

Evaluation of genetic diversity and population structure analysis in some *Rosa damascena* Mill. germplasms from Iran using ISSR markers

Atefeh Sadat Mostafavi 

Ph.D student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: mostafavi.ate@gmail.com

Mansour Omid 

*Corresponding author. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: momidi@ut.ac.ir

Reza Azizinezhad 

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: r.azizi@srbiau.ac.ir

Alireza Etminan 

Associate Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail: alietminan55@yahoo.com

Hassanali NaghdiBadi 

Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran. Email: Naghdibadi@yahoo.com, Naghdi@imp.ac.ir

Abstract

Objective

Awareness of genetic diversity and population structure is very effective in conserving germplasm and preventing the weakening of the genetic base and provides the opportunity to harness the potential of desirable genes in the genetic repository in breeding programs. The aim of this study was to investigate the genetic diversity in the germplasm of *Rosa damascena* collected from different regions of Iran and to identify the genetic relationships of different populations for use in breeding and Conservation of genetic resources programs.

Materials and methods

Genetic diversity and population structure were evaluated in a collection of *Rosa damascena* Mill germplasm, including 40 accessions collected from five geographical regions of Iran using inter-

simple sequence repeats (ISSR) markers.

Results

Twelve ISSR primers replicated 202 multiform genomic fragments, the number of these bands ranged from 15 to 18 in different primers and the average was 16.83. The average Polymorphism Information Content (PIC) and marker index (MI) for the primers used ranged from 0.35 to 0.46 and 5.25 to 8.28, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that intra-population diversity accounts for a greater share (93%) of total molecular diversity. The dendrogram obtained from cluster analysis based on method neighbor joining categorized the accessions into 3 main groups, which were confirmed by principal coordinate analysis (PCoA). Based on Jacard coefficient, the highest genetic distance (0.837) was observed between Hormozgan and Barzok 3 accessions, and the lowest genetic distance between Semnan accessions (0.141). The results of population structure using STRUCTURE software showed no strong relationship with the geographical distribution of accessions.

Conclusions

Cluster analysis and principal coordinate analysis were consistent with the genetic relationships derived by STRUCTURE analysis in many cases. The results showed that the grouping of accessions based on molecular data is not strong related to their geographical origin, thus strengthening the probability of gene flow between populations. Genetic diversity obtained by ISSR marker indicates the ability to identify interspecies and intraspecies differences of this marker.

Keywords: *Rosa damascena* Mill. ISSR, Genetic diversity, Population structure

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mostafavi AS, Omidi M, Azizinezhad R, Etminan A, NaghdiBadi H (2022) Evaluation of genetic diversity and population structure analysis in some *Rosa damascena* Mill. germplasms from Iran using ISSR markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 197-219.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 197-219.

DOI: 10.22103/jab.2022.18496.1357

Received: January 30, 2022.

Accepted: February 26, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




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


© the authors

بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در برخی ژرم پلاسما های گل محمدی

(*Rosa damascena* Mill.) ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR


عاطفه سادات مصطفوی 

دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: mostafavi.ate@gmail.com

منصور امیدی 

* نویسنده مسئول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه:

momidi@ut.ac.ir


رضا عزیزی نژاد 

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: r.azizi@srbiau.ac.ir

علیرضا اطمینان 

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

alietminan55@yahoo.com

حسنعلی نقدی بادی 

دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران. رایانامه: Naghdi@imp.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱

چکیده

هدف: آگاهی از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در حفاظت از ژرم پلاسما گیاهی و جلوگیری از ضعیف شدن پایه ژنتیکی گونه‌های زراعی موجود بسیار مؤثر است و فرصت بهره‌گیری از پتانسیل ژن‌های مطلوب در خزانه ژنتیکی را در برنامه‌های به‌نژادی فراهم می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما گل محمدی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و شناسایی روابط ژنتیکی جمعیت‌های مختلف به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در یک مجموعه از ژرم پلاسما گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

شامل ۴۰ اکسشن جمع‌آوری شده از پنج منطقه جغرافیایی ایران با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهورهای مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: دوازده آغازگر ISSR، ۲۰۲ قطعه ژنومی چند شکل تکثیر نمودند، تعداد این باندها در آغازگرهای مختلف از ۱۵ تا ۱۸ متغیر و میانگین آن‌ها ۱۶/۸۳ به دست آمد. متوسط شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگر (MI) برای آغازگرهای مورد استفاده به ترتیب بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۶ و ۵/۲۵ تا ۸/۲۸ متغیر بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع درون جمعیتی سهم بیشتری (۹۳ درصد) از تنوع مولکولی کل را به خود اختصاص داد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم اتصال - همسایگی (NJ) اکسشن‌های مورد مطالعه را در ۳ گروه اصلی دسته‌بندی کرد و گروه‌بندی توسط تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) مورد تأیید قرار گرفت. بیشترین مقدار فاصله ژنتیکی (۰/۸۳۷) بر اساس ضریب جاکارد بین اکسشن‌های هرمزگان و برزک ۳ و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۴۱) بین اکسشن‌های سمنان ۱ و سمنان ۲ مشاهده شد. نتایج بررسی ساختار جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار STRUCTUR بیانگر عدم وجود ارتباط قوی با پراکنش جغرافیایی اکسشن‌ها بود.

نتیجه‌گیری: تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با روابط ژنتیکی حاصل از تجزیه ساختار جمعیت در بسیاری از موارد سازگار بودند. یافته‌ها نشان داد که گروه‌بندی اکسشن‌ها بر اساس داده‌های مولکولی با منشأ جغرافیایی آن‌ها ارتباط قوی ندارد، در نتیجه احتمال جریان ژن بین جمعیت‌ها تقویت می‌شود. تنوع ژنتیکی به دست آمده به وسیله نشانگر ISSR نشان‌دهنده قابلیت شناسایی تفاوت‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای این نشانگر می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ISSR، *Rosa damascena* Mill.، تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مصطفوی عاطفه سادات، امیدی منصور، عزیزینژاد رضا، اطمینان علیرضا، نقدی‌بادی حسنعلی (۱۴۰۱) بررسی تنوع

ژنتیکی و ساختار جمعیت در برخی ژرم پلاسماهای گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) ایران با استفاده از نشانگرهای

ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۱)، ۱۹۷-۲۱۹.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.

© the authors



مقدمه

گیاه گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill متعلق به خانواده Rosaceae می‌باشد. جنس *Rosa* از بیش از ۲۰۰ گونه و ۱۸۰۰۰ رقم تشکیل شده که در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری و به طور خاص در اروپا، آسیا، خاورمیانه و آمریکای شمالی پراکنده و رشد می‌کنند (Gudin S 2000). ارقام نوین گل محمدی به صورت هیبریدهای مشتق شده از تیرپلوئیدی و تتراپلوئیدی هستند که از ۷ تا ۱۰ گونه دیپلوئیدی و تعداد محدودی تیرپلوئیدی منشأ گرفته‌اند. گل محمدی به عنوان یکی از

مهم‌ترین گیاهان خانواده Rosaceae، می‌تواند نقش مهمی در صادرات غیرنفتی و ارزآوری برای کشور ایفا کند، به طوری که در سال‌های اخیر در صنایع غذایی، آرایشی بهداشتی عطریات و داروسازی نقش چشمگیری داشته است.

در جنس Rosa به دلیل تعداد بالای آمیزش‌های طبیعی و جهش‌های پیش‌بینی نشده و اتفاقی، بررسی تنوع ژنتیکی بسیار دشوار بوده اما به دلیل اهمیت بالا، مورد مطالعه محققان قرار گرفته است. مطالعه تنوع ژنتیکی و صفات مطلوب ژنوتیپ‌های گوناگون در نقاط مختلف جغرافیایی، اطلاعات مفید و ضروری برای به‌گزینی و اصلاح ارقام مورد نظر برای توسعه کشت‌وکار و بهره‌برداری بهینه از گل محمدی را فراهم می‌کند تا ایران را به جایگاه واقعی خود در این عرصه نزدیک سازد.

برای کلاس‌بندی ژنوتیپ‌های گل رز، مطالعات شیمیوتاکسونومی اغلب در انواع زیادی از ساختارهای مختلف فنلی و نشانگرهای ایزوزیمی مورد بررسی قرار گرفته است (Kuhns and Fretz 1978; Shameh et al. 2018; Lee and Kim 1997; Walker and Werner 1982). ولی رویکرد مولکولی بیشتر قابل قبول است زیرا دسترسی آسان به مواد ژنتیکی (ژنوم) را فراهم می‌کند که تشخیص روابط گیاهان را بسیار آسان می‌کند (Williams et al. 1990). نشانگرهای مولکولی می‌توانند پلی‌مورفیسم ژنتیکی را در سطح DNA شناسایی کنند و همچنین در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی، برآورد فاصله ژنتیکی، تعیین والدین، انتخاب به کمک نشانگر و مکان‌یابی ژن مورد استفاده قرار گیرند. بسیاری از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به منظور تشخیص تنوع زیستی در بین جمعیت گیاهان در دسترس هستند. با این حال، انتخاب نشانگرهای DNA بستگی به نوع مطالعه دارد. چندین آزمایش مولکولی در سال‌های اخیر برای آزمایش تنوع ژنتیکی گونه‌های رز استفاده شده است که از نظر تئوری، این نشانگرهای مولکولی، روش‌ها، مراحل، میزان چندشکلی، عملکرد و زمان مورد نیاز متفاوتی داشتند (Azeem et al. 2012; Vukosavljev et al. 2013; Henuka et al. 2015; Panwar et al. 2015; Rai et al. 2015; Ogras et al. 2019; al. 2017; Korkmaz and Dogan 2018; Agarwal et al. 2019). از جمله نشانگرهایی که بیشترین کاربرد را در بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان دارند، نشانگرهای ISSR هستند. این نشانگرها به طور گسترده‌ای به عنوان یک تکنیک آسان، سریع، تکرارپذیر و ارزان مبتنی بر ریزماهورها و به‌عنوان نشانگر و ابزاری ارزشمند بر پایه PCR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجودات مختلف مخصوصاً گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. از ویژگی‌های دیگر آن می‌توان به قابلیت تکثیر زیاد، چندشکلی بالا، عدم نیاز به شناسایی ترادف ژنومی خاص آن اشاره کرد. روش ISSR بر پایه تفاوت‌های میان نواحی بین ریزماهورهای استوار بوده و به طور گسترده برای شناسایی تنوع ژنتیکی، روابط و نقشه‌کشی فیلوژنتیکی در بسیاری از گیاهان به کار می‌رود (Reddy et al. 2002).

در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۲۳ ژنوتیپ نسترن وحشی با ۱۵ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ‌ها از سه ناحیه مختلف استان اردبیل جمع‌آوری و مطابق یافته‌ها همه پرایمرها، الگوی بانندی واضح و چندشکل (۷۷ درصد چندشکلی) را دارا بودند (Jamali et al. 2019). در مطالعه‌ای که با استفاده از ۲۴ نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ۲۱ ژنوتیپ متنوع رز متعلق به دو گونه مختلف، *R. damascena* و *Rosa hybrida*، سه گروه متمایز از انواع *Floribunda*، *Hybrid Tea* و

گل محمدی استفاده شد، در مجموع ۲۸۰ قطعه تکثیر شده که از این تعداد ۲۴۴ قطعه چندشکلی بودند و به طور متوسط ۸۶/۴ درصد چندشکلی را ایجاد کردند (Joshi et al. 2021). در این راستا در پژوهشی دیگر استفاده از نشانگر مولکولی ISSR برای هفت گونه از جنس Rosa جهت به دست آوردن نوارهای واضح و قابل تکرار انجام گرفت (Jabbarzadeh et al. 2010). در مجموع ۶۶ باند واضح و قابل تکرار از ۷ گونه با استفاده از ۶ پرایمر انتخاب شده تکثیر شد که در نهایت ۵۰ باند چندشکل حاصل شد. در پژوهشی چهار جمعیت هیبرید مختلف رز با استفاده از تکنیک ISSR با ۹ پرایمر، بررسی شدند و تمام پرایمرها ۶۴ باند ایجاد کردند که ۵۹ باند آن‌ها چندشکل بودند (Dai-di et al. 2013). همچنین در مطالعه دیگری که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی رزهای مختلف با استفاده از ۳۳ پرایمر ISSR صورت گرفت، ۱۱ پرایمر با چند شکلی بالا جهت بررسی ۳ نوع رز انتخاب شدند و نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای UPGMA نشان داد که تمام ژنوتیپ‌های به کار گرفته شده در این مطالعه در ۲ گروه طبقه‌بندی می‌شوند (Xue et al. 2009). در مطالعه‌ای مشابه محققان (Babaei et al. 2007) در بررسی ۴۰ ژنوتیپ مختلف گل محمدی مناطق مختلف کشور با استفاده از مارکرهای ISSR اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها گزارش کردند، به طوری که تمام نشانگرها سطح بالایی از پلی‌مورفیسم را نشان دادند.

با وجود سابقه طولانی از کشت و کار واریته‌های مختلفی از گیاه گل محمدی در ایران، اطلاعات و مطالعات کافی در رابطه با تنوع ژنتیکی این گیاه در مقایسه با ارقام فراوانی که بومی ایران هستند وجود ندارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در میان ژرم‌پلاسما جمعیت‌های *Rosa damascena* Mill جمع‌آوری شده از مناطق تولیدی ایران، توسط نشانگر ISSR انجام شد. نتایج حاصل از کاربرد این نشانگر در این تحقیق سایر محققان را قادر می‌سازد تا بتوانند برنامه‌های مبتنی بر تنوع ژنتیکی خود را با استفاده از خوشه‌های ژنتیکی برنامه‌ریزی نمایند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این پژوهش شامل ۴۰ اکسشن^۱ گل محمدی جمع‌آوری شده از ۵ منطقه مختلف ایران بود (جدول ۱). این اکسشن‌ها از استان‌های تولیدکننده اسانس گل محمدی در ایران (استان‌های فارس، اصفهان، آذربایجان شرقی، کرمان، سمنان، گیلان، کرمانشاه، لرستان، هرمزگان، تهران و مرکزی) تهیه شدند (شکل ۱). استخراج DNA از نمونه برگ‌های جوان با استفاده از روش CTAB (Doyle and Doyle 1987) انجام گرفت.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به اکسشن‌های گل محمدی مورد مطالعه

Table 1. Details information of *Rosa damascene* Mill. accessions used in the study

ردیف Row	نام اکسشن Accession	استان Province	منطقه Region	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	ارتفاع از سطح دریا AMSL	آب و هوا climate
1	قمصر 1 Ghamsar1	اصفهان Esfahan	I	51°24'57E	33°44'38N	1897	خشک-معتدل Dry-Humid
2	اردهال Ardehal	اصفهان Esfahan	I	51°3'1E	34°2'18N	1788	خشک-گرم Dry-Hot
3	کامو 1 Kamu1	اصفهان Esfahan	I	51°15'56E	33°37'30N	2200	خشک-معتدل Dry-Humid
4	آذران Azaran	اصفهان Esfahan	I	51°7'52E	33°42'43N	2334	خشک-معتدل Dry-Humid
5	ازوار Ozvar	اصفهان Esfahan	I	51°9'12E	33°48'59N	2044	خشک-معتدل Dry-Humid
6	قمصر 2 Ghamsar2	اصفهان Esfahan	I	51°24'57E	33°44'38N	1897	خشک-معتدل Dry-Humid
7	نابر Nabar	اصفهان Esfahan	I	51°12'12E	33°52'18N	1613	خشک-گرم Dry-Hot
8	قه‌رود Ghohrud	اصفهان Esfahan	I	51°24'46E	33°40'23N	2300	خشک-گرم Dry-Hot
9	برزک 1 Barzok1	اصفهان Esfahan	I	51°13'38E	33°47'9N	2044	خشک-معتدل Dry-Humid
10	کامو 2 Kamu2	اصفهان Esfahan	I	51°15'56E	33°37'30N	2200	خشک-معتدل Dry-Humid
11	برزک 2 Barzok2	اصفهان Esfahan	I	51°13'38E	33°47'9N	2044	خشک-معتدل Dry-Humid
12	برزک 3 Barzok3	اصفهان Esfahan	I	51°13'38E	33°47'9N	2044	خشک-معتدل Dry-Humid
13	داراب Darab	فارس Fars	II	54°32'40E	28°45'7N	1139	نیمه خشک-معتدل Semi arid- Humid
14	میمند Meymand	فارس Fars	II	52°45'12E	28°52'4N	1532	خشک-گرم Dry-Hot
15	شیراز Shiraz	فارس Fars	II	52°31'52E	29°36'37N	1532	نیمه گرم-گرم Semi warm- Warm
16	میناب Minab	هرمزگان Hormozgan	II	57°5'14E	27°7'52N	27	مرطوب-گرم Humid-Warm
17	هرمزگان Hormozgan	هرمزگان Hormozgan	II	56°16'51E	27°11'11N	0	مرطوب-گرم Humid-Warm
18	بردسیر Bardsir	کرمان Kerman	II	56°34'27E	29°55'22N	2047	خشک-گرم Dry-Hot
19	لاله زار Lalezar	کرمان Kerman	II	55°8'50E	30°6'24N	1853	خشک-گرم Dry-Hot
20	کرمان Kerman	کرمان Kerman	II	57°4'44E	30°16'60N	1788	خشک-گرم Dry-Hot

خشک-گرم Dry-Hot	1788	30°12'17N	57°32'38E	II	کرمان Kerman	سیرچ Sirach	21
مرطوب-معتدل Wet-Humid	1906	35°45'24N	52°46'14E	III	تهران Tehran	فیروزکوه Firuzkooh	22
نیمه خشک-معتدل Semi arid-Humid	2556	35°49'27N	51°46'52E	III	تهران Tehran	لواسانات Lavasanat	23
خشک-معتدل Dry-Humid	2300	33°53'34N	50°59'56E	III	مرکزی Markazi	قالهر Ghalhar	24
خشک-معتدل Dry-Humid	1541	33°59'26N	50°41'2E	III	مرکزی Markazi	دلیجان Delijan	25
نیمه خشک-معتدل Semi arid-Humid	1140	35°34'37N	53°23'31E	III	سمنان Semnan	سمنان 1 Semnan1	26
نیمه خشک-معتدل Semi arid-Humid	1140	35°34'37N	53°23'31E	III	سمنان Semnan	سمنان 2 Semnan2	27
مرطوب-معتدل Wet-Humid	2	37°12'26N	50°0'14E	IV	گیلان Gilan	لاهیجان Lahijan	28
مرطوب-معتدل Wet-Humid	1	37°16'34N	49°35'19E	IV	گیلان Gilan	رشت Rasht	29
مرطوب-معتدل Wet-Humid	216	36°57'33N	50°35'8E	IV	گیلان Gilan	چابکسر Chaboksar	30
مرطوب-معتدل Wet-Humid	-2	37°15'48N	49°56'36E	IV	گیلان Gilan	آستانه Astaneh	31
مرطوب-معتدل Wet-Humid	0	37°18'5N	49°18'54E	IV	گیلان Gilan	صومعه سرا Somesara	32
مرطوب-سرد Cold-Humid	1394	38°4'48N	46°17'31E	IV	آذ. شرقی Az.sharghi	تهریز 1 Tabriz1	33
مرطوب-سرد Cold-Humid	1394	38°4'48N	46°17'31E	IV	آذ. شرقی Az.sharghi	تهریز 2 Tabriz2	34
نیمه خشک-سرد Semi arid-Cold	1276	34°9'8N	47°23'33E	V	کرمانشاه Kermanshah	گربان 1 Garaban1	35
نیمه خشک-سرد Semi arid-Cold	1276	34°9'8N	47°23'33E	V	کرمانشاه Kermanshah	گربان 2 Garaban2	36
نیمه خشک-سرد Semi arid-Cold	1276	33°31'60N	47°36'36E	V	کرمانشاه Kermanshah	کوهدشت 1 Koohtasht1	37
نیمه خشک-سرد Semi arid-Cold	1276	33°31'60N	47°36'36E	V	کرمانشاه Kermanshah	کوهدشت 2 Koohtasht2	38
نیمه خشک-سرد Semi arid-Cold	1347	33°29'16N	48°21'21E	V	لرستان Lorestan	خرم آباد Khoramabad	39
نیمه خشک-معتدل Semi arid-Humid	1276	33°10'12N	48°40'13E	V	لرستان Lorestan	بروجرد Borujerd	40

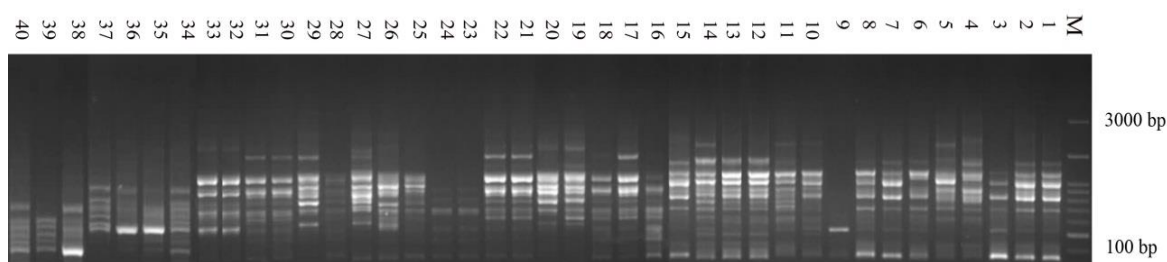


شکل ۱. نقشه ۵ منطقه جمع‌آوری اکسشن‌های گل محمدی مورد مطالعه

Figure 1. The map shows five preferred regions which damask roses were collected.

جهت ارزیابی کیفیت DNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت از ۱۲ آغازگر ISSR که چندشکلی مطلوبی داشتند استفاده شد. در هر واکنش PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر master mix 2XPCR، ۶/۵ میکرولیتر ddH₂O، ۲ میکرولیتر DNA جدا شده از هر نمونه و ۱/۵ میکرولیتر آغازگر، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، طی ۳۵ سیکل و هر چرخه دنا توره شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس توالی‌های DNA هدف طی ۳۵ چرخه دنا تورا سیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و با زمان اتصال آغازگر ۴۵ ثانیه انجام شد.

این روش برای هر آغازگر اعمال و گسترش آغازگر به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه داشت. چرخه تمديد نهایی به مدت ۱۰ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) ادامه داشت. فرآورده‌های حاصل از تکثیر به منظور تشخیص چند شکلی، به چاه‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد (W/V) منتقل شده و سپس الکتروفورز در ۹۰ ولت انجام شد. سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیم بروماید (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غوطه‌ور گردید. با استفاده از روش مستندسازی ژل، تصویر الگوهای باند در زیر نور UV (Bio-Rad) به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲. الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جمعیت‌های مختلف گل محمدی توسط آغازگر ISSR-15 بر روی ژل آگارز. خطوط با علامت ۱ تا ۴۰ نشان دهنده اکسشن‌ها بر اساس شماره در جدول ۱ و M نمایانگر مارکر DNA است.

Figure 2. Bundle pattern of genomic DNA amplification of different populations of *Rosa damascena* by ISSR-15 primer on agarose gel. Lanes marked as 1 to 40 which represent the accessions according to serial numbers in Table 1 and M represents DNA marker.

باندهای تکرارپذیر بر اساس حضور با عدد (۱) یا عدم حضور با عدد (۰) در هر نمونه امتیازدهی و ماتریس داده‌ها تشکیل شد. پارامترهای ژنتیکی برای هر آغازگر شامل تعداد باندهای چند شکل (NPB^۱)، تعداد کل قطعات تکثیری (TAB^۲)، قدرت تمایز (Rp^۳) (Prevost and Wilkinson 1999)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC^۴) (Anderson et al. 1993) و شاخص نشانگر (MI^۵) (Varshney et al. 2007) مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل تغییرات مولکولی (AMOVA) و تعیین شاخص‌های ژنتیکی همانند درصد مکان‌های چند شکلی (PPL^۶)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne^۷) و تعداد کل آلل‌های مشاهده شده (Na^۸)، شاخص تنوع ژنی نی (He^۹) و شاخص اطلاعات شانون (I^{۱۰}) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx انجام شد. برآورد مقادیر فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله جاکارد^{۱۱} توسط نرم‌افزار DARwin ver.6.0 انجام شد. به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها تجزیه خوشه‌ای به روش اتصال - همسایگی (Neighbour-Joining) با استفاده از نرم‌افزار

- ۱ Number of Polymorphic Bands
- ۲ Total Amplified Bands
- ۳ Resolving power
- ۴ Polymorphism Information Content
- ۵ Marker index
- ۶ The Percentage of Polymorphism
- ۷ Number of effective alleles
- ۸ Observed number of alleles
- ۹ Nei's gene diversity
- ۱۰ Shannon's information index
- ۱۱ Jaccard

DARwin^{ver. 6.0} صورت گرفت و دندروگرام مربوطه رسم گردید. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)^۱ نیز با استفاده از نرم افزار GenAlEx^{ver. 6.41} و با هدف ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد. علاوه بر این، تجزیه ساختار جمعیت و گروه‌بندی اکسشن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار STRUCTURE (نسخه ۲،۳،۴) با فرض $K=1$ تا $K=10$ و بر اساس مدل مبتنی بر بی‌بین (Bayesian) و با ۱۰ تکرار صورت گرفت (Evanno et al. 2005). تعداد شاخص‌های burn-in و شاخص MCMC^۲ در هر تکرار ۵۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. سپس به منظور یافتن گروه‌های واقعی از نرم افزار STRUCTURE HARVESTER استفاده شد (Earl 2012).

نتایج و بحث

چند شکلی ISSR: در این پژوهش، تنوع ژنتیکی موجود در بین ۴۰ اکسشن گل محمدی جمع‌آوری شده به وسیله ۱۲ آغازگر مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۲۰۲ قطعه چندشکل تکثیر شد (جدول ۲). این میزان چندشکلی با نتایج مطالعات محققان قبلی که بر روی مجموعه ژنوتیپ‌های رز انجام گرفته است، مطابقت دارد. به عنوان مثال در بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های رز با استفاده از نشانگرهای RAPD میزان چندشکلی ۹۸/۵۴ درصد گزارش شد (Henuka et al. 2015). در پژوهشی دیگر که بر روی تنوع ژنتیکی بیست و هفت گونه از جنس *Rosa* ترکیه، بر اساس نشانگرهای ISSR و RAPD انجام شد به ترتیب ۹۰/۱ درصد و ۸۸/۸ درصد چندشکلی گزارش شد (Korkmaz and Dogan 2018). همچنین پژوهشگران (Panwar et al. 2015) با تحقیقی بر روی رز (*Rosa × hybrida*) چندشکلی ژنتیکی ۹۴ درصد را بر پایه نشانگرهای ISSR گزارش کردند. در پژوهش دیگری که بر روی ۳۳ ژنوتیپ رز با استفاده از ۹ آغازگر ISSR انجام گرفت، ۹۳/۷ درصد چندشکلی با تکرار دی‌نوکلئوتیدها نشان داده شده است (Carvalho et al. 2009) که طبق این گزارش عمدتاً، پلی‌مورفیسم بالا توسط پرایمرهایی که در انتهای ۳ یا ۵ آن‌ها دی‌نوکلئوتید متصل بوده است، آشکار می‌شود. با در نظر داشتن مطالب فوق و مطابقت آنها با نتایج پژوهش فعلی می‌توان نتیجه گرفت که این درصد بالای چندشکلی در تحقیقات مختلف منعکس‌کننده ماهیت هتروزیگوت ساختار ژنوم پلی‌پلوئید گونه‌های گل رز می‌باشد.

تعداد باندهای چندشکل (TAB) از ۱۵ (ISSR-4, ISSR-6, ISSR-1) تا ۱۸ (ISSR-13, ISSR-15, ISSR-23,) (ISSR-25, ISSR-27) متغیر بود و میانگین تعداد باندها به طور متوسط ۱۶/۸۳ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) پارامتری است که میزان چندشکلی یک نشانگر را نشان می‌دهد، زیرا ممکن است از ۰ تا ۰/۵ تغییر کند. هر چه این مقدار بزرگ‌تر باشد، تعداد آلل‌ها بیشتر و فرکانس چندشکلی‌ها برای آن موقعیت در جمعیت مورد مطالعه بیشتر است. در این مطالعه مقادیر PIC

^۱ Principal coordinate analysis

^۲ Markov chain Monte Carlo

از ۰/۳۵ (ISSR-6) تا ۰/۴۶ (ISSR-1, ISSR-15, ISSR-25) با میانگین ۰/۴۱ متغیر بود. قدرت تفکیک آغازگرها (MI) در دامنه بین ۸/۲۸ (ISSR-15, ISSR-25) و ۵/۲۵ (ISSR-6) قرار گرفت که میزان بالای آن نشانه کارایی و کفایت آغازگر در تمایز میان اکسشن‌ها است. علاوه بر این شاخص‌ها، شاخص Rp توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد باندهای قابل امتیازدهی مشخص می‌کند (Prevost and Wilkinson 1999). بیشترین و کمترین میزان Rp به ترتیب متعلق به آغازگرهای ISSR-15 (۱۴/۲) و ISSR-6 (۷/۸) بود درحالی‌که میانگین این شاخص ۱۱/۲ به دست آمد (جدول ۲). در مطالعه حاضر، مقادیر نسبتاً بالای PIC و MI برای آغازگرهای ISSR توانایی تفکیک سیستم‌های نشانگر ISSR را ارائه داده است.

جدول ۲. شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای ISSR استفاده شده در تنوع ژنتیکی موجود در اکسشن‌های گل محمدی
Table 2. Genetic parameters of ISSR primers used in genetic diversity in *Rosa damascene* accessions

آغازگر (primer)	توالی آغازگرها Primer sequence	Ta (°c)	TAB	NPB	PIC	RP	MI
ISSR-1	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	49	15	15	0.46	12.2	6.9
ISSR-4	CTCTCTCTCTTCTTG	47	15	15	0.44	11.4	6.6
ISSR-5	CTCTCTCTCTCTCTRC	49	16	16	0.36	8.1	5.76
ISSR-6	GACAGACAGACAGACA	53	15	15	0.35	7.8	5.25
ISSR-11	GAGAGAGAGAGAGAGARC	45	17	17	0.40	10.55	6.8
ISSR-12	GTGTGTGTGTGTGTGYG	55	17	17	0.43	12.45	7.31
ISSR-13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	55	18	18	0.36	9.55	6.48
ISSR-15	ACACACACACACACC	48	18	18	0.46	14.2	8.28
ISSR-23	ACACACACACACACYG	48	18	18	0.41	11.9	7.38
ISSR-25	DBDACACACACACACA	48	18	18	0.46	13.75	8.28
ISSR-27	ACACACACACACACYA	48	18	18	0.43	12.9	7.74
ISSR-28	CACACACACACACAG	42	17	17	0.37	9.6	6.19
میانگین Mean			16.83	16.83	0.41	11.02	6.92

Ta، TAB، NPB، PIC، RP و MI به ترتیب بیانگر میانگین دمای اتصال آغازگر، تعداد کل قطعات تکثیری، تعداد قطعات تکثیری چندشکل، درصد چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی، قدرت تمایز و شاخص نشانگر

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی: تغییرات در بین و میان جمعیت‌های *Rosa damascena* با تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تشخیص داده شد (جدول ۳). نتایج AMOVA حاکی از تنوع زیاد در درون جمعیت‌ها (۹۳ درصد) در مقایسه با تنوع در بین جمعیت‌ها (۷ درصد) می‌باشد. افزون بر واریانس درون و بین گروهی، مقادیر G_{st} برای هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه و در جدول ۳ درج گردیده است. G_{st} به‌عنوان یک شاخص مهم در تعیین واریانس ژنتیکی در نظر گرفته می‌شود. در واقع این شاخص نسبت تنوع بین جمعیتی را به تنوع کل نشان می‌دهد. مطابق تئوری نی (Nei 1978) مقادیر $G_{st} > 0.15$ ، بین ۰/۵ و ۰/۱۵ و $G_{st} < 0.05$ به ترتیب سطوح بالا، متوسط و پایینی از تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهند. در این تحقیق ضریب تمایز ژنتیکی

۱ Gene differentiation coefficient

(GST) برابر ۰/۱۴۲ بود که از یافته‌های جدول AMOVA پشتیبانی می‌کنند. علاوه بر این، آماره Nm که به‌عنوان معیاری از تعداد مهاجرت‌های صورت گرفته در هر نسل در نظر گرفته می‌شود، بر اساس آماره Gst برآورد و معرف جریان ژنی در نظر گرفته می‌شود. بر اساس تئوری رایت (Wright 1951) اگر مقدار $Nm > 1$ باشد جریان ژنی مانع از ایجاد تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها شده که با توجه به نتایج به دست آمده مقدار جریان ژنی بین جمعیت‌های مورد مطالعه ۳/۰۲۲ بود که این مقدار نشان‌دهنده احتمال وقوع جریان ژنی بین خویشاوندان گل محمدی می‌باشد. درواقع، توزیع واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها تابعی از میزان جریان ژنی بین آن‌ها می‌باشد و وجود آن نیز وابسته به اندازه و درجه ایزوله بودن جمعیت‌ها دارد (Dumolim-Lapeegue et al. 1997).

جدول ۳. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گل محمدی بر اساس نشانگر ISSR

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) based on ISSR marker in *Rosa damascena* Mill. Populations

منبع تغییرات (Source of Variation)	بین جمعیتی (Among pops)	درون جمعیتی (Within pops)
Df	4	35
SS	225.62	1421.97
MS	63.9	40.62
Est. Var	2.97	4.62
Var	7%	93%
Phipt	0.068	
P= 0.001		
GST	0.142	
Nm	3.022	

Df, SS, MS, Var, Est. Var, GST و Nm به ترتیب بیانگر درجه آزادی، مجموع مربعات، میانگین مربعات، واریانس تخمین زده شده، واریانس کل، تمایز بین جمعیتی، جریان ژنی

به طور کلی نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را درون جمعیت‌های بررسی شده نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد این تنوع می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی گل محمدی مورد استفاده قرار گیرد. تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها معیار بسیار مهمی برای سازگاری به تغییرات محیطی و بقای طولانی مدت یک گونه است. از دیگر مزایای تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیتی می‌توان به افزایش امکان انتخاب برای صفات مناسب به عنوان والدین اصلاحی در برنامه‌های به‌نژادی اشاره کرد. خرازیان و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۴ گزارش کردند که جمعیت‌های جنس *Stachys* دارای تنوع ژنتیکی بین (۵۸ در صد) و درون‌گونه‌ای (۴۲ در صد) قابل توجهی هستند که ممکن است با شرایط جغرافیایی، اکولوژیکی و مقدار زیاد دگرگشتی مرتبط باشد (Kharazian et al. 2015). یکی از دلایل تنوع زیاد بین افراد یک گروه می‌تواند به علت وقوع جابجایی ژرمپلاسمی بین گیاهان چند منطقه به واسطه انتقال پایه‌ها (به‌وسیله عوامل انسانی) به منطقه دیگر باشد. همچنین با توجه به اینکه سیستم تولید مثل تأثیر فراوانی بر روی تنوع بین افراد و تنوع بین گروه‌ها می‌گذارد، این الگوی تنوع زیاد در بین افراد داخل گروه‌ها نسبت به تنوع بین گروه‌ها، بیشتر در گیاهان دگرگشتی مشاهده شده است (Basaki et al. 2009). پارامترهای تنوع

ژنتیکی برآورد شده برای هر یک از جمعیت‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود جمعیت‌های مناطق ۱ و ۲ نسبت به سایر جمعیت‌ها از نظر پارامترهای Na, Ne, I, He و PPL دارای بالاترین مقادیر می‌باشد و در مقابل جمعیت منطقه ۵ نسبت به سایر جمعیت‌ها کمترین مقادیر این پارامترها را دارا است. بالا بودن پارامترهای ژنتیکی در بین اکسشن‌های یک جمعیت نشان‌دهنده وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین اکسشن‌های موجود در آن جمعیت است که می‌تواند ناشی از تعداد نمونه‌های ارزیابی شده در این جمعیت‌ها نیز باشد (Eslamzadeh et al. 2021).

جدول ۴. پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورده شده در جمعیت‌های گل محمدی ایران بر اساس نشانگر ISSR
Table 4. Satisfied genetic diversity parameters in Iranian *Rosa damascena* populations based on ISSR marker

جمعیت Population	Na	Ne	I	He	PPL
Region I	1.89 ± 0.03	1.55 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.32 ± 0.01	94.06
Region II	1.88 ± 0.03	1.56 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.33 ± 0.01	93.07
Region III	1.72 ± 0.04	1.53 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.30 ± 0.01	83.17
Region IV	1.70 ± 0.04	1.52 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.30 ± 0.01	83.17
Region V	1.66 ± 0.05	1.50 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.28 ± 0.01	80.69
میانگین (Mean)	1.77 ± 0.01	1.53 ± 0.01	0.46 ± 0.00	0.31 ± 0.00	86.63 ± 2.79

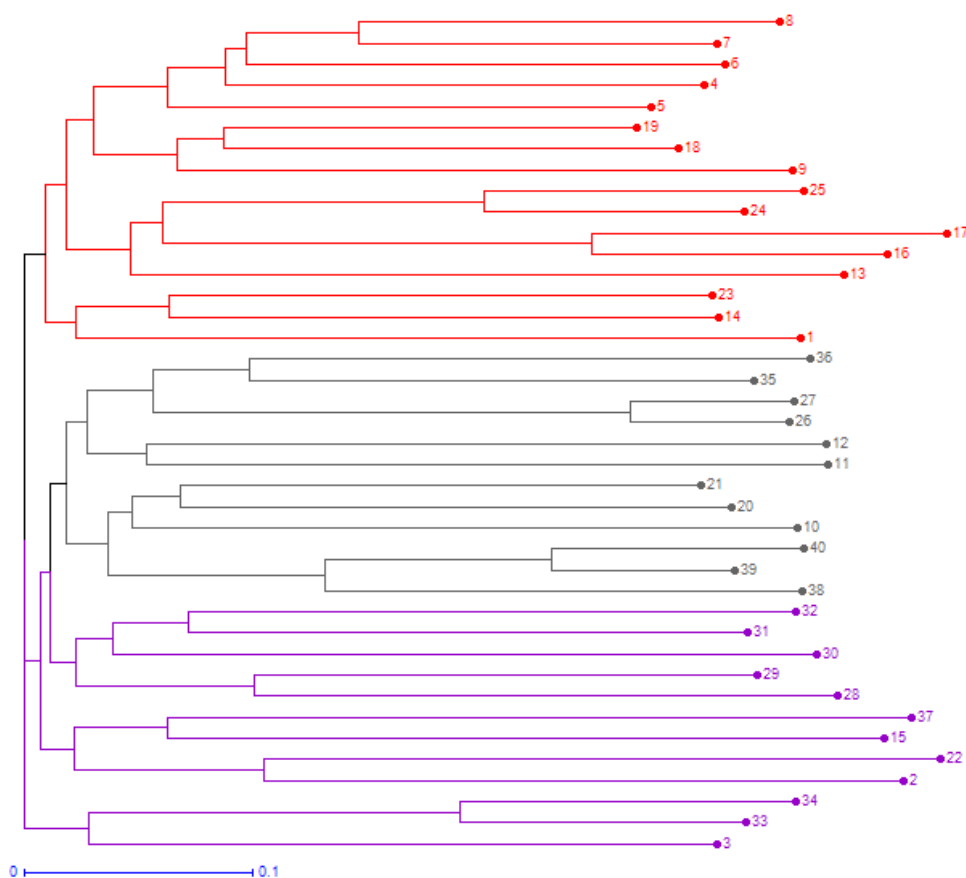
Na, Ne, I, He و PPL به ترتیب بیانگر تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون، ضریب تنوع ژنی، درصد جایگاه‌های ژنی چندشکلی

با توجه به یافته‌های سال‌های اخیر در جمعیت‌های واجد تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بالا، شانس یافتن آلل‌ها و ژن‌های مطلوب، افزایش پیدا می‌کند (Pour-Aboughadareh et al. 2017). همچنین در چنین جمعیت‌هایی تغییرات آلی مکرر جمعیت می‌تواند رخ دهد، ولی تغییرات نهایی جمعیت می‌تواند تحت تاثیر شرایط آب‌وهوایی قرار گیرد (Ni et al. 2018). همچنین، همان‌طور که در نتایج فاصله ژنتیکی گزارش شده است؛ بیشترین فاصله ژنتیکی بین اکسشن‌ها بر اساس کلیه سیستم‌های نشانگر از مناطق I, II و IV است، بنابراین در سیستم‌های اصلاح ژنتیک و هیبریداسیون، این اکسشن‌ها ممکن است به‌عنوان والدین مورد استفاده قرار گیرند تا در صورت داشتن صفات مطلوب، حداکثر هتروزیس حاصل شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که این مناطق می‌توانند منبع قوی تنوع برای پروژه‌های بالقوه تولیدمثل باشند که از آلل‌های جدید و ژن‌های برتر بهره‌مند می‌شوند (Pour-Aboughadareh et al. 2017).

فواصل ژنتیکی: ضرایب فاصله جاکارد با استفاده از داده‌های باینری از آغازگرهای ISSR برآورد شد. فاصله ژنتیکی بین اکسشن‌ها از ۰/۱۴۱ تا ۰/۸۳۷ با میانگین ۰/۶۴۳ متغیر بود. با توجه به ماتریس ضرایب فاصله بالاترین ضریب مربوط به اکسشن‌های هرمزگان (۱۷) و برزک ۳ (۱۲) از منطقه I و کمترین ضریب فاصله بین اکسشن‌های سمنان ۱ و سمنان ۲ (۲۶ و ۲۷) از

منطقه III می‌باشد (ماتریس ضرایب فاصله ژنتیکی نشان داده نشده است). به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها، از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش NJ برای ۴۰ اکسشن *Rosa damascena* استفاده شد و دندروگرام به دست آمده از این تجزیه در شکل ۳ نشان داده شده است. کلیه جمعیت‌های ارزیابی شده در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ۱۲ اکسشن از جمعیت‌های اصفهان (منطقه ۱)، هرمزگان (منطقه ۲) و مرکزی (منطقه ۳) می‌باشند. گروه دوم متشکل از ۱۶ اکسشن از جمعیت‌های کرمانشاه و لرستان (منطقه ۵)، فارس و کرمان (منطقه ۲) و سمنان (منطقه ۳) می‌باشد و گروه سوم شامل اکسشن‌هایی از جمعیت‌های گیلان و تبریز (منطقه ۴) می‌باشد. در مطالعه حاضر، بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش NJ توزیع مکانی با روابط ژنتیکی مطابقت ندارد. به عنوان مثال، جمعیت‌های اصفهان (نمونه‌برداری از مناطق مرکزی ایران) و فارس (نمونه‌برداری از جنوب) با هم در یک زیرگروه قرار گرفتند. به دلیل آب‌وهوای متنوع کشور و سازگاری گل محمدی با شرایط نامساعد محیطی، به نظر می‌رسد که اکسشن‌های این گیاه توسط مهاجران در سراسر کشور، به ویژه در کوهپایه‌هایی که معمولاً محصولات زراعی ندارند، جابه‌جا شده است.

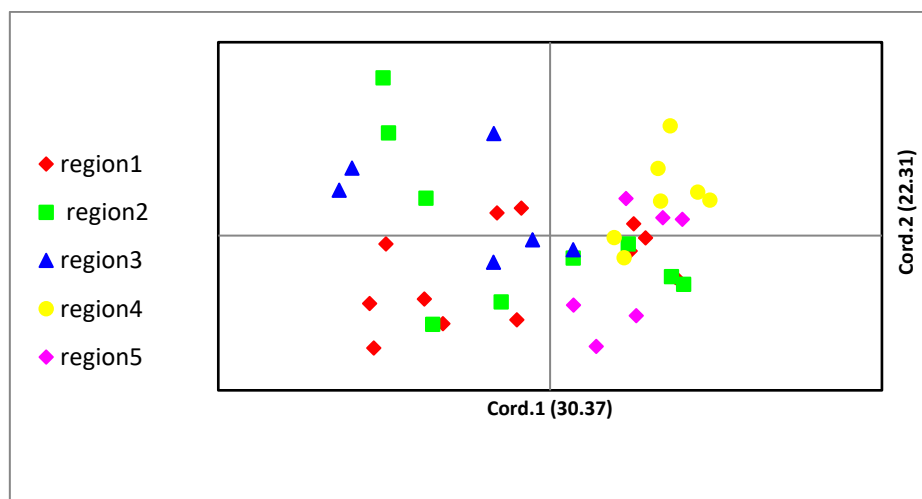
در مطالعه ای که بر روی ۱۲ ژنوتیپ گل محمدی ایرانی انجام شد با وجود فاصله جغرافیایی زیاد بین نمونه‌های مناطق کاشان و کازرون، فاصله ژنتیکی کمی بین آن‌ها مشاهده گردید (Pirsevedi et al. 2005) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نتایج یک پژوهش دیگر که با استفاده از نشانگرهای AFLP و ریزوماهواره بر روی گیاهان *R. damascena* در ترکیه انجام گرفت نشان داد که تمام اکسشن‌ها از یک منشأ ژنتیکی اصلی با تکثیر رویشی مشتق شده‌اند (Baydar et al. 2004). در این راستا در مطالعه‌ای محققان گزارش دادند که گیاهان گل رز ایران و هند ممکن است منشأ مشترک داشته باشند (Rusanov et al. 2005). بر اساس نتایج، الگوهای گروه‌بندی با منشأ جغرافیایی ارتباط ندارند. نتایج مشابهی در تجزیه و تحلیل نشانگرهای ریزوماهواره‌ای در اکسشن‌های *Rosa damascene* از مناطق مختلف ایران مشاهده شد (Gholamian et al. 2019). معمولاً یک نمونه بزرگ‌تر برای تعیین رابطه بین داده‌های مولکولی با فاصله جغرافیایی ضروری است، اگرچه جدا شدن جمعیت‌ها به دلیل وجود موانع در جریان ژن یا شرایط مختلف آب‌وهوایی منجر به تمایز درون گونه‌ها می‌شود (Goudarzi et al. 2019). تجزیه به مختصات اصلی (PCOA): علاوه بر تجزیه خوشه‌ای از تجزیه به مختصات اصلی بر اساس داده‌های مولکولی نیز جهت بررسی گروه‌بندی نمونه‌ها استفاده شد (شکل ۴). تجزیه به مختصات اصلی در نهایت در به تصویر کشیدن ساختار جمعیت کمک می‌کند. بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای ISSR، سه مولفه اصلی به ترتیب ۳۰/۳۷، ۲۲/۳۱ و ۱۱/۷۵ درصد از تنوع ژنتیکی موجود در نمونه‌های ارزیابی شده را توجیه کردند. توزیع نمونه‌ها در این نمودار در برخی موارد مطابق با توزیع آن‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بود در واقع، نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای این مشاهدات را پشتیبانی می‌کند. از طرفی در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، نشانگرها باید توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند تا بتوان از کل ژنوم نمونه‌برداری کرد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، ژنوتیپ‌ها به خوبی در محیط پخش شده‌اند که می‌تواند به دلیل تنوع زیاد بین ژنوتیپ‌ها و مناسب بودن نشانگر و آغازگرهای مورد استفاده باشد.



شکل ۳. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر پایه روش NJ بر مبنای آغازگرهای ISSR. جهت مشاهده کد هر اکسشن به جدول ۱ مراجعه شود

Figure 3. Dendrogram according to the Neighbour-joining method, evaluated with ISSR data. To see the accession codes, refer to Table 1

تجزیه ساختار جمعیت: نتیجه تجزیه ساختار جمعیت برای مجموعه داده‌های حاصل از تجزیه ISSR در اکسشن‌های گل محمدی مورد آزمایش، مقدار K در حالت ۵ در حد بهینه قرار داشت (شکل ۵). در واقع با این تجزیه هر یک از اکسشن‌ها با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌شوند که در هر زیر جمعیت میزان نامتعادلی پیوستگی حداقل گردد. نتایج تقسیم‌بندی جمعیت‌ها توسط نرم‌افزار Structure نشان داد که اکسشن‌ها در ۵ زیرگروه تقسیم می‌شوند. به طوری که زیرگروه ۱ شامل ۱۰ اکسشن از جمعیت‌های اصفهان (۶)، کرمان (۲) و مرکزی (۲)، زیرگروه ۲ متشکل از جمعیت لرستان (۲) و ۱ اکسشن از کرمانشاه می‌باشد.



شکل ۴. بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی برای ۴۰ اکسسشن گل محمدی ایران بر اساس آغازگرهای ISSR

Figure 4. Biplot resulting from Principal coordinate analyses (PCoA) for 40 Iranian *Rosa damascena* accessions based on ISSR data

زیرگروه ۳ فقط متشکل از جمعیت سمنان و زیرگروه ۴ را جمعیت هرمزگان تشکیل می‌دهد. در زیرگروه ۵، ۲۳ اکسسشن از جمعیت‌های اصفهان (۶)، گیلان (۵)، کرمانشاه (۳)، فارس (۳)، تهران (۲)، کرمان (۲) و آذربایجان شرقی (۲) قرار می‌گیرند (شکل ۵). این تعداد گروه با نتایج گروه‌بندی نمودار درختی (شکل ۳) در برخی قسمت‌ها تطابق نداشت. در این مطالعه جمعیت‌هایی که در یک گروه قرار می‌گیرند از نظر مسافت جغرافیایی مورد بررسی قرار گرفتند و مشاهده می‌شود که برخی از جمعیت‌ها که مسافت جغرافیایی کمی با هم دارند در یک گروه قرار می‌گیرند اما این ارتباط همچون سایر روش‌های گروه‌بندی در این مطالعه، برای همه‌ی جمعیت‌ها برقرار نیست. برای مثال جمعیت‌های گیلان و آذربایجان شرقی که در یک منطقه دسته‌بندی شده بودند در یک گروه قرار گرفتند، اما جمعیت‌های کرمانشاه، فارس و اصفهان که از نظر مسافت جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و شرایط آب‌وهوایی فاصله زیادی دارند نیز در یک گروه قرار گرفته‌اند.

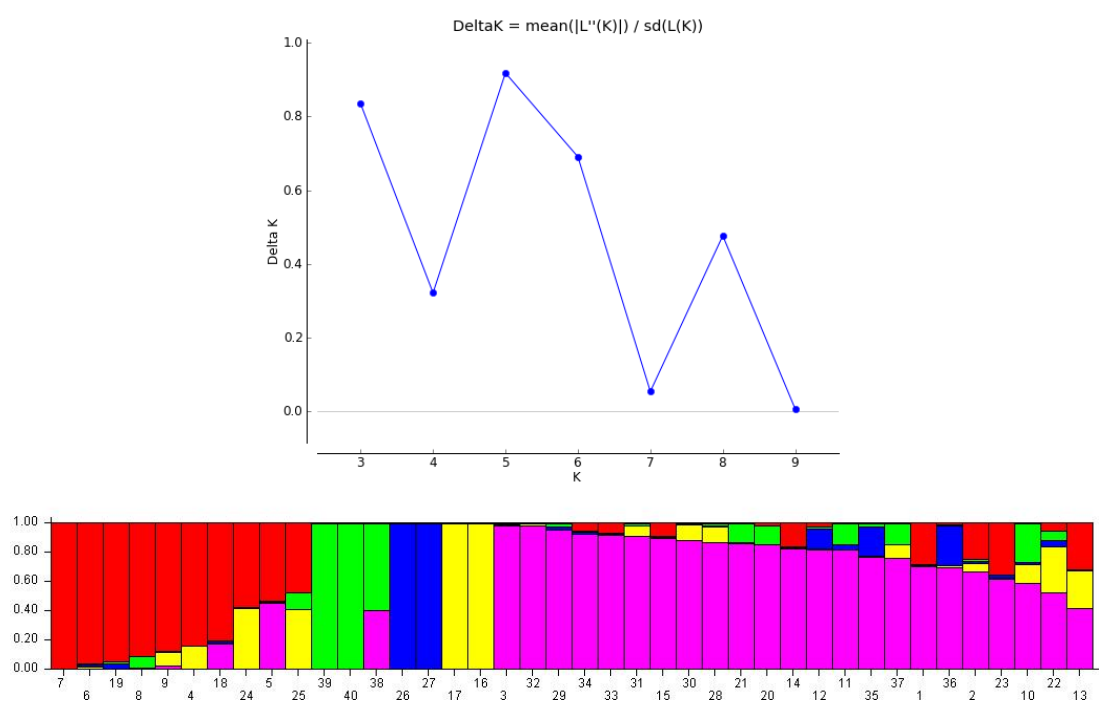
اگر ژنوتیپ‌ها یا ارقام از مناطق مختلف در یک دسته جمع شوند، ممکن است به این معنی باشد که وارث ژنتیکی یکسانی دارند (Besnard et al. 2000; Sarri et al. 2006). این ممکن است به دلیل انتقال گیاهان توسط انسان یا جابجایی ژنتیکی توسط متغیرهای طبیعی بوده باشد (Percifield et al. 2007). شواهد ژنتیکی ارائه شده در اینجا و همچنین منابع موجود این طور نشان می‌دهد که پراکندگی گیاه توسط انسان نقش بسزایی در توسعه جمعیت گل محمدی در سراسر ایران داشته است. به نظر می‌رسد این محصول به دلیل تحمل بالای خشک سالی یکی از مناسب‌ترین گونه‌ها در استان‌های خشک کشور است. به دلیل کاهش منابع آب کشاورزی و بارندگی، کشت آن می‌تواند جایگزین بسیاری از محصولات کشاورزی شود که نیاز آبی بالایی دارند.

علاوه بر این، قابلیت سازگاری خوب این گیاه با آبوهوا و شرایط مختلف خاک در ایران باعث شده کشاورزان تمایل به معرفی آن به سایر مناطق کشور داشته باشند. با وجود این که منشأ ژنتیکی این گیاهان در مناطق مختلف یکسان است، تفاوت آشکار ممکن است به آبوهوایی که در آن به وجود می‌آیند نسبت داده شود. تغییرات بین و درون گونه‌ای می‌تواند تحت تأثیر دما و بارندگی قرار گیرد (Nybom et al. 1997). همچنین گل‌های رز معمولاً گرده‌افشانی متقاطع دارند و خود ناسازگار هستند و این باعث می‌شود از نظر ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها تنوع بیشتری داشته باشد (Cole and Melton 1986; Ueda and Akimoto 2001; Charlesworth 2003). محققان تنوع ژنتیکی *R. canina* را در براندنبورگ (آلمان) مورد بررسی قرار دادند. ۵۵ ژنوتیپ در دوازده زیرگروه طبقه‌بندی شدند (Jürgens et al. 2009). آن‌ها تنوع ژنتیکی زیاد را به دگرگشنی، سیستم پراکندگی بذری و پلی‌پلوئیدی در جمعیت *R. canina* نسبت دادند. سطح تنوع ژنتیکی تحت تأثیر سیستم تولیدمثل، چرخه زندگی، پراکندگی بذری و توزیع جغرافیایی است که از عوامل مهم تنوع در بین جمعیت‌ها هستند. برخلاف نتایج تحقیقات فعلی، مطالعه‌ای روی *R. canina* از طریق نشانگرهای ISSR نشان داد که فاصله جغرافیایی در ایجاد فاصله آللی بین ژنوتیپ‌ها مؤثر است و شرایط اکولوژیکی می‌تواند باعث تنوع ژنتیکی در *R. canina* شود (Jamali et al. 2019). میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های رز با استفاده از نشانگرهای ISSR، سطح ژنتیکی نسبتاً بالایی را در میان گونه‌های رز گزارش کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. آن‌ها دلیل این سطح تنوع را شرایط مختلف اکولوژیکی مکان‌های مورد مطالعه در این تحقیق (پنج منطقه که تقریباً در شمال غربی ایران قرار گرفته است) عنوان کردند (Mirzaei et al. 2015).

نتایج حاصل از تجزیه ساختار جمعیت تا حد مطلوبی ارتباط بین تنوع مولکولی در اکسشن‌ها را نشان داده است. اکسشن‌هایی که ضریب فاصله ژنتیکی بالایی دارند در گروه‌های مجزا و همچنین، اکسشن‌هایی که ضریب فاصله کمی داشته‌اند در یک گروه قرار گرفته‌اند. با توجه به فاصله ژنتیکی اکسشن‌ها و مقایسه آن با گروه‌بندی ساختار جمعیت، تطابق نسبتاً مطلوبی بین فاصله ژنتیکی این اکسشن‌ها و تجزیه ساختار جمعیت آن‌ها مشاهده شد. در مطالعه حاضر مقداری اختلاط در برخی ستون‌ها وجود داشت به طوری که وجود بیش از یک رنگ در هر ستون، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد می‌باشد. در نتیجه بسیاری از ژنوتیپ‌ها دارای ویژگی‌های ژنتیکی واسطه‌ای از زیرگروه‌های مختلف به‌عنوان یک عامل تنوع ژنتیکی هستند.

نتیجه‌گیری: مطالعه تنوع ژرم‌پلاسماهای موجود و فهم روابط ژنتیکی در میان مواد ژنتیکی می‌تواند یک هدف با ارزش برای استراتژی‌های بهبود محصولات زراعی، باغی و همچنین حفاظت از تنوع موجود در جمعیت‌ها باشد. بهبود محصول تحت تأثیر اطلاعات مربوط به میزان و توزیع تنوع ژنتیکی و همچنین روابط بین مواد اصلاح شده است. نتایج مطالعه حاضر سطح بالایی از چندشکلی را در جمعیت‌های *R. damascena* ایران توسط سیستم نشانگر ISSR نشان داد. سطوح بالای پلی‌مورفیسم تشخیص داده شده در اکسشن‌های *R. damascena* نشان‌دهنده ژنتیک گسترده این گونه در ایران است که این نتیجه انزوای جغرافیایی و قرن‌ها انتخاب برای ویژگی‌های تجاری و سازگاری بهتر در شرایط مختلف محیطی بوده است (Padmesh et al. 2006).

بنابراین، ژرمپلاسم *R. damascena* در ایران متنوع تر از آن است که در بلغارستان یا ترکیه یافت می‌شود. علاوه بر این، با توجه به تنوع بالای موجود برای این گونه در ایران، این منطقه مرکز اصلی تنوع گونه‌ها است. درک این مقدار تنوع در میان جمعیت‌های گل محمدی می‌تواند در زمینه مدیریت ژرمپلاسم‌های گل محمدی و استفاده از آن برای کارهای اصلاحی با هدف‌های متنوع با انجام تلاقی بین اکسشن‌هایی که از مشابهت کمتری برخوردارند برای بهره‌گیری از هتروزیس جهت بهبود صفات مختلفی استفاده نمود علاوه بر این نیز می‌توان از ارتباط ژنتیکی بین والدین و نتاج برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های دخیل در بیان صفت مورد نظر استفاده کرد.



شکل ۵. الگوی ساختار جمعیت برای ۴۰ اکسشن گل محمدی ایران بر مبنای آغازگرهای ISSR

Figure 5. Population structure model for 40 Iranian Damask rose based on ISSR primers

نشانگرهای مولکولی که چند شکلی در منطقه رونویسی ژنوم را نشان می‌دهند، دارای پتانسیل خوبی در مشخص کردن چندشکلی‌هایی هستند که ممکن است به طور مستقیم مربوط به عملکرد ژن باشند. میزان چندشکلی‌های مشاهده شده نشان‌دهنده کارایی نشانگر ISSR در تشخیص پلی‌مورفیسم در بین نمونه‌های مورد مطالعه است و ملاحظه شد که بر اساس این نشانگر نمودار خوشه‌ای و ساختار جمعیت به خوبی جمعیت‌ها را از یکدیگر تفکیک کردند. از طرفی در تأیید این مطلب می‌توان به بالا بودن درصد چندشکلی و شاخص‌های مرتبط با تکثیر مکان‌های چندشکلی (EMR، RP، PIC و MI) توسط آغازگرها نیز اشاره کرد. سیستم‌های نشانگر مورد استفاده الگوی جامعی از تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های *R. damascena* ایران را نشان می‌دهد که

می‌تواند بینشی در مورد برنامه‌های آینده پرورش گل محمدی ارائه دهد. در میان گروه‌بندی‌های صورت گرفته انتظار می‌رفت که جمعیت‌های مناطق با طول و عرض جغرافیایی مشابه در یک گروه قرار بگیرند ولی برخلاف این انتظار بیشتر جمعیت‌های با طول و عرض جغرافیایی متفاوت در کنار هم قرار گرفته‌اند که دلیل آن ممکن است به واسطه جابجایی ژرم‌پلاسمی در بین این مناطق باشد

سپاسگزاری: از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

References

- Agarwal A, Gupta V, Haq SU, et al. (2019) Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasm using SCoT marker. *J King Saud Univ Sci* 31, 780-788.
- Anderson JA, Churchill G, Autrique J, et al. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36, 181-186.
- Azeem S, Khan AI, Awan FS, et al. (2012) Genetic diversity of rose germplasm in Pakistan characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr J Biotechnol* 11, 10650-10654.
- Babaei A, Tabaei-Aghdai SR, Khosh-Khui M, et al. (2007) Microsatellite analysis of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) accessions from various regions in Iran reveals multiple genotypes. *BMC Plant Biology* 7, 12.
- Basaki T, Mardi M, Kermani JM, et al. (2009) Assessing *Rosa persica* genetic diversity using amplified fragment length polymorphisms analysis. *Sci Hortic* 120, 538-543.
- Baydar NG, Baydar H, Debener T (2004) Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *Iran J Biotechnol* 111, 263-267.
- Besnard G, Khadari B, Villemur P, Bervillé A (2000) Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L). *Theor Appl Genet* 100, 1018-1024.
- Carvalho A, Lima-Brito J, Macas B, Guedes-Pinto H (2009) Genetic diversity and variation among botanical Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochem Genet* 47, 276-294.
- Charlesworth D (2003) Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 1051-1070.
- Cole P, and Melton B (1986) Self-and cross-compatibility relationships among genotypes and between ploidy of the rose. *J Am Soc Hortic Sci* 111, 122-125.

- Dai-di C, Cheng-yuan S, Jin-zhu Z, et al. (2013) ISSR Analysis of Hybrid Descendants of Roses. J Northeast Agric Univ (English Edition) 20, 1-4.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-15.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, et al. (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics 146, 1475–1487.
- Earl Dent A (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4.2, 359-361.
- Eslamzadeh M, Omidi M, Rashidi V, Etminan A (2021) Evaluation of genetic diversity and population structure analysis in some *Aegilops* species using CBDP markers. J Mod Genet 16, 1-8
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14, 2611–2620.
- Gholamian F, Etminan A, Changizi M, et al. (2019) Assessment of genetic diversity in *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan accessions using start codon targeted polymorphism (SCoT) and CAAT-box derived polymorphism (CBDP) markers. Biotechnol Biotechnol Equip 33, 1653-1662.
- Goudarzi F, Hemami MR, Rancilhac L, et al. (2019) Geographic separation and genetic differentiation of populations are not coupled with niche differentiation in threatened Kaiser's spotted newt (*Neurergus kaiseri*). Scientific reports 9, 1-12.
- Gudin S (2000) Rose genetics and breeding. Plant Breed Rev 17, 159-189.
- Henuka R, Raju D, Janakiram N (2015) Characterization and analysis of genetic diversity among different species of rose (*Rosa* species) using morphological and molecular markers. Indian J Agric Sci 85, 240-245.
- Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M, Salehi H, Saberivand A (2010) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. Afr J Biotechnol 9, 6091-6095
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44, 223-270
- Jamali M, Ghanbari A, Estaji A, Torabi Giglou M, Saidi M (2019) Genetic diversity of dog rose (*Rosa canina* L.) using ISSR markers. Iran J Genet Plant Breed 8, 1-8.
- Joshi T, Kumar S, Arya L, Riar A (2021) Distance Only Brings You Closer: Application of ISSR Markers to Analyze Molecular Relationships in Roses (*Rosa spp.*). The Symbol of Love. Preprints 14, 01-21.

- Jürgens R, Ball A, Verster A (2009) Interventions to reduce HIV transmission related to injecting drug use in prison. *Lancet Infect Dis* 9, 57-66.
- Kharazian N, Mohammadi M, Shabani L (2015) The study of flavonoid patterns diversity in five *Stachys* species in Iran. *Farmatsevtychnyi zhurnal* 25, 81–82.
- Korkmaz M, Dogan NY (2018) Analysis of genetic relationships between wild roses (*Rosa L. Spp.*) growing in Turkey. *Erwerbs-Obstbau* 60, 305-310.
- Krussmann, G (1981) *The Complete Book of Roses* (German), Timber Press: Oregon, USA.
- Kuhns LJ, Fretz TA (1978) Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Isozyme variation among cultivars. *J Am Soc Hortic Sci* 103, 509–16.
- Lee JS, Kim YR (1982) Genetic studies on natural populations of *Rosa multiflora* Thunb. by isozyme and multivariate analyses (Korean). *Hanguk Wonye Hakhoe Chi* 23, 141–62
- Mirzaei L, Rahmani F, Beigmohamadi M (2015) Assessment of genetic variation among *Rosa* species using ISSR genetic markers. *J Biodivers Environ Sci (JBES)* 3, 254-260.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Ni J-L, Zhu AG, Wang XF, et al. (2018) Genetic diversity and population structure of ramie (*Boehmeria nivea L.*). *Ind Crops Prod* 115, 340-347.
- Nybom H, Carlson-Nilsson U, Werlemark G, Uggla M (1997) Different levels of morphometric variation in three heterogamous dogrose species (*Rosa sect. Caninae*, Rosaceae). *Plant Syst Evol* 204, 207-224.
- Ogras T, Bastanlar EK, Metin ÖK, et al. (2017) Assessment of genetic diversity of rose genotypes using ISSR markers. *Turk J Botany* 41, 347-355.
- Padmesh P, Reji JV, Dhar MJ, Seeni S (2006) Estimation of genetic diversity in varieties of *Mucuna pruriens* using RAPD. *Biol Plant* 50, 3367–372.
- Panwar S, Singh KP, Sonah H, et al. (2015) Molecular fingerprinting and assessment of genetic diversity in rose (*Rosa × hybrida*). *Indian J Biotechnol* 14, 518-524.
- Percifield RJ, Hawkins JS, McCoy JA, Widrechner MP, and Wendel JF (2007) Genetic diversity in *Hypericum* and AFLP Markers for species-specific identification of *H. perforatum L.* *Planta Med* 73, 1614.
- Pirseyyedi SM, Mardi M, Davazdahemami S, et al. (2005) Analysis of the genetic diversity of 12 Iranian Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) genotypes using amplified fragment length polymorphism markers. *Iran J Biotech* 3, 225–230.

- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, et al. (2017) Assessment of genetic diversity among Iranian *Triticum* germplasm using agromorphological traits and start codon targeted. *Cereal Res Commun* 45, 574-586.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98, 107-112.
- Rai H, Raju D, Kumar A, et al. (2015) Characterization and analysis of genetic diversity among different species of the rose using morphological and molecular markers. *Indian J Agr Sci* 85, 240-245.
- Reddy MP, Sarla N Siddiq EA (2002) Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. *Euphytica* 128, 9-17.
- Rusanov K, Kovacheva N, Vosman B, et al. (2005) Microsatellite analysis of *Rosa damascena* Mill. accessions reveals genetic similarity between genotypes used for rose oil production and old Damask rose varieties. *Theor Appl Genet* 111, 804-809.
- 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* 49, 1606-1615.
- Shameh S, Hoseini B, Alirezaloo A (2018) Evaluation of distribution and phytochemical diversity of roses species (*Rosa spp.*) in Northwest of Iran. *J Plant Prod Sci* 4, 31-45.
- Ueda Y, Akimoto S (2001) Cross-and self-compatibility in various species of the genus *Rosa*. *J Horticult Sci Biotechnol* 76, 392-395.
- Varshney RK, Chabane K, Hendre PS, et al. (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Sci* 173, 638-649.
- Vukosavljev M, Zhang J, Esselink GDWPC, et al. (2013) Genetic diversity and differentiation in roses: a garden rose perspective. *Sci Hortic (Amsterdam)* 162, 320-332.
- Walker CA, Werner DJ (1997) Isozyme and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of Cherokee rose and its putative hybrids 'Silver Moon' and 'Anemone'. *J Am Soc Hortic Sci* 122, 659-64.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-5.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15, 323-354.
- XueWei W, GuangFen C, LiFang W, et al. (2009). Identification of ISSR in lily hybrids. *Acta Hortic Sin* 36, 749-754