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

DNA fingerprinting in ecotypes of three marshmallow species using ISSR molecular marker

Amin Arjmand

PhD Student, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail address: amin.arjmand@ut.ac.ir

Mohsen Ebrahimi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail address: mebrahimi@ut.ac.ir

Abstract

Objective

Marshmallow is a medicinal plant from the Malvaceae family and belongs to the Althaea genus. Knowledge of genetic diversity is the basis of plant breeding and various aspects such as selection of cross parents, protection of germplasm and prevention of genetic erosion are important. The purpose of this research is to evaluate the genetic diversity and investigate the genetic relationships in the native ecotypes of marigold in Iran in order to be used in breeding projects and to protect the genetic reserves of this plant.

Materials and methods

In this research, after extracting DNA from young leaves by CTAB method, the molecular diversity of 18 ecotypes of three species of marshmallow bud was investigated using 10 ISSR primers.

Results

The total number of bands formed by the primers studied in this research varied between 11 and 23 for each primer and its average was 17.10. The number of polymorphic bands in this research for the primers was at least 7 and at most 21 bands. In this research, the PIC ranged between 0.19 and 0.42 and its average was 0.29. The highest PIC was related to the ISSR2 marker and the lowest PIC was related to the ISSR4 marker. Cluster analysis showed that at the similarity level

of 65%, the ecotypes related to each species were in one group and the ecotypes related to different species were placed in separate groups, so that the ecotypes of Qazvin, Taft, Yazd, Sari, Kerman and Shiraz which All of them belonged to the Althaea Rosea species and were placed in one group. In the second group, the ecotypes belonging to the Althaea Ficifolia species, which included Behshahr, Gorgan, Bam, Rafsanjan, Hamadan and Mashhad, were placed. In the third group, the ecotypes of Althaea Officinalis, which included the ecotypes of Beshrouye, Kermanshah, Isfahan, Jiroft, Faryab and Bushehr, were included.The results of molecular variance analysis showed that 28% of the variation is within the species and 72% of the variation is among the studied species. The results of analysis to main coordinates also confirmed the results of cluster analysis.

Conclusions

According to the obtained results, the ISSR marker and the primers investigated in this experiment have the necessary efficiency to distinguish the ecotypes and the species of khatami flowers, and on the other hand, due to the genetic diversity of the ecotypes studied in this experiment, it can be The title of the parents was used in the breeding projects of this plant, and in order to preserve the germplasm and prevent genetic erosion, it is suggested to keep the ecotypes studied in this research in plant gene banks.

Keywords: cluster analysis, Genetic similarity, PIC.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Arjmand A, Ebrahimi M (2023) DNA fingerprinting in ecotypes of three marshmallow species using ISSR molecular marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 87-104.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (4), 87-104. DOI: 10.22103/jab.2023.22156.1511

Received: August 16, 2023. Received in revised form: October 10, 2023.

Accepted: October 11, 2023. Published online: December 30, 2023.

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

انگشت‌نگاری DNA در اکوتیپ‌های سه گونه گل‌ختمی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

امین ارجمند

دانشـــجوی دکتری، گروه زرا عت و اصـــلاح:با تات، دانشـــ کده کشـــاورزی، دانشـــ گاه تهران، تهران، ایران. را یا نا مه: amin.arjmand@ut.ac.ir

محسن ابراهیمی

*نویســـنده مســـئول: دانشـــیار، گروه علوم زراعی و اصـــلاح‌نباتات، دانشـــکده کشـــاورزی، دانشـــگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: mebrahimi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹

چکیده

هدف: گل‌ختمی گیاهی دارویی از خانواده پنیرک *(Malvaceae)* و متعلق به جنس *Althaea* می‌باشـد. آگاهی از تنوع‌ژنتیکی اساس به‌نژادی‌گیاهی ا ست و از جنبه‌های مختلف مانند انتخاب والدین تلاقی، حفاظت از ژرم‌پلا سم و جلوگیری از فر سایش‌ژنتیکی دارای اهمیت ا ست. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی تنوع‌ژنتیکی و برر سی روابط‌ژنتیکی در اکوتیپ‌های بومی گل‌ختمی ایران به منظور استفاده در پروژه‌های به‌نژادی و حفاظت از ذخایرژنتیکی این گیاه بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق پس از اسـتخراج DNA از برگ‌های جوان به روش CTAB، تنوع مولکولی ۱۸ اکوتیپ از سـه گونه گل‌ختمی (*Althaea sp.*) با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: میزان تعداد کل نوارهای تشکیل شده توسط آغازگرهای مورد مطالعه بین ۱۱ تا ۲۳ برای هر آغازگر متغیر و میانگین آن نیز ۱۷/۱۰ بود. تعداد نوارهای چندشـــکل در این تحقیق برای آغازگرها حداقل ۷ و حداکثر ۲۱ نوار به‌دســـت آمد.در این تحقیق میزان PICبین ۰/۱۹ و ۰/۴۲ متغیر بود و میانگین آن نیز ۰/۲۹ به‌د ست آمد. بی‌شترین PIC مربوط به آغازگر ISSR2و کمترین PIC نیز مربوط به آغازگر ISSR4بود. تجزیه‌خو شه‌ای ن شان داد که در سطح ت شابه ۶۵ در صد اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه در یک گروه و اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های متفاوت در گروه‌های مجزا قرار گرفت، به طوریکه اکوتویپ‌های قزوین، تفت، یزد، ســـاری، کرمان و شـیراز که همگی متعلق به گونه *Althaea Rosea* بودند در یک گروه قرار گرفتند. در گروه دوم اکوتویپ‌های متعلق به گونه *Althaea Ficifolia* که شـامل بهشـهر، گرگان، بم، رفسـنجان، همدان و مشـهد بودند قرار گرفت . در گروه سـوم نیز

اکوتیپ‌های گونه *Althaea Officinalis* که شامل اکوتیپ‌های بشروئیه، کرمانشاه، اصفهان، جیرفت، فاریاب و بوشهر قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۲۸ درصد از تنوع مربوط به درون گونه‌ها و ۷۲ درصد از تنوع مربوط به بین گونه‌های مورد مطالعه بود. نتایج تجزیه به مختصات‌اصلی نیز نتایج حاصل از تجزیه‌خوشه‌ای را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده نشانگر ISSR و آغازگرهای مورد بررسی در این آزمایش کارایی لازم را جهت تمایز اکوتیپ و گونه‌های گل‌ختمی را دارا بودند و از طرفی با توجه به وجود تنوع‌ژنتیکی از اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این آزمایش می‌توان به عنوان والدین در پروژه‌های به‌نژادی این گیاه استفاده کرد و به منظور حفظ ژرم‌پلاسم و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی، نگهداری اکوتویپ های مورد مطالعه در این تحقیق در بانک های ژن گیاهی پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: تجزیه خوشه‌ای، تشابه‌ژنتیکی، PIC.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ارجمند امین، ابراهیمی محسن (۱۴۰۲) انگشت‌نگاری DNA در اکوتیپ‌های سه گونه گل‌ختمی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۴)، ۸۷-۱۰۴.

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

© the authors

مقدمه

از زمان‌های بسیار قدیم انسان‌ها گیاهان با ترکیبات کاربردی را از طبیعت جمع‌آوری کرده و از آن‌ها برای اهداف دارویی استفاده می‌کردند، در واقع می‌توان گفت در فرهنگ‌های مختلف درمان‌گران سنتی دانش خواص درمانی و شیوه‌های کاربرد گیاهان دارویی را نسل به نسل منتقل کرده‌اند . در سال‌های اخیر به دلیل افزایش تقاضا در حوزه گیاهان دارویی و از طرفی آگاهی از اهمیت بالای گیاهان در علم پزشکی، توجه به گیاهان دارویی روند رو به رشدی داشته است (Faehnrich et al. 2021). هدف از اصلاح گیاهان دارویی افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی، غذایی و عطر سازی اهمیت خاصی دارند. اما در این راه مراحل بسیاری وجود دارند که اولین و مهم‌ترین آن‌ها جمع‌آوری ذخایرژنتیکی مورد نظر، حفظ و نگهداری کلکسیون و تعیین خصوصیات و تنوع‌ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده می‌باشد و با توجه به اینکه در بسیاری از گیاهان دارویی تا کنون گزینش‌های اولیه نیز صورت نگرفته است، انتظار می‌رود که در بین و درون گونه‌های این گیاهان تنوع بالایی وجود داشته باشد (Zhong et al. 2022).

گل‌ختمی گیاهی دارویی از خانواده پنیرک *(Malvaceae)* و متعلق به جنس *Althaea* می‌باشد. اندام‌های مختلف گل ختمی شامل برگ، گل و ریشه در صنایع دارویی کاربرد فراوان دارند (Fahamiya et al. 2016). استفاده از گیاهان خانواده *Malvaceae* برای درمان گیاهی در خاورمیانه از گذشته تا به حال رواج داشته است. از جمله این گیاهان می‌توان *Althaea Officinalis* ، *Althaea Rosea* و *Althaea Ficifolia* را نام برد که بومی آسیا، اروپا و جنوب آمریکا می باشند (Arjmand et al. 2023). این گونه‌ها با یکدیگر تلاقی‌پذیر هستند و نتاج کاملا بارور تولید می‌کنند، بنابراین از قابلیت هتروزیس در آن‌ها می‌توان استفاده کرد (Uzunhisarcikli and Vural 2012). از ریشه گونه *Althaea Officinalis* در طب سنتی به منظور درمان بیماری های گوارشی استفاده می‌شود (Sendker et al. 2017). اثرات آنتی اکسیدانی، ضدتب، ضد التهابی و ضد سرفه *Althaea Officinalis* نیز به اثبات رسیده است (Res et al. 2021). عصاره گل‌ختمی در درمان بیماری‌های پوستی موثر است (Kianitalaei et al. 2019).

گونه Althaea Rosea نیز دارای کاربرد دارویی است و ریشه‌های آن دارای موسیلاژ بالایی هستند که باعث خاصیت نرم‌کنندگی، ضدتب و ضدالتهابی این گیاه می‌شوند (Nazeem et al. 2017). گونه *Althaea Ficifolia* نیز با وجود خاصیت دارویی، بیشتر به عنوان گیاه زینتی شناخته می‌شود (Bibalani 2011). آگاهی از میزان تنوع‌ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی در به‌نژادی‌گیاهی از اهمیت ویژه و بالایی برخوردار است . شناخت دقیق میزان تنوع‌ژنتیکی واقعی موجود و پتانسیل به‌نژادی در گزینش و ایجاد ژنوتیپ‌های مطلوب و برتر و نیز از جهت ضمانت مالکیت ارقام و ژنوتیپ‌های بومی برای کشور یک اقدام بسیار مهم و اساسی به شمار می‌آید. تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها می شود و از فرسایش ژن های مفید جلوگیری می‌کند (Khodadadi et al. 2011).

در واقع اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی موجود در یک ژرم‌پلاسم، اساسی‌ترین گام جهت اجرای برنامه‌های به‌نژادی به شمار می‌رود. یک به‌نژادگر با استفاده از این تنوع قادر خواهد بود ژنوتیپ‌های مطلوب خود را گزینش کرده و در تلاقی‌های تهیه بذور هیبرید از قدرت هتروزیس موجود در این جوامع استفاده کند (Govindaraj et al. 2015). تجزیه و تحلیل تنوع‌ژنتیکی بوسیله صفات مورفولوژی و در سطح مولکولی با استفاده از ابزارهای مبتنی بر ژنتیک، تکنیک‌های DNA و روش‌های پیشرفته مولکولی انجام می‌گیرد (Kręgielczak et al. 2023). در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی در موارد زیادی مانند مطالعات پایه‌ای و کاربردی موجودات مختلف استفاده شده است . به طوریکه کشف انواع مختلفی از نشانگر های مولکولی باعث پیشرفت عمده ای در مطالعات ژنتیکی گردیده است (Kręgielczak et al. 2023). به دلیل تنوع کم و تاثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآمد و مکمل برای تعیین سطح تنوع و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها به کار می‌روند (Anwar khan et al. 2015).

در این میان نشانگرهای مبتنی بر DNA به دلیل عدم تاثیرپذیری از شرایط محیطی، وراثت‌پذیری و فراوانی بالا از ابزارهای مناسب و قابل اعتماد برای دستیابی به درک بهتر تنوع ژرم‌پلاسم می‌باشند (Ali Shah et al. 2011) . از بین

نشانگرهای مولکولی مبتنی برPCR ، نشانگر بین ریزماهواره‌ای (ISSR) به طور وسیعی در مطالعات تنوع‌ژنتیکی به‌کار می‌رود. استفاده از نشانگر ISSR به عنوان یک تکنیک حدواسط در بین نشانگرهای مولکولی SSR و RAPD و APLP مطرح شده است (Panahi and Neghab 2013). این تکنیک جزو نشانگرهای غالب بوده و نیازی به اطلاعات قبلی از ژنوم ندارد. (Mohammadabadi et al. 2021). همچنین قابلیت تکرارپذیری، پایداری و تنوع‌پذیری بالایی دارد که دلیل آن طویل‌تر بودن آغازگرها و بالا بودن دمای اتصال است (Bahador et al. 2016). هزینه این روش نسبت به روش‌هایی نظیر SSR و APLPپایین‌تر و اجرای آن نیز سریع‌تر و آسان‌تر است. میزان درصد چند شکلی در نشانگر ISSR بسیار بالا و برای مطالعات تنوع‌ژنتیکی بسیار کارآمد است (Taylor and Barker 2012). این نشانگرها تکرارپذیری نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) را به دلیل طویل بودن طول آغازگرهایشان دارا می باشند (Mohammadabadi et al. 2017). در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهواره‌ها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Ghasemi et al. 2010). آغازگرهای آن غیراختصاصی و این تکنیک ساده، سریع و نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و هزینه ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi and Askari 2012). این تکنیک به‌صورت گسترده در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی (Askari et al. 2010; Ghasemi et al. 2010; Askari et al. 2011; Zamani et al. 2011; Mohammadabadi and Askari 2012; Zamani et al. 2015; Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021) توسط پژوهشگران مورد استفاده واقع گردیده است. لذا، هدف از انجام این تحقیق ارزیابی تنوع‌ژنتیکی و بررسی روابط‌ژنتیکی در اکوتیپ‌های بومی مربوط به سه گونه گل‌ختمی ایران به منظور استفاده در پروژه‌های به‌نژادی و حفاظت از ذخایرژنتیکی این گیاه بود.

مواد و روش‌ها

روش‌های مختلفی برای برآورد تنوع‌ژنتیکی در گونه‌های گیاهی وجود دارد. از آن‌جایی که روش‌های آماری چند متغیره به طور هم‌زمان چندین اندازه‌گیری را مدنظر قرار می‌دهند، لذا در تجزیه و تحلیل تنوع‌ژنتیکی بر پایه داده های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی کاربرد وسیعی دارند. متخصصین به‌نژادی‌گیاهی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف را به منظور پی‌بردن به فاصله‌ژنتیکی بین آن‌ها و استفاده از تنوع موجود در آن‌ها در برنامه‌های تلاقی دسته‌بندی می‌کنند. استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل چندمتغیره برای طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی موجود بین مواد اصلاحی الزامی است. در بین روش‌های مختلف آنالیز چندمتغیره، تجزیه‌خوشه‌ای و تجزیه به مختصات‌اصلی مهم‌ترین روش‌ها است (Mohammadi et al. 2003). این روش برای گروه‌بندی ژنوتیپ های مختلف از نظر ژنتیکی، محیطی و تعیین والدین در دورگ‌گیری مفید است (Farahani and Arzani 2008). اجرای پژوهش در سال ۱٤۰۱ در گلخانه تحقیقاتی، آزمایشگاه زراعت و گیاهان دارویی و

آزمایشگاه ژنومیکس در دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان (دانشگاه تهران) واقع در شهرستان پاکدشت (ایران) با طول‌جغرافیایی ۵۱ درجه شـرقی و عرض‌جغرافیایی۳۳ درجه شـمالی و ارتفاع ۱۰۱۳ متری از سـطح دریا و در فاصـله ۳۶ کیلومتری جنوب شـرقی تهران انجام گرفت. در این تحقیق ارزیابی تنوع‌ژنتیکی ۱۸ اکوتویپ مختلف گل‌ختمی که متعلق به ســه گونه متفاوت بودند مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات و محل جمع‌آوری اکوتیپ‌ها و گونه‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

Table 1. Characteristics and collection location of studied marshmallow ecotypes and species

Longitude طول جغرافیایی	Latitude عرض جغرافیایی	Species گونه	Ecotype اکوتیپ
53.5422°	36.6987°	*Althaea ficifolia*	Behshahr بهشهر
54.4334°	36.8418°	*Althaea ficifolia*	Gorgan گرگان
58.3561°	29.0963°	*Althaea ficifolia*	Bam بم
55.9863°	30.4039°	*Althaea ficifolia*	Rafsanjan رفسنجان
48.5148°	34.7983°	*Althaea ficifolia*	Hamedan همدان
59.6067°	36.2972°	*Althaea ficifolia*	Mashhad مشهد
50.0046°	36.2795°	*Althaea rosea*	Ghazvin قزوین
53.9107°	31.4556°	*Althaea rosea*	Taft تفت
54.3569°	31.8974°	*Althaea rosea*	Yazd یزد
53.0586°	36.5659°	*Althaea rosea*	*Sari* ساری
57.0834°	30.2839°	*Althaea rosea*	*Kerman* کرمان
52.5836°	29.5926°	*Althaea rosea*	Shiraz شیراز
57.4285°	33.8684°	*Althaea officinalis*	*Beshroeyeh* بشروئیه
47.0778°	34.3277°	*Althaea officinalis*	*Kermanshah کرمانشاه*
51.6660°	32.6539°	*Althaea officinalis*	*Esfahan* اصفهان
57.7445°	28.6792°	*Althaea officinalis*	*Jiroft* جیرفت
57.2320°	28.0977°	*Althaea officinalis*	Faryab فاریاب
51.4651°	28.9009°	*Althaea officinalis*	Bushehr بوشهر

بذور اکوتیپ‌های قزوین، یزد، تفت، بشرویه و بهشهر از بانک ژن سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور و بذور سایر اکوتیپ‌ها از بانک ژن دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران تهیه گردید. ارزیابی تنوع‌ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲) .

جدول ۲. آغازگرهای ISSR مورد مطالعه

Table 2. ISSR primers under study

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	منبع Source
ISSR1	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYC-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR2	5'-CTCTCT CTCTCTCTCTG-3'	(Meimberg et al. 2006)
ISSR3	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR4	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR5	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	(Rostami-Ahmadvandi et al. 2013)
ISSR6	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTYC-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR7	5'-CACACACACACACACARG-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR8	5'-GACACGACACGACAC-3'	(Rodrigues et al. 2013)
ISSR9	5'-ACACACACACACACACG-3'	(Meimberg et al. 2006)
ISSR10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	(Rodrigues et al. 2013)

بذور اکوتیپ‌های مورد مطالعه در سینی‌های نشا با نسبت مساوی کوکوپیت، پیت‌ماس، خاک‌برگ و کودحیوانی کشت شده و آبیاری بسته به نیاز گیاه، هر ۴ الی ۶ روز انجام گرفت. از هر اگوتیپ در مرحله ۲۲ تا ۲۸ روز پس از سبز شدن نمونه‌های برگ برای استخراج DNA تهیه شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. نمونه‌ها پس از کوبیدن با نیتروژن مایع داخل تیوب ۲ سی سی قرار داده شد و سپس درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد . کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب محلول‌های رقیق شده DNA به نسبت ۱:۱۰۰ در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول جذب اسیدهای‌نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت جذب‌نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر که شاخص میزان خلوص است به دست آمد. بررسی کیفیت DNA با دستگاه الکتروفورز در ژل آگارز انجام شد.

آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از شرکت سیناکلون خریداری شد. به منظور انجام PCR ، حجم واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر، که حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی و ۳ میکرولیتر آغازگر بود. تیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و با توجه به دمای اتصال و پروتکل مربوط به هر آغازگر شرایط PCR به

دستگاه تعریف شد. به طور کلی چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ – ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام شد . در پایان جهت بسط نهایی، کلیه رشته‌ها یک مرحله ۷ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد را طی کردند. پس از انجام PCR نمونه‌ها در ژل آگارز ۲/ ۱ در صد با ولتاژ ۷۰ و به مدت ۲ الی ۲,۳۰ ساعت الکتروفورز شدند و پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۵ الی ۲۵ دقیقه در محلول رقیق اتیدیوم بروماید غوطه‌ور شده و پس از آن توسط دستگاه Gel Documentation عکس‌برداری صورت گرفت و در نهایت پس از تکرار این روند برای تمام ۱۰ آغازگر مورد استفاده در آزمایش امتیازدهی به صورت صفر و یک انجام شد .

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از امتیازدهی نوارهای تکثیر شده معیارهای کارایی آغازگر شامل تعدادکل نوارها، درصد چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص‌نشانگری، نسبت چندشکلی موثر و قدرت تفکیک با استفاده از نرم‌افزار Powermarker3.25 و برنامه آنلاین محاسبه‌گر کارایی نشانگر (Marker Efficiency Calculator: iMEC) محاسبه شدند. تجزیه‌خوشه‌ای در این تحقیق با استفاده از ضریب تطابق‌ساده (SM) و روش کلاستربندی UPGMA انجام شد.به منظور انجام تجزیه‌خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYSpc2.02 و به منظور تجزیه واریانس‌مولکولی و تجزیه به مختصات‌اصلی نیز از نرم‌افزار GenAlEx6.41 استفاده شد.

نتایج و بحث

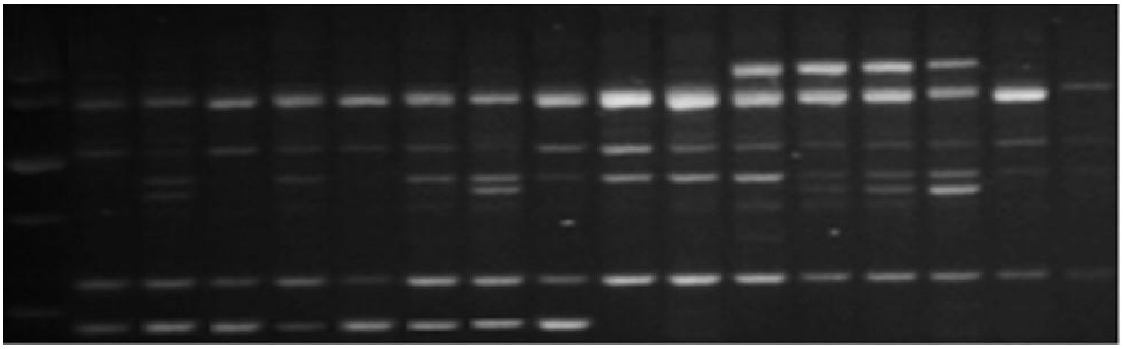
در این تحقیق میزان PIC[۱]، شاخص RP[۲] ، شاخص MI[۳]، شاخص EMR[۴]، درصد چندشکلی، تعداد نوارهای چندشکل و تعداد کل نوارها محاسبه شد (جدول ۳). تعداد نوارهای تشکیل شده و اندازه قطعات در اکوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود (شکل ۱). محتوای چندشکلی نسبی یکی از معیارهای مهم جهت مقایسه آغازگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها است. مقدار بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تمایز و تفکیک ژنوتیپ‌ها نقش زیادی دارد. از این رو آغازگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های مختلف مناسب هستند (Santhosh et al. 2009).

در این تحقیق میزان PIC بین ۰/۱۹ و ۰/۴۲ متغیر بود و میانگین آن نیز ۰/۲۹ به‌دست آمد. بیشترین PIC مربوط به آغازگر ISSR2 و کمترین PIC نیز مربوط به آغازگر ISSR4 بود. شناسایی و انتخاب آغازگرهای دارای چندشکلی بالا کمک قابل توجهی در مطالعات ژنتیکی می‌نماید و مزیت استفاده از نشانگرهای دارای چندشکلی بالا افزایش کارایی آغازگر در برآورد

[۱] محتوی چندشکلی نسبی
[۲] قدرت تفکیک
3 شاخص‌نشانگری
[۴] نسبت چندگانه موثر

تنوع‌ژنتیکی می‌باشد (Torutaeva et al. 2014). میزان تعداد کل نوارهای تشکیل شده توسط آغازگرهای مورد مطالعه در این تحقیق بین ۱۱ تا ۲۳ برای هر آغازگر متغیر و میانگین آن نیز ۱۷/۱۰ بود. تعداد نوارهای چندشـــکل در این تحقیق برای آغازگرها حداقل ۷ و حداکثر ۲۱ نوار به‌دست آمد. بیشترین و کمترین میزان درصد چندشکلی در این تحقیق به ترتیب مربوط به آغازگرهای ISSR6و ISSR7 با ۱۰۰ و ۵۲ در صد بود . میانگین در صد چند شکلی نیز در این تحقیق ۰/۷۸ به‌د ست آمد. شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR) تابعی از تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی است (Varshney et al. 2007).

در این تحقیق بیشترین میزان شاخص EMR مربوط به آغازگر ISSR2 و کمترین میزان آن مربوط به آغازگر ISSR4 بود، میانگین این شاخص نیز در این تحقیق ۱۱/۱۹ به‌د ست آمد. یک شاخص دیگر برای انتخاب آغازگر منا سب، شاخص قدرت تفکیک (RP) اســت، زیرا هم از افراد دارای باند و هم از تعداد آلل ها تاثیر می‌پذیرد (Hahn 2018). در این تحقیق میزان این شـاخص که قابلیت‌تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشـان می‌دهد در آغازگر ISSR9 با مقدار ۱۹/۷ دارای بیشـترین مقدار بود که نشان می‌دهد این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها قابلیت‌تفکیک بیشتری دارد. شاخص نشانگر (MI) نیز از تعداد مکان‌های ژنی چندشکل حاصل از آغازگرها استفاده می‌کند و زیاد بودن میزان آن نشان‌دهنده تعداد بیشتر نوار چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است (Spooner et al. 2005). میانگین این شاخص در این تحقیق ۴/۳۵ و بیشترین و کمترین آن مربوط به آغازگرهای ISSR2 و ISSR4 به ترتیب با ۸/۸۲ و ۱/۳۳ بود. نتایج این مطالعه با تحقیق Dastmalchi et al. (2013) مبنی بر کارایی مفید نشانگرهای مولکولی در تمایز اکوتیپ‌های گل‌ختمی مطابقت داشت.



شکل ۱. الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر ISSR1 در اکوتیپ‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

Figure 1. Band pattern resulting from ISSR1 primer amplification in the studied marshmallow ecotypes

نتایج تجزیه‌خوشه‌ای نشان داد که در سطح تشابه ۶۵ درصد اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه در یک گروه و اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های متفاوت در گروه‌های مجزا قرار گرفتند به طوری‌که اکوتیپ‌های قزوین، تفت، یزد، ساری، کرمان و شیراز که همگی متعلق به گونه *Althaea Rosea* بودند در یک گروه قرار گرفتند.

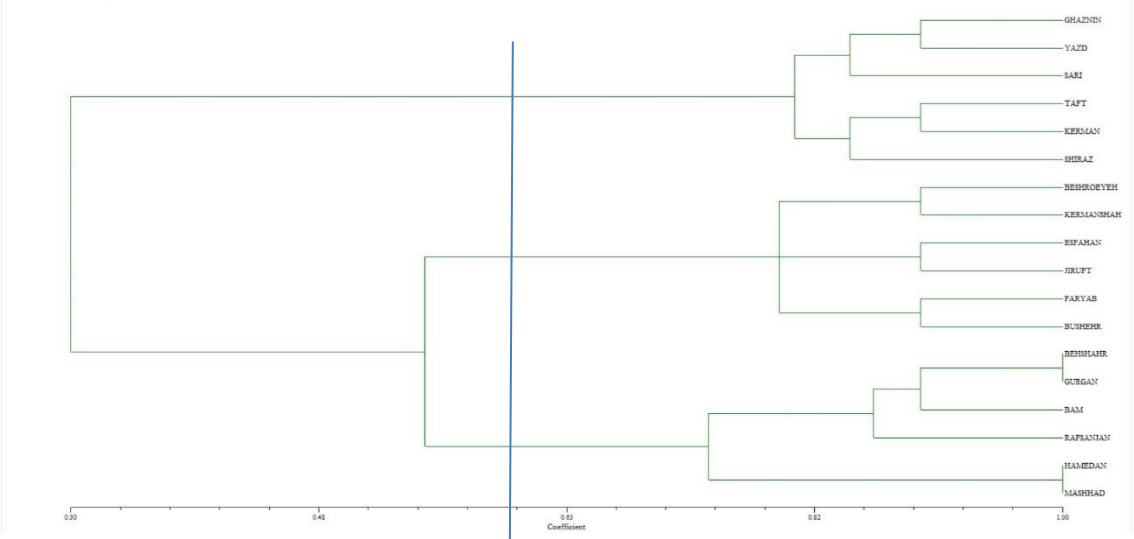
جدول ۳. شاخص‌های تنوع‌مولکولی اندازه‌گیری شده در آغازگرهای ISSR مورد مطالعه

Table 3. Molecular diversity indices measured in the studied ISSR primers

نام آغازگر Primer name	تعداد کل نوارها The total number of bands	تعداد نوارهای چندشکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphic percentage	محتوای چندشکلی نسبی PIC	شاخص‌نشانگری Marker index (MI)	نسبت چندگانه موثر (EMR)	قدرت تفکیک (RP)
ISSR1	14	11	0.78	0.20	2.2	8.58	7.4
ISSR2	23	21	0.91	0.42	8.82	19.11	17.4
ISSR3	15	12	0.80	0.25	3	9.6	19.7
ISSR4	11	7	0.63	0.19	1.33	4.41	16.9
ISSR5	14	10	0.71	0.23	2.3	7.1	12.8
ISSR6	16	16	100	0.38	6.08	16	19.4
ISSR7	17	9	0.52	0.21	1.89	4.68	12.7
ISSR8	20	17	0.85	0.36	6.12	14.45	14.3
ISSR9	22	19	0.86	0.40	7.6	16.34	21.9
ISSR10	19	15	0.78	0.28	4.2	11.7	15.4
میانگین	**17.10**	**13.70**	**0.783**	**0.29**	**4.35**	**11.19**	**15.79**

در گروه دوم اکوتیپ‌های متعلق به گونه *Althaea Ficifolia* که شامل بهشهر، گرگان، بم، رفسنجان، همدان و مشهد بودند قرار گرفتند . در گروه سوم نیز اکوتیپ‌های گونه *Althaea Officinalis* که شامل اکوتیپ‌های بشروئیه، کرمانشاه، ا صفهان، جیرفت، فاریاب و بو شهر بودند قرار گرفت (شکل ۱). در مطالعه‌ای که روی گونه‌های مختلف جنس *Althaea* صورت گرفت مشخص شد که نشانگرهای مولکولی کارایی و توانایی تمایز گونه‌های مختلف گل‌ختمی را دارند (Öztürk et al. 2009).

نتایج این تحقیق، با مطالعه یاد شده مطابقت داشت. اگر ژنوتیپ‌ها یا ارقام از مناطق مختلف در یک دسته جمع شوند، ممکن ا ست به این معنی با شد که وارث‌ژنتیکی یک سانی دارند (Sarri et al. 2006). این ممکن ا ست به دلیل انتقال گیاهان توسط انسان و یا جابجایی ژنتیکی توسط متغیرهای طبیعی بوده باشد (Percifield et al. 2007).



شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها و گونه‌های گل‌ختمی مورد مطالعه به روش UPGMA

Figure 2. Dendrogram resulting from the cluster analysis of ecotypes and marshmallow species studied by UPGMA method

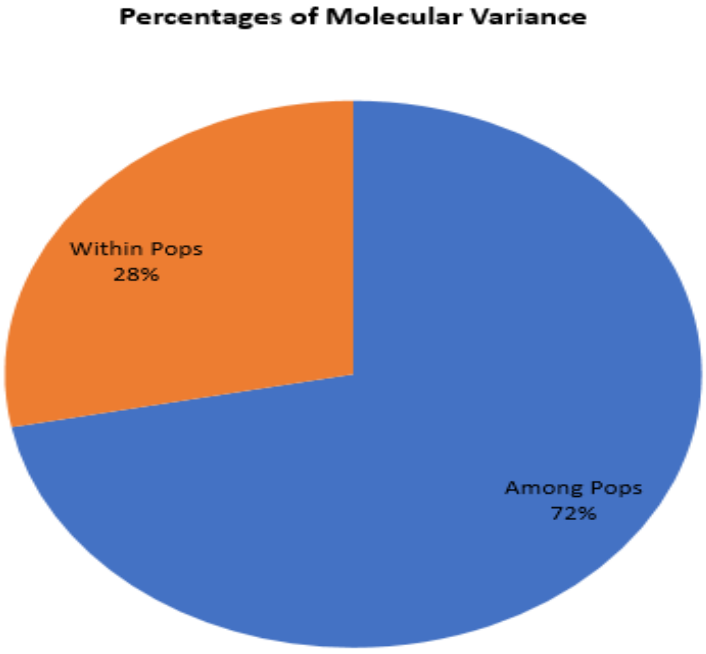
بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه ضریب‌تشابه تطابق ساده (SM) دارای بالاترین همبستگی کوفنتیک (۰/۹۳) بود که نشان‌دهنده برازندگی خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی بر اساس ضریب‌تشابه تطابق ساده می‌باشد. تشابه‌ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر ISSR و بر اساس ضریب‌تشابه SM (تطابق‌ساده) از ۰/۱۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بوده و میانگین آن ۰/۶۵ بود . بیشترین تشابه‌ژنتیکی با ۱۰۰ درصد تشابه مربوط به اکوتیپ‌های گرگان و بهشهر بود که هر دو متعلق به گونه *Althaea Ficifolia* بودند. کمترین تشابه ژنتیکی نیز مربوط به اکوتیپ فاریاب از گونه *Althaea Officinalis*با اکوتیپ قزوین از گونه *Althaea Rosea* با ۱۰ درصد تشابه بود. تجزیه‌واریانس مولکولی بین و درون گونه‌های مورد مطالعه انجام شد (جدول۴). نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۲۸ درصد از تنوع مربوط به درون گونه و ۷۲ درصد از تنوع مربوط به بین گونه‌های مورد مطالعه بود (شـــکل۳). با توجه به تنوع‌ژنتیکی بالا بین اکوتیپ های گونه‌های متفاوت به منظور جلوگیری از فرســـایش ژنتیکی در این گیاه نگهداری اکوتیپ‌های گونه‌های متفاوت به صـــورت جداگانه در بانک‌های ژن گیاهی ضـروری به نظر می‌رسـد و از طرفی با توجه به نتایج به دسـت آمده در این مطالعه، تحقیقات بیشـتر با تعداد آغازگرهای بیشـتر و نشانگرهای مولکولی دیگر نیز به منظور آگاهی از تنوع درون‌جمعیتی و ساختار جمعیت پیشنهاد می‌گردد. تجزیه به مختصات‌اصلی به عنوان روش مکمل تجزیه‌خوشـــه‌ای جهت گروه‌بندی افراد و بررســـی روابط‌ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها می‌باشـــد. این تجزیه به طور واضح اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های مشابه را از سایر گونه‌ها تفکیک نمود. تجمع اکوتیپ‌ها در یک ناحیه از نمودار، نشان‌دهنده مجموعه اکوتیپ‌هایی است که از نظر ژنتیکی مشابه می‌باشند. این نوع گروه‌بندی مشاهده همه گروه‌ها را ممکن و تفاوت‌ها را در بین اکوتیپ‌های مختلف آشـکار می‌کند. مطابق نمودار تجزیه به مختصـات‌اصـلی، اکوتیپ‌های مربوط به یک گونه در یک گروه و

اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های مختلف در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند، بنابراین می‌توان گفت که نمودار تجزیه به مختصات اصلی، نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد (شکل۳). نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با توزیع جغرافیایی اکوتیپ‌ها تا حدودی مطابقت داشت و عدم تطابق کامل می‌تواند به‌دلیل مهاجرت و جابه‌جایی جغرافیایی اکوتیپ‌های مورد مطالعه توسط انسان باشد.

جدول ٤. تجزیه واریانس مولکولی در گونه‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

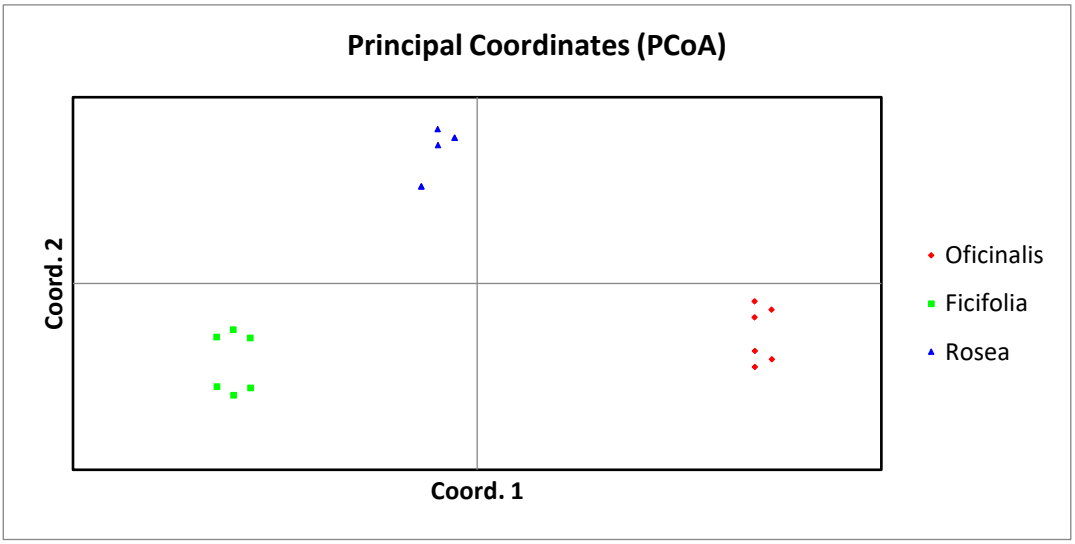
Table 4. Analysis of molecular variance in the studied marshmallow species

%	MS میانگین مربعات	SS مجموع مربعات	df درجه آزادی	SV منبع تغییرات
72	117.3945	324.789	2	**بین گونه‌ها Among species**
28	162.172	2756.94	17	**درون گونه‌ها Within species**
100	34	3081.729	19	**کل Total**



شکل ۳. درصد واریانس مولکولی به‌دست آمده در اکوتیپ‌ها و گونه‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

Figure 3. The percentage of molecular variance obtained in the ecotypes and species of marshmallow studied



شکل ٤. نمودار حاصل از تجزیه به مختصات‌اصلی اکوتیپ‌ها و گونه‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

Figure 4. The graph resulting from the decomposition into the main coordinates of the studied ecotypes and marshmallow species

نتیجه‌گیری: تنوع‌ژنتیکی اساس به‌نژادی‌گیاهی است که از تکامل طبیعی ناشی شده و اجزای مهم پایداری نظام‌های زیستی است. ارزیابی تنوع‌ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های به‌نژادی کاربرد حیاتی دارد . با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشانگر ISSR کارایی لازم جهت تمایز اکوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف گل‌ختمی را دارد و از طرفی با توجه به وجود تنوع و فاصله‌ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه، از اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌توان به عنوان والدین تلاقی در پروژه‌های به‌نژادی این گیاه استفاده کرد و به منظور حفاظت از ژرم‌پلاسم و جلوگیری از فرسایش‌ژنتیکی در این گیاه، نگهداری اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق در بانک‌های ژن گیاهی پیشنهاد می‌گردد.

سپا سگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از داوران محترم مجله بیوتکنولوژی ک شاورزی به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگذاری نمایند.

منابع

ارجمند امین، ابراهیمی محسن، بی همتا محمدرضا، مرادی نرگس (۱۴۰۲) ارزیابی صفات فیتوشیمیایی در اکوتیپ‌های مختلف گل‌ختمی(*Althaea sp.*) . به‌زراعی‌کشاورزی ۲۵ ،۷۶۷-۷۵۵.

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.

دستمالچی ترانه، امیدی منصور، ترابی سپیده، مداح‌عارفی حسن، اطمینان علیرضا، حسنی محمدحسین، بهزادی‌راد مرجان (۱۳۹۰) ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی ختمی (Althaea & Alcea spp L) با استفاده از نشانگرهایAFLP . فصلنامه ژنتیک نوین ۶، ۹۱-۷۹.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹

References

Arjamand A, Ebrahimi M, Bihamta MR, Moradi N (2023) Evaluation of phytochemical traits in different ecotypes of Althaea sp. J Crop Imp 3 (25), 767-755 (In Persian).

Bibalani GH (2011) Average stem biomass of Althaea ficifolia in Shanjan Rangelands, East Azerbaijan, Iran. J Med Plant Res 5(19), 4822-4825.

Ali Shah SM, Akhtar N, Akram M, et al. (2011) Pharmacological activity of althaea officinalis L. J Med Plant Res 5(24), 5662–5666.

Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 49-56 (In Persian).

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222–229.

Bahador Y, MR Mohammadabadi, A Khezri, et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7 (13), 186-192 (In Persian).

Dastmalchi T, Omidy M, Torabi S, et al. (2013) Evaluation of the genetic diversity of the medicinal plant Althaea & Alcea spp L using AFLP markers. Mod Gene Qua 6(3), 79-87 (In Persian).

Farahani E , Arzani A (2008) Evaluation of genetic variation of durum wheat genotypes using multivariate analysis. Elec Jour Cr Prod 4(7), 51-64.

Faehnrich B, Franz C, Nemaz P, Kaul H (2021) Medicinal plants and their secondary metabolites − State of the art and trends in breeding , analytics and use in feed supplementation − with special focus on German chamomile. J Appl Bot Food Qual 7(4), 61–74.

Fahamiya N, Shiffa M, Aslam M, Muzn F (2016) Unani perspective of Khatmi (Althaea officinalis). J Pharmacogn Phytochem 5(6), 357–360.

Germplasm T L, In L, Valley K (2015) Multivariate analysis for morphological diversity of bread wheat (triticumaestivum l.) germplasm lines in kashmir valley. Statistical Stat Genet 8(9), 372–376.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4, 5758–5760.

Khodadadi M, Fotokian M H, Miransari M (2011) Genetic diversity of wheat (Triticum aestivum L.) genotypes based on cluster and principal component analyses for breeding strategies Aust J Crop Sci 5(1), 17–24.

Kianitalaei A, Feyzabadi Z, Hamedi S, Qaraaty M (2019) Althaea Officinalis in Traditional Medicine and modern phytotherapy. J Adv Pharm Educ Res 9(12), 154-161.

Meimberg H, Abele T, Bräuchler C, et al. (2006) Molecular evidence for adaptive radiation of Micromeria Benth.(Lamiaceae) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. Mol Phylogenet Evol 4(1), 566-578.

Mohammadabadi M, Askari N (2012) Characterization of Genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany. 120pp.

Mohammadabadi M, Oleshko V, Oleshko O, et al. (2021) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Guppy Fish. Turk J Fish Aquatic Sci 21(12), 603-613.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), 154.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. Crop Sci 4(3), 1235-1248.

Nazeem Fahamiya, Mohamrd Shiffa MA (2017) Acomprehensive review on *Althaea Rosea* Linn. Indo Am J Pharm Res 7(07), 2-9.

Öztürk F, Babaoğlu S, Uzunhisarcıklı M E, et al. (2009) Genetic differentiation of Turkish Althaea L and Alcea L. Adv Mol Biol 7(13), 47–56.

Panahi B, Neghab MG (2013) Genetic characterization of Iranian safflower (Carthamus tinctorius) using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. Physiol Mol Biol Plants 8(13), 239–243.

Prisenˇ L (2009) dependent cough suppressive effect of Althaea officinalis rhamnogalacturonan in guinea pigs test system y. Int J Biol Macromol 4(5), 27–32.

Percifield RJ, Hawkins JS, McCoy JA, et al. (2007) Genetic diversity in Hypericum and AFLP Markers for species-specific identification of H. perforatum L. Planta Med 7(3), 161-174.

Res M, Xue T, Xu H, et al. (2021) Progress in Chemical Compositions and Pharmacological Activities of Althaea officinalis. Med Res 6(8), 1–6.

Rostami-Ahmadvandi H, Cheghamirza K, Kahrizi D, et al. (2013) Comparison of morphoagronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among Cuminum cyminum L accessions. Aust J Crop Sci 7(8), 36-51.

Rodrigues L, van den Berg C, Póvoa O, et al. (2013) Low genetic diversity and significant structuring in the endangered Mentha cervina populations and its implications for conservation. Biochem Syst Ecol 5(10), 51-61.

Sendker J, Bo I, Lengers I, et al. (2017) Phytochemical Characterization of Low Molecular Weight Constituents from Marshmallow Roots (*Althaea officinalis*) and Inhibiting E ff ects of the Aqueous Extract on Human Hyaluronidase . J Nat Prod 8(14), 22-37.

Song Z, Li X, Wang H, Wang J (2010) Genetic diversity and population structure of Salvia miltiorrhiza Bge in China revealed by ISSR and SRAP. Genetica 4(12), 241–249.

Sarri V, Baldoni L, Porceddu A, et al. (2006) Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. Genome 4(9), 1606-1615.

Taylor CL, Barker NP (2012) Species limits in Vachellia (Acacia) karroo (Mimosoideae : Leguminoseae): Evidence from automated ISSR DNA “fi ngerprinting. South African J Bot 8(3), 36–43.

Torutaeva E, Asanaliev A, Prieto ML, et al. (2014) Evaluation of microsatellite-based genetic diversity, protein and mineral content in chickpea accessions grown in Kyrgyzstan. outh African J Bot 5(12), 81-90.

Kręgielczak A, Łukaszewska-Kuska M, Mania-Końsko A, Dorocka-Bobkowska B (2023) Flaxseed (Linum usitatissimum), Chamomile (Matricariae flos) and Marshmallow *(Althaea officinalis*) Mouth Rinses in the Therapy of Oral Mucosa Diseases–A Review. J Nat Fibers 20(2), 136-147.

Uzunhisarcikli ME, Vural M (2012) The taxonomic revision of Alcea and Althaea *(Malvaceae)* in Turkey. Turk J Botany 36(6), 603-636.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumin Res 132, 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812–1817.

Zhong C, Chen C, Gao X, et al. (2022) Multi-omics profiling reveals comprehensive microbe–plant–metabolite regulation patterns for medicinal plant Glycyrrhiza uralensis Fisch. Plant Biotecnol 6(10), 1874-1887.