Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# Evaluation of genetic diversity of *Freesia hybrida* genotypes using ISSR marker

**Zahra Arabi**

MSc student, Department of Agrobiotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. E-mail: za.arabi400@gmail.com

**Alaeddin Kordenaeej**

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Agrobiotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. E-mail: kordenaeej@shahed.ac.ir

**Mohammad Hossein Azimi**

*Corresponding author. Assistant Professor, Ornamental Plants Research Center (OPRC), Horticultural Sciences Research Institute (HSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, Iran. E-mail: m.h.azimi58@gmail.com

**Maryam Karimi Alavijeh**

Assistant Professor, Ornamental Plants Research Center (OPRC), Horticultural Sciences Research Institute (HSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, Iran. E-mail: mkarimia61@gmail.com

## *Abstract*

### Objective

The objective of present study was to evaluate the genetic diversity within 23 genotypes of *Freesia hybrida* including 6 parents and their 17 F1 hybrids, using 10 ISSR primers in order to utilize such diversity in breeding program of this plant.

### Materials and methods

After extraction of genomic DNA from fresh leaves and amplification of marker regions by the PCR, followed by the electrophoresis, a matrix of binary data was created based on scoring of electrophoretic bands. Marker parameters including number of polymorphic loci, polymorphism information content, effective multiple ratio, resolution power index, and marker index as well as genetic variation indices including observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's gene diversity index, and Shannon's information index were calculated by using the ISSR marker

data. Principle components analysis based on the Jaccard similarity coefficient with UPGMA algorithm were done followed by the cluster analysis using Dice coefficient and based on Ward's grouping method.

**Results**

Out of 110 amplified loci of the 10 ISSR markers, the mean of polymorphism percentage 94.7% within the used genotypes was estimated. Maker IS-HB11 showed maximum number of polymorphic loci (12), effective multiple ratio (7.93), resolution power index (7.83), and marker index (2.67) as well. Cluster analysis grouped genotypes into four clusters, which was confirmed by the result of principle component analysis.

**Conclusions**

Relative high value of the polymorphism information content (0.368), showed that the ISSR makers utilized in present study were genetically well informative regarding to the number of identified alleles and their distribution in the genome of Freesia. Based on the gene diversity indices, there was no significant difference between the parental genotypes and the F1 hybrids in terms of genetic variation. However, the level of this variation was acceptable and is capable to be utilized for breeding program in this plant.

**Keywords:** Cluster analysis, Gene diversity, Marker index, Principle component analysis

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Arabi Z, Kordenaeej A, Azimi MH, Karimi Alavijeh M (2022) Evaluation of genetic diversity of Freesia hybrida genotypes using ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 85-100.

*Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 85-100. DOI: 10.22103/jab.2022.17985.1330

Received: December 20, 2021. Accepted: January 17, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

@the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

# ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Freesia hybrida* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

**زهرا عربی**

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. رایانامه: za.arabi400@gmail.com

**علاءالدین کردنائیج**

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. رایانامه: kordenaeej@shahed.ac.ir

**محمد حسین عظیمی**

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران. رایانامه: m.h.azimi58@gmail.com

**مرم کریمی علویجه**

استاد، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران. رایانامه: mkarimia61@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰/۱۰/۲۷

## چکیده

**هدف:** هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳ ژنوتیپ گیاه زینتی فریزیا (*Freesia hybrida*) شامل شش ژنوتیپ والدینی و ۱۷ دورگ F1 حاصل از تلاقی آنها، با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR به منظور بهره‌برداری از این تنوع در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه بوده‌است.

**مواد و روش‌ها:** پس از استخراج DNA از برگ‌های تازه و تکثیر نواحی نشانگری در دستگاه PCR و تفکیک قطعات نشانگری بر روی ژل الکتروفورز، نوارها نمره‌دهی شدند و بر اساس ماتریس داده‌های صفر و یک، پارامترهای نشانگری شامل تعداد لوکوس‌های چند شکل، محتوای اطلاعات چندشکلی، نسبت چندگانه مؤثر، شاخص قدرت تفکیک، شاخص نشانگری و شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد مشاهده شده و تعداد مؤثر آلل‌ها، شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون مبتنی بر

داده‌های نشانگر ISSR محاسبه شدند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از از ضرایب دایس به روش گروه‌بندی وارد انجام شد.

**نتایج:** از مجموع ۱۱۰ مکان ژنی تکثیر یافته برای ۱۰ نشانگر ISSR، متوسط درصد چندشکلی برابر با ۹۴/۷ درصد در میان ژنوتیپ‌های تحت بررسی برآورد شد. نشانگر IS-HB11 بیشترین تعداد مکان ژنی چندشکل (۱۲)، نسبت چندگانه مؤثر (۷/۳۹)، شاخص قدرت تفکیک (۷/۸۳) و شاخص نشانگری (۲/۶۷) را به خود اختصاص داد. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تفکیک و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی درستی این گروه‌بندی را تأئید کرد.

**نتیجه‌گیری:** اندازه نسبتا بالای شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۳۶۸)، نشان داد که نشانگرهای به‌کار رفته در این پژوهش از اطلاعات ژنتیکی مناسب از لحاظ تعداد آلل‌های شناسایی شده و نیز توزیع فراوانی مناسب در ژنوم گیاه فریزیا برخوردار بوده و کارایی بالای خود را در تفکیک ژنوتیپ‌ها نشان دادند. همچنین بر اساس شاخص‌های تنوع ژنی برآورد شده، بین والدین و دورگ‌های حاصل از تلاقی آن‌ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. با وجود این، سطح تنوع ژنتیکی موجود قابل قبول بوده و می‌توان از این تنوع در برنامه‌های به‌نژادی فریزیا بهره‌برداری نمود.

**کلیدواژه‌ها:** تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنی، شاخص نشانگری.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** عربی زهرا، کردنائیج علاءالدین، عظیمی محمد حسین، کریمی علویجه مریم (۱۴۰۱) ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *Freesia hybrida* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۱)، ۱۰۰-۸۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

@the authors

## مقدمه

فریزیا گیاهی زینتی پایا از جنس فریزیا (*Freesia*) متشکل از ۱۱ گونه و متعلق به خانواده زنبقیان (*Iridaceae*) می‌باشد. اگرچه این گیاه بومی آفریقای جنوبی است اما نواحی با آب و هوای مدیترانه‌ای، بهترین مناطق برای کشت آن در هوای آزاد محسوب می‌شوند (Bryan, 2002). گونه‌های مختلف آن با عدد کروموزومی پایه X=۱۱ و به فرم‌های دیپلوئید (2x=22)، تریپلوئید (3x=33) و تتراپلوئید (4x=44) یافت می‌شوند (Anderson, 2007). در سال‌های اخیر، گونه شاخه بریده فریزیا (cut-freesia) با نام علمی *Freesia hybrida* به دلیل تنوع در رنگ گل، رایحه دل‌انگیز و عمر گلدانی طولانی طرفداران زیادی را در بین مردم و نیز پرورش‌دهندگان گل به خود جلب کرده است.

ارزش منابع ژنتیکی در گل‌ها و گیاهان زینتی همانند هر گیاه دیگر، نه تنها به تعداد گونه‌های در دسترس بلکه به تنوع ژنتیکی موجود در درون هر گونه نیز وابسته است. این تنوع به نوبه خود، می‌تواند بنیان ژنتیکی لازم را برای بهبود فرم، اندازه، رنگ، رایحه گل و سایر صفات مرتبط با بازارپسندی در این گیاهان فراهم کند. در مقایسه با گیاهان زراعی، تا کنون تنها در تعداد نسبتا معدودی از گونه‌های گیاهان زینتی، تنوع ژنتیکی در رویشگاه‌های طبیعی (in situ) و یا خارج از رویشگاه‌های طبیعی (ex situ) با تعداد محدودی از صفات، مورد ارزیابی قرار گرفته‌است (Watanabe and Watanabe, 2000). با وجود فقدان تنوع کافی در خزانه ژنی گیاهان زینتی که موفقیت برنامه‌های به‌نژادی برای این گیاهان را محدود کرده است، پیشرفت‌های سه دهه اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و ژنومیک که با توسعه نشانگرهای مولکولی همراه بوده است، زمینه مناسبی را برای جستجوی تنوعات ژنتیکی در خزانه ژنی گل‌ها و گیاهان زینتی و در نتیجه افزایش ظرفیت بهبود ژنتیکی آن‌ها فراهم نموده‌است (Debener, 2012). یکی از کارآمدترین ابزارهای زیستی برای جستجوی چنین تنوعاتی، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر توالی‌های DNA هستند که می‌توان آن‌ها را بر اساس چندشکلی[1] موجود میان توالی‌های نوکلئوتیدی در افراد مختلف یک گونه یا جمعیت زنده ارزیابی کرد (Nadeem et al. 2018).

نشانگر ISSR یکی از این نشانگرهاست که برای نخستین بار توسط زیتکویچ و همکاران به عنوان یک نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR و به منظور انگشت‌نگاری ژنوم ابداع شد (Zietkiewicz et al. 1994). آغازگرهای مورد استفاده برای این نشانگر با طول ۱۵ تا ۳۰ جفت نوکلئوتید، قابلیت تکثیر توالی‌های DNA در حد فاصل میان دو ناحیه ریز ماهواره[2] منحصر به‌فرد مشابه ولی غیر هم‌جهت را دارا هستند (Ng et al. 2015). اگرچه الگوی توارث این نشانگر از نوع غالب است (Tsumura et al. 1996) اما به‌خوبی می‌توان از آن برای توسعه نشانگرهای با الگوی توارث همبارز نیز بهره برد (Ng et al. 2015). مجموعه این ویژگی‌ها همراه با کاربری آسان (Zhang and Dai, 2010)، سطح بالای چندشکلی و قابلیت تکرارپذیری بالا (Reddy et al. 2002) سبب شده‌اند تا از این نشانگر به‌خوبی در مطالعات و تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی در گیاهان بهره برد.

کاربرد نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیکی در گل‌ها و گیاهان زینتی در زمینه‌های مختلف شامل شناسایی ارقام و گونه‌ها، ارزیابی تنوعات ژنتیکی و تنوعات سوماکلونال، بررسی روابط دودمانی (فیلوژنتیک)، توارث سیتوپلاسمی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی به حدود سه دهه پیش بر می‌گردد (Rout and Mohapatra, 2006) اما در یک بررسی کلی در می‌یابیم که با وجود چنین زمینه‌های متنوعی از مطالعات ژنتیکی، جنس فریزیا به‌ندرت مورد مطالعه قرار گرفته‌است. با وجود این، کاربرد و کارایی نشانگر ISSR در زمینه مطالعه تنوع ژنتیکی در برخی از گیاهان دارویی، زینتی و باغی از جمله در نسترن وحشی (Jamali et al. 2019)، زنبق (Attari et al. 2016)، رز وحشی (Talas Ogras et al. 2017) و شاه توت (Vijayan et al. 2005) مورد توجه قرار گرفته است. طرح تولید و معرفی ارقام جدید فریزیای شاخه بریده در پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی محلات با هدف اصلاح و

[1] . Polymorphism
[2] . Microsatellite

بهبود رنگ، رایحه و اندازه گل، مقاومت به بیماری‌ها و حشرات، افزایش ارتفاع بوته، کاستن دوره رشد و افزایش توان رشدی این گونه در شدت‌های نور پائین، از ۵ سال پیش آغاز شده است و در راستای این طرح، پژوهش حاضر، برای نخستین بار تنوع ژنتیکی مبتنی بر نشانگر مولکولی ISSR در میان مجموعه‌ای از والدین و فرزندان حاصل از یک برنامه تلاقی ژنتیکی در گونه *Freesia hybrida* را مورد ارزیابی قرار داده است.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این پژوهش متشکل از ۲۳ ژنوتیپ از گونه *Freesia hybrida* در قالب ۶ لاین والدینی و ۱۷ دورگ F1 حاصل از تلاقی آن‌ها بوده اند که از بانک ژن پژوهشکده گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات استان مرکزی فراهم شدند. هدف پژوهش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی موجود در میان والدین و دورگ‌های حاصل از آن‌ها و نیز بررسی کارایی نشانگرهای ISSR مورد استفاده در ارزیابی این تنوع بوده است. استخراج DNA از برگ‌های جوان ژنوتیپ‌های فریزیا به روشCTAB و با مختصر تغییراتی انجام شد (Doyle and Doyle 1990). ارزیابی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد. همچنین کیفیت DNA استخراج شده با انجام الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با حجم واکنش ۱۲ میکرولیتر انجام شد. اجزاء واکنش شامل ۶ میکرولیتر مسترمیکس، ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر و ۳ میکرولیتر آب مقطر سترون بوده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشته سازی چرخه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال نشانگر در دامنه دمایی ۴۶ تا ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تکثیر نواحی نشانگرهای ISSR از ۱۰ آغازگر استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

تفکیک قطعات تکثیر شده، بر روی ژل آگارز یک درصد به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۸۵ انجام شد. سپس نوارهای DNA در دستگاه ژل داک مشاهده و عکسبرداری شدند. تشخیص نوارهای حاصل از الکتروفورز و نمره‌دهی آن‌ها با استفاده از نرم افزار BioNumerics نسخه ۷/۵ همراه با پیمایش چشمی در صورت لزوم انجام شد. با توجه به الگوی توارث غالبیت در نشانگر ISSR، ظهور و عدم ظهور هر نوار به ترتیب با اعداد یک و صفر نمره دهی شد. نوارهای مبهم و داده‌های از دست رفته نیز بصورت نقطه(.) مشخص شدند. از ماتریس داده‌های صفر و یک (باینری[3]) برای برآورد پارامترهای نشانگری استفاده شد. پارامترهای نشانگری به تفکیک هر نشانگر شامل تعداد مکان‌های ژنی چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکلی[4] (Roldán-Ruiz et al. 2000;

[3]. Binary
[4]. Polymorphism information content: PIC

Soengas et al. 2006)، نسبت چندگانه مؤثر[5]، شاخص قدرت تفکیک نشانگر[6] و شاخص نشانگری[7] با استفاده از نرم افزار Powermarker نسخه ۳/۲۵ و برنامه آنلاین محاسبه‌گر کارایی نشانگر[8] برآورد شدند (https://irscope.shinyapps.io/iMEC/). شاخص‌های تنوع ژنتیکی مبتنی بر داده‌های نشانگر ISSR، شامل تعداد مشاهده شده آلل‌ها[9]، تعداد مؤثر آلل‌ها[10]، شاخص تنوع ژنی نی[11] (Nie, 1978) و شاخص اطلاعات شانون[12] (Lewontin, 1972) با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۱/۳۲ محاسبه شدند.

**جدول ۱. نشانگرهای ISSR مورد استفاده و مشخصات آن‌ها**

**Table 1. ISSR markers and their characteristics**

| Marker name | نام نشانگر | Primer sequence | توالی آغازگر | Tm(°C) | دمای اتصال (سانتیگراد) |
|---|---|---|---|---|---|
| IS-2 | | 5' TCGTCGTCGTCGTCGG 3' | | | 56.5 |
| IS-7 | | 5' AGAGAGAGAGAGAGAGC 3' | | | 51.9 |
| IS-8 | | 5' ACACACACACACACACYG 3' | | | 58.3 |
| IS-10 | | 5' CTCCTCCTCCTCRC 3' | | | 46.0 |
| IS-HB11 | | 5' GTGTGTGTGTGTTGTCC 3' | | | 49.7 |
| IS-CS17 | | 5' DBDBCACCACCACCACCAC 3' | | | 61.7 |
| IS-CS18 | | 5' DBDBCCACCACCACCACCA 3' | | | 60.0 |
| IS-CS77 | | 5' ACACACACACACACACT 3' | | | 52.2 |
| IS-836 | | 5' AGAGAGAGAGAGAGAGYA 3' | | | 46.6 |
| IS-903 | | 5' BDBCACCACCACCACCAC 3' | | | 62.0 |

D = A, T or G, B = T, C or G, Y= T or C

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضرایب دایس مبتنی بر ماتریس داده‌های صفر و یک و به روشگروه‌بندی وارد (Ward, 1963) با استفاده از نرم افزار NTSYS نسخه ۲،۰۲ و برنامه برخط ClustVis صورت گرفت (https://biit.cs.ut.ee/clustvis/).

## نتایج و بحث

نشانگر IS-HB11 با دوازده و نشانگر IS-2 با پنج لوکوس چند شکل، به ترتیب بیشترین و کمترین لوکوس‌های چندشکل را نشان داده‌اند. بیشترین اندازه محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۴۹۳) مربوط به نشانگر IS-8 و کمترین آن (۰/۳۷۰) مربوط به

5. Effective multiple ratio: EMR
6. Resolution power index: RP
7. Marker index: MI
8. Marker Efficiency Calculator: iMEC
9. Observed number of alleles: Na
10. Effective number of alleles: Ne
11. Nei's gene diversity index: H
12. Shannon's Information index: I

نشانگرهای IS-10 و IS-836 بوده است. از میان شاخص‌های مهم مربوط به کارایی نشانگر شامل نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص قدرت تفکیک (RP) و شاخص نشانگری (MI) بیشترین اندازه‌ها به ترتیب ۷/۳۹، ۷/۸۳ و ۲/۶۷ برای نشانگر IS-HB11 و کمترین نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص نشانگری (MI) به ترتیب با اندازه‌های ۲/۶۵ و ۰/۹۶ برای نشانگر IS-10 و کمترین شاخص قدرت تفکیک (RP) برابر با ۳/۵۷ برای نشانگر IS-2 برآورد شد.

**جدول ۲. شاخص‌های مرتبط با چند شکلی و کارایی نشانگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های فریزیا**

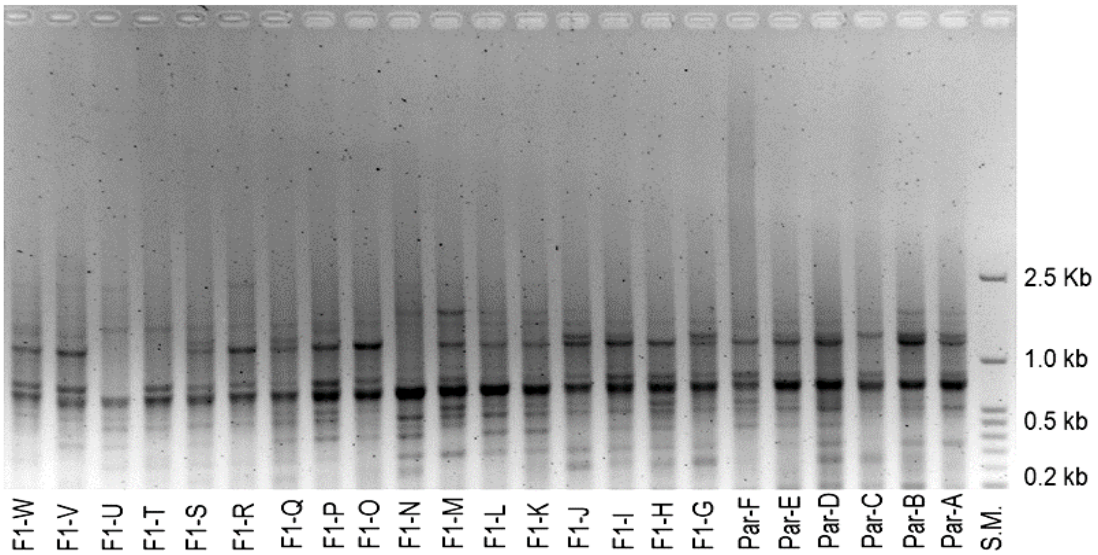
**Table 2. Indices related to polymorphism and efficiency of ISSR markers in *Freesia* genotypes**

| شاخص نشانگری(MI) Marker index | شاخص قدرت تفکیک (RP) Resolution power index | نسبت چندگانه موثر (EMR) Effective multiple ratio | محتوای اطلاعات چند شکلی(PIC) Polymorphism information content | تعداد لوکوس‌های چندشکل Number of polymorphic loci | نام نشانگر Marker name |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.09 | 2.78 | 3.01 | 0.376 | ٥ | IS-2 |
| 0.98 | 3.61 | 2.67 | 0.414 | ٧ | IS-7 |
| 1.23 | 4.26 | 3.30 | 0.493 | ٦ | IS-8 |
| 0.96 | 3.57 | 2.65 | 0.370 | ٦ | IS-10 |
| 1.58 | 6.17 | 4.22 | 0.392 | ٨ | IS-CS17 |
| 1.01 | 4.61 | 2.83 | 0.406 | ٨ | IS-CS18 |
| 1.33 | 3.91 | 3.65 | 0.378 | ٦ | IS-CS77 |
| 2.67 | 7.83 | 7.39 | 0.408 | ١٢ | IS-HB11 |
| 1.48 | 4.61 | 3.96 | 0.370 | ٨ | IS-836 |
| 2.12 | 6.35 | 5.74 | 0.373 | ١٠ | IS-903 |
| **1.45** | **4.77** | **3.94** | **0.368** | **7.6** | میانگین Mean |

ارزیابی تنوع ژنتیکی پیش زمینه مطالعه بنیان‌های ژنتیکی کنترل کننده ویژگی‌های مختلف افراد یک جمعیت و شناخت ساختار ژنتیکی آن می‌باشد (Ma, et al. 2008). نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است که آنالیز ژنتیکی ژنوتیپ‌های فریزیا شامل دورگ‌های F1 و والدین آن‌ها با استفاده از نشانگرهای ISSR با هدف کاوش تنوع ژنتیکی، موفقیت آمیز بوده است. برای مثال، درصد بالای چندشکلی به‌دست آمده در پژوهش حاضر (۹۴/۷ درصد) نشان داد که نشانگرهای به‌کار رفته توانستند تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های والدینی و فرزندی تحت بررسی را به‌خوبی نمایان سازند. ویژگی درصد بالای چندشکلی نشانگرهای ISSR در مطالعه Attari et al. 2016 در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های زنبق (۹۴/۴ درصد) ، Erfani et al. 2017 در ارزیابی روابط فیلوژنتیکی توده‌های مختلف ترشک (*Rumex* spp.) بومی ایران (۸۵/۳ درصد) و Ghanbari Hamedani et al. 2020 در مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی *Ephedra major* ایران (۷۱/۰ درصد) نیز گزارش شده است. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی میزان تنوعات ژنتیکی موجود در جمعیت‌های گیاهی می‌باشد ( Chesnokov and Artemyeva, 2015). این شاخص نشان می‌دهد که چگونه یک نشانگر می‌تواند اندازه چندشکلی را در یک جمعیت بر اساس تعداد و فراوانی‌های آللی نشان دهد (Botstein et al. 1980). برای نشانگرهای با الگوی توارث غالبیت همانند نشانگر ISSR،

بیشینه مقدار PIC برابر با ۰/۵ است البته به شرطی که توزیع آلل‌های نشانگرها در جمعیت برابر باشد. در پروهش حاضر، اندازه نسبتا بالای میانگین شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (۰/۳۹۷)، نشان داد که نشانگرهای به‌کار رفته از اطلاعات ژنتیکی مناسبی از لحاظ تعداد آلل‌های شناسایی شده و توزیع فراوانی مناسبشان در ژنوم گیاه فریزیا برخوردار بوده‌اند. به عبارت دیگر با توجه به مفهوم محتوای اطلاعات چندشکلی، نشانگرها میزان تنوع ژنی بالایی را در میان ژنوتیپ‌های تحت بررسی عرضه کردند.

کارایی بالای نشانگرهای ISSR مبتنی بر اندازه این شاخص در مطالعه Momeni et al. 2013 و Ghanbari Hamedani et al. 2020 نیز مورد تأکید قرار گرفته است. هم‌چنین نشانگرهای به کار رفته در پژوهش حاضر بر اساس شاخص قدرت تفکیک و شاخص نشانگری، توانایی تفکیک و تمایز مناسبی را میان ژنوتیپ‌ها نشان دادند. این دو شاخص، تابعی از توزیع و تعداد آلل‌های مؤثر درون یک جمعیت هستند (Kayis et al. 2010). یک نوار نشانگری به عنوان یک مکان ژنی، زمانی دارای قدرت تفکیک بالا میان ژنوتیپ‌هاست که دست کم در ۵۰ درصد از ژنوتیپ‌ها آشکار شود. به عبارت دیگر، قدرت تفکیک یک نشانگر زمانی افزایش می‌یابد که تعداد نوارهای الکتروفورتیک آن بیشتر باشد (Chesnokov and Artemyeva, 2015). در پژوهش حاضر، نشانگر IS-HB11 با برخورداری از بیشترین مکان ژنی چندشکل (۱۲) از بالاترین میزان شاخص قدرت تفکیک (۷/۸۳) و شاخص نشانگری (۲/۶۷) برخوردار بوده‌است (شکل ۱، جدول ۲). رابطه همبستگی معنی‌دار میان این دو شاخص مهم ( $r=0.91$, $\alpha= 0.01$) نیز حاکی از کارایی مناسب نشانگرهای به‌کار رفته در آزمایش برای آشکار کردن تفاوت‌های ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها می‌باشد.




**شکل ۱. الگوی نوارهای الکتروفورتیک نشانگر IS-HB11 در ژنوتیپ‌های فریزیا**

**Figure 1. Electrophoretic bands pattern of the IS-HB11 marker in *Freesia* genotypes**

نتایج ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی مبتنی بر داده‌های حاصل از الگوی الکتروفورتیک نشانگرهای ISSR به‌کار رفته در پژوهش حاضر، در جدول ۳ نشان داده شده است. حداکثر فراوانی آلل‌های مشاهده شده (Na) برای هر لوکوس نشانگری برابر با دو بوده است. بیشترین فراوانی آللی مؤثر (۱/۸۱) مربوط به نشانگر IS-CS17 و کمترین آن (۱/۴۸) مربوط به نشانگر IS-CS18 بوده است. بیشترین اندازه شاخص تنوع ژنی نی (۰/۴۴۵) و شاخص اطلاعات شانون (۰/۶۳۶) برای نشانگر IS-CS17 و کمترین اندازه‌های این دو شاخص (۰/۳۱۶ و ۰/۴۹۱) برای نشانگر IS-CS18 برآورد شدند.

در ارزیابی تنوع ژنتیکی با کمک نشانگرهای ISSR به دلیل برخورداری از الگوی توارث غالبیت، شاخص تنوع ژنی نی به عنوان جایگزین مناسبی برای شاخص میزان ناخالصی (هتروزیگوسیتی) می‌باشد (Nie, 1978). اندازه نسبتا بالای این شاخص (با میانگین کل ۰/۳۹۰) در این پژوهش- به عنوان اندازه متوسط تنوع ژنتیکی در هر لوکوس نشانگری- سطح مناسب تنوع ژنتیکی را در بین ژنوتیپ‌های فریزیا نشان داده است. این اندازه، تابعی از تعداد لوکوس‌ها و تعداد مؤثر آلل‌ها در هر لوکوس می‌باشد.

**جدول ۳. شاخص‌های تنوع ژنتیکی مبتنی بر داده‌های نشانگرهای ISSR در ژنوتیپ های فریزیا**

**Table 3. Genetic diversity indices based on ISSR markers data in *Freesia* genotypes**

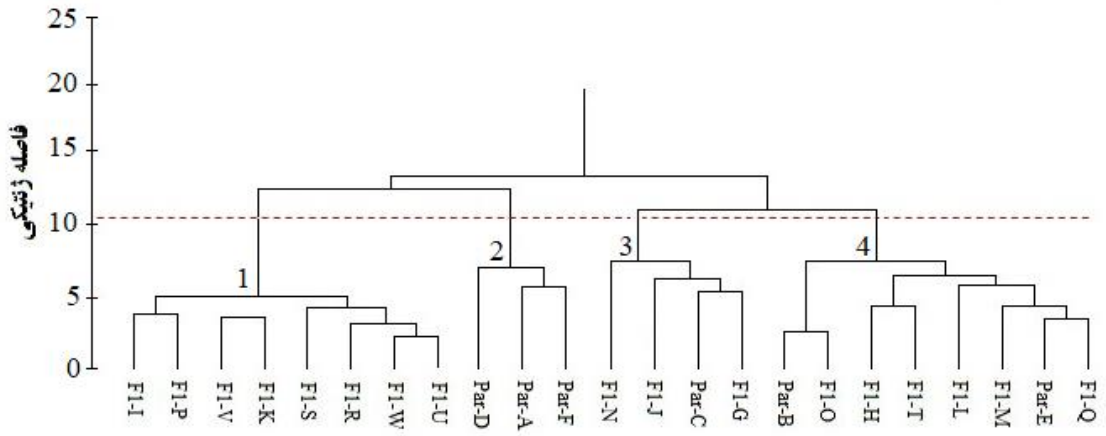
| شاخص اطلاعات شانون (**I**) **Shannon's Information index** | | شاخص تنوع ژنی نی (**H**) **Nei's gene diversity index** | | تعداد مؤثر آلل‌ها (**Ne**) **Effective number of alleles** | | تعداد مشاهده شده آلل‌ها (**Na**) **Observed number of alleles** | | نام نشانگر **Marker Name** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| دورگ‌ها | والدین | دورگ‌ها | والدین | دورگ‌ها | والدین | دورگ‌ها | والدین | |
| 0.557 | 0.640 | 0.381 | 0.449 | 1.69 | 1.82 | 2.0 | | IS-2 |
| 0.553 | 0.564 | 0.373 | 0.386 | 1.64 | 1.69 | 2.0 | | IS-7 |
| 0.588 | 0.662 | 0.405 | 0.470 | 1.74 | 1.89 | 2.0 | | IS-8 |
| 0.519 | 0.392 | 0.341 | 0.241 | 1.55 | 1.38 | 2.0 | | IS-10 |
| 0.589 | 0.611 | 0.401 | 0.422 | 1.69 | 1.76 | 2.0 | | IS-CS17 |
| 0.475 | 0.495 | 0.306 | 0.322 | 1.47 | 1.50 | 2.0 | | IS-CS18 |
| 0.600 | 0.560 | 0.413 | 0.375 | 1.74 | 1.62 | 2.0 | | IS-CS77 |
| 0.600 | 0.610 | 0.414 | 0.421 | 1.75 | 1.75 | 2.0 | | IS-HB11 |
| 0.563 | 0.661 | 0.379 | 0.468 | 1.64 | 1.88 | 2.0 | | IS-836 |
| 0.574 | 0.679 | 0.388 | 0.486 | 1.66 | 1.94 | 2.0 | | IS-903 |
| **0.559** | **0.583** | **0.379** | **0.400** | **1.66** | **1.71** | **2.0** | | میانگین Mean |
| **۰,۵۷۱** | | **0.390** | | **1.68** | | **2.0** | | میانگین کل Grand mean |

با توجه به نزدیک بودن میانگین تعداد مؤثر آلل‌ها (۱/۶۸) به تعداد مشاهده شده آلل‌ها (۲/۰)، اندازه نسبتا بالای شاخص تنوع ژنی نی قابل توجیه است. رابطه همبستگی معنی‌دار میان این دو شاخص ($r=0.998, \alpha= 0.01$) نیز مؤید این موضوع می‌باشد. علاوه بر آن، اندازه متوسط شاخص اطلاعات شانون (۰/۵۷۱) و همبستگی بالای آن با شاخص تنوع ژنی نی ($r=0.968, \alpha= 0.01$) بر وجود سطح مناسبی از تنوعات ژنی در میان ژنوتیپ‌های تحت بررسی تأکید دارد، اگرچه شاخص اطلاعات شانون به اندازه نمونه حساس است (Konopiński, 2020). مقایسه سطح تنوعات ژنی بر مبنای شاخص‌های مورد اشاره نشان داد که این تنوعات

با اختلافات اندک بین والدین و دورگ‌های F1 آن‌ها به هم نزدیک هستند (جدول ۳). مقایسات دو به دوی میانگین سه شاخص به روش آزمون تی- استیودنت نیز نشان داد که اختلاف ژنوتیپ‌های والدینی و دورگ‌های F1 آن‌ها از نظر شاخص‌های تنوع ژنی معنی دار نبوده است.

**تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های فریزیا بر اساس داده‌های نشانگر ISSR:** تجزیه خوشه‌ای ، ۲۳ ژنوتیپ فریزیا را به چهار گروه (خوشه) به شرح زیر دسته‌بندی کرد (شکل ۲):

گروه اول شامل دورگ‌های F1-I، F1-K، F1-P، F1-R، F1-S، F1-U، F1-V و F1-W، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های والدینی Parent-A، Parent-D و Parent-F، گروه سوم شامل دورگ‌های F1-G، F1-J، F1-N، همراه با ژنوتیپ والدینی Parent-C و گروه چهارم شامل دورگ‌های F1-H، F1-L، F1-M، F1-O، F1-T همراه با ژنوتیپ‌های والدینی Parent-B و Parent-E.

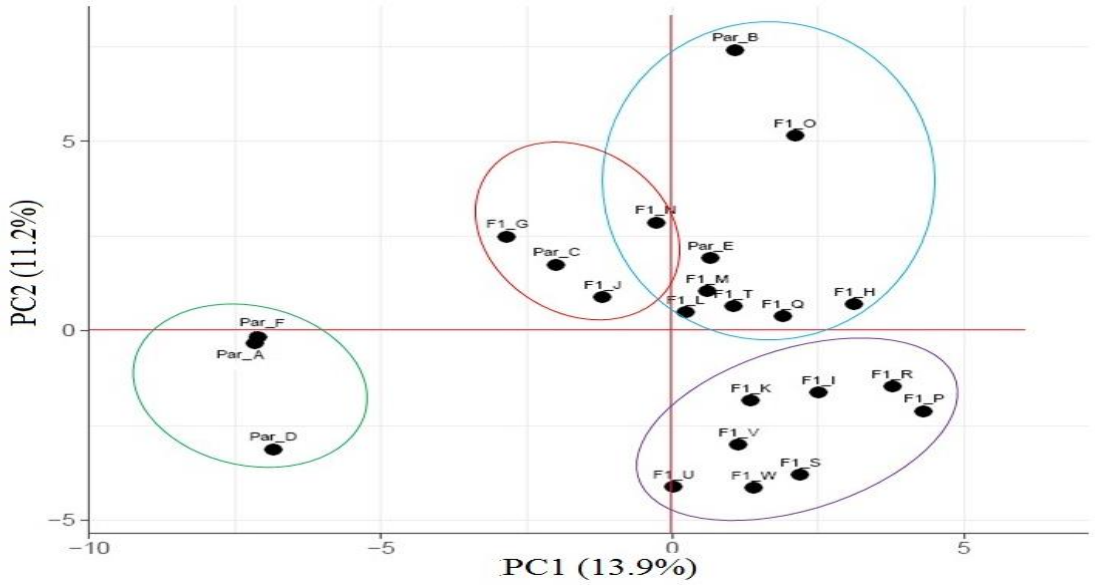



**شکل 2. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های فریزیا بر اساس داده‌های نشانگر ISSR**

**Figure 2. Dendrogram of cluster analysis of *Freesia* genotypes based on the ISSR marker data**

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مبتنی بر داده‌های نشاگر ISSR، با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه خوشه ای همخوانی بالایی را نشان داد. دو مؤلفه اول و دوم با مقادیر ویژهٔ بالاتر از یک، در مجموع ۳۲/۳ درصد از واریانس موجود میان ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند (شکل۳). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روش مناسبی برای راستی‌آزمایی و برآورد تعداد خوشه‌های واقعی در گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به‌شمار می‌رود. در مورد داده‌های مولکولی نظیر داده‌های نشانگری، دو یا سه مؤلفه اول، حداکثر ۱۰ تا ۳۰ درصد از تغییرات اولیه نشانگرها را توجیه می‌کنند. از نقطه نظر ژنتیکی این واقعیت نشان دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها و توزیع مناسب آن‌ها در ژنوم می‌باشد (Mohammadi et al. 2006). قرار گرفتن برخی از والدین همراه با برخی از دورگ‌ها در یک خوشه مشترک (خوشه‌های ۳ و ۴) به دلیل آن است که این دورگ‌ها از تلاقی آن والدین حاصل شده‌اند. هم چنین قرار گرفتن چند والد در یک خوشه (خوشه ۲) یا قرار گرفتن چند دورگ در یک خوشه (خوشه ۱)، نشان از آن دارد که با توجه به توزیع مکان‌های آللی

نشانگرهای به‌کار رفته، این ژنوتیپ‌ها به هم نزدیک‌تر بوده‌اند. از طرف دیگر نزدیک بودن دورگ‌های هم خوشه (هم‌گروه) به یکدیگر را می توان به این موضوع ربط داد که در دورگ‌های F1 به دلیل ناخالص بودن مکان‌های آللی، تظاهر مکان‌های آللی مغلوب عملا پوشیده مانده و توزیع مکان‌های غالب در ژنوم است که تعیین کننده سطح تنوع ژنتیکی می‌باشد. به همین دلیل ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ناخالص با کمک نشانگرهای بارزی مانند ISSR مقداری اریبی دارد. اگرچه همان‌طوری که گفته شد، اندازه بالای شاخص تنوع ژنی نی به عنوان جایگزین مناسبی برای شاخص میزان ناخالصی (هتروزیگوسیتی) در وضعیتی که افراد ناخالص هم در حال ارزیابی شدن هستند، تا حدود زیادی این نقیصه را برطرف کرده است.




**شکل۳. نمودار بای پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های فریزیا بر اساس داده‌های نشانگر ISSR**

**Figuare 3. Biplot diagram of PCA for the *Freesia* genotypes based on the ISSR marker data**

**نتیجه‌گیری:** پژوهش حاضر نخستین گزارش در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه زینتی فریزیا (*Freesia hybrida*) با استفاده از نشانگر ISSR می‌باشد. در صد بالای چند شکلی، نشان داد که می‌توان تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های دور و نزدیک این گیاه را با کمک این نشانگر نمایان کرد. اندازه نسبتا بالای میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی نشان داد که نشانگرهای به‌کار رفته از اطلاعات ژنتیکی مناسبی از لحاظ تعداد آلل‌های شناسایی شده و توزیع فراوانی مناسبشان در ژنوم گیاه فریزیا برخوردار بوده‌اند. از میان ده نشانگر چندشکل به‌کار رفته، نشانگر IS-HB11 با برخورداری از بیشترین اندازه‌ها برای شاخص‌های نشانگری مانند محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نسبت چندگانه مؤثر، شاخص قدرت تفکیک و شاخص نشانگری از یک طرف و نیز اندازه‌های نزدیک به بیشینه برای شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل شاخص‌های نی و شانون، به عنوان کارامدترین نشانگر در ارزیابی تنوعات ژنتیکی فریزیا در این پژوهش معرفی می‌شود. همچنین با وجودی که سطح تنوع ژنتیکی میان والدین و دورگ‌های آن‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، اما این سطح از تنوع موجود با توجه به اندازه‌های شاخص‌های

تنوع ژنی مبتنی بر توزیع مکان‌های آللی نشـــانگرهای به‌کار رفته، قابل قبول اســـت و می‌توان از آن در ادامه برنامه‌های به‌نژادی فریزیا بهره‌برداری نمود. اگرچه برای خلق یا جستجوی تنوع ژنتیکی، نسل F2 به دلیل برخورداری از رخدادهای نوترکیبی از سطح تنوع بیشتری نسبت به نسل F1 برخوردار است، اما از آنجایی‌که دورگ‌های به‌کار رفته در این پژوهش از ترکیبات والدینی متفاوت حا صل شده اند، بنابراین سطح تنوع در میان دورگ‌ها هم قابل قبول بوده ا ست که اندازه بالای شاخص‌های تنوع ژنی مؤید این موضوع می‌باشد.

**سپا سگزاری:** از معاونت محترم پژوه شی دان شگاه شاهد به خاطر حمایت مالی و نیز پژوه شکده گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات به خاطر حمایت‌های فنی و همکاری در اجرای عملی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

عطاری سیده زینب، شور محمود، قربانزاده نقاب محمود، تهرانی فر علی، ملک زاده شفارودی سعید (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های زنبق (*Iris* spp) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. نشریه علوم باغبانی ۳۰، ۳۷۶- ۳۸۲.

عرفانی ملیحه، محب الدینی مهدی، قنبری علیرضا، صباغ نیا ناصر (۱۳۹۷) ارزیابی روابط فیلوژنتیکی توده‌های مختلف ترشک (*Rumex* spp.) بومی ایران با استفاده از نشانگر ISSR، صفت‌های ریخت شناسی و بررسی ساختار روزنه‌ای آن‌ها. تاکسونومی و بیوسیستماتیک ۳۴، ۷-۱۸.

قنبری همدانی سمیه، عصری یونس، مهرگان ایرج (۱۳۹۹) مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی *Ephedra major* در ایران. رستنی‌ها ۲۱(۲)، ۲۳۱-۲۴۷.

محمدی سید ابوالقاسم (۱۳۸۵) تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی. نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۵ شهریور ۱۳۸۵، تهران، ایران.

مؤمنی حسن، شیران بهروز، خدامباشی محمود، چغامیرزایی کیانوش (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) در منطقه زاگرس ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی. فصلنامه علوم باغبانی ایران ۴۴(۱)، ۶۱-۷۲.

Anderson NO (2007) Flower breeding and genetics. Springer, the Netherlands, 848 pages.

Attari SZ, Shoor M, Ghorbanzadeh Neghab M, et al. (2016) Evaluation of genetic diversity of Iris genotypes (Iris spp) using ISSR. Hortic Sci 30(3), 376- 382 (In Persian).

Botstein D, White RL, Skalnick MH, Davies RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am J Human Genet 32, 314-331.

Bryan JE (2002) Bulbs. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 524 pages.

Chesnokov YV, Artemyeva AM (2015) Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. Agric Biol 50(5), 571-578.

Debener T (2012) Molecular markers for ornamental plant genetics, genomics and breeding. Acta Hortic 953, 193-200.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12(1), 12-15.

Erfani M, Mohebodini M, Ghanbari A, Sabbaghnia N (2017) Investigating phylogenetic relationships in Iranian Docke ecotypes (*Rumex* spp.) using ISSR markers, morphological features, and their stomata structure. Taxon Biosyst 34, 7-18 (In Persian).

Ghanbari Hamedani S, Asri Y, Mehregan I (2020) Genetic diversity and population structure of Iranian *Ephedra major*. Rostaniha 21(2), 231–247 (In Persian).

Jamali M, Ghanbari A, Estaji A et al. (2019) Genetic diversity of dog rose (Rosa canina L.) using ISSR markers. Iran J Genet Plant Breed 8, 1-8.

Kayis SA, Hakki EE, Pinarkara E (2010) Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. Afr J Agric Res 5(21), 2925-2933.

Konopiński MK (2020) Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. Peer J 8, e9391.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. Evol Biol 6, 381–398.

Ma X, Zhang XQ, Zhou YH et al. (2008) Assessing genetic diversity of *Elymus sibiricus* (Poaceae: Triticeae) populations from Qinghai-Tibet Plateau by ISSR markers. Biochem Sys Ecol 36(7), 514-522.

Mohammadi SA (2006) Analysis of molecular data from the perspective of genetic diversity evaluation, Proc. of 9th Iranian congress of agricultural sciences and plant breeding, Aug. 27, 2006. Tehran, Iran (In Persian).

Momeni H, Shiran B, Khodambashi M, Choghamirzaie, K (2013) Evaluation of genetic diversity of *Fritillaria imperialis* L. populations in zagros region of Iran using ISSR markers. Hortic Sci 44 (1), 61- 72 (In Persian).

Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ et al. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. Biotechnol Biotechnol Equip 32, 261-285.

Ng W, Tan SG (2015) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? ASM Sci J 9,30–39.

Nie M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89, 583–90.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128(1), 9-17.

Roldán-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E et al. (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Mol Breed 6, 125–134.

Rout GR and Mohapatra A (2006) Use of molecular markers in ornamental plants: A critical reappraisal. Eur J Hortic Sci 71(2), 53-68.

Soengas P, Velasco P, Padilla G et al. (2006) Genetic relationships among *Brassica napus* crops based on SSR markers. Hort Science 41(5), 1195-1199.

Talas Ogras T, Koban E, Metin K et al. (2017) Assessment of genetic diversity of rose genotypes using ISSR markers. Turk J Botany 41(4), 347-355

Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor Appl Genet 92(1), 40–45.

Vijayan K (2005) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. Int J Ind Entomol 10(2), 79-86.

Ward JH (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. J Am Stat Assoc 58, 236–244.

Watanabe KN, Watanabe JA (2000) Genetic diversity and molecular genetics of ornamental plant species. Biotechnol Biotechnol Equip 14(2), 19-2.

Zhang LJ, Dai SL 2010 Genetic variation within and among populations of *Orychophragmus violaceus* (Cruciferae) in China as detected by ISSR analysis. Genet Resour Crop Evol 57(1), 55-64.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20 (2), 176–183.