

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین بیان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

قاسم اقلیما^۱، عزیزاله خیری^{۲*}، محسن ثانی‌خانی^۲، جواد هادیان^۳ و میترا اعلانی^۲

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

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

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

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

چکیده

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

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، شیرین بیان، نشانگر ISSR

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

مقدمه

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

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

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

همچنین ماتریس فاصله براساس تحلیل نی انجام شد (Nei, 1973). در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون برای هر یک از جمعیت‌ها با نرم‌افزار GenAlex نسخه 6.3 محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی^۴ و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با نرم‌افزار GenAlex نسخه 6.3 انجام شد.

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

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

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

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

نتایج و بحث

محاسبه شاخص‌های مولکولی: تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین بیان با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۲ پرایمر ISSR، تعداد ۱۳۰ نوار حاصل گردید که ۱۰۵ نوار (۸۰/۴۷ درصد) چندشکل بودند. دامنه نوارهای چندشکل بین هفت (۸۴۹، UBC4، IS4 و IS6) تا ۱۱ (IS21) با میانگین ۸۷۵ نوار چندشکل متغیر بود. درصد نوارهای چندشکل نیز بین ۷۰ (IS4) تا ۹۰ درصد (IS23) به دست آمد (جدول ۲). میزان EMR برابر با ۷/۰۸ و میانگین هتروزیگوسیتی برای باندهای پلی مورف (-Hav_p) ۰/۳۴۷ به دست آمد. شاخص نشانگری (MI) یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد. شاخص نشانگر (MI) برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکلی به دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود (Milbourne et al., 1997). زیاد بودن شاخص نشانگر، بیان کننده فراهم کردن اطلاعات بیشتر، از ژنوم باتوجه به تولید تعداد بیشتر نوار چندشکلی است. شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (Rp) محاسبه شد تا توانایی نشانگرهای ISSR را در تمایز جمعیت‌های شیرین بیان نشان دهد. میانگین شاخص نشانگر در جمعیت‌های مورد مطالعه ۲/۴۷ به دست آمد که بیشترین آن (۳/۲۴) در آغازگر IS21 و کمترین آن (۱/۷۵) در آغازگر IS4 مشاهده شد. قدرت تفکیک بین ۳/۲۷ برای IS4 تا ۵/۶۹ برای IS21 و میانگین قدرت تفکیک تمام آغازگرها ۴/۵۴ به دست آمد. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. قدرت تفکیک، شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد (Kayis et al., 2010). برای هر آغازگر میانگین نسبت جمعیت-های دارای نوار آگاهی بخش (mp) و میانگین باند آگاهی دهنده (mI_b) نیز در جدول ۲ آورده شده است. شاخص محتوای چندشکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها است. مقادیر زیاد این شاخص، دلیل بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد (Thimmappaiah et al., 2009). مقادیر اطلاعات چندشکلی از صفر تا یک متغیر هستند و هرچه اعداد

به دست آمده بزرگ‌تر باشند، بیان‌کننده فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نمونه‌های بررسی شده است (Wei et al., 2005). محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در آغازگرهای ISSR بین ۰/۲۸۱ (IS5) تا ۰/۳۷۶ (IS15) و با میانگین ۰/۳۷ متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به‌شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه آغازگری دارد که در قدرت و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین، آغازگرهای با محتوای اطلاعات چندشکلی بالا (PIC) برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Esmaeili et al., 2020). آغازگرهای که PIC بزرگتر از ۰/۵ داشته باشند، دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند. آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند و آنها که کمتر از ۰/۲۵ باشد، حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2012). براساس شاخص‌های محتوای کلی اطلاعات چندشکلی (PIC) مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های شیرین بیان، آغازگرهای IS15، IS7، IS23، IS11 و IS8 تعیین شد و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما دیگر جمعیت‌های این گونه در تحقیقات بعدی استفاده شوند. در بررسی روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعنای با استفاده از آغازگر ISSR براساس محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرهای برتر برای آنالیز ژرم پلاسما نعنای معرفی شد (Zinodini et al., 2013).

محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ضریب تشابه جاکارد در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج ضریب کوفتیک برای ضرایب و روش‌های گروه‌بندی مختلف، ضریب جاکارد و روش UPGMA دارای بالاترین ضریب کوفتیک بود و بر این اساس افراد گروه‌بندی شدند. در این کلاستر، ۶۶ ژنوتیپ شیرین بیان بر اساس ضریب تشابه ۰/۵۹ به سه گروه تقسیم شدند. یک فرد از جمعیت سلطانیه (۲۱) در یک گروه کاملاً مجزا قرار گرفت. در تقسیم بندی زیر گروه‌ها نیز، یک فرد از جمعیت ربط (۱) در گروه جداگانه قرار گرفت. در این تقسیم بندی، اکثر افراد مربوط به هر منطقه در گروه‌های مجزا قرار گرفتند.

جدول ۲- آغازگرها و جزئیات مربوط به الگوهای باندهای به دست آمده از آنالیز ISSR

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

شاخص نشانگر	نسبت چند گانه مؤثر	میانگین محتوی چندشکلی	میانگین باندهای آگاهی دهنده	قدرت تفکیک	نسبت جمعیت‌های دارای باند آگاهی بخش	درصد چندشکلی	تعداد قطعات چندشکلی	تعداد قطعات تکثیر شده	آغازگر
Marker index	effective multiplex ratio	Main of polymorphic information content	Main values of band informativeness	Resolving power	Main values of proportion of accessions containing band	% of polymorphism	No. of polymorphic fragments	No. of amplified fragments	Primer
IS4	5.443	0.322	0.467	3.272	0.367	77.77	7	9	IS4
IS5	6.400	0.281	0.416	3.333	0.351	80.00	8	10	IS5
IS6	4.900	0.338	0.515	3.606	0.488	70.00	7	10	IS6
IS7	7.29	0.375	0.599	5.393	0.470	81.80	9	11	IS7
IS8	5.81	0.362	0.579	4.636	0.477	72.70	8	11	IS8
IS9	8.33	0.356	0.518	5.181	0.396	83.30	10	12	IS9
IS11	7.36	0.362	0.552	4.969	0.499	81.80	9	11	IS11
IS13	8.33	0.334	0.478	4.787	0.410	83.30	10	12	IS13
IS15	8.33	0.376	0.566	5.666	0.189	83.30	10	12	IS15
IS21	9.307	0.348	0.517	5.696	0.495	84.61	11	13	IS21
IS23	8.100	0.371	0.501	4.515	0.315	90.00	9	10	IS23
UBC349	5.443	0.334	0.489	3.424	0.458	77.77	7	9	UBC349
Total							105	130	
Average	7.088	0.347*	0.516	4.540		80.47	8.75 ^{EMR}	10.38 ^{MR}	

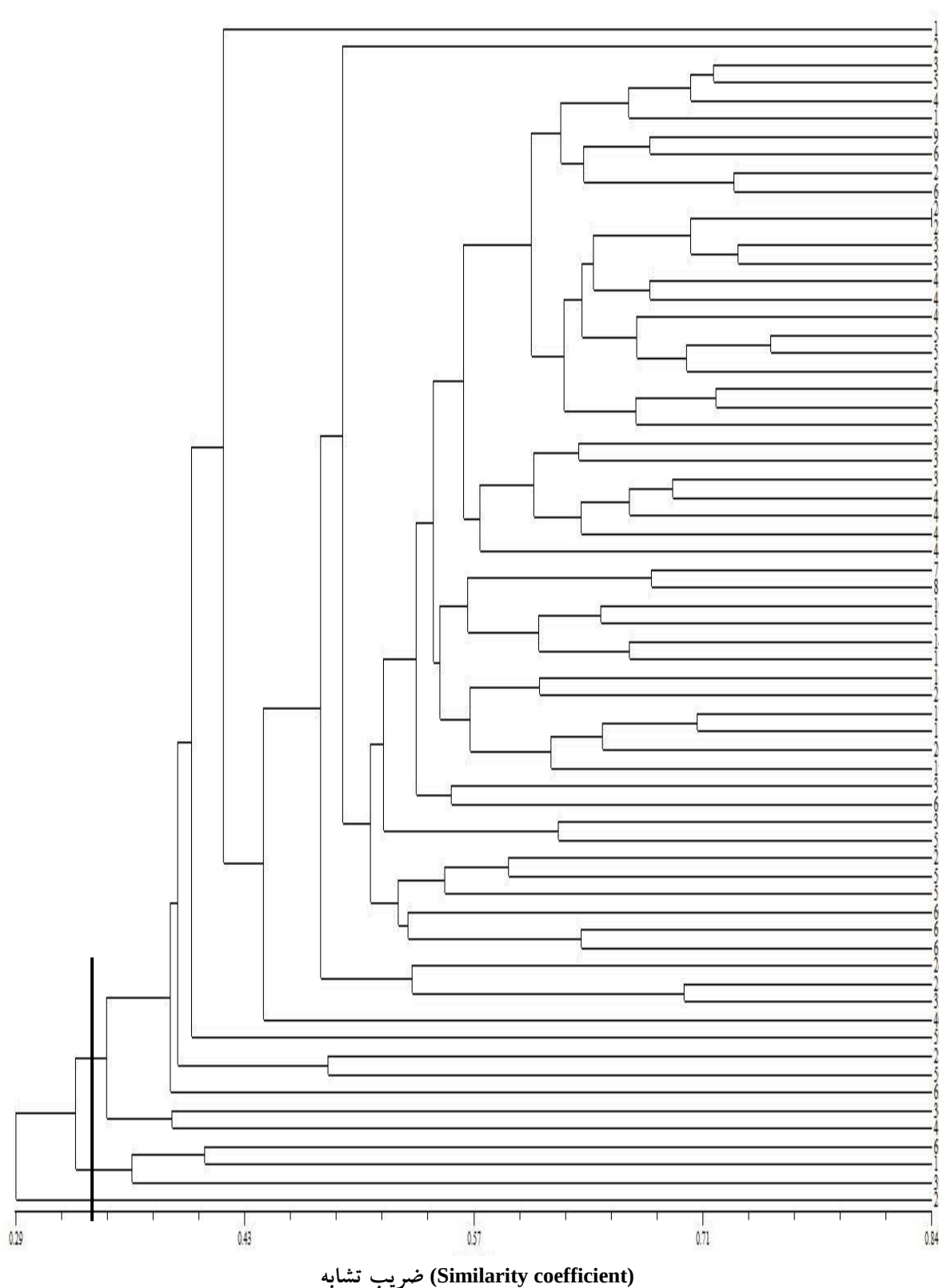
*: میانگین هتروزیگوسیتی برای باندهای پلی مورف

*: Average heterozygosity for polymorphic bands

شباهت ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی اثر بگذارد (Van valen, 1995). بر اثر انتخاب طبیعی جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک مشابه، ولی در نقاط مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند، در مقایسه با جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک متفاوت رشد می‌کنند شباهت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (Volis *et al.*, 2001).

محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت: در بین جمعیت‌های وحشی شیرین بیان، میزان مکان‌های ژنی چندشکل (NPL) دامنه‌ی بین ۳۷ تا ۶۹ و با میانگین ۴۹/۱۳ مکان ژنی پلی مورف و درصد مکان‌های ژنی پلی مورف (PL%) بین ۳۵/۲۴ تا ۶۵/۷۱ و با میانگین ۴۶/۸۰ درصد مشاهده شد. در مطالعه‌ای جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ توده‌ی زیره سبز از ۳۸ آغازگر ISSR استفاده شد که در این میان ۱۲ آغازگر تولید قطعات چندشکل نمودند (Ma *yanming et al.*, 2008). میزان تعداد آل‌های مشاهده شده (Na) در هر مکان ژنی بین ۱/۳۵ تا ۱/۶۰ و با میانگین ۱/۴۶ بود. تعداد آل‌های مؤثر (Ne) در هر مکان ژنی بین ۱/۲۴ تا ۱/۴۸ و میانگین ۱/۳۴ محاسبه گردید. از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آل‌های مؤثر است (Gheitarani *et al.*, 2020)، می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین بیان استفاده کرد.

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



شکل ۱- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۶۶ فرد شیرین‌بیان با استفاده از داده‌های ISSR

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

با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هر یک از جمعیت‌ها از طریق محاسبه نسبت تعداد آل‌های مؤثر به تعداد آل‌های مشاهده شده (Ne/Na) تعیین گردید که این نسبت از دامنه ۰/۸۰۵ تا ۰/۹۳۴ و با میانگین ۰/۹۱۳ متغیر بود. هرچه این نسبت به یک نزدیک‌تر باشد نشان‌دهنده یکنواختی گونه مورد نظر است (Zinodini et al., 2013). شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها بین ۰/۲۰۷ تا ۰/۳۹۳ و میانگین ۰/۲۸۷ و شاخص تنوع ژنی نی (h) بین ۰/۱۴۰ تا ۰/۲۷۰ و با میانگین ۰/۱۹۱ بود، که در کل جمعیت داراب کمترین تنوع ژنتیکی و سلطانیه بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. در کل جمعیت‌ها (سطح گونه-ای)، میزان تعداد آل‌های مشاهده شده ۱/۹۹، تعداد آل‌های مؤثر در هر مکان ژنی ۱/۶۰، شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۵۱۷ و شاخص تنوع ژنی نی ۰/۳۴۷ به‌دست آمد (جدول ۳). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به‌دلیل تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها پیچیدگی‌هایی دارد. این پژوهش‌ها به تعداد افراد بررسی شده در هر جمعیت، تعداد مکان‌های آلی در هر جمعیت، موقعیت آلی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازه جمعیت بستگی دارد (Latifi et al., 2018).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که در آن تغییرات مشاهده شده داخل و بین اجرا توده با استفاده از فاصله‌های ژنتیکی دسته‌بندی می‌شود، با استفاده از نرم‌افزار GenALEx برآورد و در جدول ۴ نمایش داده شده است. براساس نتایج این دسته‌بندی، در این مطالعه ۷۷ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده بین جمعیت‌ها و ۲۳ درصد درون جمعیت‌ها بود. این آزمون در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود. تعیین تنوع ژنتیکی جهت انجام پروژهای حفاظت، اهلی‌سازی و اصلاح این گیاه ضروری است (Wasala and Prasanna, 2012). تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها تحت تأثیر عوامل بیولوژیکی، پراکنش، چرخه زندگی، اندازه جمعیت، جریان ژنی، نرخ جهش، فرسایش

ژنتیکی و سیستم گرده‌افشانی است (Petrova et al., 2017). به دلیل پراکنش گسترده و چندساله بودن شیرین بیان بیشتر در معرض جهش قرار گرفته و منجر به افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌شود (Esmaeili et al., 2020). اگرچه در اکثر مناطق ایران این گیاه به دلیل برداشت بی‌رویه در معرض انقراض قرار گرفته است، ولی نتایج این مطالعه نشان داد که این گیاه دارای تنوع قابل توجهی است که این تنوع سبب افزایش مقاومت این گیاه به شرایط محیطی متفاوت خواهد شد.

تجزیه به مختصات اصلی: بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) در نشانگرهای ISSR، داده‌هایی که مقادیر ویژه بالای یک داشتند در ۵ عامل قرار گرفتند که در مجموع این عوامل توانستند ۶۱/۴۲ درصد از کل تغییرات را توجیه کنند. در بین این عوامل، عامل اول درصد بالایی با میزان ۱۸/۴۵ درصد از واریانس را توجیه نمود. دو عامل دوم و سوم به ترتیب با ۱۳/۴۰ و ۹/۶۸ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در داده‌های مولکولی هرچه درصد واریانس اختصاص یافته به عامل‌های اصلی کمتر باشد نشانگرها توزیع بهتری داشته و نشان دهنده این امر می‌باشد که نشانگرهای مولکولی نواحی وسیع‌تری از ژنوم را مورد بررسی قرار داده‌اند و در نتیجه اطلاعات بیشتری از مناطق مختلف ژنوم که حاوی ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات مختلف می‌باشند را مورد هدف و بررسی قرار داده است (Mohammadi and Prasanna, 2003; Fazeli and Cheghamirza, 2011). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعه حاضر نشانگرهای ISSR کارایی مناسبی داشته‌اند و توانستند سطح وسیعی از ژنوم را پوشش دهند.

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

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

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

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های شیرین بیان

Table 4. Results of molecular variance analysis (AMOVA) of ISSR data from population of <i>G. glabra</i>					
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد از واریانس
S.O.V	df	Sum of squares	Mean Square	Estimated variance	Percentage of variance
درون جمعیت‌ها	21	129.212	6.153	0.965	23%
Among Populations					
بین جمعیت‌ها	44	143.333	3.258	3.258	77%
Within Populations					
کل	65	272.545		4.223	100%
Total					

جمعیت‌ها وجود دارد و می‌توان تدابیری برای حفاظت و برنامه‌های اصلاحی بر روی این گونه انجام داد. از آنجایی که برنامه‌های اصلاحی به تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌ها نیاز دارند، تنوع موجود در جمعیت‌های مورد بررسی می‌تواند کمک شایانی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی بکند.

یکی از اهداف به‌نژادگران گیاهی، حفاظت از ذخایر ژنتیکی می‌باشد که تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها و در نتیجه بقای گونه می‌شود. از آنجا که مطالعه بر روی روابط ژنتیکی برای اصلاح گیاهان و همچنین حفاظت از منابع ژنتیکی ضروری می‌باشد (Aghaei et al., 2012)، این بررسی نشان داد با وجود در معرض خطر بودن گونه‌های گیاهی، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین

References

- Aghaei, M., Darvishzadeh, R. and Hassani, A. (2012). Molecular characterization and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Revista Ciencia Agronomica*, **43**: 312-320.
- Ahmadian, H., Mirahmadi, F. and Rashidzade, B. (2018). Effects of ultrasound on extraction of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza glabra* L. in comparison with modified Rosen's method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **33(6)**: 961-974 (In Persian).
- Alam, A., Naik, P.K. and Mishra Gyan, P. (2009). Congruence of RAPD and ISSR Markers for evaluation of genomic relationship among 28 populations of *Podophyllum Hexandrum* from himachal pradesh. *Turkish Journal of Botany*, **33**: 1-12
- Alibrahim, MT., Sabaghnia, N. Ebadi, A. and Mohebbodini, M. (2004). Study of drought and salinity stress on germination of common Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Research in Agricultural Science*, **1**: 13-19 (In Persian).
- Bei-ning, L.I., Bo, N.A., Chun-sheng, L., Ying-qun, Z.H.O. and Juan, L. (2010). Analysis on genetic diversity of licorice *Glycyrrhiza uralensis* from geo-authentic product areas by ISSR markers. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, **12**:10-36.
- Bussell, J.D. (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8**: 775-789
- Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U., Restuccia, D. and Picci, N. (2011). Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots. *Food Chemistry*, **125**: 1058-1063.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. and Bandpang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. *Euphytica*, **142**: 169-196.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Dwevdi, K.K. and Gaibriyal, M. (2009). Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Asian Journal of Agriculture Science*, **1**: 7-8.

- Erayman, M., Ilhan, E., Guzel, Y. and Eren, A.H. (2014). Transferability of SSR markers from distantly related legumes to *Glycyrrhiza* species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **38**: 32-38.
- Esmaeili, H., Karami, A., Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S. and Lars-Gernot, O. (2020). Genetic structure and variation in Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) populations based on morphological, phytochemical and simple sequence repeats markers. *Industrial Crops and Product*, **145**: 112-140.
- Fazeli, F. and Cheghamirza, K. (2011). Investigation of genetic diversity in Iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Modern Genetic*, **6(2)**: 97-104 (In Persian).
- Gheitarani, B., Erfani-Moghadam, J. and Fazeli, A. (2020). Evaluation of Genetic diversity among some common fig Using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 43-54 (In Persian).
- Gupta, D.K., Verma, M.K. and Khajuria, R.K. (2013). Development of a validated UPLC-qTOF-MS/MS method for determination of bioactive constituent from *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Pharmaceutical Analysis*, **33**: 205-210.
- Gupta, S., Srivastava, M., Mishra Gyan, P., Naik, P.K., Chauhan, R.S., Tiwari, S.K., Kumar, M. and Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha Curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology*, **23**: 4230-4243.
- Hadian, J., Esmaeili, H., Nadjafi, F. and Khadivi-Khub, A. (2014a). Essential oil characterization of *Satureja rechingeri* in Iran. *Industrial Crops and Product*, **61**: 403-409.
- Hadian, J., Karami, A.R., Azizi, A. and Khadivi-Khub, A. (2014b). Ubiquitous genetic diversity among and within wild populations of *Satureja rechingeri* assessed with ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, **301(3)**: 923-930.
- Hagiaghay, R., Khan Ahmadi, M., Naghdi badi, H., Akhundzade, N., Khaliq, F., Mherafarin, A. and Shahriar, S. (2012). Analytical review on methods to isolate and measure the glycyrrhizic acid from licorice. *Journal of Medicinal Plants*, **13(50)**: 1-10.
- Kayis, S.A., Hakki, E.E. and Pinarkara, E. (2010) Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, **5(21)**: 2925-2933.
- Khan, S., Miraz, K.J., Tayaab, M. and Abidin, M.Z. (2009). RAPD profile for authentication of medicinal plant *Glycyrrhiza glabra* Linn. *International Journal of Food Safety*, **11**: 24-28.
- Latifi, A., Yosefi, M. and Haezinasab, M. (2018). Study of genetic diversity in some populations of *Cordia myxa* L. in Iran by using CDDP molecular marker. *Iranian Journal of Plant Biology*, **9(34)**: 39-35.
- Liu, Y., Zhang, P., Song, M., Hou, J., Qing, M. and, Wang, W. (2015). Transcriptome analysis and development of SSR molecular markers in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *PLoS ONE*, **10(11)**: e0143017.
- Ma yanming, L., Wang, H. and Han, F. (2008). Evaluation of cumin germplasm by ISSR markers. *Xinjiang Agriculture Science*, **45**: 143-152.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, **3**: 127-136.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, **43**: 1235-1248.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizadeh Lahiji, H., Alami, A., Shoaie Deylami, M. and Talesh Sasani, S. (2012). Study of genetic diversity of different flue-cured tobacco genotypes using ISSR marker and Retrotransposons. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **43**: 371-380 (In Persian).
- Naghavi, R., Gharayazi, B. and Hosseini, G. (2004). *Molecular Markers*. University of Tehran, Tehran. IR (In Persian).
- Najafi, F., Koocheki, A., Rezvani Moghaddam, P.P. and Rastgoo, M. (2005). Evaluation of seed germination characteristics in *Nepeta binaludensis*, a highly endangered medicinal plant of Iran. *Iranian Journal of Field Crops Research*, **4**: 1-8 (In Persian).

- Nei, M.** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**(12): 3321-3323.
- Nemeth, E.** (2000). Needs, problems and achievements of introduction of wild growing medicinal plants in to the agriculture. *First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries and VI Meeting "Days of Medicinal Plants"*. Arandjelovac, Yugoslavia, Serbia.
- Noorian, M. and Shirvani, H.** (2020). Genetic variability of *Malva neglecta* ecotype using ISSR molecular markers. *Journal of Plant Research*, **32**: 806-814 (In Persian).
- Nybom, H. and Bartish, I.V.** (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematic*, **3**: 293-114.
- Omidbaigi, O.** (2007). *Production and Processing of Medicinal Herbs* (Vol 3). Quds Razavi Publication, Mashhad, IR (In Persian).
- Pawell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A.** (1996). The comparison of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.
- Petrova, G., Petrova, S., Delcheva, M. and Bancheva, S.** (2017). Genetic diversity and conservation of Bulgarian endemic *Verbasum tzar-borisii* (Scrophulariaceae). *Annales Botanici Fennici*, **54**: 307-317.
- Renganayaki, K., Read, J.C. and Fritz, A.K.** (2001). Genetic diversity among texas bluegrass (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **2**: 1037-1045.
- Renmin, W., Chan, L., Jingliang, L., Fang, Y., Jianpei, G. and Xuejun, P.** (2012). Pressured microwave-assisted hydrolysis of crude glycyrrhizic acid for preparation of glycyrrhetic acid. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **20**(1): 152-157.
- Slageren, M. and Van, W.** (1994). Wild wheats: a monograph *Aegilops* L. and *Amblypyrum* (Jaub. and spach.) of eig (poaceae). Wagenin Gen. Agr., univ.ICARDA.
- Tahir, N.A.R. and Karim, H.F.H.** (2011). Determination of genetic relationship among some varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Sulaimani by RAPD and ISSR markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **4**: 77-86.
- Terzopoulos, P.J. and Bebeli, P.J.** (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, **108**: 39-44.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S.** (2009) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120**(3): 411-417.
- Van Valen, L.** (1965) Morphological variation and width of ecological niche. *American Naturalist*, **99**: 377-390.
- Volis, S., Yakubov, B., Shulgina, I., Ward, D., Zur, V. and Nedlinge, S.** (2001). Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of Linnaean Society*, **74**: 289-303.
- Wasala, S.K. and Prasanna, B.M.** (2012). Microsatellite marker-based diversity and population genetic analysis of selected lowland and mid-altitude maize landrace accessions of India. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **22**: 392-400.
- Wei, Y.M., Hou, Y.C., Yan, Z.H., Wu, W., Zhang, Z.Q., Liu, D.C. and Zhang, Y.L.** (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, **46**: 3-9.
- Yao, H., Zhao, Y., Chen, D.F., Chen, J.K. and Zhou, T.S.** (2008). ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Glycyrrhiza uralensis*. *Biologia Plantarum*, **52**(1):117-120.
- Zinodini, A., Farshadfar, M., Safari, H., Moradi, F. and Shirvani, H.** (2013). Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using ISSR Markers. *Journal of Crop Biotechnology*, **5**: 11-25.
- Zhang, A.H., LEI, F.J., Chen, C.B. and Zhang, L.X.** (2006). Seed Property Comparison and Genetic Diversity Analysis among Different Lines of *Glycyrrhiza uralensis*. *Journal of Jilin Agricultural University*, **6**:10-30.

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

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

Ghasem Eghlima¹, Azizollah Kheiry^{2*}, Mohsen Sanikhani², Javad Hadian³ and Mitra Aelaei²

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

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

Abstract

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

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

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