

## ارزیابی رابطه ژنتیکی بین گونه ای ارقام *Capsicum* و *Capsicum frutescens*

### (annuum) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

الهام رضایی میرقائد<sup>۱</sup>، اشرف آقاجری<sup>۲</sup>، حسین زینلی<sup>۳</sup>، زهرا کریمیان<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، اصفهان

۲- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، اصفهان

۳- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات و منابع طبیعی اصفهان

۴- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، اصفهان

#### چکیده

فلفل سبز (*Capsicum annuum*) در خانواده ی سیب زمینی (*Solanaceae*)، جنس *Capsicum* قرار دارد و یکی از محصولات سبزی و صیفی مهم است که هم اکنون در ایران و سایر نقاط جهان کشت می گردد و از جمله مهمترین گیاهان دارویی حساب می شود. در این آزمایش از نشانگر ISSR برای بررسی روابط ژنتیکی بین دو گونه فلفل (*Capsicum annuum*، *Capsicum frutescens*) استفاده شد. ۱۵ جمعیت از این دو گونه فلفل از مناطق مختلف کشور ایران و دو جمعیت از ایتالیا و ایالات متحده جمع آوری شد. از نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در فلفل استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، در ۱۵ ژنوتیپ فلفل، پرایمرها ۶۸ باند ایجاد کردند که ۵۱ باند چند شکلی و ۱۷ نوار تک شکل بود. در میان آنها پرایمر ۱۵ با ۱۳ نوار چند شکلی و پرایمر ۱۹ با ۲ نوار چندشکلی به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوارهای چندشکلی را داشتند. نمودارهای خوشه ای با ضریب تشابه ۲۱٪ دو گروه اصلی را نشان داد. بر اساس نتایج، نشانگر ISSR توانست گونه های فلفل را از نظر منشأ جغرافیایی و شباهت آب و هوایی مناطق متمایز کند.

**واژگان کلیدی:** تنوع، ژنوتیپ ها، گیاهان دارویی، نشانگر مولکولی

## مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزش مندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می شوند (امیدبگی، 1383). گیاه فلفل (*Capsicum sp*) از جمله گیاهان دارویی و غذایی می باشد که با دارا بودن ترکیب شیمیائی متنوع، در زمره مهمترین گیاهان داروئی به شمار می رود. جهت اصلاح گیاهان در راستای افزایش کمی و کیفی آنها، شناخت صحیح از اساس ژنتیکی و سیستم باروری آن ضروری می باشد (Stewart et al, 2007). گیاه فلفل یک گیاه دارویی گرمسیری و نیمه گرمسیری است که به خوبی مورد استفاده قرار می گیرد و از مهمترین گیاهانی است که برای مدت طولانی در کشورها و تمدن های مختلف به عنوان دارو مورد استفاده قرار گرفته است (امیدبگی، ۱۳۸۳). محققان ذکر کردند که عصاره های *Capsicum spp* درجات مختلفی از مهار علیه *Pseudomonas aeruginosa*، *Clostridium sporogenes*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*، ترکیب شیمیایی میوه فلفل حاوی مقدار زیادی تانن، فلاونوئید، ساپونین، تریپنوئید و کاروتنوئید است (Yihune and Yemata 2019). سی و یک گونه در جنس شناخته شده است، از این تعداد ۲۶ گونه وحشی و پنج گونه اهلی کشت می شوند، مطالعه روابط بین گونه ای گونه *Capsicum* برای تکثیر ارقام جدید یا دورگه مفید خواهد بود. در فرآیندهای تکثیر، باید پی برد که چگونه تنوع ژنتیکی توزیع می شود و کدام ویژگی های محیطی یا گونه ای بر این توزیع تأثیر می گذارد. تکرار دنباله ساده (ISSR) یکی از پر کاربردترین نشانگرهای مبتنی بر DNA است که به طور موثر در روشن ساختن تنوع و ارتباط ژنتیکی در داخل و بین چندین گونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Olatunji and Afolayan, 2019). در اینجا ما یک بررسی تنوع از مجموعه *Capsicum spp*، شامل پانزده ژنوتیپ با استفاده از نشانگر ISSR و خواص فیزیولوژیکی ارائه می دهیم.

## روش تحقیق

**ماده ی گیاهی:** در این پژوهش، ۱۵ جمعیت دو گونه فلفل (*Capsicum frutescens*، *Capsicum annuum*) مطابق با جدول شماره ۱، از مناطق مختلف ایران، شامل اصفهان، شیراز، اراک، لرستان، کاشان، تهران، آمل، ورامین، سمنان و کلارچای به همراه دو جمعیت از ایتالیا و ایالات متحده توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی جمع آوری شد.

جدول ۱: فهرست ژنوتیپ های فلفل از مناطق مختلف

Number	Genotypes	Number	Genotypes
1	<i>C. annuum-Italia</i>	9	<i>C. frutescens-Shiraz</i>
2	<i>C. annuum-Esfahan2</i>	10	<i>C. annuum-Esfahan1</i>
3	<i>C. annuum-Shiraz</i>	11	<i>C. frutescens-Esfahan</i>
4	<i>C. annuum-Arak</i>	12	<i>C. frutescens-Amol</i>
5	<i>C. frutescens-Lorestan</i>	13	<i>C. frutescens-Varamin</i>
6	<i>C. frutescens-Kashan</i>	14	<i>C. annuum-Kelarchay</i>
7	<i>C. annuum-America</i>	15	<i>C. annuum-Semnan</i>
8	<i>C. frutescensTehran</i>		

**استخراج DNA:** از نمونه های برگ جوان با استفاده از روش روگز و بندیچ با اندکی تغییرات انجام شد (Rogers and Bendich 1985). واکنش ISSR با استفاده از آغازگرهای مکمل با توالی ریز ماهواره ای انجام شد. قبل از شروع آزمایشها، دمای ذوب هر آغازگر با کیفیت مناسب بررسی شد تا بهترین دمای ذوب برای هر آغازگر مشخص شود. در نهایت، هشت آغازگر که یک الگوی باند خوب تولید کردند برای واکنشهای PCR انتخاب شدند (جدول ۲). تکثیر در یک ترموسیکلر (FlexCycler2، آلمان) تحت شرایط زیر انجام شد: پس از تغییر دمای اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (داناتوراسیون). ۶۳-۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (ذوب)؛ ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه (تکرار) برای ۴۰ چرخه، و پس از آن یک گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

**الکتروفورز و اسکوردهی:** از ژل آگارز ۲٪ و الکتروفورز افقی برای نمونه های PCR استفاده شد. نمونه ها در چاهک ها بارگیری و سپس جریان الکتریکی ۸۰ ولت اعمال می شود، در نهایت پس از رسیدن نمونه ها به ۱ سانتی متر انتهای ژل، جریان متوقف، ژل از مخزن خارج و عکسبرداری انجام می شود. از آنجاییکه ISSR ها نشانگرهای غالب هستند، فقط می توان وجود یا عدم وجود آلل را تعیین کرد. بنابراین باید این فرض را پذیرفت که هر موقعیت باند، مربوط به یک مکان با دو آلل با وجود یا عدم وجود یک باند است. حضور گروهی که چند شکلی را در بین والدین نشان می دهد با شماره یک (۱)، عدم وجود آن با صفر (۰) و عدم وجود نوار در همه نمونه ها با شماره (۹) یا علامت سوال (؟) ثبت شد. قبل از گروه بندی توده ها به روش تجزیه خوشه ای، از آزمون Mantel برای انتخاب بهترین ضریب برای رسم نمودار استفاده شد و درصد چندشکلی هر آغازگر از رابطه بین تعداد مکانهای چندشکلی تقسیم بر تعداد کل مکان ها بدست آمد. در این مطالعه، روابط بین ژنوتیپ ها، تجزیه خوشه ای و ضریب همبستگی با نرم افزار NTSYS و روش ماتریس شباهت (JACARD) و روش تجزیه خوشه ای (UPGMA) محاسبه شد.

جدول ۲: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای انتخابی

Primers	Sequences
13	5'-(CA) <sub>6</sub> GT-3'
14	5'-(CA) <sub>6</sub> GG-3'
15	5'-(CA) <sub>6</sub> AG-3'
19	5'- HVH(TCC) <sub>7</sub> -3'
22	5'-(AC) <sub>8</sub> C -3'
23	5'- (GA) <sub>8</sub> YC-3'
24	5'-(AG) <sub>8</sub> YT -3'
25	5'-(AC)YG -3'

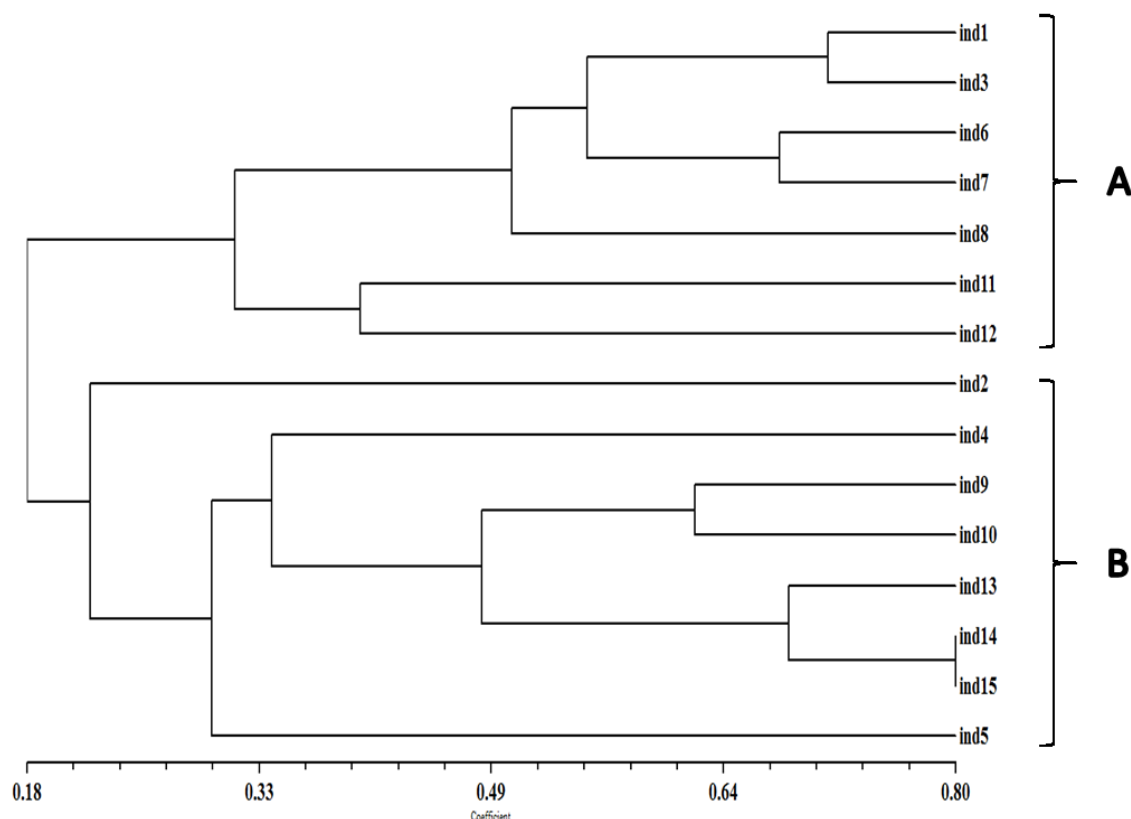
## یافته ها

پس از انتخاب آغازگرهایی که الگوی باندی مناسب در فلفل داشتند، نشانگرهای انتخاب شده بر روی همه ژنوتیپ ها مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت وجود (۱) و عدم وجود (۰) برای هر نوار امتیاز گرفتند و پرایمرها ۶۸ باند ایجاد کردند که شامل ۵۱ باند چند شکلی و ۱۷ نوار تک شکلی، در ۱۵ ژنوتیپ فلفل بود. در میان آنها، پرایمر ۱۵ با ۱۳ نوار چند شکلی و پرایمر ۱۹ با ۲ نوار چندشکلی به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوارهای چندشکلی را داشتند. میانگین تعداد قطعات در آغازگر ۸.۵ در ژنوتیپهای مورد مطالعه بود. اطلاعات مربوط به نشانگرهای مورد مطالعه در ژنوتیپ های فلفل در جدول شماره ۳ آورده شده است.

نمودارهای خوشه ای با ضریب تشابه ۲۱٪ دو گروه اصلی (A و B) را نشان داد (شکل ۱)، یک گروه شامل دو زیر گروه با ۳۶٪ شباهت با ژنوتیپ ۱، ۳، ۶، ۷ و ۸ به عنوان یک گروه و ژنوتیپ بود. ۱۱ و ۱۲ به عنوان یک گروه دیگر. گروه B شامل ژنوتیپ های ۲، ۴، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۵ در این گروه بود. ژنوتیپ ۲ با ضریب تشابه ۲۳ درصد بیشتر از بقیه بود. به این ترتیب، تنوع ارقام فلفل بلغاری را با استفاده از صفات زراعی و نشانگرهای ISSR ارزیابی کردند (Tsonov et al, 2017). داده های صفات زراعی و ۷ آغازگر ISSR دی نوکلئوتیدی برای برآورد فواصل ژنتیکی زوجی مورد استفاده قرار دادند. میانگین فاصله فنوتیپی بالاتری (۰/۴۱۴) در مقایسه با ژنوتیپی (۰/۲۱۴) در بین ارقام مشاهده شد که نشان دهنده تنوع فنوتیپی بالاتری در بین آنها بود (Refaat and Elgarhy, 2007). رابطه بین عملکرد ترکیبی و تنوع ژنتیکی را بر اساس نشانگرهای ISSR-PCR در فلفل مورد ارزیابی قرار دادند. فواصل ژنتیکی محاسبه شده توسط نشانگرهای ISSR یک دندوگرام با هفت گروه برای خطوط والدین ایجاد کرد.

جدول ۳: اطلاعات مربوط به نشانگر در ژنوتیپ های فلفل

Primer number	Primer sequences	Annealing tem.	Numbers of total band	Number of monomorphi sm bands	Number of polymorph ism bands	% polymor phism	PIC	MI
13	5'-(CA) <sub>6</sub> GT-3'	44	6	2	4	66.6	0.216	0.86
14	5'-(CA) <sub>6</sub> GG-3'	46	15	2	13	86.6	0.353	4.58
15	5'-(CA) <sub>6</sub> AG-3'	43	10	2	8	80	0.32	2.56
19	5'- HVH(TCC) <sub>7</sub> -3'	63	5	3	2	40	0.16	0.32
22	5'-(AC) <sub>8</sub> C -3'	52	10	0	10	100	0.247	2.47
23	5'-( GA) <sub>8</sub> YC-3'	48	9	5	4	44.4	0.185	0.73
24	5'-( AG) <sub>8</sub> YT-3'	48	7	2	5	71.42	0.274	1.36
25	5'-(AC) <sub>8</sub> YG -3'	54	6	1	5	83.3	0.213	1.06
	Total	-	68	17	51	-	-	-
	Means	-	8.5	-	6.37	71.56	0.246	1.74



شکل ۱: خوشه بندی ژنوتیپ های فلفل بر اساس ضریب شباهت جاکارد و روش UPGMA

### بحث و نتیجه گیری

در سال ۲۰۱۳، دیازو همکاران گونه های فلفل دلمه را در شرایط واگرایی ژنتیکی با توجه به پایگاه داده های مورفولوژیک، زراعی و مولکولی شرح دادند. با این حال توصیف تفاوت های ژنتیکی بر اساس صفات آناتومیکی نادر است. آناتومی و میکرومورفولوژی اندامهای رویشی و زایشی از چندین گونه فلفل دلمه مورد بررسی قرار گرفت. چهار فلفل دلمه به نمایندگی از گونه های *C. annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. annuum* var. *C. frutescens* در گلخانه کشت شدند. برگها، میوه ها و دانه ها نمونه برداری شد و ساختار اندام با میکروسکوپ نوری و الکترونی تجزیه و تحلیل شد. خصوصیات نمونه های مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR تعیین شد. پلی-مورفیسم در میان رنگ و شکل میوه ها مشاهده شد. تنوع بالایی در میان نمونه ها با استفاده از نشانگر ISSR تشخیص داده شد. با وجود این که گونه های مورد مطالعه تنوع ژنتیکی و مولکولی گسترده ای را نشان دادند ولی از لحاظ ویژگی های آناتومیک این گونه نبودند (Dias et al, 2013). در سال ۲۰۱۲ نجات حبیب وش و همکاران در پژوهشی به بررسی تنوع ژنتیکی در میان ارقام بنگدانه بر اساس نشانگرهای ISSR پرداختند و چنین بیان داشتند که جنس بنگ دانه متعلق به خانواده

# 4<sup>th</sup> International Conference on Agricultural Sciences Medicinal Plants and Traditional Medicine



COMSTEC Inter-Islamic Network on Virtual Universities  
KOSAR UNIVERSITY

September 20, 2021 Tbilisi - Georgia

سولاناسه دارای ۲۰ گونه در سراسر جهان و ۱۳ گونه در ایران می باشد که در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ بنگدانه از جمله *H.arachnoiduesd* و *Hyoscyamus niger*, *H.reticulatus*, *H.pusillus*, *H.kurdicus* بر اساس نشانگرهای ISSR در ایران مورد بررسی قرار گرفتند. ماتریس تشابه با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد بر اساس باندهای چند شکلی و دندروگرام از طریق تجزیه و تحلیل خوشه ایی UPGMA محاسبه شد. و دندروگرام ۲ گروه اصلی را نشان داد. شباهت ژنتیکی ارقام مورد مطالعه در محدوده ۰/۰۹ تا ۰/۵۳ بود بنابراین تنوع ژنتیکی قابل توجهی مشاهده شد. به طور کلی نشانگر ISSR توانست پلی مورفیسم بالایی را در میان ژنوتیپ های گیاه بنگدانه کشف نماید و نشان داده شد که روش ISSR یک راهکار مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی است (Nejad habibvash et al, 2012). همچنین در دنیای تجزیه و تحلیل های امروز، از اطلاعات حاصل از ISSR به عنوان پارامترهای حمایت کننده کیفیت گیاهان گلدار استفاده شده است. نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگرهای AFLP و RAPD برای انگشت نگاری و آنالیزهای گوناگون در برنج، ذرت و گیاهان مختلف دیگر و گونه های حیوانی استفاده شده است (Sanjog et al, 2011). بر اساس مطالب ذکر شده می توان پیشنهادات زیر را ارائه نمود:

۱. بررسی روابط تکاملی سایر گونه ها و ارزیابی قابلیت تلاقی پذیری آنها
۲. برنامه ریزی صحیح در جهت حفظ ذخایر ارزشمند ژنتیکی این گیاه و مدیریت صحیح در جهت ایجاد مراکز مجهز برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی کشور

۱. امیدییگی، رضا، ۱۳۸۳. تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد سوم، چاپ هشتم، مشهد، انتشارات آستان قدس رضوی

2. Dias, G. B., Gomes, V. M. Moraes, V. P. Zotich, G. R. Rabelo, A. O. Carvaiho, M. Moulin, S.A. Goncalves, R And Cunha, M. (2013). Characterization of Capsicum species using anatomical and molecular data. *Genetics and molecular Research*. 7 (2013). 216-240.
3. Nejad habibvash, F., Rahmani, F., Heidari, R. and Jamei, R. (2012). Assessment of genetic diversity among *Hyoscyamus* getypes based on ISSR markers. *International journal of Agriculture and crop sciences*. 15 (2012). 1300-1306.
4. Olatunji, T.L. and Afolayan, A.J. (2019). Evaluation of genetic relationship among varieties of *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens* L. in West Africa using ISSR markers. *Heliyon*, 5 (2019). 979-991
5. Refaat, M.H. and Elgarhy, H.A. (2007). Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in pepper (*Capsicum annum*. L.). *Annals of Agric. Sci., Moshtohor*, 45 (2007). 1565-1579.
6. Rogers, S.O. and Bendich, A. (1985). extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5 (1985). 69-76
7. Sanjog, T., Thul, D. Mahendra, P. Darokar, S., Ajitk. And Khanuja. P. (2011). Molecular profiling for Genetic Variability in Capsicum Species Based on ISSR and RAPD markers. *Springer science, Business Media, LLC*, 11 (2011). 1015-1019.
8. Stewart, J.R., Mazourek, C., Stellari, M. and Jahn, M. (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun locus. *Journal of Experimental Botany*, 58 (2007). 979-991.
9. Tsonev, S., Todorova, V., Groseva, S., Popova, T. and Todorovska, E.G. (2017). Evaluation of diversity in Bulgarian pepper cultivars by agronomical traits and ISSR markers. *Genetika*, 49 (2017). 647-662.
10. Yihune, E. and Yemata, G. (2019). Antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Ralstonia solanacearum* (Smith) that causes bacterial wilt in hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41 (2019). e45402-e45402.