

## بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گون‌های زرد و سفید در مناطق حفاظت شده استان اصفهان با استفاده از نشانگر ISSR

مهدی رحیم ملک<sup>۱\*</sup>، محمد فضیلتی<sup>۲</sup>، شیما غریبی<sup>۱</sup> و محمد وهابی<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۱)

### چکیده

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۶ نمونه جمعیتی گون زرد و سفید از سه منطقه حفاظت شده استان اصفهان (موته، کلاه قاضی و قامیشلو) با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، ۹ آغازگر منتخب در مجموع ۲۲۱ نوار تکثیر نمودند که ۲۰۴ نوار بین نمونه‌های جمعیتی چندشکلی نشان دادند. الگوی نواری ISSR به داده‌های صفر و یک، بر اساس وجود و عدم وجود نوارها، تبدیل گردید و داده‌ها توسط نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 تجزیه و تحلیل شدند. آزمون تطابق متیل با هدف انتخاب بهترین ضریب تشابه انجام گرفت. دندروگرام بر اساس ضریب SM و الگوریتم UPGMA ترسیم شد. نتایج گروه‌بندی گویای دو گروه بزرگ و پنج گروه کوچک بود. تجزیه به مؤلفه‌های تعدیل شده (PCoA) نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد. نتایج نشان داد که گون‌های سفید در کل در سه منطقه مورد مطالعه از نظر ژنتیکی به یکدیگر نزدیک‌ترند و حالت یکنواخت‌تری دارند. ولی گون‌های زرد متنوع‌ترند و نیاز است ارقام و گونه‌های مختلف آنها از نظر گیاه‌شناسی بیشتر مطالعه شوند. گون‌های منطقه کلاه قاضی دارای بیشترین (۰/۳۶۶) و جمعیت‌های منطقه موته دارای کمترین تنوع ژنی (۰/۱۲۹) بودند. بنابراین، مناطق دارای تنوع ژنتیکی کمتر، مانند منطقه موته، بایستی بیشتر از نظر پوشش گون مورد حمایت قرار گیرند و ضروری است راهکارهای حفاظت ژنتیکی در مورد این مکان‌ها به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: گون، تنوع ژنتیکی، ISSR

۱. به ترتیب استادیار و دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران

۳. استادیار مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrahimmalek@cc.iut.ac.ir

## مقدمه

گون با نام علمی *Astragalus L.* با ۳۰۰۰-۲۰۰۰ گونه در شمار بزرگ‌ترین جنس‌های گیاهان گل‌دار محسوب می‌شود (۱۰). کشور ایران دارای ۷۵۰ گونه از این گیاه است. گون سفید (*A. gossipinus*) در کشورهای سوریه، لبنان، ترکیه، عراق و ایران گزارش شده است، در حالی که گون زرد (*A. microcephalus*) بومی ایران است (۱۱). این دو گونه ارزشمند از نظر تولید صمغ کتیرا از اهمیت زیادی برخوردارند. استان‌های مختلف کشور دارای جنس‌ها و گونه‌های مختلف این گیاه هستند که در این بین استان اصفهان از نظر هر دو گونه گیاهی غنی می‌باشد. از طرف دیگر، سه منطقه کامیشلو، موته و کلاه قاضی در استان اصفهان جزو مناطق حفاظت شده می‌باشند که کمتر دستخوش تغییرات شده‌اند و مناطق مناسبی برای بررسی‌های ژنتیک محسوب می‌شوند.

امروزه مشکل خشکسالی، چرای بیش از حد و شخم مراتع برای تولید محصولات کشاورزی، بسیاری از گونه‌های مرتعی و دارویی را در خطر انقراض قرار داده است (۱۴). بدین منظور، بسیاری از پژوهشگران به دنبال یافتن راهکارهای حفاظت ژنتیکی این گونه‌ها هستند. برای رسیدن به این هدف نیاز است تا گونه‌های دارای تنوع ژنتیکی کمتر و با خطر انقراض بیشتر شناسایی و راهکارهایی برای حفاظت از آنها تدارک دیده شود (۷). از طرف دیگر، مطالعات ریخت‌شناسی مختلف در گون به خوبی نتوانسته است طبقه‌بندی‌های گیاه‌شناسی قابل قبولی را ارائه دهد (۱۹). نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری قدرتمند در طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی استفاده شده است. تاکنون بررسی‌های مولکولی بسیار زیادی در جنس گون صورت پذیرفته است. لو و همکاران (۱۰) تنوع ژنتیکی سه گونه *A. sinicus L.*، *A. nankotaizanensis* و *A. nokoensis* را با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که ۱۳۱ نشانگر چند شکل بودند. پس از ترسیم دندروگرام مشخص شد که دو گونه اول شباهت ژنتیکی بیشتری به

یکدیگر دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نتایج مطالعات گیاه‌شناسی را نیز تأیید نمود. چنگ و همکاران (۵) در تحقیق خود، مواد دارویی برگرفته از گون را که به طور تصادفی از ۲۰ فروشگاه تهیه شده بود با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بررسی نمودند. سه نشانگر چند شکلی نشان دادند و به عنوان شاخصی برای تشخیص این نمونه‌ها به کار گرفته شدند. مهرنیا و همکاران (۱۲) تنوع بین و درون گونه‌ای را در گونه‌های *A. compactus* و *A. mesoleios*، *A. gossipinus* و *A. microcephalus* با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه آنها تعداد ۲۰ نمونه جمعیتی توسط ۲۱۸ نوار چندشکل RAPD ارزیابی شد و نتایج نشان داد که این نشانگر در مقایسه با روش‌های مورفولوژی روشی مناسب‌تر برای طبقه‌بندی صحیح‌تر گونه‌ها می‌باشد.

ادیگوزل و همکاران (۱) نیز از نشانگر مولکولی RAPD و تجزیه اسیدهای چرب برای طبقه‌بندی گونه‌های گون مناطق شرقی ترکیه استفاده نمودند و بر اساس ۹۸ نشانگر چندشکل شش گونه گون گروه‌بندی شد. ویسنت و همکاران (۱۷) از هشت نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار پنج جمعیت گونه در حال انقراض *A. nitidiflorus* در کشور اسپانیا استفاده نمودند. هووانگ و همکاران (۸) در مطالعه خود از ۱۲ آغازگر ISSR و ۱۲ آغازگر RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ نمونه جمعیتی متعلق به گونه *A. adsurgens* از کشور چین استفاده کردند. در پژوهش دیگری که در آمریکا انجام شد، الکساندر و همکاران (۲) تنوع ژنتیکی ۸ جمعیت از گونه *A. oniciformis* را با استفاده از نشانگر ISSR بررسی کردند و ساختار ژنتیکی این گونه انحصاری کشور آمریکا را مورد مطالعه قرار دادند. نظر به توانایی نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف (۴، ۱۵ و ۲۰) و اینکه تاکنون گزارشی دال بر استفاده از نشانگر ISSR برای طبقه‌بندی گونه‌های گون ایران وجود ندارد، بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی روابط ژنتیکی نمونه‌های جمعیتی دو گونه گون زرد و سفید در سه منطقه کامیشلو، موته و کلاه قاضی در استان اصفهان به

واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف Mastercycler gradient با برنامه حرارتی یک سیکل ۳ دقیقه ای در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۴۵-۵۵ درجه سلسیوس بر حسب نوع آغازگر، یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR را با حجم مساوی (۲۰ میکرولیتر) از بافر بارگذاری فرمامید (۹۶٪ فرمامید، ۱۰ mM EDTA، ۰/۲۵ درصد بروموفنل بلو و ۰/۲۵ درصد زایلن سیانول) مخلوط نموده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس روی یخ قرار داده شد. به منظور مشاهده الگوی نواری از ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ و اسرشت ۷ مولار اوره استفاده گردید. قبل از بارگذاری نمونه‌ها، الکتروفورز مقدماتی با دستگاه توالی‌یاب بیومترا مدل S2 به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط وات ثابت ۱۱۰ و دمای ۵۰ درجه سلسیوس صورت گرفت. الکتروفورز محصولات PCR نیز در همان شرایط و به مدت دو ساعت انجام شد. پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام گرفت (۳). نوارهای چندشکل بر اساس وجود و یا عدم وجود نوار کدگذاری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این نشانگر با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 صورت پذیرفت. آزمون منتل به منظور انتخاب بهترین الگوریتم و ضریب تشابه انجام شد. تنوع ژنی در مناطق مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Arlequin ver.3 و با استفاده از فرمول  $H = n/n-1(1-\sum p_i^2)$  محاسبه شد (۶).

### نتایج و بحث

تولید تعداد نوار و میزان چندشکلی زیاد گویای کارایی قابل قبول نشانگر ISSR در طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌ها و ارقام مختلف گون است (شکل ۱). از ۱۴ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۹ آغازگر چندشکلی بالایی نشان دادند. در این پژوهش از آغازگرهایی که وضوح کمی داشتند استفاده نشد که از آن

منظور ارزیابی خویشاوندی نمونه‌های جمعیتی با استفاده از نشانگر ISSR و مقایسه میزان تنوع ژنی مناطق مورد مطالعه در راستای اهداف اصلاحی آینده می‌باشد.

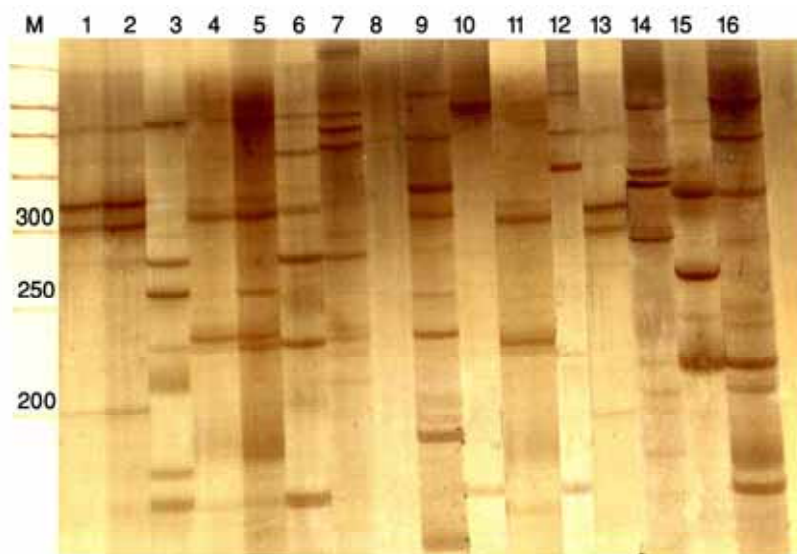
### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های گون مناطق حفاظت‌شده اصفهان به عنوان ذخایر ژنتیکی دست نخورده و همچنین بررسی تنوع موجود بین گون‌های زرد و سفید سه منطقه قامیشلو، موه و کلاه قاضی، نمونه‌های برگ‌گی جوان از این مناطق جغرافیایی تهیه شد. در این مطالعه، از حروف G، K، A و C برای معرفی نمونه‌های مورد بررسی استفاده شد (جدول ۱). این نمونه‌ها در سال ۱۳۸۹ درون یخدان کائوچویی قرار داده شدند و به دانشگاه صنعتی اصفهان انتقال یافتند. در آزمایشگاه برگ‌های جوان برای استخراج DNA استفاده شدند و پس از وزن کردن آنها، در داخل فویل‌های مخصوص کوچک و درون نیتروژن مایع منجمد گردیدند. هر نمونه پس از درج نام و شماره رقم، داخل فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  برای نگهداری طولانی مدت قرار داده شدند. در زمان‌های مختلف، نمونه‌ها به ترتیب از فریزر خارج شده و عملیات استخراج مطابق روش تغییر یافته موری و تامسون (۱۳) انجام گرفت.

کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر کنترل شد. واکنش ISSR با استفاده از آغازگرهای مکمل با توالی‌های ریزماهواره‌ای همراه با یک نوکلئوتید لنگری در انتهای ۳ یا ۵ و سه نوکلئوتید لنگری در انتهای ۵ انجام گرفت (جدول ۱). آنزیم Taq DNA polymerase، مخلوط نوکلئوتید (dNTPs) و بافر PCR از شرکت Roche آلمان تهیه شد. مقدار ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر (۲۰ نانوگرم DNA) به ۱۳ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل Taq DNA polymerase (۱ U)، آغازگرها (۱۰ pmol)، کلرید منیزیم (۲ mM)، dNTPs (۰/۲ mM)، فرمامید (۰/۲٪)، بافر PCR (۱×) و آب دوبار تقطیر استریل اضافه شد و در نهایت حجم محلول

جدول ۱. مشخصات و محل جمع‌آوری نمونه‌های گون مورد استفاده در این تحقیق

شماره ژنوتیپ	گونه	نوع گون	کد نمونه	محل جمع‌آوری
۱	<i>A. gossipinus</i>	سفید	G1	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۲	<i>A. gossipinus</i>	سفید	G2	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۳	<i>A. microcephalus</i>	زرد	G3	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۴	<i>A. gossipinus</i>	سفید	G4	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۵	<i>A. microcephalus</i>	زرد	G5	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۶	<i>A. microcephalus</i>	زرد	G6	منطقه حفاظت شده قامیشلو
۷	<i>A. microcephalus</i>	زرد	A1	منطقه حفاظت شده موته
۸	<i>A. microcephalus</i>	زرد	A2	منطقه حفاظت شده موته
۹	<i>A. microcephalus</i>	زرد	A3	منطقه حفاظت شده موته
۱۰	<i>A. gossipinus</i>	سفید	A4	منطقه حفاظت شده موته
۱۱	<i>A. microcephalus</i>	زرد	A5	منطقه حفاظت شده موته
۱۲	<i>A. microcephalus</i>	زرد	K1	منطقه حفاظت شده کلاه قاضی
۱۳	<i>A. microcephalus</i>	زرد	K2	منطقه حفاظت شده کلاه قاضی
۱۴	<i>A. gossipinus</i>	سفید	K3	منطقه حفاظت شده کلاه قاضی
۱۵	<i>A. microcephalus</i>	زرد	K4	منطقه حفاظت شده کلاه قاضی
۱۶	<i>A. microcephalus</i>	زرد	C	ياسوج



شکل ۱. الگوی نواری حاصل از آغازگر 8(CT)CCA در ۱۶ نمونه گون زرد و سفید

گروه‌های تکی همگی از نوع گون زرد بوده و شباهت ژنتیکی زیادی با هم ندارند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تعدیل شده (PCoA)، سه مؤلفه اول ۷۶٪ تغییرات را توجیه کردند. این موضوع نشان‌دهنده پراکندگی نسبی نشانگرها در طول ژنوم می‌باشد (شکل ۳).

نتایج به دست آمده از این تجزیه و تحلیل تا حدودی نتایج قبلی را تأیید نمود و اکثر ارقامی که در دندروگرام در یک گروه قرار داشتند در PCoA نیز در کنار هم قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نتایج حاصل از دندروگرام اکثر گونه‌های گون سفید این سه منطقه را از هم جدا نمود. این نمونه‌ها شامل G1، G2، K3 و G4 می‌باشند، ولی گونه‌های گون زرد سه منطقه بر خلاف انتظار در گروه‌های نزدیک قرار نگرفتند. در PCoA نمونه‌های G1، G2 و K3 نیز در نزدیک هم قرار گرفتند و این نتیجه نشان‌دهنده توزیع یکنواخت‌تر نشانگرها در طول ژنوم است. گون‌های زرد A3، C و K1 که از سه ناحیه جغرافیایی کاملاً متفاوت بودند هم در دندروگرام در نزدیکی یکدیگر و هم در PCoA در یک ناحیه قرار گرفتند. لو و همکاران (۱۰) نیز در تحقیق مشابهی تنوع ژنتیکی سه گونه *A. sinicus L.* و *A. nokoensissasaki*، *A. nankotaizanensis* را در کشور تایوان مورد بررسی قرار دادند. نشانگر مولکولی RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی سه گونه به کار برده شد و ۱۳۱ نشانگر چندشکل در پایان حاصل شد. پس از ترسیم دندروگرام مشخص شد که دو گونه اول شباهت ژنتیکی بیشتری به یکدیگر دارند. در این تحقیق، به جای سه گونه، دو گونه و در سه منطقه استفاده شد، ولی نشانگر ISSR که تکرارپذیری بیشتری دارد به کار رفت. مهرنیا و همکاران (۱۲) تنوع بین‌درون گونه‌ای را در گونه‌های *A. microcephalus*، *A. gossipinus*، *A. mesoleios* و *A. compactus* با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار دادند. این محققین نیز دو گونه مورد استفاده در تحقیق حاضر را مورد استفاده قرار دادند، ولی نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به مناطق متفاوت با تحقیق حاضر بود. در مطالعه زی و همکاران (۱۸) با

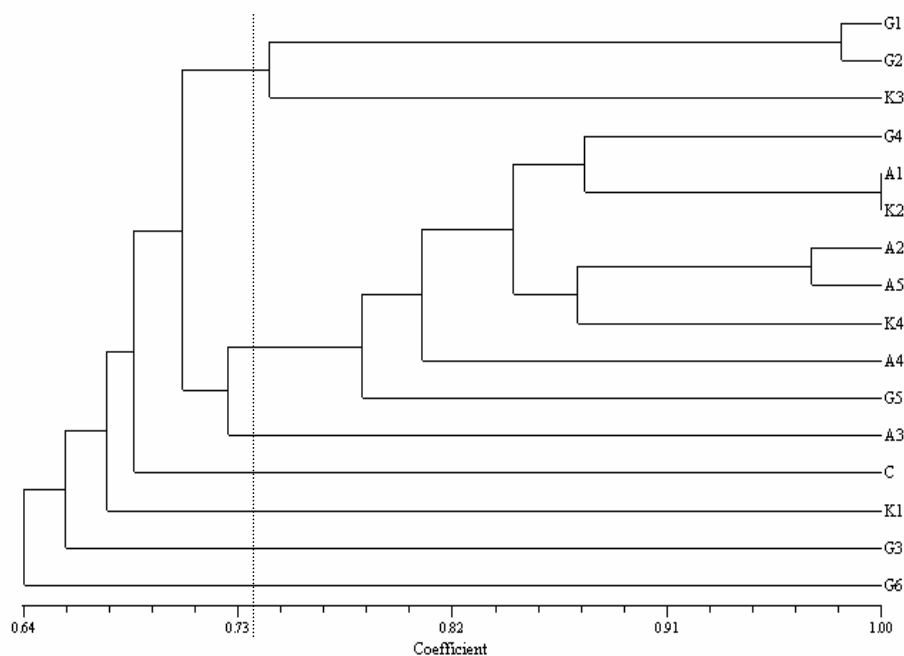
جمله می‌توان به آغازگرهای ترکیبی اشاره نمود. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۲۰۳ نوار چندشکل تولید نمودند (جدول ۲) که بیشترین تعداد نوار چندشکل متعلق به آغازگر CCA(CT)<sub>8</sub> (۳۴ نوار) و کمترین تعداد نوار چندشکل متعلق به آغازگر T<sub>8</sub>(AG) (۶ نوار) بود و متوسط چندشکلی در نشانگرهای مورد استفاده ۹۶/۲ درصد به دست آمد.

در میان آغازگرهای انتخاب شده، آغازگر T<sub>8</sub>(AC) بیشترین نوار تک شکل (۴ نوار) را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان داد. آغازگر CCA(CT)<sub>8</sub> که دارای ۳ نوکلئوتید لنگری در انتهای ۵' خود می‌باشد، تعداد نوار بیشتری تولید نمود که با نتایج پرادیپ و همکاران (۱۵)، کوهی و همکاران (۹) و رحیم ملک و همکاران (۱۶) همخوانی داشت. در این پژوهش‌ها نیز زمانی که از آغازگرهای لنگری در قسمت ۵' استفاده شد، قطعات تکثیر شده بیشتر و در نتیجه امکان چندشکلی بیشتری فراهم می‌شد. معمولاً آغازگرهایی که دارای نوکلئوتیدهای لنگری در قسمت ۳' خود هستند، در مقایسه با آغازگرهایی که دارای نوکلئوتیدهای لنگری در قسمت ۵' خود هستند نوارهای با وضوح بیشتری ایجاد می‌کنند چنین آغازگرهایی شبیه آغازگرهای اختصاصی عمل کرده و به نقاط خاصی از DNA الگو متصل می‌شوند و الگوی نواری با وضوح بیشتر ولی تعداد نوار کمتر تولید می‌کنند. پس از تبدیل نوارها به داده‌های صفر و ۱، داده‌ها در نرم‌افزار NTSYS Ver 2 تجزیه و تحلیل شد. پس از انجام آزمون تطابق متل و بررسی ضرایب کوفتیک، بیشترین ضریب همبستگی توسط ضریب SM (۰/۷۷۴) و الگوریتم UPGMA (۰/۸۱۲) در مقایسه با سایر ضرایب و الگوریتم‌ها به دست آمد. بنابراین دندروگرام بر اساس این ضریب و الگوریتم ترسیم گردید (شکل ۲).

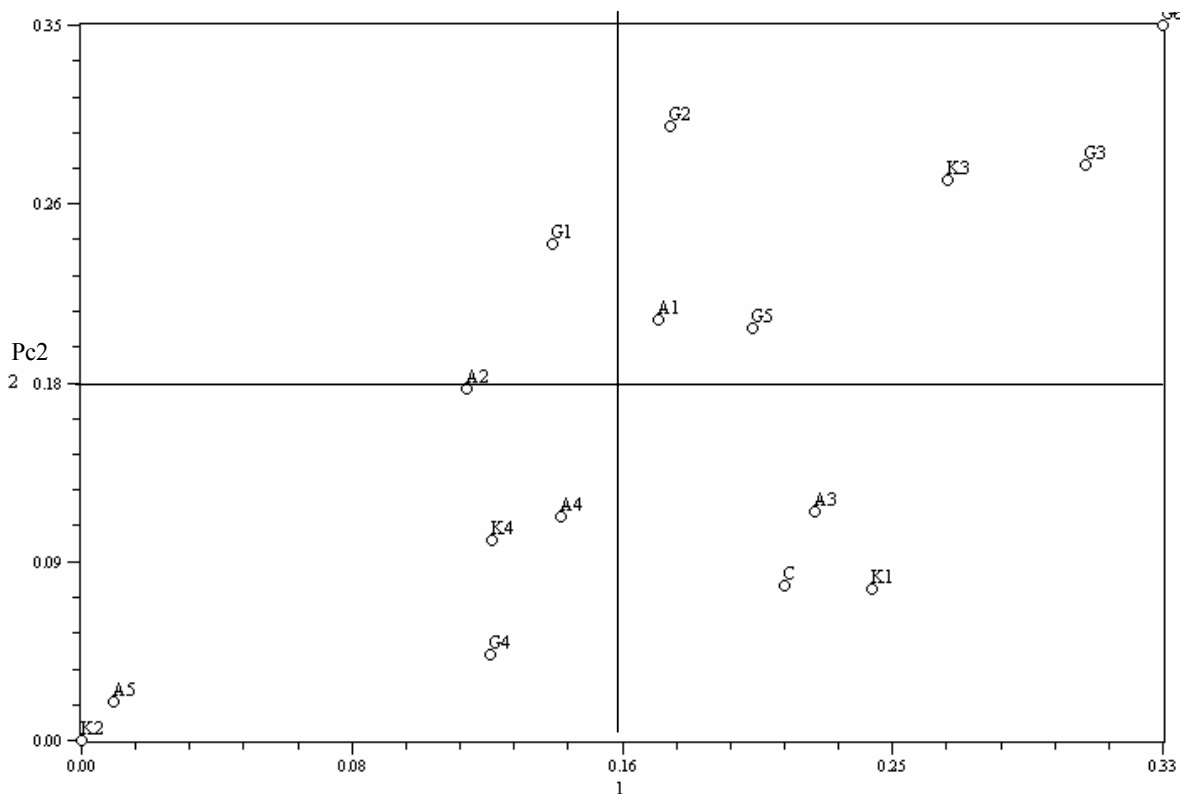
بر اساس قطع دندروگرام در ضریب ۰/۷۱، دو گروه بزرگتر و پنج گروه تکی به دست آمد. نمونه‌های G1، G2 و K3 متعلق به گروه اول همگی گون‌های سفید مناطق قامیشلو و کلاه قاضی هستند. در گروه دوم، گون‌های زرد و تعدادی از گون‌های سفید مناطق موه و کلاه قاضی قرار گرفته‌اند. سایر

جدول ۲. تعداد نوارهای چندشکل، تک شکل و درصد چندشکلی مشاهده شده در نمونه‌های گون با استفاده از نشانگر ISSR.

نام آغازگر	تعداد نوار تک شکل	تعداد نوار چندشکل	تعداد کل نوار	درصد چندشکلی
(AG) <sub>8</sub> T	۰	۶	۶	۱۰۰
(AG) <sub>8</sub> YT	۳	۲۰	۲۳	۸۶
(AG) <sub>8</sub> C	۰	۲۰	۲۰	۱۰۰
(GA) <sub>8</sub> C	۲	۲۴	۲۶	۹۲
(GA) <sub>8</sub> T	۱	۲۷	۲۸	۹۶
CCA(CT) <sub>8</sub>	۲	۳۲	۳۴	۹۴
(CT) <sub>8</sub> G	۲	۲۶	۲۸	۹۲
(AC) <sub>8</sub> C	۳	۲۴	۲۷	۸۸
(AC) <sub>8</sub> T	۴	۲۵	۲۹	۸۶
مجموع	۱۷	۲۰۴	۲۲۱	-
میانگین	۱/۸۸	۲۲/۶	۲۴/۵	۹۲/۶



شکل ۲. گروه‌بندی ۱۶ نمونه جمعیتی گون زرد و سفید با استفاده از ضریب تشابه SM و الگوریتم UPGMA بر اساس نشانگر ISSR. حروف G, A, K و C به ترتیب گویای نمونه‌های قامیشلو، مونه، کلاه قاضی و یاسوج می‌باشند.



شکل ۳. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تعدیل شده (PCoA) دو بعدی بر اساس فراوانی داده‌های ISSR در گون‌های زرد و سفید. حروف A, G, K و C به ترتیب گویای نمونه‌های قامیشلو، موته، کلاه قاضی و یاسوج می‌باشند.

جدول ۳. اطلاعات تنوع ژنی گون‌های مورد مطالعه در مناطق موته، قامیشلو و کلاه قاضی

منطقه	متوسط تنوع ژنی در تمام مکان‌ها	متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار
قامیشلو	0/17 ± 0/29	0/29
کلاه قاضی	0/14 ± 0/33	0/34
موته	0/08 ± 0/129	0/26

تجزیه و تحلیل سه منطقه از دیدگاه تنوع ژنی با استفاده از نرم‌افزار Arlequin ver.3 نشان داد که منطقه کلاه قاضی دارای بیشترین تنوع ژنی (0/33) و منطقه موته دارای کمترین تنوع ژنی (0/129) است. نتایج به دست آمده از هتروزیگوسیتی مورد انتظار تا حدود زیادی با نتایج تنوع ژنی همخوانی داشت (جدول ۳).

استفاده از ۸ آغازگر ISSR، سه تیپ مورفولوژیک گونه *A. membranaceus* مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۱۶۲ نوار چندشکل تولید شد. از دیگر پژوهش‌های مشابه در سایر کشورها می‌توان به مطالعات ویسنت و همکاران (۱۷) در گونه *A. nitidiflorus* از اسپانیا، هووانگ و همکاران (۸) در گونه *A. adsurgens* از کشور چین و الکساندر و همکاران (۲) در گونه *A. oniciformis* از کشور آمریکا اشاره نمود. نتایج

## نتیجه گیری

موته و کلاهقازی تشابه ژنتیکی بیشتری دارند. گون‌های زرد تنوع ژنتیکی بالایی دارند که می‌توان در تحقیقات آتی و برنامه‌های اصلاحی و انتخاب ارقام با تولید کثیرای بیشتر از آنها استفاده نمود.

همانطور که از نتایج این تحقیق استنباط می‌شود، در کل، گون‌های سفید در سه منطقه مورد مطالعه از نظر ژنتیکی به یکدیگر نزدیک‌ترند و حالت یکنواخت‌تری دارند. ولی گون‌های زرد متنوع‌ترند و مطالعات مولکولی و گیاه‌شناسی بیشتری را در آینده نیاز دارند. با توجه به بحث خشکسالی و انقراض بسیاری از گونه‌های گیاهی، توجه به پوشش گیاهی مناطق دارای تنوع ژنتیکی کمتر مانند منطقه موته و راهکارهای حفاظت ژنتیکی در این مکان‌ها ضروری است. از نظر ژنتیکی، گونه‌های دو منطقه

## سپاسگزاری

برخی از امکانات این تحقیق توسط سازمان محیط زیست استان اصفهان فراهم گردیده است که قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده

- Adiguzel, A. G., O. Agar, M. Baris, F. Gulluce, M. Sahin and M. Sengul. 2006. RAPD and FAME analyses of *astragals* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 424-432.
- Alexander, J. A., A. Liston and S. Popovich. 2004. Genetic diversity of the narrow endemic of *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 91(12): 2004-2012.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* 19: 680-683.
- Blair, M. W., O. Panaud and S. R. McCouch. 1999. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oriza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 780-792.
- Cheng, K. T., S. U. Borcherng, C. Chien-Tsu and L. Chun-Ching. 2000. RAPD analysis of *Astragalus* medicines marketed in Taiwan. *American Journal of Chinese Medicine* 28(2): 273-278.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Hamrick, J. L. and M. J.W Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. PP. 281-304. In: Avise, J. C. and J. L. Hamrick (Eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*, Chapman and Hall, New York.
- Huang, L. K., Z. Chen, X. Zhang, Z. Wang and C. Liu. 2009. A comparative analysis of molecular diversity of erect milkvetch (*Astragalus adsurgens*) germplasm from north China using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics* 47: 92-99.
- Koohi Dehkordi, M., B. E. Sayed Tabatabaei, B. Baninasab and M. Mobli. 2006. Assessment of genetic relationships among Iranian and foreign olive cultivars using ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 14(2): 93-102.
- Luo, M. C., K. K. Hwu and T. C. Huang. 2000. Taxonomic study of Taiwan *Astragalus* based on genetic variation. *Taxon* 49: 35-46.
- Maassoumi, A. A. 1998. *Astragalus* in the Old World: A Check-list. Research Institute of Forests and Rangelands Publication, Tehran.
- Mehrnia, M., S. Zarre and A. Sokhan-Sanj. 2005. Intra- and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 149-158.
- Murry, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321-4325.
- Noroozi, M. 2000. Study on distribution and factors affecting the extinct of some medicinal plants in Isfahan province. 1<sup>st</sup> International Congress on Traditional Medicine and Material Medica, 6 November, Tehran, Iran.
- Rahimmalek, M., B. Bahreininejad, M. Khorrami and S. B. E. Tabatabaei. 2009. Genetic diversity and geographical differentiation of *Thymus daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biochemical Genetics* 47: 831-842.
- Reddy, M. P., N. Sarla and E. A. Siddiq. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.



17. Vicente, M. J., F. Segura, M. Aguado, D. Migliaro, J. A. Franco and J. J. Martínez-Sánchez. 2011. Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 175-182.
18. Xie, X., Y. Hu, W. Li, J. Yang, Y. Li and M. Peng. 2009. Genetic diversity in three morphological types of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao as revealed by inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology* 8(18): 4490-4494.
19. Zarre, S. H. 2000. Systematic revision of *Astragalus* sect. *Adiaspastus*, sect. *Macrophyllium* and sect. *Pterophorus* (Fabaceae). *Englera* 18: 1-219.
20. Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

## Evaluation of Genetic Variation of Yellow and White Astragals (*Astragalus* sp.) in Protected Regions of Isfahan Province Using ISSR Marker

M. Rahimmalek<sup>1\*</sup>, M. Fazilati<sup>2</sup>, SH. Gharibi<sup>1</sup> and M. Vahabi<sup>3</sup>

(Received : Nov. 24-2020 ; Accepted : Nov. 2-2011)

### Abstract

Genetic variation of 16 white and yellow astragal accessions collected from three protected regions of Isfahan province (Mooteh, Kolah-Ghazi and Ghamishloo) were evaluated using ISSR marker. Nine ISSR primers produced 221 bands in which 204 were polymorphic among astragal accessions. ISSR banding patterns were transformed into binary data of presence-absence and matrices were processed with NTSYS Ver. 2 software. Mantel correspondence tests were conducted to select the best similarity coefficient. Dendrogram was constructed using the simple matching coefficient with unweighted pair group mathematical average (UPGMA). Cluster analysis showed the presence of two large and five small groups and the PCoA data confirmed the results of clustering. Results showed that white astragals have more genetic similarity but yellow astragals have more genetic diversity and it is necessary to improve their systematic identification. The highest gene diversity was observed in Kolah-Ghazi (0.366) and the least gene diversity belonged to Mooteh (0.129). So, the regions with low gene diversity (e. g. Mooteh) should be more protected in relation to astragal accessions and it is necessary to apply genetic conservation strategies in these regions.

**Keywords:** Astragal, Genetic diversity, ISSR.

---

1. Assis. Prof. and PhD. Student of Plant Breed., Respectively, College of Agric., Isf. Univ. Technol., Isfahan, Iran.

2. Assoc. Prof. of Biochem., Payam Noor Univ., Tehran, Iran.

3. Assis. Prof. of Range and Watershed Manage. , College of Natur. Resour., Isf . Univ. Technol., Isfahan, Iran.

\*: Corresponding Author, Email: mrahimmalek@cc.iut.ac.ir