

Evaluation of morphologic and genetic diversity of *Pulicaria gnaphalodes* populations collected from south-east of Iran

Zahra Hassanabadi 

Ph.D. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail address: hassanabadi.z110@gmail.com

Mehdi Mohayeji 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Genetics and Crop Production, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: mohayeji@uk.ac.ir

Fariba Sharififar 

Professor, Herbal and Traditional Medicines Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. E-mail address: f.sharififar@kmu.ac.ir

Mansur Mirtadzadini 

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: mirtadz@uk.ac.ir

Ali Mehrafarin 

Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran. E-mail address: a.mehrafarin@gmail.com

Abstract

Objective

Pulicaria gnaphalodes (Vent.) Boiss, known as Kak-Kosh, is a desert-adapted species that has been widely distributed throughout Iran. This plant is a source of flavonoids and terpenes that are used in traditional medicine. Considering the medicinal importance of this plant, the aim of this research was to investigate the effectiveness of molecular and morphological markers to separate the populations.

Materials and methods

In this research, 20 populations of this species were collected from Kerman, Fars, Yazd and Hormozgan provinces and their genetic diversity was analyzed using 10 morphological traits and

25 ISSR primers. Sampling for genetic and morphological studies were carried out in spring and late summer, respectively.

Results

A total of 150 ISSR marker fragments were scored and 139 bands were found to be polymorphic [the percentage of polymorphic bands (PPB): 92.67%]. The average number of effective alleles (N_e) and expected Heterozygosity (u_{He}) for the amplification products were 1.470 and 0.288 respectively. Both Principal Coordinates Analysis (PCoA) and UPGMA cluster analysis supported the clustering of all the populations into two groups. Small cluster contained populations 15, 18 and 19 and other populations were placed in a large Cluster. A weak relationship was observed between genetic diversity and GIS data. The Factor Analysis (FA) results for morphological traits detected three principal components with Eigen value greater than one (reproductive, leaf area, and vegetative components), which explained 69.24% of the total variability. These three components explained 28.77, 21.05 and 19.42 percentage of variability respectively. The FA analysis separated a group from the other populations.

Conclusions

In the present study, high levels of genetic and morphologic diversity were found between *P. gnaphalodes* populations. So that geographical separations have a weak effect on genetic diversity of populations. It seems that some probable factors such as perianality, self-incompatibility, pollination system, seed dispersal by wind, and gene flow could support achieving the population in a high level of genetic diversity.

Keywords: Fleabane, Genetic variation, Morphological diversity, ISSR Marker

Paper Type: Research Paper.

Citation: Hassanabadi Z, Mohayjeji M, Sharififar F, Mirtadzadini M, Mehrafarin A (2023) Evaluation of morphologic and genetic diversity of *Pulicaria gnaphalodes* populations collected from south-east of Iran. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 145-166.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 145-166.

DOI: 10.22103/jab.2023.20590.1445

Received: January 08, 2023.

Received in revised form: February 12, 2023.

Accepted: February 13, 2023.

Published online: February 18, 2023.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

ارزیابی تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes* در بخشی از جنوب شرق ایران

زهرا حسن‌آبادی 

دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه:

hassanabadi.z110@gmail.com

مهدی مهیجی 


*نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

mohayeji@uk.ac.ir

فریبا شریفی‌فر 

استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و طب سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

f.sharififar@kmu.ac.ir

منصور میرتاج‌الدینی 

استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: mirtadz@uk.ac.ir

علی مهرآفرین 

استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران. رایانامه: a.mehrafarin@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

چکیده

هدف: گیاه دارویی و معطر *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss معروف به گیاه کک کش یکی از گسترده‌ترین گونه‌های بیابانی است که به صورت وحشی در مناطق وسیعی از ایران رشد می‌کند. این گیاه منبع فلاونوئیدها و ترپن‌ها است که در طب سنتی کاربردهای متعددی دارد. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، هدف این تحقیق بررسی و مقایسه کارایی نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی در تفکیک جمعیت‌های آن بود

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۲۰ جمعیت از این گونه از استان‌های کرمان، فارس، یزد و هرمزگان جمع‌آوری و تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از ۱۰ صفت مورفولوژیکی و ۲۵ آغازگر ISSR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمونه‌گیری برای استخراج DNA در بهار و نمونه‌گیری برای بررسی‌های مورفولوژیکی در انتهای فصل رشد در تابستان انجام شد.

نتایج: در بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها، در مجموع ۱۵۰ نوار تکثیر شد که از این تعداد ۱۳۹ مورد آن (۹۲/۶۷ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل‌های موثر (Ne) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (uHe) به ترتیب ۱/۴۷ و ۰/۲۸۸ بود. دندروگرام رسم شده با استفاده از روش Wards، این تجزیه جمعیت‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم نمود. خوشه کوچک‌تر شامل جمعیت‌های ۱۵، ۱۸ و ۱۹ بود و سایر جمعیت‌ها در خوشه بزرگ قرار گرفتند. ارتباط ضعیفی بین الگوی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها و داده‌های GIS مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه به عامل‌ها برای صفات مورفولوژیک نشان داد که سه مؤلفه اصلی (مؤلفه‌های زایشی، سطح برگ و رویشی) با مقادیر ویژه بیش از یک، ۶۹/۲۴ درصد از کل تنوع را توجیه نمودند. این سه عامل به ترتیب ۲۸/۷۷، ۲۱/۰۵ و ۱۹/۴۲ درصد از تغییرات داده‌ها را تبیین کردند. تجزیه به عامل‌ها جمعیت‌های مورد مطالعه را به دو گروه مشخص تقسیم نمود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی بین جمعیت‌های *P. gnaphalodes* مشاهده شد به نحوی که پراکندگی‌های جغرافیایی تاثیر کمی در تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها داشت. به نظر می‌رسد عواملی نظیر چند ساله بودن گیاه، سیستم گرده‌افشانی، خودناسازگاری، پراکندگی بذر توسط باد و جریان زن، از تنوع ژنتیکی بالای جمعیت‌ها حمایت کنند.

کلیدواژه‌ها: پولیکاریا، تنوع ژنتیکی، تنوع مورفولوژیکی، نشانگر ISSR.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حسن‌آبادی زهرا، مهیجی مهدی، شریفی فر فریبا، میرتاج‌الدینی منصور، مهرآفرین علی (۱۴۰۲) ارزیابی تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes* در بخشی از جنوب شرق ایران. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱۴۵-۱۶۶.

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



© the authors

مقدمه

گیاه پولیکاریا به فارسی کک‌کش نامیده می‌شود که اشاره به کاربرد این گیاه در دفع حشره کک دارد (Batoli et al. 2017). این گیاه همچنین با نام‌های « علف هیضه » و « شبانگ » نیز شناخته می‌شود و به انگلیسی Fleabane نامیده می‌شود (Shariatifar 2011). بر اساس مطالعات فیتوشیمیایی اثرات ضد انگلی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد دردی، ضد سرطانی و

آنتی اکسیدانی این گیاه محرز گشته است. همچنین، پولیکاریا در زمینه‌های آرایشی و بهداشتی، طعم‌دهنده غذا، و درمان سنتی و به‌عنوان حشره‌کش، کاربرد دارد (Kazemi et al. 2013; Shariatifar et al. 2014; Batoli et al. 2017). فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه بر مواد غذایی پاتوژن‌زا (Habibi et al., 2014)، اثر ضد تشنجی عصاره و اسانس آن برای درمان صرع (Zendehdel et al., 2013)، اثر اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه در مهار سلول‌های سرطانی (Mirian et al., 2015) و اثر مهارکنندگی آن بر رشد عمده لیشمانیا (Asghari et al., 2014) مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه بر دروره نگهداری روغن سویا، به‌عنوان یک جایگزینی طبیعی به‌جای آنتی‌اکسیدان مصنوعی تایید شده است (Shariatifar et al., 2014). همچنین اثرات مثبت این گیاه بر عملکرد، رشد، میکرو فلور روده و سلامت روده در جوجه‌های گوشتی با افزودن پودر این گیاه در رژیم غذایی جوجه گوشتی نشان داده شده است (Shirani et al., 2019).

جنس *Pulicaria* متعلق به طایفه *Inuleae* و خانواده *Asteraceae* می‌باشد. این جنس از نظر طبقه‌بندی ناهمگن می‌باشد و بحث‌های زیادی در زمینه طبقه‌بندی زیر طایفه‌ای *Inuleae* و تعیین حدود جنس‌های آن وجود دارد (Anderberg 1994; Bremer 1989). طایفه *Inuleae* یک گروه پارافلیتیک^۱ (چند نیایی) است و به دو زیر طایفه *Inuleae-Inulinae* و *Inuleae-Plucheineae* تقسیم می‌شود (Anderberg & Eldenäs 2009). پولیکاریا یکی از جنس‌های اصلی طایفه *Inuleae* به‌شمار می‌رود که در اروپا، آفریقا و آسیا پراکنده شده است (Englund et al. 2009). تاکنون بیش از صد گونه از این جنس در سراسر جهان گزارش شده است که از این میان پنج گونه در ایران به‌طور گسترده رشد می‌کنند: *P. gnaphalodes* (Vent.) Boiss، *P. arabica* L. و *P. vulgaris* Gaertn.، *P. salvifolia* Bunge، *P. dysenterica* (L.) Bernh. که از بین این پنج گونه، *P. gnaphalodes* دارای وسیع‌ترین دامنه اکولوژیکی در نواحی مرکزی، غربی و جنوبی ایران است و رویشگاه‌های این گونه در خاک‌های ابرفتی مناطق کوهستانی و ارتفاعات بالای ۱۲۰۰ متر گزارش شده است (Kazemi et al. 2013). بسیاری از گیاهان طایفه *Inuleae* دگرگرده افشان هستند. با توجه به ویژگی‌های پولیکاریا تصور می‌شود این گیاه نیز دگرگشن باشد. گرچه اطلاع دقیقی از سیستم آمیزش این گیاه در دست نیست (Anderberg 2009) & Eldenäs. تکثیر این گیاه به وسیله بذر صورت می‌گیرد و بذور به وسیله باد در محیط پخش می‌شوند. این ویژگی باعث ایجاد جمعیت‌های متنوع با ساختاری پیچیده شده است.

امروزه نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری ضروری برای مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی شناخته شده‌اند. انواع مختلفی از نشانگرها برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Dogan et al. 2015). در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگر ردیف‌های ساده تکراری داخلی (ISSRs) به‌طور گسترده در مطالعات تنوع ژنتیکی استفاده شده است. این نشانگر دارای چندین مزیت از جمله عدم نیاز به اطلاعات قبلی توالی DNA، هزینه کم و سهولت استفاده برای هر گونه

^۱ Paraphyletic

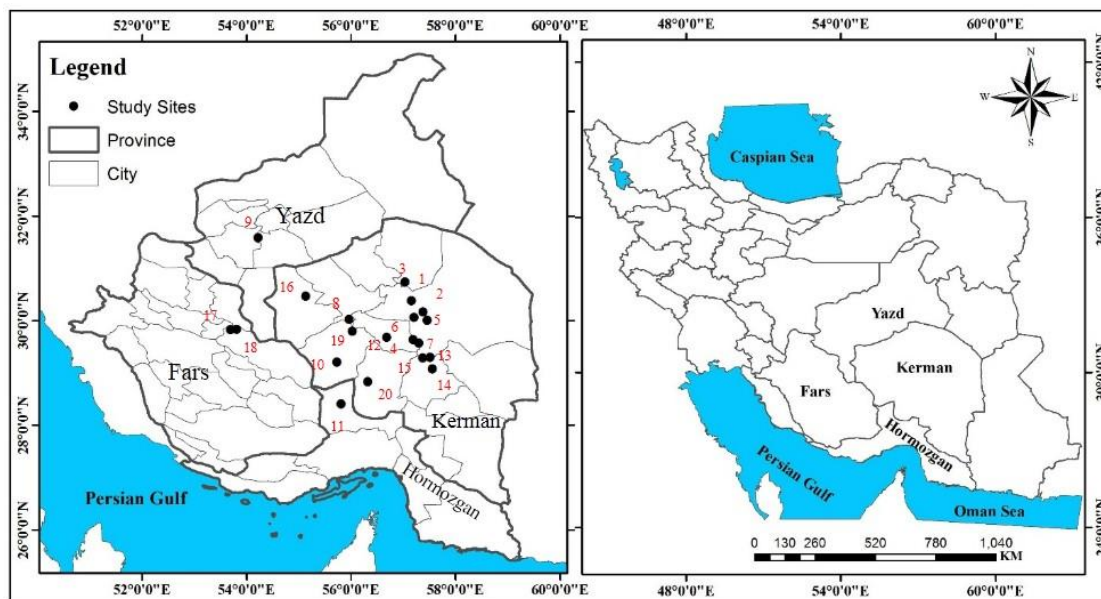
گیاهی است (Oğraş et al. 2017). نشانگر ISSR شامل تکثیر قطعه‌های DNA موجود در فواصل بین دو ناحیه تکراری ریزماهورهای است که در دو سوی آن قرار دارند (Mohammadabadi et al. 2021). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به RAPD تکثیرپذیری و تنوع پذیری بالاتری داشته، سریع بوده و روشی آسان است. همچنین به مقدار DNA الکو کمتری در انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نیاز دارد (Ng et al. 2015). این نشانگرها به دلیل طویل بودن آغازگرهایشان تکرارپذیری بسیار بالایی دارند (Kumar et al. 2014). در واقع این تکنیک بسیاری از مزایای ریزماهورها را دارد و مزیت‌های روش‌های AFLP و RAPD را نیز در هم می‌آمیزد (Ghasemi et al. 2010). کار با این نشانگر ساده و سریع است. آغازگرهای آن غیراختصاصی است و نیازی به ایجاد کتابخانه ژنومی و توالی‌یابی ندارد (Kumar et al. 2014). این نشانگر در دامنه وسیعی از گیاهان دارویی از جمله استویا، شقایق کبیر، گل راعی و گزنه برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Haghpanah et al. 2016; Luz et al. 2020; Hadipour et al. 2020; Ma et al. 2021). در تحقیقی با استفاده از ۱۴ نشانگر ISSR روی ۲۰ جمعیت از گیاه مینا (*Tanacetum polycephalum*) تنوع ژنتیکی مطلوبی بین این جمعیت‌ها مشاهده شد. همچنین ارتباط نزدیکی میان تنوع ژنتیکی و فواصل جغرافیایی در این پژوهش دیده شد (Mojarad et al. 2018). در تحقیق دیگری رابطه ژنتیکی هفت گونه از طایفه Inuleae با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR در ترکیه مورد بررسی قرار گرفت و درصد چندشکلی میان جمعیت‌های مورد مطالعه ۸۷ درصد گزارش شد (Sevindik et al. 2022). در این مطالعه، گونه‌های مورد بررسی به دو گروه عمده فیلوژنتیکی تقسیم شدند.

حفاظت از تنوع ژنتیکی راهکاری مهم برای حفظ گونه‌های در معرض انقراض محسوب می‌شود. امروزه عوامل مختلفی مانند نوسان‌های آب و هوایی و فعالیت‌های انسانی منجر به فرسایش ژنتیکی بسیاری از گونه‌های گیاهی شده است. بنابراین، ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی برای حفظ و استفاده از خزانه‌های ژنی امری ضروری محسوب می‌شود. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی در مورد تنوع ژنتیکی گیاه *P. gnaphalodes* وجود نداشته است، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *P. gnaphalodes* در بخش مهمی از رویشگاه این گیاه در جنوب شرق کشور بر اساس صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای ISSR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: پس از مطالعه و بررسی نواحی مختلف رویش گیاه پولیکاریا در استان کرمان و بخش‌هایی از استان‌های یزد، فارس و هرمزگان، کار جمع‌آوری گیاهان در دو مرحله بهار و تابستان صورت گرفت. در بررسی مناطق مذکور، رویشگاه این گیاه از ارتفاع بیش از ۱۳۰۰ متر مشاهده شد که دامنه جمع‌آوری را به نواحی مرتفع محدود کرد. در مجموع ۲۰ جمعیت و از هر جمعیت ۴۰ نمونه، از گستره وسیعی از اقلیم‌ها جمع‌آوری گردید. نقشه و اطلاعات جغرافیایی و ارتفاع مکان‌ها در شکل ۱ و جدول ۱ آورده شده

است. پس از تعیین محل‌های رویش، در فصل بهار، نمونه‌گیری از برگ‌های جوان بوته‌های هر جمعیت به‌منظور انجام مطالعات مولکولی، انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری با نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی نگهداری شدند. مختصات جغرافیایی بوته‌ها توسط GPS مشخص گردید. سپس بوته‌ها توسط حلقه‌های فلزی در محل طوقه علامت گذاری شدند.



شکل ۱. نقشه پراکنش جغرافیایی نقاط جمع‌آوری جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes* مورد مطالعه

Figure 1. Geographical distribution map of studied *Pulicaria gnaphalodes* populations collection points

به‌منظور مطالعات مورفولوژیکی در انتهای فصل تابستان که رشد اندام‌های رویشی و زایشی تکمیل شد، جمع‌آوری نمونه‌های هرباریومی از جمعیت‌های مذکور انجام گرفت. نمونه‌ها پس از شناسایی و اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی در هرباریوم دانشگاه شهید باهنر کرمان نگهداری شدند. صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ارتفاع گیاه، حالت ساقه (افراشته یا خوابیده بودن)، طول و عرض برگ، تعداد پاپوس‌ها، طول فندقه، طول فیلاهای داخلی، خارجی و تراکم کرک بودند که از ۱۰ بوته در هر جمعیت اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری تراکم کرک، با استفاده از استریوسکوپ (Olympus) و لام مدرج انجام گرفت. تعداد کرک‌های سطح زیرین برگ (قسمت میانی ساقه) شمارش و فراوانی آنها در میلی‌متر مربع محاسبه شد (Abbasi et al. 2018). تجزیه‌های آماری داده‌های توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت و تجزیه به عامل‌ها با استفاده از چرخش واریماکس انجام شد (IBM, 2013). سه عامل اول، که بیشترین تغییرات را به خود اختصاص دادند، برای رسم پراکنندگی سه بعدی توده‌های مورد مطالعه استفاده شدند.

جدول ۱. مشخصات رویشگاه‌های مورد مطالعه ۲۰ جمعیت *Pulicaria gnaphalodes* در جنوب شرقی ایران

Table 1. Information about the habitats studied for 20 populations of *Pulicaria gnaphalodes* from Southeast Iran

شماره	استان	محل	ارتفاع	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
No.	Province	Locality	Altitude (M)	Latitude (N)	Longitude(E)
1	Kerman کرمان	Jopar جوپار	1780	30°55'39.9"	57° 20'75 "E
2	Kerman کرمان	Kouhpayeh کوهپایه	1830	30°22'39.9"	57° 09'14.2"
3	Kerman کرمان	Ravar راور	1962	30°49'48.7"	57° 02'23.4"
4	Kerman کرمان	Koohe Hazar کوه هزار	2730	29°33'44.5"	57° 18'3.3"
5	Kerman کرمان	Sahebabad صاحب اباد	2526	29°37'55.1"	57° 11'37.3"
6	Kerman کرمان	Sekonj سکنج	2452	30°0'10.6"	57° 27'27"
7	Kerman کرمان	Sirch سیرچ	2207	30°10'24.3"	57° 17'43.5"
8	Kerman کرمان	Lalehzar لاله زار	2300	29°40'24.2"	56° 41'10.4"
9	Yazd یزد	Shirkooh شیرکوه	2059	31°34'50"	54° 13'16.2"
10	Hormozgan هرمزگان	Sirjan-Hormozgan سیرجان-هرمزگان	1798	29°11'57.2"	55° 43'50.1"
11	Hormozgan هرمزگان	Hajiabad حاجی اباد	1208	28°24'3.5"	55° 48'28.1"
12	Kerman کرمان	Godare Khoon Sorkh گذار خونسرخ	2443	29°47'25.1"	56° 51'36.1"
13	Kerman کرمان	Rayen-Jiroft راین-جیرفت	2375	39°17'25.9"	57° 30'6.8"
14	Kerman کرمان	Dalfard دلفارد	2709	29°04'15.3"	57° 33'21.5"
15	Kerman کرمان	Sardooieh ساردویییه	2709	29°16'58.7"	57° 22'13"
16	Kerman کرمان	Midok میدوک	2313	30°27'42"	55° 08'10.1"
17	Fars فارس	Abadeh آباذه	1600	29°48'57.8"	53° 41'45.6"
18	Fars فارس	Bovanat بوانات	1800	29°49'44.4"	53° 48'50"
19	Kerman کرمان	Sarcheshmeh سرچشمه	2075	30°10'9.1"	55° 57'52.9"
20	Kerman کرمان	Khabre Baft خبر بافت	2148	29°15'31.1"	56° 41'1.3"

استخراج و تکثیر قطعات DNA: استخراج DNA ژنومی از ۸۰۰ نمونه متعلق به ۲۰ جمعیت پولیکاریا، با استفاده از

برگ‌های یخ‌زده به کمک روش CTAB با برخی تغییرات انجام شد (Murray & Thompson 1980). کیفیت و کمیت DNA

به ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک و نیم درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. در ادامه از تمام نمونه‌های DNA

هر جمعیت یک بالک برای انجام واکنش PCR^۲ استفاده شد. از بین ۲۵ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۹ آغازگر ISSR که بیشترین مقدار چندشکلی را نشان دادند انتخاب و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی جمعیت‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). اجزاء واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر مستر میکس (حاوی آنزیم Taq polymerase، dNTP و منیزیم کلرید)، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر آغازگر بود. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (مدل Analytik jena tone شرکت Biometra آلمان) انجام شد.

جدول ۲. توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده

Table 2. Nucleotides sequences of the used ISSR primers, the annealing temperature

آغازگر	توالی آغازگر 5'-3'	دمای اتصال	آغازگر	توالی آغازگر 5'-3'	دمای اتصال
Primer	Primer sequence 5'-3'	AT (C °)	Primer	Primer sequence 5'-3'	AT (C °)
1	(CA)7AT	45.6	13	(TCC)5	42.7
2	(CA)7GT	48.2	14	(GACA)4	30.0
3	(AG)8T	50.0	16	(AG)8	34.5
4	(GATA)5	48.2	17	TGGA(TGAA)3	46.2
5	(AC)8G	52.4	18	(GA)8	30.5
6	(AG)8G	52.4	19	(CA)8G	37.8
7	(GA)8C	52.4	21	(GACT)4	28.8
8	(GA)9C	57.3	22	(TG)8A	38.5
9	(GA)8T	50.0	24	(GGAT)4	43.5
11	(GT)8C	52.4			

مراحل چرخه PCR و برنامه دمایی مورد استفاده به صورت زیر بود. مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°، واسرشت سازی با دمای ۹۴° به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر با ۳۵ بار تکرار به مدت ۱ دقیقه که دمای این مرحله با توجه به نوع آغازگر از ۵۰°-۵۳° متغیر بود، مرحله بسط و گسترش به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۳° و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲° به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات تکثیرشده توسط الکتروفورز از طریق ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE^۳ با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه مورد الکتروفورز قرار گرفتند. نوارهای تکثیر شده DNA تحت نور UV با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل داک مدل ویلبر عکس‌برداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی: در بررسی الگوی نوارهای به دست آمده از ژل‌ها در الکتروفورز، نوارهایی که چندشکلی نشان دادند در قالب ماتریسی به صورت یک (حضور نوار) و صفر (عدم حضور نوار) امتیازبندی شدند. ماتریس تشابه بر

^۲. Polymerase Chain Reaction

^۳. Tris/Borate/EDTA

اساس ضریب تشابه جاکارد با نرم افزار SPSS ver.22 برای ژنوتیپ‌ها محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA رسم شد (IBM, 2013). در ارزیابی محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC^4)، پارامترهای ژنتیکی شامل تعداد نوارهای چندشکل ($NPBs^5$)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na^6)، تعداد آلل‌های موثر (Ne^7)، میزان جریان ژنی (BF^8)، شاخص شانون (I^9)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He^{10})، هتروزیگوسیتی مورد تایید (uHe^{11}) و ماتریس تشابه برای هریک از جمعیت‌ها محاسبه شد. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و گروه‌بندی جمعیت‌ها از روش‌های تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) از طریق نرم افزار GenAlEx v. 6.1، انجام شد (Peakall & Smouse 2006).

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل تنوع مورفولوژیکی: نتایج حاصل از تجزیه به عامل‌ها برای صفات مورفولوژیکی ۲۰ جمعیت مورد مطالعه نشان داد که سه مؤلفه اصلی با مقادیر ویژه بیش از یک، ۶۹/۲۴ درصد از کل تنوع را توجیه نمودند. این سه عامل به ترتیب ۲۸/۷۷، ۲۱/۰۵ و ۱۹/۴۲ درصد از تغییرات داده‌ها را تبیین کردند. عامل اول با تعداد پاپوس، طول فندقه، طول فیلاهای داخلی و خارجی و طول دم‌گل ضریب مثبت بالایی نشان داد. از آنجایی که همه این صفات مربوط به مرحله زایشی رشد گیاه بود عامل اول، مؤلفه زایشی نام گرفت. عامل دوم که ضریب مثبت بالایی با طول و عرض برگ نشان داد مؤلفه سطح برگ نامیده شد و آخرین عامل مربوط به فرم رویشی گیاه (حالت ایستاده و خوابیده بودن ساقه) و میزان تراکم کرک گیاه در نظر گرفته شد که ضریب مثبت بالایی نسبت به فرم رویشی گیاه و ضریب منفی برای صفت تراکم پرز داشت و این عامل، مؤلفه رویشی نامیده شد (جدول ۳). نمودار سه بعدی تجزیه به عامل‌ها جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که جمعیت ۴ و ۱۵ به ترتیب بزرگترین و کوچکترین اندازه اندام زایشی را داشتند. در مورد مؤلفه سطح برگ، جمعیت ۲ و ۹ بیشترین اندازه را داشتند و برای مؤلفه رویشی جمعیت‌های ۱۳ و ۱۴ بیشترین و جمعیت‌های ۴، ۱۸ و ۱۰ کمترین امتیاز را داشتند (شکل ۲). نتایج تجزیه و تحلیل FA به وضوح گروهی از جمعیت‌ها (۷، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۹ و ۲۰) را از سایر جمعیت‌ها جدا کرد که در ربع چهارم نمودار قرار گرفتند. در این تحقیق تنوع فنوتیپی بالایی برای بیشتر صفات مورفولوژیکی مشاهده شد. این تنوع بالا می‌تواند توضیحی برای توانایی سازگاری با محیط‌های مختلف و

۴. Polymorphism Information Content

۵. Number of Polymorphic Band

۶. No. of Different Alleles

۷. No. of Effective Alleles

۸. Band Frequency

۹. Shannon's Information Index

۱۰. Expected Heterozygosity

۱۱. Unbiased Expected Heterozygosity

رویشگاه‌های متنوع این گیاه در کشور باشد. نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل FA صفات مورفولوژیکی، گروهی از جمعیت‌ها (جمعیت‌های ۷، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۹ و ۲۰) را که در صفات زایشی و رویشی تفاوت محسوسی داشتند، از سایر جمعیت‌ها جدا کرد.

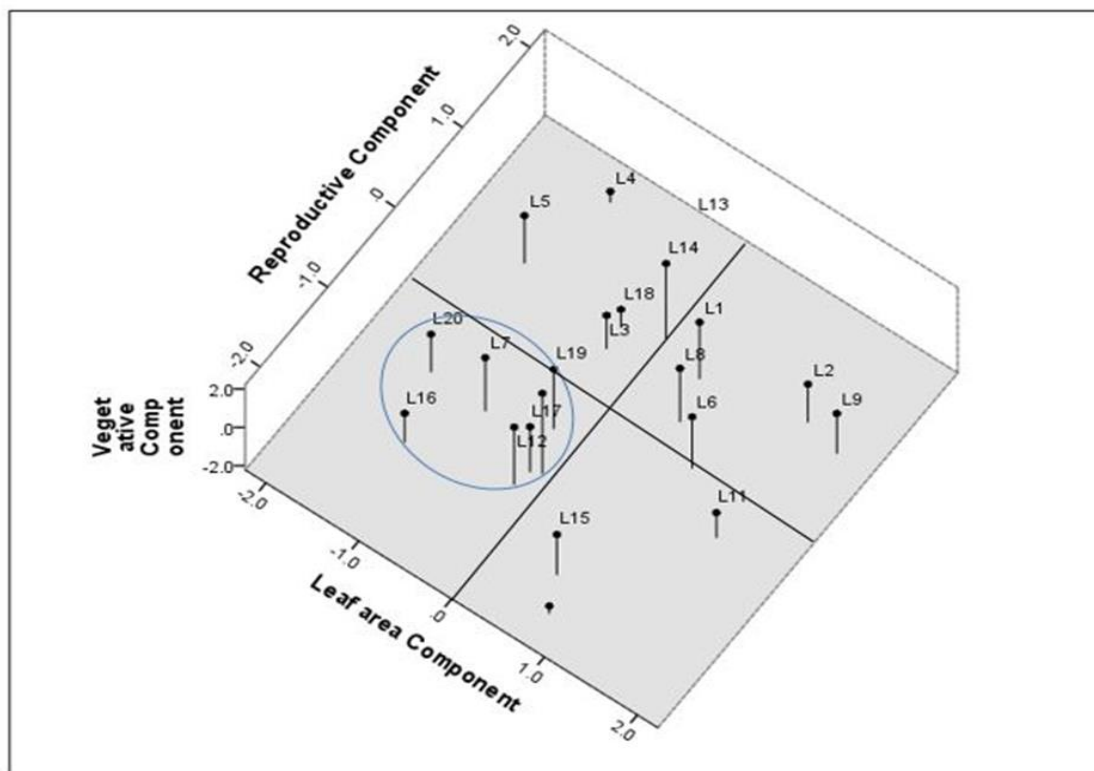
جدول ۳. بارهای عاملی پس از چرخش واریماکس

Table 3. Factor loadings after Varimax rotation

صفات مورفولوژیکی	مولفه زایشی	مولفه سطح برگ	مولفه رویشی
Morphological traits	Reproductive Component	Leaf area Component	Vegetative Component
Stem mode حالت ساقه	0.033	-0.223	0.781
Stem height ارتفاع ساقه	-0.263	0.192	-0.330
villi density تراکم کرک	0.074	0.020	-0.820
Leaf length طول برگ	-0.218	0.913	-0.141
Leaf width عرض برگ	-0.196	0.847	-0.196
peduncle length طول دمگل آذین	0.659	0.026	0.542
inner phylla برگه داخلی	0.867	-0.320	-0.145
outer phylla برگه خارجی	0.914	-0.224	-0.197
Achene length طول فندقه	0.541	0.413	0.375
Pappus length طول پاپوس	0.634	-0.378	0.295

این گروه از نظر اندازه برگ، و اجزای گل آذین نسبت به بقیه جمعیت‌ها کوچک‌تر بودند. در بسیاری از موارد گزینش جهش یافته‌های دارای گل‌ها یا میوه‌های بزرگ‌تر یکی از مهم‌ترین گام‌های اهلی سازی بوده است. گزارش‌های متعددی در مورد تاثیر ژن‌های بزرگ‌اثر در تعیین اندازه نهایی اندام‌ها و دانه‌ها در گیاهان وجود دارد (Fatih et al. 2013; Li & Li 2016). بر این اساس ژن‌های بزرگ اثر در هنگام شکل‌گیری اندام‌های گیاهی با کنترل تعداد سلول‌های اولیه در مرستم در حال تمایز، باعث تعیین ابعاد نهایی یک اندام می‌شوند. از این رو می‌توان این اختلاف بارز میان دو گروه را ناشی از وجود ژن‌های بزرگ‌اثر کنترل‌کننده اندازه اندام دانست. در مطالعه حاضر بین داده‌های مورفولوژیکی و جغرافیایی جمعیت‌ها تطابق قابل توجهی دیده نشد، البته این عدم تطابق در سایر گونه‌های تیره Asteraceae نیز مشاهده شده است و نتایج مشابهی در پژوهش‌های (Ebrahimi et al. 2012) بر روی گونه‌های *Achillea*، (Eftekharian et al. 2017) در مورد گونه *Senecio glaucus* و همین‌طور در پژوهش (Azizi et al. 2018) در مورد گونه *Tragopogon graminifolius* گزارش شده است. پارامترهای زیادی از جمله جریان ژنی، سازگاری ژنی به اقلیم‌های محلی و رانده شدگی ژنتیکی را می‌توان از جمله عواملی نامید که می‌توانند اثرات فاصله

جغرافیایی در ایجاد تنوع بین جمعیت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار دهند (Eftekharian et al. 2017). با توجه به ویژگی‌های گیاه کک کش می‌توان عدم تطابق داده‌های جغرافیایی و مورفولوژیک را خصوصیتی مانند احتمال دگرگشتی بالا، پتانسیل ایجاد جریان ژنی از گونه‌های نزدیک (Anderberg & Eldenäs 2009) و اقلیم رویشگاه‌های این گیاه نسبت داد.



شکل ۲. نمودار تجزیه به عامل‌ها (FA) بر اساس داده‌های مورفولوژیکی

Figure 2. Factor analysis (FA) plot based on morphologic data

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی: از بین ۲۵ آغازگر به کار رفته در این پژوهش، ۱۹ آغازگر، چندشکلی نشان دادند. از بین ۱۵۰ نوار تولید شده، ۱۳۹ باند (۹۲/۶۷ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر واحد سنجش برابر با ۷/۳۱ نوار بود (جدول ۴). دامنه نوارهای چندشکل ایجاد شده بین ۲۵۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز و تعداد نوارهای تولید شده از ۴ نوار در آغازگر C و آغازگر (GACT)₄ تا ۱۱ نوار در آغازگر G (AG)₈ و آغازگر (GA)₈ متغیر بود. به‌عنوان نمونه، الگوی نوارهای PCR آغازگر C و آغازگر (GA)₉ در شکل ۳ نشان داده شده است. در این ارزیابی‌ها میانگین Na برابر ۱/۹۲۹ بود و آغازگرهای (GACT)₄ و (GA)₈، TGGG(TGAA)₃، (GACA)₄، (TCC)₅، (GT)₈C، (AG)₈G، (GATA)₅، (CA)₇GT بالاترین مقدار Na را نشان دادند، در حالی که آغازگر (GA)₉C کمترین مقدار را داشت. میانگین Ne و uHe به ترتیب ۱/۴۷۰ و ۰/۲۸۸ بود. حداکثر Ne و uHe در آغازگر (GACT)₄ مشاهده شد و به ترتیب برابر ۰/۴۶۸ و ۱/۸۴۳ بود. از سوی دیگر، حداقل

پارامتر Ne و uHe در آغازگر (CA)₇AT شناسایی شد که به ترتیب ۱/۲۱۸ و ۰/۱۵۲ بود. در بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر (GACT)₄ دارای بیشترین BF، Na، Ne، He و I بود و کارآمدترین آغازگر به شمار آمد.

جدول ۴. پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes*

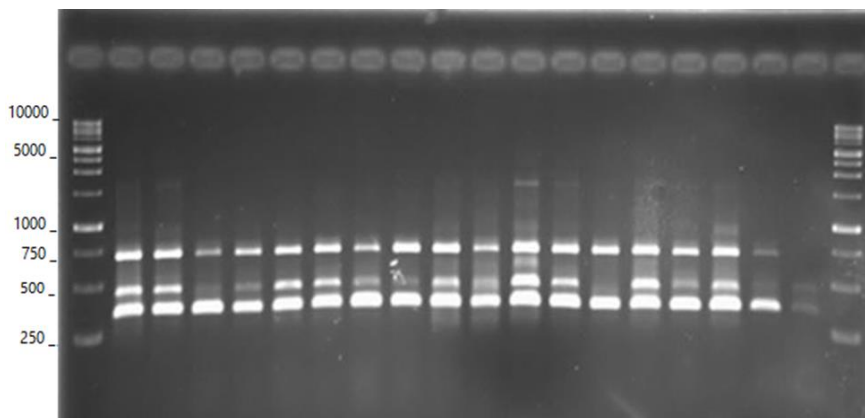
Table 4. Genetic diversity parameters of *Pulicaria gnaphalodes* populations

مکان ژنی locus	NPB	BF	p	q	Na	Ne	I	He	uHe
Avp1	10	0.332	0.258	0.742	1.909	1.218	0.255	0.149	0.152
Avp2	10	0.395	0.245	0.755	2.000	1.521	0.455	0.301	0.308
Avp3	8	0.356	0.249	0.751	1.889	1.317	0.349	0.214	0.220
Avp4	6	0.275	0.180	0.820	2.000	1.273	0.320	0.190	0.195
Avp5	8	0.700	0.545	0.455	1.889	1.548	0.459	0.310	0.318
Avp6	11	0.450	0.282	0.718	2.000	1.565	0.507	0.335	0.344
Avp7	6	0.464	0.351	0.649	1.857	1.358	0.359	0.226	0.231
Avp8	4	0.560	0.448	0.552	1.800	1.392	0.343	0.225	0.230
Avp9	9	0.473	0.367	0.633	1.818	1.347	0.333	0.212	0.218
AvP11	8	0.375	0.268	0.732	2.000	1.301	0.358	0.213	0.218
AvP13	5	0.460	0.316	0.684	2.000	1.464	0.446	0.288	0.295
AvP14	5	0.500	0.326	0.674	2.000	1.633	0.514	0.348	0.357
AvP16	7	0.656	0.480	0.520	1.875	1.626	0.515	0.352	0.361
AvP17	5	0.650	0.467	0.533	2.000	1.586	0.553	0.367	0.376
AvP18	11	0.359	0.232	0.768	2.000	1.394	0.406	0.253	0.260
AvP19	10	0.645	0.470	0.530	1.909	1.650	0.510	0.351	0.361
AvP21	4	0.800	0.572	0.428	2.000	1.843	0.648	0.456	0.468
AvP22	5	0.457	0.327	0.673	1.857	1.418	0.403	0.259	0.266
AvP24	6	0.607	0.461	0.539	1.857	1.487	0.439	0.292	0.299
To. AV		0.500	0.360	0.639	1.929	1.470	0.430	0.281	0.288

NPB: تعداد نوارهای چندشکل، BF: فراوانی نوارهای چند شکل، Na: تعداد آللهای مشاهده شده، Ne: تعداد آللهای موثر، I: شاخص

شانون، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، uHe: هتروزیگوسیتی مورد تایید

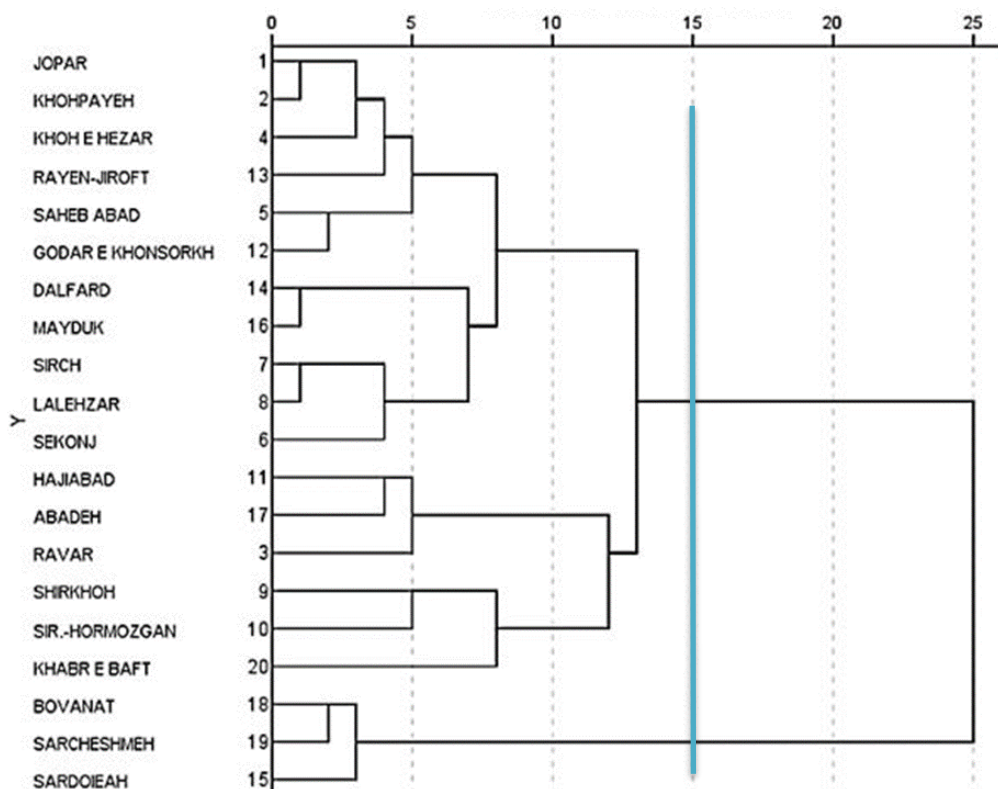
NPB: Number of Polymorphic Band, BF: Band Frequency, Na: No. of Different Alleles, Ne: No. of Effective Alleles, I: Shannon's Information Index, He: Expected Heterozygosity, uHe: Unbiased Expected Heterozygosity



شکل ۳. الگوی باندهای ISSR جمعیت‌های مختلف *Pulicaria gnaphalodes* توسط آغازگر $(GA)_9C$ (GA)

Figure 3. ISSR profiles using the primer $(GA)_9C$ in *Pulicaria gnaphalodes* populations

دندروگرام تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب جاکارد و روش UPGMA رسم شد که از ضریب همبستگی کوفنتیک بالا (۰/۷۱) برخوردار بود. این تجزیه، جمعیت‌ها به دو گروه اصلی شامل یک گروه کوچک (جمعیت ۱۵، ۱۸ و ۱۹) و یک گروه بزرگ (هفده جمعیت باقی‌مانده) تقسیم کرد (شکل ۴). نتایج تجزیه به مختصات اصلی PCoA نشان داد دو جزء اصلی اول به ترتیب ۲۶/۱۷ و ۲۰/۰۹ درصد از کل تغییرات را به خود اختصاص دادند (شکل ۵). نتایج PCoA موید تقسیم بندی حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بود. بر اساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، جمعیت‌های ۱۵، ۱۸ و ۱۹ گروه جداگانه‌ای را تشکیل دادند که به‌وضوح از بقیه جمعیت‌ها متمایز بود. لازم به ذکر است که نتایج تحلیل خوشه‌ای با داده‌های جغرافیایی و مکانی منطبق نبود. برای مثال، سه جمعیت دورافتاده از نظر جغرافیایی، جمعیت‌های ۹ (شیرکوه استان یزد)، ۱۱ (حاجی آباد استان هرمزگان) و ۲۰ (بافت استان کرمان) در نتایج تحلیل خوشه‌ای به یکدیگر نزدیک بودند. در حالی که دو جمعیت ۱۷ و ۱۸ (آباد و بوانات استان فارس) که از نظر جغرافیایی بسیار به هم نزدیک هستند، در تجزیه خوشه‌ای با فاصله از یکدیگر قرار گرفتند. این نتیجه با گروه بندی حاصل از داده‌های مورفولوژیک نیز همخوانی ضعیفی داشت. به نحوی که جمعیت‌های ۱۵، ۱۸ و ۱۹ از نظر مورفولوژیک تفاوت‌های آشکاری داشتند (شکل ۲). پژوهش‌های زیادی از در رابطه با تنوع ژنتیکی تفاوت‌های آشکار میان تنوع مولکولی و مورفولوژیک را خاطر نشان کرده‌اند (Yuan et al. 2015; Sevindik et al. 2022). عواملی از جمله غنای نشانگرهای مولکولی در نشان دادن تنوع نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک، تاثیر یک یا چند ژن بزرگ اثر در تفاوت‌های مورفولوژیک و عدم بیان بسیاری از تفاوت‌های مولکولی در سطح فوتیپ از دلایل این اختلاف است (Dogan et al. 2015). ارزیابی‌های ژنتیکی در این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان شاخص اطلاعات چندشکل مربوط به آغازگر $(GACT)_4$ بود که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در تولید نوارهای چندشکل بر اثر تکثیر نواحی مختلف ژنومی و سودمندی قابل توجه این آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه پولیکاریا می‌باشد. بنابراین در مطالعات آینده می‌توان از آن برای بررسی مجموعه ژرم‌پلاسما جمعیت‌های این گیاه بهره برد.

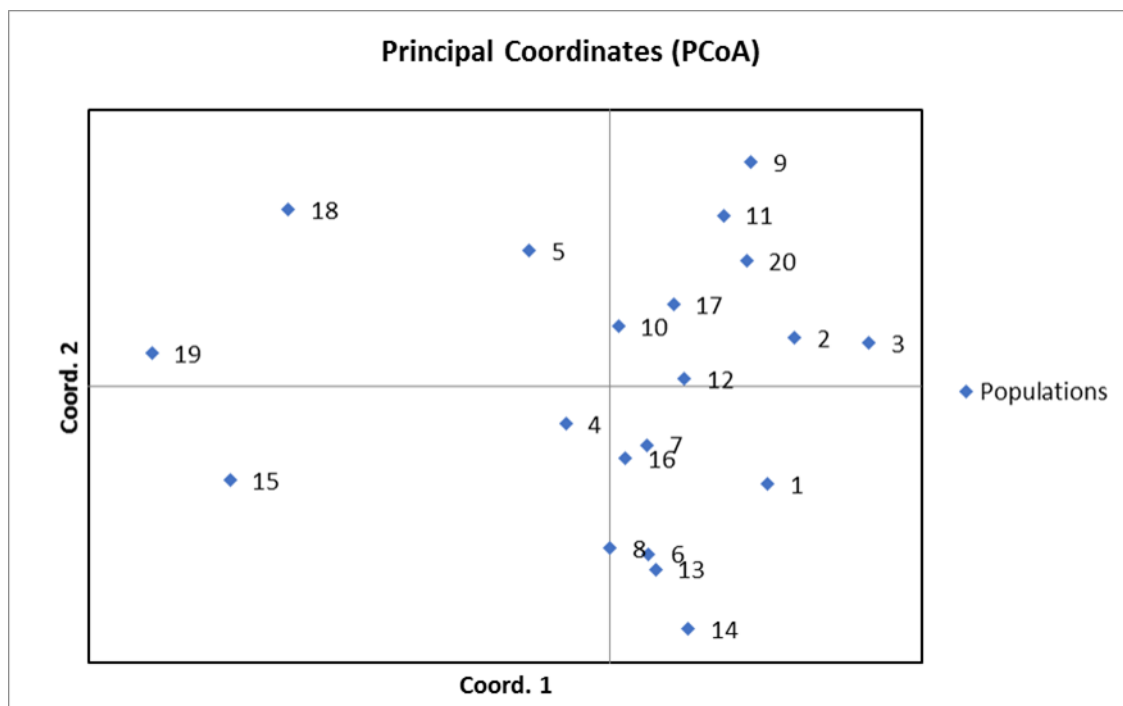


شکل ۴. دندروگرام ۲۰ جمعیت *Pulicaria gnaphalodes* بر اساس داده‌های ISSR با استفاده از روش وارد

Figure 4. Dendrogram of 20 *Pulicaria gnaphalodes* populations based on ISSR data using complete Ward method

میانگین درصد چندشکلی مشاهده شده برابر با ۹۲/۶۷ درصد در این تحقیق، نشان‌دهنده قابل قبول بودن نسبی میزان تنوع ژنتیکی در مجموعه مورد مطالعه است. همچنین شاخص شانون در این مطالعه از سایر مطالعاتی که در مورد سایر گونه‌های این طایفه انجام گرفته بالاتر بود (Azizi et al. 2014; Eftekharian et al. 2017; Azizi, et al. 2018 & Younsi et al. 2018). مقایسه نتایج پارامترهای ژنتیکی، با سایر تحقیقات انجام شده در گونه‌های مجاور این گیاه در طایفه اینوله، نشان می‌دهد تنوع قابل توجهی در جمعیت‌های پولیکاریا وجود دارد. وجود هتروزیگوسیتی بالا را در جمعیت‌های پولیکاریا احتمال دگرگشتن بودن این گیاه را مطرح می‌کند. سایر گونه‌های خانواده Asteraceae نیز اکثراً میزان بالایی از هتروزیگوسیتی و دگرگشتی قابل توجه دارند (Allen et al. 2011; Gonthier et al. 2013). (Allen et al. 2011; Gonthier et al. 2013). تنوع بالای ژنتیکی این گیاه در کنار فرسایش ژنتیکی و تغییر اقلیم منطقه ضرورت جمع‌آوری این تنوع و حفاظت از آن را دوچندان می‌کند. از دیگر دلایل تنوع ژنتیکی بالا در گیاهان وجود پلی‌پلوئیدی است. تحقیقات صورت گرفته در مورد گیاهان طایفه Inuleae گویای وجود پلی‌پلوئیدی در این گیاهان می‌باشد. Qari (2016) عدد کروموزومی $2n=14$ را در گونه *Pulicaria crispa* گزارش کرد.

چندین گزارش از پلی‌پلوئیدی جنس *Artemisia* L. بیان شده است (Atri et al. 2009; Naseri et al. 2009). لذا با توجه به وجود پلی‌پلوئیدی در این طایفه، دلیل تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های مورد مطالعه ممکن است به سطح بالای پلی‌پلوئیدی بازگردد. با این وجود، تحقیقات بیشتری برای آشکار نمودن ویژگی‌های ساختار جمعیت در این گونه مورد نیاز است.



شکل ۵. نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) داده‌های ISSR در جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes*. دو مختصات اصلی اول به ترتیب ۲۵/۵۱٪ و ۲۰/۴۴٪ از تغییرات کل را توضیح

دادند

Figure 5. 2-D plot of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) results of ISSR data for *Pulicaria gnaphalodes*. The first two principal coordinates explained for 25.51% and 20.44% of total variation, respectively

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس داده‌های ISSR در کنار PCoA، جمعیت‌های گیاهی را به دو گروه دسته بندی کرد. ولی این نتایج با پراکندگی جغرافیایی جمعیت‌ها هم‌خوانی نداشت. این نتایج نشان داد که فاصله جغرافیایی تنها دلیل تنوع ژنتیکی *P. gnaphalodes* نیست. مطالعات متعددی که بر روی گونه‌های نزدیک این گیاه انجام گرفته که به نتایج مشابهی در این رابطه رسیده است. از جمله مطالعات روی گونه‌های *Helicrysum leucocephalum* (Azizi et al. 2014)، *Artemisia santolina* (Rahimmalek et al. 2009)، *Tragopogon graminifolius* (Azizi et al. 2018) تایید کننده عدم وجود همبستگی میان فواصل جغرافیایی و فواصل ژنتیکی بودند. گرچه (Melito et al. 2013) در بررسی روی گونه

Helichrysum italicum نشان دادند که موقعیت جغرافیایی به دلیل سازگاری گیاهان با محیط‌های مختلف بر تنوع ژنتیکی تأثیر می‌گذارد. با این وجود، تحقیقی جامع در این زمینه بیان داشت که فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها با خرد اقلیم‌های^{۱۲} هر جمعیت بهتر از جدایی‌های جغرافیایی توضیح داده می‌شود (Melito et al. 2013). در همین راستا (Eichten et al. 2014) مطرح کردند در مناطق وسیع جغرافیایی با محیط‌های ناهمگن، خرد اقلیم‌ها نقش موثری در بیان ژن و تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی دارند. به طور کلی تنوع ژنتیکی هر گونه را می‌توان متأثر از عوامل تکاملی متعدد مانند سیستم گرده‌افشانی، جریان ژنی، پراکندگی دانه، تولیدمثل و انتخاب طبیعی دانست (Seyedimoradi et al. 2016). در مورد گیاه پولیکاریا برخی از عوامل احتمالی مانند پایا بودن گیاه، نوع سیستم گرده افشانی، خودناسازگاری احتمالی، پراکندگی بذر توسط باد و جریان ژن می‌توانند باعث ایجاد این تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌ها باشند. این تنوع خود سبب سازگاری بالای این گیاه با تغییرات محیطی شده و موجب پراکندگی وسیع این گیاه در مناطق نیمه کوهستانی و بیابانی شده است. با این حال، این اولین گزارش در مورد بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Pulicaria gnaphalodes* است و نیاز به مطالعه‌های بیشتر برای درک کامل ساختار جمعیتی این گونه وجود دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل قبولی در گیاه کک‌کش وجود دارد. تنوع فنوتیپی بالایی در میان جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده گردید. تجزیه به عامل‌ها نشان داد که ۶۹/۲۴ درصد از کل تنوع مشاهده شده توسط سه مولفه اول توجیه شد. با توجه به مقدار بار عاملی صفات مورد بررسی برای هر یک از این سه مولفه، مولفه اول، دوم و سوم به ترتیب مولفه زایشی، مولفه سطح برگ و مولفه فرم رویشی نام گرفتند. تجزیه به عامل‌ها گروه کوچکی از جمعیت‌ها را از سایر جمعیت‌ها جدا کرد که از اندام‌های رویشی و زایشی کوچک‌تری در قیاس با سایر جمعیت‌ها برخوردار بودند. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۲۵ آغازگر ISSR نشان داد که ۱۹ آغازگر چند شکل بودند. در صد نوارهای چند شکل نیز ۹۲/۶۷ گزارش شد. میانگین شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تعداد آلل موثر در این مطالعه به ترتیب ۰/۲۸۸ و ۱/۴۷۰ به دست آمد. آغازگر (GACT)₄ با داشتن بالاترین مقادیر تعداد نوار چند شکل، تعداد آلل موثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون به عنوان کارآمدترین آغازگر معرفی گردید. نتایج تجزیه خوشه‌ای سه جمعیت ۱۵، ۱۸ و ۱۹ را از سایر جمعیت‌ها جدا کرد. این نتیجه با تجزیه PCoA تایید گردید. عدم تطابق این نتیجه با الگوی پراکنش جغرافیایی جمعیت‌ها را می‌توان به تأثیر خرد اقلیم در ایجاد تنوع ژنتیکی نسبت داد. به نحوی که خرد اقلیم نسبت به فاصله جغرافیایی تأثیر بیشتر روی فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها گذاشته است.

سپاسگزارى: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از خانم دکتر پورتبریزی و آقای دکتر پورخسروانی به خاطر ارائه نظرهای ارزشمند و راهنمایی‌هایشان سپاسگزارى نمایند.

^{۱۲} Micro clima

مجرد م، حسینی سرقین س، سنبللی ع، حیدری ر (۱۳۹۷). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *Tanacetum polycephalum* آذربایجان غربی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۶(۲)، ۲۶۸-۲۷۸.

References

- Abbasi Sh, Houshmand S, Mirakhorli N (2018) Evaluation of morphological characteristics, glandular trichomes structure and their relationship with essential oil content in four species of Thyme (*Thymus* spp.). J Medicin Aroma Plants Res 34, 859-69.
- Allen AM, Thorogood CJ, Hegarty MJ et al. (2011) Pollen–pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of *Senecio squalidus* (Oxford ragwort). Ann Bot 108, 687-698.
- Anderberg A, Eldenäs P (2009) Inuleae. Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae International Association for Plant Taxonomy Viena, Austria, pp. 667-680.
- Asghari G, Zahabi F, Eskandarian A, et al. (2014) Chemical composition and leishmanicidal activity of *Pulicaria gnaphalodes* essential oil. Res J pharmacogn 1, 27-33
- Atri M, Chehregani A, Jalali F et al. (2009) New chromosome counts in some species of the genus *Artemisia* L.(Asteraceae) from Iran. Cytologia 74, 443-448.
- Azizi H, Sheidai M, Mozaffarian V et al. (2018) Genetic and morphological diversity in *Tragopogon graminifolius* DC.(Asteraceae) in Iran. Cytol Genet 52, 75-79.
- Azizi N, Sheidai M, Mozafarian V et al. (2014) Genetic, cytogenetic and morphological diversity in *Helicrysum leucocephalum* (Asteraceae) populations. Biologia 69, 566-573.
- Batoli H, Haghiri EA, Karimi I et al. (2017) The Survey of The Essential Oil Composition Of *Pulicaria Gnaphalodes* (Vent.) Boiss. From Brzok Of Kashan At The First Report. Eco-phytochem. J Med Plant 5, 65-78.
- Dogan B, Duran A, Şeker M et al. (2015) Study of phylogenetic relationship of Turkish species of *Klasea* (Asteraceae) based on ISSR amplification. PhytoKeys 56, p29.
- Ebrahimi M, Farajpour M, Rahimmalek M (2012) Inter-and intra-specific genetic diversity of Iranian yarrow species *Achillea santolina* and *Achillea tenuifolia* based on ISSR and RAPD markers. Genet Mol Res 11, 2855-2861.
- Eftekharian R, Sheidai M, Attar F et al. (2017) Morphometric and ISSR based variability analysis to elucidate population genetic structure in *Senecio glaucus* L.(Asteraceae: Senecioneae). Nucleus 60, 43-49.

- Eichten SR, Schmitz RJ, Springer NM (2014) Epigenetics: beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *J Plant Physiol* 165, 933-947.
- Englund M, Pornpongrueng P, Gustafsson MH, Anderberg AA (2009) Phylogenetic relationships and generic delimitation in Inuleae subtribe Inulinae (Asteraceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *Cladistics* 25, 319-352.
- Fatihi A, Zbierzak AM, Dörmann P (2013) Alterations in Seed Development Gene Expression Affect Size and Oil Content of Arabidopsis Seeds. *Plant Physiol* 163(2), 973-985.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4, 5758–5760.
- Gonthier L, Blassiau C, Mörchen M et al. (2013) High-density genetic maps for loci involved in nuclear male sterility (NMS1) and sporophytic self-incompatibility (S-locus) in chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). *Theor Appl Genet* 126, 2103-2121
- Habibi H, Ghahtan N, Eskandari F. (2017) Chemical composition and antibacterial effect of medicinal plants against some food-borne pathogen. *Res Mo Med* 5, 14-21.
- Hadipour M, Kazemitabar SK, Yaghini, H, Dayani S (2020) Genetic diversity and species differentiation of medicinal plant Persian Poppy (*Papaver bracteatum* L.) using AFLP and ISSR markers. *Ecol. Genet. Genom* 16, 100058.
- Haghpanah M, Kazemitabar SK, Hashemi SH, Alavi, SM (2016) Comparison of ISSR and AFLP markers in assessing genetic diversity among Nettle (*Urtica dioica* L.) populations. *J Plant Mol Breed* 4(1), 10-16.
- IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Kazemi M, Nagafi G, Azad A (2013) Constituents, antimicrobial and antioxidant activities of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Bioss. Volatile Oil from Iran. *Asian J Chem* 25, 3215.
- Kumar A, Mishra P, Singh SC, Sundaresan V (2014) Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L., a medicinal plant. *Plant Syst Evol* 300(6), 1409-1420.
- Li N, Li Y (2016) Signaling pathways of seed size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* 33, 23-32.
- Luz GC, Strioto DK, Mangolin CA, Maria DF (2020) ISSR markers to assess genetic diversity of cultivated populations from artificial selection of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Breed Sci* 70(4), 508-514.

- Ma, S, Khayatnezhad M, Minaeifar, AA (2021) Genetic diversity and relationships among *Hypericum L.* species by ISSR Markers: A high value medicinal plant from Northern of Iran. *Caryologia* 74(1), 97-107.
- Melito S, Sias A, Petretto GL et al. (2013) Genetic and metabolite diversity of Sardinian populations of *Helichrysum italicum*. *PLoS One* 8, e79043.
- Mirian M, Sadeghi-Aliabadi H, Asghari G, Hatami A. (2015) Cytotoxic effects of essential oil and different extracts of *Pulicaria gnaphalodes* Bioss. on a panel of cancer cells. 5th World Congress on Cell & Stem Cell Research. Volum VI. March 23-25, 2015. Chicago, USA. pp 123-128.
- 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.
- Mojarad M, Hassani-Sarghein S, Sonboli A, Heidari R (2018) Genetic variability of *Tanacetum polycephalum* populations in West Azarbaijan using ISSR molecular markers. *Iran J Rangel For Plant Breed Genet Res* 26(2) (In Persian).
- Murray M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4326.
- Naseri HR, Azarnivand H, Jafari MJC (2009) Chromosomal evolution in some Iranian *Artemisia L.* using numerical analysis of karyotypes. *Cytologia* 74, 55-64.
- Ng, WL, Tan, SG (2015) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J* 9(1), 30-39.
- Oğraş T, Baştanlar EK, Metin ÖK et al. (2017) Assessment of genetic diversity of rose genotypes using ISSR markers. *Turk J Bot* 41, 347-355.
- Peakall R, Smouse PEJMen (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel .Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6, 288-295.
- Qari S, Kamel E, Ali K (2016) Karyotype Criteria of Some Taxa Of Asteraceae (Compositae) From Saudi Arabia. *Int J Biol Allied Sci* 5, 2956-2966.
- Rahimmalek M, Tabatabaei BES, Arzani A et al. (2009) Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochem. Syst Ecol* 37, 354-361.
- Sevindik E, Paksoy MY, Sevindik M (2022) Genetic Relationship of Seven Endemic *Inula L.*(Asteraceae) Species Grown in Turkey. *Turk J Agric-Food Sci Technol* 10(4), 678-681.

- Seyedimoradi H, Talebi R, Fayaz F (2016) Geographical diversity pattern in Iranian landrace durum wheat (*Triticum turgidum*) accessions using start codon targeted polymorphism and conserved DNA-derived polymorphism markers. *J Environ Biol* 14, 63-68.
- Shariatifar N, Kamkar A, Shamse Ardekani MR et al. (2014) Composition and antioxidant activities of Iranian *Pulicaria gnaphalodes* essential oil in Soybean oil. *Pak J Pharm Sci* 27(4), 807-813.
- Shirani V, Jazi V, Toghyani M, Ashayerizadeh A, et al. (2019) *Pulicaria gnaphalodes* powder in broiler diets: consequences for performance, gut health, antioxidant enzyme activity, and fatty acid profile, *Poult Sci* 98(6), 2577-2587.
- Younsi F, Rahali N, Mehdi S et al. (2018) Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Tunisia. *Phytochemistry* 148, 48-56.
- Yuan, CY, Wang P, Chen PP, et al (2015) Genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in 48 Okras (*Abelmoschus esculentus* L.). *Physiol Mol Biol* 21(3), 359-364.
- Zarin P, Ghahremaninejad F, Maassoumi AAJT et al. (2010) Systematic of genera *Pulicaria* Gaertn. and *Platycheteae* Boiss. from tribe *Inuleae* s. str (Asteraceae) in Iran. *Tax Biosystem J* 2, 27-44.
- Zendehdel, M, Fallah R, Baghbanzadeh A, et al. (2013) Effect of intracerebroventricular injection of aqueous extract and essential oil of *Pulicaria gnaphalodes* on PTZ-induced seizures in male rat. *Physiol Pharmacol* 17: 94-100.

