ارزیابی گوناگونی و ساختار ژنتیکی برخی توده‌های بومی گل محمدی با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD

فاطمه عبدالی ورکانه[۱]، علی عزیزی*[۱]، محمد سیاری[۱] و امیرحسین کشتکار[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

* نویسنده مسئول: azizi@basu.ac.ir

چکیده

گل محمدی (*Rosa damascena*)، یکی از مهم‌ترین گونه های رز و از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و معطر جهان است. تکثیر این گیاه از طریق غیرجنسی است، با این وجود، به دلیل تنوع در بوته‌های مادری اولیه، این سوال مطرح است که آیا توده‌های کشت شونده این گیاه در ایران، همه کلون هستند؟ یا دارای تنوع ژنتیکی نیز می‌باشند؟ در این تحقیق، تنوع و ساختار ژنتیکی ۶ توده گل محمدی از استان کاشان (برزوک، نیاسر، آذران، کلپه، خیرآباد و آهسته) و یک توده از همدان (بهار)، در مجموع ۵۴ گیاه، به وسیله ۹ نشانگر ISSR و ۹ نشانگر RAPD مورد پیمایش ژنتیکی قرار گرفتند. آغازگرهای ISSR در مجموع۷۷ باند تولید کردند که ۶۱ باند چندشکل (۷۹٪) بودند. آغازگرهای RAPD نیز ۸۱ باند تولید کردند که ۵۴ باند چندشکل (۶۶٪) بودند. تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های گل محمدی (۵۴ گیاه) را به ۸ گروه تقسیم نمود. تنوع درون توده‌ها با استفاده از میانگین شاخص تنوع ژنی نی (h) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) با نرم‌افزار POPGENE مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین تنوع ژنتیکی در توده همدان (h=۰/۱۳ و I=۰/۱۹) و کم‌ترین در توده آذران (h=۰/۰۷ و I=۰/۱۰) مشاهده شد. میانگین نسبت آلل‌های مؤثر (Ne) به آلل‌های مشاهده‌شده (Na) در میان کل توده‌ها برابر با ۰/۹۱ بود. هم‌چنین برای بررسی تنوع ژنتیکی بین توده‌ها و واریانس مولکولی (AMOVA) از دو نرم‌افزار POPGENE و GENE ALEX استفاده شد. تمایز ژنتیکی نسبتا پایینی (Gst =۰/۱۱) در بین توده‌ها مشاهده شد. تنوع ژنتیکی درون توده‌ها نیز نسبتا پایین بود (Hs =۰/۱۶). میزان جریان ژنی(Nm) به دست آمده بین توده‌های گل محمدی مورد مطالعه ۳/۹۷ بود. در بررسی ساختار توده با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE، توده‌های گل محمدی مورد مطالعه به۴ زیرگروه ژنتیکی تقسیم شدند. شاخصهای محاسبه شده در این پژوهش، نشان داد که با وجود تکثیر غیر جنسی گیاه در سالیان متمادی، یک میزان اندکی از تنوع ژنتیکی در توده ها مشاهده می شود.

کلمات کلیدی: رز، تنوع ، نشانگر مولکولی، ساختار جمعیت

مقدمه

جنس رز (*Rosa*) از خانواده رزاسه (*Rosaceae*) از گیاهان معطر و زینتی هستند (آقا اقلو و بایدار، ۲۰۱۷). در جنس رز ۲۰۰ گونه و بیش از ۱۸۰۰۰ واریته وجود دارد (طبایی عقدایی و همکاران،۲۰۰۶). علاوه بر عطر و بوی آن، در طب سنتی چندین اثر دارویی از قبیل اثرات درمانی دردهای پیش از قاعدگی، کاهش وزن، ضد اسپاسم، آرامبخش و اثرات دیگر در این گیاه گزارش شده است (لقمانی خوزانی و همکاران، ۲۰۰۷). در سال‌های اخیر، فعالیت ضد HIV و ضد میکروبی در اسانس گل محمدی گزارش شده است (طبایی عقدایی و همکاران، ۲۰۰۷). مناطق عمده کشت آن در ایران :کاشان، فارس، آذربایجان و کرمان هستند (یاسا و همکاران، ۲۰۰۹). تنوع، عبارت است از وجود تفاوت‌های قابل تمایز در بین افراد مختلف، که این تنوع لازمه و اساس انتخاب می‌باشد (نصیری و همکاران، ۲۰۰۹). برای پیمایش تنوع ژنتیکی در میان موجودات زنده، از نشانگر استفاده می شود که می‌تواند ماهیت مورفولوژیکی، بیوشیمیایی یا مولکولی

IrHC2019

داشته باشد. مزیت نشانگر مولکولی ژنومی در این است که تحت تاثیر عوامل محیطی قرار نمی‌گیرد و تعداد چندشکلی‌های بیشتری را آشکار می‌کند. در پژوهش حاضر، با علم به اینکه تکثیر این گل محمدی غیرجنسی بوده است، گوناگونی و ساختار ژنتیکی برخی توده‌های بومی این گیاه با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گل محمدی به صورت پاجوش از مناطق مختلف کاشان و همدان تهیه شد. کشت پاجوش‌ها در فروردین ۱۳۹۶ در محوطه گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. استخراج DNA به روش دویل و دویل (۱۹۸۷) و از نمونه‌های برگی تازه انجام گرفت. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA نمونه‌ها، از سه روش ۱- اسپکتروفتومتری ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۳- روش نانو دراپ استفاده شد. در این تحقیق از ۹ آغازگر ISSR و ۹ آغازگر RAPD استفاده شد. دمای بهینه‌ی اتصال آغازگرها به طور عملی و با تکرار آزمایشات برای هر پرایمر به روش گرادیانت مشخص شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از مستر آماده‌ی (Master Mix) تولید شده توسط شرکت آمپلیکان دانمارک استفاده گردید. بعد از امتیاز دهی به باندهای ایجاد شده از هر آغازگر، با استفاده از آزمون منتل (۱۹۶۷) و محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک، ماتریس تشابه جهت انجام تجزیه خوشه‌ای تهیه شد و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc-2.2 ترسیم گردید. جهت تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به جمعیت، مانند هوموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده, فاصله ژنتیکی بین گیاهان و توده‌ها و رسم دندروگرام براساس ضریب نی از نرم افزار POPGENE -1.31 استفاده شد. پارامترهای تنوع ژنتیکی شامل میزان مکان‌های ژنی چند شکل (NPL)، درصد مکان‌های ژنی چندشکل (PL%)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و تعداد آلل‌های موثر (Ne) در هر مکان ژنی, شاخص اطلاعاتی شانون (I) و شاخص تنوع ژنی نی (h) بود که در هر دو سطح گونه و توده محاسبه گردید.

تمایز ژنی بین توده‌ها با استفاده از تخمین هتروزیگوسیتی درون توده ها (Hs)، هتروزیگوسیتی کل (Ht) و ضرایب تمایز ژنی (Gst) و جریان ژنی (Nm) با استفاده از نرم افزار POPGENE-1.31 بررسی شد. در ضمن با کمک Ht و Hs شاخص Fst از طریق رابطه Fst = 1- Hs/Ht محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) نیز با استفاده از نرم افزار GEN ALEX-6.5 انجام شد. آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت در توده‌ها با نرم افزار STRUCTURE-2.3.3 و با استفاده از الگوریتم زنجیره‌ای مارکوو- مونت کارلو (MCMC) انجام شد.

نتایج و بحث

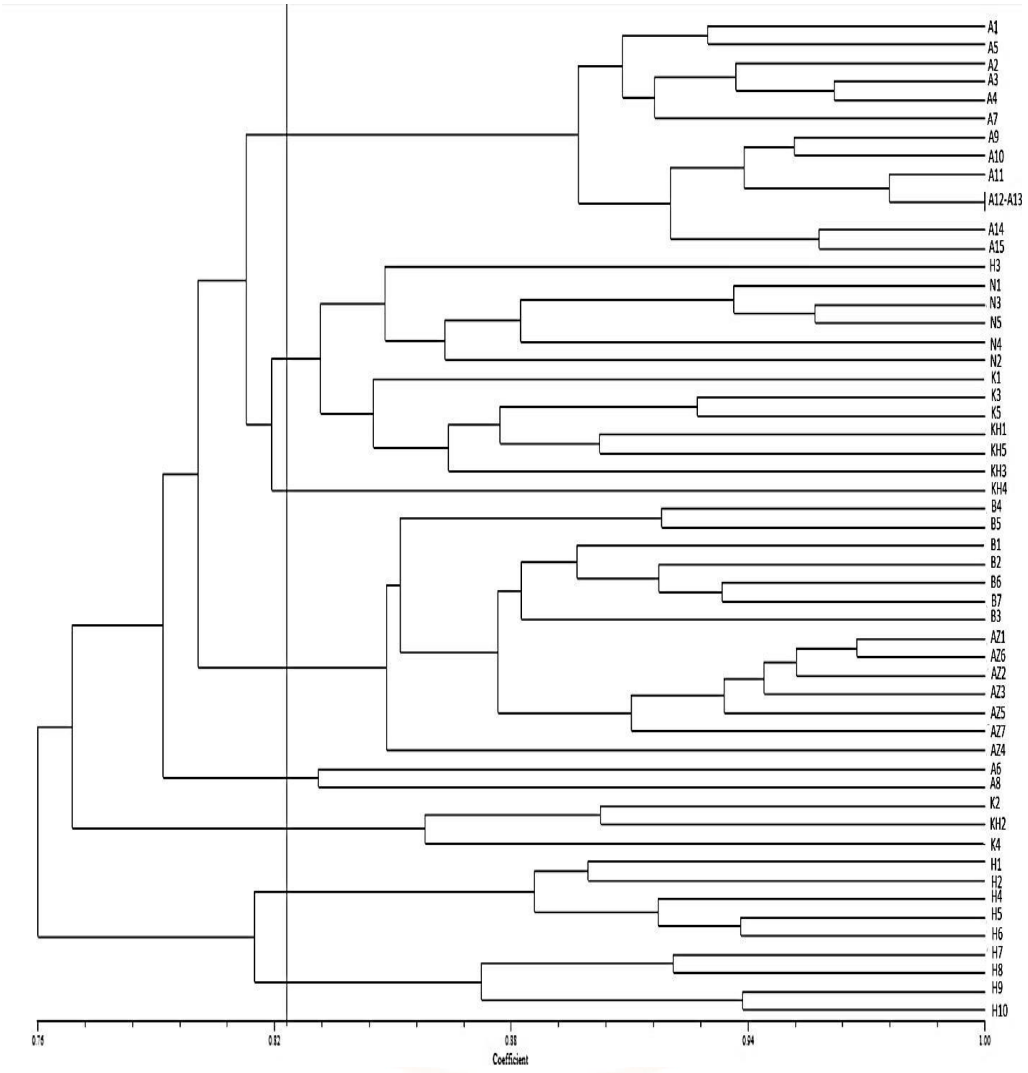
در این پژوهش، از ۹ آغازگر ISSR در مجموع ۷۷ باند ISSR تولید شد که از این تعداد ۶۱ باند (۷۹٪) چندشکلی نشان دادند. میانگین شاخص نشانگری (MI) و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای آغازگرهای ISSR در توده‌های مورد مطالعه به ترتیب برابر با ۱/۰۰۷و ۰/۱۷۳ به دست آمد و میانگین قدرت تفکیک این آغازگرها (۲/۸۱) بود. از ۹ آغازگر RAPD در مجموع ۸۱ باند تولید شد که ۵۴ باند (۶۶٪) چندشکلی نشان دادند. برای این نوع از نشانگرها نیز، میانگین شاخص نشانگری (MI) در توده‌های مورد مطالعه (۰/۷۷۰) به دست آمد و میانگین قدرت تفکیک این آغازگرها (۱/۶۶۳) بود.

ضریب همبستگی کوفنتیک حاصل از ماتریس تشابه جاکارد برابر با r=۰/۷۹ تعیین شد. بیشترین مقدار تشابه ژنتیکی نمونه های گیاهی براساس داده‌های نشانگری بین دو نمونه از توده آهسته (A12 و A13) با میزان ۱۰۰ درصد به دست آمد. و یک نمونه از توده کلپه (K4) با یک نمونه از ژنوتیپ آهسته (A3) با ۶۰ درصد ضریب تشابه، کمترین شباهت را به هم داشتند. در این تجزیه خوشه‌ای، توده‌ها براساس خط برش به ۸ گروه تقسیم شدند (شکل-۱).

در بین توده‌های گل محمدی، میانگین میزان مکان‌های ژنی (NPL)، میانگین درصد مکان‌های ژنی پلی مورف (PL%)، میزان تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، و تعداد آلل‌های موثر (Ne) در هر مکان ژنی به ترتیب ۴۴/۵۷, ۲۸/۲۱،

IrHC2019

۱/۲۷ و ۱/۱۷ محاسبه گردید. شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها با میانگین ۰/۱۴ و شاخص تنوع ژنی نی (h) با میانگین ۰/۰۹ محاسبه شدند، که توده آذران کمترین تنوع ژنتیکی و توده آهسته بیشترین تنوع ژنتیکی را در درون خود نشان دادند، در بین توده‌ها (در سطح گونه‌ای)، تعداد آلل‌های مشاهده شده ۱/۷۲، تعداد آلل‌های موثر در هر مکان ژنی ۱/۳۰، شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۲۹ و شاخص تنوع ژنی نی ۰/۱۸ به دست آمد.



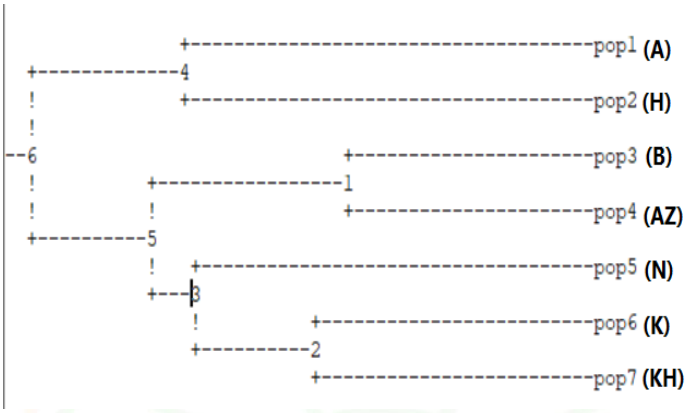
شکل «۱» دندروگرام حاصل از روش خوشه‌بندی UPGMA با ضریب تشابه جاکارد در توده‌های گل محمدی براساس داده‌های ISSR و RAPD

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها، تمایز ژنتیکی نسبتا پایینی را در بین نمونه‌های گیاهی نشان داد (Gst =۰/۱۱). تنوع ژنتیکی درون توده‌ها نیز نسبتا پایین بود، اما از تنوع ژنتیکی بین توده‌ها بیشتر بود (Hs =۰/۱۶) و تنوع ژنتیکی بین توده‌ها کمتر از تنوع ژنتیکی درون توده‌ها بود. میزان جریان ژنی (Nm) به دست آمده بین توده‌های گل محمدی مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR، ۳/۹۷ بود که نشان‌دهنده‌ی وجود یک تبادل ژنی نسبتا بالا بین توده‌های این گونه است. برای محاسبه تفرق ژنتیکی در بین جمعیت‌ها از شاخص Fst استفاده شد که مقدار آن ۰/۱۱ به دست آمد که سطح پایینی از تفرق ژنتیکی در بین توده‌های مورد مطالعه از این گیاه را نشان می‌دهد، این مقادیر در پژوهشی که توسط یانگ و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ۶ توده *Rosa laxa* با مارکرهای AFLP انجام شد برابر با Ht=۰/۲۸، Hs=۰/۱۹، Dst=۰/۰۹، Gst=۰/۳۲، Nm=۱/۰۴ بود. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ژنوتیپ‌ها نشان داد که ۵۹ درصد از تنوع

IrHC2019

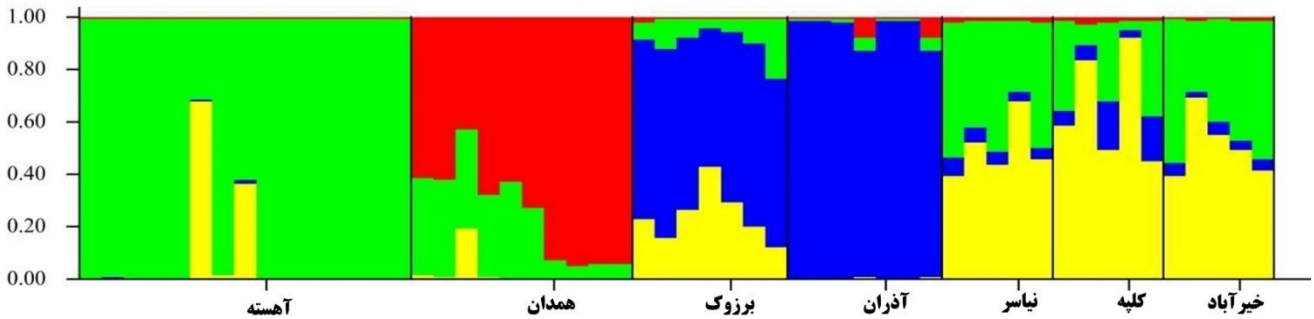
ژنتیکی شناسایی شده درون جمعیت‌ها بوده و ۴۱ درصد بین جمعیت‌ها می‌باشد که با نتایج کیانی و همکاران (۲۰۰۸) روی ۴۱ نمونه گل محمدی با استفاده از ۳۱ پرایمر RAPD مطابقت داشت.

میزان فواصل ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها توسط ماتریس فاصله براساس شاخص نی نشان داد که بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو توده آذران و برزوک (۰/۹۴۱) می‌باشد که نشان دهنده‌ی وجود جریان ژنی قوی بین این توده‌هاست. دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی براساس شاخص نی، هفت توده گل محمدی را به دو گروه مجزا تقسیم نمود که در گروه اول توده‌های همدان و آهسته قرار دارند و گروه دوم به ۳ زیرگروه تقسیم شد که در زیرگروه اول توده‌های برزوک و آذران در زیرگروه دوم توده نیاسر و در زیر گروه سوم توده‌های کلپه و خیرآباد قرار داشت (شکل-۲).



شکل «۲» دندروگرام گروه بندی ۷ توده گل محمدی به روش UPGMA بر اساس فواصل ژنتیکی نی

بررسی ساختار ژنتیکی توده‌های گل محمدی براساس داده‌های ISSR و RAPD و با استفاده از نرم افزار STRUCTURE و روش اوانو و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که بیشترین میزان Δk در مقابل تغییرات k در k=۴ به دست آمد (شکل ۳-۱). به عبارت دیگر چهار نوع ژنوتیپ در میان نمونه ها قابل تشخیص است که توده ها هرکدام از این ژنوتیپ ها سهم مشخصی دارند.



شکل«۳» آنالیز کلاستربندی براساس k=۴، تعداد زیر توده‌ها در ژوتیپ‌های گل محمدی (۵۴) فرد با استفاده از داده های ISSR و RAPD. هر توده در نمودار افقی مشخص شده است و گروه‌ها با چهار رنگ نمایش داده شده‌اند، توده آهسته (سبز)، توده همدان (قرمز)، توده برزوک آذران (آبی)، توده نیاسر (سبز و زرد)، توده کلپه (زرد) و توده خیرآباد (سبز و زرد)

منابع

Aghaoglu, Y.S., Ergül, A. and Baydar, N. 2017. Molecular Analysis of Genetic Diversity Oil Rose (Rosa Damascena Mill.) Grown Isparta (Turkey) Region. Biotechnology and Biotechnological Equipment.

Tabaei-Aghdaei, S.R., Hoosseini Monfared, H., Fahimi, H., Ebrahimzade, H., jebelly, M., Naghavi, M.R. and Babaei, A. 2006. Genetic variation analysis of different populations of Rosa damascena in Nw. Ian using RAPD markers. The Iranian Journal of Botany. 12 (2): 121-127. Tehran.

Loghmani-Khouzani, H., Sabzi Fini, O. and Safari, J. 2007. Essential Oil Composition of Rosadamascena Mill Cultivated in Central Iran. Scientia Iranica. pp: 316-319

Yassa, N., Masoomi, F., Rohani Rankouhi, S.E. and Hadjiakhoondi, A. 2009. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of Rosa damascena from Iran, Population of Guilan. PP: 175-180

Nassiri, M., Javanmard, A. andTohidi, R. 2009. Application of statistical procedures for analysis of genetic diversity in domestic animal populations. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 4.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leat tissue. Phytochemical bulletin. 19: 11-15.

Yang, S.H., Guo, N., Ge, w.y. and Ge, H. 2013. AFLP-Based Genetic Diversity among the Populations of Rosa laxa in Tianshan Mountains of Xinjiang, China. ISHS Acta Horticulturae.

Kiani,M., Zamani,Z. and Khalighi,A. 2008. "Wide genetic diversity of Rosa damascena Mill.germplasm in iran as revealed by RAPD analysis".Scientia Horticulturae. 115: 386-392

Study of genetic diversity and structure of some landraces of *Rosa damascena* using ISSR and RAPD markers

Fatemeh Abdali Varkaneh[1], Ali Azizi*[1], Mohammad Sayyari [1], Amir Hosein Keshtkar [2]
[1*] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
*Corresponding Author: azizi@basu.ac.ir

Abstract

Rosa damascena Mill. is an important rose species which contain essential oil. “Damask Rose” is one of the oldest medicinal and aromatic plants in the world. The propagation of this plant is non-sexual, however, because of the diversity in the early maternal shrubs, the question arises whether the cultivated landraces of Damask Rose in Iran are all clones? Or have genetic diversity?

In the present research, the genetic diversity and population structure of seven indigenous cultivated landraces of Damask Rose from Iran, including six landraces from Kashan province (Barzuk, Niasar, Azaran, Kolope, Kheirabad and Aheste) and one from Hamedan province (Bahar) were evaluated by ISSR (Inter simple sequence repeat) and RAPD (random amplified polymorphic DNA) molecular markers. A total of 54 single plants from the mentioned landraces were studied. Nine ISSR primers produced a total of 77 bands, of which 61 were polymorphic (%79). Nine RAPD markers produced 81 bands, of which 54 were polymorphic (%66). The plant samples were clustered into 8 main groups based on the Jaccard genetic similarity matrix and UPGMA method. POPGENE software was used to describe genetic variation within landraces according to Shannon's index (I) and Nei's gene diversity index (h). The highest and lowest genetic variations were observed in Hamedan (h = 0.13, I = 0.19) and Azaran (h = 0.07 and I = 0.10) landraces, respectively. The average observed number of alleles (Na) ratio to the effective number of alleles (Ne) was obtained to be 0.91 in the total landraces. GeneAlex and POPGENE softwares were used to analyze genetic diversity and molecular variance (AMOVA) among landraces. Genetic differentiation of landraces was relatively low (Gst=0.11). Genetic variation within the landraces was also found to be low (Hs=0.16). The gene flow (Nm) between landraces of Rosa damascena was shown to be 3.97. AMOVA analysis revealed 59% and 41% of the variation among and within landraces, respectively. STRUCTURE analysis showed that the Rosa damascena plants were distributed into 4 genetic clusters. Indices calculated in this research, indicate a low genetic diversity within the landraces, which was probably due to the non-sexual propagation of plant for many years.

***Keywords*:** Rose, Diversity, Molecular marker, Population structure

IrHC2019