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

Evaluation of genetic diversity and population structure of Iranian native henna ecotypes using ISSR molecular markers and phenotypic traits

Beheshteh Khandanizadeh
PhD Student, Department of Horticultural Sciences, Estahban Branch, Islamic Azad University, Estahban, Iran. E-mail address: b. Khandani@yahoo.com

Ardalan Alizadeh
*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Estahban Branch, Islamic Aza University, Estahban, Iran. E-mail: Ardelanalizadeh1718@yahoo.com

Ahmad Aien
Crop and Horticultural Science Research Department, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Jiroft, Iran. E-mail address: A.Aien@areeo.ac.ir

Ghasem Mohammadinejad
Professor, Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. E-mail address: mohammadinejad@uk.ac.ir

Fatemeh Ebrahimi
Assistant Professor, Research & Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Email address: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Henna (*Lawsonia inermis* L.) is a valuable medicinal plant used in medicine and dyeing industries. This study aimed to investigate the genetic diversity of Iranian native henna ecotypes using ISSR molecular markers and phenotypic traits to preserve genetic resources and advance breeding programs.

Materials and Methods

In this study, 140 henna ecotypes were cultivated in a lattice design with two replications. Important phenotypic traits including plant height, leaf dry weight, stem dry weight, leaf area index, and the ratio of leaf dry weight to stem dry weight were measured in seven selected plants from each plot. DNA was extracted using the modified CTAB method, and nine ISSR markers with the maximum number of polymorphic bands among 20 markers were selected and used.

Results

Variance analysis revealed significant differences between ecotypes in all studied phenotypic traits. The high degree of polymorphism and ability to distinguish ecotypes demonstrated the high efficiency of ISSR markers in evaluating henna genetic diversity. Structure analysis separated the 140 henna ecotypes into three different subpopulations. Cluster analysis of phenotypic data using Ward's method divided the ecotypes into four groups. The ecotypes of Zehkalut (HA245), Rudbar (ET244), and two ecotypes of Qalehganj (EH100 and GB107) with high averages of all studied traits were placed in the second phenotypic cluster group. Additionally, phenotypic cluster analysis showed that ecotypes with the highest average plant height were also in the second group. Three ecotypes from the Qalehganj region (AGH140, LA137, and NE253) and one ecotype from the Shahdad region (SHH157) had the highest stem dry weight, all of which were located in the third phenotypic cluster group. Cluster analysis of molecular data based on the Jaccard method and principal component analysis of genotypic data placed ecotypes into more distinct groups. Molecular data revealed greater genetic differentiation between ecotypes than phenotypic information. The genetic distance analysis showed the least difference between AGH140 and NG142 ecotypes from the Qalehganj region, while the GA198 ecotype from the Dalgan region exhibited the greatest genetic difference from other ecotypes.

Conclusions

The population structure identified in this study can serve as a necessary prerequisite for association mapping in future studies. The obtained diversity and genetic distance results are valuable for preserving genetic resources and selecting parents to improve the breeding value of genotypes.

Keywords: cluster analysis, medicinal plant, molecular index, principle component analysis

Paper Type: Research Paper.

Citation: Khandanizadeh, Alizadeh A, Aien A, Mohammadinejad Gh, Ebrahimi F (2025) Evaluation of genetic diversity and population structure of Iranian native henna ecotypes using ISSR molecular markers and phenotypic traits. *Agricultural Biotechnology Journal* 17(1), 27-44.

Agricultural Biotechnology Journal 17(1), 27-44. DOI: 10.22103/jab.2024.23528.1573

Received: September 22, 2024. Received in revised form: December 03, 2024.

Accepted: December 04, 2024. Published online: January 30, 2025.

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 و ساختار جمعیت اکوتیپ‌های حنا بومی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و صفات فنوتیپی

بهشته خاندانی زاده

دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، واحد استهبان، دانشگاه ازاد اسلامی استهبان استهبان، ایران. رایانامه: b.khandanizadeh@yahoo.com

اردلان علیزاده

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد استهبان، دانشگاه آزاد اسلامی استهبان، استهبان، ایران. رایانامه: Ardelanalizadeh1718@yahoo.com

احمد آیین

دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران. رایانامه : A.Aien@areeo..ac.ir

قاسم محمدی نژاد

استاد، ژنتیک و اصلاح نباتات پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، پژوهشگاه افضلی پور و دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان. رایانامه: mohammadinejad@uk.ac.ir

فاطمه ابراهیمی

استادیار، ژنتیک و اصلاح نباتات پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، پژوهشگاه افضلی پور ،دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴

چکیده

هدف: حنا با نام علمی *Lawsonia inermis* L. یکی از گیاهان دارویی ارزشمند که در طب و صنایع رنگرزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های حنا بومی ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات فنوتیپی جهت حفظ ذخایر ژنتیکی و پیشبرد برنامه‌های اصلاحی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۴۰ اکوتیپ مختلف حنا در قالب طرح لاتیس با دو تکرار کشت گردید صفات مهم فوتیپی شامل: ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، شاخص سطح برگ، نسبت وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه در ۵ بوته انتخابی

از هر پلات اندازه گیری شد. همچنین استخراج DNA از نمونه‌ها به روش CTAB تغییر یافته انجام شد و تعداد ۹ نشانگر ISSR بر اساس حداکثر تعداد باند چند شکل از بین ۲۰ نشانگر انتخاب و استفاده شد.

نتایج: تجزیه واریانس نشان داد بین اکوتیپ‌ها از نظر تمامی صفات فنوتیپی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تعداد باند زیاد، میزان چند شکلی بالا و متمایز کردن اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده کارآیی بالای نشانگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی حنا بود. تجزیه ساختار ۱۴۰ اکوتیپ حنا را به ۳ زیر جمعیت متفاوت تفکیک کرد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های فنوتیپی بر اساس روش وارد ۱۴۰ اکوتیپ حنا را به چهار گروه تقسیم بندی کرد. اکوتیپ‌های زهکلوت (HA245)، رودبار (ET244) و دو اکوتیپ قلعه‌گنج (EH100وGB107) با مقدار میانگین بالا از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه در گروه دوم کلاستر فنوتیپی قرار گرفتند. همچنین نتایج تجزیه کلاستر فنوتیپی نشان داد که اکوتیپ‌های با بالاترین مقدار میانگین ارتفاع بوته در گروه دوم قرار گرفتند. سه اکوتیپ از منطقه قلعه‌گنج (AGH140، LA137 و NE253) و یک اکوتیپ از منطقه شهداد (SHH157) بیشترین مقدار وزن خشک ساقه را به خود اختصاص دادند و همه درگروه سوم تجزیه کلاستر فنوتیپی واقع شدند. نتایج تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی بر اساس روش جاکارد و تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ماتریس فاصله داده‌های ژنوتیپی اکوتیپ‌ها را در تعداد گروه‌های بیشتری قرار داد. داده‌های مولکولی نسبت به اطلاعات فنوتیپی توانست بین اکوتیپ‌ها از لحاظ ژنتیکی تمایز بیشتری نشان دهد. فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها نشان داد کمترین تفاوت بین اکوتیپ‌های AGH140 و NG142 از منطقه قلعه‌گنج و بیشترین تفاوت را اکوتیپ GA198 از منطقه دلگان نسبت به سایر اکوتیپ‌ها نشان داد.

نتیجه‌گیری: ساختار جمعیت حاصل در این مطالعه می‌تواند پیش نیاز لازم جهت انجام نقشه‌یابی ارتباطی در مطالعات بعدی باشد. نتایج حاصل از تنوع و فاصله ژنتیکی برای حفظ ذخایر ژنتیکی و انتخاب والدین به منظور بهبود ارزش اصلاحی ژنوتیپ‌ها مفید است.

کلیدواژه‌ها: تجزیه به مولفه اصلی، تجزیه کلاستر، شاخص‌های مولکولی، گیاه دارویی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: خاندانی زاده بهشته، علیزاده اردلان، آیین احمد، محمدی نژاد قاسم، ابراهیمی فاطمه (۱۴۰۴) ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت اکوتیپ های حنا بومی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و صفات فنوتیپی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۱)، ۲۷-۴۴.

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

© the authors

مقدمه

حنا گیاهی درختچه‌ای با نام علمی *Lawsonia inermis* L. از تیره حناییان (Lythraceae) در مناطق خشک، نیمه گرمسیری و گرمسیر رشد می‌کند و با مناطق دیگر نیز سازگاری پیدا کرده است. برای جوانه‌زنی، رشد و نمو نیاز به حرارت بالا دارد. برگ و گل حنا هر دو نقش دارویی دارد. برگ‌ها حاوی ماده‌ای رنگی به نام لاوسون یا ۲-هیدروکسی ۱،۴ نفتوکینون (۰/۲۲٪ -۱/۳) بوده و گلیکوزیدهای فنلی متعددی می‌باشد. حنا علاوه بر موارد مذکور دارای مانیتول و موسیلاژ است که موجب خمیری شدن برگ گیاه در تماس با آب می‌شود و به صورت موضعی در درمان بیماری‌های قارچی و باکتریایی (گرم مثبت و گرم منفی) به ویژه در قارچ‌های عامل کچلی و دردهای روماتیسمی به کار می‌رود (Kalantar Motamedi 2015). منابع ژنتیکی گیاهی یکی از مهمترین، پر ارزش‌ترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شوند مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که در آن تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌شود (Mohammadi and Prasanna 2003). در واقع بهبود ژنتیکی هر موجودی وابسته به وجود و ماهیت وسعت تنوع ژنتیکی آن می‌باشد. در راستای این ارزیابی نقاط قوت و ضعف ژنوتیپ‌ها و پتانسیل‌های موجود در آنها شناخته می‌شود. به عبارت دیگر در این ارزیابی‌ها وسعت پایه ژنتیکی هر صفت معلوم می‌گردد. تنوع ژنتیکی نقش بسزایی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی دارد به همین دلیل گام نخست در آغاز هر برنامه اصلاحی ارزیابی تنوع ژنتیکی و پتانسیل بالقوه موجود در توده گیاهی می‌باشد (Hussain et al. 2016). تاکنون تعداد زیادی نشانگرهای مولکولی در تجزیه ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. این نشانگرها از نظر بسیاری ویژگی‌ها مانند درجه چند شکلی، غالب بودن، توزیع کروموزوم‌ها تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌های DNA الگو و هزینه مورد نیاز با یکدیگر تفاوت دارند (Kalantar Motamedi 2015). از سال ۱۹۹۴، نشانگرهای مولکولی به نام ISSR در مطالعات ژنتیکی به کار رفت. تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های Microsatellite یا SSR هدف انجام می‌پذیرد و تنوع حاصله در طول فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمراز تابعی از تعداد واحدهای ریز ماهواره‌ای است. نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD که دارای ۱۰ نوکلئوتید هستند بین ۱۵-۳۰ باز طول داشته و طویلترند. به طوری که سبب می‌شوند دمای اتصال در آنها بالا بوده و از این راه سختی واکنش بیشتر می‌شود (Kalantar Motamedi 2015).این نشانگرها تکرارپذیری نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) را به دلیل طویل بودن طول نشانگرهایشان دارا می‌باشند (Mohammadabadi et al. 2017). آغازگرهای این نشانگر غیراختصاصی می باشد. این تکنیک ساده و سریع است و نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و هزینه ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi and Askari 2012). نشانگر ISSR به صورت گسترده در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی توسط پژوهشگران دیگر مورد استفاده واقع گردیده است (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; Ebrahimi et al. 2022). در مطالعه ژنتیکی

انجام شده بر روی DNA حنا تعداد کروموزوم‌های آن 2n=30-34 گزارش شد (Hanson et al. 2012). در تحقیقی توسط Boubaya et al. (2012)، بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژرم پلاسم جمع‌آوری شده حنا از کشور تونس با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD انجام شد. تجزیه و تحلیل این نشانگرها با استفاده از مولفه‌های اصلی PCO با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله انجام شد. دامنه تشابه بر اساس داده‌های ISSR از بازه ۰/۱ تا ۳۸ /۰ و بر اساس داده‌های RAPD از بازه ۰/۷۰ تا ۰/۳۸ می‌باشد. این ژرم پلاسم‌ها در ۳ گروه بر اساس نشانگر RAPD و ۴ گروه بر اساس ISSR تقسیم‌بندی شدند. در بررسی یکنواختی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت حنا با استفاده از ۱۰ پرایمر ISSR و ۱۴ پرایمر RAPD نتایج نشان داد که بیشترین تعداد باند در پرایمر ۵ (GAC) مشاهده شد. به طورکلی نتایج بیانگر کارآیی این نشانگرها در تشخیص یکنواختی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت می‌باشد (Moharana1 et al. 2017). تنوع ژنتیکی ۱۲ اکوتیپ بومی گیاه دارویی حنا با استفاده از نشانگر ISSR انجام و نتایج نشان داد که نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه حنا کارآیی نسبتا خوبی داشت و در این بررسی کمترین تشابه بین دو اکوتیپ شهداد و بم بود (Kalantar motamedi et al 2015). ارزیابی و طبقه‌بندی ژرم پلاسم بر مبنای صفات فنوتیپی و مارکرهای مولکولی در حفظ ذخایر مهم ژنتیکی اکوتیپ‌های بومی حنا امری مهم و ضروری می‌باشد. اما تاکنون تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ژرم‌پلاسم وسیعی از اکوتیپ‌های بومی ایران انجام نشده است. لذا، مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های حنا از مناطق مختلف کشور با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و صفات مهم فنوتیپی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی ژرم پلاسم مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۱۴۰ اکوتیپ مختلف حنا بود که از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان شهرستان جیرفت تهیه شد (جدول ۱). اکوتیپ‌ها در قالب طرح لاتیس با دو تکرار کشت گردید صفات مهم فوتیپی شامل: ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، شاخص سطح برگ، نسبت وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه در ۵ بوته انتخابی از هر پلات اندازه‌گیری شد.

واکنش زنجیره پلی مراز: نمونه‌گیری از برگ‌های جوان در سال دوم از هر ژنوتیپ انجام شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر۸۰- نگهداری شد. به منظور استخراج DNA ژنومی از روش CTAB تغییر یافته(Zhang et al. 1998). استفاده شد. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، به دو روش الکتروفورز DNA روی ژل آگارز با غلظت یک درصد و روش اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر انجام شد. در این مطالعه تعداد ۹ نشانگر ISSR بر اساس حداکثر تعداد باند چند شکل از بین ۲۰ نشانگر انتخاب و استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱. شماره ۱۴۰ اکوتیپ حنا مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Code of 140 ecotypes of henna used in this study

شماره Number	نام اکوتیپ Ecotype name	شماره Number	نام اکوتیپ Ecotype name	شماره Number	نام اکوتیپ Ecotype name
1	ZE 1	49	HG 102	97	NI 261
2	EH 2	50	CHZ 104	98	NA 263
3	HK 4	51	GB 107	99	ND 264
4	KA 6	52	ZA 110	100	AI 266
5	AL 10	53	GA 115	101	AD 269
6	LU 13	54	AN 117	102	SHA 151
7	UT 14	55	NI 120	103	AH 152
8	TU 17	56	GN 122	104	HD 153
9	UI 26	57	NA 126	105	DA154
10	LA 29	58	AG 129	106	AD 155
11	AK 30	59	GH 131	107	SHH 157
12	KH 31	60	HE 133	108	SHD 160
13	HE 33	61	EI 134	109	DH 163
14	EZ 35	62	LA 137	110	TKH 166
15	ZH 38	63	AGH 140	111	KHT 168
16	ZK 41	64	NG 142	112	TT 170
17	ZA 43	65	NH 252	113	BI 172
18	ZI 45	66	NE 253	114	HO 272
19	ZU 48	67	NI 254	115	BGM 174
20	ZT 49	68	NA 255	116	BMG 176
21	EA 50	69	NGH 259	117	BBR 177
22	EL 241	70	DA 188	118	LA 178
23	EU 243	71	AI 191	119	AM 181
24	ET 244	72	LG193	120	ME 183
25	HA 245	73	GN 195	121	ER 186
26	HI 248	74	NB 196	122	GI 239
27	HU 251	75	GA198	123	IR 240
28	RI 51	76	AN 200	124	KA 143
29	IG 54	77	DI 202	125	AH 145
30	GA 57	78	DG 204	126	S1
31	AN 60	79	DA 206	127	S2
32	NA 62	80	KN 207	128	S3
33	AG 63	81	DN 208	129	S4
34	GI 64	82	AI 209	130	S5
35	IR 68	83	AG 211	131	S6
36	AI 70	84	LG 213	132	S7
37	AR 72	85	NK 216	133	S8
38	GI 74	86	BD 218	134	S9
39	GR 77	87	ZG 219	135	S10
40	IR 80	88	GG 221	136	S11
41	IA 83	89	LA 223	137	S12
42	IN 85	90	LN 227	138	S13
43	GN 87	91	ZZ 228	139	S14
44	RI 93	92	GZ 229	140	S15
45	GHA 94	93	GR 231		
46	AI 96	94	GN 234		
47	LE 99	95	NA 237		
48	EH 100	96	NG 238		

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر master mix از شرکت parstous، ۱/۴ میکرو لیتر DNA،۶/۶ میکرو لیتر آب و ۲ میکرو لیتر آغازگر انجام شد. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Biometra thermocycler,type T-48Personal از کشور آلمان با برنامه دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه و ۳۴ سیکل با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر متغییر با توجه به هر پرایمر متفاوت (۶۱-۵۰ درجه) به مدت ۱۵ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت دمای اتصال نهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. به منظور نمایان‌سازی و تفکیک باندها، محصول واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد و سپس با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. پس از رنگ‌آمیزی نمونه ژل به داخل دستگاه ژل داک منتقل و عکس‌برداری از آن انجام شد (شکل ۱).

جدول۲. توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده در مطالعه

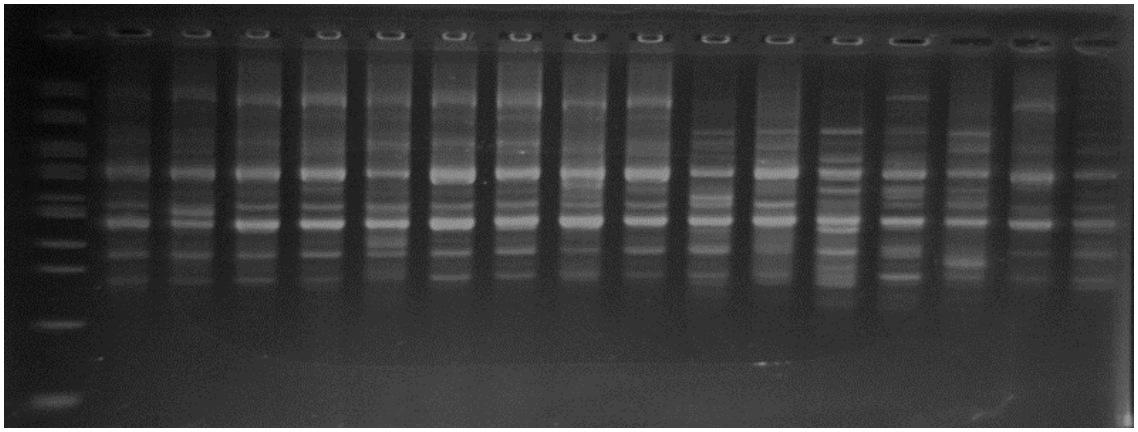
Table 2. Sequence and annealing temperature of ISSR primers used in this study

آغازگر primer	توالی آغازگر Sequence primers	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
(GTGC)4	5`GTGCGTGCGTGCGTGC3`	59
(AGG)6	5`AGGAGGAGGAGGAGGAGG3`	61
T(GA)9	5`TGAGAGAGAGAGAGAGAGA3`	52
(AG)8T	5`AGAGAGAGAGAGAGAGT3`	50
T(AC)8	5`TACACACACACACACAC3`	51
T(CA)8	5`TCACACACACACACACA3`	51
T(GA)	5`TGAGAGAGAGAGAGAGA3`	50
(GACA)4	5`GACAGACAGACAGACA3`	50
(GA)9T	5`GAGAGAGAGAGAGAGAGAT3`	50

آنالیزهای آماری-تجزیه واریانس: در ابتدا تجزیه واریانس در قالب طرح لاتیس انجام گرفت. از آنجا که سودمندی طرح لاتیس نسبت به بلوک کامل تصادفی به صد نزدیک بود تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام پذیرفت. در واقع این نشان‌دهنده ارجح بودن طرح بلوک‌های کامل تصادفی نسبت به طرح لاتیس ساده است.

تجزیه ساختار ژنتیکی: ساختار جمعیت داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر ISSR درحالت Admixture (مخلوط) با ۱۰۰۰۰ طول دوره و تعداد تکرار۱۰۰۰۰۰در مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) با استفاده از نرم‌افزار ۲.۳.۴

STRUCTURE بررسی شد. تعداد زیر جمعیت احتمالی (عدد K بهینه) بر اساس میزان ΔK مطابق روش اوانو و همکاران2005 با استفاده از نرم افزار HARVESTER STRUCTURE مشخص شد.



شکل ۱. الکتروفورز نمونه هایDNA استخراج شده ازاکوتیپ های حنا بر روی ژل آگارز

Figure 1. Electrophoresis of the extracted DNA samples from henna ecotypes of henna on agarose gel

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به عامل‌ها: تجزیه‌ی خوشه‌ای داده‌های فنوتیپی به روش وارد و داده‌های مولکول به روش جاکارد و تجزیه به عامل‌ها با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس: نتایج تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک کامل تصادفی (جدول ۳) نشان داد بین اکوتیپ‌ها از نظر تمامی صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. این امر بیانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای از لحاظ صفات مورد بررسی و امکان گزینش برای این صفات در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه و استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی است.

ساختار ژنتیکی جمعیت: در این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۱۴۰ اکوتیپ حنا، از ۹ آغازگر ISSR استفاده شد. امتیازبندی نوارها به صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) برای هر نوار صورت گرفت. در مجموع از ۱۳۸ باند تولید شده، تعداد ۳۲ باند یک شکلی و ۱۰۶ نوار چند شکلی نشان دادند و بیشترین درصد چند شکلی را نشانگرT9 (GA) نشان داد. شاخص PIC از ۱/۷۷ (نشانگر T(GA)9) تا ۵/۵۰ (T(GA)8) متغییر بود. همچنین شاخص نشانگر بیشترین مقدار را در نشانگر 4(GACA) نشان داد (جدول ۴).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ٣. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ١٤٠ اکوتیپ حنا

Table 3. Analysis of variance for studied traits in 140 ecotypes of henna

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	ارتفاع بوته plant height	وزن خشک برگ leaf dry weight	وزن خشک ساقه stem dry weight	شاخص سطح برگ Leaf area index	نسبت وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه leaf dry Weight/ stem dry weight
بلوک	1	1555.71**	45.32 ns	1428.41**	364.11**	17.71**
تیمار	139	739.39**	119.50**	78.77**	174.89**	0.20**
خطا	139	6.93	15.62	17.21	36.04	0.14
CV		2.30	22.72	29.57	22.32	27.40
میانگین		114.41	17.39	14.02	26.89	1.36

** : معنی‌دار در سطح احتمال ١٪

جدول ٤. شاخصهای مولکولی برای ٩ آغازگرISSR دراکوتیپ های حنا

Table 4. Molecular indexes for 9 ISSR primers in ecotypes of date henna

آغازگر Primer combination	تعداد باند چند شکل Polymorphic percentage	محتوای اطلاعات چند شکل PIC	شاخص نشانگر Marker index
(GTGC)4	60	3.186	28.674
(AGG)6	60	2.210	13.26
T(GA)9	69	1.773	19.503
(AG)8T	60	3.568	21.408
T(AC)8	94	4.340	65.1
T(CA)8	79	3.882	42.702
T(GA)8	65	5.504	71.552
(GACA)4	90	5.188	93.384
(GA)9T	100	4.281	72.777

در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت بر اساس داده‌های مولکولی مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) محاسبه و عدد K بهینه بر اساس بیشترین مقدار ΔK طبق روش اوانو و همکاران (Evanno et al. 2005) مشخص شد، بیشترین مقدار Delta k برای تعیین مقدار بهینه K (جدول ۵) مربوط به K=3 بود. بنابراین ۱۴۰ اکوتیپ حنا به ۳ زیرجمعیت متفاوت تفکیک شدند. به طور کلی آنالیز ساختار ژنتیکی اکوتیپ‌های حنا وجود تمایز ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها را نشان می‌دهد که آنها را در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی کرده است. تجزیه ساختار ۱۴۰ اکوتیپ جمع‌آوری شده از ۱۱ منطقه نشان داد بر اساس منشا اکوتیپ‌ها از هم تفکیک نشده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که روابط بین ژنوتیپ‌ها متاثر از تنوع درونی هر منطقه جغرافیایی می‌باشد (Ren et al. 2013). وجود زیرگروه‌ها در داخل یک جمعیت بزرگ می‌تواند ببه دلایلی از جمله منشاء جغرافیایی مختلف ژنوتیپ‌ها، انتخاب طبیعی یا انسانی یا رانش ژنتیکی باشد (Flint-Garcia et al. 2003; Buckler and Thornsberry 2002).

جدول ۵. نتایج روش اوانو در انتخاب K بهینه

Table 5. The results of method s'Evanno in optimal K selection

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	|Ln''(K)|	Delta K
2	5	-11175.680000	0.637966	—	—	—
3	5	-10661.500000	1.630951	514.180000	195.680000	119.979106
4	5	-10343.000000	285.890862	318.500000	87.140000	0.304802
5	5	-9937.360000	7.002000	405.640000	131.660000	18.803200
6	5	-9663.380000	2.901207	273.980000	110.860000	38.211687
7	5	-9500.260000	48.651958	163.120000	216.840000	4.456963
8	5	-9553.980000	542.269460	-53.720000	431.200000	0.795177
9	5	-9176.500000	105.903329	377.480000	277.980000	2.624847
10	5	-9077.000000	149.506321	99.500000	—	—

پارامترهای ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها: برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در درون زیرجمعیت‌های حاصل از تجزیه ساختار ژنتیکی، پارامترهای تعداد آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی و میزان چند شکلی در هر زیر جمعیت محاسبه گردید (جدول ۶). بیشترین میزان شاخص شانون در زیر جمعیت سوم به مقدار ۱/۴۳ مشاهده شد. همچنین زیر جمعیت سوم باز لحاظ مقادیر پارامترهای دیگر تنوع ژنتیکی از جمله تعداد آلل مشاهده شده و موثر، میزان هتروزیگوسیتی بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد.

جدول ٦. پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده درون جمعیت‌های حنا با استفاده از نشانگر ISSR

Table 6. Estimated genetic variation parameters within subpopulations of henna using ISSR markers

زیر جمعیت (تعداد) Subpopulation (N)	تعداد آلل‌های مشاهده شده Number of observed alleles	تعداد آلل‌های موثر Number of effective alleles	شاخص شانون Shanoon Index	هتروزیگوسیتی Heterozygosity	درصد چند شکلی Polymorphic percentage
Pop1 (37)	1.71	1.45	0.39	0.26	77.64
Pop2 (27)	1.84	1.46	0.41	0.27	86.79
Pop3 (4)	1.86	1.47	1.43	0.28	86.79

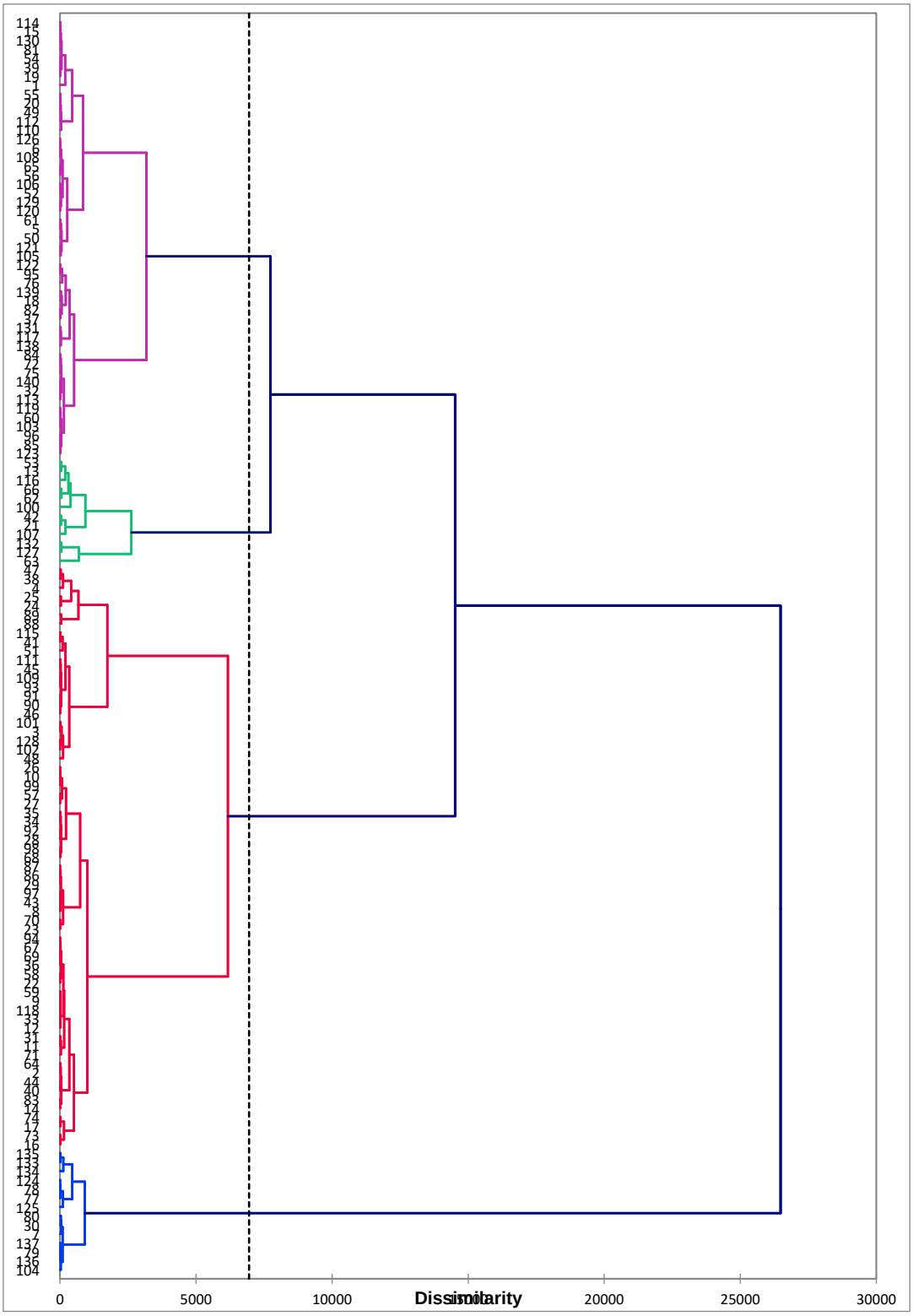
تجزیه خوشه ای داده های فنوتیپی و مولکولی: بررسی تنوع ژنتیکی یک راه موثر و کارآمد جهت برآورد تنوع و ترسیم روابط فنوتیپی در میان ارقام را فراهم می‌کند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های فنوتیپی بر اساس روش وارد ۱۴۰ اکوتیپ حنا را به چهار گروه تقسیم‌بندی کرد .تفاوت ژنتیکی کم بین ژنوتیپ‌ها و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌تواند ناشی از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت‌های ژنتیکی، خویشاوندی‌های احتمالی و داشتن اجداد مشترک باشد (Mahasi et al. 2009; Amini et al. 2008; Esposito et al. 2013). بررسی قرابت‌ها نشان داد که برخی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک منطقه با سایر ژنوتیپ‌های آن منطقه رابطه خویشاوندی دوری دارند در حالی که با برخی ژنوتیپ‌های مناطق دیگر رابطه نزدیکی دارد. برای مثال اکوتیپ‌های منطقه زهکلوت در گروه‌های مختلف قرار گرفتند و یا برخی اکوتیپ‌های کهنوج و دلگان در یک گروه قرار گرفتند. این نشان می‌دهد که در بین ارقام کشت شده در این مناطق احتمال اختلاط ژنوتیپی اتفاق افتاده است که سبب عدم امکان طبقه‌بندی این ژنوتیپ‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی گردید . البته در خصوص برخی ژنوتیپ‌ها تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق داشت.

اکوتیپ‌های زهکلوت (HA245)، رودبار (ET244) و دو اکوتیپ قلعه‌گنج (EH100 وGB107) با مقدار میانگین بالا از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه در گروه دوم کلاستر فنوتیپی قرار گرفتند. همچنین نتایج تجزیه کلاستر فنوتیپی نشان داد که اکوتیپ‌های با بالاترین مقدار میانگین ارتفاع بوته در گروه دوم قرار گرفتند. سه اکوتیپ از منطقه قلعه‌گنج (AGH140، LA137 و NE253) و یک اکوتیپ از منطقه شهداد (SHH157) بیشترین مقدار وزن خشک ساقه را به خود اختصاص دادند و همه درگروه سوم تجزیه کلاستر فنوتیپی واقع شدند.

نتایج تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های مولکولی بر اساس روش جاکارد اکوتیپ‌ها را در تعداد گروه‌های بیشتری قرار دادند و نشان‌دهنده تمایز بالا بین اکوتیپ‌ها از لحاظ ژنتیکی است. به طور کلی طبقه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی در مقایسه با صفات مورفولوژیک می‌تواند بیشتر قابل اعتماد باشد. نتایج نشان داد گروه اول و پنجم اکثر اکوتیپ‌های حنا را به ترتیب با ۶۲/۸۸ و ۲۷/۱۴ درصد از جمعیت به خود اختصاص دادند. فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها نشان داد کمترین تفاوت بین اکوتیپ‌های AGH140 و NG142 از منطقه قلعه‌گنج و بیشترین تفاوت را اکوتیپ GA198 از منطقه دلگان نسبت به سایر اکوتیپ‌ها نشان داد. نتایج حاصل از تنوع و فاصله ژنتیکی برای انتخاب والدین به منظور بهبود ارزش اصلاحی ژنوتیپ‌ها مفید است. به طوری که تلاقی بین ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی بیشتر، می‌تواند منجر به ایجاد دورگ‌هایی با پتانسیل ژنتیکی بالاتر نسبت به والدین خود باشد. در کل تجزیه خوشه‌ای فنوتیپی و مولکولی در مطالعه حاضر تطابق چندانی نداشتند. گروه‌بندی بر اساس داده‌های فنوتیپی براساس پتانسیل‌های ژنوتیپ‌ها می باشد و نشان می دهد در شرایط محیطی مشابه کدام واریته‌ها می‌تواند به طور مشابه خصوصیات مشابه از خود نشان دهد. ولی نشانگرهای مولکولی اختلاف در ژنوم را نشان می‌دهد و این اختلاف به شرایط محیطی وابسته نیست. از طرف دیگر تمامی ژنوم گیاه نیز تحت پوشش قرار نگرفته است تا اطلاعات مولکولی بسیار دقیقی استحصال گردد، لذا این دو گروهبندی در تطابق با یکدیگر نبودند.

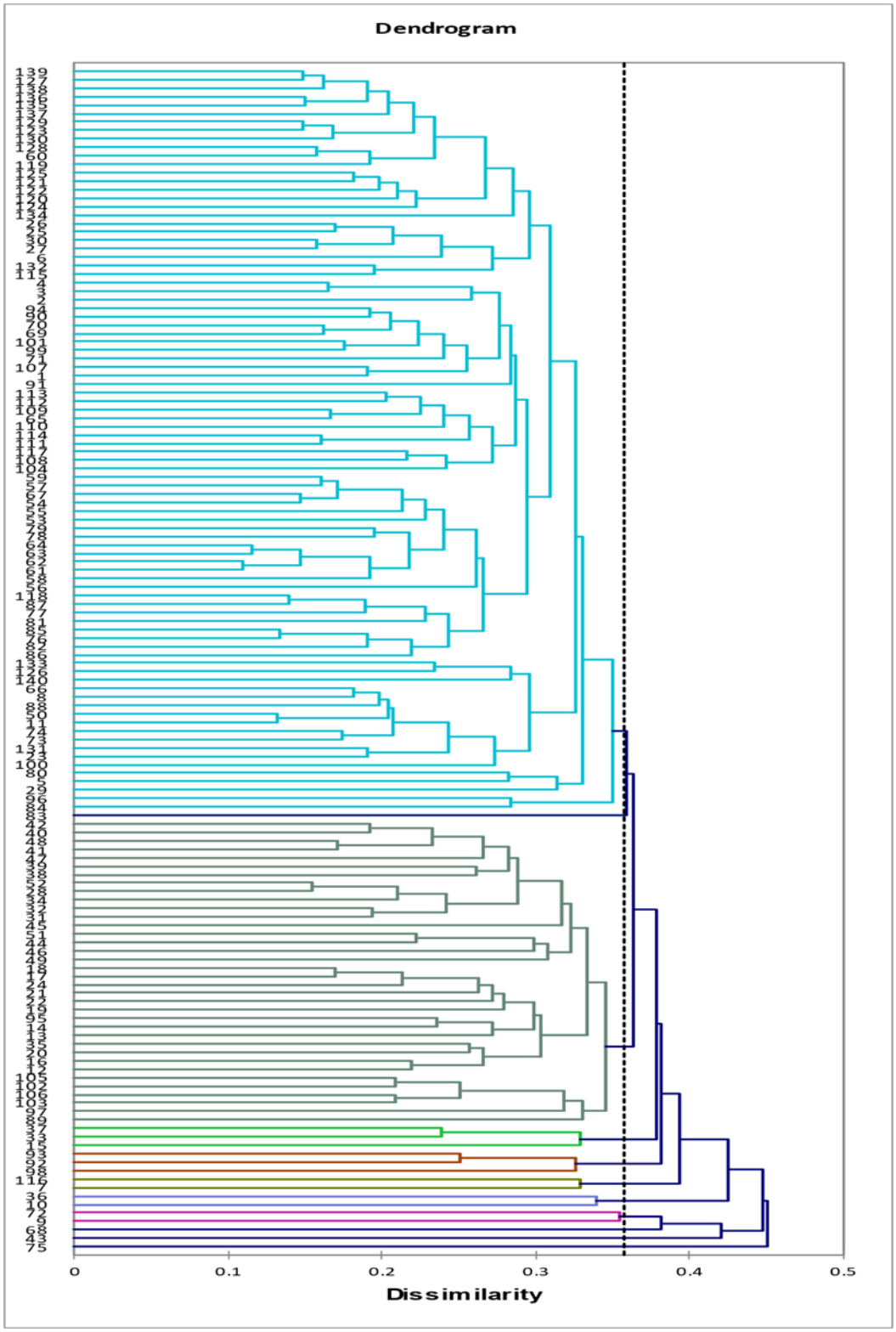
تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های مولکولی: تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ماتریس فاصله داده‌های ژنوتیپی (PcoA) انجام و پراکنش جمعیت‌ها بر اساس دو مولفه اول و دوم در (شکل ۴) نشان داده شده است. مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۷/۸۸ و ۵/۴۹ از واریانس کل را توجیه کردند. تجمع افراد در یک نقطه از پلات تشابه ژنتیکی آنها را نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده از تجزیه به مولفه‌های اصلی بیانگر این است که گروه‌بندی مشخصی از ژنوتیپ‌ها وجود ندارد. یک دلیل برای این موضوع می‌تواند بخاطر تعداد نابرابر ژنوتیپ‌ها از هر منطقه در ژرم پلاسم مورد بررسی باشد (Mansori et al. 2016).

همچنین نتایج نشان داد نشانگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه توانسته است ژنوتیپ‌ها را به خوبی از هم تفکیک کند و پراکنش نسبتا خوبی در سطح ژنوم داشته است. نتایج تجزیه خوشه‌ای مولکولی به نوعی تأییدی بر نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی بود. برای مثال اکوتیپ‌های GA198 (از منطقه دلگان)، GN87 (از ریگان) و NA255 (از منطقه قلعه‌گنج) در هر دو نوع گروه‌بندی در گروه‌های مجزا از سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفتند و یا افراد با تشابه ژنتیکی بالا در هر دو گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مولکولی و تجزیه به مولفه‌های اصلی در گروه مشابه قرار گرفتند.



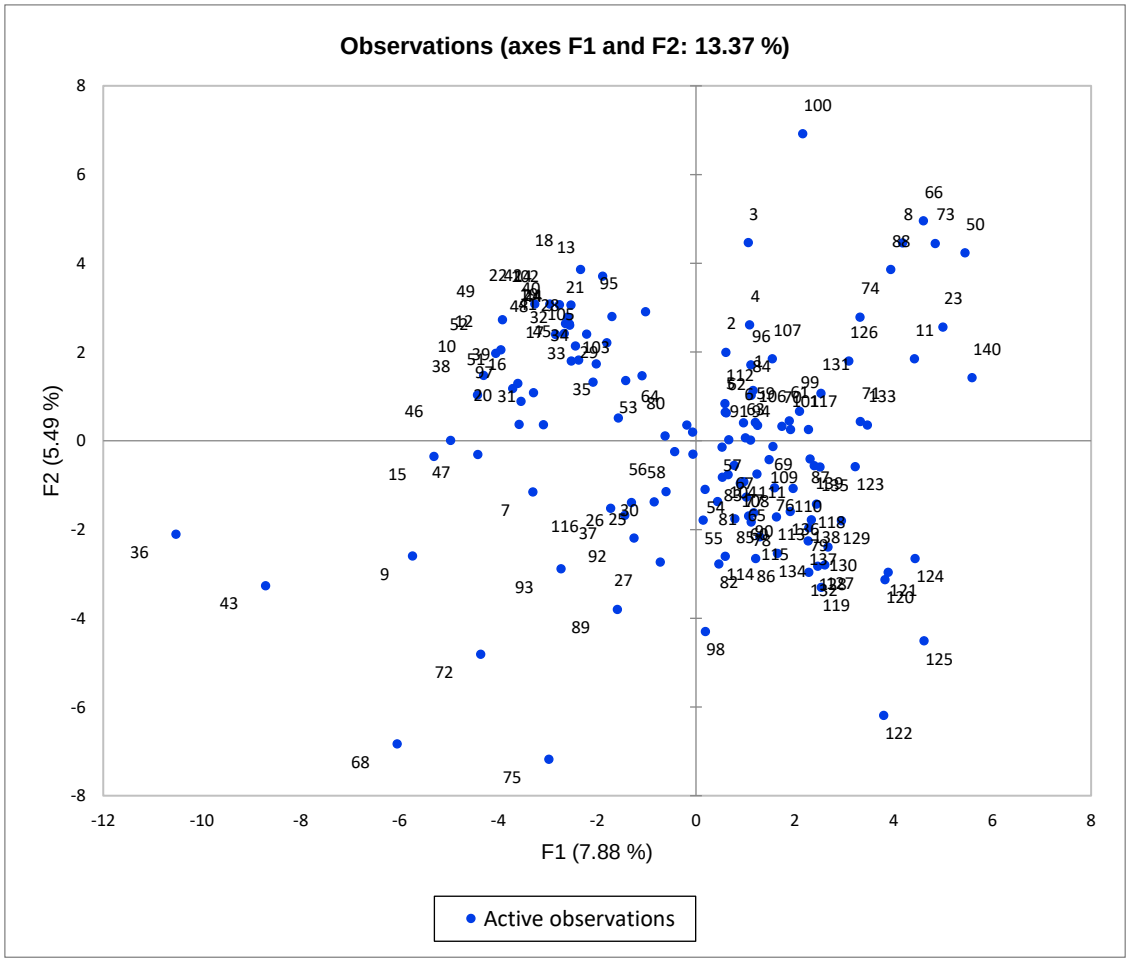
شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های مختلف حنا با استفاده از صفات فنوتیپی بر اساس روش وارد

Figure 2. Cluster analysis of different ecotypes of henna using morphological traits based on Ward method



شکل۳. تجزیه کلاستر اکوتیپ‌های مختلف حنا با استفاده از استفاده از نشانگر ISSR بر اساس روش جاکارد

Figure 3. Cluster analysis of different ecotypes of henna using ISSR marker based on Jacard method



شکل ٤. نمایش دو بعدی تجزیه مولفه اصلی بر اساس دو مولفه اول دراکوتیپ‌های مختلف حنا با استفاده از نشانگر ISSR

Figure 4. Biplot diagram of the principal component analysis based on the first two principal components in the different ecotypes of henna using ISSR marker

نتیجه‌گیری: آگاهی از تنوع ژنتیکی گیاه دارویی حنا که از نقاط جغرافیایی مختلف ایران جمع‌آوری شده است، تاثیر مهمی بر حفظ و استفاده از این منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی دارد. همچنین تجزیه ساختار جمعیت در این مطالعه می‌تواند پیش‌نیاز لازم جهت انجام نقشه‌یابی ارتباطی در مطالعات بعدی باشد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR به خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده‌اند. تولید تعداد باند زیاد، میزان چند شکلی بالا و متمایز کردن اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده کارآیی بالای نشانگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی حنا بود و می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ‌ها و گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی بر اساس روش جاکارد و تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ماتریس فاصله داده‌های ژنوتیپی نسبت به اطلاعات فنوتیپی توانست بین اکوتیپ‌ها از لحاظ ژنتیکی تمایز بیشتری نشان دهد. بطور کلی نتایج

مطالعه حاضر نشان داد اکوتیپ‌های زهکلوت (HA245)، رودبار (ET244) و دو اکوتیپ قلعه (EH100 وGB107) از لحاظ کلیه صفات مورد بررسی مطلوب و در یک گروه فنوتیپی قرار گرفتند.

سپاسگزاری: از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی ، پژوهشگاه افضلی پور به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. فصلنامه پژوهش‌های تولیدات دامی ۷، ۱۹۲-۱۸۶.

کلانتر معتمدی گلرخ (۱۳۹۳) بررسی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی حنا در استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی وکروماتوگرافی مایع (HPLC) ۱۰۵-۱.

کلانتر معتمدی گلرخ، باقی‌زاده امین، ملکی محمود، ترکزاده ماهانی مسعود (۱۳۹۳) بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی حنا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار ۱۸-۲۰.

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.

منصوری سجاد ، اشرف مهرابی علی، محمدی ولی اله، آرمینیان علی، رودر ماریون (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و الگوی عدم تعادل لینکاژی در ژنوتیپ‌های گندم دورو Triticum durum Desf با استفاده از نشانگرهای اس .ان.پی. مجله ژنتیک نوین۱۳، ۱۶۸-۱۵۷.

References

Amini F, Saeidi G, Arzani A (2008) Study of genetic diversity in safflower genotypes agromorphological traits and RAPD markers. Euphytica 163, 21–30 .

Boubaya A, Hannachi H, Marzougui N, et al (2013) Genetic diversity assessment of Lawsonia inermis germplasm in Tunisian coastal oases by ISSR and RAPD markers. Dendrobiology 69, 31-39.

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A, 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).

Ebrahimi F (2022) Allelic variation, population structure and genetic diversity in different genotypes of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) using ISSR marker. Agric Biotechnol J 14(1), 135 -154 (In Persian).

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure a simulation study. J Mol Ecol 14, 2611- 2620.

Esposito MA, Gatti1 I, Cravero VP et al. (2013) Combining abilities and heterotic groups in Pisum sativum L. Aust J Crop Sci 7, 1634-1641.

Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. Annu Rev Pant Bol 54, 357-374.

Mansori S, Mehrabi AA, Mohammadi V, et al (2016) Genetic Variation, Population Structure and Linkage Disequilibrium in Durum Wheat (*Triticum durum Desf.*) Genotypes using SNP Markers. Mod Genet 13, 157-168 (In Persian).

Hanson L, McMahon K A, Johnson M A.T, Bennett M. D (2001) First nuclear DNAC- values for 25 angiosperm families. Ann Bot 88, 851-858.

Hussain MI, Lyra DA, Farooq M, et al. (2016) Salt and drought stresses in safflower. Agron Sustain Dev 36, 1-31.

Kalantar Motamedi G (2014) Evaluation of genetic and biochemical diversity of Lawsonia inermis by using molecular markers and high performance liquid charomatograophy (HPLC). Shahid Bahonar University. PP.1-105 (In Persian).

Kalantar Motamedi G, Baghizadeh A, Malki M, et al. (2014) Evaluation of genetic diversity of the medicinal plant henna using the ISSR molecular marker. The second Nat Conf Med Plant Sustain Agric 2, 18-20 (In Persian).

Laurentine H (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genet Resour Crop Evol 56, 277-292.

Mohammadi S. A and B. M. Prasanna (2003) Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. Crop Sci 43, 1235- 1248.

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

Mohammadabadi MR, 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 -158.

Moharana A, Das A, Subudhi E, Naik S, Barik (2017) High Frequency Shoot Proliferation from Cotyledonary Node of Lawsonia inermis L. and Validation of their Molecular Finger Printing. J Crop Sci Biotech 20(5), 405-416

Mahasi MJL, Wachira FN, Pathak RS, Riungu TC (2009) Genetic polymorphism in exotic Safflower (*Carthamus tinctorius L*.) using RAPD markers. J Plant Breed Crop Sci 1, 008-012.

Ren J, Sun D, Chen L, et al. (2013) Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a Worldwide Germplasm Collection of durum wheat. Int J Mol Sci 14, 7061-7088.

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.

Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. J Virol Method 71, 45-50.