

## بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های اسفرزه (*Plantago ovata*) با استفاده از صفات مورفو-فنولوژیک و نشانگرهای ISSR

مهدی رضانی\* و مهدی رحیمی

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۴)

### چکیده

اسفرزه (*Plantago ovata*) گیاهی است که برای کاهش التهاب معده و عفونت ادراری و همچنین کنترل قند خون و میزان کلسترول در بدن استفاده می‌شود. روابط فیلوژنی و تنوع ژنتیکی ۲۲ اکوتیپ مختلف اسفرزه (*Plantago ovata*) با استفاده از ۱۲ نشانگر ISSR و همچنین نه صفت مورفولوژیکی و فنولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از تنوع بالا بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA توانست ۲۲ اکوتیپ مختلف را بر اساس داده‌های زراعی در دو گروه قرار دهد. همچنین ارزیابی مولکولی اکوتیپ‌ها نشان داد که ۱۲ آغازگر توانستند تعداد ۹۱ نوار چندشکل به وجود آورند. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر UBC813 با ۱۱ نوار و بعد از آن، آغازگر UBC811 با تعداد ۱۰ نوار بیشترین و آغازگر UBC824 با تعداد ۴ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد نمودند. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) نشانگرها بین ۰/۲۶ تا ۰/۴۵ و شاخص نشانگری (MI) از ۰/۹۰ تا ۴/۱۳ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس داده‌های مولکولی، ۲۲ اکوتیپ مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد که به ترتیب شامل ۱، ۲، ۳ و ۱۵ اکوتیپ بودند. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با نشانگرهای مولکولی با گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با صفات مورفولوژیک تفاوت داشت. با توجه به نتایج می‌توان از اکوتیپ‌هایی که فاصله زیادی با هم دارند در برنامه اصلاحی اسفرزه استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** اسفرزه، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی، نشانگر مولکولی

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: me\_ramezani@msrt.ir

## مقدمه

امروزه گیاهان دارویی از گیاهان مهم اقتصادی هستند که به صورت خام یا فرآوری شده در طب سنتی و مدرن صنعتی مورد استفاده و بهره‌وری قرار می‌گیرند. همچنین گیاهان دارویی از لحاظ داشتن مواد مؤثره و همچنین از نظر خصوصیات گیاه‌شناسی با یکدیگر متفاوت هستند (Rao and Ravishankar, 2002). با توجه به پیشرفت‌های جدید علوم شیمی و داروسازی، یک سوم داروهای مورد استفاده با منشأ گیاهی هستند و این میزان مسلماً رو به افزایش است (Omidbaigi, 2012). کشور ایران با موقعیت خاص آب و هوایی، بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در خود جای داده است که ۲-۳ برابر پوشش گیاهی تمامی قاره اروپاست و پیش‌بینی می‌شود که بیش از ۷۵۰ گونه دارویی در پوشش گیاهی ایران وجود داشته باشد (Kurian and Sankar, 2007; Matsuo et al., 2008). اسفرزه از جنس *Plantago* و متعلق به خانواده *Plantaginaceae* دارای حدود ۲۵۰ گونه می‌باشد. این جنس دارای پراکنش جهانی است اما منشأ اولیه آن هند و پاکستان می‌باشد (Kurian and Sankar, 2007; Singh, 2011). یکی از گونه‌های مهم اسفرزه، گونه *Plantago ovata* است که گیاهی یکساله و پوشیده از کرک‌های کم و بسیار نرم می‌باشد. ساقه گیاه کوتاه و غالباً خمیده است. برگ‌ها کامل خطی باریک یا سرنیزه‌ای هستند. اسامی رایج این گیاه شامل *Indian wheat*, *blond psyllium* (Spogel and Khan, 2011) و *Ispaghula* است (Khan and Abourashed, 2011). این گونه در ایران در نواحی شمال (قزوین، منجیل، رودبار، فیروزکوه)، غرب (همدان، مهران)، جنوب (بندرعباس، میمه، بین بوشهر و شیراز، کرمان) و شرق (خراسان) گسترش دارد (Ghahreman, 1975).

تنوع ژنتیکی در گیاهان و جمعیت‌های گیاهی از نظر کاربردی مورد توجه است. کشاورزی و تولید غذا بستگی به استفاده از ژنوتیپ‌های گیاهی پرمحصول دارد. روش‌های متداول اصلاح گیاهان زراعی براساس گزینش ژنوتیپ‌های مورد علاقه از بین تنوع ژنتیکی موجود و

دستورزی همه یا تعدادی از صفات ممکن و مورد علاقه در یک ژنوتیپ به منظور تولید یک وارته تجاری می‌باشد (Das née Pal and Raychaudhuri, 2003). کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان شامل بررسی‌های فیلوژنتیکی، ژنتیک جمعیت، مطالعه و حفاظت ژنتیکی و بررسی‌های گسترش ژنتیکی در عوامل بیماری‌زا گیاهی می‌باشند. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی ممکن است از طریق سازوکارهای متفاوتی نظیر جهش، نوترکیبی جنسی، مهاجرت و جریان ژن، رانده شدن ژنتیکی و گزینش ایجاد شود. از بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان به مقدار تنوع موجود در جمعیت‌های گیاهی پی برد (Henry, 1997). امروزه با توجه به توسعه نشانگرهای DNA و قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی آن‌ها همچنین بدلایل اینکه یک روش سریع در برنامه اصلاحی می‌باشد، به‌طور گسترده‌ای از نشانگرهای ژنتیکی در کشاورزی استفاده می‌شود (Arif et al., 2010). استفاده از نشانگرهای ISSR به دلیل عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی‌های هدف در مقایسه با نشانگرهای SSR آسان است و بنابراین می‌تواند به‌طور مؤثر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپ اسفرزه استفاده شوند (Zietkiewicz et al., 1994).

در تحقیقی با استفاده از دو سیستم نشانگری RAPD و ISJ و نشانگرهای گیاه‌شناسی رابطه بین ۲۲ اکوتیپ اسفرزه گونه *Plantago ovata* مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۵ آغازگر تصادفی RAPD، ۱۴۲ نوار پلی مورفیک تولید کردند که به طور متوسط ۴/۰۵ نوار برای هر آغازگر بود. دامنه ضرایب تشابه بین ۰/۱۹ تا ۰/۷۵ با میانگین ۰/۴۵ بود. بالاترین ضریب تشابه بین اکوتیپ‌های WP103 و WP104 از استان ایلام و پایین‌ترین ضریب تشابه بین اکوتیپ WP105 از اصفهان و اکوتیپ LP011 از بندرعباس بود. در مرحله بعد ۱۴ آغازگر نیمه تصادفی، ۹۵ نوار تولید کرده‌اند. بیشترین و کمترین چندشکلی به ترتیب مربوط به نشانگرهای IT4 و ET38 بود. در آغازگرهای نیمه تصادفی ISJ ضریب تشابه بین ۰/۱۷ تا

دارویی مهم است، بنابراین در این تحقیق، تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف اسفرزه گونه *Plantago ovata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و صفات زراعی بررسی شد تا از اطلاعات به دست آمده از این تنوع در اصلاح این گیاه بهره برد.

#### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این پژوهش، ۲۲ اکوتیپ مختلف اسفرزه گونه *Plantago ovata* بود (جدول ۱) که از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شده بودند. این اکوتیپ‌های مختلف در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان کشت گردیدند و برای ارزیابی، از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار استفاده گردید. تعداد ۲۲ اکوتیپ مختلف اسفرزه با توزیع تصادفی و به صورت بذر (کشت مستقیم) کشت شدند. طول و عرض هر کرت آزمایشی ۲ و ۱/۵ متر بود و هر اکوتیپ در سه ردیف کشت شد که فاصله ردیف‌ها ۵۰ سانتیمتر و فاصله بین بوته‌ها در هر ردیف ۲۵ سانتی‌متر بود. پس از کاشت اسفرزه تا زمان سبز شدن بذور، هر سه روز یکبار و پس از این مرحله هر هفت روز یکبار آبیاری به روش غرقابی انجام گرفت.

در مرحله چند برگی، برگ‌های جوان از هر جمعیت برداشته شد و در فریزر -۲۰ قرار داده شد تا در زمان مناسب استخراج DNA صورت بگیرد. صفات مورد ارزیابی در این تحقیق خصوصیات کمی رشد از جمله تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی (تعداد روز از زمان کاشت تا گلدهی ۵۰ درصد بوته‌های هر کرت)، تعداد روز تا رسیدگی کامل (تعداد روز از زمان کاشت تا رسیدگی بوته‌های هر کرت)، ارتفاع بوته (میانگین ارتفاع ساقه اصلی بوته از سطح خاک تا انتهای ساقه در هر کرت)، تعداد سنبله (میانگین تعداد سنبله‌های هر بوته در هر کرت)، طول سنبله (میانگین طول سنبله‌های هر کرت)، تعداد دانه در سنبله (میانگین تعداد دانه سنبله در بوته)، وزن سنبله (میانگین وزن سنبله‌های هر بوته)، وزن هزار دانه (میانگین وزن صد دانه در هر کرت) و عملکرد دانه

۰/۸۳ با میانگین ۰/۴۹ بود. پایین‌ترین ضریب تشابه را اکوتیپ‌های WP111 و WP101 و بالاترین را اکوتیپ‌های WP103 و WP104 از ایلام به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که گروه بندی با استفاده از داده‌های نشانگر ISJ هیچ تشابهی با گروه بندی با نشانگر RAPD و صفات زراعی نداشت (Vahabi et al., 2008). در مطالعه ای دیگر تنوع ژنتیکی ۸۰ اکوتیپ مختلف اسفرزه گونه *Plantago ovata* با صفات بیومتری و نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد. ۸۰ اکوتیپ براساس صفات بیومتری در ۷ گروه قرار گرفتند (Singh et al., 2009). کومار و همکاران (Kumar et al., 2014)، ۳۸ ژنوتیپ مختلف اسفرزه گونه *Plantago ovata* را که از نقاط مختلف هند جمع‌آوری شده بود، بررسی کردند. گروه بندی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و گروه‌بندی با استفاده از صفات مورفولوژیکی با هم اختلاف داشتند و نتایج متفاوتی را نشان دادند. همچنین در بررسی دیگری تنوع ژنتیکی ۱۸ اکوتیپ اسفرزه گونه *Plantago ovata* با نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. ۳۵ آغازگر مورد استفاده ۳۰۲ نوار تولید کردند که ۱۹۸ نوار چند شکل (۶۵/۵٪) بودند. معیار تشابه از ۰/۰۷ تا ۰/۲۹ متغیر بود و اکوتیپ‌ها براساس گروه بندی با روش سلسله مراتبی تجمعی در سه گروه ۱۰، ۷ و ۱ اکوتیپی قرار گرفتند (Rohilla et al., 2012).

جهت بهره‌وری جامع‌تر و مؤثرتر از خزانه ژنی، لازم است که قادر به پیش بینی، غربال‌گری و ارزیابی تنوع ژنتیکی احتمالی در اکوتیپ‌های طبیعی و ژنوتیپ‌های خویشاوندان اسفرزه باشیم. در این رابطه برای به دست آوردن اطلاعات موجود در اکوتیپ‌های مختلف اسفرزه، بررسی‌های مورفولوژیکی که متأثر از محیط بوده و نمی‌تواند نماینده کامل ژنوم باشند کافی به نظر نمی‌رسد. بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی که چند شکلی را در سطح DNA آشکار نمایند، می‌تواند به عنوان روش‌های مکمل داده‌های مورفولوژیکی، روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های اسفرزه را به طور کارا تر تعیین کند. با توجه به این که اسفرزه یک گیاه

جدول ۱- اسامی و مناطق جمع‌آوری اکوتیپ‌های مختلف گونه *Plantago ovata*

شماره در اکوتیپ	استان	منطقه	ارتفاع از سطح دریا	شماره در بانک ژن	شماره اکوتیپ	استان	منطقه	ارتفاع	شماره در بانک ژن
Ecotype No.	Province	Region	Above sea level	Number gene bank	Ecotype No.	Province	Region	Height	Number gene bank
1	ایلام	دهلران	150	3328	12	لرستان	بروجرد	0	14559
2	ایلام		780	10752	13	لرستان	خرم آباد	0	14810
3	ایلام		0	14617	14	یزد	شاهدیه	1220	15482
4	گلستان	مینودشت	400	4273	15	یزد	طبس	730	33930
5	گلستان	کالاله	410	12860	16	یزد	شاهدیه	1210	37249
6	گلستان	اینچه برون	0	13794	17	مرکزی		1895	13561
7	گلستان	آق قلا	8	13924	18	مرکزی	اراک	0	14628
8	گلستان	گنبد	15	19932	19	خوزستان	بهبهان	361	35665
9	هرمزگان	حاجی آباد	1100	31488	20	اصفهان	فریدون شهر	0	11223
10	هرمزگان	بندرعباس	1300	31563	21	فارس	شیراز	0	12298
11	هرمزگان	میناب	50	22867	22	همدان		0	12614

$$\sigma_e^2(x) = MSe(x) \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\sigma_g^2(x) = (MSt(x) - MSe(x))/r \quad \text{رابطه ۲}$$

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2(x) + \sigma_e^2(x) \quad \text{رابطه ۳}$$

$$CV_g(x) = \frac{\sigma_g(x)}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{رابطه ۴}$$

$$CV_p(x) = \frac{\sigma_p(x)}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{رابطه ۵}$$

استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان اکوتیپ‌های مختلف اسفرزه با استفاده از روش CTAB مورای و تامپسون (Murray and Thompson, 1980) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۶٪ استفاده شد. در این آزمایش از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۳) که در گیاهان دیگر تعداد نوار بیشتری داده بودند (Bahari et al., 2015; Mohsen-Zade et al., 2012; ) (ShazdehAhmadi and Kharrazi, 2016) برای تکثیر انتخاب و استفاده گردید.

بودند. تمامی صفات مورد ارزیابی (به استثنای عملکرد دانه) در ۵ بوته از هر واحد آزمایشی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند و برای ارزیابی عملکرد دانه، تمامی بوته‌های هر واحد آزمایشی برای هر اکوتیپ به‌طور جداگانه با ترازوی حساس وزن شدند و میانگین وزن آن‌ها بر حسب گرم به‌دست آمد و سپس عملکرد در متر مربع محاسبه شد. قبل از ارزیابی، بوته‌های خارج از تیپ حذف، سپس میانگین مشاهدات در هر کرت جهت انجام تجزیه‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS-Institute, 2011) انجام شد.

واریانس ژنوتیپی و فنوتیپی برای صفات بر مبنای امید ریاضی میانگین مربعات (MS) تیمارها و خطای آزمایشی طرح آزمایشی و ضریب تغییرات ژنوتیپی، فنوتیپی بر اساس روابط ۱ تا ۵ محاسبه شدند.

Hartl and Clark, 1997; Lynch and Walsh, 1998; Nei, 1972; Powell *et al.*, 1996; (Shannon, 2001).

$$\left(\frac{np}{n}\right) * 100 \quad \text{رابطه ۶}$$

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i \quad \text{رابطه ۷}$$

$$EMR = n_p \times \beta \quad \text{رابطه ۸}$$

$$PIC \times EMR \quad \text{رابطه ۹}$$

$$\frac{1}{\sum p_i^2} \quad \text{رابطه ۱۰}$$

$$- \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i \quad \text{رابطه ۱۱}$$

$$- \ln \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} \quad \text{رابطه ۱۲}$$

در این روابط  $P_i$ ،  $i$  (از یک تا  $n$ )، فراوانی آلل  $i$ ام و  $n$  تعداد آلل،  $n_p$  تعداد کل نوارهای چندشکل و  $\beta$  نسبت تعداد نوار چند شکل به تعداد کل نوار، و  $J_x$ ،  $J_y$  و  $J_{xy}$  به ترتیب میانگین حسابی همه آلل‌ها برای فرد  $x$  و  $y$  می‌باشد.

فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف با روش‌ها مختلف تجزیه خوشه‌ای و همچنین معیارهای مختلف فاصله و شباهت محاسبه و در نهایت گروه‌بندی ارقام با تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس برای داده‌های نشانگر ISSR و روش UPGMA و فاصله اقلیدسی برای داده‌های زراعی انجام شد و سپس دندروگرام‌های مربوطه رسم گردید. کلیه محاسبات با استفاده از نرم افزار PAST (Hammer *et al.*, 2001) انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس براساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی (جدول ۲) نشان داد که تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در بین صفات مورد مطالعه وجود دارد که خود دلیلی بر تنوع بالای بین اکوتیپ‌های مختلف و انتخاب اکوتیپ مناسب می‌باشد. بررسی ضرایب تغییرات فنوتیپی و ضرایب تغییرات ژنوتیپی صفات (جدول ۲) نشان داد که صفت وزن هزار دانه و به دنبال

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای ۲ میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۵۰ نانوگرم)، ۰/۶ میکرولیتر آغازگر، ۰/۱ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵ Unit) انجام شد. چرخه حرارتی شامل ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$ ، سپس ۳۵ سیکل انجام شد که هر سیکل به این صورت بود که واسرشته‌سازی در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد سپس مرحله اتصال آغازگر در دمای  $T_M$  (بسته به آغازگر متفاوت بود) به مدت ۴۰ ثانیه بود و در نهایت مرحله بسط در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ دقیقه انجام شد. در نهایت بعد از ۳۵ سیکل ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  انجام شد و سپس در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. دمای بهینه برای اتصال هر آغازگر در طی واکنش PCR، با تعریف کردن محدوده دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر از دمای  $T_M$  و ۳ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای  $T_M$  برای دستگاه ترموسایکلر دارای بلوک‌های شیب دمایی، همان دمای  $T_M$  بود که شرکت Generay Biotech برای آغازگرهای ISSR تعریف کرده بود.

الگوهای نواریابی حاصل به صورت وجود یا عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. همچنین برای هر آلل نشانگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت ۱، ۲، ۳ و ... نامگذاری و برای برآورد فراوانی آللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه و نیز فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها استفاده شدند. ماتریس داده‌ها برای کلیه اکوتیپ‌ها و کلیه نشانگرهای مورد مطالعه تشکیل شد. درصد چند شکلی براساس رابطه ۶، محتوای اطلاعات چندشکل یک نشانگر (Polymorphism Information Content) براساس رابطه ۷، نسبت چندگانه موثر (Effective Multiplex Ratio) براساس رابطه ۸، شاخص نشانگری (Marker Index) براساس رابطه ۹، تعداد آلل-های موثر (Number of effective allele) براساس رابطه ۱۰، شاخص شانون براساس رابطه ۱۱ و شاخص تنوع نی براساس رابطه ۱۲

برای اینکه ایده‌ای از میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات به‌دست آید، تجزیه خوشه‌ای ارقام به روش‌های مختلف تجزیه خوشه ای مانند متوسط فاصله بین و درون گروه‌ها، نزدیکترین و دورترین همسایه‌ها و روش حداقل واریانس وارد و غیره با معیارهای مختلف فاصله انجام شد و گروه‌بندی حاصل از آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که روش متوسط فاصله بین کلاستر (UPGMA) با معیار فاصله اقلیدوسی بهترین نتیجه را با ضریب کوفتیک ۰/۷۲ نشان داد (سایر روش‌ها ضریب کوفتیک پایین‌تری داشتند)، بنابراین گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه با روش متوسط فاصله بین کلاستر (UPGMA) و معیار فاصله اقلیدوسی انجام شده و لذا تنها نتایج این روش گزارش گردید (شکل ۱).

آن عملکرد دانه بالاترین ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی را دارا بود. بنابراین می‌توان از این صفات در به نژادی استفاده نمود و گزینش‌های مؤثری در بین ارقام مورد مطالعه جهت بهبود و اصلاح این صفات انجام داد. همچنین کمترین ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی مربوط به صفات روز تا رسیدگی و بعد از آن وزن سنبله بود و اصلاح این صفات نسبت به صفات دیگر از طریق گزینش در جمعیت مورد مطالعه با موفقیت کمتری همراه خواهد بود. پارامتر ضریب تغییرات یکی از مهمترین و ارزش‌ترین شاخص‌های برآورد تنوع در جمعیت‌ها بوده و به دلیل این که این معیار تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد و از این نظر از معیارهای دیگر تنوع نظیر دامنه تغییرات اهمیت بیشتری دارد و می‌توان با اعتماد بیشتری گزینش‌های مطلوب را برای اصلاح صفاتی که ضریب تغییرات بالاتری دارند، انجام داد.

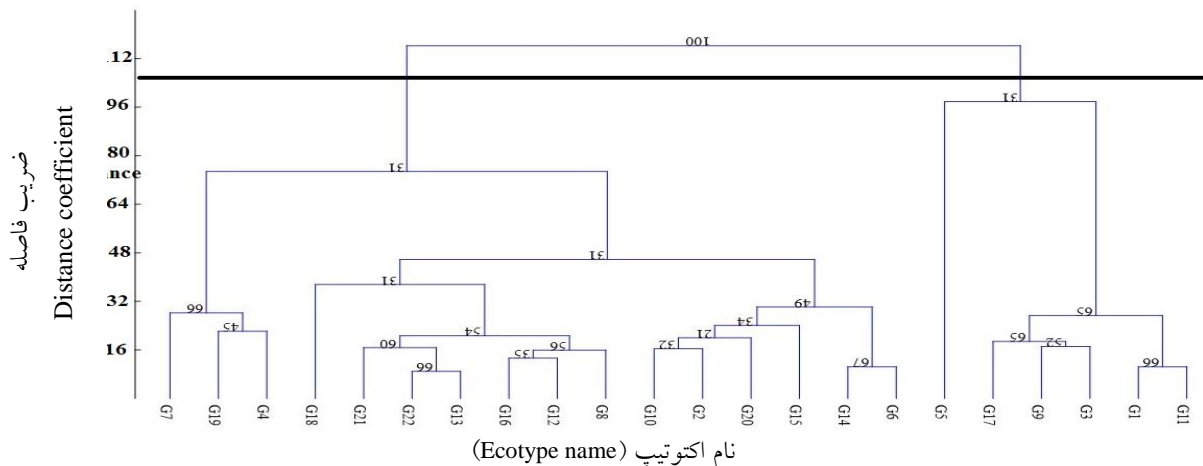
جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه

Table 2. ANOVA of studied traits

میانگین مربعات Mean square										
منابع تغییرات S.o.V.	درجه آزادی D.F.	تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی Days to 50% flowering	تعداد روز تا رسیدگی کامل Days to maturity	ارتفاع بوته Plant height	تعداد سنبله Number of spikes	طول سنبله Spikes length	تعداد دانه در سنبله Number of grains per spike	وزن سنبله Spike weight	وزن هزار دانه 1000-Grain weight	عملکرد دانه Grain yield
تکرار replication	2	137.15**	38.05**	6.11 <sup>ns</sup>	0.24**	0.26**	5.72 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.25**	16618.92**
تیمار trait	21	95.00**	66.68**	23.13**	0.28**	0.27**	132.44**	65.33**	0.31**	12474.45**
خطا error	42	0.83	1.22	4.23	0.02	0.02	2.48	0.67	0.02	298.18
ضریب تغییرات (درصد) % C.V.		1.33	1.16	10.47	2.78	5.72	4.52	1.08	8.04	4.45
ضریب تغییرات فنوتیپی (%) % Phenotypic C.V.		8.29	5.04	16.51	7.13	13.80	7.88	6.24	20.65	16.99
ضریب تغییرات ژنوتیپی (%) % Genotypic C.V.		8.19	4.91	12.77	6.57	12.55	7.66	6.15	19.02	16.40

<sup>ns</sup> و <sup>\*\*</sup> به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۱ درصد.

<sup>ns</sup> and <sup>\*\*</sup>: non-significant and significant at the 1% level, respectively.



شکل ۱- گروه‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژی به روش UPGMA و معیار فاصله اقلیدوسی. شماره اکوتیپ‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

Figure 1. Grouping of ecotypes based on morphological traits using UPGMA and standard Euclidian distance. Number of ecotypes are shown in Table 1.

هوایی تقریباً مشابه استان‌های همجوار باشد که باعث شده این اکوتیپ‌ها از لحاظ صفات ظاهری مشابه هم بوده و سازگاری به این مناطق مشابه باعث شباهت این اکوتیپ‌ها شده باشد. این تحقیقات می‌تواند پیش‌نیازی برای برنامه‌های دورگ‌گیری به‌شمار رود و صفات مطرح شده برای گروه‌ها به منظور تصمیم‌گیری در انتخاب والدین مفید می‌باشد. به این ترتیب برای اصلاح جمعیت می‌توان بعضی از اکوتیپ‌های گروه اول با دوم را تلاقی داد و دورگ‌های مورد نظر را ایجاد نمود.

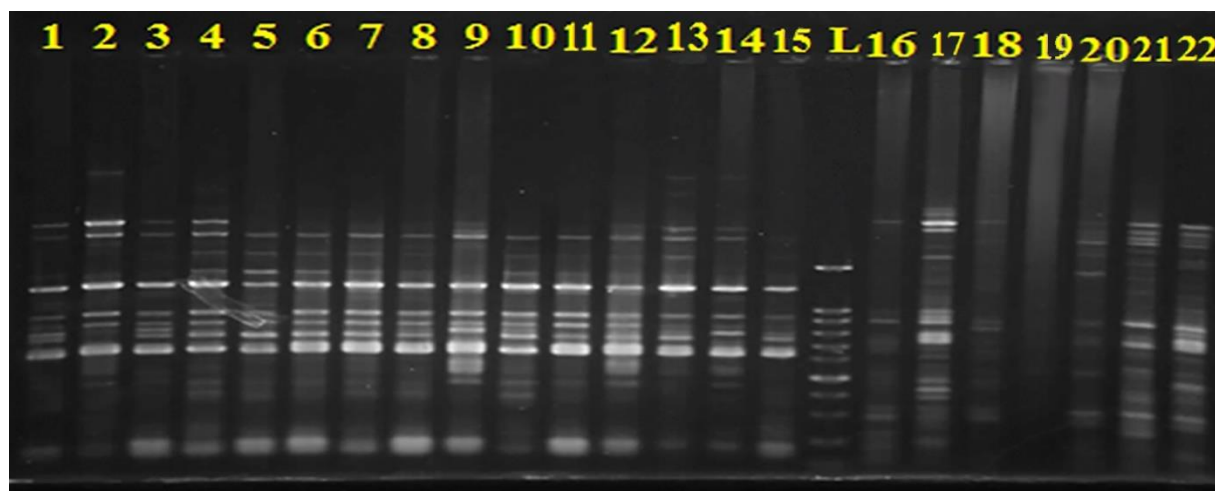
در این پژوهش استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، در مجموع ۱۲۹ نوار را نتیجه داد که از بین آن‌ها ۹۱ نوار چندشکل بودند و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۷/۵۸ بدست آمده است (جدول ۳). از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر UBC814 با تعداد ۱۴ نوار (شکل ۲) و بعد از آن، آغازگرهای UBC811، UBC813 و UBC817 با تعداد ۱۳ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگرهای UBC824 و UBC876 با تعداد ۷ نوار کمترین تعداد را داشتند (جدول ۳). همچنین تعداد ۱۱ نوار چندشکل برای آغازگر UBC813 و ۱۰ نوار چندشکل برای آغازگر UBC811 مشاهده شد. کمترین تعداد نوار برای آغازگر UBC824 با ۴ نوار مشاهده شد. درصد چندشکلی بدست آمده در اکوتیپ‌ها از ۵۷/۱۴

برای تعیین تعداد گروه‌ها نیز، برش از ناحیه ۵۰ (۴ گروه)، ناحیه ۸۰ (۳ گروه) و ناحیه ۱۰۴ (۲ گروه) انجام شد و صحت گروه‌بندی هر یک از نواحی برش داده شده با تجزیه تابع تشخیص مورد بررسی قرار گرفت. صحت گروه‌بندی با چهار گروه در حدود ۸۲ درصد، سه گروه در حدود ۹۱ درصد و صحت گروه‌بندی دو گروه در حدود ۹۶ درصد بود که تعداد دو گروه به عنوان بهترین تعداد گروه برای این روش انتخاب شد. با برش دندروگرام در فاصله ۱۰۴، دو گروه ایجاد گردید که به ترتیب ۶ و ۱۶ اکوتیپ را شامل می‌شد (شکل ۱). گروه اول شامل اکوتیپ‌های شماره ۱، ۳، ۵، ۹، ۱۱ و ۱۷ بود. گروه دوم شامل بقیه‌ی اکوتیپ‌های مورد مطالعه بود. بیشترین فاصله بین اکوتیپ گلستان-کلاله (G5) و گلستان-آق‌قلا (G7) با فاصله ۲۵۷/۰۱ دیده شد. کمترین فاصله هم بین اکوتیپ لرستان-خرم‌آباد (G13) و همدان (G22) با فاصله ۸/۹۵ دیده شد. گروه‌بندی ارقام تا حدی با منشأ جغرافیای خود هم‌خوانی داشت. به‌نحوی که اکوتیپ‌های مربوط به یک استان یا استان‌های همجوار تا حدودی در یک گروه قرار گرفتند. به عنوان مثال در گروه اول دو اکوتیپ از استان ایلام، دو اکوتیپ از استان هرمزگان بود. دلیل قرار گرفتن اکوتیپ‌های استان‌های همجوار در یک گروه می‌تواند به دلیل شرایط آب و

تعداد آلل‌های موثر در بین نشانگرهای مطالعه شده متفاوت بود. میانگین تعداد آلل‌های موثر در کل جمعیت ۱/۵۹ بدست آمد و از ۱/۳۸ تا ۱/۷۷ متغیر بود (جدول ۳). بیشترین تعداد آلل موثر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC813، UBC876، UBC815 و UBC824 در بین کل اکوتیپ‌ها بود (جدول ۳). از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل‌های موثر است (Hartl and Clark, 1997)، می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های اسفرزه استفاده کرد. یکی از مهمترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد (Nei, 1972). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۴۵ تا ۰/۶۲ متغیر بود (جدول ۳) و آغازگرهای UBC813، UBC876، UBC824، UBC815 و UBC825 بترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان دادند. آغازگر UBC814 کمترین میزان تنوع ژنی را نشان داد.

در تحقیقات دیگر نیز میزان این شاخص برای این نشانگرها بالا بود و کارایی بهتر این نشانگرها را نشان داده شد که در تطابق با نتایج این تحقیق بود (Bahari et al., 2015; Mohsen-Zade et al., 2012; ShazdehAhmadi and Kharrazi, 2016).

درصد برای UBC824 تا ۸۴/۶۲ درصد برای UBC813 متغیر بود. درصد چندشکلی به دست آمده در این تحقیق ۶۹/۹۱ درصد بود که تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها را توجیه می‌کند (جدول ۳). محتوای اطلاعات چندشکل، به تفکیک برای هر یک از آغازگرهای مورد مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۳ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۲۶ تا ۰/۴۵ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۷ بود (جدول ۳). بالاترین میزان PIC در آغازگر UBC813 به میزان ۰/۴۵ و بعد از آن UBC876 به میزان ۰/۴۲ تعیین شد که نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. به منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان (EMR) برای آغازگر UBC811 (۸/۲۳) و کمترین میزان برای آغازگر UBC824 (۲/۳۱) بود (جدول ۳). میزان MI بین ۰/۹۰ تا ۴/۱۳ متغیر بود. آغازگرهای UBC813، UBC811، UBC815 و UBC823 به ترتیب با ۴/۱۳، ۲/۶۷، ۲/۶۲ و ۲/۲۱ واحد دارای بیشترین شاخص نشانگری (MI) بودند که کارایی بالا این آغازگرها را در بروز چندشکلی نشان می‌دهد (جدول ۳).



شکل ۲- الگوی نواریابی آغازگر UBC814 در اکوتیپ‌های مورد مطالعه. شماره‌های روی شکل نشان دهنده شماره‌های اکوتیپ‌ها است.

Figure 2. Banding pattern of UBC814 primer in the studied ecotypes. The numbers on the shape represent the ecotype numbers.



جدول ۳- خصوصیات نشانگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه

Table 3- ISSR markers characteristics used in this study

شاخص	تنوع ژنی	تعداد آلل	شاخص	نسبت چندگانه	محتوای	درصد	تعداد نوار	تعداد کل	آغازگرها	ردیف
Shannon	Nei	No. of effective allele	Marker index	EMR	اطلاعات چندشکل	% Polymorphism	No. of Polymorphic bands	Total bands	Primers	No.
0.39	0.51	1.55	2.67	8.23	0.37	76.92	10	13	UBC811	1
0.32	0.49	1.43	1.69	5.94	0.31	72.73	8	11	UBC812	2
0.43	0.62	1.77	4.13	9.86	0.45	84.62	11	13	UBC813	3
0.17	0.45	1.38	1.62	5.92	0.26	64.29	9	14	UBC814	4
0.28	0.55	1.69	2.62	6.35	0.40	80.00	8	10	UBC815	5
0.34	0.52	1.50	1.50	4.52	0.33	63.64	7	11	UBC816	6
0.27	0.47	1.44	1.91	6.33	0.32	69.23	9	13	UBC817	7
0.31	0.54	1.62	2.21	5.71	0.38	72.73	8	11	UBC823	8
0.36	0.57	1.69	0.90	2.31	0.41	57.14	4	7	UBC824	9
0.37	0.55	1.63	1.19	3.18	0.38	62.50	5	8	UBC825	10
0.30	0.55	1.64	1.78	4.39	0.38	63.64	7	11	UBC826	11
0.31	0.58	1.72	1.51	3.58	0.42	71.43	5	7	UBC876	12
0.32	0.53	1.59	1.98	5.53	0.37	69.91	7.58	10.75	میانگین Average	

دیگر فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌ها است که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. داده‌های مولکولی بر اساس رتبه‌دهی صفر و یک انجام شد. تجزیه خوشه‌ای به روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و معیارهای مختلف شباهت انجام شد و در نهایت روش UPGMA بر اساس ضریب جاکارد با ضریب کوفنتیک در حدود ۷۸ درصد بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های مورد بررسی بود و میزان تشابه بین ارقام براساس ضریب جاکارد از ۰/۱۱ تا ۰/۶۷ متغیر بود. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها براساس داده‌های مولکولی نشان داد که اکوتیپ G13 (لرستان- خرم آباد) با G14 (یزد-شاهدیه) با ضریب تشابه ۰/۶۷، اکوتیپ G1 (ایلام-دهلران) با G8 (گلستان-گنبد) با ضریب تشابه ۰/۶۵، اکوتیپ G8 (گلستان-گنبد) با G3 (ایلام) با ضریب تشابه ۰/۶۴ و اکوتیپ G7 (گلستان-آق قلا) با G21 (فارس-شیراز) با ضریب تشابه ۰/۶۲ بیشترین شباهت را باهم داشتند. اکوتیپ G2 (ایلام) با G18 (مرکزی-اراک) با ضریب تشابه ۰/۱۱ کمترین شباهت را با یکدیگر داشتند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ارقامی که کمترین تشابه را دارند (بیشترین فاصله)، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در

میانگین تنوع ژنی در جمعیت مورد مطالعه ۰/۵۳ بود. ضریب شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها است (Shannon, 2001). در این تحقیق میانگین ضریب شانون ۰/۳۲ بود که نشان دهنده تنوع متوسط در اکوتیپ‌های مورد بررسی است. آغازگرهای UBC813، UBC811، UBC825 و UBC824 دارای بیشترین شاخص شانون بودند، این نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد اشاره می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند. آغازگر UBC814 دارای کمترین شاخص شانون می‌باشد (جدول ۳) که این نتایج در تطابق با نتایج محققین دیگر بود (Bahari et al., 2015; Mohsen-Zade et al., 2012). در مطالعه وهابی و همکاران (Vahabi et al., 2008) نیز ۳۵ آغازگر تصادفی RAPD، ۱۴۲ نوار پلی مورفیک تولید کردند که به طور متوسط ۴/۰۵ نوار برای هر آغازگر بود. همچنین در مطالعات دیگری نیز میانگین درصد چندشکلی نشانگرها ۶۵/۵٪ درصد به دست آمد (Rohilla et al., 2012). این گزارش‌ها نشان می‌دهد که با توجه به چندشکلی بالای نشانگرها می‌توان از آن‌ها در مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده نمود که در تطابق با نتایج این تحقیق بود. فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله تفاوت قابل توجهی بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آلی است. به عبارت

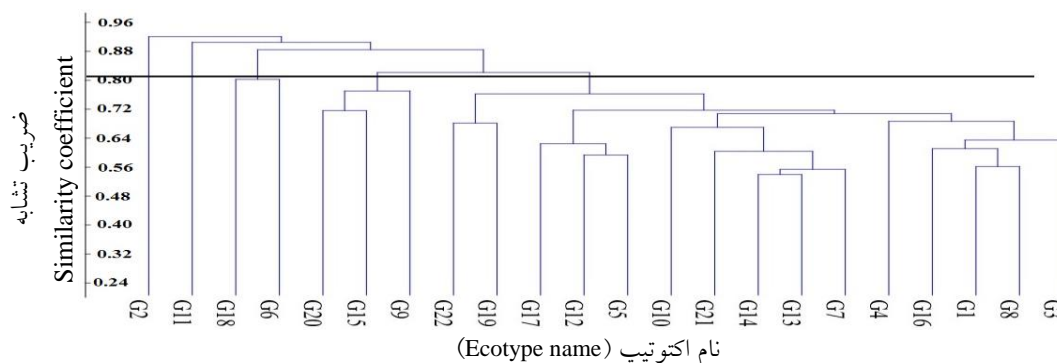
انسان طی هزاران سال شکل گرفته‌اند. اطلاعاتی که انسان در خصوص کاربردها و مصارف گیاهان، نحوه یا مکان و زمان جمع‌آوری آن‌ها و یا روش‌های کشت و تولید زراعی آنها طی قرن‌ها در مناطق مختلف جهان کسب کرده‌اند، گنجینه‌های پرارزش را به وجود آورده است. پایش تنوع ژنتیکی و حفاظت از این ذخایر ژنتیکی بوسیله بانک‌های ژن انجام می‌گیرد. تنوع مبنای همه‌گزینش‌ها بوده و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع می‌باشد. بدیهی است که با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب نیز وسیع‌تر می‌شود. انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه اصلاحی بوده و اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. نتایج این بررسی حاکی از وجود تنوع بالا در بین جمعیت‌های مورد بررسی اسفرزه است. با توجه به اینکه اکوتیپ‌های اسفرزه از مناطق مختلف جغرافیایی هستند و ترکیبات اسانس آنها متفاوت است، وجود تنوع ژنتیکی تایید کننده این مطلب می‌باشد که اختلافات فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های تنها به واسطه اثر محیطی نمی‌باشد، بلکه توسط عوامل ژنتیکی هم کنترل می‌شوند.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اهواز انجام شده است. نویسندگان مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اهواز برای حمایت مالی و معنوی و اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

نسل‌های پس از  $F_1$  خواهد شد. نمودار از نواحی مختلف برای تشکیل تعداد ۲، ۳، ۴ و ۵ گروه برش داده شد و صحت گروه‌بندی با انجام تجزیه تابع تشخیص مورد بررسی قرار گرفتند که درصد صحت گروه‌بندی به ترتیب ۸۶، ۸۶، ۷۷ و ۹۶ درصد بود که در نهایت تعداد پنج گروه با صحت درصد گروه‌بندی بیشتر انتخاب شد. براساس روش UPGMA و برش نمودار از ناحیه ۰/۳۹، ۲۲ اکوتیپ مورد مطالعه در پنج گروه قرار گرفتند (شکل ۳). گروه‌های یک تا پنج به ترتیب شامل ۱، ۱، ۲، ۳ و ۱۵ اکوتیپ بودند. آغازگرهای مورد استفاده توانستند تمامی اکوتیپ‌ها را به خوبی از هم جدا کنند. نتایج آزمون ماتل نشان داد که همبستگی بین روش گروه‌بندی با صفات مورفولوژیک و روش گروه‌بندی با نشانگرهای مولکولی، ۰/۴۲ می‌باشد که نشان می‌دهد که گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی با گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از صفات مورفولوژیک نتایج متفاوتی داشتند. کومار و همکاران (Kumar et al., 2014) نیز با بررسی ۳۸ ژنوتیپ مختلف اسفرزه که از نقاط مختلف هند جمع‌آوری شده بود، نشان دادند که گروه‌بندی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و گروه‌بندی با استفاده از صفات مورفولوژیک با هم اختلاف داشتند که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت.

ذخایر ژنتیک گیاهی به عنوان گنجینه‌های گران‌بها در دست بشر و در خدمت نیازهای او می‌باشد. برخی از این ذخایر بصورت طبیعی و وحشی وجود داشته و برخی با دستکاری



شکل ۳- گروه‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی با استفاده از روش UPGMA. شماره اکوتیپ‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

Figure 3. Grouping ecotypes based on molecular data using the UPGMA method. Ecotype Numbers of are shown in table 1.

## References

- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M. and Shobrak, M. (2010). A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**(5): 2079-2096.
- Bahari, Z., Shojaeiyan, A., Rashidi Monfared, S., Mirshekari, A., Nasiri, K. and Amiriyani, M. (2015). Investigation of genetic diversity among some Iranian dill (*Anethum graveolens* L.) landraces, using ISSR markers. *Journal of Plant Genetic Researches*, **2**(1): 11-22 (In Persian).
- Das née Pal, M. and Raychaudhuri, S. (2003). Estimation of genetic variability in *Plantago ovata* cultivars. *Biologia Plantarum*, **47**(3): 459-462.
- Gahreman, A. (1975). *Colored flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, IR (In Persian).
- Hammer, Q., Harper, D. and Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**(1): 1-9.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G. (1997). *Principles of Population Genetics*. Fourth edn, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Henry, R.J. (1997). *Practical Applications of Plant Molecular Biology*, Chapman & Hall, London, UK.
- Khan, I.A. and Abourashed, E.A. (2011). *Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Kumar, M., Fougat, R.S., Sharma, A.K., Kulkarni, K., Mistry, J.G., Sakure, A.A. and Kumar, S. (2014). Phenotypic and molecular characterization of selected species of *Plantago* with emphasis on *Plantago ovata*. *Australian Journal of Crop Science*, **8**(12): 1639-1647.
- Kurian, A. and Sankar, M.A. (2007). *Medicinal Plants*. New India Publishing, New Delhi, IN.
- Lynch, M. and Walsh, B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. 1<sup>st</sup> edn, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Matsuo, E., Relf, P.D. and Burchett, M. (2008). Proceedings of the VIIIth international people-plant symposium on exploring therapeutic powers of flowers, greenery and nature. June 4-6, 2004, edn, *International Society for Horticultural Science*, Awaji, Japan.
- Mohsen-Zade, M., Samizade-Lahiji, M., Alami, A., Shoayi-Deylami, M. and Talesh-Sasani, S. (2012). Study of genetic diversity of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes using ISSR and retrotransposon markers. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **43**(2): 371-380 (In Persian).
- Murray, M. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**(19): 4321-4326.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**(949): 283-292.
- Omidbaigi, R. (2012). *Production and Processing of Medicinal Plants*. 6 edn, Astan Godesa Razavei Publication, Mashhad, IR (In Persian).
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**(3): 225-238.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, **20**(2): 101-153.
- Rohilla, A.K., Kumar, M., Sindhu, A. and Boora, K. (2012). Genetic diversity analysis of the medicinal herb *Plantago ovata* (Forsk.). *African Journal of Biotechnology*, **11**(92): 15835-15842.
- SAS-Institute. (2011). *Base SAS® 9.3 Procedures Guide*. SAS Institute Inc, North Carolina, USA.
- Shannon, C.E. (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, **5**(1): 3-55.
- ShazdehAhmadi, M. and Kharrazi, M. (2016). Application of ISSR molecular markers for genetic diversity study of some tobacco genotypes. *Journal of Plant Genetic Researches*, **2**(2): 33-46 (In Persian).
- Singh, N., Lal, R. and Shasany, A. (2009). Phenotypic and RAPD diversity among 80 germplasm accessions of the medicinal plant isabgol (*Plantago ovata*, Plantaginaceae). *Genetics and Molecular Research*, **8**(3): 1273-1284.
- Singh, R.J. (2011). *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Medicinal Plants*. CRC Press, London, UK.
- Vahabi, A., Lotfi, A., Solouki, M. and Bahrami, S. (2008). Molecular and morphological markers for the evaluation of diversity between *Plantago ovata* in Iran. *Biotechnology*, **7**(4): 702-709.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**(2): 176-183.

## Study of Phylogenetic Relationships and Genetic Diversity of *Plantago ovata* Ecotypes using Morpho-Phenological Traits and ISSR Markers

Mehdi Ramezani\* and Mehdi Rahimi

Young Researchers and Elite Club, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

(Received: April 12, 2017 – Accepted: July 26, 2017)

### Abstract

Ispaghula (*Plantago ovata*) is used to reduce gastrointestinal and urinary tract infections, as well as control blood glucose and cholesterol levels in the human body. The phylogeny and genetic diversity of 22 different ecotypes of Ispaghula were evaluated using 12 ISSR markers and nine morphological and phenological traits. Analysis of variance showed that there were significant differences among cultivars for all traits. Cluster analysis grouped 22 different ecotypes of Ispaghula in two groups using UPGMA method based on field data. The assessment of genetic diversity among ecotypes based molecular markers showed that the 12 primers amplified 91 polymorphic bands. The maximum number of bands (11) was produced by UBC813 and primers UBC811 with 10 bands were in the next steps, respectively. The minimum band number (4) was produced by UBC824. Polymorphism information content (PIC) value was varied from 0.26 to 0.45 and Marker index (MI) was varied from 0.90 to 4.13. Cluster analysis using UPGMA based on molecular markers, placed 22 ecotypes in the study in five groups, include 1, 1, 2, 3 and 15 ecotypes, respectively. Grouping of ecotypes with molecular markers was different with classification of the ecotypes based morphological traits. According to the results, ecotypes that are far apart can be used in the breeding program of Ispaghula.

**Keywords:** Cluster analysis, Ispaghula, Polymorphism, Molecular marker.

---

\* Corresponding Author, E-mail: me\_ramezani@msrt.ir