

ساختار شناسی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گزنه دوپایه (*Urtica dioica*) استان مازندران با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

مصطفی حق‌پناه*^۱، سیدکمال کاظمی تبار^۲، سیدحمیدرضا هاشمی^۳، سیدمحمد علوی^۳

*^۱- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پست الکترونیک: masoudhgh@gmail.com

^۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۳- پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۱

چکیده

گزنه (*Urtica dioica*) گیاهی دوپایه بوده و از طریق جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شود و به‌طور گسترده در شمال ایران می‌روید. در این تحقیق با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری AFLP، تنوع و ساختار ژنتیکی ۵ جمعیت گزنه استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۷۹۸ باند امتیازدهی شد که ۷۲۲ باند چندشکل (۹۰/۵) بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، ۰/۲۳ و براساس ضریب تشابه جاکارد دامنه تغییرات تشابه ژنتیکی از ۰/۴۴ تا ۰/۱۴ متغیر بود. گروه‌بندی بر مبنای الگوریتم UPGMA ۵ جمعیت مورد بررسی را در چهار گروه مجزا قرار داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان دهنده بالا بودن واریانس درون جمعیت‌ها بود. تنوع گسترده مشاهده شده، شاخص Fst و نرخ بالای مهاجرت (Nm) همگی دلیل بر بسته نبودن جمعیت‌ها و ارتباط ژنتیکی میان آن‌ها می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه گزنه با تنوع بسیار وسیع، اقلیم مازندران را محلی مناسب برای سکونت یافته است.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی DNA، تشابه ژنتیکی، نشانگر مولکولی، گیاه دارویی.

مقدمه

تتراپلوئید گزنه ۳/۱ پیکوگرم محاسبه گردیده است (Grime et al., 2007). گزنه دوپایه عموماً دگرگشن بوده، هر چند که برخی از جمعیت‌های آن نیز از خودگشنی برخوردارند. گرده‌افشانی این گیاه از طریق باد صورت گرفته و روش تکثیر غیرجنسی این گیاه تکثیر از طریق ریزوم می‌باشد (Grime et al., 2007).

امروزه گیاهان دارویی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه یکی از منابع ملی با ارزش می‌باشند که حفاظت از ژرم پلاسما آنها دارای اهمیت است (Sarwat et al.,

گزنه دوپایه (*Urtica dioica*) یکی از گیاهان دارویی مهم با خواص دارویی متنوع (Taylor, 2009) بوده که به‌طور گسترده در شمال ایران می‌روید و دارای چندین زیرگونه شناخته شده است. این گیاه دوپایه عموماً تتراپلوئید با دو فرم در تعداد کروموزوم‌های پایه $X=12$ و $X=13$ بوده که تنها زیرگونه دیپلوئید شناخته شده آن *U. dioica ssp. galeopsifolia* با عدد کروموزومی $2x=26$ می‌باشد (Stace, 2004). مقدار محتوای ژنومی (2C value) برای گیاه

رابطه Uzonur و همکاران (۲۰۱۳) نیز با روش‌های متفاوت مولکولی و مورفولوژیکی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گیاه گزنه کشور ترکیه را بررسی و عنوان داشتند که تنوع مشاهده شده بسیار گسترده است. به غیر از دو بررسی مذکور تحقیق‌های قابل دسترس و منتشر شده دیگری در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های گیاه گزنه موجود نمی‌باشد. در این تحقیق با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گزنه استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA: جمعیت‌های گیاه گزنه از ۵ منطقه واقع در استان مازندران جمع‌آوری گردید. تعداد نمونه در هر منطقه با توجه به وسعت و تراکم جمعیت به نحوی انتخاب شدند (۲۴ نمونه از ۵ منطقه) تا نماینده مناسبی از هر جمعیت باشد (جدول ۱). به منظور استخراج DNA گیاه گزنه از روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) با اندکی تغییرات استفاده شد. مقدار ۰/۰۵ گرم پودر برگ گیاه گزنه به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج، (NaCl 2.5 M, Tris base 1M: pH 8, EDTA 0.5M: pH: 8, CTAB 3% (w/v), PVP 4% (w/v), β -Mercaptoethanol 2% (v/v)) در دمای ۶۵ درجه به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتیفریوژ با ۱۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس فاز روایی محلول برداشته مقدار ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۱۰٪ (بسته به رنگ محلول) به همراه ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل به محلول اضافه کرده و به مانند قبل سانتیفریوژ شد. بعد از اتمام سانتیفریوژ فاز روایی برداشته و بار دیگر به مانند قبل با کلروفرم ایزوامیل الکل شستشو گردید. برای تشکیل پلت DNA از ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد استفاده شد. کمیت و کیفیت سنجی DNA حاصله به دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز ۰/۷٪ انجام گرفت.

ارزیابی و محاسبه تنوع ژنتیکی اولین گام در مدیریت، بهره‌برداری و حفاظت از ژرم پلاسما این گیاهان می‌باشد. در گذشته روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی وابسته به نشانگرهای مورفولوژیک بود که بسیار تحت تأثیر محیط قرار گرفته و اطلاعات دقیقی حاصل نمی‌کردند. اما امروزه نشانگرهای مولکولی ابزارهایی دقیق و مفیدی در این راستا می‌باشند (Cao & Finkeldey, 2006). نشانگرهای مولکولی مختلفی در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاهان استفاده گردیده اما به دلیل عدم شناخت کافی از اطلاعات ژنوم گیاهان دارویی معمولاً از نشانگرهای تصادفی نظیر AFLP، RAPD، ISSR، SAMPL و Sarwat (Sarwat et al., 2008) در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار شناسی جمعیت استفاده می‌شود. نشانگر AFLP با خصوصیتی مانند دقت زیاد، تکرارپذیری و قدرت تفکیک بسیار بالا در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی پرکاربرد می‌باشند. این نشانگر برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهان دارویی *Siraitia grosvenorii* (Tang et al., 2007)، *Jatropha curcas* (Tatikonda et al., 2009)، گونه‌های *Achillea* (Rahimmalek et al., 2009) و *Incarvillea younghusbandii* (Zhu et al., 2009) مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Tribulus terrestris* با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی نشان داد که نشانگر AFLP ابزاری مفید در بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه دارویی می‌باشد (Sarwat et al., 2008).

با توجه به خواص دارویی و تنوع سیتوژنتیکی گیاه گزنه شناخت ژرم پلاسما آن دارای اهمیت می‌باشد. تا کنون مطالعات انجام شده عموماً بر خواص دارویی این گیاه متمرکز بوده و بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های گیاه گزنه دوطایه بسیار محدود می‌باشد (Bharmauria et al., 2009). در اولین مطالعه منتشر شد Bharmauria و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از ۸ آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی گزنه هیمالیا را بررسی و اعلام داشتند که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را مشاهده کردند. در همین

برای اطمینان از صحت خوشه‌بندی از تکنیک Bootstrapping با ۱۰۰۰۰ بار نمونه برداری مجدد تصادفی با بهره‌گیری از نرم‌افزار Winboot انجام شد (Yap & Nelson, 1996). برای محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از فرمول $PIC = \sum 2f(1-f)/n$ (Powell et al., 1996) استفاده شد که در این رابطه f فراوانی نسبی باندهای مشاهده شده، 1-f فراوانی نسبی باندهای غایب و n تعداد لوکوس‌های می‌باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003) و شاخص تنوع Nei (1973)، شاخص Shannon، تعداد کل باند، درصد چندشکلی و تعداد باندهای چندشکل توسط نرم‌افزار Popgen ver 32 (Yeh et al., 1999) و شاخص نشانگر (MI) که نشان‌دهنده قدرت تفکیک یک نشانگر می‌باشد از حاصل ضرب درصد چندشکلی در محتوای اطلاعات چندشکلی نیز محاسبه گردید (Powell et al., 1996). از نرم‌افزار Arlequin ver 3.5 برای بدست آوردن شاخص F_{st} (wright's F statistics) به منظور بررسی تنوع کل (fixation index) و F_{st} هر جمعیت (population specific indices F_{st}) استفاده (Excoffier et al., 2005) و براساس F_{st} بدست آمده برای هر جمعیت، میزان جریان ژنی (Nm) طبق فرمول $Nm = (F_{st} \times 4)^{-1}$ محاسبه گردید (Whitlock & McCauley, 1999). در رابطه مذکور N تعداد افراد در یک جمعیت و m سهم آن افراد از میزان مهاجرت است.

نتایج

مبنای پژوهش‌های مولکولی به دست آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب می‌باشد، لذا پس از استخراج DNA طبق مراحل ذکر شده کمیت و کیفیت DNA مورد بررسی قرار گرفتند. چالش اصلی در استخراج DNA گیاه گزنه رنگی شدن (زرد، سبز، قهوه‌ایی و...) پلست‌های DNA استخراجی می‌تواند به دلیل ازدیاد متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات رنگی بوده باشد که استفاده از ماده شیمیایی PVP (Bharmauria et al., 2009) و CTAB ۱۰٪ این مشکل را رفع نمود.

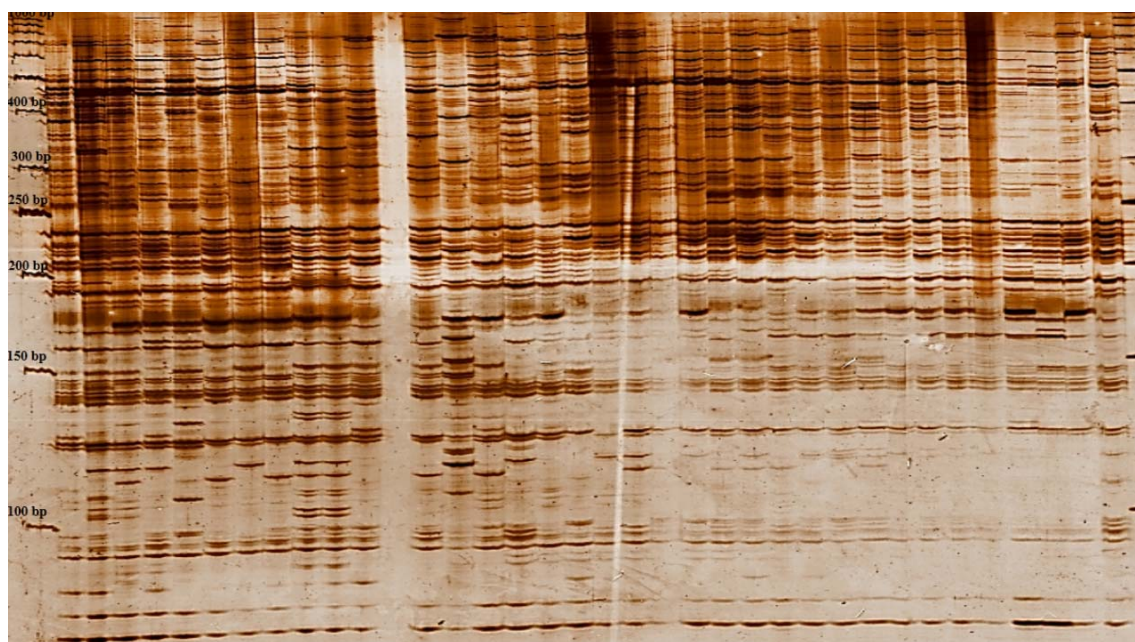
جدول ۱- نمونه‌های گزنه (*U. dioica*) جمع‌آوری شده از

مناطق مختلف استان مازندران

نام نمونه‌های هر جمعیت	نام جمعیت	محل جمع‌آوری
B1, B2, B3, B4, B5, B6	Pop1	بابلسر
R1, R2, R3, R4, R5, R6	Pop2	رامسر
N1, N2, N3, N4	Pop3	نور
A1, A2, A3, A4	Pop4	عباس‌آباد
S1, S2, S3, S4	Pop5	ساری

مراحل تکنیک AFLP: تکنیک انگشت‌نگاری AFLP براساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات انجام گرفت. بدین منظور ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی با ۵ واحد آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* مورد هضم قرار گرفته سپس آدپتورهای مرتبط با آنزیم‌های برشی به انتهای برش خورده ژنومی اتصال یافت. انگشت‌نگاری AFLP با استفاده از ۴۰ ترکیب آغازگری (۸ آغازگر *EcoRI* و ۵ آغازگر *MseI*) با سه نوکلئوتید اضافه در انتهای 3' انجام شد و ۱۰ ترکیب آغازگری که مناسب‌ترین وضوح و چندشکلی را داشتند انتخاب شدند. قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ به مدت ۲ ساعت در بافر 0.5 x TBE الکتروفورز گردیده (شکل ۱) و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت (Sanguinetti et al., 1994).

تجزیه آماری: براساس وجود و عدم وجود باند ماتریس صفر و یک توسط نرم‌افزار Total Lab TL120 ver 2008 تهیه و از این ماتریس برای به دست آوردن ماتریس تشابه، رسم دندروگرام و آزمون مانتل با کمک نرم‌افزار NTSYS ver 2.02 (Rohlf, 1998) استفاده گردید. به منظور بدست آوردن مناسب‌ترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی از آزمون مانتل با بهره‌گیری از سه ضریب تشابه جاکارد، دایس، اتصال ساده و سه الگوریتم خوشه‌بندی همبستگی ساده (single linkage)، همبستگی کامل (complete linkage) و اتصال متوسط (UPGMA) استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با ۹۹۹ نمونه برداری مجدد تصادفی، با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5



شکل ۱- الگوی بانندی جمعیت‌های گزنه مازندران حاصل از ترکیب آغازگری *M-CAA/E-AAG*

جدول ۲- شاخص‌ها و اطلاعات حاصل از باندهای ترکیب‌های آغازگری مورد مطالعه

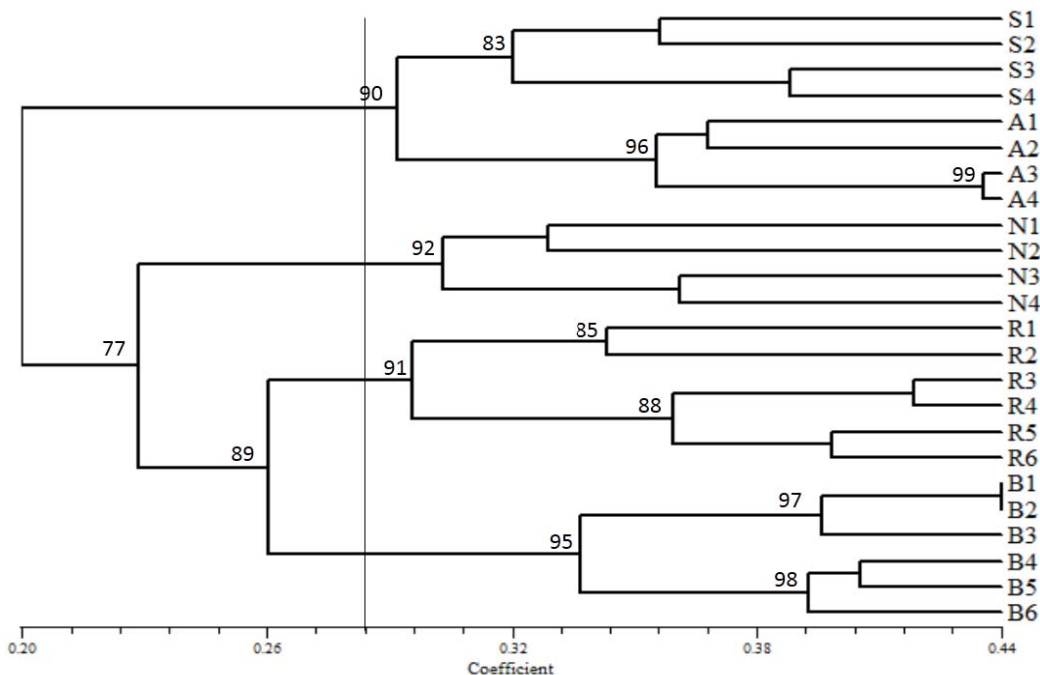
توالی آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکل PIC	شاخص نشانگر MI
<i>MseI</i>	<i>EcoRI</i>					
<i>M-CAA</i>	<i>E-ACC</i>	۴۴	۳۹	۸۹	۰/۲	۱۷/۷۳
<i>M-CAA</i>	<i>E-ACG</i>	۶۹	۶۰	۸۷	۰/۲۴	۲۰/۷۸
<i>M-CAA</i>	<i>E-AGG</i>	۷۰	۶۴	۹۱	۰/۲۱	۱۹/۵۷
<i>M-CAA</i>	<i>E-CGT</i>	۷۰	۶۰	۸۶	۰/۲	۱۷/۱۴
<i>M-CAA</i>	<i>E-TTG</i>	۱۰۲	۹۶	۹۴	۰/۲۷	۲۵/۴۱
<i>M-CAC</i>	<i>E-AAC</i>	۱۰۲	۹۱	۸۹	۰/۳۱	۲۷/۶۶
<i>M-CTT</i>	<i>E-AAG</i>	۱۰۰	۸۹	۸۹	۰/۲۸	۲۴/۹۲
<i>M-CTT</i>	<i>E-ACG</i>	۱۰۰	۷۶	۹۴	۰/۲۳	۲۱/۵۸
<i>M-CTT</i>	<i>E-AGG</i>	۸۱	۶۱	۹۰	۰/۲۶	۲۳/۳۲
<i>M-CTT</i>	<i>E-CGT</i>	۶۸	۸۶	۹۳	۰/۲۶	۲۴/۳
میانگین		۷۹/۲	۷۲/۲	۹۰/۲۱	۰/۲۵	۲۲/۲۵

امتیازدهی شده برای هر ترکیب آغازگری حدود ۷۹/۸ و میانگین باندهای چندشکل ۷۹/۲ باند محاسبه شد. بیشترین تعداد باند متعلق به ترکیب آغازگرهای

در مجموع ۷۹۸ باند امتیازدهی شده از ۱۰ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP در محدوده ۱۰۰ تا ۸۵۰ جفت باز، تعداد ۷۲۲ باند (۹۰/۵ درصد) چندشکل، میانگین باندهای

آغازگری $E-ACC/M-CAA$ با ۰/۲ محاسبه شد و میانگین شاخص نشانگر ۲۲/۲۵، بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب به ترکیب آغارگرهای $M-CAA/E-AAG$ (شکل ۱) با ۲۷/۶۶ و $M-CAA/E-CGT$ با ۱۷/۱۴ بود (جدول ۲). مقدار بالای شاخص نشانگر AFLP در این بررسی به دلیل تعداد زیاد باندهای چندشکل می باشد نه مقدار PIC این نشانگر، Maras و همکاران (۲۰۰۸) نیز به چنین نتیجه گیری در تحقیق خود رسیدند.

($E-TTG/M-CAA$ و $E-AAC/M-CAC$) و کمترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگر $E-ACC/M-CAA$ ، بیشترین درصد چندشکلی متعلق به ترکیب آغازگرهای $E-ACG/M-$ و CTT با $E-TTG/M-CAA$ ۹۴٪ و کمترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگری $E-CGT/M-CAA$ با ۸۶٪ باند چندشکل، متوسط مقدار PIC نشانگر AFLP در این بررسی ۰/۲۳، بیشترین مقدار PIC را ترکیب آغازگری $M-CAA/E-AAG$ با ۰/۳۱ و کمترین میزان را ترکیب



شکل ۲- دندروگرام ۲۴ ژنوتیپ گزنه استان مازندران با بهره گیری از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

خوشه بندی و ضریب تشابه مذکور یکدیگر را به خوبی توجیه می کنند (Mohammadi & Prasanna, 2003). بر مبنای ضریب تشابه جاکارد بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۴۴) بین جفت نمونه های B1 و B2 متعلق به جمعیت بابلسر و کمترین تشابه (۰/۱۴) بین جفت نمونه های B6 و S1 متعلق به جمعیت های ساری و بابلسر به دست آمد (جدول ارائه نشده است). نتایج تجزیه خوشه ای براساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA حاکی از وجود چهار گروه اصلی با ضریب تشابه ۰/۲۸ که گروه اول شامل

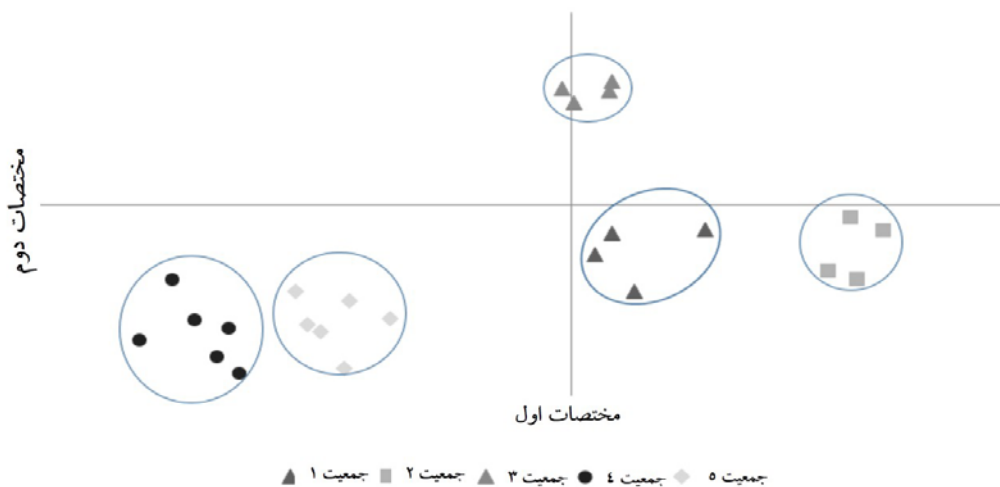
آزمون مانتل یک روش آماری جهت تعیین همبستگی بین دو ماتریس (با ابعاد یکسان) بوده و هرچه ضریب حاصل این آزمون به یک نزدیک تر شود همبستگی دو ماتریس بیشتر است (Mantel, 1967). براساس داده های حاصل از آزمون مانتل ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم خوشه بندی UPGMA با همبستگی بسیار بالا (۰/۹۴) به عنوان مناسب ترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه بندی برای رسم دندروگرام انتخاب شدند (جدول آورده نشده است). مقدار بالای این عدد نشان می دهد که الگوریتم

یکنواخت تر از نشانگر AFLP بوده و تمایل این نشانگر بیشتر به نواحی تلومری می‌باشد. دلیل توزیع غیر یکنواخت نشانگر AFLP به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی مانند موتاسیون، حذف و اضافه شدن قطعات نسبت داده می‌شود (Grime, 2007). نمودار دو بعدی حاصل از این تجزیه بیانگر فاصله نزدیک تر جمعیت‌های عباس‌آباد و ساری و در کل گروه‌بندی انجام شده را توجیه می‌کند (شکل ۳). این مختصات با این حال که با استفاده از ۵۱/۷۰ درصد واریانس حاصله رسم شد ولی گویای تمایز قابل ملاحظه جمعیت‌ها می‌باشد، به طوری که هیچ یک از اکوتیپ‌های جمعیت‌های مختلف در هم ادغام نشده بودند. این تمایز قابل ملاحظه می‌تواند مرتبط به دلایلی نظیر قدرت تفکیک بالای نشانگر AFLP و وجود چند زیرگونه در گونه *U. dioica* باشد (Weigend, 2005).

نمونه‌های جمعیت‌های عباس‌آباد و ساری است. گروه دوم نمونه‌های جمعیت نور، گروه سوم نمونه‌های جمعیت رامسر و گروه چهارم نمونه‌های جمعیت بابلسر را شامل شدند. مقادیر بالای Bootstrapping (۷۷ تا ۹۹) دلیلی بر صحت دندروگرام (شکل ۲) و محل قرار گرفتن افراد درون خوشه (Mohammadi & Prasanna, 2003) می‌باشد.

نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که سه مختصات اول روی هم ۶۳/۶۵٪ و سهم هر یک به ترتیب ۳۰/۷۳، ۲۹/۹۸ و ۱۳/۹۳ درصد می‌باشد (جدول ارائه نشده است). از نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت نشانگر AFLP در طول ژنوم یکنواخت توزیع نشده و تمامی ژنوم را پوشش ندادند (Mohammadi & Prasanna, 2003). در این خصوص Chalmers و همکاران (۲۰۰۱) اعلام داشتند توزیع نشانگرهای SSR و RFLP در طول ژنوم

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)



شکل ۳- نمودار دو بعدی مختصات اصلی (PCoA) جمعیت‌های مورد مطالعه

بحث

کل این شاخص‌ها به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۲۷ به دست آمد. این در حالی است که حداکثر این شاخص‌ها درون جمعیت‌ها مربوط به جمعیت نور (۰/۲۱ و ۰/۳۳) و حداقل آن‌ها متعلق به جمعیت رامسر (۰/۱۵ و ۰/۲۳) بوده است. نتایج این تجزیه حاکی از تنوع گسترده درون جمعیت‌های گیاه گزنه در استان مازندران می‌باشد.

با توجه به تمایز جمعیت‌ها در تجزیه‌های قبلی برای روشن تر شدن ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌ها به بررسی تنوع و ساختار جمعیت‌های مورد مطالعه پرداخته شد. شاخص‌های تنوع جمعیتی Shannon و Nei (۱۹۷۳) با استفاده از نرم‌افزار Popgen ver 32 محاسبه شد (جدول ۳) و مقدار

جدول ۳- شاخص‌های تنوع و میزان چندشکلی برای هر جمعیت

جمعیت	درصد چندشکلی	تعداد مکان‌های چندشکل	شاخص تنوع Nei	شاخص تنوع Shannon
بابلسر	۶۳/۱۱	۴۶۲	۰/۳۰	۰/۱۹
رامسر	۶۸/۸۶	۵۰۴	۰/۲۳	۰/۱۵
نور	۴۶/۳۱	۳۳۹	۰/۳۳	۰/۲۱
عباس‌آباد	۵۱/۰۹	۳۷۴	۰/۲۷	۰/۱۸
ساری	۵۳/۵۵	۳۹۲	۰/۲۸	۰/۱۸
کل	۹۰/۲۱	۷۲۲	۰/۴۳	۰/۲۷

واریانس مولکولی انجام شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که در مجموع سهم تنوع درون جمعیت‌ها از تنوع بین جمعیت‌ها بیشتر بوده به طوری که ۸۰٪ واریانس کل (جدول ۵) متعلق به تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد. اگرچه گیاه گزنه دگرگشن بوده و با کمک باد تکثیر می‌شود ولی به دلیل داشتن بذر درشت نسبت به سایر گیاهان خودرو (Mutikainen & Koskela, 2000) نمی‌تواند مسافت زیادی را طی کند. تکثیر گسترده غیر جنسی در محل به وسیله ریزوم و درشتی بذر می‌تواند از دلایل توجیح سطح بالای تمایز بین جمعیت‌ها و تنوع درون آن‌ها باشد. بخصوص در جمعیت نور که از سایر جمعیت‌ها از لحاظ جغرافیایی دور بوده و دارای نرخ مهاجرت کمتری می‌باشد این امر قابل مشاهده است. میزان بالای Nm و واریانس درون جمعیت‌ها بیانگر این واقعیت است که جریان ژنی باعث اضافه شدن ژن‌ها از جمعیتی به جمعیت دیگر گشته Alfonso-Corado و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسی خود به چنین نتیجه‌ای رسیده بودند.

به منظور بررسی ساختار جمعیت‌های گزنه استان مازندران، شاخص Fst (Fixation Index) محاسبه گردید (Palsboll *et al.*, 2006). میزان Fst کل ۰/۳۱۶ محاسبه گشت، بیشترین میزان Fst درون جمعیت‌ها (۰/۲۷) مربوط به جمعیت نور و کمترین (۰/۱۵) آن مربوط به جمعیت عباس‌آباد بود (جدول ۴). مطالعات Mutikainen و Koskela (۲۰۰۰) نشان داد که مقادیر بالای هتروزیگوسیتی گیاه گزنه که باعث افزایش Fst می‌شود به دلیل نحوه تولید مثل جنسی این گیاه است، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نتایج حاصل حاکی از تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه درون و بین جمعیت‌ها می‌باشد که این امر با توجه به نحوه تولید مثل این گیاه (دگرگشنی) قابل پیش‌بینی بوده و همچنین نرخ نسبتاً بالای مهاجرت (Nm) نیز نشان می‌دهد که این گیاه علاوه بر تکثیر غیر جنسی (تکثیر ریزوم) از طریق جنسی نیز به طور گسترده تکثیر می‌شود و در واقع جوامع مورد بررسی دارای ساختاری هتروزیگوت و هتروژن می‌باشند. برای اطمینان از تنوع درون جمعیت‌ها تجزیه

جدول ۴- میزان شاخص‌های Fst و Nm کل و جمعیت‌ها

جمعیت	کل	ساری	عباس‌آباد	نور	رامسر	بابلسر
Fst	۰/۳۱۶	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۲۷	۰/۲۴	۰/۲۳
Nm	۱/۰۸۱	۱/۳۷۱	۱/۶۲۶	۰/۹۳۸	۱/۰۳۱	۱/۰۸۷

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی AMOVA

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۴	۹۵۶/۲۹۲	۲۳۹/۰۷۳	۲۷/۰۲۴	۲۰٪
داخل جمعیت‌ها	۱۹	۲۱۰۳/۵	۱۱۰/۷۱۱	۱۱۰/۷۱۱	۸۰٪
کل	۲۳	۳۰۵۹/۷۹۲		۱۳۷/۷۳۴	۱۰۰٪

- RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Research, 3(3):166-170.
- Cao, C.P., and Finkeldey, R., 2006. Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula* Miq and *Shorea parvifolia* Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs. Tree Genetics and Genomes, 2:225-39.
- Chalmers, K.J., Canobell, W., Kretschmer, J., Karakousis, A., Ensckhe, P. H., Pierns, S., Harker, M., Pallota, G. B., Cornish, M. R., Shariflou, L., Rampling, A., Mclauchlan, G., Daggard, P. J., Sharp, T. A., Holton, M., Sutherland, W., Apples, R., and Landrige, P., 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. Australian Journal Agriculture Research, 52:1089-1119.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Algal Physiology and Biochemistry, 19:11-15.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.
- Grime, J. P., Hodgson, J. G., and Hunt, R., 2007. Comparative Plant Ecology: A Functional Approach to Common British Species. Unwin hyman Ltd, London, 742p.
- Uzonur, I., Akdeniz, G., Katmer, Z., and Ersoy, S. K., 2013. RAPD-PCR and real-time PCR HRM based genetic variation evaluations of *Urtica dioica* parts, ecotypes and evaluations of morphotypes in Turkey. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines, 10(2):232-245.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27:209-220.
- Maras, M., Sustar-Vozilc, J., Javornik, B., and Meglic, V., 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Acta agriculturae slovenica, 91: 87-96.
- Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
- Mutikainen, P., and Koskela, T., 2000. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. Heredity, 89: 38-24.
- Nei, M., 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 3321-3323.
- Palsboll, P. J., Berube, M., and Allendorf, F. W., 2006. Identification of management units using

شناخت تنوع ژنتیکی و ساختار جوامع گیاهی کمک بسیار مهمی در حفاظت منابع ژنتیکی و بهره‌برداری صحیح از گیاهان دارویی می‌باشد (Shafie et al, 2009). نشانگر AFLP با تکرارپذیری بالا از قدرت تفکیک بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های درون گونه (Rawashdeh et al, 2009) گیاه گزنه دوپایه (*U. dioica*) برخوردار بوده و شاخص‌های بدست آمده نشان می‌دهد که شباهت‌ها و تفاوت‌های مولکولی مشاهده شده با فاصله جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ها ارتباط تنگاتنگ داشته ولی ارتفاع از سطح دریا (جدول آورده نشده است) بر روی تنوع این گیاه تاثیری ندارد. با در نظر گرفتن مسافت جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها و محدودیت در تولید مثل جنسی گیاه (طی کردن مسافت‌های زیاد) می‌توان انتظار داشت که جمعیت‌های دور از هم رابطه ژنتیکی کمتری با هم داشته باشند. در مجموع این تحقیق نشان می‌دهد که گیاه گزنه با تنوع بسیار وسیع، اقلیم مازندران را محلی مناسب برای سکونت یافته و می‌توان با مطالعات گسترده و هدف‌دار، از این ژرم‌پلاسم متنوع و پرکاربرد بهره‌برداری کرد و این بررسی نیز می‌تواند مقدمه‌ای برای رسیدن به این اهداف باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی حمایت‌های مالی و معنوی ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبهرستان جناب آقای دکتر قربانعلی نعمت‌زاده قدردانی بعمل آمده و از جناب آقای دکتر علی پاکدین پالیزی به‌دلیل راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- Alfonso-Corado, C., Esteban-Jimenez, R., Clark-Tapia, R., Pinero, D., Campos, J., and Mendosa, A., 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). Evolutionary Ecology, 18:585-599.
- Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., and Sharma, Sh., 2009. Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on

- Tang, S. Q., Bin, X. Y., Peng, Y. T., Zhou, J. Y., Wang, L., and Zhong, Y., 2007. Assessment of genetic diversity in cultivars and wild accessions of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*), a species with edible and medicinal sweet fruits endemic to southern China, using RAPD and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54:1053-1061.
- Tatikonda, L., Wani, S. P., Kannan, S., Beerelli, N., Sreedevi, T. K., Hoisington, D. A., Devi, P., and Varshney, R. K., 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Science*, 176:505-513.
- Taylor, K., 2009. Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *Journal of Ecology*, 97:1436-1458.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Weigend, M., 2005. Die Erben Pokornys – Ein Beitrag zur Abgrenzung der enigmatischen Sippen *Urtica galeopsifolia* und *Urtica pubescens* in Mittel- und Osteuropa. *Hoppea*, 66:101-117.
- Whitlock, M. C., and McCauley, D. E., 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} / (4Nm + 1)$. *Heredity*, 82:117-125.
- Yap, I. V., and Nelson, R. J., 1996. Winboot, a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogram. *International Rice Research Institute, Philippines*, 32p.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., and Boyle, T., 1999. POPGENE Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. *University of Alberta, Edmonton*, 29p.
- Zhu, Y., Geng, Y., Tersing, T., Liu, N., Wang, Q., and Zhong, Y., 2009. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:589-596.
- population genetic data. *Trends Ecological. Evolutionar*, 22:11-16.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2:225-238.
- Rahimmalek, M., Sayed Tabatabaei, B. E., Arzani, A., and Etemadi, N., 2009. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:354-361.
- Rawashdeh, I. M., Ghzawi, A. L., Rawashdeh, N. Q., Khairallah, K., Al Tawaha A. R., and Salama, B., 2009. Genetic variation among Sumac (*Rhus Coriaria* L.) samples collected from three locations in Jordan as revealed by AFLP markers. *Advance Environ Biology*, 3:107-112.
- Rohlf, F. J., 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. *Stony book, New York*, 31p.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E., and Simpson, A. J. G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 915-919.
- Sarwat, M., Das, S., and Srivastava, P. S., 2008. Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant Cell Report*, 27: 519-528.
- Shafie, M. S. B., Hasan, S. M. Z., and Shah, R. M., 2009. Study of genetic variability of wormwood capillary (*Artemisia capillaries*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia. *Plant Omics Journal*, 2:127-134.
- Shannon, C. E., and Weaver, W., 1949. *The mathematical theory of communication*. *University of Illinois Press. Urbana*.
- Stace, C. A., 2004. *Interactive Flora of the British Isles (DVD-ROM)*. *ETI Information Services Ltd. University of Amsterdam. Amsterdam, the Netherlands*.

Evaluation of Mazandaran nettle (*Urtica Dioica*) population structure and genetic diversity by AFLP markers.

M. Haghpanah^{*1}, S.K. Kazemitabar², S.H.R. Hashemi³ and S.M. Alavi³

1* -Corresponding author, M.Sc., Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
Email: masoudhgh@gmail.com.

2- Assoc. Prof., Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

3- Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 02.08.2014

Accepted: 22.12.2014

Abstract

Stinging Nettle (*Urtica dioica*) is an important medicinal dioecious plant that is widely distributed around the north of Iran. Reproduction of the species is sexual and asexual. In this study, ten AFLP primer combinations were used to evaluate genetic diversity and population structure of five nettle populations collected from Mazandaran province. From 798 bands, 722 bands (90.5%) were polymorphic. Average polymorphic information content (PIC), 0.23, genetic similarity range based on Jaccard's similarity coefficient were between 0.44 to 0.14. Clustering based on UPGMA separated the studied populations into four groups. Analysis of molecular variance indicated high variance within the populations. Wide variation, high rates of F_{st} and number of migration (N_m) suggested that populations are not isolated implying gene flow between the populations. The results showed that Nettle plant with wide diversity selected the Caspian region as suitable place to reside.

Keywords: DNA polymorphism, genetic similarity, molecular marker, medicinal plant.