

Investigating Phylogenetic Relationships in Iranian Docke Ecotypes (*Rumex* spp.) using ISSR Markers, Morphological Features, and their Stomata Structure

Malihe Erfani¹, Mahdi Mohebodini^{2*}, Alireza Ghanbari³, Nasser Sabbaghnia⁴

¹ Ph. D. Student Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

² Associate Professor Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

³ Associate Professor Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

⁴ Associate Professor Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Tabriz, Iran

Abstract

Rumex spp. is one of the most valuable medicinal plants. This genus has about 200 species scattered in most parts of the world. Iran is considered as one of the distribution points of this plant, 23 species of this genus have been reported in different regions of Iran. The genetic diversity among 10 accessions of *Rumex* spp., was analyzed in this paper using ISSR markers. PCR analysis was performed on genomic DNA using 15 ISSR primers. ISSR primers were screened and yielded to the total of 174 amplified products, 146 bands (85.31%) of which were polymorphic. The results showed that polymorphism information content (PIC) was 0.50. UBC826 primer had the highest PIC value of 0.50 and P7 primer had the lowest PIC value of 0.28. Also, the Rp values were 13.6, 12.4 and 12.2 for UBC833, IS12 and UBC810 primers, respectively. Cluster analysis based on Jacquard's similarity coefficient using Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) indicated wide range of diversity across the studied accessions. Cluster analysis at distance of about 0.47 for ecotypes divided in 3 main groups. These results showed that great diversities exist in both of genetic and stomata structure in the ecotypes. Therefore, the possibility of using molecular data for varietal identification is a promising tool for applying in future breeding programs in the genus *Rumex*.

Key words: Stomatal Density, RP, PIC, Molecular Marker.

* mohebodini@uma.ac.ir

ارزیابی روابط فیلوژنتیکی توده‌های مختلف ترشک (*Rumex spp.*) بومی ایران با استفاده از نشانگر ISSR، صفت‌های ریخت‌شناسی و بررسی ساختار روزنه‌ای آنها

ملیحه عرفانی^۱، مهدی محب‌الدینی^{۲*}، علیرضا قنبری^۳، ناصر صباغ‌نیا^۴

^۱ دانشجوی دکتری گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۳ دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۴ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، تبریز، ایران

چکیده

گیاه ترشک (*Rumex spp.*) از جمله گیاهان باارزش دارویی و دارای حدود ۲۰۰ گونه است که در بیشتر نقاط دنیا پراکنده‌گی دارند. ایران یکی از نقاط پراکنش این گیاه محسوب می‌شود و ۲۳ گونه از این جنس از نواحی مختلف ایران گزارش شده است. در پژوهش حاضر، نشانگر مولکولی RSSI با استفاده از ۱۵ آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی اکوتیپ‌های ترشک بومی کشور استفاده شد. از مجموع ۱۷۴ نوار، ۱۴۶ نوار چندشکل تولید و امتیازدهی شدند. میانگین درصد چندشکلی برای تمام آغازگرها ۸۵/۳۱ درصد به دست آمد. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی به آغازگر CBU826 با مقدار ۰/۵ و کمترین مقدار آن به آغازگر p7 با مقدار ۰/۲۸ تعلق یافت. بیشترین قدرت تفکیک نشانگری به نشانگرهای CBU 833، IS12 و UBC810 با مقدار به ترتیب ۱۳/۶، ۱۲/۴ و ۱۲/۲ اختصاص یافت. تجزیه خوشه‌ای به روش AMGPU و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد اکوتیپ‌ها را در سه کلاستر دسته‌بندی کرد. نتایج بررسی ساختار روزنه‌ای اکوتیپ‌ها نیز تفاوت اکوتیپ‌ها را از نظر تراکم روزنه‌ای نشان دادند و تعداد روزنه برخی اکوتیپ‌ها در سطح رویی برگ بیشتر از سطح زیری برگ بود. نتایج نشان دادند تنوع زیادی از نظر ژنتیکی، ساختار روزنه‌ای و ریخت‌شناسی بین اکوتیپ‌های بررسی شده وجود دارد و بنابراین، امکان استفاده از روابط فیلوژنتیکی و تنوع موجود به‌عنوان ابزار مناسبی برای طبقه‌بندی و کارهای اصلاحی در این گونه گیاهی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تراکم روزنه‌ای، قدرت تفکیک نشانگر، محتوای اطلاعات چندشکلی، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

گیاهان بومی ایران شناخته می‌شوند و ظرفیتی انحصاری

در کشور به شمار می‌آیند (Gholami and Joharchi,

2008). گیاه ترشک (*Rumex spp.*) از جمله گیاهان

بیش از ۲۳۰۰ گونه از گیاهان کشور دارای خواص

دارویی، عطری و ادویه‌ای هستند که ۱۷۲۸ گونه از این

* mohebodini@uma.ac.ir

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک و انتخاب دقیق والدین مناسب برای تولید دورگ‌های قوی‌اند (Ren and Timko, 2001). نشانگر RSSI از جمله نشانگرهای مولکولی است که ابتدا Zietkiewicz و همکاران (۱۹۹۴) آن را ارائه کردند و به سرعت در زمینه‌های مختلف گیاهی استفاده شد (Zietkiewicz et al., 1994). بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر خانواده DNA ماهواره‌ای (RUSI) در گونه‌های مختلف این جنس نشان می‌دهد تنوع در توالی گونه‌ها زیاد و درجه اختلاف توالی بین گونه‌ها کم است (Navajas-Perez et al., 2006). همچنین Navajas-Perez و همکاران (۲۰۰۶) مطالعه‌ای با نشانگری از خانواده DNA ماهواره‌ای به نام RAYSI انجام دادند (Navajas-Perez et al., 2006) که داده‌های حاصل از آن دوپایه بودن این گیاهان را تأیید کرد. Rottenberg و Parker (۲۰۰۳) نیز مطالعه‌ای روی گونه *R. rothschildianus* Aarons انجام دادند؛ در این مطالعه، تنوع ژنتیکی دو جمعیت بومی اسرائیل به روش AFLP با ۰/۱۷ هتروزینگوسیستی و ۴۸/۹ مکان‌های چندشکل گزارش شد (Rottenberg and Parker, 2003). Talavera و همکاران (۲۰۱۱) نیز در گزارشی تنوع بین ۲۰ جمعیت از گونه *R. bucephalophorus* L. را با استفاده از نشانگرهای AFLP و ITS بررسی کردند؛ در بررسی تنوع ژنتیکی همراه با تنوع ریخت‌شناسی در این گونه مشخص شد بیش از ۷ زیرگونه دارد (Talavera et al., 2011). در مقاله دیگری، رابطه تاکسونومیک ۲۰ اکوتیپ از گونه‌های *R. cristatus* Wall. *R. confertus* Willd. *R. alpinus* Gand و *R. patientia* Pall. Ex M. Bieb همراه با ۵ اکوتیپ *R. pulcher* L. با استفاده از ۱۰

دارای ارزش دارویی است که به خانواده Polygonaceae (علف هفت‌بند) تعلق دارد. جنس *Rumex* (ترشک) دارای حدود ۲۰۰ گونه است که در بیشتر نقاط دنیا پراکندگی دارند (Vasas et al., 2015). ایران یکی از نقاط پراکندگی این گیاه محسوب می‌شود و ۲۳ گونه از این جنس از نواحی مختلف ایران گزارش شده است (Gholami and Joharchi, 2008). طبق گزارش‌های مختلف، عدد پایه کروموزومی جنس ترشک ۷، ۸، ۹ و ۱۰ است؛ از این رو، عدد کروموزومی در گیاهان نواحی مختلف متغیر و در بیشتر مواقع $2n=20$ است (Ichikawa et al., 1971). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های بومی برای حفاظت از این ذخایر ژنتیکی با ارزش بسیار اهمیت دارد زیرا این اکوتیپ‌ها نسبت به آن منطقه سازگارند و در نتیجه، کارهای اصلاحی با سرعت بیشتری پیشرفت می‌کنند. دسته‌بندی زیرگونه‌های *Rumex* بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تشریحی و عدد کروموزومی آنها انجام می‌شود (Lousley and Williams 1975; Himi et al., 2000)؛ هرچند در نتیجه پلی‌پلوئیدی و اینتروگرسیون در زیرگونه‌های *Rumex* هیبریداسیون به‌طور طبیعی وجود دارد و تنوع صفت‌های ریخت‌شناسی طی تکامل کمتر می‌شود (Rechinger, 1990)؛ از این رو، الگوی تاکسونومیک قابل‌قبولی برای مشخص کردن زیرگونه‌ها وجود ندارد (Losinskaja, 1936; Rechinger, 1937; Borodina, 1979). کاربرد نشانگرهای مولکولی تا حدی مشکلات تاکسونومیک زیرجنس‌ها را حل می‌کند. نشانگرهای مولکولی دارای کاربردهای بسیاری در بررسی تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری، تسهیل اینتروگرسیون، یافتن روابط خویشاوندی بین گونه‌ها، شناسایی ارقام،

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۱۰ اکوتیپ ترشک (گونه‌های *R. crispus*، *R. acetosa*، *R. obtusitolius*، *R. patientia* و *R. pulcher*) از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شد (محل جمع‌آوری در جدول ۱ دیده می‌شود). بذرها پس از جمع‌آوری در گلدان‌هایی با قطر ۳۰ سانتی‌متر کشت شدند. صفت‌های ریخت‌شناسی شامل طول پهنک برگ، عرض پهنک برگ، طول دم‌برگ بر حسب سانتی‌متر و قطر دم‌برگ بر حسب میلی‌متر، تعداد رگ‌برگ‌ها، تعداد برگ در بوته، تعداد گیاهک‌ها، میزان سبزی‌نگی با دستگاه spad (مدل CCM200، آمریکا) اندازه‌گیری و ثبت شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها و تجزیه واریانس برای تمام صفت‌های کمی و مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنادار (LDS) در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ روی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفت‌ها انجام شد.

آغازگر، نشانگر ISSR بررسی شد؛ نتایج کلاستر بندی نشان دادند گونه‌ها در دو گروه اصلی قرار می‌گیرند که گروه اول شامل *R. cristatus*، *R. patinetia* و *R. confertus* و گروه دوم شامل *R. alpinus* و ۱۵ اکوتیپ *R. pulcher* است و به این ترتیب، رده‌بندی گونه‌های یادشده با نتایج این گزارش تغییر یافت (Raycheva et al., 2013). نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع زیستی گونه‌های گیاهی در مناطق مختلف و طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف به کار می‌روند. در بسیاری از خانواده‌های گیاهی، گونه‌هایی وجود دارند که از نظر تقسیم‌بندی در گروه خاصی قرار داشته‌اند، ولی هنگامی که با نشانگرهای مولکولی بررسی شده‌اند تقسیم‌بندی آنها تغییر یافته است؛ بنابراین با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان این تقسیم‌بندی را برای بسیاری از گونه‌های گیاهی انجام داد. پژوهش حاضر با هدف تعیین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف ترشک بومی ایران به منظور تعیین روابط فیلوژنتیکی و شناسایی این اکوتیپ‌ها، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی و انتخاب دقیق والدین مناسب برای تولید دورگ‌های بهتر انجام شد.

جدول ۱- محل و موقعیت مناطق جمع‌آوری نمونه اکوتیپ‌های مختلف ترشک

ردیف اکوتیپ‌ها	ارتفاع از سطح دریا	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ردیف اکوتیپ‌ها	ارتفاع از سطح دریا	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	۱۲۱۵	۵۸	۳۵	۶	۱۴۵۰	۴۸	۳۸
۲	۱۳۳۴	۴۵	۳۸	۷	۱۸۴۳	۴۸	۳۷
۳	۲۷۵۰	۳۹	۳۷	۸	۱۴۳	۴۸	۳۲
۴	۱۶۵۰	۴۷	۳۸	۹	۱۲	۴۸	۳۱
۵	۲۷۵۰	۴۲	۳۷	۱۰	۱۵۱۳/۹	۵۲	۲۹

اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. پس از بررسی آغازگرها از نظر تکرارپذیری و چندشکلی، تعداد ۱۵ آغازگر ISSR

گیاهچه‌های شش تا هشت هفته‌ای برای استخراج DNA ژنومی استفاده شدند (Raycheva et al., 2013). کمیت و کیفیت DNA با دستگاه

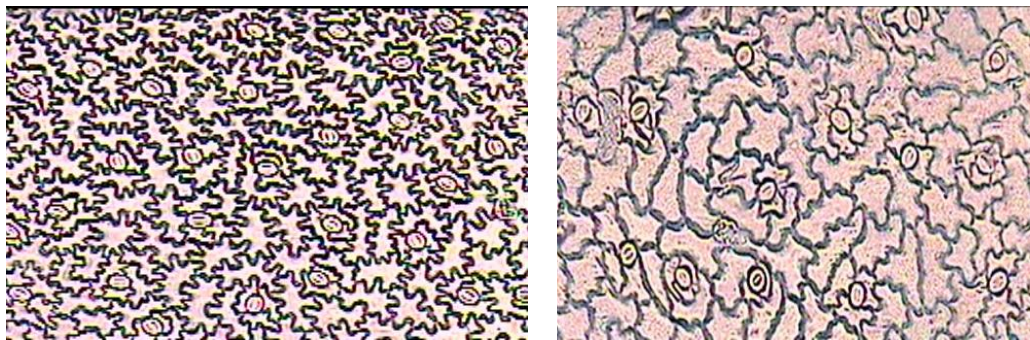
هتروزیگوسیتی (h) با نرم افزار POPGENE 1.32 محاسبه شد. به منظور تعیین روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های مطالعه شده، میزان تشابه آنها با تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و معیار فاصله جاکارد (Jaccard, 1908) با نرم افزار NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998) تعیین شد. به منظور بررسی ساختار روزه‌ای اکوتیپ‌های مطالعه شده، ابتدا لاک ناخن شفاف و چسب نواری در طول برگ کشیده و پس از خشک شدن، از برگ جدا و روی لام چسبانده شد (Camargo and Marengo, 2011)؛ سپس اسلایدهای آماده شده زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی‌های ۴۰× و ۱۰۰× بررسی شدند تا آرایش روزه‌ها مشخص و تعداد روزه‌ها شمارش شود.

نتایج

در پژوهش حاضر به منظور تشخیص و ارزیابی روابط فیلوژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گیاه ترشک بومی ایران بررسی ساختار روزه‌ای اکوتیپ‌ها با میکروسکوپ نوری، ۱۵ آغازگر مولکولی ISSR و ۸ صفت ریخت‌شناسی انجام شد. در بررسی ساختار روزه‌ای، روزه هر ۱۰ اکوتیپ از نوع آنیسوسیتیک بود و در اکوتیپ‌های مرنده، نیر، حور، نمین، دزفول و اهواز تعداد روزه‌ها در واحد سطح (در سطح رویی و در سطح زیری برگ) بیشتر از اکوتیپ‌های دیگر بود (شکل ۱).

انتخاب و دمای اتصال و شرایط واکنش آنها ارزیابی شد؛ سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با دستگاه ترموسایکلر (مدل Q-cycler، انگلستان) انجام شد. برنامه حرارتی اعمال شده شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد دمای واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد دمای واسرشته‌سازی ثانویه به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگرهای مختلف) دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه و ۱۵ ثانیه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد دمای بسط اولیه به مدت ۲ دقیقه بود که در ۳۲ چرخه انجام شد و در نهایت، ۷۰ درجه سانتی‌گراد واکنش بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در نظر گرفته شد.

چندشکلی بین اکوتیپ‌ها بر اساس حضورداشتن یا نداشتن نوار به ترتیب با صفر و یک مشخص شد. به منظور تعیین کارایی و مقایسه نشانگرها در تفکیک اکوتیپ‌های مطالعه شده از معیار محتوای اطلاعات چندشکلی طبق رابطه ۱: $PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_j^2$ (Botstein, 1980)، شاخص نشانگری از رابطه ۲: (MI) $MI = EMR \times PIC$ (Powell et al., 1996)، نسبت سهم مؤثر طبق رابطه ۳: $EMR = \partial \times \beta$ (Prevost and Wilkinson 1999)، قدرت تفکیک برای هر آغازگر از رابطه ۴: $R_p = \sum |I_b - I_b| = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ و درصد نوارهای چندشکل طبق رابطه ۵: $\%P = \frac{np}{n} \times 100$ استفاده شد. همچنین شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تنوع ژنتیکی (N) و میزان



شکل ۱- ساختار روزنه دو اکوتیپ مرند (سمت چپ تصویر) و اهواز (سمت راست تصویر)

داشت. مقایسه میانگین صفت قطر دمبرگ نشان داد توده‌های ۵ و ۱ به ترتیب دارای بیشترین (۶/۳۱ میلی‌متر) و کمترین (۳/۸۳ میلی‌متر) قطر دمبرگ هستند. از نظر تعداد رگبرگ در برگ‌ها نیز توده ۸ با ۵۵/۵۵ و توده ۳ با ۲۴/۱۱ رگبرگ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تعداد رگبرگ بودند. توده ۸ بیشترین (۱۹ برگ) و توده ۷ (۶/۲۲ برگ) کمترین تعداد برگ در بوته را داشتند. مقایسه میانگین صفت تعداد گیاهک در هر بوته نشان داد توده ۸ با ۲/۱۱ و توده ۷ با صفر گیاهک به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تعداد گیاهک‌اند. از نظر میزان سبزی‌نگی، توده ۹ دارای بیشترین (۵۱/۹۰) و توده ۱۰ (۲۲/۵۰) دارای کمترین میزان سبزی‌نگی بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های صفت‌های ریخت‌شناسی نشان دادند بین توده‌های مطالعه‌شده از نظر تمام صفت‌ها در سطح ۵ درصد تفاوت معنادار وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین صفت‌ها به روش حداقل اختلاف معنادار (DSL) در سطح ۵ درصد (جدول ۲) مشاهده شد بیشترین طول پهنک به توده ۸ (۳۴/۳۹ سانتی‌متر) و کمترین طول پهنک به توده ۱۰ (۱۶/۶۱ سانتی‌متر) تعلق دارد. از نظر صفت عرض پهنک برگ، توده ۷ (۶ سانتی‌متر) و توده ۹ (۴/۳۹ سانتی‌متر) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین عرض پهنک بودند؛ همچنین بیشترین و کمترین طول دمبرگ به ترتیب به توده ۱ (۲۲/۵۵ سانتی‌متر) و توده ۶ (۸/۱۶ سانتی‌متر) تعلق

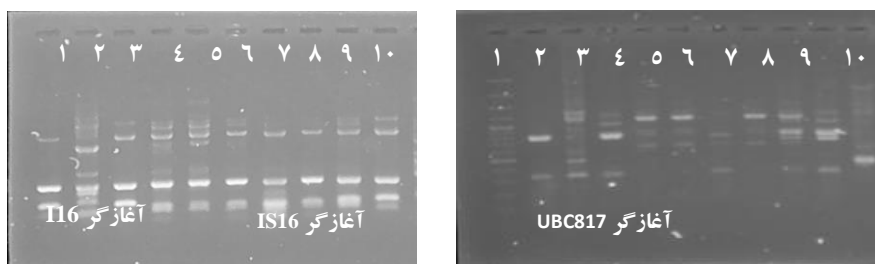
جدول ۲- مقایسه میانگین صفت‌های ریخت‌شناسی در ۱۰ توده ترشک

توده	میزان سبزی‌نگی	تعداد گیاهک	تعداد برگ	تعداد رگبرگ	قطر دمبرگ	طول دمبرگ	عرض برگ	طول برگ
۱	۴۷/۷۳ ^{a-c}	۱/۱۱ ^{n-p}	۱۱/۴۴ ^{j-l}	۲۶/۲۲ ^{j-o}	۳/۸۳ ^{i-p}	۲۲/۵۵ ^{b-f}	۵/۲۲ ^{h-m}	۱۶/۶۷ ^{k-q}
۲	۳۸/۰۳ ^{a-i}	۰/۵۵ ^{n-p}	۱۳/۶۶ ^{i-l}	۲۴/۴۴ ^{j-r}	۴/۳۰ ^{h-o}	۱۷/۷۷ ^{d-o}	۵/۲۲ ^{h-m}	۱۷/۲۸ ^{k-q}
۳	۴۷/۱۶ ^{a-d}	۰/۴۴ ^{op}	۸/۳۳ ^l	۲۴/۱۱ ^{k-r}	۳/۸۶ ^{i-p}	۲۱/۱۶ ^{b-h}	۵/۳۶ ^{h-m}	۱۵/۹۴ ^q
۴	۳۳/۶۰ ^{b-o}	۱/۵۵ ^{l-o}	۱۱/۴۴ ^{j-l}	۴۷/۳۳ ^{b-d}	۴/۱۹ ^{h-p}	۱۴/۷۷ ^{i-r}	۵/۹۶ ^{g-k}	۲۷/۱۱ ^j
۵	۲۷/۴۰ ^{e-p}	۰/۹۹ ^{m-p}	۸/۵۵ ^{kl}	۵۳/۱۱ ^{a-c}	۶/۳۱ ^{d-f}	۱۱/۸۹ ^{n-s}	۵/۷۴ ^{h-k}	۳۱/۳۳ ^{d-c}
۶	۴۰/۵۳ ^{a-f}	۰/۸۹ ^{m-p}	۱۳/۷۷ ^{i-l}	۴۴/۴۴ ^{c-f}	۴/۲۶ ^{h-p}	۸/۱۶ ^{rs}	۵/۳۴ ^{h-m}	۲۸/۴۴ ^{b-i}
۷	۲۸/۱۶ ^{e-p}	۰/۰۰ ^p	۶/۲۲ ^j	۳۲/۷۷ ^{i-k}	۴/۶۸ ^{k-p}	۲۱/۲۷ ^{b-h}	۶/۰۰ ^{f-k}	۲۲/۷۲ ^m
۸	۴۳/۳۶ ^{a-e}	۲/۱۱ ^{k-m}	۱۹/۰۰ ^{g-l}	۵۵/۵۵ ^{ab}	۴/۶۸ ^{g-k}	۱۰/۰۰ ^{p-s}	۵/۴۸ ^{h-l}	۳۴/۳۹ ^{d-c}
۹	۵۱/۹۰ ^a	۱/۰۰ ^{m-p}	۱۲/۶۶ ^{i-k}	۴۸/۲۲ ^{b-d}	۴/۴۹ ^{h-m}	۱۶/۸۹ ^{f-p}	۴/۳۹ ^{j-m}	۳۱/۲۷ ^{e-d}
۱۰	۲۲/۵۰ ^{j-p}	۰/۳۳ ^{op}	۷/۷۸ ^l	۲۶/۲۲ ^{j-o}	۳/۸۴ ^{k-p}	۱۸/۳۳ ^{d-m}	۴/۸۳ ^{i-m}	۱۶/۶۱ ^q
LSD(5%)	۱۲/۱۰	۱/۵۲	۱۵/۴۴	۹/۱۹	۱/۲۸	۶/۲۱	۲/۲۲	۸/۳۳

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معناداری ندارند.

در بررسی مولکولی نیز تمام آغازگرها در همه اکوتیپ‌ها چندشکلی نشان دادند. در مجموع، ۱۷۴ نوار با وضوح زیاد تولید شد که ۱۴۶ نوار چندشکل بودند و به‌طور میانگین، تعداد ۱۱/۶ نوار به‌ازای هر نشانگر به دست آمد. کمترین تعداد نوار تکثیرشده به آغازگر UBC815 با ۳ نوار و بیشترین تعداد نوار چندشکل به آغازگر UBC807 با ۲۳ نوار مربوط بود. الگوی نواربندی دو آغازگر استفاده‌شده در شکل (۲) دیده می‌شود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر ۸۵/۳۱ درصد بود که تنوع ژنتیکی زیاد را نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه حاضر، بیشترین

در بررسی مولکولی نیز تمام آغازگرها در همه اکوتیپ‌ها چندشکلی نشان دادند. در مجموع، ۱۷۴ نوار با وضوح زیاد تولید شد که ۱۴۶ نوار چندشکل بودند و به‌طور میانگین، تعداد ۱۱/۶ نوار به‌ازای هر نشانگر به دست آمد. کمترین تعداد نوار تکثیرشده به آغازگر UBC815 با ۳ نوار و بیشترین تعداد نوار چندشکل به آغازگر UBC807 با ۲۳ نوار مربوط بود. الگوی نواربندی دو آغازگر استفاده‌شده در شکل (۲) دیده می‌شود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر ۸۵/۳۱ درصد بود که تنوع ژنتیکی زیاد را نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه حاضر، بیشترین



شکل ۲- الگوی نواربندی حاصل از تکثیر آغازگرهای IS16 و UBC817

جدول ۳- نام، دمای اتصال، تعداد نوار تکثیرشده، تعداد نوار چندشکل، درصد چندشکلی و میزان اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگری آغازگرهای استفاده‌شده در اکوتیپ‌های بررسی شده

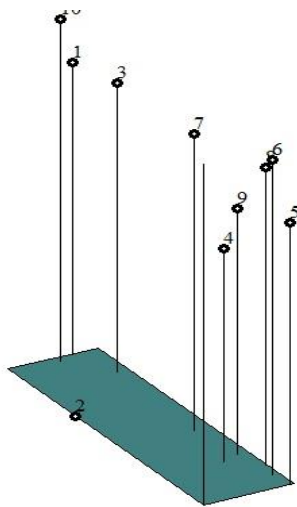
آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	تعداد نوارهای تکثیرشده	تعداد نوارهای چندشکل	درصد چندشکلی	میزان اطلاعات چندشکلی	شاخص نشانگری
UBC807	(AG)8T	۵۱/۹	۲۳	۲۰	۸۶/۹۵	۰/۳۶	۱۸/۷۱
p7	(AC)8GA	۵۵/۸	۱۷	۱۲	۷۰/۵۸	۰/۲۸	۱۱/۶۶
UBC 810	(GA)8T	۵۱/۹	۱۷	۱۳	۷۶/۴۷	۰/۴۶	۲۰/۶۹
UBC 811	(GA)8C	۵۴/۴	۹	۶	۶۶/۶۶	۰/۴۲	۱۶/۳۵
UBC 834	(AG) ₈ YT	۵۹	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۴۲	۲۴/۵۲
ISLA	(GAG)3GC		۸	۶	۷۵	۰/۴۲	۱۸/۳۹
UBC 815	(CT)8G	۵۴/۴	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۹	۲۹/۰۷
UBC 829	(GACA)4	۵۰/۲	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۸	۲۸/۴۹
UBC 833	(GGAGA)3		۱۶	۱۴	۸۷/۵	۰/۴۹	۲۵/۴۰
UBC 817	(CA)8T		۱۶	۱۵	۹۳/۷۵	۰/۴۹	۲۶/۸۵
UBC 826	(AC) ₈ C	۵۴/۴	۵	۵	۱۰۰	۰/۵	۲۹/۲۰
IS30	CCA(CT)8	۵۸/۷	۶	۶	۱۰۰	۰/۴۸	۲۸/۰۳
IS31	(ATG)6	۴۸/۹	۱۰	۸	۸۰	۰/۴۹	۲۳/۲۷
IS16	BDBCA(CCA)4	۶۱/۷	۱۰	۷	۷۰	۰/۴۹	۲۰/۴۳
IS12	DD(CCA)5	۵۸/۸	۸	۸	۷۲/۷۲	۰/۴۹	۲۰/۹۸

قدرت تفکیک با مقادیر ۱۳/۶، ۱۲/۴ و ۱۲/۲ به ترتیب به نشانگرهای CBU 833، IS12 و CBU810 اختصاص یافت. کمترین قدرت تفکیک نیز در نشانگر CBU815 با مقدار ۲/۸ دیده شد (جدول ۴).

میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۴۰، ۰/۲۶، ۱/۴۲ و ۱/۸۵ و بیشترین سطح هتروزیگوسیتی $h=0/۳۶$ به دست آمد. بیشترین

جدول ۴- نام، شاخص شانون، شاخص تنوع ژنتیکی نی، تعداد آلل‌های مشاهده‌شده، تعداد آلل‌های مؤثر و قدرت تفکیک نشانگر در اکوتیپ‌های بررسی شده

آمازگر	شاخص شانون	شاخص تنوع ژنتیکی نی	تعداد آلل‌های مشاهده‌شده	تعداد آلل‌های مؤثر	قدرت تفکیک نشانگر
UBC807	۰/۳۴	۰/۲۱	۱/۸۷	۱/۳۲	۱۱/۴
p7	۰/۲۶	۰/۱۵	۱/۷۱	۱/۲۱	۵/۸
UBC 810	۰/۳۶	۰/۲۳	۱/۷۶	۱/۳۷	۱۲/۴
UBC 811	۰/۲۵	۰/۱۵	۱/۶۷	۱/۲۲	۵/۴
UBC 834	۰/۴۲	۰/۲۶	۲/۰۰	۱/۴۰	۸/۴
ISLA	۰/۴۴	۰/۳۰	۱/۷۵	۱/۵۵	۱۰/۸
UBC 815	۰/۵۵	۰/۳۷	۲/۰۰	۱/۶۶	۲/۸
UBC 829	۰/۵۰	۰/۳۴	۲/۰۰	۱/۵۹	۷/۶
UBC 833	۰/۴۲	۰/۲۷	۱/۸۸	۱/۴۳	۱۳/۶
UBC 817	۰/۴۳	۰/۲۸	۱/۹۴	۱/۴۷	۱۱/۸
UBC 826	۰/۵۴	۰/۳۶	۲/۰۰	۱/۵۹	۵
IS30	۰/۴۶	۰/۲۹	۲/۰۰	۱/۴۵	۴/۸
IS31	۰/۳۷	۰/۲۴	۱/۸۰	۱/۳۸	۹/۴
IS16	۰/۲۴	۰/۱۵	۱/۶۰	۱/۲۶	۹/۸
IS12	۰/۳۸	۰/۲۵	۱/۷۳	۱/۴۲	۱۲/۲
Mean	۰/۳۸	۱/۸۳	۰/۲۴	۱/۳۹	

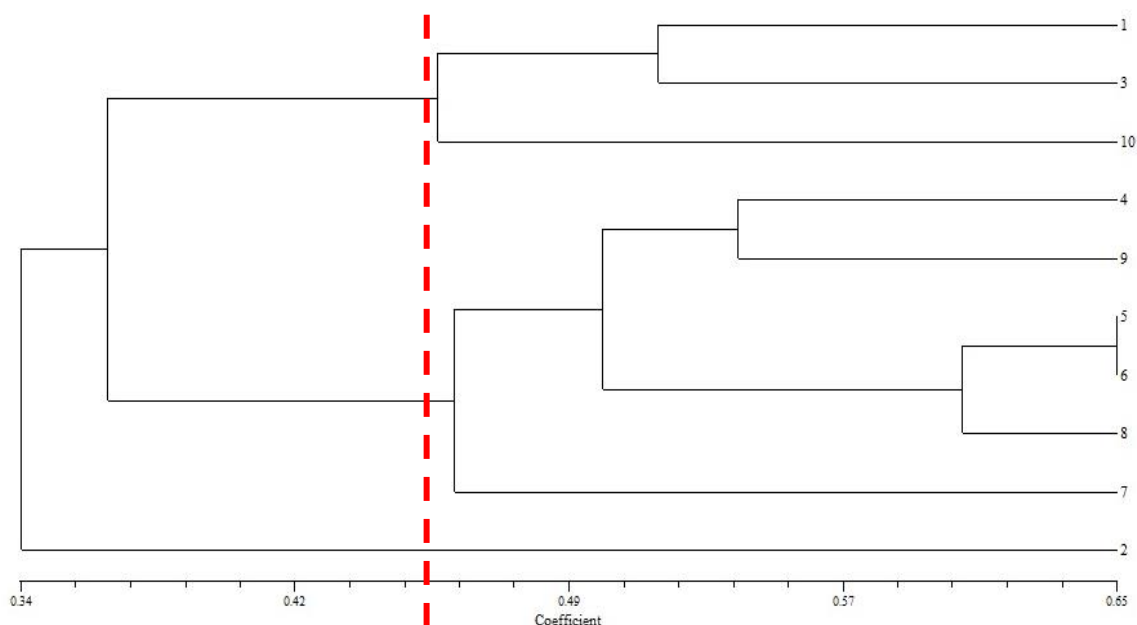


شکل ۳- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد

گروه‌بندی اکوتیپ‌های مطالعه‌شده بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA انجام شد (شکل ۴). تجزیه به مختصات اصلی برای تأیید گروه‌بندی انجام شد و نمودار سه بعدی آن در شکل (۳) مؤید قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب و دسته‌بندی صحیح نمونه‌ها است.

دسته‌بندی می‌شود؛ کلاستر دوم شامل سه زیرگروه است که در زیرگروه اول اکوتیپ‌های نیر و اهواز و در زیرگروه دوم اکوتیپ‌های حور، نمین و دزفول قرار می‌گیرند و زیرگروه سوم شامل اکوتیپ خلخال است. کلاستر سوم شامل اکوتیپ مرند است که به تنهایی در یک کلاستر جداگانه قرار می‌گیرد.

بر اساس دندروگرام حاصل، اکوتیپ‌ها در فاصله ۰/۴۷ در سه کلاستر دسته‌بندی می‌شوند: در کلاستر اول، اکوتیپ‌های کاشمر، اردبیل و شیراز در یک گروه قرار می‌گیرند و این گروه دارای دو زیرگروه است که دو توده کاشمر و اردبیل در یک زیرگروه قرار می‌گیرند و توده شیراز به تنهایی در زیرگروه دیگر



شکل ۴- دندروگرام حاصل از ضریب تشابه جاکارد بر اساس الگوریتم UPGMA

مولکولی در یک گروه قرار می‌گیرند و از این رو، بررسی روزنه‌ای برای بررسی روابط فیلوژنتیکی اکوتیپ‌ها در این گیاه مفید است؛ همان‌طور که سال‌های متمادی است ریخت‌شناسی روزنه به‌عنوان معیار تاکسونومیکی مناسبی برای تعیین گونه‌های مختلف یک جنس استفاده می‌شود. دسته‌بندی زیرگونه‌های *Rumex* با بررسی ساختار روزنه‌ای و دانه کرده آنها انجام شد (Lousley and Williams 1975; Himi *et al.*, 2000).

بحث

در بررسی روزنه‌ای، روزنه هر ۱۰ اکوتیپ از نوع آنیسوسیتیک بود. Yasmin و همکاران (۲۰۱۰) انواع سلول‌های روزنه‌ای آنیسوسیتیک، پاراسیتیک و استتاروسیتیک را برای گونه‌های مختلف این جنس گزارش کرده‌اند (Yasmin *et al.*, 2010). در اکوتیپ‌های کاشمر، اردبیل، خلخال و شیراز نسبت به سایر اکوتیپ‌ها تعداد روزنه کمتری در سطح روی برگ دیده شد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود این اکوتیپ‌ها در تجزیه کلاستر حاصل از داده‌های

Raycheva و همکاران (۲۰۱۳) روی گونه‌های مختلف جنس *Rumex* مطابقت دارد (Raycheva et al., 2013).

میزان PIC در آغازگرهای استفاده‌شده زیاد بود که کارایی زیاد این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده در پژوهش حاضر و برتری آنها برای بررسی تنوع ژنتیکی در تفکیک و تمایز افراد را نشان می‌دهد. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. آغازگرهایی که PIC بیشتر از ۰/۵ داشته باشند، به علت داشتن اطلاعات سودمند مناسب‌تر هستند. معیار PIC توان تمایز هر آغازگر را از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی نسبی آلل‌ها تعیین می‌کند (Muminovic et al., 2004). حداکثر مقدار PIC در جایگاه‌های دو آللی برابر ۰/۵ است و فقط زمانی اتفاق می‌افتد که فراوانی آلل‌ها در جمعیت مساوی باشد (Mateescu et al., 2005)؛ از این رو، نشانگرهای دارای PIC زیاد برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Ren and Timko, 2001). مقادیر MI و PIC به دست آمده در پژوهش حاضر کارایی به نسبت خوب این نشانگر در بررسی روابط ژنتیکی این گیاه را نشان می‌دهند. PIC در گونه‌های مختلف گیاه ریواس بین ۰/۳۲ تا ۰/۶۶ گزارش شده است (Tabina et al., 2016). از میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون برای بررسی تنوع در اکوتیپ‌ها استفاده می‌شود؛ زیاد بودن این شاخص‌ها در پژوهش حاضر نشان‌دهنده مفید بودن این اطلاعات برای بررسی تنوع بین اکوتیپ‌ها است. در پژوهشی که روی گونه‌های مختلف گیاه علف لیمو با استفاده از نشانگرهای RSI

در بررسی ریخت‌شناسی بر اساس مقایسه میانگین صفت‌ها، توده‌های ۸ و ۴ دارای بیشترین تعداد گیاهک در هر بوته بودند و توده ۷ بدون گیاهک بود؛ گفتنی است هرچه تعداد گیاهک در پای بوته اصلی بیشتر باشد تعداد برگ‌ها بیشتر و بوته از نظر حجمی بزرگ‌تر دیده می‌شود. توده ۸ از نظر صفت تعداد برگ دارای بیشترین تعداد برگ بود. افزایش تعداد برگ در بوته باعث افزایش زیست توده و عملکرد تولیدی می‌شود و از این نظر عامل مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر است (Borodina 1979).

وجود میانگین ۱۱/۶ نوار به‌ازای هر نشانگر در بررسی مولکولی انتخاب درست آغازگرها در پژوهش حاضر را نشان می‌دهد. در پژوهشی که روی گونه‌های ترشک بومی بلغارستان انجام شده است متوسط ۱۶ نوار برای هر آغازگر (Raycheva et al., 2013) و در گیاه ریواس (خانواده علف هفت‌بند) میانگین ۵/۵۲ نوار برای هر آغازگر (Tabina et al., 2016) گزارش شده است. همچنین درصد چندشکلی نسبتاً زیاد در مطالعه حاضر بیان‌کننده وجود تنوع ژنتیکی زیاد بین اکوتیپ‌ها و قابلیت نشانگرهای ISSR در شناسایی آن است. در پژوهشی روی اکوتیپ‌های مختلف گیاه ترشک با استفاده از نشانگر PLFA، میزان چندشکلی ۵۸/۶ درصد گزارش شد (Rottenberg and Parker, 2003). مطالعه‌ها نشان می‌دهند آغازگرهای ISSR دارای تکرارهای AG، AG، TC، CT، CA و AC چندشکلی بیشتری نسبت به سایر تکرارهای دی، تری و تترا نوکلئوتیدی نشان می‌دهند (Reddy et al., 2002) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد؛ به طوری که در آغازگر UBC807 با توالی (AG)₈T بیشترین تعداد نوار (۲۳ نوار) مشاهده شد که با نتایج مطالعه

نزدیک به هم هستند؛ به طوری که در یک شاخه مشترک قرار می گیرند. تنوع موجود بین توده های یک منطقه جغرافیایی به دگرگشتی گیاه نسبت داده می شود. کلاستر سوم شامل اکوتیپ مرند است که به تنهایی در کلاستر جداگانه ای قرار می گیرد. از آنجا که هرچه فاصله ژنتیکی ژنوتیپ ها بیشتر باشد می توان به هتروزیس بیشتری دست یافت، در برنامه های تلاقی از اکوتیپ هایی استفاده می شود که در گروه های مجزا قرار گرفته اند و فاصله بیشتری نسبت به یکدیگر دارند. در پژوهشی که با استفاده از نشانگر RSSI روی میوه در اگون فروت گونه های مختلف انجام شده است، پنجاه گونه در دو کلاستر اصلی گروه بندی شده اند؛ همچنین در این مقاله گزارش شده است نشانگر RSSI نشانگر مناسبی برای بررسی ژرم پلاسم این گونه های گیاهی است (Tao *et al.*, 2014). با توجه به مطالب یاد شده به نژادگران توصیه می شود در انتخاب والدین مناسب برای انجام دورگ گیری ها علاوه بر صفت های مطلوب ظاهری و زراعی به بررسی و طبقه بندی مولکولی آنها نیز توجه داشته باشند (Mwadingeni *et al.*, 2013).

جمع بندی

مطالعه حاضر کارایی زیاد نشانگر ISSR در بررسی چندشکلی بین اکوتیپ های بررسی شده را نشان داد. همچنین آغازگرهای استفاده شده با روش تجزیه خوشه ای اکوتیپ های مدنظر را از نظر جغرافیایی تفکیک کردند و تنوع بین اکوتیپ ها را به خوبی نشان دادند. از آنجا که آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر نتایج قابل قبولی را ارائه کردند می توان آنها را برای مطالعه درباره این گیاه استفاده کرد. در بررسی ساختار روزنه ای نیز تفاوت های زیادی بین اکوتیپ ها

و RAPD انجام شده است، میزان میانگین تعداد آلل های مشاهده شده، تعداد آلل های مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۵۷، ۰/۳۹، ۱/۷۰ و ۱/۹۸ و مقدار شاخص نشانگر ۴/۳۹ در نشانگر RSSI گزارش شده است (Baruah *et al.*, 2017). در گیاه ریواس نیز تنوع ژنتیکی نی ۰/۲۳ و شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۳۴ گزارش شده است (Tabina *et al.*, 2016).

آغازگر CBU833 بیشترین قدرت تفکیک (۱۳/۶) را داشت؛ گفتنی است قدرت تفکیک با افزایش درصد نوارهای چندشکل افزایش می یابد و بنابراین، نتایج نشان می دهند تمام نشانگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر به جز نشانگر CBU815 دارای قدرت تفکیک زیاد و مطلوب هستند. میزان قدرت تفکیک نشانگر در گونه های مختلف جو برای آغازگرهای ISSR برابر ۰/۹۲ و برای آغازگرهای RAPD برابر ۲/۹۹ گزارش شده است (Guasmi *et al.*, 2012).

در گروه بندی اکوتیپ های مطالعه شده بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA، کمترین شباهت (۰/۲۶) که بیان کننده بیشترین واگرایی است بین اکوتیپ های شیراز و مرند و بیشترین شباهت (۰/۶۵) بین دو اکوتیپ حور و نمین دیده شد که از نظر جغرافیایی توجیه پذیر است. تفکیک اکوتیپ ها به سه کلاستر مجزا کارایی زیاد این نشانگر در گروه بندی اکوتیپ های مختلف را نشان می دهد. به نظر می رسد در کلاستر اول، قرار گرفتن دو اکوتیپ کاشمر و اردبیل در کنار هم (با وجود فاصله جغرافیایی زیاد از هم) نشان دهنده قرابت زیاد این دو اکوتیپ از نظر ژنتیکی باشد. در کلاستر دوم، دو اکوتیپ حور و نمین (اکوتیپ های ۵ و ۶) از نظر جغرافیایی و از نظر ژنتیکی

از نظر ساختار و تعداد روزنه در سطح رویی و زیری
برگ دیده شد؛ از این رو، نتایج پژوهش حاضر در
بررسی روابط خویشاوندی و فیلوژنتیکی این گیاه
با ارزش کاربرد دارند.

منابع

- Baruah, J., Gogoi, B., Das, K., Ahmed, N. M., Sarmah, D. K., Lal, M. and Bhau, B. S. (2017) Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products* 95: 235-243.
- Borodina, A. E. (1979) The main directions of evolution in the genus *Rumex* L. (Polygonaceae) and its system. *Journal Botanicheskii Zhurnal* 64(4): 541-523.
- Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Feres, Kh., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T. and Ferchichi, A. (2012) The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among South Tunisian Barley. *Agronomy Journal* 2: 1-10.
- Tabina, Sh., Kamili, A. N., Ganie, Sh. A., Zargar, O. and Sharma, V. (2016) Genetic diversity and population structure of *Rheum* species in Kashmir Himalaya based on ISSR markers. *Flora* 223: 121-128.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Human Genetic* 32: 314-331.
- Camargo, M. A. B. and Marengo, R. A. (2011) Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. *Acta Amazonica* 41(2): 205-212.
- Gholami, A. L. and Joharchi, M. R. (2008) Revision on the genus *Rumex* L. in Northeast of Iran. 15th National and 3rd International Conference of Biology, Tehran, Iran.
- Himi, H., Iwatsubo, Y. and Naruhashi, N. (2000) Chromosome numbers of five natural hybrids in Japanese *Rumex* subg. *Rumex* (Polygonaceae). *Phytogeography Taxon* 48: 19-24.
- Ichikawa, S., Sparrow, A., Frankton, H., Nauman, C., Anne, F., Smith, E. B. and Pond, V. (1971) Chromosome number, volume and nuclear volume, relationships in a polyploid series ($2x-20x$) of the Genus *Rumex*. *Cand. Cytology and Genetic* 13: 842-863.
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles* 44: 223-270.
- Losinskaja, A. (1936) *Rumex* L. In: *Flora USSR* (Ed. Komarov, V. L.) 5: 444-482. *Akademiya Nauk SSSR, Moscow, Leningrad*.
- Lousley, J. E. and Williams, J. T. (1975) *Rumex* L. In: *Hybridization and the flora of the british isles* (Ed. Stace, C. A.) 278-292. *Academic Press London, New York*.
- Mateescu, R. G., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Burton-Wurster, N. I., Lust, G., Quaas, R., Murphy, K., Acland, G. M. and Todhunter, R. J. (2005) Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *Heredity Journal* 96: 847-853.
- Muminovic, J., Melchinger, A. E. and Lubbersted, T. (2004) Genetic determined by AFLP markers. *Plant Breeding* 123: 460-466.
- Mwadzingeni, L., Kashangura, C., Gasura, E., Garwe, D. and Lewis, R. (2013) Genetic diversity of Zimbabwean and exotic fluecured tobacco varieties based on phenotypic traits and simple sequence repeats. *African Journal of Agricultural Research* 8(46): 5845-5853.

- Navajas-Perez, R., Schwarzacher, T., Herran, R., Rejon, C. R., Rejon, M. R. and Garrido-Ramos, M. A. (2006) The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives. *Gene* 368: 61-71.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Prevost, A. and Wilkinson, M. J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112.
- Rechinger, K. H. (1937) Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Rumex*. V. The North American species of *Rumex*. *Botanic* 17(1): 1-151.
- Rechinger, K. H. (1990) *Rumex* subgen. *Rumex* sect. *Axillares* (Polygonaceae) in South America. *Journal of Systematics and Evolution*, 172: 151-192.
- Reddy, M. P., Sarla, N., Neeraja, C. N. and Siddiq, E. A. (2000) Assessing genetic variation among Asian A-genome *Oryza* species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. 4th International Rice Research Institute (IRRI), Philippines.
- Ren, N. and Timko, M. P. (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* 44: 559-571.
- Rohlf, F. J. (1998) NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, New York.
- Rottenberg, A. and Parker, J. S. (2003) Conservation of the critically endangered *Rumex rothschildianus* as implied from AFLP diversity. *Biological Conservation* 114: 299-303.
- Talavera, M., Balao, F., Casimiro-Soriguer, R., Ortiz, R., Terrab, A., Arista, M., Ortiz, P. L., Stuessy, T. F. and Talavera, S. (2011) Molecular phylogeny and systematics of the highly polymorphic *Rumex bucephalophorus* complex (Polygonaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 659-670.
- Tao, J., Qiao, G., Wena, X. P., Gao, G. L., Tao, L., Peng, Cai, Y. Q. and Zhang, B. X. (2014) Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 170: 82-88.
- Raycheva, T., Denev, I. and Dimitrova, D. (2013) Taxonomic relationships of selected Bulgarian species from *Rumex* subg. *Rumex* (Polygonaceae) based on ISSR markers. *Phytologia Balcanica* 19(1): 29-37.
- Vasas, A., Orban-Gyapai, O. and Hohmann, J. (2015) The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 175: 198-228.
- Yasmin, G. H., Khan, M. A., Shaheen, N. and Qasim, M. (2010) Micromorphological investigation of foliar anatomy of *Fagopyrum* Mill., and *Rumex* L. of polygonaceae. *Pakistan Journal of Botany* 42(1): 47-57.
- Zietkiewicz, E., Fafalski, A. and Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.