مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum* L.) با استفاده از نشانگر ISSR

عزیزه سقلی*[1]، محمد فرخاری[2]، افشین صلواتی[2]، خلیل عالمی سعید[2]، علیرضا ابدالی‌مشهدی[2]

[1] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[2] استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۳۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۱

چکیده

خارمریم (*Silybum marianum* L.) یکی از گیاهان دارویی مهم است که از زمان‌های باستان برای درمان بیماری کبد و بیماری‌های مرتبط با صفرا و همچنین مسمومیت حاد ناشی از مصرف قارچ‌های سمی مورد استفاده قرار می‌گرفت. شناخت تنوع ژنتیکی در گیاه خارمریم همانند سایر گیاهان کمک بزرگی در جهت تحقیقات به‌نژادی و بررسی و شناسایی تنوع موجود در ذخایر ژرم‌پلاسم این گیاه می‌نماید. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ اکوتیپ خارمریم مربوط به مناطق زیستی مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR بود. به این منظور از ۹ نشانگر ISSR استفاده شد که برمبنای آنها بین اکوتیپ‌ها چندشکلی مشاهده گردید. این آغازگرها مجموعاً ٤١ باند چندشکل و تکرارپذیر ایجاد نمودند. در این بررسی میانگین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، میانگین شاخص اطلاعاتی شانون و میانگین شاخص ضریب تنوع نی به ترتیب برابر با ۰/۳۸، ۰/۳۰ و ۰/۲۰ بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و ماتریس تشابه جاکارد، اکوتیپ‌های خارمریم را در ٤ گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. در مجموع بین این گروه‌بندی و مناطق پراکنش جغرافیایی اکوتیپ‌ها تطابق کاملی وجود نداشت. نتایج این پژوهش مبین وجود تنوع ژنتیکی مناسب در بین اکوتیپ‌های خارمریم ایران جهت آغاز مطالعات پروژه‌های بهنژادی است.

کلمات کلیدی: *خارمریم، بهنژادی، خوزستان.*

---

* نویسنده مسئول: **عزیزه سقلی** تلفن: ۰۹۱۱٤۲۰۸۰٥٦ Email: azizehsaghalli@yahoo.com

مقدمه

خارمریم با نام علمی *Silybum marianum*(L.) Gaertn یکی از گیاهان دارویی مهم است که از زمان‌های باستان برای درمان بیماری کبد و بیماری‌های مرتبط با صفرا و همچنین مسمومیت حاد ناشی از مصرف قارچ‌های سمی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Rainone, ۲۰۰۵). این گیاه حاوی ترکیبات فنولیک به نام فلاونولیگان‌ها است که عمدتا در دانه آن یافت می‌شود و در مجموع به نام سیلی‌مارین شناخته می‌شود (Kurkin, 2003). خارمریم جایگاه مهمی در زراعت متابولیتی و صنایع دارویی داراست، به طوری که این گیاه از ۲۰ سال پیش در کشورهایی مانند مجارستان، لهستان و بلغارستان در مقیاس وسیع کشت و ارقام اصلاح شده آن تولید شده است (OmidBeigi, 1998).

خارمریم گیاهی دیپلوئید با ۱۷ جفت کروموزم (2n=2x=34) شامل ٦ جفت کروموزم متاسنتریک، ۱۰ جفت کروموزم ساب متاسنتریک و یک جفت کروموزم آکرو سنتریک می‌باشد (Asghari-Zakaria *et al*., 2008). این گیاه به سلسله گیاهان بخش Magnoliophyta، کلاس نهاندانگان، راسته Asterales، خانواده Asteraceae و جنس *Silybum* است. دو گونه در جنس *Silybum* وجود دارد، گل بنفش *Silybum marianum* و گل سفید *S. eburneum* Coss، که هر دو تولید فلاونولیگنان‌های محافظ کبد می‌کنند (Murphy Abdali Mashhadi & Fathi, 2002 *et al*., 2000;). این گیاه بومی جنوب اروپا، منطقه مدیترانه و شمال آفریقا است (Hasanloo *et al*., 2005). در ایران این گیاه در مناطق مختلفی از جمله گرگان، گنبد کاووس، بین گرگان و نوده در ارتفاعات ۱۵۰ تا ۵۰۰ متری کلاردشت، بابل در ارتفاعات ٤٥٠ متری، آذربایجان (دشت مرغان)، کرمانشاه (کوه نوه)، لرستان (باغ سراب در ارتفاعات ۸۵۰ متری، پشت کوه)، خوزستان (شوش، حمیدیه، ۲۵ کیلومتری رامهرمز)، فارس (کازرون، بوشهر، برازجان) می‌روید (ZareKia & OmidBeigi, 2006).

توده‌های وحشی خارمریم در مناطق مختلف خوزستان به‌وفور به چشم می‌خورد و به خوبی با شرایط آب و هوایی خوزستان سازگار می‌باشد. در خوزستان این گیاه در آبان ماه سبز شده و در پاییز و زمستان با استفاده از بارندگی‌ها رشد رویشی می‌نماید و در بهار به ساقه رفته و گل‌دهی می‌نماید و در اردیبهشت ماه بذور آن به رسیدگی فیزیولوژیک می‌رسد. این گیاه به شرایط نامساعد محیطی همچون سنگین بودن خاک که از مشکلات عمده خوزستان است، مقاوم می‌باشد. بنابراین در صورت اهلی‌سازی و اصلاح این گیاه در جهت افزایش روغن و سیلی‌مارین می‌تواند به عنوان یک گیاه روغنی-دارویی در بسیاری از زمین‌های این استان که شرایط خوبی برای کشت سایر گیاهان زراعی از جمله گندم و کلزا را ندارند، مورد کشت قرار گیرد.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تنوع و انتخاب دو رکن اصلی در هر برنامه اصلاحی بوده و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب از حیث هدف مورد بررسی می‌باشد (Varma *et al*., 1980). در مطالعه تنوع ژنتیکی، تنوع بین افراد یا جمعیت‌ها بوسیله روش خاص و یا ترکیبی از روش‌ها انجام می‌شود. یکی از روش‌های مطالعه تنوع استفاده از نشانگرهای DNA می‌باشد. از جمله مزایای نشانگرهای دی.ان.ای نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک هزینه پایین، سرعت و دقت بالا است. نشانگرهای مختلف DNA امروزه به این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند که هر یک معایب و مزایای خاص خویش را می‌باشد. تاکنون چندین بررسی برروی تنوع اکوتیپ‌های خار مریم ایران توسط نشانگرهای DNA صورت پذیرفته است. در پژوهشی Mohammadi *et al*. (2011) در مطالعه خود تنوع ژنتیکی درون و بین ۳۲ اکوتیپ خارمریم جمع‌آوری شده از نواحی مختلف کشور به همراه دو رقم خارجی بوداکالازی و Cnseeds را با استفاده از نشانگرهای AFLP مورد مطالعه قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های AFLP با استفاده از فاصله ژنتیکی، اکوتیپ‌ها را به سه گروه منتسب کرد. در تحقیقی دیگر تنوع مولکولی و مورفولوژیکی ۹ نمونه مختلف خارمریم از ۹ مکان مختلف ایران را با استفاده از صفات مورفولوژیکی، فنولوژیکی، فیتوشیمیایی و نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه اکوتیپ‌های خارمریم توسط نشانگر RAPD در ۳ دسته طبقه‌بندی شدند (Hamid *et al*.). در پژوهشی Jorabadi *et al*. (2012) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی ٦١ بوته خارمریم بومی استان کرمانشاه با استفاده از ۹ نشانگر مولکولی ISSR[1] اظهار نمودند که با میانگین ۹۳/۱۱ درصد چندشکلی، این نشانگر قابلیت بررسی تنوع ژنتیکی و تفکیک نمونه‌ها را دارا هستند. نشانگرهای بین‌ریزماهواره‌ای (ISSR) تکنیکی است که توالی‌های ریزماهواره‌ای را به عنوان آغازگرها در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ایجاد نشانگرهای چند جایگاهی مورد استفاده قرار می‌دهند. این نشانگرها جزء نشانگرهای غالب بوده و کاربرد آن‌ها نیازی به شناخت قبلی از توالی ژنومی ندارند. میزان چندشکلی در نشانگرهای ISSR بسیار بالاست و برای مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیک، نشانمند کردن ژن، نقشه‌یابی ژنوم و بیولوژی تکاملی بسیار کارآمد هستند (Reddy *et al*., 2002). با توجه به موارد فوق و این که استفاده از نشانگرهای ISSR نیازی به اطلاعات توالی ژنوم ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چندجایگاهی و بسیار چندشکل می‌شود (Askari *et al*., 2011; Ghasemi *et al*., 2010; Zamani *et al*., 2011; Zamani *et al*., 2015) هدف از اجرای این پژوهش ارزیابی میزان تنوع موجود در ژرم‌پلاسم جمع‌آوری شده خارمریم با استفاده از نشانگر ISSR بود.

[1] Inter simple sequence repeat

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

مواد وروش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ اکوتیپ خارمریم در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی ومنابع طبیعی رامین خوزستان انجام گردید. عمده اکوتیپ‌های مورد مطالعه از بانک ژن موسسه جنگل‌ها و مراتع تهران دریافت و تعدادی نیز از استان خوزستان جمع‌آوری گردید (جدول ۱). همچنین رقم استاندارد از شرکت پاکان بذر اصفهان و رقم P۱۰۰ که اکوتیپی وحشی است، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید.

استخراج DNA از برگ‌های جوان به روش دلاپورتا (Dellaporta *et al.* 1983)، با کمی تغییرات انجام گرفت. ۰/۲ گرم نمونه برگی (بدون رگبرگ و دمبرگ) از گیاهچه‌های جوان در ازت مایه پودر و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. به میزان ٤۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl با ۸ = pH، ۵۰ میلی‌مولار EDTA با ۸ = pH، ۱/٤ میلی‌مولار NaCl و دو درصد SDS) به همراه ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ٦۰ دقیقه در حمام بن‌ماری در دمای٦٥°C درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شده و در این مدت هر ۵ دقیقه به آرامی سر و ته شدند. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق خنک و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵M اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند. بعد از این مدت ۵۰۰ میکرولیتر کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) سرد به نمونه اضافه و به آرامی به‌هم زده شدند. نمونه‌ها با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و پس از حذف مایع رویی رسوب به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در هوای اتاق خشک شد. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر TE به هریک از نمونه‌ها اضافه و برای حل شدن کامل DNA، به مدت ٢٤ساعت نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به فریزر۲۰- منتقل گردیدند. کمیت DNA استخراجی با دستگاه نانودراپ مدل Thermo NANO DROP20000spectro photometer و کیفیت آن از نظر وجود شکستگی بوسیله الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد ارزیابی شد.

در این پژوهش ۹ نشانگر ISSR استفاده شد (جدول۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه Bio Rad در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۰,۲ میلی‌مولار دزکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲ درصد دی‌متیل‌سولفوکسید[1] (DMSO)، ۲ میلی‌مولار کلریدمنیزیم، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز و ۳۰ نانوگرم DNA الگو صورت گرفت.

کاربرد DMSO در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دلیل بازکردن پیچ و تاب‌های موجود در DNA خارمریم بوده تا واکنش به سهولت انجام گیرد.

[1] Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۱- اکوتیپ‌های خارمریم‌های مورد بررسی در این تحقیق.

Table 1- *Silybum marianum* ecotypes that was studied in this study.

شماره Number	اکوتیپ Ecotype	استان Province	ارتفاع از سطح دریا Height from sea level
1	شوش ۱ (Shush 1)	خوزستان (Khuzestan)	85
2	شاهدیه(Shahdyh)	یزد (Yazd)	1210
3	جاده اهواز- هفتگل (Ahvaz road - Haftgel)	خوزستان (Khuzestan)	36
4	P ۱۰۰		
5	انگلستان ۱ (England 1)		
6	رستم آباد (Rostam Abad)	گیلان (Gillan)	396
7	شوشتر (Shooshtar)	خوزستان (Khuzestan)	61
8	منجیل (Manjil)	گیلان (Gillan)	348
9	استاندارد (Standard)		
10	روسنای ندافیه (Rvsnay Ndafyh)	خوزستان (Khuzestan)	21
11	اندیمشک (Andimeshk)	خوزستان (Khuzestan)	169
12	هفت تپه (Haft Hill)	خوزستان (Khuzestan)	46
13	اردبیل (Ardabil)	اردبیل (Ardabil)	1320
14	ملاثانی ۱ (Molasany 1)	خوزستان (Khuzestan)	
15	ملاثانی ۲ (Molasany 2)	خوزستان (Khuzestan)	
16	بهبهان ۱ (Behbahan 1)	خوزستان (Khuzestan)	340
17	نجف آباد (Najaf Abad)	اصفهان (Esfahan)	1642
18	ملاثانی ۳ (Molasany 3)	خوزستان (Khuzestan)	
19	انگلستان ۲ (England 2)		
20	رامهرمز (Ramhormuz)	خوزستان (Khuzestan)	128
21	بهبهان ۲ (Behbahan 2)	خوزستان (Khuzestan)	1726
22	شوش ۲ (Shush 2)	خوزستان (Khuzestan)	80
23	مجارستان (Hungary)		

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

چرخه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ مرحله بعدی واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای مناسب آغازگر (٤۷-۵۳درجه سانتی گراد) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه‌سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه صورت پذیرفت. در نهایت مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌سانتیگراد انجام گردید.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده.

Table 2- Sequence of used primers.

منبع Refrences	توالی آغازگر (۳ ← ۵) Sequence of primer (5 → 3)	آغازگر Primer
R. Ahmadvandi *et al*. 2013	$(GACA)_4$	ISSR-1
Fazeli & Cheghamirza, 2011	$(AG)_8G$	ISSR-2
Fazeli & Cheghamirza, 2011	$(GA)_8C$	ISSR-3
Mohammadi Farsani, 2012	$(AG)_8CT$	ISSR-4
Mohammadi Farsani, 2012	$(GA)_8T$	ISSR-5
Fazeli & Cheghamirza, 2011	$(CTC)_6$	ISSR-6
Ghorbani	$(ATG)_6$	ISSR-7
Ghorbani	$(AC)_8T$	ISSR-8
Fazeli & Cheghamirza, 2011	$(ACTG)_4$	ISSR-9

جهت الکتروفورز فرآورده‌های PCR حاصل از نشانگرهای ISSR از الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. از سایز مارکر[1] bp ۱۰۰ یا ۱ کیلو باز شرکت Fermentas جهت تخمین وزن باندهای تکثیری مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت، شدت جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر و قدرت ۵۰ وات به مدت ۷۵ دقیقه صورت پذیرفت. پس از پایان الکتروفورز، ژل از تانک خارج گردید و قطعات تکثیر شده تحت تأثیر نور فرابنفش (با طول موج ۲۵٤ نانومتر) توسط دستگاه ژل‌داک[2] شرکت UVI TEC Cambridge مشاهده شد و عکس ژل ثبت گردید. با توجه به اینکه در هر ژل تعداد چاهک‌ها به تعداد ژنوتیپ‌ها نبود بنابراین عمل بارگذاری در چند ژل مستقل از یکدیگر انجام گردید و در نهایت برای امتیاز دهی باندها از

[1] Size marker (Ladder)

[2] Gel documentation system

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

نرم‌افزار UV doc که از سایز مارکر به عنوان اندازه معیار کمک می‌گیرد، استفاده شد. نشانگرها به صورت صفر(عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیاز بندی شدند.

شاخص‌هایی نظیر تنوع ژنی نی (Nei, 1973) و ضریب شانون (Shannon, 1949) توسط نرم‌افزار Popgene32 (Francis *et al.*, 1997) محاسبه گردید. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی[1] (PIC) توسط فرمول Rold'an-Ruiz *et al.*, 2000 محاسبه گردید. برای محاسبه ماتریس تشابه از ضریب تشابه جاکارد و برای گروهبندی از الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) استفاده شد. بدین منظور نسخه ۲,۰۲ نرم‌افزار NTSYSpc (Rohlf, 2000) استفاده گردید. برای تعیین تعداد گروه‌ها در دندروگرام از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) توسط نرم GenAlex v6 (Peakall and Smouse, 2006) استفاده گردید. بدین صورت که از بین خطوط برش متفاوت ، موردی انتخاب گردید که در آن واریانس بین گروه‌های ایجاد شده نسبت به واریانس درون گروه‌ها معنی‌دار و دارای بیشترین مقدار بود.

نتایج و بحث

در این بررسی در مجموع ۵۵ جایگاه توسط ۹ نشانگر ایجاد گردید که از این بین ٤١ جایگاه (چندشکلی ٧٤ درصد) بین ژنوتیپ‌ها چندشکلی نشان داد. تعداد قطعات تکثیر شده با نشانگرهای مختلف متفاوت بوده و اندازه قطعات تکثیر شده در تمام نشانگرها در محدوده ۱۵۰۰-۲۰۰ جفت باز بودند (شکل ۱). دامنه ضریب تشابه جاکارد بدست آمده از نشانگر ISSR در این تحقیق از ۰/۲۰ بین اکوتیپ‌های شوشتر و روستای ندافیه تا ۰/۷۲ بین دو اکوتیپ ملاثانی۱ و نجف‌آباد متغیر بود (جدول ۳). مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (Rold'an-Ruiz *et al.*, 2000)، شاخص تنوع ژنی نی (Nei 1973) و شاخص اطلاعاتی شانون (Shannon 1949) محاسبه شده و در جدول ٤ گزارش شده است. آغازگر UBC-112 با توالی 4(GACA) از لحاظ این شاخص‌ها در مقایسه با سایر آغازگرها حاوی کمترین مقادیر بود. بنابراین این نشانگر در مقایسه با سایر نشانگرها سهم کمتری در تمایز اکوتیپ‌های از یکدیگر داشته است. سایر آغازگرها از لحاظ این شاخص‌ها دارای مقادیر متوسط و تقریبا برابر بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص ضریب تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعاتی شانون برای نشانگرهای مورد بررسی در این تحقیق به ترتیب برابر با ۰/۳۸، ۰/۳۳ و ۰/٤۹ بود. این مقادیر در مطالعه‌ای که بر روی ۳۲ جمعیت گیاه خارمریم در ایران با ۲۷ آغازگر AFLP صورت گرفت، به ترتیب برابر با ۰/۳۵، ۰/۲۰ و ۰/۳۰ بود (Mohammadi *et al.*, 2011).

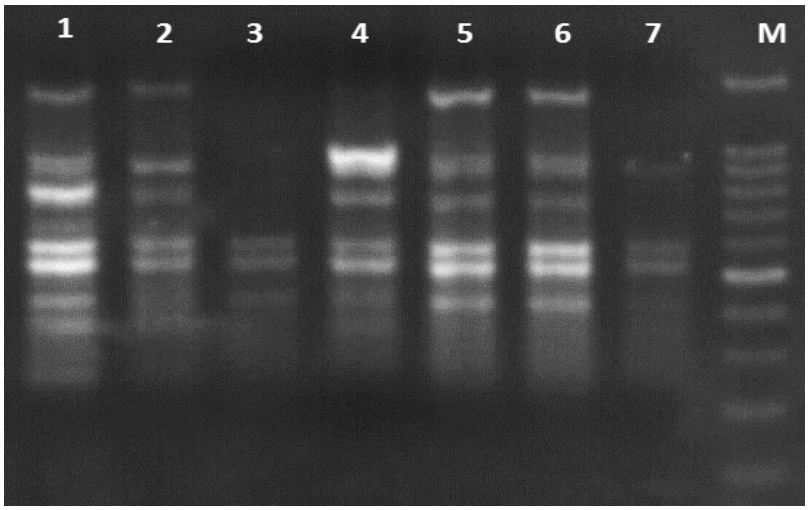
[1] Polymorphic Information Content

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۳- ماتریس تشابه جاکارد.

Table 3- Jaccard similarity matrix.

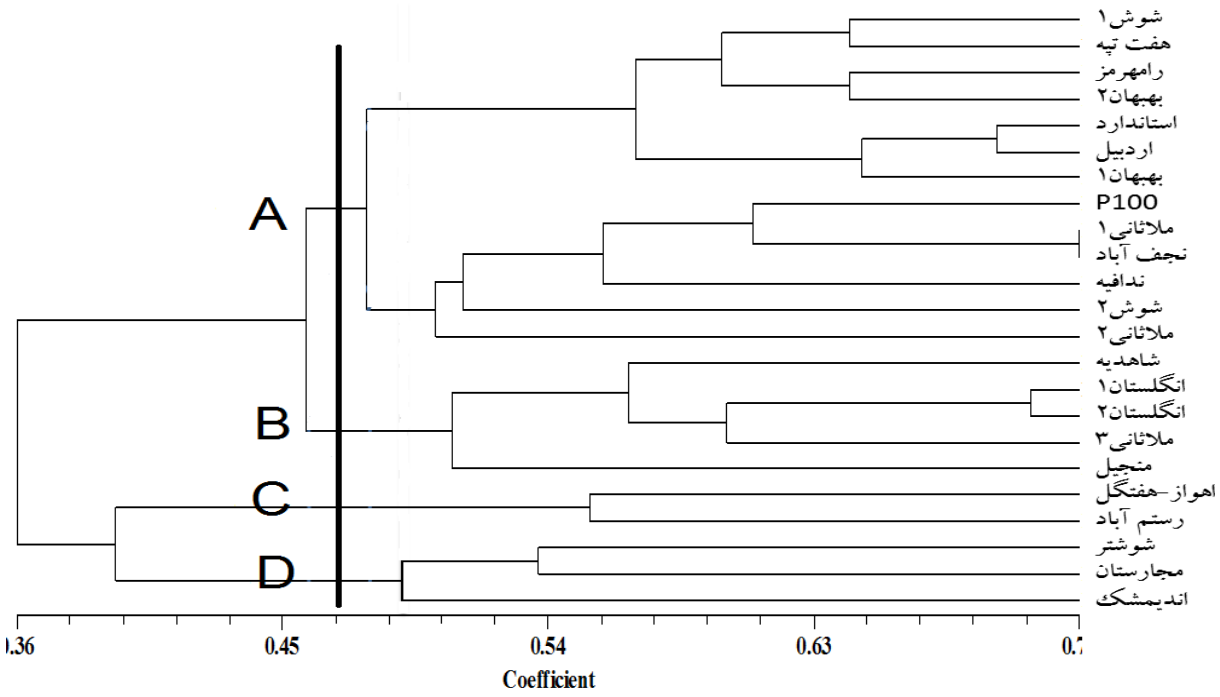
اکوتیپ‌ها	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Ecotypes
شاهدیه(۲)	0.56																						Shahdyh(2)
هفتگل(۳)	0.48	0.35																					A.Haftgol(3)
P ۱۰۰(٤)	0.51	0.57	0.27																				P100(4)
انگلستان ۱(۵)	0.46	0.53	0.35	0.41																			England 1(5)
رستم آباد(٦)	0.44	0.31	0.56	0.26	0.40																		R.Abad(6)
شوشتر(۷)	0.46	0.38	0.43	0.37	0.29	0.38																	Shushtar(7)
منجیل(۸)	0.55	0.51	0.31	0.38	0.47	0.29	0.27																Manjil(8)
استاندارد(۹)	0.66	0.46	0.48	0.51	0.33	0.35	0.42	0.40															Standard(9)
ندافیه(۱۰)	0.50	0.41	0.38	0.51	0.44	0.34	0.20	0.33	0.39														Ndafyh(10)
اندیمشک(۱۱)	0.35	0.37	0.47	0.41	0.33	0.34	0.52	0.28	0.35	0.33													Andimeshk(11)
هفت تپه(۱۲)	0.64	0.45	0.47	0.54	0.50	0.30	0.34	0.56	0.53	0.48	0.33												Haft hills(12)
اردبیل(۱۳)	0.62	0.53	0.33	0.58	0.35	0.36	0.39	0.57	0.62	0.41	0.36	0.52											Ardabil(13)
ملاثانی ۱(١٤)	0.52	0.56	0.32	0.60	0.51	0.30	0.37	0.40	0.48	0.62	0.34	0.37	0.57										Molasany1(14)
ملاثانی ۲(۱۵)	0.48	0.50	0.36	0.50	0.40	0.21	0.26	0.49	0.49	0.42	0.23	0.44	0.50	0.58									Molasany2(15)
بهبهان ۱(١٦)	0.51	0.39	0.33	0.53	0.33	0.21	0.43	0.37	0.64	0.40	0.35	0.48	0.64	0.59	0.33								Behbahan1(16)
نجف آباد(۱۷)	0.53	0.50	0.40	0.60	0.50	0.30	0.44	0.37	0.56	0.53	0.48	0.35	0.52	0.72	0.57	0.56							Najaf Abad(17)
ملاثانی ۳(۱۸)	0.53	0.59	0.21	0.50	0.58	0.30	0.23	0.44	0.34	0.43	0.26	0.44	0.50	0.56	0.49	0.40	0.69						Molasany3(18)
انگلستان۲(۱۹)	0.51	0.58	0.35	0.40	0.70	0.36	0.25	0.51	0.35	0.44	0.28	0.52	0.48	0.47	0.48	0.33	0.42	0.65					England2(19)
رامهرمز(۲۰)	0.60	0.51	0.39	0.51	0.56	0.35	0.37	0.42	0.67	0.50	0.40	0.63	0.57	0.46	0.43	0.47	0.38	0.45	0.56				Ramhormuz(20)
بهبهان ۲(۲۱)	0.58	0.54	0.47	0.50	0.50	0.38	0.35	0.56	0.64	0.60	0.37	0.51	0.67	0.53	0.59	0.56	0.63	0.56	0.55	0.64			Behbahan2(21)
شوش ۲(۲۲)	0.52	0.46	0.30	0.51	0.46	0.32	0.37	0.35	0.40	0.44	0.44	0.34	0.35	0.56	0.41	0.37	0.56	0.44	0.37	0.46	0.48		Shush2(22)
مجارستان(۲۳)	0.57	0.53	0.44	0.51	0.53	0.40	0.38	0.33	0.35	0.33	0.44	0.52	0.34	0.49	0.23	0.33	0.34	0.42	0.43	0.49	0.36	0.46	Hungary(23)



شکل۱- چند شکلی حاصل از تکثیر با نشانگر ISSR-11 در برخی اکوتیپ‌های خارمریم، M: سایز مارکر 100 bp.

Figure 1- Polymorphism of ISSR-4 in some of Milk Thistle ecotypes, M: size marker 100 bp.

برای طبقه‌بندی اکوتیپ ها از روش گروهبندی UPGMA و ماتریس تشابه جاکارد استفاده شد. ضریب کوفنتیک محاسبه شده برابر با ۰/۷٦ و بسیار معنی‌دار بود که تشابه قابل قبول بین ماتریس تشابه و دندروگرام رسم شده را نشان می‌دهد. در دندروگرام اکوتیپ‌ها در ٤ گروه (A، B، C و D) دسته بندی شدند که گروه A نیز خود شامل دو زیر گروه می‌باشد (شکل ۲). در این حالت واریانس بین گروه‌ها و واریانس داخل‌گروه‌ها به ترتیب برابر با ۲٦ و ۷٤ درصد و این نسبت از لحاظ آماری بسیار معنی‌دار بود. واریانس بین گروه‌ها برای سایر حالات گروهبندی از جمله ۵ گروه و ۳ گروه کمتر از ۲٦ درصد درصد بود. تقریبا همه اکوتیپ‌های قرار گرفته در گروه A مربوط به استان خوزستان بودند به جز اکوتیپ مربوط به اردبیل و نجف آباد اصفهان که در این گروه قرار گرفته بودند. در سایر گروه‌ها نیز اکوتیپ‌های مربوط به مناطق مختلف در کنار یکدیگر قرار گرفتند. در مجموع تطابق کاملی بین گروه‌بندی اکوتیپ‌ها توسط دندوگرام با مناطق جغرافیایی وجود نداشت. با این حال دو اکوتیپ متعلق به انگلستان در کنار یکدیگر در گروه دوم قرار گرفتند. در مطالعات Mohammadi *et al.* ، Hamid *et al.* (2011) (2011) و Hossini (2012) که به ترتیب از نشانگرهای RAPD، AFLP و SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارمریم جمع‌آوری شده از مناطق زیستی مختلف ایران استفاده نموده بودند نیز انطباق کاملی بین گروه‌بندی اکوتیپ‌های خارمریم توسط نشانگرهای مولکولی و منشاء جغرافیایی آنها مشاهده نشد. علت این امر می‌تواند به خاطر تنوع بالای این گیاه و یا جابجایی بذور بین مناطق مختلف باشد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود اکوتیپ‌های مربوط به استان خوزستان در تمام گروه‌ها موجود هستند. اکوتیپ‌های ملاثانی۱ و ۲ و ملاثانی۳ گرچه هر دو مربوط به یک منطقه می‌باشد اما در دو گروه مجزا دسته‌بندی شده‌اند. دو اکوتیپ مربوط به بهبهان نیز در دو زیرگروه متفاوت در گروه A قرار گرفته‌اند. این موارد نشان‌دهنده تنوع بالای خارمریم در استان خوزستان می‌باشد. اکوتیپ‌های انگلستان یک و دو و نیز رقم مجارستان در کنار اکوتیپ‌های ایرانی قرار گرفته‌اند (شکل ۲). بنابراین می‌توان ادعا نمود که این ارقام از اکوتیپ‌های ایرانی حاصل شده‌اند و در صورت اشتباه بودن این ادعا، این موضوع تاییدکننده دیگری مبنی بر تنوع بالای خارمریم در ایران است. در مطالعه Mohammadi *et al.* (2011) نیز دو رقم تجاری Budakalaszi و CN seeds در کنار اکوتیپ‌های ایرانی قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود (شکل ۳). این گروه‌بندی به جزء در مورد رقم مجارستان در تطابق با گروه‌بندی حاصل از دندوگرام بود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد.

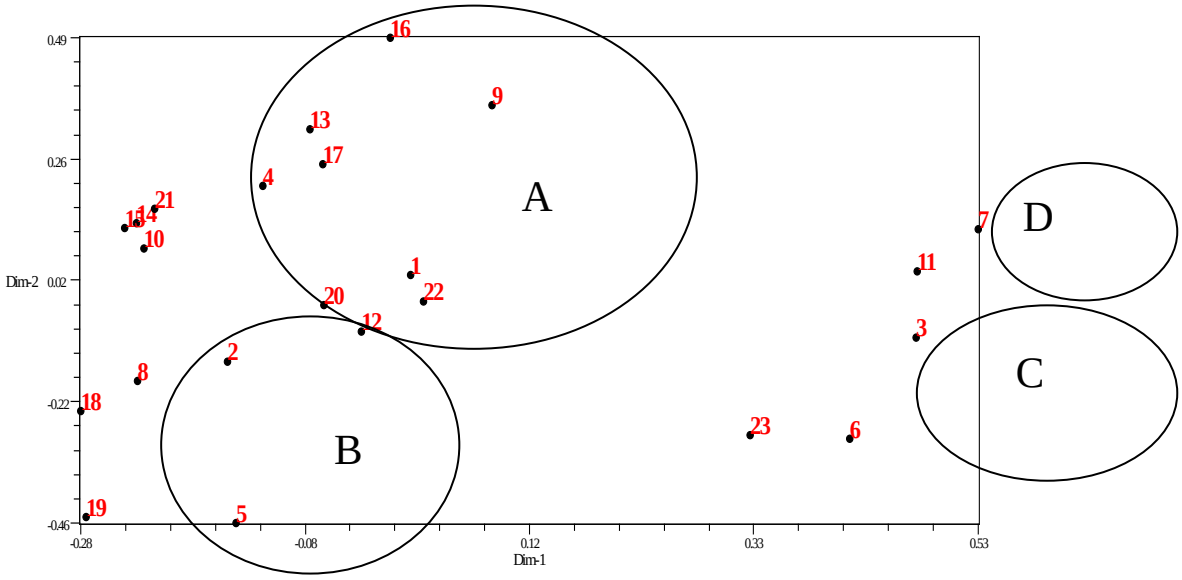
Figure 2- Dendrogram based on UPGMA cluster analysis using Jaccard similarity matrix.

جدول ٤- محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص اطلاعاتی شانون و شاخص تنوع ژنی نی برای هر آغازگر.

Table 4- Polymorphic information content (PIC), Shannon's information index and Nei's gene diversity of each primer.

شاخص تنوع ژنی نی Nei's gene diversity	شاخص اطلاعاتی شانون Shannon's information index	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC	آغازگر Marker
0.20	0.33	0.28	ISSR-1
0.43	0.62	0.40	ISSR-2
0.44	0.63	0.36	ISSR-3
0.41	0.59	0.49	ISSR-4
0.29	0.44	0.35	ISSR-5
0.45	0.64	0.39	ISSR-6
0.38	0.54	0.31	ISSR-7
0.32	0.50	0.30	ISSR-8
0.40	0.59	0.45	ISSR-9
0.33	0.49	0.38	Average میانگین

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۳- تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌های مختلف خارمریم (۱-شوش۱، ۲-شاهدیه، ۳-اهواز-هفتگل، ٤-P100، ٥-انگلستان۱، ٦-رستم‌آباد، ۷-شوشتر، ۸-منجیل، ۹-استاندارد، ۱۰-ندافیه، ۱۱-اندیمشک، ۱۲-هفت‌تپه، ۱۳-اردبیل، ١٤-ملاثانی۱، ۱۵-ملاثانی۲، ١٦-بهبهان۱، ۱۷-نجف‌آباد، ۱۸-ملاثانی۳، ۱۹-انگلستان۲، ۲۰-رامهرمز، ۲۱-بهبهان۲، ۲۲-شوش۲ و ۲۳-مجارستان).

Figure 3- Principal coordinates analysis of *S. marianum* ecotypes (1 - Shush 1, 2 - Shahdyh, 3 - Ahvaz - Haftgol, 4-P100, 5 - England 1, 6 - Rostam Abad, 7 - Shushtar, 8 - Manjil 9 - Standard, 10 - Ndafyh, 11 - Andimeshk, 12 - Haft hills, 13 - Ardabil, 14 - Molasany 1, 15 - Molasany 2, 16 - Behbahan 1, 17 - Najaf Abad, 18 - Molasany 3, 19 - England 2, 20 - Ramhormuz, 21 - Behbahan 2, 22 - Shush 2, 23 -Hungary).

در سایر مطالعات در رابطه با تنوع مولکولی خارمریم انطباق خوبی بین گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با دسته بندی حاصل از دندوگرام نیز مشاهده شده است (Mohammadi *et al.*, 2011). ارزیابی تنوع در ژرم‌پلاسم این گیاه گامی مهم در برنامه‌های بهنژادی و نیز مدیریت ژرم‌پلاسم به حساب می‌آید. اهداف اصلی بهنژادی خارمریم افزایش میزان سیلیمارین، افزایش عملکرد بذر، همزمانی در گلدهی و عدم ریزش می‌باشد (Alemardan *et al.*, 2013). با توجه به اینکه تعداد ارقام اصلاح شده این گیاه در دنیا انگشت شمار می‌باشند، دستیابی به این صفات از طریق اکوتیپ‌های وحشی این گیاه امری اجتناب ناپذیر است. نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی سریع ژرم‌پلاسم وحشی خارمریم به عنوان ابزار موثری در بهنژادی این گیاه به شمار می‌رود (Alemardan *et al.*, 2013). با توجه به تعداد زیاد اکوتیپ‌های وحشی و مشکل بودن ارزیابی مورفولوژیک در این گیاه استفاده از نشانگرهای مولکولی عملیات ارزیابی ژرم‌پلاسم را تسریع می‌نماید. شکرپور و همکاران (Shokrpour *et al*, 2008) گزارش نمودند که نشانگر AFLP قادر است ٤٠ درصد از تنوع موجود در ارتفاع ژنوتیپ‌های خارمریم پیش‌بینی نماید. نتایج این بررسی حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

زیستی مختلف کشور و همچنین بین اکوتیپ‌های مربوط به استان خوزستان بود. نتایج این پژوهش مبین وجود تنوع ژنتیکی مناسب در بین اکوتیپ‌های خارمریم مورد مطالعه جهت آغاز برنامه‌های بهنژادی است. همچنین با توجه به تنوع بالای این گیاه بررسی جامع‌تر اکوتیپ‌های مختلف این گیاه در سرتاسر ایران جهت جمع‌آوری و حفظ ژنوتیپ‌های متنوع ضروری است. همچنین چندشکلی قابل ملاحظه در الگوهای باندی به دست آمده در این مطالعه، بیانگر مناسب بودن تکنیک ISSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه خارمریم می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور به خاطر در اختیار قرار دادن بذور اکوتیپ‌های خارمریم تشکر می‌گردد.

منابع

Abdali Mashhadi AR, Fathi Gh (2002). Evaluation of different levels of plant density on *Silybum marianum* L. yield. Journal of Research and Development 15: 33-28.

Alemardan A, Karkanis a, Salehi R (2013). Breeding Objectives and Selection Criteria for Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] improvement. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41: 340-347.

Asghari-Zakaria R, Panahi AR, Sadeghizadeh M (2008). Comparative study of chromosome morphology in *Silybum marian*um. Cytolgia 73: 327-332.

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222–229.

Dellaporta S L, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant molecular biology reporter 1(4): 19-21.

Fazeli F, Cheghamirza K (2011). Evaluation of genetic diversity in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions using ISSR markers. Modern Genetic 2: 97-104 (In Farsi).

Francis CY, Yang RC, Boyle T, YE, ZH, Mao JX (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010). Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Australian Journal of Basic Applied Science 4: 5758–5760.

Hamid R (2011). Diversity evaluation of 10 ecotypes of *Silybum marianum* L. using morphological and molecular RAPD marker. MS.C Thesis. University of Shahid Chamran, Ahwaz, Iran (In Farsi).

Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E, ShamsArdakani M (2005). Analysis of flavonoliganans in dried fruits of *Siybum marianum* (L.) Geartn from Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 8: 1778-1782.

Hossini SA (2012). Genetic diversity assessment of *Silybum marianum* L. populations using ISSR marker. MS.C Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (In Farsi).

Jorabadi A, chogamirza F, Bahraminezha S (2012). Evaluation of medicinal plant genetic diversity of Milk Thistle using molecular markers. The 12th Iranian Genetics Congress.

Kurkin V (2003). Saint-Mary thistle: a source of medicinals (a review). Pharmaceutical Chemistry Journal 37: 189-202.

Mohammadi Farsani T, Etemadi N, Sayed-Tabatabaei BE, Talebi M (2012). Assessment of Genetic Diversity of Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Using ISSR Markers. International Journal of Molecular Sciences. 13: 383-392.

Mohammadi S.A, Shokrpure M, Moghaddam M and Javanshir A (2011). AFLP-based molecular characterization and population structure analysis of *Silybum marianum* L. Plant Genetic Resources 9: 445–453.

Murphy J, Caban M, Kemper K (2000). Milk thistle (*Silybum marianum*). The Longwood.

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

OmidBeigi R (1998). Silymarin and Silybin production from wild and cultivated Milkthistle seeds. Iranian journal of Agricultural Science 29: 420-413.

Peakall R and Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288–295.

Rainone, F (2005). Milk Thistle. American Family Physician 72: 1285–1288

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9-17.

Rohlf FJ (1992) NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Software, New York

Rold´an-Ruiz I, Calsyn E, Gilliland TJ, Coll R, van Eijk MJT, DeLoose M (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties AFLP characterization. Molecular Breeding 6: 593–602.

Rostami-Ahmadvandi H, Cheghamirza K, Kahrizi K, Bahraminejad S (2013). Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L. Accessions 7: 361-367.

Shannon CE, Weaver W (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Shokrpour M, Mohammadi SA, Moghaddam M, Ziai SA, Javanshir A (2008) Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 24: 278-292.

Varma P, Talwar S Gary G (1980). Chemical investigation of *Silybum marianum*. Planta Medica 38: 377-378.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Research 132: 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10: 1812–1817.

ZareKia S, OmidBeigi R (2006). Autecology of Milk Thistle (*Silybum marianum*) in Behdasht Region of Noor. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 22: 139-135.

Genetic diversity assessment of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using ISSR markers

Saghalli A.*[1], Mohammad Farkhari[2], Afshin Salavati[2], Khalil Alamisaeid[2], Alireza Abdali[2]

[1]Former graduate student of Biotechnology, University of Khuzestan Ramin Agriculture and Natural Resources
[2]Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources Ramin Khuzestan.

Abstract

Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) is one of the important ancient medicinal plants that have been used to treat liver disease, bile-related diseases and poisoned individuals by poisonous mushrooms. Assessment of genetic variation in Milk Thistle like the other important plants is a key component in breeding programs. The aim of this study was studying genetic variation of some Iranian Milk Thistle ecotypes using ISSR marker. A total of 41 repeatable polymorphic marker loci were produced by 9 ISSR primers. The average of polymorphism information content (PIC), Shannon's information index and Nei's gene diversity were 0.38, 0.49 and 0.33, respectively. Using cluster analysis by UPGMA algorithm and Jaccard similarity matrix, different ecotypes of Milk thistle grouped in 4 main clusters. We did not find an exact match between dendrogram grouping and geographical grouping of ecotypes. This could be due to the high diversity of this plant or relocation of ecotypes. The results indicate existence of a significant variation among Iranian Milk thistle ecotypes to start the breeding programs.

Keywords: *Marian thistle, Breeding, Khuzestan.*

* Corresponding Author: Saghalli A. Tel: 09114208056 Email: azizehsaghalli@yahoo.com