

ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های مختلف گیاه استبرق با نشانگرهای مولکولی ISSR

سعید نواب پور^{۱*}، احد یامچی^۲ و ساسان گل چشمه^۳

- ۱- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
- ۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
- ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵)

چکیده

مطالعه حاضر جهت طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های استبرق مناطق مختلف استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد. در مجموع DNA مربوط به ۱۴ نمونه گیاهی با ۹ آغازگر ISSR با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد و الگوی بانندی آن‌ها به دست آمد. آغازگرهای مورد استفاده چندشکلی قابل قبولی (۳۵/۹۳) را نشان دادند به نحوی که حداقل و حداکثر شاخص اطلاعات چندشکل آغازگرهای به کار رفته در این مطالعه به ترتیب ۰/۱۱ برای آغازگر ISSR9 و ۰/۴۱ برای آغازگرهای ISSR3 و ISSR8 بود. میزان شباهت ژنتیکی بر اساس شاخص نی از ۰/۴۰۵ تا ۰/۷۴۵ به دست آمد و کم‌ترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های جیرفت ۳ و دوساری ۲ و بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های جیرفت ۱ و جیرفت ۲ بود. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، نمونه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند که گروه‌های دوم و سوم نمونه‌های بیشتری را در خود جای دادند. از نظر نزدیکی ژنتیکی نیز دو نمونه جیرفت ۱ و جیرفت ۲ که در یک خوشه قرار داشتند، نزدیک‌تر بودند. همچنین نمونه‌های جمع‌آوری شده از عنبرآباد نسبت به سایر نمونه‌ها در فاصله ژنتیکی دورتری قرار داشت. تجزیه به مختصات اصلی نیز نشان داد مؤلفه‌های اول و دوم ۶۷ درصد از تنوع به دست آمده را توجیه می‌کنند. به‌طور کلی نشانگرهای ISSR برای طبقه‌بندی نمونه‌های استبرق مفید بود و با توجه به اطلاعات به دست آمده مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های استبرق استان کرمان، از این تنوع می‌توان در آینده در به‌نژادی و تولید استبرق زراعی بهره جست.

واژگان کلیدی: چندشکلی، ذخایر ژنتیکی، فاصله ژنتیکی، گیاه دارویی، نشانگر DNA

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

مقدمه

استبرق با نام علمی *Calotropis procera* Willd. از خانواده *Asclepiadaceae* و با تعداد کروموزوم $2n = 2x = 22$ دارای ۲۰۸ جنس و بیش از ۲۰۰ گونه می‌باشد و درختچه‌ای چندساله با شاخه‌های انشعاب‌یافته از قاعده به ارتفاع حدود پنج متر و از گیاهان کائوچویی است. این گیاه به‌طور گسترده در مناطق بیابانی، نقاط گرمسیر و سواحل خلیج فارس و دریای عمان و مناطقی مثل جنوب خراسان، سیستان و بلوچستان، جنوب کرمان، هرمزگان، بوشهر و خوزستان دیده می‌شود (Raghavan, 1957; Soltani-Eini et al., 2012; Babakhani and Yavari, 2018). استبرق در مناطق بیابانی نقش کلیدی در کنترل سیلاب‌ها و مدیریت آبخیز دارد. مواردی همچون وسعت زیاد مناطق با شرایط اقلیمی گرم و خشک، استقرار این گیاه در اراضی شنی و ماسه‌بادی، نیازهای اکولوژیکی پایین گیاه، کاربرد آن در جلوگیری از فرسایش خاک و تثبیت شن‌های روان، ظرفیت بالای آن جهت جذب فلزات سنگین در بافت‌های خود، مقاومت بالای آن در برابر شوری (Al-Yemni et al., 2011)، استفاده از الیاف این گیاه در صنایع نساجی و شیره آن در لاستیک‌سازی و داروسازی (جهت کاهش محسوس فشار چشم، درمان بیماری‌های کبدی، التهابات پوستی، نیش عقرب و مار و دیابت) اهمیت این گیاه را چند برابر نموده و آن را به‌عنوان یک گیاه استراتژیک مطرح می‌نماید (Padhy et al., 2007; Abbasi et al., 2016).

به‌طور کلی برای افزایش میزان تولید گیاهان زراعی، اتکا به ظرفیت ژنتیکی گونه‌ها و تلاش در جهت اصلاح ژنی مهم‌ترین و پایدارترین الگو می‌باشد (Hoisington et al., 1999). در این راستا، شناسایی ژنوم گیاه اهمیت بسزایی دارد؛ اما هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد توالی ژنوم گیاه استبرق در جهان گزارش نشده است و لذا پیشرفت در بخش‌های اشاره شده در آینده نزدیک موجب افزایش کیفیت این گیاه در جهت استفاده بهتر در صنایع مزبور خواهد شد. افزایش کیفیت صفات مهم مستلزم مشخص شدن ژن‌های کدکننده این خصوصیات است. از طرف دیگر، اطلاعاتی نظیر نحوه

تکامل این گیاه و قرابت آن با سایر گیاهان وجود ندارد. برای آغاز شناسایی اطلاعات ژنومی، اولین قدم ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی بین گیاهان استبرق کشت شده در ایران و حتی مقایسه آن‌ها با نمونه‌های خارجی این گیاه در کشورهای همسایه می‌باشد. اهمیت تنوع ژنتیکی در اصلاح انواع مختلف گیاهان در مطالعات بسیاری از محققان گزارش شده است. تنوع ژنتیکی می‌تواند از طریق نشانگرهای ریختاری (مورفولوژیک) و مولکولی نیز ارزیابی گردد (Kakaei et al., 2013). نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم عمل می‌کنند و شرایط محیطی نمی‌تواند بر روی آن‌ها تأثیر بگذارد و کوچک‌ترین اختلاف بین دو ژنوتیپ توسط آن‌ها قابل رؤیت می‌باشد (Golcheshmeh et al., 2019).

یکی از مهم‌ترین گروه از نشانگرهای مولکولی، نشانگر بین ریزماهوره‌ای^۱ (ISSR) می‌باشد که برای طراحی آغازگرهای آن نیازی به داشتن اطلاعات از ژنوم گونه مدنظر نیست و تکنیکی است که توالی‌های ریزماهوره‌ای را به‌عنوان آغازگرها در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای ایجاد نشانگرهای چند جایگاهی مورد استفاده قرار می‌دهد (Reddy et al., 2002; Ahmadi-Khah, 2011). از این نشانگر و نشانگرهای مشابه در بررسی تنوع ژنتیکی استبرق و دیگر گیاهان دارویی توسط محققان مختلف استفاده شده است. به‌عنوان مثال بینگ بن و همکاران (Ying-Ben et al., 2010) جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی و رابطه بین ۱۳۴ ژرم‌پلاسم چای موجود در یونان که در هشت گروه قرار گرفته بودند، از نشانگر ISSR استفاده نمودند و از ۴۷۵ باند تشکیل شده ۴۷۰ باند چندشکل بود. مطالعه‌ی دیگری توسط احمد و همکاران (Ahmed et al., 2014) به‌منظور تجزیه و تحلیل ژنتیکی جهت بررسی وجود چندشکلی در بین ۱۸ نمونه استبرق جمع‌آوری شده از شش منطقه مختلف در مصر با استفاده از پنج آغازگر RAPD انجام شد. نشانگر مورد استفاده سطح بالایی از چندشکلی را برای نمونه‌های مورد مطالعه نشان داده است (۹۳/۴۵ درصد). در مجموع ۱۰۰ باند چندشکل و هفت باند تک‌شکل در کلیه افراد مورد مطالعه تولید شده است. همچنین دندروگرام رسم شده نشان داده

1- Inter simple sequence repeat

شد و در پاکت‌های پلاستیکی همراه با کد مربوط به هر گیاه قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در یخ خشک قرار گرفت و به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. جهت کوبیدن نمونه‌ها، ابتدا هاون‌های چینی با محلول هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شدند و در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون قرار گرفتند تا استریل شوند. نمونه‌های برگ‌ها در هاون با اضافه کردن ازت مایع کوبیده شدند تا کاملاً پودر شوند. سپس DNA نمونه‌ها به‌روش دوپل و دوپل (Doyle and Doyle, 1987) استخراج شدند.

در این مطالعه ابتدا ۳۵ آغازگر ISSR در دستور کار قرار گرفت، ولی برای گزینش آغازگرهای مناسب با توانایی تکثیر خوب و دارای نوارهای واضح جهت امتیازدهی، به‌کمک یکی از نمونه‌های DNA (جیرفت ۱)، واکنش PCR آزمایشی انجام گرفت و از بین آن‌ها نه آغازگر که توانایی تکثیر داشتند و چندشکلی قابل‌قبولی را نشان دادند انتخاب شد که مشخصات و توالی این نه آغازگر در جدول ۲ نشان داده شده است. همچنین آغازگرها از شرکت Metabion International AG تهیه شده بود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T Gradient مدل RS 232 شرکت Biometra آمریکا در حجم نهایی ۱۷ میکرولیتر انجام پذیرفت. تمامی مواد مورد نیاز از شرکت سینا ژن تهیه شد. نام و غلظت مواد استفاده شده در PCR در جدول ۳ نشان داده شده است. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر آغازگرهای ISSR در جدول ۴ نشان داده شده است.

به جهت تفکیک بهتر محصول PCR از دستگاه الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید مدل H-vertigel2 ساخت شرکت فرانسوی APELEX جهت بارگذاری محصول PCR و مشاهده باندهای ایجاد شده استفاده شد. در هر چاهک به‌میزان هشت میکرولیتر محصول PCR به‌همراه دو میکرولیتر محلول بافر بارگذاری که از قبل باهم مخلوط شده بودند، قرار گرفته شد. رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از موادی که در جدول ۵ ذکر شده است، انجام شد.

است منطقه اسوان و دره فران در دو خوشه مجزا از هم قرار گرفته‌اند. درحالی‌که چهار منطقه دیگر در خوشه سوم قرار گرفته‌اند. شاخص‌های تعیین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها نشان داده است که بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های جاده قاهره-سوئز و نوویبا (۷۶/۰۳ درصد) و کم‌ترین آن بین نمونه‌های فران و نوویبا (۶۳/۸۷ درصد) بوده است. به‌طور کلی نتایج این مطالعه به‌خوبی کارایی نشانگر RAPD که شباهت زیادی با نشانگر ISSR دارد را در تعیین تنوع ژنتیکی میان نمونه‌های به‌کار رفته نشان می‌دهد.

با عنایت دوباره به این‌که گیاه استبرق در صنایع مختلفی از جمله نساجی، لاستیک‌سازی و داروسازی از اهمیت بالایی برخوردار است، متأسفانه مطالعات کمی برای بررسی چندشکلی موجود در جمعیت‌های مختلف آن در سطح ژنتیکی انجام شده است (Ahmed et al., 2014).

همچنین ارزیابی تنوع ژنتیکی، شرط لازم برای پیش‌برد اهدافی مانند محافظت از مواد گیاهی و تعیین تغییرات بین نمونه‌های مختلف نیز می‌باشد (Krasteva, 2000). لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های استبرق رشد کرده در نقاط مختلف استان کرمان و یافتن روابط خویشاوندی بین آن‌ها از طریق نشانگرهای مولکولی بین ریزوماهواره‌ای (ISSR) جهت کمک به فعالیت‌های اصلاحی آینده این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

مکان اجرای آزمایش و مواد گیاهی: این مطالعه در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد. در این مطالعه ۵۰ نمونه استبرق از سه منطقه مختلف استان کرمان جمع‌آوری شد و در نهایت ۱۴ نمونه گیاهی حاوی برگ‌های جوان برای استخراج DNA و انجام کارهای بعدی از بین آن‌ها انتخاب شد؛ زیرا کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از برگ‌های جوان مطلوب‌تر می‌باشد (Zamani et al., 2005). نام هر گیاه در قالب یک کد یادداشت گردید و جزئیات و اطلاعات مربوط به خصوصیات ظاهری گیاه و منطقه رشد آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

نمونه‌برداری، استخراج DNA و بررسی مولکولی: برای نمونه‌برداری به‌طور متوسط دو تا سه برگ از هر گیاه برداشت

جدول ۱- خصوصیات نمونه‌های گیاهی (استبرق) جمع‌آوری شده و موقعیت جغرافیایی منطقه‌های رشد

Table 1. Description and latitude and longitude of the collection place of collected plant accessions (*Calotropis procera*)

کد	نام شهر	توضیحات	طول و عرض جغرافیایی محل جمع‌آوری
Code	City name	Descriptions	Latitude and longitude of the collection place
۱ J1	جیرفت Jiroft	ارتفاع ۴ متر، خاک از جنس ماسه Height 4 meters, Sandy soil	28°43' N, 57°44' E
۲ J2	جیرفت Jiroft	ارتفاع ۲ متر، خاک شنی-رس Height 2 meters, Sandy-clay soil	28°42' N, 57°48' E
۳ J3	جیرفت Jiroft	ارتفاع ۲ متر، خاک لوم-رس Height 2 meters, Loam-clay soil	28°37' N, 57°39' E
۴ J4	جیرفت Jiroft	ارتفاع گیاه ۲ متر، خاک شنی Height 2 meters, Sandy soil	28°37' N, 57°50' E
۱ A1	عنبرآباد Anbarabad	ارتفاع ۲ متر، خاک دج Height 2 meters, Dej soil	28°30' N, 57°43' E
۲ A2	عنبرآباد Anbarabad	ارتفاع ۲ متر خاک رس Height 2 meters, Clay soil	28°22' N, 57°43' E
۳ A3	عنبرآباد Anbarabad	ارتفاع یک متر، خاک شنی-آهکی High 1 meter, Sandy calcareous soil	28°20' N, 57°48' E
۴ A4	عنبرآباد Anbarabad	ارتفاع ۲ متر، خاک شنی Height 2 meters, Sandy soil	28°23' N, 58°03' E
۵ A5	عنبرآباد Anbarabad	ارتفاع ۴ متر، خاک شنی Height 4 meters, Sandy soil	28°32' N, 57°55' E
۱ D1	دوساری Dosari	ارتفاع یک متر، خاک شنی High 1 meter, Sandy soil	28°24' N, 57°57' E
۲ D2	دوساری Dosari	ارتفاع نیم متر، خاک رس Half a meter high, Clay soil	28°24' N, 57°54' E
۳ D3	دوساری Dosari	ارتفاع ۶ متر، خاک رس Height 6 meters, Clay soil	28°20' N, 57°55' E
۴ D4	دوساری Dosari	ارتفاع ۳ متر، خاک شنی-رسی Height 3 meters, Sandy-clay soil	28°21' N, 57°59' E
۵ D5	دوساری Dosari	ارتفاع ۳ متر، خاک شنی-رسی Height 3 meters, Sandy-clay soil	28°21' N, 58°02' E

جدول ۲- توالی و دمای اتصال نه آغازگر ISSR استفاده شده

Table 2. Sequence and annealing temperature of the nine used ISSR primers

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر (°C)
Name of primer	Sequence of primer	Annealing temperature of primer (°C)
ISSR1	5'-GAGAGAGAGAGAGAATG-3'	58
ISSR2	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	47
ISSR3	5'-AGAAGAGAGAGAGAGACTT-3'	50
ISSR4	5'-AGAAGAGAGAGAGAGACTG-3'	50
ISSR5	5'-TGTGTGTGTGTGTGAGT-3'	58
ISSR6	5'-CCACTCTCTCTCTCTCT-3'	58
ISSR7	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3'	58
ISSR8	5'-GAAACCTGCTGCGGACAAG-3'	58
ISSR9	5'-GTTGGCCGGTTCGGCTGCCATG-3'	58

جدول ۳- نام و غلظت مواد استفاده شده در PCR

Table 3. Name and concentration of materials used in PCR

نام واکنش‌دهنده‌ها	مقدار (میکرولیتر)
Reactant's name	Amount (Microliter)
PCR buffer (10X)	2
dNTPs (10 mM)	0.4
MgCl ₂ (50 mM)	1
DNA polymerase (Taq polymerase 1 U)	0.5
DNA (10 ng per µl)	1
Primers (10 pmol)	2
Distilled water	13.1

جدول ۴- شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 4. Polymerase chain reaction conditions

نام مرحله Name of step	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه) Time (Minutes)
واسرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)	94	5
واسرشت‌سازی (Denaturation)	94	1
اتصال (Annealing)	58	1
سنتز و بسط (Extension)	72	2
چرخه برای ۳۵ بار (Cycle For 35 times)	-	-
بسط نهایی (Final extension)	72	10
نگهداری (Hold)	4	60

جدول ۵- مواد مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید

Table 5. Materials used for staining polyacrylamide gel

نام ماده Name of the material	مقدار ماده The amount of material	مقدار آب دو بار تقطیر (میلی‌لیتر) Amount of double distilled water (ml)	حجم نهایی محلول (میلی‌لیتر) Final volume of solution (ml)
10% acetic acid	20 (ml)	180	200
Silver nitrate	0.2 (g)	100	100
Sodium hydroxide	6 (g)	195	200
Formaldehyde	1 (g)	-	1

تشکیل شد. در مرحله بعدی بر اساس درجه شباهت یا تفاوت آن‌ها گروه‌بندی شدند. در این راستا از روش‌های آماری چندمتغیره از قبیل تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی^۱ (PCoA) استفاده به عمل آمد و توسط نرم‌افزار NTSYS سری ۲/۰۲ محاسبه شدند. قابل ذکر است برای تشکیل ماتریس تشابه به سه روش تطابق ساده، دایس و جاکارد بر اساس مقادیر ناریب نی برای محاسبه شباهت ژنتیکی و همچنین برای گروه‌بندی و رسم دندروگرام با استفاده از روش UPGMA^۲ بر اساس فاصله تشابه ژنتیکی نی (Nei, 1978) از نرم‌افزار مذکور استفاده شد. تخمین ضریب کوفتیک نیز یکی از روش‌های مقایسه الگوریتم‌های مختلف خوشه‌بندی است و درجه همبستگی بین ورودی و

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در بررسی الگوی بانندی ژل پلی‌اکریل‌آمید حاصل از الکتروفورز عمودی، باندهایی که چندشکلی نشان دادند به صورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازبندی شدند. شاخص اطلاعات چندشکل که نشان دهنده قدرت هر نشانگر برای تمایز نمونه‌ها است، طبق فرمول $PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$ محاسبه شد که در این رابطه P_{ij} فراوانی i امین باند برای نشانگر j و n تعداد کل باندهای مشاهده شده برای لوکوس نشانگری است (Anderson et al., 1993). در ضمن شاخص مذکور توسط نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا ماتریس صفر و یک برای هر نمونه بر مبنای چندشکلی تولید شده توسط نشانگرها

1- Principal coordinate analysis

2- Unweighted pair group method with arithmetic mean

شاخص اطلاعات چندشکل (PIC) در این مطالعه از ۰/۱۱ برای آغازگر ISSR9 تا ۰/۴۱ برای آغازگرهای ISSR3 و ISSR8 متغیر بود. همچنین متوسط میزان شاخص اطلاعات چندشکل در این مطالعه ۰/۲۹ بود (جدول ۶).

بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نی، بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های جیرفت ۱ (J1) و جیرفت ۲ (J2) با مقدار ۰/۷۴۵ و کم‌ترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های جیرفت ۳ (J3) و دوساری ۲ (D2) با مقدار ۰/۴۰۵ مشاهده شد (جدول ۷).

نتایج تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها بر مبنای تجزیه ماتریس داده‌های صفر و یک حاصل از الگوی باندهای آغازگرهای ISSR با استفاده از معیار فاصله تشابه ژنتیکی نی به روش UPGMA در شکل ۱ نشان داده شده است که ۱۴ نمونه مورد بررسی را به چهار گروه مجزا تقسیم نمود. ضریب کوفتیک این دندروگرام ۰/۶۲ بود (شکل ۱).

خروجی تجزیه خوشه‌ای را نشان می‌دهد و با نرم‌افزار NTSYS محاسبه شد. لازم به ذکر است درجه همبستگی می‌تواند بین $0.7 < r < 0.9$ متغیر باشد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد از ۳۵ آغازگر ISSR استفاده شده در این مطالعه، نه آغازگر چندشکلی نشان دادند و در کل ۲۹۵ باند تولید شد که از این تعداد ۱۰۶ باند چندشکلی نشان دادند و بقیه یک‌شکل بودند. به عبارتی چندشکلی مشاهده شده ۳۵/۹۳ درصد بود. بیشترین و کم‌ترین تعداد باند تولید شده به ترتیب توسط آغازگرهای ISSR8 و ISSR7 ایجاد شد. همچنین بیشترین و کم‌ترین تعداد باند چندشکل نیز به ترتیب توسط آغازگرهای ISSR8 و ISSR4 به دست آمد. میانگین تعداد باند تولید شده به ازای هر آغازگر ۳۲/۷۷ درصد و میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر آغازگر ۱۱/۷۷ درصد بود. میزان

جدول ۶- تعداد باند تولید شده، تعداد باند چندشکل و شاخص اطلاعات چندشکل آغازگرهای ISSR استفاده شده

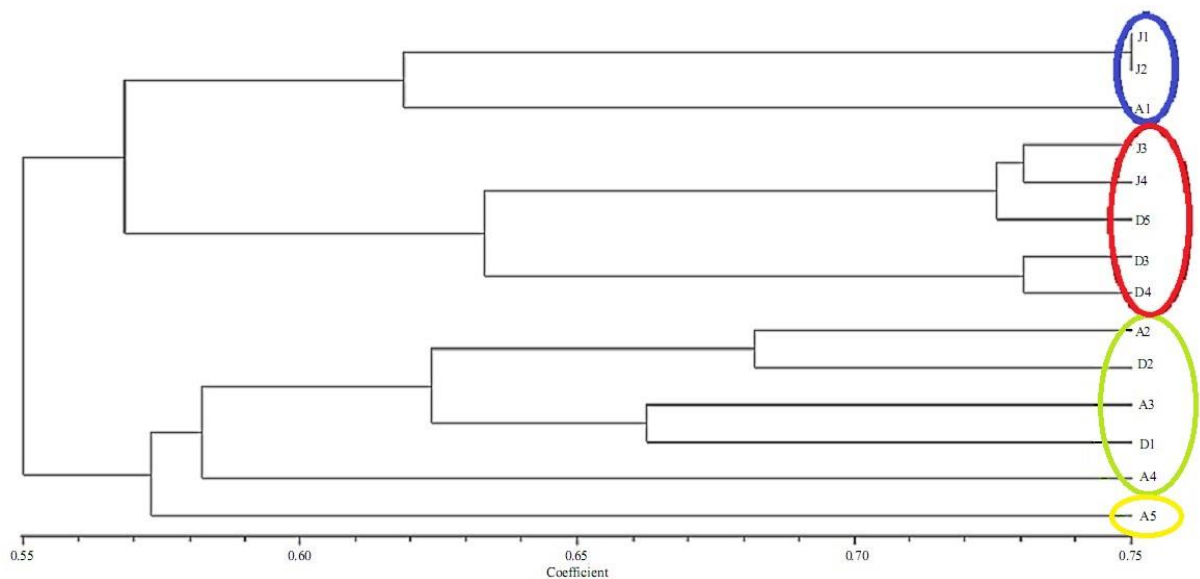
Table 6. Number of total bands, number of polymorphic bands and polymorphism information content of ISSR primers

نام آغازگر Primer name	تعداد باند تولید شده Number of bands produced	تعداد باند چندشکل Polymorphic band number	شاخص اطلاعات چندشکل (PIC) Polymorphism information content
ISSR1	26	12	0.39
ISSR2	26	9	0.13
ISSR3	25	6	0.41
ISSR4	25	4	0.40
ISSR5	27	8	0.19
ISSR6	42	18	0.26
ISSR7	23	5	0.33
ISSR8	59	29	0.41
ISSR9	42	15	0.11
تعداد کل (Total)	295	106	-
متوسط (Average)	32.77	11.77	0.29

جدول ۷- ماتریس ضرایب تشابه نی بین نمونه‌های استبرق مورد مطالعه

Table 7. Nei similarity coefficients matrix between the studied *Calotropis procera*

جمعیت Population	J1	J2	J3	J4	A1	A2	A3	A4	A5	D1	D2	D3	D4	D5
J1	1													
J2	0.745	1												
J3	0.490	0.566	1											
J4	0.622	0.613	0.726	1										
A1	0.660	0.575	0.556	0.679	1									
A2	0.660	0.641	0.518	0.669	0.650	1								
A3	0.547	0.594	0.415	0.547	0.528	0.650	1							
A4	0.490	0.490	0.490	0.584	0.556	0.669	0.518	1						
A5	0.528	0.547	0.500	0.613	0.603	0.641	0.613	0.547	1					
D1	0.500	0.509	0.462	0.584	0.556	0.669	0.660	0.622	0.575	1				
D2	0.528	0.584	0.405	0.537	0.452	0.679	0.566	0.518	0.490	0.603	1			
D3	0.471	0.509	0.528	0.632	0.575	0.584	0.547	0.660	0.603	0.632	0.660	1		
D4	0.566	0.603	0.641	0.650	0.584	0.641	0.613	0.537	0.547	0.547	0.547	0.726	1	
D5	0.518	0.566	0.716	0.726	0.613	0.547	0.490	0.500	0.509	0.547	0.452	0.622	0.716	1



شکل ۱- دندروگرام گروه‌بندی ۱۴ نمونه استبرق بر اساس فاصله تشابه ژنتیکی نی، با روش UPGMA

Figure 1. Dendrogram grouping of 14 *Calotropis procera* strains based on Nei genetic similarity distance using UPGMA method
 رنگ آبی شامل نمونه‌های مربوط به مناطق جیرفت ۱، جیرفت ۲ و عنبرآباد ۱؛ رنگ قرمز شامل نمونه‌های مربوط به مناطق جیرفت ۳، جیرفت ۴، دوساری ۵، دوساری ۳ و دوساری ۴؛ رنگ سبز شامل نمونه‌های مربوط به مناطق عنبرآباد ۲، دوساری ۲، عنبرآباد ۳، دوساری ۱ و عنبرآباد ۴؛ و رنگ زرد مربوط به منطقه عنبرآباد ۵ است
 Blue color includes samples related to Jiroft 1, Jiroft 2 and Anbarabad 1; red color includes samples related to Jiroft 3, Jiroft 4, Dosari 5, Dosari 3 and Dosari 4; green color includes samples related to Anbarabad 2, Dosari 2, Anbarabad 3, Dosari 1; and yellow color includes sample related to Anbarabad 5

جیرفت ۱، جیرفت ۲ و عنبرآباد ۱؛ گروه دوم شامل نمونه‌های J1، J2، J3، J4، D3، D4، D5 به ترتیب از مناطق جیرفت

بر اساس نتیجه دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، گروه اول شامل نمونه‌های J1، J2 و A1 به ترتیب از مناطق

ژنتیکی بین توده‌های مورد استفاده از این گونه تجزیه به مختصات اصلی انجام شد و ۶۷ درصد از تغییرات بین داده‌ها توسط دو مؤلفه اول توجیه شد (جدول ۸). نمودار گرافیکی رابطه ژنتیکی نمونه‌ها با توجه به دو مؤلفه اصلی نیز در شکل ۲ نمایش داده شده است. بر طبق آنچه که در نمودار پراکنش (شکل ۲) مشاهده می‌شود، گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی توسط این نمودار تا حدودی مطابق با دندروگرام رسم شده با روش UPGMA (شکل ۱) است. به‌نحوی که چهار گروه ایجاد شد و نمونه‌های A2 و D2 در گروه اول، نمونه‌های A5 و A4 در گروه دوم، نمونه‌های A1 و J2 در گروه سوم و نمونه‌های D4، D5 و J3 در گروه چهارم قرار گرفت (شکل ۳). سایر نمونه‌ها جزو نمونه‌های بحرانی بودند.

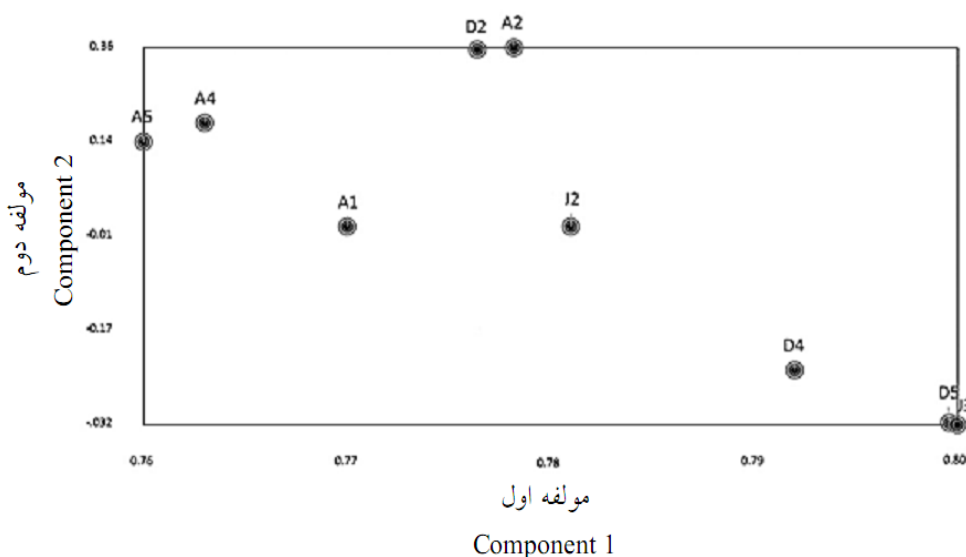
۳، جیرفت ۴، دوساری ۳، دوساری ۴ و دوساری ۵؛ گروه سوم شامل نمونه‌های A2، A3، A4، D1 و D2 به ترتیب از مناطق عنبرآباد ۲، عنبرآباد ۳، عنبرآباد ۴، دوساری ۱ و دوساری ۲ و گروه چهارم شامل نمونه A5 از منطقه عنبرآباد ۵ بودند (شکل ۱). طبق الگوی پراکنش نمونه‌ها در شکل ۲ به نظر این گروه‌بندی بیشتر بر اساس فاصله ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی است.

تجزیه به مختصات اصلی یک روش مقیاس‌گذاری یا مختصات‌یابی است که با ماتریس شباهت‌ها یا تفاوت‌های بین مجموعه‌ای از افراد شروع می‌شود و هدف از آن به‌وجود آوردن یک نمودار گرافیکی از داده‌ها با ابعاد کمتر است؛ به‌طوری‌که فاصله بین نقاط در نمودار، نزدیک به تفاوت‌های اصلی می‌باشد (Amiri et al., 2017; Salami et al., 2018). در مطالعه حاضر نیز برای نشان دادن رابطه

جدول ۸- مؤلفه‌ها، مقادیر ویژه، درصد واریانس توجیه شده و درصد تجمعی واریانس توجیه شده در تجزیه به مختصات اصلی برای داده‌های بین ریزماهوره‌ای

Table 8. Components, eigenvalues, percentage of determined variance and cumulative percentage of determined variance in principal coordinate analysis for inter-satellite data

مؤلفه Component	مقدار ویژه Eigenvalue	درصد واریانس توجیه شده Percentage of determined variance	درصد تجمعی واریانس توجیه شده Cumulative percentage of determined variance
1	8.53	60.93	60.93
2	0.83	5.94	66.87



شکل ۲- نمودار پراکنش رابطه ژنتیکی نمونه‌ها با توجه به دو مؤلفه اصلی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی برای داده‌های بین ریزماهوره‌ای
Figure 2. Genetic relationship distribution diagram of samples according to two principal components of principal coordinate analysis for inter-satellite data

فواصل جغرافیایی متفاوت این نمونه‌ها می‌باشد. در مورد دو نمونه اخیر که فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر دارند، اگر از قدرت ترکیب‌پذیری بالایی نیز برخوردار باشند، می‌توانند دورگ‌هایی با ویژگی‌های موردنظر اصلاح‌گران تولید کنند. به این مهم در یافته‌های یانگ و همکاران (Yang et al., 2005) نیز پرداخته شده است. نتایج حاصل از گروه‌بندی ۱۴ نمونه استبرق بر اساس فاصله تشابه ژنتیکی نی، با روش UPGMA نیز مؤید این موضوع است (شکل ۱). متأسفانه تحقیقات کمی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های استبرق در کشور انجام شده است. در یک بررسی توسط آگوسویانو و همکاران (Agossou-Yao et al., 2015) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی استبرق در منطقه غرب آفریقا با استفاده از نشانگر AFLP، تنوع ژنتیکی وسیعی را بر اساس ضریب تشابه جاکارد مشاهده کرده‌اند که مقادیر آن بین ۰/۰۵۶ تا ۰/۹۶۶ بود.

در نتایج حاصل از گروه‌بندی نمونه‌های استبرق بر اساس فاصله تشابه ژنتیکی نی با روش UPGMA، همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، نمونه‌های مربوط به عنبرآباد (گروه A) اغلب در گروه سوم قرار گرفته‌اند که این امر به نظر حاکی از تأثیر فواصل جغرافیایی در توارث ژنتیکی می‌تواند باشد. به نظر این نتیجه کارایی آغازگرهای بین ریزوماوارهای و قابلیت تجزیه خوشه‌ای در خوشه‌بندی صحیح بر مبنای اطلاعات داده‌های مولکولی را نیز به تأیید می‌رساند. کارآمدی و سودمندی آغازگرهای ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی توسط محققینی چون اش و همکاران (Ash et al., 2002)، رضانی و رحیمی (Ramezani and Rahimi, 2017) و دیگر گونه‌ها توسط یانگ و همکاران (Yang et al., 2007) و سبزیلیان و همکاران (Sabzalian et al., 2009) نیز گزارش شده است. بر طبق آنچه که انتظار می‌رفت تجزیه خوشه‌ای نتوانست همه توده‌های متعلق به هر منطقه را در یک گروه قرار دهد، اما با توجه به گروه‌بندی این تجزیه، می‌توان توده‌هایی را که در یک گروه قرار گرفته‌اند را از نظر ژنتیکی در فاصله نزدیک‌تری لحاظ کرد.

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)، نوعی روش گروه‌بندی است و با ایجاد نقاطی در پلات‌های گرافیکی، فواصل بین هر

چندشکلی شامل وجود اشکال مختلف از یک ژن یا آلل در گیاهان است که از این تفاوت می‌توان به‌عنوان نشانگرهای مولکولی برای شناسایی ژن‌های خاص و در نتیجه صفات مطلوب استفاده نمود. به طوری که این چندشکلی‌ها با ژن‌های صفات مطلوب مرتبط بوده (Ribaut et al., 2002) و از این چندشکلی مشاهده شده در بوته‌های استبرق مناطق مختلف، می‌توان در برنامه اصلاح این گیاه استفاده نمود. به‌طور مشابه در مطالعه‌ای به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آویشن‌دانی با استفاده از نشانگر ISSR، در مجموع ۱۳ آغازگر به‌کار گرفته شد که تعداد ۲۷۱ آغازگر چندشکل بودند (Khorshidi et al., 2018).

میزان شاخص اطلاعات چندشکل (PIC) می‌تواند برای تعیین آغازگرهای کارآمد که بیشترین چندشکلی را نشان می‌دهند استفاده شود و میزان آن برای نشانگرهای غالب بین صفر تا ۰/۵ متغیر می‌باشد و مقادیر بالای آن نشان دهنده چندشکلی بالا و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است (Mondak, 2013). از آنجایی‌که در مطالعه حاضر دو آغازگر ISSR3 و ISSR8 دارای بیشترین میزان شاخص اطلاعات چندشکل بودند، لذا دو آغازگر اخیر نسبت به سایر آغازگرها از کارایی بالایی برخوردار بودند. به‌طور مشابه در مطالعه‌ای قندهاری و همکاران (Ghandehari et al., 2013) به جهت بررسی جمعیت‌های شمشاد با استفاده از نشانگرهای ISSR، تعداد ۳۸ باند چندشکل را گزارش نمودند که متوسط میزان شاخص اطلاعات چندشکل (PIC) در جمعیت شمشاد ۳۷/۴ به‌دست آمد که این نتیجه در مقایسه با نمونه‌های استبرق کمی بیشتر بود.

ضریب تشابه ژنتیکی نی بیان می‌دارد اگر دو جمعیت از نظر ژنتیکی یکسان و مشابه باشند، فاصله ژنتیکی آن‌ها بزرگ‌تر از صفر است. از آنجایی‌که این مقدار بین صفر تا یک متغیر است، لذا هرچه فاصله ژنتیکی دو جمعیت نزدیک به یک باشد آن دو جمعیت از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر مشابه هستند (Nei, 1978). در مطالعه حاضر شباهت ژنتیکی زیاد بین نمونه‌های جیرفت ۱ (J1) و جیرفت ۲ (J2) و شباهت ژنتیکی کم بین نمونه‌های جیرفت ۳ (J3) و دوساری ۲ (D2) به‌احتمال فراوان مربوط به

همچنین نمونه‌های استبرق مورد مطالعه زمینه‌های ژنتیکی بسیار خوبی برای کمک به تولید و اصلاح یک استبرق زراعی را دارا بودند و با توجه به اینکه نمونه‌های جیرفت ۳ (J3) و دوساری ۲ (D2) در این تحقیق دارای فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر بودند، لذا در برنامه‌های تولید هیبرید این گیاه در آینده می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. این مهم با توجه به ویژگی‌های ممتاز استبرق در عرصه صنعتی به‌منظور تولید صمغ و ماده اولیه صنایع لاستیک‌سازی و کاتوچو اهمیتی مضاعف دارد، چراکه ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه استبرق به‌خصوص با نمونه‌ها و نشانگرهای فراوان، پیش‌نیاز اصلی برنامه‌های به‌نژادی جهت اصلاح زراعی آن است. همچنین موضوع تولید نسوج و نخ ابریشمی در صنایع نساجی از این گیاه و ظرفیت تولید مواد مؤثره دارویی، ضرورت گسترش و توسعه مطالعات اصلاحی را دوچندان می‌کند.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت حمایت مالی و سازمان جهاد خودکفایی سپاه پاسداران به‌دلیل مساعدت مالی و همکاری مؤثر در جمع‌آوری نمونه‌ها سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

ژنوتیپ در فضای اقلیدسی عرضه می‌شود و از این رو نقاط مربوط به ژنوتیپ‌هایی که بر روی پلات گرافیکی نزدیک به یکدیگر هستند، از شباهت بیشتری برخوردار می‌باشند (Farshadfar, 1998). نتایج دیاگرام پراکنشی نمونه‌ها بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۲)، با نتایج تجزیه خوشه‌ای (شکل ۱) تا حد قابل قبولی مطابقت داشت. نتایج مشابهی در مطالعه رحمتی و شیروانی (Rahmati and Shirvani, 2018) به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *Dactylis glomerata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR به‌دست آمده است. به‌نظر در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی گواه بر توزیع مناسب نشانگرها بر روی کل ژنوم است (جدول ۶). بر طبق نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، تنوع ژنتیکی قابل توجهی درون استبرق‌های بومی منطقه جیرفت وجود نداشت و دلیل آن می‌تواند فاصله کم جغرافیایی آن‌ها باشد. نمونه‌های استبرق از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت بودند و نشانگر ISSR توانست به‌عنوان ابزار مناسبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تخمین درجه شباهت ژنتیکی در این گونه مورد استفاده واقع شود و نشانگرهای ISSR3 و ISSR8 مورد استفاده در این مطالعه از کارایی بالایی در این زمینه برخوردار بودند.

References

- Abbasi, H.A., Tasaodi, S., Mirsoleimani, M.A. and Masoudi, M. (2016). Study of milkweed (*Calotropis procera*) regeneration potential in vitro culture conditions. *Journal of Plant Researches*, **29**: 833-842 (In Persian).
- Agossou-Yao, D.A.R., Sprycha, Y., Porembski, S. and Horn, R. (2015). AFLP assessment of the genetic diversity of *Calotropis procera* (Apocynaceae) in the West Africa region (Benin). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **62**: 863-878.
- Ahmadi-Khah, A. (2011). *Advanced Genetic*, 2nd. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran (In Persian).
- Ahmed, A., El-Bakry, A., Hammad, I.A. and Rafat, F.A. (2014). Polymorphism in *Calotropis procera*: preliminary genetic variation in plants from different phytogeographical regions of Egypt. *Rendiconti Lincei Scienze Fisiche Naturali*, **25**: 471-477.
- Al-Yemni, M.N., Sher, H., El-Sheikh, M.A. and Eid, E.M. (2011). Bioaccumulation of nutrient and heavy metals by *Calotropis procera* and *Citrullus colocynthis* and their potential use as contamination indicators. *Scientific Research and Essays*, **6**: 966-976.
- Amiri, P., Ismaili, A. and Hadian, J. (2017). Evaluation of genetic diversity of Styrian pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) populations, using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **4**(2): 17-28 (In Persian).
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, **36**: 181-186.
- Ash, G.H., Raman, R. and Crump, N.S. (2002). An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. *European Weed Research Society*, **43**: 208-213.
- Babakhani, M. and Yavari, A. (2018). *Calotropis procera* Willd. medicinal plant, ideal for afforestation in the Persian Gulf and Oman sea. *1st National Conference on Novel Ideas in Agriculture and Natural Resources*, University of Mohaghegh Ardabili, Iran (In Persian).

- Doyle, J. and Doyle, J.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Farshadfar, E.** (1998). *Application of Biometrical Genetics in Plant Breeding (I and II)*, Razi University of Kermanshah, Kermanshah, Iran (In Persian).
- Ghandehari, V., Ahmadi-Khah, A. and Payamnoor, V.** (2013). Genetic diversity of *Buxus hyrcana* populations in north of Iran using ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **21**: 1-13 (In Persian).
- Golcheshmeh, S., Pahlavani, M.H., Esmailzadeh-Moghaddam, M. and Zaynali-Nezhad, K.** (2019). Morphological evaluation and marker assisted for tillering of wheat. *Journal of Crop Breeding*, **11**: 153-160 (In Persian).
- Hoisington, D., Khairallah, M., Reeves, T., Ribaut, J.M., Skovmand, M., Taba, S. and Warburton, M.** (1999). Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity? *National Academy of Sciences*, **96**: 5937-5943.
- Kakaei, M., Mazahery-Laghab, H. and Kahrizi, D.** (2013). Study of morphological and biochemical to determine the genetic diversity of cultivated Oat (*Avena sativa* L.). *Agricultural Biotechnology Journal*, **5**: 119-138 (In Persian).
- Khorshidi, J., Shokrpour, M. and Nazeri, V.** (2018). Assessment of genetic diversity in different populations of *Thymus daenensis* Celak. using ISSR marker. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **10**: 59-74 (In Persian).
- Krasteva, L.** (2000). Organization of Melon plant genetic resources in Bulgaria. *Acta Horticulturae*, **510**: 247-25.
- Mondak, B.** (2013). Study of hybridization, genetic and phytochemical diversity in native Thyme of Iran. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran.
- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Center for Demographic and Population Genetics*, **89**: 583-590.
- Padhy, B.M., Srivastava, A. and Kumar, V.L.** (2007). *Calotropis procera* latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 498-502.
- Raghavan, R.S.** (1957). Chromosome number in Indian medicinal plants. *In Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B*, **45**: 294-298.
- Rahmati, H. and Shirvani, H.** (2018). The study of genetic diversity *Dactylis glomerata* ecotype using ISSR molecular marker. *Iranian Journal of Biology*, **31**: 1-9 (In Persian).
- Ramezani, M. and Rahimi, M.** (2017). Grouping and estimation of genetic diversity of different ecotypes of medicinal plant of *Plantago psyllium* using ISSR marker. *Journal of Cellular and Molecular Researches*, **30**: 141-151 (In Persian).
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A.** (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, **128**: 9-17.
- Ribaut, J.M., Banziger, M. and Hoisington, D.** (2002). Use of Molecular Markers in Plant Breeding: Drought Tolerance Improvement in Tropical Maize. In: Kang, M.S., Ed., *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding*, pp. 85-100. Louisiana State University, Baton Rouge, USA.
- Sabzalian, M.R., Mirlohi, A., Saeidi, G. and Rabbani, M.T.** (2009). Genetic variation among population of wild safflower, *Carthamus oxyacanthus* analyzed by agro-morphological traits and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56**: 1057-1064.
- Salami, A., Pahlevani, M., Zaynali-Nezhad, K. and Esmailzadeh Moghaddam, M.** (2018). Genetic variation pattern of Iranian wheat landraces based on ISSR molecular markers and morphological traits. *Plant Genetic Researches*, **5**: 87-100 (In Persian).
- Soltani-Eini, M., Razmi, G.H., Afkhami, A. and Ahmadi, A.** (2012). Therapeutic effects of liquid, hydro alcohol extracts of *Calotropis* spp. and Butalex, against *Haemoproteus* spp. infection in Pigeons. *Journal of Veterinary Microbiology*, **8**: 101-107 (In Persian).
- Yang, B.C., Xiao, B.G., Chen, X.J. and Shi, C.H.** (2005). Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers. *Yi Chuan Hereditas*, **27**: 753-758.
- Yang, Y.X., Wu, W., Zheng, Y.L., Chen, L., Liu, R.J. and Huang, C.Y.** (2007). Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**: 1043-1051.
- Ying-Ben, L., Yang, L., Yi-Chun, T.I., Li-Yuang, W., Hao, C. and Ping-Seng, W.** (2010). Assessment of genetic diversity and relationship of Tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, **36**: 391-400.
- Zamani, Z., Sarkhosh, A., Fattahi-Moghaddam, M.R. and Ebadi, A.** (2005). Comparison of six genomic DNA extraction methods from pomegranate (*Punica granatum* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, **6**: 99-110 (In Persian).

Assessment of Genetic Diversity between Different Accessions of *Calotropis Procera* with ISSR Molecular Markers

Saeid Navabpour^{1,*}, Ahad Yamchi² and Sasan Golcheshmeh³

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: April 19, 2020 – Accepted: February 23, 2021)

Abstract

The present study was performed to classify and study genetic diversity between *Calotropis procera* accessions from different regions of Kerman province (Iran) using ISSR markers. In total, DNA from 14 plant samples with nine ISSR primers was amplified by PCR and their banding pattern was obtained. The primers showed acceptable polymorphism (35.93) and minimum and maximum polymorphic information content (PIC) of primers in this study were 0.11 for ISSR9 primer and 0.41 for ISSR3 and ISSR8 primers, respectively. Genetic similarity based on Nei index was varied from 0.405 to 0.745 and the lowest genetic similarity was found between J3 (Related to Jiroft) and D2 (Related to Dosari) and the highest genetic similarity was found between J1 and J2 (both of them for Jiroft). By using UPGMA cluster analysis, samples divided into four groups, and the second and third groups contained more accessions. In terms of genetic similarity, two accessions of Jiroft 1 (J1) and Jiroft 2 (J2) which classified in the same cluster were closer. Also, the accessions collected from Anbarabad were at a longer genetic distance than other accessions. Principal coordinate analysis also showed that the first and second components justify 67 percent of obtained genetic diversity. In general, ISSR markers were useful for classifying *Calotropis procera* accessions and according to the obtained information about existence of genetic diversity between *Calotropis procera* accessions of Kerman province, this diversity could be useful in the future for breeding and production of *Calotropis procera*.

Keywords: Polymorphism, Genetic resources, Genetic distance, Medicinal plant, DNA marker

* Corresponding Author, E-mail: s.navabpour@gau.ac.ir