DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2015.12227

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۲۵۰-۲۴۱ (۱۳۹۳)

ساختار شناسی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گزنه دوپایه (*Urtica dioica*) استان مازندران با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

مصطفی حق‌پناه*[۱]، سیدکمال کاظمی‌تبار[۲]، سیدحمیدرضا هاشمی[۳]، سیدمحمد علوی[۳]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوزی و اصلاح‌نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پست الکترونیک: masoudhgh@gmalil.com

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوزی و اصلاح‌نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۱

چکیده

گزنه (*Urtica dioica*) گیاهی دوپایه بوده و از طریق جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شود و به‌طور گسترده در شمال ایران می‌روید. در این تحقیق با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری AFLP، تنوع و ساختار ژنتیکی ۵ جمعیت گزنه استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۷۹۸ باند امتیازدهی شد که ۷۲۲ باند چندشکل (۹۰/۵) بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، ۰/۲۳ و براساس ضریب تشابه جاکارد دامنه تغییرات تشابه ژنتیکی از ۰/۴۴ تا ۰/۱۴ متغیر بود. گروه‌بندی بر مبنای الگوریتم UPGMA ۵ جمعیت مورد بررسی را در چهار گروه مجزا قرار داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان دهنده بالا بودن واریانس درون جمعیت‌ها بود. تنوع گسترده مشاهده شده، شاخص Fst و نرخ بالای مهاجرت (Nm) همگی دلیل بر بسته نبودن جمعیت‌ها و ارتباط ژنتیکی میان آن‌ها می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه گزنه با تنوع بسیار وسیع، اقلیم مازندران را محلی مناسب برای سکونت یافته است.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی DNA، تشابه ژنتیکی، نشانگر مولکولی، گیاه دارویی.

مقدمه

گزنه دوپایه (*Urtica dioica*) یکی از گیاهان دارویی مهم با خواص دارویی متنوع (Taylor, 2009) بوده که به‌طور گسترده در شمال ایران می‌روید و دارای چندین زیرگونه شناخته شده است. این گیاه دوپایه عموما تتراپلوئید با دو فرم در تعداد کروموزوم‌های پایه X=۱۳ و X=۱۲ بوده که تنها زیرگونه دیپلوئید شناخته شده آن *U. dioica ssp galeopsifolia* با عدد کروموزومی ۲x=۲۶ می‌باشد (Stace, 2004). مقدار محتوای ژنومی (2C value) برای گیاه تتراپلوئید گزنه ۳/۱ پیکوگرم محاسبه گردیده است (Grime *et al*., 2007). گزنه دوپایه عموما دگرگشن بوده، هر چند که برخی از جمعیت‌های آن نیز از خودگشنی برخوردارند. گرده‌افشانی این گیاه از طریق باد صورت گرفته و روش تکثیر غیرجنسی این گیاه تکثیر از طریق ریزوم می‌باشد (Grime *et al*., 2007).

امروزه گیاهان دارویی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه یکی از منابع ملی با ارزش می‌باشند که حفاظت از ژرم پلاسم آنها دارای اهمیت است (Sarwat *et al*.,

2008). ارزیابی و محاسبه تنوع ژنتیکی اولین گام در مدیریت، بهره‌برداری و حفاظت از ژرم‌پلاسم این گیاهان می‌باشد. در گذشته روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی وابسته به نشانگرهای مورفولوژیک بود که بسیار تحت تأثیر محیط قرار گرفته و اطلاعات دقیقی حاصل نمی‌کردند. اما امروزه نشانگرهای مولکولی ابزارهایی دقیق و مفیدی در این راستا می‌باشند (Cao & Finkeldey, 2006). نشانگرهای مولکولی مختلفی در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاهان استفاده گردیده اما به‌دلیل عدم شناخت کافی از اطلاعات ژنوم گیاهان دارویی معمولا از نشانگرهای تصادفی نظیر ISSR، RAPD، SAMPL و AFLP (Sarwat *et al*, 2008) در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار شناسی جمعیت استفاده می‌شود. نشانگر AFLP با خصوصیاتی مانند دقت زیاد ، تکرارپذیری و قدرت تفکیک بسیار بالا در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی پرکاربرد می‌باشند. این نشانگر برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهان دارویی *Siraitia grosvenorii* (Tang *et al*., 2007)، *Jatropha curcas* (Tatikonda *et al*., 2009)، گونه‌های *Achillea* (Rahimmalek *et al*., 2009) و *Incarvillea younghusbandii* (Zhu *et al*., 2009) مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Tribulus terrestris* با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی نشان داد که نشانگر AFLP ابزاری مفید در بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه دارویی می باشد (Sarwat *et al*., 2008).

با توجه به خواص دارویی و تنوع سیتوژنتیکی گیاه گزنه شناخت ژرم‌پلاسم آن دارای اهمیت می‌باشد. تا کنون مطالعات انجام شده عموما بر خواص دارویی این گیاه متمرکز بوده و بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های گیاه گزنه دوپایه بسیار محدود می‌باشد (Bharmauria *et al*., 2009). در اولین مطالعه منتشر شد Bharmauria و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از ۸ آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی گزنه هیمالیا را بررسی و اعلام داشتند که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را مشاهده کردند. در همین رابطه Uzonur و همکاران (۲۰۱۳) نیز با روش‌های متفاوت مولکولی و مورفولوژیکی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گیاه گزنه کشور ترکیه را بررسی و عنوان داشتند که تنوع مشاهده شده بسیار گسترده است. به‌غیر از دو بررسی مذکور تحقیق‌های قابل دسترس و منتشر شده دیگری در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های گیاه گزنه موجود نمی‌باشد. در این تحقیق با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گزنه استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA: جمعیت‌های گیاه گزنه از ۵ منطقه واقع در استان مازندران جمع‌آوری گردید. تعداد نمونه در هر منطقه با توجه به‌وسعت و تراکم جمعیت به‌نحوی انتخاب شدند (۲۴ نمونه از ۵ منطقه) تا نماینده مناسبی از هر جمعیت باشد (جدول ۱). به‌منظور استخراج DNA گیاه گزنه از روش CTAB (Doyle & Doyle., 1987) با اندکی تغییرات استفاده شد. مقدار ۰/۰۵ گرم پودر برگ گیاه گزنه به‌همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج، (NaCl 2.5 M, Tris base 1M: pH 8, EDTA 0.5M: pH: 8, CTAB 3% (w/v), PVP 4% (w/v), β-Mercaptoethanol 2% (v/v)) در دمای ۶۵ درجه به‌مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به آن اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس فاز رویی محلول برداشته مقدار ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۱۰٪ (بسته به‌رنگ محلول) به‌همراه ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل به محلول اضافه کرده و به مانند قبل سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ فاز رویی برداشته و بار دیگر به‌مانند قبل با کلروفرم ایزوآمیل الکل شستشو گردید. برای تشکیل پلت DNA از ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد استفاده شد. کمیت و کیفیت سنجی DNA حاصله به دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز ۰/۷٪ انجام گرفت.

جدول ۱- نمونه‌های گزنه (*U. dioica*) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران

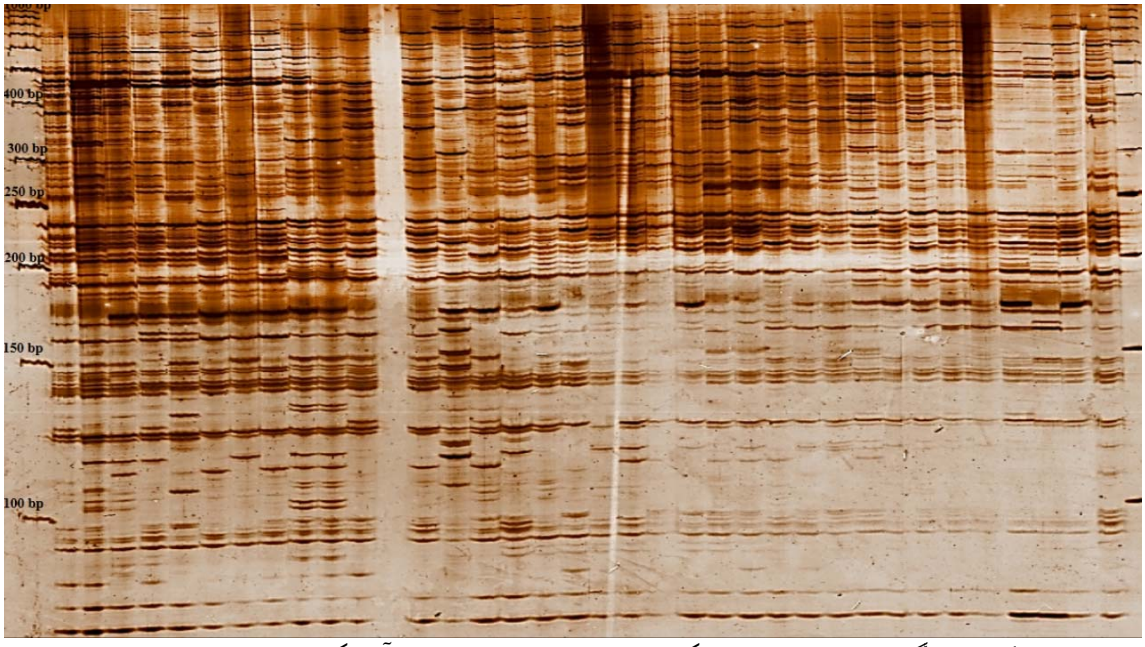
نام نمونه‌های هر جمعیت	نام جمعیت	محل جمع‌آوری
B1, B2, B3, B4, B5, B6	Pop1	بابلسر
R1, R2, R3, R4, R5, R6	Pop2	رامسر
N1, N2, N3, N4	Pop3	نور
A1, A2, A3, A4	Pop4	عباس‌آباد
S1, S2, S3, S4	Pop5	ساری

مراحل تکنیک AFLP: تکنیک انگشت‌نگاری AFLP براساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات انجام گرفت. بدین‌منظور ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی با ۵ واحد آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* مورد هضم قرار گرفته سپس آداپتورهای مرتبط با آنزیم‌های برشی به انتهای برش خورده ژنومی اتصال یافت. انگشت‌نگاری AFLP با استفاده از ۴۰ ترکیب آغازگری (۸ آغازگر *EcoRI* و ۵ آغازگر *MseI*) با سه نوکلئوتید اضافه در انتهای *3'* انجام شد و ۱۰ ترکیب آغازگری که مناسب‌ترین وضوح و چندشکلی را داشتند انتخاب شدند. قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ به‌مدت ۲ ساعت در بافر TBE 0.5 x الکتروفورز گردیده (شکل ۱) و رنگ‌آمیزی به‌روش نیترات نقره صورت گرفت (Sanguinetti *et al.*, 1994).

تجزیه آماری: براساس وجود و عدم وجود باند ماتریس صفر و یک توسط نرم‌افزارTotal Lab TL120 ver 2008 تهیه و از این ماتریس برای به‌دست آوردن ماتریس تشابه، رسم دندروگرام و آزمون مانتل با کمک نرم‌افزار NTSYS ver 2.02 (Rohlf, 1998) استفاده گردید. به‌منظور بدست آوردن مناسب-ترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی از آزمون مانتل با بهره‌گیری از سه ضریب تشابه جاکارد، دایس، اتصال ساده و سه الگوریتم خوشه‌بندی همبستگی ساده (single linkage)، همبستگی کامل (complete linkage) و اتصال متوسط (UPGMA) استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با ۹۹۹ نمونه برداری مجدد تصادفی، با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 و برای اطمینان از صحت خوشه‌بندی از تکنیک Bootstrapping با ۱۰۰۰۰ بار نمونه برداری مجدد تصادفی با بهره‌گیری از نرم‌افزار Winboot انجام شد (Yap & Nelson, 1996). برای محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از فرمول (Powell *et al.*, 1996) $PIC=\sum 2f(1-f)/n$ استفاده شد که در این رابطه f فراوانی نسبی باندهای مشاهده شده، 1-f فراوانی نسبی باندهای غایب و n تعداد لوکوس‌های می‌باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003) و شاخص تنوع Nei (۱۹۷۳) ، شاخص Shannon، تعداد کل باند، درصد چندشکلی و تعداد باندهای چندشکل توسط نرم‌افزار Popgen ver 32 (Yeh *et a*l., 1999) و شاخص نشانگر (MI) که نشان‌دهنده قدرت تفکیک یک نشانگر می‌باشد از حاصل ضرب درصد چندشکلی در محتوای اطلاعات چندشکلی نیز محاسبه گردید (Powell *et al.*, 1996). از نرم‌افزار Arlequin ver 3.5 برای بدست آوردن شاخص Fst (wright's F statistics) به‌منظور بررسی تنوع کل (fixation index) و Fst هر جمعیت (population specific indices Fst) استفاده (Excoffier *et al.*, 2005) و براساس Fst بدست آمده برای هر جمعیت، میزان جریان ژنی (Nm) طبق فرمول $Nm= (Fst\ x\ 4)^{-1}$ محاسبه گردید (Whitlock & McCauley, 1999). در رابطه مذکور N تعداد افراد در یک جمعیت و m سهم آن افراد از میزان مهاجرت است.

نتایج

مبنای پژوهش‌های مولکولی به‌دست آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب می‌باشد، لذا پس از استخراج DNA طبق مراحل ذکر شده کمیت و کیفیت DNA مورد بررسی قرار گرفتند. چالش اصلی در استخراج DNA گیاه گزنه رنگی شدن (زرد، سبز، قهوه‌ایی و...) پلت‌های DNA استخراجی می‌تواند به‌دلیل ازدیاد متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات رنگی بوده باشد که استفاده از ماده شیمیایی PVP (Bharmauria *et al.*, 2009) و CTAB ۱۰٪ این مشکل را رفع نمود.



شکل ۱- الگوی باندی جمعیت‌های گزنه مازندران حاصل از ترکیب آغازگری *M*-CAA/*E*-AAG

جدول ۲- شاخص‌ها و اطلاعات حاصل از باندهای ترکیب‌های آغازگری مورد مطالعه

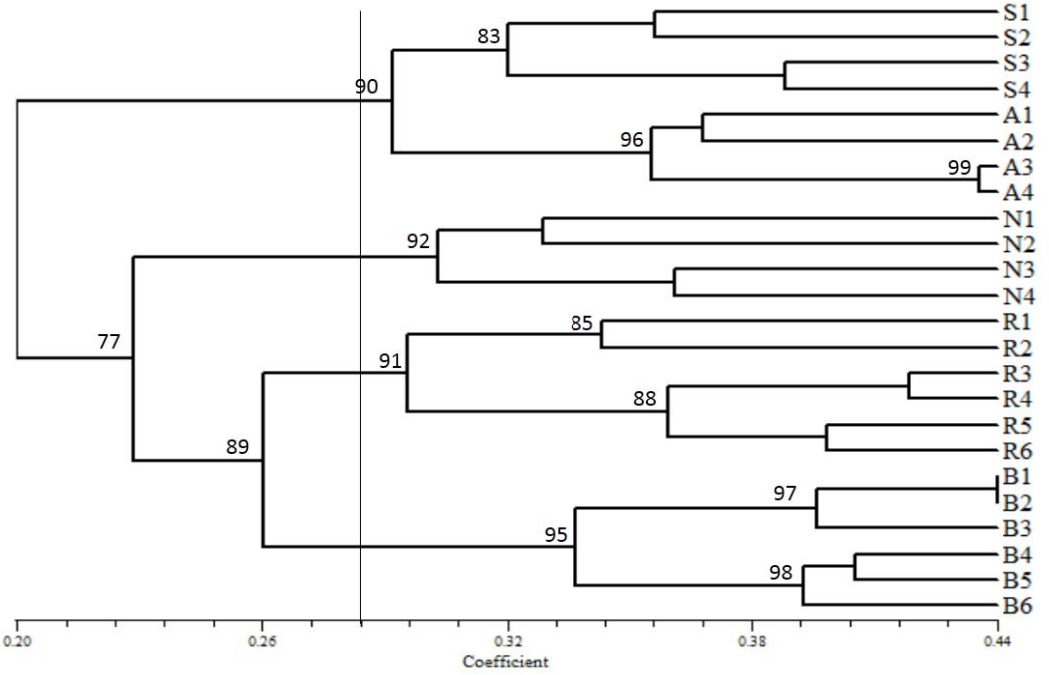
توالی آغازگر ***Mse*I**	توالی آغازگر ***Eco*RI**	تعداد کل باند	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکل **PIC**	شاخص نشانگر **MI**
M-CAA	*E*-ACC	۴۴	۳۹	۸۹	۰/۲	۱۷/۷۳
M-CAA	*E*-ACG	۶۹	۶۰	۸۷	۰/۲۴	۲۰/۷۸
M-CAA	*E*-AGG	۷۰	۶۴	۹۱	۰/۲۱	۱۹/۵۷
M-CAA	*E*-CGT	۷۰	۶۰	۸۶	۰/۲	۱۷/۱۴
M-CAA	*E*-TTG	۱۰۲	۹۶	۹۴	۰/۲۷	۲۵/۴۱
M-CAC	*E*-AAC	۱۰۲	۹۱	۸۹	۰/۳۱	۲۷/۶۶
M-CTT	*E*-AAG	۱۰۰	۸۹	۸۹	۰/۲۸	۲۴/۹۲
M-CTT	*E*-ACG	۱۰۰	۷۶	۹۴	۰/۲۳	۲۱/۵۸
M-CTT	*E*-AGG	۸۱	۶۱	۹۰	۰/۲۶	۲۳/۳۲
M-CTT	*E*-CGT	۶۸	۸۶	۹۳	۰/۲۶	۲۴/۳
میانگین		۷۹/۲	۷۲/۲	۹۰/۲۱	۰/۲۵	۲۲/۲۵

در مجموع ۷۹۸ باند امتیازدهی شده از ۱۰ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP در محدوده ۱۰۰ تا ۸۵۰ جفت باز، تعداد ۷۲۲ باند (۹۰/۵ درصد) چندشکل، میانگین باندهای امتیازدهی شده برای هر ترکیب آغازگری حدود ۷۹/۸ و میانگین باندهای چندشکل ۷۹/۲ باند محاسبه شد.

بیشترین تعداد باند متعلق به ترکیب آغازگرهای

(*E*-TTG/*M*-CAA و *E*-AAC/*M*-CAC) و کمترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگر *E*-ACC/*M*-CAA، بیشترین درصد چندشکلی متعلق به ترکیب آغازگرهای *E*-ACG/*M*-CTT و *E*-TTG/*M*-CAA با ۹۴٪ و کمترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگری *E*-CGT/*M*-CAA با ۸۶٪ باند چندشکل، متوسط مقدار PIC نشانگر AFLP در این بررسی ۰/۲۳، بیشترین مقدار PIC را ترکیب آغازگری *M*-CAA/*E*-AAG با ۰/۳۱ و کمترین میزان را ترکیب آغازگری *E*-ACC/*M*-CAA با ۰/۲ محاسبه شد و میانگین شاخص نشانگر ۲۲/۲۵، بیشترین و کمترین میزان آن به‌ترتیب به ترکیب آغازگرهای *M*-CAA/*E*-AAG (شکل ۱) با ۲۷/۶۶ و *M*-CAA/*E*-CGT با ۱۷/۱۴ بود (جدول ۲).

مقدار بالای شاخص نشانگر AFLP در این بررسی به‌دلیل تعداد زیاد باندهای چندشکل می‌باشد نه مقدار PIC این نشانگر، Maras و همکاران (۲۰۰۸) نیز به چنین نتیجه‌گیری در تحقیق خود رسیدند.



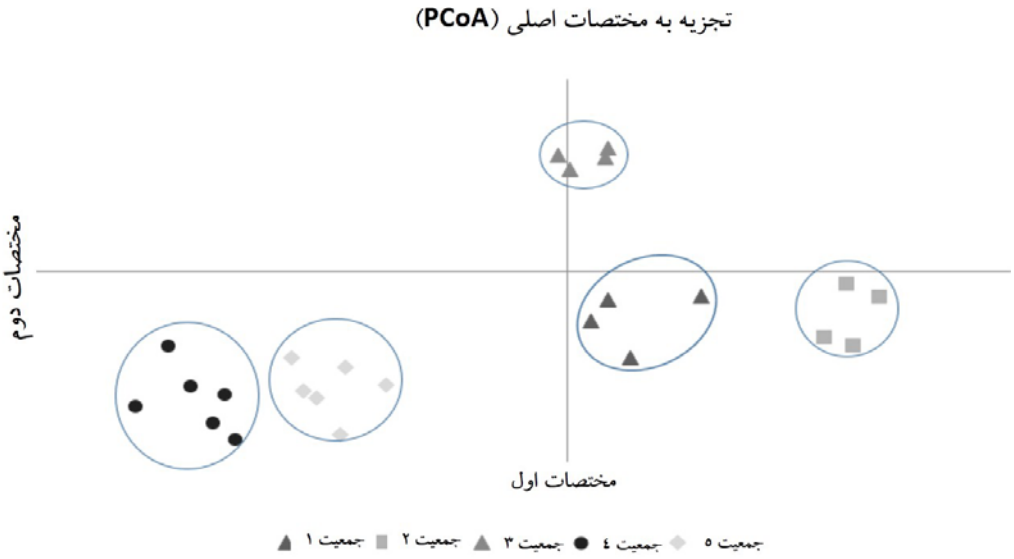
شکل ۲- دندروگرام ۲۴ ژنوتیپ گزنه استان مازندران با بهره‌گیری از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

آزمون مانتل یک روش آماری جهت تعیین همبستگی بین دو ماتریس (با ابعاد یکسان) بوده و هرچه ضریب حاصل این آزمون به یک نزدیک‌تر شود همبستگی دو ماتریس بیشتر است (Mantel, 1967). براساس داده‌های حاصل از آزمون مانتل ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم خوشه بندی UPGMA با همبستگی بسیار بالا (۰/۹۴) به‌عنوان مناسب‌ترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی برای رسم دندروگرام انتخاب شدند (جدول آورده نشده است). مقدار بالای این عدد نشان می‌دهد که الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب تشابه مذکور یکدیگر را به‌خوبی توجیه می‌کنند (Mohammadi & Prasanna, 2003).

بر مبنای ضریب تشابه جاکارد بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۴۴) بین جفت نمونه‌های B1 و B2 متعلق به جمعیت بابلسر و کمترین تشابه (۰/۱۴) بین جفت نمونه‌های B6 و S1 متعلق به جمعیت‌های ساری و بابلسر به‌دست آمد (جدول ارائه نشده است). نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA حاکی از وجود چهار گروه اصلی با ضریب تشابه ۰/۲۸ که گروه اول شامل

نمونه‌های جمعیت‌های عباس‌آباد و ساری است. گروه دوم نمونه‌های جمعیت نور، گروه سوم نمونه‌های جمعیت رامسر و گروه چهارم نمونه‌های جمعیت بابلسر را شامل شدند. مقادیر بالای Bootstrapping (۷۷ تا ۹۹) دلیلی بر صحت دندروگرام (شکل ۲) و محل قرار گرفتن افراد درون خوشه می‌باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003).

نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که سه مختصات اول روی هم ۶۵/۶۳٪ و سهم هر یک به‌ترتیب ۳۰/۷۳، ۲۹/۹۸ و ۱۳/۹۳ درصد می‌باشد (جدول ارائه نشده است). از نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت نشانگر AFLP در طول ژنوم یکنواخت توزیع نشده و تمامی ژنوم را پوشش ندادند (Mohammadi & Prasanna, 2003). در این خصوص Chalmers و همکاران (۲۰۰۱) اعلام داشتند توزیع نشانگرهای SSR و RFLP در طول ژنوم یکنواخت تر از نشانگر AFLP بوده و تمایل این نشانگر بیشتر به نواحی تلومری می‌باشد. دلیل توزیع غیر یکنواخت نشانگر AFLP به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی مانند موتاسیون، حذف و اضافه شدن قطعات نسبت داده می‌شود (Grime, 2007). نمودار دو بعدی حاصل از این تجزیه بیانگر فاصله نزدیک‌تر جمعیت‌های عباس‌آباد و ساری و در کل گروه‌بندی انجام شده را توجیه می کند (شکل ۳). این مختصات با این حال که با استفاده از ۵۱/۷۰ درصد واریانس حاصله رسم شد ولی گویای تمایز قابل ملاحظه جمعیت‌ها می‌باشد، به‌طوری که هیچ یک از اکوتیپ‌های جمعیت‌های مختلف در هم ادغام نشده بودند. این تمایز قابل ملاحظه می‌تواند مرتبط به دلایلی نظیر قدرت تفکیک بالای نشانگر AFLP و وجود چند زیرگونه در گونه *U. dioica* باشد (Weigend, 2005).



شکل ۳- نمودار دو بعدی مختصات اصلی (PCoA) جمعیت‌های مورد مطالعه

بحث

با توجه به تمایز جمعیت‌ها در تجزیه‌های قبلی برای روشن‌تر شدن ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌ها به بررسی تنوع و ساختار جمعیت‌های مورد مطالعه پرداخته شد. شاخص های تنوع جمعیتی Shannon و Nei (۱۹۷۳) با استفاده از نرم‌افزار Popgen ver 32 محاسبه شد (جدول ۳) و مقدار کل این شاخص‌ها به‌ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۲۷ به‌دست آمد. این در حالی است که حداکثر این شاخص‌ها درون جمعیت‌ها مربوط به جمعیت نور (۰/۲۱ و۰/۳۳) و حداقل آن‌ها متعلق به جمعیت رامسر (۰/۱۵ و ۰/۲۳) بوده است. نتایج این تجزیه حاکی از تنوع گسترده درون جمعیت‌های گیاه گزنه در استان مازندران می‌باشد.

جدول ۳- شاخص‌های تنوع و میزان چندشکلی برای هر جمعیت

جمعیت	درصد چندشکلی	تعداد مکان‌های چندشکل	شاخص تنوع Nei	شاخص تنوع Shannon
بابلسر	۶۳/۱۱	۴۶۲	۰/۳۰	۰/۱۹
رامسر	۶۸/۸۶	۵۰۴	۰/۲۳	۰/۱۵
نور	۴۶/۳۱	۳۳۹	۰/۳۳	۰/۲۱
عباس‌آباد	۵۱/۰۹	۳۷۴	۰/۲۷	۰/۱۸
ساری	۵۳/۵۵	۳۹۲	۰/۲۸	۰/۱۸
کل	۹۰/۲۱	۷۲۲	۰/۴۳	۰/۲۷

به‌منظور بررسی ساختار جمعیت‌های گزنه استان مازندران، شاخص Fst (Fixation Index Fst) محاسبه گردید (Palsboll *et al.*, 2006). میزان Fst کل ۰/۳۱۶ محاسبه گشت، بیشترین میزان Fst درون جمعیت‌ها (۰/۲۷) مربوط به جمعیت نور و کمترین (۰/۱۵) آن مربوط به جمعیت عباس‌آباد بود (جدول ۴). مطالعات Mutikainen و Koskela (۲۰۰۰) نشان داد که مقادیر بالای هتروزیگوسیتی گیاه گزنه که باعث افزایش Fst می‌شود به‌دلیل نحوه تولید مثل جنسی این گیاه است، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نتایج حاصل حاکی از تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه درون و بین جمعیت‌ها می‌باشد که این امر با توجه به‌نحوه تولید مثل این گیاه (دگرگشنی) قابل پیش‌بینی بوده و همچنین نرخ نسبتا بالای مهاجرت (Nm) نیز نشان می‌دهد که این گیاه علاوه بر تکثیر غیرجنسی (تکثیر ریزوم) از طریق جنسی نیز به‌طور گسترده تکثیر می‌شود و در واقع جوامع مورد بررسی دارای ساختاری هتروزیگوت و هتروژن می‌باشند. برای اطمینان از تنوع درون جمعیت‌ها تجزیه واریانس مولکولی انجام شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که در مجموع سهم تنوع درون جمعیت ها از تنوع بین جمعیت‌ها بیشتر بوده به‌طوری که ۸۰٪ واریانس کل (جدول ۵) متعلق به‌تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد. اگرچه گیاه گزنه دگرگشن بوده و با کمک باد تکثیر می‌شود ولی به‌دلیل داشتن بذر درشت نسبت به سایر گیاهان خودرو (Mutikainen & Koskela, 2000) نمی‌تواند مسافت زیادی را طی کند. تکثیر گسترده غیر جنسی در محل به‌وسیله ریزوم و درشتی بذر می‌تواند از دلایل توجیح سطح بالای تمایز بین جمعیت‌ها و تنوع درون آن‌ها باشد. بخصوص در جمعیت نور که از سایر جمعیت‌ها از لحاظ جغرافیایی دور بوده و دارای نرخ مهاجرت کمتری می‌باشد این امر قابل مشاهده است. میزان بالای Nm و واریانس درون جمعیت‌ها بیانگر این واقعیت است که جریان ژنی باعث اضافه شدن ژن‌ها از جمعیتی به جمعیت دیگر گشته Alfonso-Corado و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسی خود به چنین نتیجه‌ایی رسیده بودند.

جدول ۴- میزان شاخص‌های Fst و ،Nm کل و جمعیت‌ها

جمعیت	کل	ساری	عباس‌آباد	نور	رامسر	بابلسر
Fst	۰/۳۱۶	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۲۷	۰/۲۴	۰/۲۳
Nm	۱/۰۸۱	۱/۳۷۱	۱/۶۲۶	۰/۹۳۸	۱/۰۳۱	۱/۰۸۷

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی AMOVA

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۴	۹۵۶/۲۹۲	۲۳۹/۰۷۳	۲۷/۰۲۴	٪۲۰
داخل جمعیت‌ها	۱۹	۲۱۰۳/۵	۱۱۰/۷۱۱	۱۱۰/۷۱۱	٪۸۰
کل	۲۳	۳۰۵۹/۷۹۲		۱۳۷/۷۳۴	٪۱۰۰

شناخت تنوع ژنتیکی و ساختار جوامع گیاهی کمک بسیار مهمی در حفاظت منابع ژنتیکی و بهره‌برداری صحیح از گیاهان دارویی می‌باشد (Shafie *et al,* 2009). نشانگر AFLP با تکرارپذیری بالا از قدرت تفکیک بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی جمعیت‌های درون گونه (Rawashdeh *et a*l, 2009) گیاه گزنه دوپایه (*U. dioica*) برخوردار بوده و شاخص‌های بدست آمده نشان می‌دهد که شباهت‌ها و تفاوت‌های مولکولی مشاهده شده با فاصله جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ها ارتباط تنگاتنگ داشته ولی ارتفاع از سطح دریا (جدول آورده نشده است) برروی تنوع این گیاه تاثیری ندارد. با در نظر گرفتن مسافت جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها و محدودیت در تولید مثل جنسی گیاه (طی کردن مسافت‌های زیاد) می‌توان انتظار داشت که جمعیت‌های دور از هم رابطه ژنتیکی کمتری با هم داشته باشند. در مجموع این تحقیق نشان می‌دهد که گیاه گزنه با تنوع بسیار وسیع، اقلیم مازندران را محلی مناسب برای سکونت یافته و می‌توان با مطالعات گسترده و هدف‌دار، از این ژرم‌پلاسم متنوع و پرکاربرد بهره‌برداری کرد و این بررسی نیز می‌تواند مقدمه‌ایی برای رسیدن به این اهداف باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی حمایت‌های مالی و معنوی ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان جناب آقای دکتر قربانعلی نعمت‌زاده قدردانی بعمل آمده و از جناب آقای دکتر علی پاکدین پالیزی به‌دلیل راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

– Alfonso-Corado, C., Esteban-Jimenez, R., Clark-Tapia, R., Pinero, D., Campos, J., and Mendosa, A., 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (*Fagaceae*). Evolutionary Ecology, 18:585-599.
– Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., and Sharma, Sh., 2009. Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Research, 3(3):166-170.
– Cao, C.P., and Finkeldey, R., 2006. Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula Miq* and *Shorea parvifolia Dyer* (*Dipterocarpaceae*) in Indonesia detected by AFLPs. Tree Genetics and Genomes, 2:225–39.
– Chalmers, K.J., Canobell, W., Kretschmer, J., Karakousis, A., Enschke, P. H., Pierns, S., Harker, M., Pallota, G. B., Cornish, M. R., Shariflou, L., R.ampling, A., Mclauchlan, G., Daggard, P. J., Sharp, T. A., Holton, M., Sutherland, W., Apples, R., and Landrige, P., 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. Australian Journal Agriculture Research, 52:1089-1119.
– Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Algal Physiology and Biochemistry, 19:11–15.
– Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47–50.
– Grime, J. P., Hodgson, J. G., and Hunt, R., 2007. Comparative Plant Ecology: A Functional Approach to Common British Species. Unwin hyman Ltd, london, 742p.
– Uzonur, I., Akdeniz, G., Katmer, Z., and Ersoy, S. K., 2013. RAPD-PCR and real-time PCR HRM based genetic variation evaluations of *Urtica dioica* parts, ecotypes and evaluations of morphotypes in Turkey. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines, 10(2):232-245.
– Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27:209-220.
– Maras, M., Sustar-Vozilc, J., Javornik, B., and Meglic, V., 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Acta agriculturae slovenica, 91: 87-96.
– Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
– Mutikainen, P., and Koskela, T., 2000. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. Heredity, 89: 38-24.
– Nei, M., 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 3321-3323.
– Palsboll, P. J., Berube, M., and Allendorf, F. W., 2006. Identification of management units using

– Tang, S. Q., Bin, X. Y., Peng, Y. T., Zhou, J. Y., Wang, L., and Zhong, Y., 2007. Assessment of genetic diversity in cultivars and wild accessions of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*), a species with edible and medicinal sweet fruits endemic to southern China, using RAPD and AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:1053-1061.

– Tatikonda, L., Wani. S. P., Kannan, S., Beerelli, N., Sreedevi. T. K., Hoisington, D. A., Devi, P., and Varshney. R. K., 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. Plant Science, 176:505-513.

– Taylor, K., 2009. Biological Flora of the British Isles*: Urtica dioica L*. Journal of Ecology, 97:1436–1458.

– Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23:4407-4414.

– Weigend, M., 2005. Die Erben Pokornys – Ein Beitrag zur Abgrenzung der enigmatischen Sippen *Urtica galeopsifolia* und *Urtica pubescens* in Mittel- und Osteuropa. Hoppea, 66:101–117.

– Whitlock, M. C., and McCauley, D. E., 1999. Indirect measures of gene flow and migration: FST 1/ (4Nm + 1). Heredity, 82:117–125.

– Yap, I. V., and Nelson, R. J., 1996. Winboot, a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogram. International Rice Research Institute, Philippines, 32p.

– Yeh, F. C., Yang, R. C., and Boyle, T., 1999. POPGENE Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, 29p.

– Zhu, Y., Geng. Y, Tersing. T., Liu, N., Wang, Q., and Zhong, Y., 2009. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 37:589-596.

population genetic data. Trends Ecological. Evolutionar, 22:11–16.

– Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattlite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2:225-238.

– Rahimmalek, M., Sayed Tabatabaei, B. E., Arzani, A., and Etemadi, N., 2009. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Biochemical Systematics and Ecology, 37:354–361.

– Rawashdeh, I. M., Ghzawi, A. L., Rawashdeh, N. Q., Khairallh, K., Al Tawaha A. R., and. Salama, B., 2009. Genetic variation among Sumac (*Rhus Coriaria* L.) samples collected from three locations in Jordan as revealed by AFLP markers. Advance Environ Biology, 3:107–112.

– Rohlf, F. J., 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Stony book, New York, 31p.

– Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E., and Simpson, A. J. G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, 17: 915-919.

– Sarwat, M., Das, S., and Srivastava, P. S., 2008. Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. Plant Cell Report, 27: 519–528.

– Shafie, M. S. B., Hasan, S. M. Z., and Shah, R. M., 2009. Study of genetic variability of wormwood capillary (*Artemisia capillaries*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia. Plant Omics Journal, 2:127–134.

– Shannon, C .E., and Weaver, W., 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana.

– Stace, C. A., 2004. Interactive Flora of the British Isles (DVD-ROM). ETI Information Services Ltd. University of Amsterdam. Amsterdam, the Netherlands.

Evaluation of Mazandaran nettle (*Urtica Dioica*) population structure and genetic diversity by AFLP markers.

M. Haghpanah*[1], S.K. Kazemitabar[2], S.H.R. Hashemi[3] and S.M. Alavi[3]

1*-Corresponding author, M.Sc., Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Email: masoudhgh@gmail.com.
2- Assoc. Prof., Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
3- Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 02.08.2014 Accepted: 22.12.2014

Abstract

Stinging Nettle (*Urtica dioica*) is an important medicinal dioecious plant that is widely distributed around the north of Iran. Reproduction of the species is sexual and asexual. In this study, ten AFLP primer combinations were used to evaluate genetic diversity and population structure of five nettle populations collected from Mazandaran province. From 798 bands, 722 bands (90.5%) were polymorphic. Average polymorphic information content (PIC), 0.23, genetic similarity range based on Jaccard's similarity coefficient were between 0.44 to 0.14. Clustering based on UPGMA separated the studied populations into four groups. Analysis of molecular variance indicated high variance within the populations. Wide variation, high rates of Fst and number of migration (Nm) suggested that populations are not isolated implying gene flow between the populations. The results showed that Nettle plant with wide diversity selected the Caspian region as suitable place to reside.

Keywords: DNA polymorphism, genetic similarity, molecular marker, medicinal plant.