای نشانگرهای غالب معادل ۵۰٪ می‌باشد، مقدار به‌دست آمده در این پژوهش (حدود ۳۲/۷٪ از ۵۰٪) نشان می‌دهد در مجموع تنوع ژنتیکی مطلوبی در جمعیت‌های مطالعه شده وجود داشت.

مقدار تنوع ژنی کل (Ht) حدود ۳۹٪ برآورد شد، که حدود ۹٪ آن مربوط به تنوع ژنی بین‌گونه‌ای (Gst) و حدود ۳۰٪ دیگر آن مربوط به تنوع درون‌گونه‌ای (Hs) بود. این معیار نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی بین دو گونه مورد مطالعه کمتر از تفاوت ژنتیکی در داخل نژادگان‌های هرگونه می‌باشد. علت این موضوع می‌تواند ناشی از اشتقاق از یک نیای مشترک و بعد ادامه حیات در شرایط اقلیمی مشابه و جریان بالای ژن بین جمعیت‌ها و یا هر سه عامل بالا باشد. توزیع تنوع ژنتیکی در داخل و بین گونه‌ها با ویژگی‌های تاریخی زنده، به ویژه انتشار ژن و نحوه تولیدمثل مرتبط است (۱۰).

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بیشتر نژادگان‌های گونه *alba* جمع‌آوری شده از قسمت‌های مرکزی ساحل‌های دریای خزر به سمت شرق دریای خزر در یک گروه مجزا از نژادگان‌های گونه *odorata* قرار گرفتند و هیچ نژادگانی از گونه *odorata* در گروه نژادگان‌های گونه *alba* جمع‌آوری شده از این منطقه‌ها وجود نداشت. به عبارتی نژادگان‌های گونه *alba* از قسمت مرکز به سمت غرب دریای خزر (استان گیلان) از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک به گونه *odorata* هستند. اما نژادگان‌های گونه *alba* از قسمت مرکزی به شرق ساحل‌های دریای خزر (استان گلستان) به طول کامل جدا از گونه *odorata* هستند و هرچه از شرق به سمت غرب ساحل‌های دریای خزر پیش برویم شباهت ژنتیکی دو گونه بیشتر می‌شود.

در پژوهش انجام شده توسط مارکوسن (۱۴) پس از بررسی آزمایش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با استفاده از ۷ نشانگر ایزوآنزیم، مشخص شد که جمعیت‌های موجود در گونه *odorata* در اروپای مرکزی و غربی با جمعیت‌های قسمت‌های شرقی اروپا متفاوت است. در آن پژوهش جمعیت‌های منطقه آناتولی و حاشیه دریای خزر به طور کامل در دسته مجزا قرار گرفتند.

نتیجه‌های این مطالعه با نتیجه‌های مطالعه‌ای که توسط مارکوسسن (۱۲) با نشانگرهای آلوزایمیک در گونه *alba* در منطقه‌های بالکان و آذربایجان انجام شد، مشابه بود. در مطالعه‌های او جمعیت‌های منطقه آذربایجان و قبرس تا یونان در یک دسته و جمعیت‌های جنوب اروپا تا یونان در دسته دیگر قرار گرفتند و تنوع بین گونه‌ای زیادی نشان دادند. مارکوسسن پیشنهاد می‌کند که به دلیل تفاوت‌های زیاد گونه‌های منطقه‌های حاشیه دریای خزر و آذربایجان و تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در این منطقه‌ها نسبت به منطقه‌های اروپایی، باید رده‌بندی به صورت مجزا انجام شود. البته هیچ گونه پژوهشی تاکنون برای مقایسه جمعیت‌های موجود از این گونه در ایران با جمعیت‌های سایر منطقه‌های دنیا صورت نگرفته است.

از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات، نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. برای خلاصه کردن داده‌های اطلاع‌های مولکولی و وضوح بیشتر می‌توان از تجزیه مختصات اصلی در ترکیب با خوشه‌بندی به‌صورت هم‌زمان استفاده کرد و گروه بندی نژادگان‌ها را با استفاده از نمودار دو بعدی متشکل از دو مؤلفه اول بررسی نمود. به‌ویژه هنگامی که ۲ مؤلفه اول بیش از ۲۵٪تغییرهای کل داده‌ها را توجیه نماید، این امر صادق است (۷). در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از داده‌های مولکولی، بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح کل ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را نمونه‌برداری کنند. بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه به مؤلفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرهای کل نیاز است. با توجه به این‌که در این بررسی تجزیه به مختصات اصلی دو مؤلفه اول، حدود ۲۷٪ واریانس کل را توجیه می‌کند، بنابراین نشانگرهای حاصل از این پژوهش به اندازه کافی در ژنوم پراکنده‌اند. اطلاع‌ها به دو مؤلفه اصلی توانست بیشتر نژادگان‌ها را مطابق با تجزیه خوشه‌ای از هم جدا کند.

سپاسگزاری

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر ولی‌اله مظفریان عضو هیأت علمی سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور برای همکاری در طی مرحله جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی، تشکر و قدردانی کرده و از خداوند متان طول عمر این دانشمند فرزانه را مسألت داریم.

References منابع

۱. امید بیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی. جلد اول. مشهد.۳۳۷ ص.

2. Becker, W. 1918. *Violae asiaticae* et AustralensesIII. Beih. Bot. Ctrlbl. 36:15-59.

3. Becker, W. 1924. *Violae asiaticae* et australenses IV. Beih Bot Centralbl Abt. 2:20-68.

4. Bokesch, H.R., L.K. Pannell, P.K. Cochran, R.C. Sowder, T.C. McKee and M.R. Boyd. 2001. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. J. Nat. Prod. 64:249-250.

5. Chen, B., M.L. Colgrave, C. Wang and D.J. Craik. 2006. Cycloviolacin H4, a hydrophobic cyclotide from *Viola* hederaceae. J. Nat. Prod. 69:23-28.

6. Culley, T.M. and A.D. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. Heredity 86:545-556.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Fabrikiurang, S. 2007. Analysis of genetic diversity of Iranian melons (*Cucumis melo* L.) using ISSR markers. Thesis of Biotechnology, Tarbiat Modares University, I.R.Iran. 123 p.

8. Ghanadha, M.R., M. Zahravi and K. Vahdati. 2003. Breeding Horticultural Crops. Dibagaran Tehran Press, 344 p. (Translated in Persian)

9. Gruber, C.W., M. Cemazar, M.A. Anderson and D.J. Craik. 2007. Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. Toxicon. 49:561-575

10. Hartl, D.L. and G.C. Clark. 1994. Principles of Population Genetics. Sinauer, Sunderland.

11. Marcussen, T. and L. Borgen. 2000. Allozymic variation and relationships within *Viola subsection Viola* (Violaceae). Plant Systematics and Evolution 223:29-57.

12. Marcussen, T. 2003. Evolution, phylogeography, andtaxonomy within the *Viola alba* complex (Violaceae). Plant Systematics and Evolution 237:51-74.

13. Marcussen, T., L. Borgen and I. Nordal. 2005. New distributional and molecular information call into question the systematic position of the West Asian *Viola sintenisii* (Violaceae). Botanical J. Linnean Society 147:91-98.

14. Marcussen, T. 2006. Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* (Violaceae) in western Eurasia. Botanical J. Linnean Society151:563-571.

15. Marcussen, T. and L. Borgen. 2010. Species delimitation in the Ponto-Caucasian *Viola sieheana* complex, based on evidence from allozymes, morphology, ploidy levels, and crossing experiments. Plant Systematics and Evolution, 291:183-196.

www.SID.ir

Archive of SID

16. **Mereďa, P., I. Hodálová., J. Kučera, J.** Zozomová-Lihová, D.R. Letz and M. Slovák. 2011. Genetic and morphological variation in *Viola suavis* s.l. (Violaceae) in the western Balkan Peninsula: two endemic subspecies revealed. Systematics and Biodiversity 9:211-231.

17. Rad, J.E. and A.B. Shafiei. 2010. The distribution of ecological species groups in Fagetum communities of Caspian forests: Determination of effective environmental factors. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 205:721-727.

18. Trabi, M. and D.J. Craik. 2004. Tissue-**specific expression of head**-to-tail cyclized miniproteins in Violaceae and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide1. Plant Cell 16:2204-2216.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 17 (1): 103-116 (2016)

Genetic Diversity among Some Iranian Viola (*Viola* spp.) Genotypes Using Molecular Markers ISSR

N. Asadi, A.R. Babaei* and M.R. Naghavi[1]

Ever Green sweet violets (*Viola spp.*) are perennial herbaceous plants that have medicinal properties and they were planted in Europe since ancient times. They are native to East Asia, the Mediterranean and north-eastern parts of Europe.In this research, studying of the species diversity as well as the genetic among some Iranian Viola species was performed. This research was at 2012–2013 and included: samples from young leaves of plants in the field and laboratory works, involves extracting DNA, PCR and electrophoresis etc that was done in the laboratory of Horticultural Science, Tarbiat Modarres University. A total of 37 genotypes of the two species V.odorata and V. alba were examined. In this study 20 random primers were used for PCR reaction on the template DNAs extracted from leaves, which 18 showed good amplification and polymorphism. Totally, 117 bands ranging from 200 to 1000 bp with 59 polymorphic bands were produced. Cluster analysis using UPGMA algorithm were separated genotypes into 4 distinct groups. Based on The genetic similarity coefficient both species have a high genetic similarity (91.2 percent) and both species have very low genetic distance (9.2 percent).In other words alba genotypes as part of the Caspian Sea to the West Caspian Sea are genetically very closely related odorata species. But genotypes alba species from the central part of the Caspian Sea to the East Caspian Sea, quite apart from odorata species and higher genetic similarity Is seen between species at East to the West coast of the Caspian Sea.

Key Words: Violet, Cluster analysis, Genetic similarity, Genetic distance.

1. M.Sc. Student and Assictante Professor of Horticulture, College of Agricultture, Tarbiyat modares University, Professor of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University, I.R.Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (arbabaei@modares.ac.ir)

www.SID.ir