ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارمریم (*Silybum marianum* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

مریم جمشیدنیا [*۱]، صدیقه عسگری [۲]، محمود رفیعیان کوپایی [۳]

[*۱] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۲] مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

[۳] مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

[*] نویسنده مسئول: Maryam.Jamshidnia58@gmail.com

چکیده

خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* گیاهی از خانواده Asteraceae است. گیاه خارمریم برای درمان سمیت کبدی مورداستفاده قرار می‌گیرد که تأثیر این گیاه به علت ترکیبی از فلاونولیگنان‌هایش می‌باشد که تحت عنوان سیلیمارین شناخته می‌شوند. با وجود ارزش‌های اقتصادی و دارویی خارمریم، تلاش‌ها در جهت شناسایی ژنوتیپ‌های این گیاه پایین است. نشانگر مولکولی (ISSR)، نشانگری مبتنی بر PCR بوده که در بین نشانگرهای مولکولی به‌عنوان تکنیک مناسبی در مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند. در این پژوهش میزان تنوع موجود در اکوتیپ‌های خارمریم با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت .جمعیتی از ۲۸ اکوتیپ از نواحی مختلف ایران به همراه یک نمونه از کشور مجارستان انتخاب گردید و توسط ۱۹ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۱۹ آغازگر ISSR ۹ آغازگر چندشکلی را به‌صورت باندهای واضح نشان دادند که در مجموع ۸۵ نوار چندشکل مشاهده شد. بیشترین مقدار PIC مربوط به نشانگر ISSR7 و ISSR8 با ۱۰۰ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای صفات مولکولی بر اساس ضریب تشابه جاکارد با روش UPGMA برای نشانگر ISSR درنظر گرفته شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت نشانگر ISSR برای تشخیص تنوع اکوتیپ‌های خارمریم ابزار کارآمدی می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش مبین وجود تنوع ژنتیکی مناسب در بین اکوتیپ‌های خارمریم ایران جهت آغاز مطالعات پروژه‌های بهنژادی است.

***کلمات کلیدی:* ضریب تشابه جاکارد، بهنژادی، PCR، Asteraceae، سیلیمارین**

مقدمه

گیاه خار مریم از خانواده Asteraceae است، به‌طور بومی در مدیترانه رشد می‌کند و در مناطق دیگری از جهان از جمله ایران پراکنده است (Morazzoni and Bombardelli, 1995; Leng-Peschlow, 1996). مواد موجود در گیاه ماریتیغال (خار مریم) دارای خواص ضد سرطانی است و می‌تواند در پیشگیری و درمان بسیاری از سرطان‌ها مؤثر باشد. ماده مؤثره آن "سیلیمارین" به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، سلول‌های کبد را در برابر هرگونه آسیب نابودکننده حاد یا مزمن، محافظت می‌کند. ضمن اینکه این ماده در کاهش کلسترول خون، افزایش سیستم ایمنی بدن، کاهش عوارض جانبی بیماران سرطانی که تحت شیمی‌درمانی هستند، مؤثر است و اثرات ضدسرطانی روی سلول‌های سرطانی پروستات، پوست، سینه و تخمدان دارد (Murphy *et al.*, 2000). با وجود ارزش‌های اقتصادی و دارویی خارمریم، تلاش ها در جهت شناسایی ژنوتیپ‌های این گیاه پایین است. همچنین ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان که در محیط‌های مختلف رشد یافته‌اند می‌تواند روی خصوصیات دارویی آن‌ها مؤثر باشد. تحقیقی که همراه با شناسایی و مشخص کردن زمینه

ژنتیکی گیاهان با خصوصیات دارویی آن‌ها باشد به تولید مداوم و ثابت مواد فعال در گیاهان کمک می‌کند. به‌منظور شروع برنامه شناسایی لازم است خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های موجود مطالعه شود (Leng-Peschlow, 1996).

فن‌آوری زیستی ابزار قدرتمندی در جهت شناسایی تنوع ژنتیکی است که از آن‌جمله می‌توان به نشانگرهای مبتنی بر DNA اشاره کرد. این نشانگرها تفاوت‌های ژنتیکی افراد مختلف را تعیین می‌کنند. کاربرد مهم نشانگرهای DNA، تهیه نقشه‌های ژنتیکی است (Seen, 2006). نشانگر مولکولی Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)، نشانگری مبتنی بر PCR بوده که در آن قطعات DNA با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره ای تکثیر می‌شود. در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ISSR به علت چندشکلی و تکرارپذیری بالا، توزیع ژنومی بالا و تصادفی، مشخص بودن محل کروموزومی، دسترسی و انجام سریع و آسان به‌عنوان تکنیک مناسبی در مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند (Sanchez-Perez *et al*., 2005). در ایران، خارمریم در مناطق جغرافیایی مختلف پراکند شده است، اگرچه هیچ گزارشی در ارتباط با مقدار تنوع ژنتیکی اش وجود ندارد. در این پژوهش پس کالیبراسیون دستگاه ترموسایکلر، آداپته سازی شرایط PCR و استخراج DNA از برگ‌های این گیاه جهت انجام مطالعات مولکولی تنوع ژنتیکی ارقام ذکر شده گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) با استفاده از مارکر ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه مارتیغال از قسمت‌های مختلف ایران جمع‌آوری شدند که شامل ۲۸ اکوتیپ بودند به همراه یک اکوتیپ اصلاح شده خارجی از کشور مجارستان نیز در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

DNA گیاهان با استفاده از روش CTAB استخراج شدند (Murray and Thompson, 1980). کیفیت و غلظت DNA با اسپکتروفتومتر و روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. پس از آن‌که کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری مورد سنجش قرار گرفت .در مرحله بعد PCR با حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر با استفاده از ۱۹ آغازگر انجام پذیرفت که از بین آن‌ها ۹ آغازگر چندشکلی را نشان دادند.

نشانگرها به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازبندی شدند. برای گروه‌بندی از الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) استفاده شد. بدین منظور نسخه ۲/۰۲ نرم‌افزار NTSYSpc (Rohlf ., 1998) استفاده گردید. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) توسط فرمول اندرسون و همکاران محاسبه گردید (Anderson *et al*., 1993).

نتایج و بحث

در این تحقیق اندازه قطعات تکثیر شده در تمام نشانگرها در محدوده ۲۰۰ تا ۱۵۰۰جفت باز مشاهده شدند. ۹ آغازگر ISSR در مجموع ۸۵ باند چندشکل تولید نمودند که تقریباً ۸۳ درصد از کل ۱۰۳ باند تولید شده را شامل گردید (جدول ۱).

آغازگر ISSR7 و ISSR15 بیشترین PIC (۰/۵۰) را نشان دادند. میانگین PIC برای کل آغازگرهای ISSR ۰/۴۵ بدست آمد. آغازگر ISSR7 و ISSR8 بیشترین درصد چندشکلی را نشان دادند (جدول ۱). هر چه عدد متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر بیشتر باشد کارایی آن نشانگر در گیاه مورد مطالعه بالاتر است.

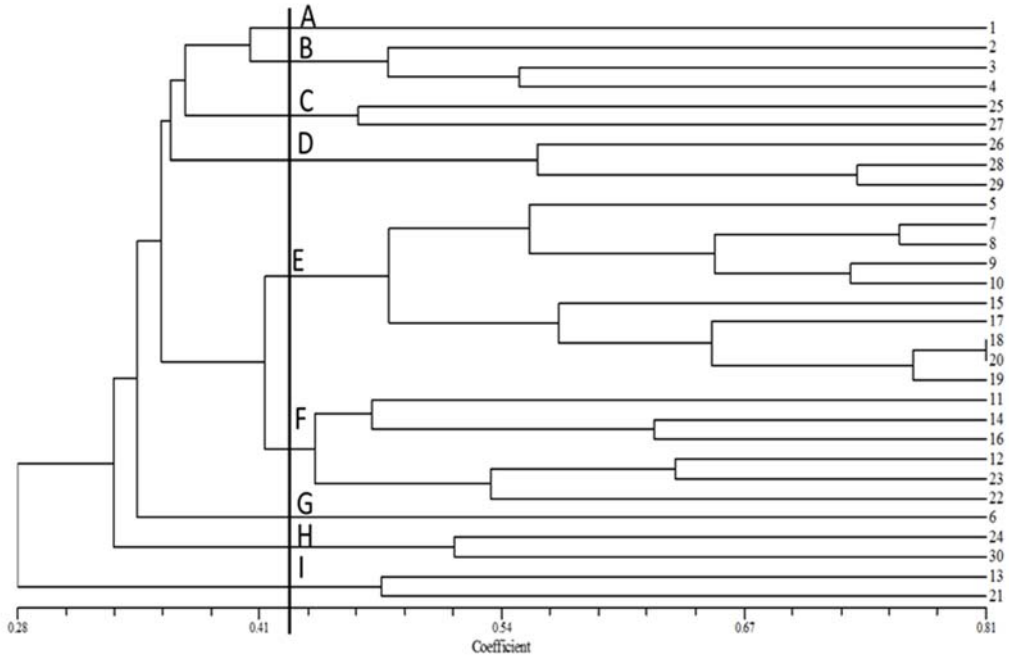
جدول ۱- توالی آغازگرهای مورداستفاده و تعداد باندهای چندشکلی تولید شده

آغازگر	توالی 5´-3´	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چندشکلی	درصد باندهای چندشکلی(٪)	محتوای اطلاعات چندشکلی(PIC)
ISSR7	(GA)8C	۶	۶	۱۰۰	۰/۵۰
ISSR8	(CT)8G	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۴۱
ISSR9	(AG)8C	۱۲	۹	۷۵	۰/۴۴
ISSR12	(GA)8A	۱۲	۱۰	۸۳	۰/۴۶
ISSR15	(AC)8G	۱۳	۹	۶۹	۰/۵۰
ISSR16	(TG)8A	۱۱	۸	۷۲	۰/۴۸
ISSR17	(AC)8C	۱۱	۸	۷۲	۰/۴۸
ISSR18	(ATC)6T	۱۴	۱۲	۸۵	۰/۴۶
ISSR19	(ATC)6C	۹	۸	۸۸	۰/۳۰
Total		۱۰۳	۸۵		۴/۰۳
Average		۱۱/۴۴	۹/۴۴	۸۳	۰/۴۵

در این تحقیق تجزیه و تحلیل داده‌ها برای گروه‌بندی گروه‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA برای نشانگر ISSR صورت گرفت. در دندروگرام اکوتیپ‌ها در ۹ گروه (A، B، C، D، E، F، G، H، I) دسته‌بندی شدند که گروه‌های B، C، D، E، F، H و I نیز خود شامل چند زیر گروه می‌باشند (شکل ۱).

رقم مجارستان در کنار اکوتیپ‌های ایرانی قرارگرفته است (شکل ۱). بنابراین می‌توان ادعا نمود که این ارقام از اکوتیپ‌های ایرانی حاصل‌شده‌اند و در صورت اشتباه بودن این ادعا، این موضوع تأییدکننده دیگری مبنی بر تنوع بالای خارمریم در ایران است.

ارزیابی تنوع در ژرم‌پلاسم این گیاه گامی مهم در برنامه‌های بهنژادی و نیز مدیریت ژرم‌پلاسم به حساب می‌آید. اهداف اصلی بهنژادی خارمریم افزایش میزان سیلیمارین، افزایش عملکرد بذر، همزمانی در گلدهی و عدم ریزش می باشد (Alemardan *et al*., 2013). با توجه به اینکه تعداد ارقام اصلاح شده این گیاه در دنیا انگشت شمار می‌باشند، دستیابی به این صفات از طریق اکوتیپ‌های وحشی این گیاه امری اجتناب‌ناپذیر است .نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی سریع ژرم‌پلاسم وحشی خارمریم به‌عنوان ابزار مؤثری در بهنژادی این گیاه به شمار می‌رود (Alemardan *et al*., 2013).



شکل ۱- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار NTSYS با استفاده از روش UPGMA بر اساس نشانگر ISSR در ۲۹ اکوتیپ خارمریم

منابع

Alemardan, A., Karkanis, A. and Salehi, R. 2013. Breeding Objectives and Selection Criteria for Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] improvement. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca; 41: 340-347.

Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Sorells, M.E. and Tanksley, S.D. 1993. Optimizing parental selection for genetic-linkage maps. Genome; 36:181–186.

Leng-Peschlow, D. 1996. Properties and medical use of flavonolignans (Silymarin) from Silybium marianum. Phytotherapy Research;10: 25-26.

Morazzoni, P. and Bombardelli, B. 1995. Silybium marianum (Carduus marianus). Fitotrapi;. 66:3-42.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research; 8: 4321-4325.

Murphy, J., Caban, M. and Kemper, K. 2000. Milk thistle (Silybium marianum). Http://www.mcp.edu/herbal/default.htm

Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.02. Exter Publications, etauket, NY, pp 1–31.

Sanchez-Perez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J. and Martinz-Gomez, P. 2005. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: Molecular characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticulture; 103:305-315.

Seen S. 2006. TV1-01 Exsitu conservation and productization of native plants. National conference on forest Biodiversity Resources: Exploitation conservation and management, 21-22 March 2006 CBFS, Madurai Kamaraj University: Madurai-625021.

Evaluation of Genetic Diversity of *Silybum marianum* Ecotypes Using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker

Maryam Jamshidnia[1*], Sedigheh Asgary[2], Mahmoud Rafieian-Kopaei[3]
[1*]Dept. Of Plant Breeding & Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran
[2]Isfahan Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3]Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[*]*Corresponding Author: Maryam.Jamshidnia58@gmail.com*

Abstract

Silybum marianum **is the scientific name of Milk thistle belonging to Asteraceae family. Milk thistle is used as oral treatment for liver diseases. This activity of Milk thistle is due to a mixture of flavonolignans, known as silymarin. Milk thistle has economical and domestic worth, nevertheless there are rare studies about the amount of its genetic diversity and the efforts to identify ecotypes of this plant are low. ISSR marker is a PCR based marker that is a suitable technique for genetic variation studies. The aim of this study was investigating genetic variation of Iranian Milk thistle ecotypes using ISSR marker. The population of 28 ecotypes from different region of Iran and a sample from Hungary were selected and evaluated by 19 ISSR primers. Clear banding pattern produced by 9 primers that totally a total of 85 repeatable polymorphic bands were detected. Among the primers, ISSR7 and ISSR8 identified the most number of PIC with 100%. Cluster analysis molecular traits based on Jacards with UPGMA method for ISSR marker were considered. According to findings ISSR marker is a powerful tool for detection genetic diversity of ecotypes. Moreover, the results indicate existence of a significant variation among Iranian Milk thistle ecotypes to start the breeding programs.**

Keywords**: Milk thistle, PCR, Asteraceae, Silymarin, Genetic Variation.**