بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین‌بیان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

قاسم اقلیما[۱]، عزیزاله خیری[۲،*]، محسن ثانی‌خانی[۲]، جواد هادیان[۳] و میترا اعلائی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۳- دانشیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۳)

چکیده

در این بررسی برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت شیرین‌بیان از نشانگر مولکولی ISSR استفاده شد. تعداد ۱۲ آغازگر برای تکثیر قطعات DNA ژنومی جمعیت‌های شیرین‌بیان استفاده شد. تنوع ژنتیکی مطلوبی براساس نشانگر ISSR در بین افراد مشاهده شد. در کل ۱۳۰ باند تشکیل شد و ۱۰۵ باند دارای چندشکلی بودند. میانگین درصد چندشکلی در بین جمعیت‌های مطالعه شده برابر ۸۰/۴۷ محاسبه شد. بیشترین درصد چندشکلی به آغازگرهای IS23، IS21، IS9، IS13 و IS15 اختصاص داشت. میانگین محتوی چندشکلی (PIC) و میانگین شاخص نشانگر (MI) به‌ترتیب ۰/۳۴۷ و ۲/۴۷ بود. شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها بین ۰/۲۰۷ تا ۰/۳۹۳ و شاخص تنوع ژنی نی (h) بین ۰/۱۴۰ تا ۰/۲۷۰ متغیر بود. در کل جمعیت داراب کمترین تنوع ژنتیکی و جمعیت سلطانیه بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. درصد مکان‌های ژنی پلی‌مورف بین ۳۵/۲۴ تا ۶۵/۷۱ درصد متغیر بود. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر در هر مکان‌ژنی به‌ترتیب ۱/۴۶ و ۱/۳۴ محاسبه گردید. بر مبنای میزان فاصله ژنتیکی نی، جمعیت‌های بردسیر و بافت دارای بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۸۸) و جمعیت‌های بردسیر و سلطانیه دارای کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۳۲) بودند. افراد جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGAM و ضریب تشابه جاکارد در سه گروه اصلی گروه‌بندی شدند. نتایج حاصل نشان داد که نشانگر ISSR سیستم نشانگری قابل اطمینان برای آشکاری‌سازی سطح بالایی از چندشکلی است و می‌توان از آن در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در شیرین‌بیان استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، شیرین‌بیان، نشانگر ISSR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **kheiry@znu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

مقدمه

فلات پهناور ایران با تنوع اقلیمی بسیار گسترده، رویشگاه گونه‌های بی‌شمار گیاهی است. تعداد زیادی از این گونه‌های گیاهی به‌لحاظ دارویی و طبی جزء پرارزش‌ترین و منحصر به‌فردترین گونه‌های جهان می‌باشند و یکی از مهمترین آن‌ها که بیش از دو هزار سال کاربرد دارویی دارد، گیاه شیرین بیان می‌باشد (Omidbaigi, 2007). گیاهی چندساله از خانواده بقولات با نام *Glycyrrhiza* که در اصل از واژه یونانی گلیکوس ریزا به‌معنی ریشه شیرین و از تیره فرعی پروانه‌داران (Papilionaceae) است. شیرین‌بیان به‌دلیل دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حائز اهمیت بوده و به‌عنوان یک گیاه صنعتی مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و دخانیات قرار گرفته است (Cirillo *et al*., 2011; Hagiaghay *et al*., 2012). معروف‌ترین گونه آن *Glycyrrhiza glabra* L. به نام شیرین‌بیان شهرت یافته است. شیرین‌بیان در سطوح وسیعی در کشورهای انگلیس، بلژیک، فرانسه، آلمان، ایتالیا، یونان و ترکیه کشت می‌شود. در ایران نیز تقریباً در تمام شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به‌وفور یافت می‌شود (Ahmadian *et al*., 2017). ریشه شیرین‌بیان دارای ترکیبات متعددی نظیر قندهای مختلف (تا ۱۸ درصد)، فلاوونوئیدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، صمغ و نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها می‌باشد. عمده‌ترین ساپونین آن اسید گلیسریزیک یا گلیسریزین به فرمول $C_{42}H_{62}O_{16}$ می‌باشد که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتنیک (آگلیکون) تشکیل شده است (Cirillo *et al*., 2011). عصاره شیرین‌بیان دارای خاصیت ضدویروس، ضدالتهاب، ضدسرفه، درمان هپاتیت B، C و ایدز، تنظیم عملکرد قلب، ضدسرطان، تقویت بدن و حافظه، پادزهر و تسکین درد می‌باشد (Renmin *et al*., 2012). همچنین در صنایع غذایی و دارویی به‌عنوان شیرین‌کننده و اصلاح مزه استفاده می‌شود (Gupta *et al*., 2013).

بهبود محصول از طریق استفاده از تنوع ژنتیکی، کلید موفقیت برنامه‌های اصلاحی است (Renganayaki *et al*. 2001). اختلافات بین ژنوتیپ‌ها با توجه به ویژگی‌های زراعی، مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم نشان دهندهٔ اختلافات در سطح DNA است. بنابراین، کسب اطلاعات در مورد روابط ژنتیکی، اجتناب ناپذیر است (Tahir and Karim, 2011). دلایل زیادی برای نیاز به ارزیابی صحیح تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گیاهی وجود دارد. از این دلایل می‌توان به گواهی بذر، حمایت یا نگهداری صحیح تنوع ژنتیکی گیاهان (Dwevdi and Gaibriyal, 2009)، تجزیه تغییرپذیری ژنتیکی در ژنوتیپ‌ها، توزیع و نگهداری ژرم‌پلاسم (Zheleva *et al*., 2007) و انتخاب صحیح والدهای برتر برای تلاقی‌ها اشاره کرد (Tahir and Karim, 2011). نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA کمتر تحت‌تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند (Collard *et al*., 2005). در سال‌های اخیر، تکنولوژی PCR به توسعه تکنیک ساده و سریع به‌نام بین توالی‌های تکرای ساده (ISSR) منجر شد که مستقل از شرایط محیطی هستند و تحت تأثیر مراحل رشد گیاه قرار نمی‌گیرند. این نشانگر هم برای انگشت نگاری DNA (Gupta *et al*., 2008) و مطالعه ژنتیک جمعیت (Alam *et al*., 2009) استفاده شده است. این تکنیک میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (Terzopoulos and Bebeli, 2008).

گیاهان دارویی انحصاری از طرفی به‌دلیل پراکنش جغرافیایی محدود و نیازهای زیست بومی خاصی که دارند و از طرفی دیگر به‌دلیل برداشت‌های بی‌رویه و غیراصولی و نیز آسیب‌های اقلیمی (مثل خشکسالی)، آسیب‌های ناشی از انسان (مثل آتش‌زدن مراتع و جنگل‌ها، تغییر کاربری مراتع به زمین‌های زراعی

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

یا ساخت و ساز و چراهای بی‌رویه)، دائم در معرض خطر انقراض و نابودی قرار دارند (Alibrahim *et al.*, 2004). اهلی‌سازی و حفاظت از این گیاهان نه‌تنها می‌تواند از انقراض آن‌ها جلوگیری نماید، بلکه تأمین‌کننده نیازهای روزافزون ترکیبات دارویی حال و آینده کشور می‌باشد و وسیله‌ای جهت کاهش فشار بر جوامع گیاهی وحشی نیز محسوب می‌شود (Najafi *et al.*, 2005). نخستین گام در راستای اهلی‌کردن یک گیاه خاص، ارزیابی تنوع درون گونه‌ای جمعیت‌های مختلف آن گونه گیاهی به کمک نشانگرهای ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی جهت شناسایی میزان شباهت و تفاوت بین جمعیت‌ها و نیز برتری‌های هر جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها بسته به هدف اصلاح‌گر می‌باشد (Nemeth, 2000). کاربرد نشانگرهای مختلف در ارزیابی جمعیت‌های مختلف از طرفی باعث افزایش سرعت و دقت انتخاب جمعیت برتر می‌گردد و از طرف دیگر هزینه‌های اهلی‌سازی را کاهش می‌دهد (Naghavi *et al.*, 2004). تنوع لاین‌های مختلف شیرین‌بیان با استفاده از نشانگرهای ISSR شناسایی شده‌اند (Zhang *et al.*, 2006). مطالعات زیادی به‌منظور بررسی تنوع مرفولوژیکی و مولکولی گونه‌های مختلف شیرین‌بیان با استفاده از نشانگرهای SSR (Erayman *et al*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Esmaeili *et al.*, 2020)، RAPD (Khan *et al.*, 2009) و ISSR (Yao *et al.*, 2008; Bei-ning *et al.*, 2012) انجام شده است.

شیرین‌بیان پراکنش وسیعی در ایران داشته که نشان از سازگاری بالای آن با اغلب شرایط آب و هوایی ایران می‌باشد، لذا به‌نظر می‌رسد که شناخت بیشتر پتانسیل‌های دارویی این گیاه و نیز کمک به فرآیند اهلی‌سازی آن بتواند از انقراض آن جلوگیری کرده و همچنین زمینه کشت‌وکار و اشتغال‌زایی زیادی را فراهم آورد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های این گونه با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه اولیه با استفاده از اطلاعات موجود در فلور و نیز با مراجعه به مناطق مختلف پیرامون، رویشگاه‌های مختلف شیرین‌بیان در مناطق مختلف شناسایی گردید. برای نمونه ریزوم در هر رویشگاه با فاصله ۱۰۰ متری، ۱۰-۵ فرد از هر جمعیت (بسته به اندازه جمعیت) جمع‌آوری گردید (Hadian *et al.*, 2014a). نمونه جمع‌آوری شده بلافاصله به مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان منتقل و کشت گردید. پس از رشد بوته‌ها به‌اندازه کافی، از هر جمعیت ۳ فرد انتخاب و نمونه برگی با استفاده از تیغ استریل تهیه شد و درون فویل آلومینیومی و سپس در ازت مایع قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و استخراج DNA انجام گرفت (Doyle and Doyle, 1987) و از دو روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. دوازده آغازگر برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات و توالی این آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۰۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار 1x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد و به‌مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به‌ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز تزریق و با ولتاژ ۱۰۰ و مدت ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به‌مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده باندها استفاده شد.

تحلیل آماری: اطلاعات به‌دست آمده از ژل ها در الکتروفورز در قالب ماتریسی از صفر و یک تنظیم شدند. باندهایی که چندشکلی نشان دادند به‌صورت یک و صفر (برای حضور و عدم حضور) امتیازبندی شدند. برای محاسبه و تشکیل ماتریس تشابه از رویه SimQual و ایجاد این ماتریس به سه روش تطابق ساده، دایس و جاکارد، و برای گروه‌بندی از رویه SAHN به روش UPGMA و نرم‌افزار NTSYS 2.02 استفاده شد. با استفاده از ضریب کوفنتیک، ضریب تشابه مناسب انتخاب گردید. جهت تعیین کارآیی الگوریتم مورد استفاده و میزان برازش خوشه‌بندی از ضریب کوفنتیک که با نرم‌افزار NTSYS 2.02 محاسبه شده بود، استفاده گردید.

محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC[1]) با فرمول $PIC=1-\Sigma pi^2$ محاسبه شد. در این رابطه، Pi برابر با آلل iام هر جایگاه ژنی برای همهٔ ژنوتیپ‌ها است. همچنین شاخص نشانگر (MI[2]) برای همهٔ آغازگرها از رابطهٔ $MI= PIC \times N \times \beta$ محاسبه شد، که PIC ، محتوای اطلاعات چندشکلی؛ N، تعداد کل نوارها و β، درصد چندشکلی برای هر آغازگر است. مقدار RP[3] نیز برای هر آغازگر از رابطه $RP= \Sigma I_b$ که میزان I_b از رابطه $Ib= 1-(2|0.5-Pi|)$ محاسبه شد که در این رابطه، P_i درصد فراوانی یک آلل از هر نوار است (Pawell *et al.*, 1996).

همچنین ماتریس فاصله براساس تحلیل نی انجام شد (Nei, 1973). در این ارزیابی تعداد آلل های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون برای هر یک از جمعیت‌ها با نرم‌افزار GenAlex نسخه 6.3 محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی[4] و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با نرم‌افزار GenAlex نسخه 6.3 انجام شد.

جدول ۱- لیست آغازگرهای ISSR مورد استفاده به همراه توالی و دمای اتصال (R= A/T ،Y= G/C)

Table 1. List of ISSR primers used with sequence and annealing temperature (Y = G / C, R = A / T)

آغازگر ISSR Primer ISSR	توالی (′3→′5) Sequence (5′→3′)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	منبع Reference
IS4	CACACACACACACACACAG	52	Hadian *et al.*, 2014b
IS5	ACACACACACACACACACG	52	
IS6	ACACACACACACACACACC	52	
IS7	ACGACGACGACGACGG	52	
IS8	ACGACGACGACGACGC	52	
IS9	TCGTCGTCGTCGTCG	52	
IS11	ACACACACACACACACG	52	
IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	49	
IS15	ACACACACACACACACYG	49	
IS21	AGAGAGAGAGAGAGAGRC	52	
IS23	CTCCTCCTCCTCRC	49	
UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	52	

1- Polymorphism information content
2- Marker index
3- Resolving power
4- Principal coordinate analysis

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

نتایج و بحث

محاسبه شاخص‌های مولکولی: تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین‌بیان با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۲ پرایمر ISSR، تعداد ۱۳۰ نوار حاصل گردید که ۱۰۵ نوار (۸۰/٤۷ درصد) چندشکل بودند. دامنه نوارهای چندشکل بین هفت (UBC۸٤۹، IS4 و IS6) تا ۱۱ (IS21) با میانگین ۸/۷۵ نوار چندشکل متغیر بود. درصد نوارهای چندشکل نیز بین ۷۰ (IS4) تا ۹۰ درصد (IS23) به‌دست آمد (جدول ۲). میزان EMR برابر با ۷/۰۸ و میانگین هتروزیگوسیتی برای باندهای پلی‌مورف (Hav-p) ۰/۳٤۷ به‌دست آمد. شاخص نشانگری (MI) یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد. شاخص نشانگر (MI) برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکلی به‌دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می شود (Milbourne *et al.*, 1997). زیاد بودن شاخص نشانگر، بیان کنندهٔ فراهم کردن اطلاعات بیشتر، از ژنوم باتوجه به تولید تعداد بیشتر نوار چندشکلی است. شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (Rp) محاسبه شد تا توانایی نشانگرهای ISSR را در تمایز جمعیت‌های شیرین‌بیان نشان دهد. میانگین شاخص نشانگر در جمعیت‌های مورد مطالعه ۲/٤۷ به‌دست آمد که بیشترین آن (۳/۲٤) در آغازگر IS21 و کمترین آن (۱/۷۵) در آغازگر IS4 مشاهده شد. قدرت تفکیک بین ۳/۲۷ برای IS4 تا ۵/٦۹ برای IS21 و میانگین قدرت تفکیک تمام آغازگرها ٤/٥٤ به‌دست آمد. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. قدرت تفکیک، شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می دهد (Kayis *et al.*, 2010). برای هر آغازگر میانگین نسبت جمعیت‌های دارای نوار آگاهی بخش (mp) و میانگین باند آگاهی دهنده (mI_b) نیز در جدول ۲ آورده شده است. شاخص محتوای چندشکلی(PIC)، یکی از شاخص‌های مهم مقایسهٔ نشانگرهای مختلف ازنظر قدرت تمایز آن‌ها است. مقادیر زیاد این شاخص، دلیل بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد (Thimmappaiah *et al.*, 2009). مقادیر اطلاعات چندشکلی از صفر تا یک متغیر هستند و هرچه اعداد به‌دست آمده بزرگ‌تر باشند، بیان‌کننده فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نمونه های بررسی شده است (Wei *et al.*, 2005). محتویات اطلاعات چندشکل (PIC) در آغازگرهای ISSR بین ۰/۲۸۱ (IS5) تا ۰/۳۷٦ (IS15) و با میانگین ۰/۳۷ متغیر بود. محتوی اطلاعات چندشکلی(PIC)، یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آن‌ها به‌شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه آغازگری دارد که در قدرت و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین، آغازگرهای با محتوای اطلاعات چندشکلی بالا (PIC) برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Esmaeili *et al.*, 2020). آغازگرهای که PIC بزرگتر از ۰/۵ داشته باشند، دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند. آغازگرهایی که مقادیر PIC آن‌ها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند و آن‌های که کمتر از ۰/۲۵ باشد، حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2012). براساس شاخص‌های محتوای کلی اطلاعات چندشکلی (PIC) مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های شیرین‌بیان، آغازگرهای IS15، IS7، IS23، IS11 وIS8 تعیین شد و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم‌پلاسم دیگر جمعیت‌های این گونه در تحقیقات بعدی استفاده شوند. در بررسی روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از آغازگر ISSR براساس محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرهای برتر برای آنالیز ژرم‌پلاسم نعناع معرفی شد (Zinodini *et al.*, 2013).

محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج ضریب کوفنتیک برای ضرایب و روش‌های گروه‌بندی مختلف، ضریب جاکارد و روش UPGMA دارای بالاترین ضریب کوفنتیک بود و بر این اساس افراد گروه‌بندی شدند. در این کلاستر، ٦٦ ژنوتیپ شیرین‌بیان بر اساس ضریب تشابه ۰/۵۹ به سه گروه تقسیم شدند. یک فرد از جمعیت سلطانیه (۲۱) در یک گروه کاملا مجزا قرار گرفت. در تقسیم بندی زیر گروه‌ها نیز، یک فرد از جمعیت ربط (۱) در گروه جداگانه قرار گرفت. در این تقسیم بندی، اکثر افراد مربوط به هر منطقه در گروه‌های مجزا قرار گرفتند.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

جدول۲- آغازگرها و جزئیات مربوط به الگوهای باندی به‌دست آمده از آنالیز ISSR

Table 2. Primers and details of banding pattern revealed through ISSR analysis

آغازگر Primer	تعداد قطعات تکثیر شده No. of amplified fragments	تعداد قطعات چندشکل No. of polymorphic fragments	درصد چندشکلی % of polymorphism	نسبت جمعیت‌های دارای باند آگاهی بخش Main values of proportion of accessions containing band	قدرت تفکیک Resolving power	میانگین باندهای آگاهی دهنده Main values of band informativeness	میانگین محتوی چندشکلی Main of polymorphic information content	نسبت چند گانه مؤثر effective multiplex ratio	شاخص نشانگر Marker index
IS4	9	7	77.77	0.367	3.272	0.467	0.322	5.443	1.75
IS5	10	8	80.00	0.351	3.333	0.416	0.281	6.400	1.80
IS6	10	7	70.00	0.488	3.606	0.515	0.338	4.900	1.65
IS7	11	9	81.80	0.470	5.393	0.599	0.375	7.29	2.73
IS8	11	8	72.70	0.477	4.636	0.579	0.362	5.81	2.11
IS9	12	10	83.30	0.396	5.181	0.518	0.356	8.33	2.96
IS11	11	9	81.80	0.499	4.969	0.552	0.362	7.36	2.67
IS13	12	10	83.30	0.410	4.787	0.478	0.334	8.33	2.78
IS15	12	10	83.30	0.189	5.666	0.566	0.376	8.33	3.13
IS21	13	11	84.61	0.495	5.696	0.517	0.348	9.307	3.24
IS23	10	9	90.00	0.315	4.515	0.501	0.371	8.100	3.00
UBC849	9	7	77.77	0.458	3.424	0.489	0.334	5.443	1.82
Total	130	105							
Average	10.38 MR	8.75 EMR	80.47		4.540	0.516	0.347*	7.088	2.47

*: میانگین هتروزیگوسیتی برای باندهای پلی‌مورف

*: Average heterozygosity for polymorphic bands

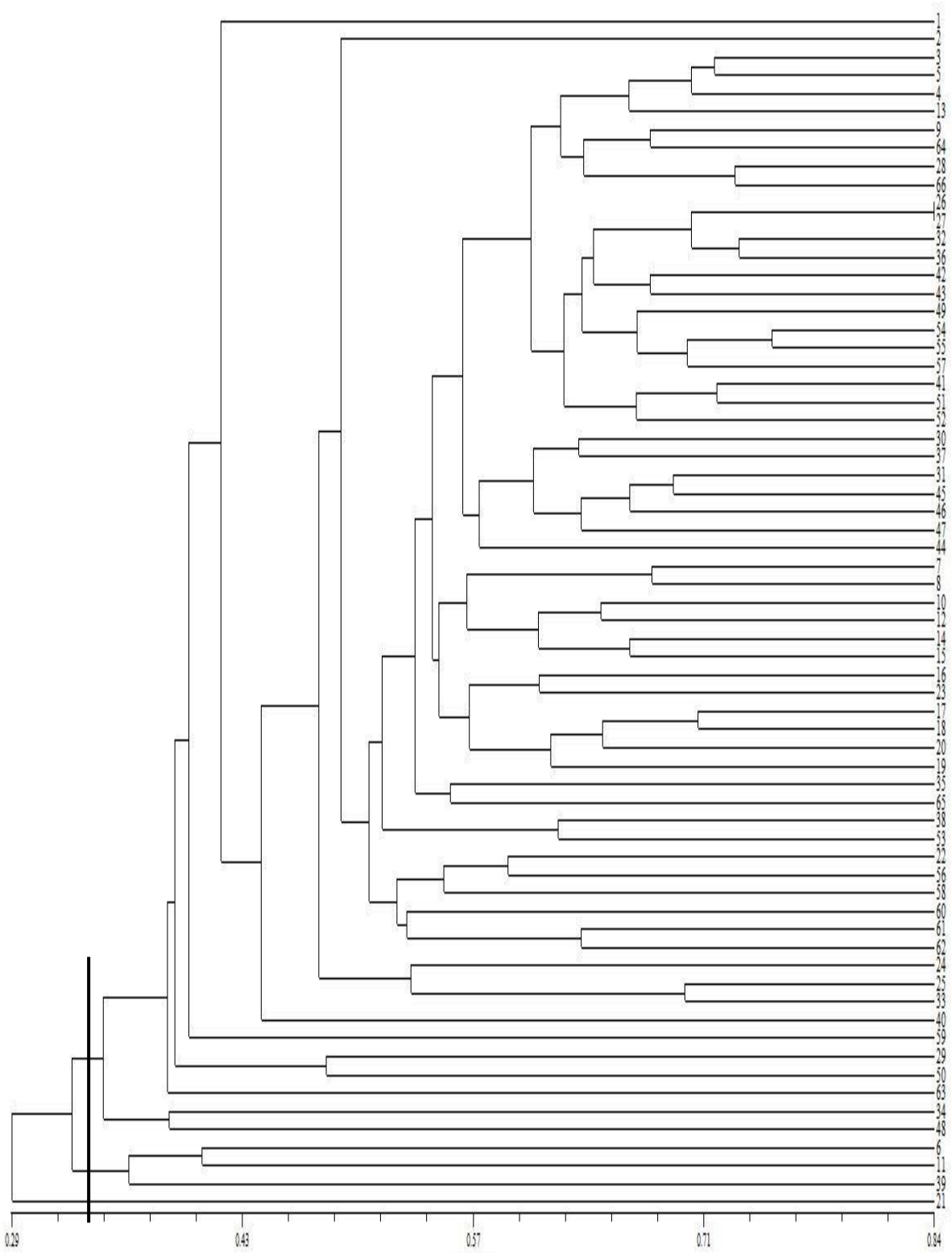
پراکنش جمعیت‌ها براساس تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیای تطابق نداشت، که ممکن است علت این موضوع جدایی منشاء جغرافیایی ژنوتیپ‌ها یا ایجاد و تجمع جهش‌های ژنتکی مجزا در سطح ژنوم باشد که باعث ایجاد تنوع در آن‌ها نسبت به یکدیگر شده است (Noorian and Shirvani, 2020). میزان فواصل ژنتیکی در بین جمعیت‌ها توسط ماتریس فاصله بر اساس شاخص نی تعیین شد. میزان فاصله ژنتیکی نی بین ۰/۱۳۲۲ تا ۰/۸۸۸۸ مشاهده شد. در این ارزیابی، بیشترین شباهت مربوط به جمعیت‌های بردسیر با بافت (۰/۸۸) بود که نشان دهنده وجود جریان ژنی قوی‌تر بین این جمعیت‌ها می‌باشد. بیشترین تفاوت نیز مربوط به جمعیت‌های بردسیر با سلطانیه (۰/۱۳۲۲) بود که پیشنهاد می‌گردد از این جمعیت‌ها که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. هر چند سیستم گرده‌افشانی نقش برجسته‌ای در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی دارد. عوامل محیطی متعدد دیگر بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه گیاهی اثر دارند (Bussell, 1999). عواملی مانند فرم رویشی مثل یکساله یا چندساله بودن، شرایط اکولوژیک، به‌طریق مختلف بر روی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یک گونه گیاهی تأثیر می‌گذارند (Nybom and Bartish, 2000). همچنین تنش‌های محیطی مانند تنش‌های غیرزیستی (مثل خاک و اقلیم) می‌تواند بر روی تنوع و شباهت ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی اثر بگذارد (Van valen, 1995). بر اثر انتخاب طبیعی جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک مشابه، ولی در نقاط مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند، در مقایسه با جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک متفاوت رشد می‌کنند شباهت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (Volis *et al.*, 2001).

محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت: در بین جمعیت‌های وحشی شیرین‌بیان، میزان مکان‌های ژنی چندشکل (NPL) دامنه‌ی بین ۳۷ تا ٦۹ و با میانگین ٤۹/۱۳ مکان ژنی پلی‌مورف و درصد مکان‌های ژنی پلی‌مورف (PL%) بین ۳۵/۲٤ تا ٦۵/۷۱ و با میانگین ٤٦/۸۰ درصد مشاهده شد. در مطالعه‌ای جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲٤ توده‌ی زیره سبز از ۳۸ آغازگر ISSR استفاده شد که در این میان ۱۲ آغازگر تولید قطعات چندشکل نمودند (Ma yanming *et al.*, 2008). میزان تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در هر مکان‌ژنی بین ۱/۳۵ تا ۱/٦۰ و با میانگین ۱/٤٦ بود. تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) در هر مکان‌ژنی بین ۱/۲٤ تا ۱/٤۸ و میانگین ۱/۳٤ محاسبه گردید. از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل‌های مؤثر است (Gheitarani *et al.*, 2020)، می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین‌بیان استفاده کرد.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]



ضریب تشابه (Similarity coefficient)

شکل۱- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ٦٦ فرد شیرین‌بیان با استفاده از داده‌های ISSR

Figure 1. UPGMA cluster analysis of different 66 individuals of *G. glabra* based on ISSR data matrix

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هر یک از جمعیت‌ها از طریق محاسبه نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده (Ne/Na) تعیین گردید که این نسبت از دامنه ۰/۸۰۵ تا ۰/۹۳٤ و با میانگین ۰/۹۱۳ متغیر بود. هرچه این نسبت به یک نزدیک‌تر باشد نشان‌دهنده یکنواختی گونه مورد نظر است (Zinodini *et al*., 2013). شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها بین ۰/۲۰۷ تا ۰/۳۹۳ و میانگین ۰/۲۸۷ و شاخص تنوع ژنی نی (h) بین ۰/۱٤۰ تا ۰/۲۷۰ و با میانگین ۰/۱۹۱ بود، که در کل جمعیت داراب کمترین تنوع ژنتیکی و سلطانیه بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. در کل جمعیت‌ها (سطح گونه-ای)، میزان تعداد آلل‌های مشاهده شده ۱/۹۹، تعداد آلل‌های مؤثر در هر مکان‌ژنی ۱/٦۰، شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۵۱۷ و شاخص تنوع ژنی نی ۰/۳٤۷ به‌دست آمد (جدول ۳). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به‌دلیل تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها پیچیدگی‌هایی دارد. این پژوهش‌ها به تعداد افراد بررسی شده در هر جمعیت، تعداد مکان‌های آللی در هر جمعیت، موقعیت آللی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازهٔ جمعیت بستگی دارد (Latifi *et al*., 2018).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که در آن تغییرات مشاهده شده داخل و بین اجزا توده با استفاده از فاصله‌های ژنتیکی دسته‌بندی می‌شود، با استفاده از نرم‌افزار GenALEx برآورد و در جدول ٤ نمایش داده شده است. براساس نتایج این دسته‌بندی، در این مطالعه ۷۷ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده بین جمعیت‌ها و ۲۳ درصد درون جمعیت‌ها بود. این آزمون در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود. تعیین تنوع ژنتیکی جهت انجام پروژهای حفاظت، اهلی‌سازی و اصلاح این گیاه ضرروی است (Wasala and Prasanna, 2012). تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها تحت تأثیر عوامل بیولوژیکی، پراکنش، چرخه زندگی، اندازه جمعیت، جریان ژنی، نرخ جهش، فرسایش ژنتیکی و سیستم گرده‌افشانی است (Petrova *et al*., 2017). به دلیل پراکنش گسترده و چندساله بودن شیرین‌بیان بیشتر در معرض جهش قرار گرفته و منجربه افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌شود (Esmaeili *et al*., 2020). اگرچه در اکثر مناطق ایران این گیاه به دلیل برداشت بی‌رویه در معرض انقراض قرار گرفته است، ولی نتایج این مطالعه نشان داد که این گیاه دارای تنوع قابل‌توجهی است که این تنوع سبب افزایش مقاومت این گیاه به شرایط محیطی متفاوت خواهد شد.

تجزیه به مختصات اصلی: بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) در نشانگرهای ISSR، داده‌هایی که مقادیر ویژه بالای یک داشتند در ۵ عامل قرار گرفتند که در مجموع این عوامل توانستند ٦۱/٤۲ درصد از کل تغییرات را توجیه کنند. در بین این عوامل، عامل اول درصد بالایی با میزان ۱۸/٤۵ درصد از واریانس را توجیه نمود. دو عامل دوم و سوم به‌ترتیب با ۱۳/٤۰ و ۹/٦۸ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در داده‌های مولکولی هرچه درصد واریانس اختصاص یافته به عامل‌های اصلی کمتر باشد نشانگرها توزیع بهتری داشته و نشان دهنده این امر می‌باشد که نشانگرهای مولکولی نواحی وسیع‌تری از ژنوم را مورد بررسی قرار داده‌اند و در نتیجه اطلاعات بیشتری از مناطق مختلف ژنوم که حاوی ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات مختلف می‌باشند را مورد هدف و بررسی قرار داده است (Mohammadi and Prasanna, 2003; Fazeli and Cheghamirza, 2011). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعه حاضر نشانگرهای ISSR کارایی مناسبی داشته‌اند و توانستند سطح وسیعی از ژنوم را پوشش دهند.

نتایج این تحقیق نشان داد که بالا بودن میزان چندشکلی به‌دست آمده نشان‌دهنده کارایی مناسب نشانگر ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین‌بیان می‌باشد و می‌توان از آن به‌عنوان ابزار مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در گیاهان استفاده نمود.

جدول۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *G. glabra* توسط نشانگرهای مولکولی ISSR

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

Table 3. Genetic diversity parameters within population of *G. glabra* revealed by ISSR markers

ردیف Row	جمعیت population	اندازه نمونه sample size	تعداد مکان‌های چندشکل Polymorphic loci number	درصد مکان‌های چندشکل Percentage of polymorphic loci (%)	تعداد آلل مشاهده شده Observe allele No.	تعداد آلل مؤثر Effective allele .No	نسبت تعداد آلل مؤثر بر مشاهده شده Effective allele/ Observe allele No.	تعداد آلل‌های مؤثر بر مشاهده شده Shannon Index	شاخص نی Nei index
1	ربط (Rabat)	3	63	60.00	1.60	1.48	0.925	0.265	0.373
2	تاکستان (Takestan)	3	51	48.57	1.48	1.35	0.912	0.199	0.289
3	مهاباد (Mahabad)	3	44	41.90	1.41	1.29	0.915	0.166	0.244
4	شهررضا (Shahreza)	3	55	52.38	1.52	1.38	0.908	0.216	0.313
5	قوچان (Quchan)	3	42	40.00	1.40	1.28	0.914	0.159	0.233
6	کرمانشاه (Kermansha)	3	37	35.24	1.35	1.27	0.941	0.148	0.214
7	سلطانیه (Solataniyeh)	3	69	65.71	1.65	1.48	0.897	0.270	0.393
8	یاسوج (Yasuj)	3	50	47.62	1.47	1.34	0.912	0.192	0.281
9	تفت (Taft)	3	48	45.71	1.45	1.35	0.931	0.194	0.280
10	بردسیر (Bardsir)	3	56	53.33	1.53	1.39	0.908	0.219	0.318
11	بافت (Baft)	3	51	48.57	1.48	1.37	0.926	0.204	0.295
12	شهربابک (Sharebabak)	3	60	57.14	1.57	1.37	0.873	0.219	0.325
13	سمیرم (Semirom)	3	52	49.52	1.49	1.33	0.893	0.193	0.284
14	مروست (Marvast)	3	52	49.52	1.49	1.35	0.906	0.198	0.290
15	شهربابک (Shahrekord)	3	41	39.05	1.39	1.27	0.914	0.154	0.227
16	کرازون (Kazerun)	3	38	36.19	1.36	1.25	0.919	0.144	0.211
17	سپیدان (Sepidan)	3	55	52.38	1.52	1.39	0.914	0.219	0.317
18	داراب (Darab)	3	38	36.19	1.36	1.24	0.912	0.140	0.207
19	باجگاه (Bajgah)	3	42	40.00	1.40	1.27	0.908	0.155	0.229
20	سیرجان (Sirjan)	3	49	46.67	1.46	1.35	0.925	0.197	0.284
21	حاجی آباد (Hajiabad)	3	39	37.14	1.37	1.28	0.934	0.156	0.225
22	اهر (Ahar)	3	49	46.67	1.47	1.33	0.907	0.190	0.277
	در سطح گونه Species level	66	105	81.00	1.99	1.60	0.805	0.347	0.517
	میانگین (Mean)		49.13	46.80	1.46	1.34	0.913	0.191	0.278

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های شیرین‌بیان

Table 4. Results of molecular variance analysis (AMOVA) of ISSR data from population of *G. glabra*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean Square	واریانس برآورد شده Estimated variance	درصد از واریانس Percentage of variance
درون جمعیت‌ها Among Populations	21	129.212	6.153	0.965	23%
بین جمعیت‌ها Within Populations	44	143.333	3.258	3.258	77%
کل Total	65	272.545		4.223	100%

یکی از اهداف به‌نژادگران گیاهی، حفاظت از ذخایر ژنتیکی می‌باشد که تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها و در نتیجه بقای گونه می‌شود. از آنجا که مطالعه بر روی روابط ژنتیکی برای اصلاح گیاهان و همچنین حفاظت از منابع ژنتیکی ضروری می‌باشد (Aghaei *et al*., 2012)، این بررسی نشان داد با وجود در معرض خطر بودن گونه‌های گیاهی، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌ها وجود دارد و می‌توان تدابیری برای حفاظت و برنامه‌های اصلاحی بر روی این گونه انجام داد. از آنجایی که برنامه‌های اصلاحی به تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌ها نیاز دارند، تنوع موجود در جمعیت‌های مورد بررسی می‌تواند کمک شایانی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی بکند.

References

Aghaei, M., Darvishzadeh, R. and Hassani, A. (2012). Molecular characterization and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Revista Ciencia Agronomica*, **43:** 312-320.

Ahmadian, H., Mirahmadi, F. and Rashidzade, B. (2018). Effects of ultrasound on extraction of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza glabra* L. in comparison with modified Rosen's method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **33(6):** 961-974 (In Persian).

Alam, A., Naik, P.K. and Mishra Gyan, P. (2009). Congruence of RAPD and ISSR Markers for evaluation of genomic relationship among 28 populations of *Podophyllum Hexandrum* from himachal pradesh. *Turkish Journal of Botany*, **33:** 1-12

Alibrahim, MT., Sabaghnia, N. Ebadi, A. and Mohebbodini, M. (2004). Study of drought and salinity stress on germination of common Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Research in Agricultural Science*, **1:** 13-19 (In Persian).

Bei-ning, L.I., Bo, N.A., Chun-sheng, L., Ying-qun, Z.H.O. and Juan, L. (2010). Analysis on genetic diversity of licorice *Glycyrrhiza uralensis* from geo-authentic product areas by ISSR markers. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, **12:**10-36.

Bussell, J.D. (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8:** 775-789

Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U., Restuccia, D. and Picci, N. (2011). Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots. *Food Chemistry*, **125:** 1058-1063.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. and Bandpang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. *Euphytica*, **142:** 169-196.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.

Dwevdi, K.K. and Gaibriyal, M. (2009). Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Asian Journal of Agriculture Science*, **1:** 7-8.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

Erayman, M., Ilhan, E., Guzel, Y. and Eren, A.H. (2014). Transferability of SSR markers from distantly related legumes to Glycyrrhiza species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **38:** 32-38.

Esmaeili, H., Karami, A., Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S. and Lars-Gernot, O. (2020). Genetic structure and variation in Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) populations based on morphological, phytochemical and simple sequence repeats markers. *Industrial Crops and Product*, **145:** 112-140.

Fazeli, F. and Cheghamirza, K. (2011). Investigation of genetic diversity in Iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Modern Genetic*, **6(2):** 97-104 (In Persian).

Gheitarani, B., Erfani-Moghadam, J. and Fazeli, A. (2020). Evaluation of Genetic diversity among some common fig Using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2):** 43-54 (In Persian).

Gupta, D.K., Verma, M.K. and Khajuria, R.K. (2013). Development of a validated UPLC-qTOF-MS/MS method for determination of bioactive constituent from *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Pharmaceutical Analysis*, **33:** 205-210.

Gupta, S., Srivastava, M., Mishra Gyan, P., Naik, P.K., Chauhan, R.S., Tiwari, S.K., Kumar, M. and Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha Curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology*, **23:** 4230-4243.

Hadian, J., Esmaeili, H., Nadjafi, F. and Khadivi-Khub, A. (2014a). Essential oil characterization of *Satureja rechingeri* in Iran. *Industrial Crops and Product*, **61:** 403-409.

Hadian, J., Karami, A.R., Azizi, A. and Khadivi-Khub, A. (2014b). Ubiquitous genetic diversity among and within wild populations of *Satureja rechingeri* assessed with ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, **301(3):** 923-930.

Hagiaghay, R., Khan Ahmadi, M., Naghdi badi, H., Akhundzade, N., Khaliq, F., Mherafarin, A. and Shahriar, S. (2012). Analytical review on methods to isolate and measure the glycyrrhizic acid from licorice. *Journal of Medicinal Plants*, **13(50):** 1-10.

Kayis, S.A., Hakki, E.E. and Pinarkara, E. (2010) Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, **5(21):** 2925-2933.

Khan, S., Miraz, K.J., Tayaab, M. and Abdin, M.Z. (2009). RAPD profile for authentication of medicinal plant *Glycyrrhiza glabra* Linn. *International Journal of Food Safety*, **11:** 24-28.

Latifi, A. Yosefi, M. and Haezinasab, M. (2018). Study of genetic diversity in some populations of *Cordia myxa* L. in Iran by using CDDP molecular marker. *Iranian Journal of Plant Biology*, **9(34):** 39-35.

Liu, Y., Zhang, P., Song, M., Hou, J., Qing, M. and, Wang, W. (2015). Transcriptome analysis and development of SSR molecular markers in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *PLoS ONE*, **10(11):** e0143017.

Ma yanming, L., Wang, H. and Han, F. (2008). Evaleuation of cumin germplasm by ISSR markers. *Xinjiang Agriculture Science*, **45:** 143-152.

Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, **3:** 127–136.

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

Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizadeh Lahiji, H., Alami, A., Shoae Deylami, M. and Talesh Sasani, S. (2012). Study of genetic diversity of different flue-cured tobacco genotypes using ISSR marker and Retrotransposons. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **43:** 371-380 (In Persian).

Naghavi, R., Gharayazi, B. and Hosseini, G. (2004). *Molecular Markers*. University of Tehran, Tehran. IR (In Persian).

Najafi, F., Koocheki, A., Rezvani Moghaddam, P.P. and Rastgoo, M. (2005). Evaluation of seed germination characteristics in *Nepeta binaludensis*, a highly endangered medicinal plant of Iran. *Iranian Journal of Field Crops Research*, **4:** 1-8 (In Persian).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70(12):** 3321-3323.

Nemeth, E. (2000). Needs, problems and achievements of introduction of wild growing medicinal plants in to the agriculture. *First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries and VI Meeting "Days of Medicinal Plants"*. Arandjelovac, Yugoslavia, Serbia.

Noorian, M. and Shirvani, H. (2020). Genetic variabiliy of *Malva neglecta* ecotype using ISSR molecular markers. *Journal of Plant Research*, **32:** 806-814 (In Persian).

Nybom, H. and Bartish, I.V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematic*, **3:** 293-114.

Omidbaigi, O. (2007). *Production and Processing of Medicinal Herbs* (Vol 3). Quds Razavi Publication, Mashhad, IR (In Persian).

Pawell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A. (1996). The comparision of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2:** 225-238.

Petrova, G., Petrova, S., Delcheva, M. and Bancheva, S. (2017). Genetic diversity and conservation of Bulgarian endemic *Verbasum tzar-borisii* (Scrophulariaceae). *Annales Botanici Fennici*, **54:** 307-317.

Renganayaki, K., Read, J.C. and Fritz, A.K. (2001). Genetic diversity among tegxas bluegrass *(Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **2:** 1037-1045

Renmin, W., Chan, L., Jingliang, L., Fang, Y., Jianpei, G. and Xuejun, P. (2012). Pressured microwave-assisted hydrolysis of crude glycyrrhizic acid for preparation of glycyrrhetinic acid. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **20(1):** 152-157.

Slageren, M. and Van, W. (1994). Wild wheats: a monograph *Aegilops* L. and *Amblypyrum* (Jaub. and spach.) of eig (poaceae). Wagenin Gen. Agr., univ.ICARDA.

Tahir, N.A.R. and Karim, H.F.H. (2011). Determination of genetic relationship among some varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Sulaimani by RAPD and ISSR markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **4:** 77-86.

Terzopoulos, PJ. and Bebeli, PJ. (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, **108:** 39-44.

Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120(3):** 411-417.

Van Valen, L. (1965) Morphological variation and width of ecological niche. *American Naturalist*, **99:** 377-390.

Volis, S., Yakubov, B., Shulgina, I., Ward, D., Zur, V. and Nedlinge, S. (2001). Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of Linnaean Society*, **74:** 289-303.

Wasala, S.K. and Prasanna, B.M. (2012). Microsatellite marker-based diversity and population genetic analysis of selected lowland and mid-altitude maize landrace accessions of India. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **22:** 392-400.

Wei, Y.M., Hou, Y.C., Yan, Z.H., Wu, W., Zhang, Z.Q., Liu, D.C. and Zhang, Y.L. (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, **46:** 3-9.

Yao, H., Zhao, Y., Chen, D.F., Chen, J.K. and Zhou, T.S. (2008). ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Gycyrrhiza uralensis*. *Biologia Plantarum*, **52(1):**117-120.

Zinodini, A., Farshadfar, M., Safari, H., Moradi, F. and Shirvani, H. (2013). Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using ISSR Markers. *Journal of Crop Biotechnology*, **5:** 11-25.

Zhang, A.H., LEI, F.J., Chen, C.B. and Zhang, L.X. (2006). Seed Property Comparison and Genetic Diversity Analysis among Different Lines of *Glycyrrhiza uralensis*. *Journal of Jilin Agricultural University*, **6:**10-30.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

Zheleva, D., Todorovska, E., Chirstov, N., Ivanov, P., Ivanov, I. and Todorov, I. (2007). Assessing the genetic variation in Bulgarian bred wheat varieties by biochemical and molecular. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, **12:** 311-321.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]

Study of Genetic Diversity of *Glycyrrizha glabra* L. Populations Using ISSR Molecular Markers

Ghasem Eghlima[1], Azizollah Kheiry[2,*], Mohsen Sanikhani[2], Javad Hadian[3] and Mitra Aelaei[2]

1- Ph.D. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Associate Professor, Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received: November 9, 2020– Accepted: June 13, 2021)

Abstract

Twenty-two *G. glabra* populations were used to study the genetic diversity of ISSR molecular markers. 12 primers were used to amplification of genomic DNA fragments of *G. glabra* populations. High genetic diversity based on ISSR markers was observed among individuals. A total of 130 bands were formed and 105 bands were polymorphic. The mean polymorphism percentage among studied populations was 80.47. The highest polymorphic percentages were assigned to IS23, IS21, IS9, IS13 and IS15 primers. The mean of PIC and MI were 0.347 and 2.47, respectively. The Shannon index (I) varied between 0.207-0.393 and the Nei genetic variation index (h) from 0.140 to 0.026. Darab and Solataniyeh populations showed the lowest and highest genetic diversity, respectively. The percentage of polymorphic loci was varied between 35.224 to 65.71%. The observe allele number and effective alleles number was 1.46 and 1.34, respectively. Based on the genetic distance Nei, populations Bardsir and Baft had the highest genetic similarity (0.888) and populations Bardsir and Solataniyeh had the least genetic similarity (0.132). The studied populations were grouped into three main groups by cluster analysis using UPGAM and Jaccard's similarity coefficient. The results showed that the ISSR marker is a reliable marker system for revealing a high level of polymorphism and can be used to study genetic diversity and further examinations as a subset of breeding programs in *G. glabra*.

Keywords: Genetic diversity, *G. glabra* L., ISSR marker

* **Corresponding Author, E-mail: kheiry@znu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.1.1.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.1.6]