Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 39, No. 4, Page 622-637 (2023)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.361341.3283

Genetic diversity of different ecotypes from three *Althaea* species using SCoT phytochemical and molecular markers

Amin Arjmand[1], Mohsen Ebrahimi[2*] and Narges Moradi[3]

1- M.Sc. graduated, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Tehran, Iran, E-mail: mebrahimi@ut.ac.ir
3- Ph.D. student, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: January 2023 Revised: July 2023 Accepted: July 2023

Abstract

Background and objectives: *Althaea* genus belongs to the Malvaceae family. *Althaea officinalis* is the most important species of this genus for medicinal use. Other species, such as *A. rosea* and *A. ficifolia*, also have medicinal uses. Different flower organs (flower, fruit, seed, root, and leaf) of *Altheae* species have many medicinal uses due to high mucilage, phenolic compounds, and antioxidant properties. This research aims to find the best ecotypes for the investigated phytochemical traits. It also aims to determine the distance and genetic similarity between the studied *Altheae* species ecotypes. It is intended to be used in various projects.

Methodology: The research was carried out in 1401 in the research greenhouse, the agriculture and medicinal plants laboratory, and the genomics laboratory in the Aburihan Faculty of Agricultural Technology (Tehran University) located in Pakdasht city at 51 degrees east longitude and 33 degrees north latitude. It was conducted at 1013 meters above sea level and 36 kilometers southeast of Tehran. In this research, the molecular diversity and phytochemical traits of total phenol content, mucilage content, and antioxidant capacity were investigated in 9 ecotypes of three species of *Altheae* species. In the phytochemical evaluation, extracts were obtained from the roots by the Soxhlet method. Evaluation of molecular diversity was done after extracting DNA from leaves by the CTAB method using 10 SCoT primers. The quality and quantity of the extracted DNA were evaluated using two methods: a spectrophotometer and horizontal electrophoresis on 1% agarose gel.

Results: In the phytochemical evaluation, it was found that in terms of total phenol, the Kermanshah ecotype had the highest value statistically, with 10.67 mg of gallic acid per gram of extract. Regarding the amount of mucilage, the Kermanshah and Kerman ecotypes were ranked first in the same group with 2.86 and 2.77 mg per gram of dry weight, respectively, compared to other ecotypes. Pearson's correlation coefficient was calculated between phytochemical traits. It was determined that there was a positive and strong relationship between the traits evaluated in the experiment. Evaluation of molecular diversity was done after extracting DNA from leaves by the CTAB method using 10 SCoT primers. A total of 111 bands were formed, and 76 were polymorphic bands. PIC values varied between 0/22 and 34%. The percentage of polymorphism in this research varied between 0/5 and 0/87, and its average was 0/67. The average MI and RP indices were 1/55 and 5/48, respectively. In cluster analysis of molecular data, ecotypes were divided into three groups with 70% similarity. The dendrogram obtained from cluster analysis of ecotypes shows genetic similarity between ecotypes belonging to the same species. It also shows the genetic distance between ecotypes related to different species. The results of

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

decomposition into principal coordinates also confirmed cluster analysis results. In the analysis of molecular variance, it was found that 27% of the variation was within species, and 63% was between species.
Conclusion: In the end, it was found that SCoT phytochemical and molecular markers have the necessary efficiency to differentiate different ecotypes of *Altheae* species. Due to genetic diversity, to improve this plant, the ecotypes examined in this research can be crossed as the initial population and parents.

Keywords: Antioxidant capacity, correlation, molecular diversity, heterosis.

تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف سه گونه گل‌ختمی (*Althaea*) با استفاده از نشانگرهای فیتوشیمیایی و مولکولی SCoT

امین ارجمند[۱]، محسن ابراهیمی[۲*] و نرگس مرادی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیک: mebrahimi@ut.ac.ir

۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: گل‌ختمی متعلق به جنس *Althaea* و خانواده Malvaceae است. مهمترین گونه گل‌ختمی که دارای کاربرد دارویی است گونه *Althaea officinalis* می‌باشد. سایر گونه‌ها مانند *A. rosea* و *A. ficifolia* نیز دارای کاربردهای دارویی هستند. اندام‌های مختلف گونه‌های گل‌ختمی (گل، میوه، دانه، ریشه و برگ) به دلیل وجود موسیلاژ بالا، ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی کاربرد دارویی فراوانی دارند. هدف از انجام این تحقیق، یافتن بهترین اکوتیپ‌ها از نظر صفات فیتوشیمیایی مورد بررسی و تعیین فاصله و تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های گل‌ختمی مورد مطالعه به منظور استفاده در پروژه‌های به‌نژادی است.

مواد و روش‌ها: اجرای پژوهش در سال ۱۴۰۱ در گلخانه تحقیقاتی، آزمایشگاه زراعت و گیاهان دارویی و آزمایشگاه ژنومیکس در دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان (دانشگاه تهران) واقع در شهرستان پاکدشت با طول جغرافیایی ۵۱ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه شمالی و ارتفاع ۱۰۱۳ متری از سطح دریا و در فاصله ۳۶ کیلومتری جنوب‌شرقی تهران انجام شد. در این تحقیق تنوع مولکولی و صفات فیتوشیمایی میزان فنول کل، میزان موسیلاژ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ۹ اکوتیپ از سه گونه گل‌ختمی بررسی شد. در ارزیابی فیتوشیمیایی عصاره‌گیری از ریشه، به روش سوکسله انجام گردید. ارزیابی تنوع مولکولی پس از استخراج DNA از برگ به روش CTAB با استفاده از ۱۰ پرایمر SCoT انجام شد. کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید.

نتایج: در ارزیابی فیتوشیمیایی، مشخص شد که از نظر فنول کل اکوتیپ کرمانشاه با ۱۰/۶۷ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره دارای بالاترین مقدار از نظر آماری بود. از نظر میزان موسیلاژ اکوتیپ‌های کرمانشاه و کرمان هر دو در یک گروه و به‌ترتیب با ۲/۸۶ و ۲/۷۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک نسبت به سایر اکوتیپ‌ها در جایگاه اول قرار گرفتند. ضریب همبستگی پیرسون بین صفات فیتوشیمیایی محاسبه و مشخص شد. رابطه مثبت و قوی بین صفات ارزیابی شده در آزمایش وجود دارد. ارزیابی تنوع مولکولی پس از استخراج DNA از برگ به روش CTAB با استفاده از ۱۰ پرایمر SCoT انجام شد و در مجموع ۱۱۱ باند تشکیل و ۷۶ باند چندشکل بود. مقدار PIC بین ۰/۲۲٪ تا ۰/۳۴٪ متغیر بود. درصد چندشکلی در این تحقیق بین ۰/۵ تا ۰/۸۷ متغیر و میانگین آن ۰/۶۷ بدست آمد. میانگین شاخص‌های MI و RP به‌ترتیب ۱/۵۵ و ۵/۴۸ بدست آمد. در تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، اکوتیپ‌ها در سطح تشابه ۷۰٪ در سه گروه قرار گرفتند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده وجود تشابه ژنتیکی بین اکوتیپهای متعلق به یک گونه و وجود فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های مختلف بود. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نیز نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی را تأیید کرد. در تجزیه واریانس مولکولی مشخص شد ۲۷٪ از تنوع مربوط به درون و ۶۳٪ از تنوع مربوط به بین گونه‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در نهایت مشخص شد که نشانگرهای فیتوشیمیایی و مولکولی SCoT دارای کارایی لازم برای تمایز اکوتیپ‌های مختلف

گل‌ختمی هستند و با توجه به وجود تنوع ژنتیکی، به‌منظور اصلاح این گیاه از اکوتیپ‌های بررسی شده در این تحقیق می‌توان به‌عنوان جمعیت اولیه و والدین تلاقی به‌منظور بهره‌مندی از هتروزیس استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، همبستگی، تنوع مولکولی، هتروزی.

مقدمه

گل‌ختمی گیاهی است متعلق به جنس *Althaea* و شامل گونه‌های مختلفی است که بومی آمریکای جنوبی، شمال آفریقا و غرب آسیا می‌باشد (Uzunhisarcikli & Vural, 2012). ایران نیز یکی از مراکز اصلی تنوع این گیاه محسوب می‌شود. اندام‌های مختلف گل‌ختمی (گل، میوه، دانه، ریشه و برگ) به دلیل وجود موسیلاژ بالا، ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی کاربرد دارویی فراوانی دارند (Kianitalaei *et al*., 2019). یکی از گونه‌های مهم گل‌ختمی که کاربرد دارویی فراوانی دارد، *A. officinalis* است (Golshani *et al*., 2015). یکی از خواص دارویی این گیاه، در واقع مربوط به موسیلاژی می‌باشد که در ریشه وجود دارد و دارای اثرهای ضد سرفه، ضد التهاب، نرم کننده و ... است. همچنین ریشه‌ها با اسیدهای اضافی معده مقابله می‌کنند و برای درمان زخم و ورم معده و مشکلات مختلف روده استفاده می‌شوند (Valiei, 2011). برگهای این گیاه نیز دارای ترکیبات فنولی مختلف هستند و از برگ این گیاه نیز در درمان بیماری‌های ریوی، تنفسی و سوزش گلو استفاده می‌شود. برگها و ریشه‌های گل‌ختمی به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فنولی و موسیلاژ بالایی که دارند می‌توانند منبع دارویی مناسبی برای بیماری‌هایی مانند دیابت، پیری زودرس و نقص دستگاه ایمنی باشند (AC, 2004؛ Ali Shah *et al*., 2011). *A. ficifolia* گونه‌ای دیگر از گل‌ختمی است که دارای کاربرد دارویی می‌باشد، در بخش‌هایی از ایران، مراتع شنجان، بخش شبستر و به‌طور کلی در شمال‌غرب ایران پراکندگی و تنوع بالایی دارد (Yadav & Kamble, 2009). در مطالعه‌ای که بر روی میزان فنول کل و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف ختمی دارویی انجام گردید، مشخص شد که بیشترین میزان فنول کل با ۳/۳۸ میلی‌گرم گالیک اسید در اندام گل می‌باشد. همچنین در این آزمایش گزارش شد که اندام گل این گیاه نسبت به ریشه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد (Shabani *et al*., 2017). در تحقیقی که بر روی خصوصیات فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های مختلف گل‌ختمی در استان چهارمحال و بختیاری انجام گردید، مشخص شد که از نظر میزان ترکیبات فلاونوئیدی اکوتیپ دستگرد با ۳۸٪ و اکوتیپ بن با ۳۶٪ کمترین مقادیر را دارند. از نظر فنیل پروپان نیز اکوتیپ دستگرد با ۱۴٪ و اکوتیپ شهرکرد با ۸٪ به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را داشتند (Majdanesiri, 2013). در تحقیق دیگری که بر روی تعیین محتوای فنول و موسیلاژ اندام‌های مختلف گل‌ختمی انجام گردید، مشخص شد از نظر موسیلاژ، دانه با ۸۳٪ و از نظر محتوای فنول اندام گلبرگ با ۲٪ دارای بالاترین مقادیر بودند (Delnavaz Hashemlouyan, 2012). وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم اولیه و اطلاع کامل از آن، اساس و پایه شروع همه برنامه‌های به‌نژادی گیاهان می‌باشد و یکی از روش‌های قابل اطمینان برای آگاهی از تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم اولیه استفاده از نشانگرهای مولکولی است (Tripathi & Tripathi, 2005). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و نشانگرهای مبتنی بر DNA استفاده می‌شود. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به دلیل عدم تأثیرپذیری از محیط و تکرارپذیری بالا دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین نشانگرها هستند (Soltani *et al*., 2020). نشانگر SCoT که در فارسی به آن کدون‌های آغاز هدفمند می‌گویند

براساس توالی‌های اطراف نواحی آغازین ژن‌های گیاهی طراحی می‌شود و طبق تحقیقاتی که روی گیاهان مختلف انجام شده، می‌توان گفت این نشانگر تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف را به خوبی نشان می‌دهد (Collard & Mackill, 2009). نشانگرهای SCoT براساس توالیهای آغاز (ATG) طراحی می‌شوند و طول پرایمرها معمولاً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید است و طبق تحقیقات مختلف از مزایای این نشانگرها آسانی و تکرارپذیری بالای آنهاست (Al-Qurainy *et al*., 2015). در سال‌های اخیر به دلیل افزایش سطح زیر کشت ارقام زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از گونه‌ها و اکوتیپ‌های بومی و محلی دارویی به فراموشی سپرده شده و به نوعی می‌توان گفت به سمت انقراض و فرسایش ژنتیکی رفته‌اند. به‌منظور جلوگیری از فرسایش ژنتیکی، حفظ و اصلاح گیاهان دارویی و ارزیابی آنها و نیز آگاهی از تنوع ژنتیکی به‌عنوان اولین و مهمترین قدم ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

زمان و محل اجرای پژوهش

اجرای پژوهش در سال ۱۴۰۱ در گلخانه تحقیقاتی، آزمایشگاه زراعت و گیاهان دارویی و آزمایشگاه ژنومیکس در دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان (دانشگاه تهران) واقع در شهرستان پاکدشت با طول جغرافیایی ۵۱ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه شمالی و ارتفاع ۱۰۱۳ متری از سطح دریا و در فاصله ۳۶ کیلومتری جنوب‌شرقی تهران انجام شد.

طرح آزمایشی و تیمارها

این آزمایش در دو بخش مولکولی و فیتوشیمیایی با تعداد ۹ اکوتیپ، سه گونه مختلف گل‌ختمی و از هر گونه سه اکوتیپ انجام شد. بذرهای اکوتیپ‌های قزوین و یزد از بانک ژن منابع طبیعی در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و بذر سایر اکوتیپ‌ها از بانک ژن دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران تهیه گردید. در بخش مولکولی تنوع ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از ۱۰ پرایمر SCoT بررسی شد. در ارزیابی‌های فیتوشیمیایی، از هر اکوتیپ ۱۰ بذر در هر گلدان با ترکیب مساوی پیت‌ماس، خاک برگ و کود حیوانی در گلخانه کشت شده و ۴ ماه پس از جوانه‌زنی گیاهان کشت شده اقدام به برداشت ریشه‌های گیاهان به‌منظور عصاره‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ۹ تیمار در ۴ تکرار انجام شد. مشخصات اکوتیپ‌های گل ختمی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Table 1. Characteristics of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

Longitude	Latitude	Species	Ecotype	Ecotype code
47.0778°	34.3277°	*Althaea officinalis*	Kermanshah	1
57.0834°	30.2839°	*Althaea officinalis*	Kerman	2
51.6660°	32.6539°	*Althaea officinalis*	Esfahan	3
54.3569°	31.8974°	*Althaea rosea*	Yazd	4
53.0586°	36.5659°	*Althaea rosea*	Sari	5
48.6706°	31.3183°	*Althaea rosea*	Ahvaz	6
52.5836°	29.5926°	*Althaea ficifolia*	Shiraz	7
51.4651°	28.9009°	*Althaea ficifolia*	Bushehr	8
50.0046°	36.2795°	*Althaea ficifolia*	Ghazvin	9

ارزیابی فیتوشیمیایی

صفات فنول کل، میزان موسیلاژ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ۳ گونه مختلف گل‌ختمی و از هر یک ۳ اکوتیپ متفاوت اندازه‌گیری شد. از گونه *Althaea Officinalis* اکوتیپ‌های کرمانشاه، کرمان و اصفهان، از گونه *Althaea Rosea* اکوتیپ‌های یزد، ساری و اهواز و از گونه *Althaea Ficifolia* اکوتیپ‌های شیراز، بوشهر و قزوین بررسی گردید.

عصاره‌گیری از نمونه‌ها

عصاره‌گیری از ریشه، به روش سوکسله (عصاره متانولی) که یکی از مرسوم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین روش‌های استخراج عصاره در آزمایشگاه است، انجام شد (Krishnaiah *et al*., 2012).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

میزان ترکیبات فنولی کل با روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شدند. پس از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ (وزنی/ حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، با استفاده از رابطه خطی مربوط مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها براساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بیان گردید.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH استفاده شد (Lee *et al*., 2003). برای اندازه‌گیری IC_{50} غلظت‌های متفاوتی از محلول عصاره و DPPH تهیه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه تاریکی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب خوانده شد. نمونه حاوی متانول و محلول DPPH به‌عنوان شاهد اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری موسیلاژ

به‌منظور اندازه‌گیری موسیلاژ، ابتدا ۳ گرم پودر ریشه را با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و روی اجاق برقی قرار دادیم تا جوش آمد، بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه جوشیدن، آن را صاف کرده و تفاله باقی مانده را سه مرتبه با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط و صاف کردیم تا تمام موسیلاژ آن خارج شود. بعد از خنک شدن، هم‌حجم آن استون اضافه و موسیلاژ را با چای صاف‌کن بسیار ریز از آب و استن جدا کردیم. موسیلاژ بدست آمده را چند بار با استون شست‌وشو داده و در هوای اتاق خشک و بعد وزن نمودیم.

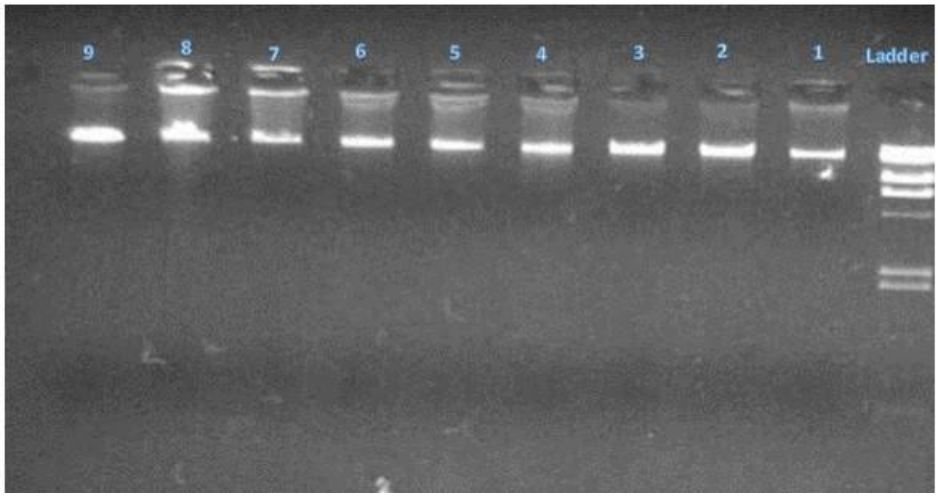
بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گل‌ختمی مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای ScoT

شیوه‌نامه محلول‌سازی استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. از هر ژنوتیپ در مرحله ۲۲ تا ۲۸ روز پس از سبز شدن نمونه‌های برگ برای استخراج DNA تهیه شد. نمونه پس از کوبیدن با نیتروژن مایع داخل تیوب ۲CC قرار داده شد و بعد درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (بهینه‌سازی شده) برای گونه *A. ficifolia*، *A .rosea* و *A. officinalis* انجام شد.

بررسی کمّیت و کیفیت DNA

کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جذب محلول‌های رقیق شده DNA به نسبت ۱:۱۰۰ در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت

جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر که شاخص میزان خلوص است، بدست آمد. بررسی کیفیت DNA با دستگاه الکتروفورز در ژل آگارز انجام شد و در نهایت با دستگاه ژل‌داک که براساس تابش نور UV کار می‌کند منتقل گردید، پس از روشن کردن دستگاه و مشاهده ژل و باندهای DNA یا RNA، از آن عکس‌برداری انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی باندی حاصل از آزمون کیفیت DNA اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Figure 1. The band pattern obtained from the DNA quality test of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

شرایط انجام PCR، الکتروفورز نمونه‌ها بعدازانجام واکنش زنجیرهای پلیمراز

به‌منظور انجام PCR، حجم واکنش شامل ۱۰ ماکرولیتر، حاوی ۵ ماکرولیتر مسترمیکس، ۳ ماکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ ماکرولیتر DNA و ۱ ماکرولیتر پرایمر بود. تیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و با توجه به دمای اتصال و شیوه‌نامه مربوط به هر پرایمر شرایط PCR به دستگاه تعریف شد. به‌طور کلی مدت زمان هر واکنش (۳۵ چرخه)، ۲ ساعت و ۴۵ دقیقه به طول انجامید. پس از انجام PCR نمونه‌ها (۹ اکوتیپ که شامل ۳ گونه متفاوت بودند) در ژل آگارز ۲/۵٪ با ولتاژ ۷۰، به‌مدت ۲ تا ۲/۵ ساعت الکتروفورز شدند و پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۵ تا ۲۵ دقیقه در محلول رقیق اتیدیوم بروماید غوطه‌ور شده و پس از آن توسط دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری انجام شد، در نهایت پس از تکرار این روند برای تمام ۱۰ پرایمر مورد استفاده در آزمایش، امتیازدهی به صورت صفر و یک داده شد.

آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش از شرکت سیناکلون خریداری شده و در نهایت ۱۰ پرایمر توانستند باندهای واضح و قابل امتیازدهی تولید کنند. اطلاعات مربوط به هر آغازگر و نتیجه آزمایش هر یک از آنها بر روی ۹ اکوتیپ مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری مربوط به اندازه‌گیری‌های فیتوشیمیایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.2 و SPSS 9.1 انجام گردید. تجزیه‌وتحلیل‌های مربوط به داده‌های مولکولی نیز با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSpc2.02 و GenALEx انجام شد. قبل از تجزیه واریانس و تفسیر نتایج مربوط به صفات فیتوشیمیایی، آزمون نرمال بودن خطای آزمایشی انجام و مشخص شد که خطای آزمایشی هر سه صفت دارای توزیع

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Table 2. Primers used in investigating the genetic diversity of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

No.	Primer name	Primer sequence
1	SCoT 1	GCAACAATGGCTACCAC
2	SCoT 2	CATGGCTACCACCGGCC
3	SCoT 3	CAATGGCTACCACTACAG
4	SCoT 4	ACAATGGCTACCACCATC
5	SCoT 5	CAATGGCTACCATTAGCC
6	SCoT 6	ACCATGGCTACCACGGG
7	SCoT 7	CCATGGCTACCACCGCC
8	SCoT 8	ACCATGGCTACCACCGC
9	SCoT 9	CAACAATGGCTACCAGC
10	SCoT 10	AAGCAATGGCTACCACCA

نرمال است. سپس مقایسه میانگین دانکن در سطح ۱٪ بین اکوتیپ‌ها انجام شد.

نتایج

فنول کل

از نظر فنول کل، اکوتیپ کرمانشاه با ۱۰/۶۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره دارای بالاترین مقدار از نظر آماری بود (جدول ۳). اکوتیپ کرمان نیز با ۱۰/۱ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره دارای رتبه دوم در بین اکوتیپ‌ها بود. اکوتیپ‌های اهواز و یزد به‌ترتیب با ۸/۳۵ و ۸/۳۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره در جایگاه سوم و چهارم بودند. اکوتیپ‌های اصفهان و ساری نیز هر دو در یک گروه قرار گرفته و به‌ترتیب با ۸/۰۷ و ۸/۰۲ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره در رتبه پنجم قرار گرفتند. اکوتیپ‌های بوشهر و قزوین نیز در یک گروه و به‌ترتیب با ۶/۵۶ و ۶/۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره در رتبه ششم قرار گرفتند. در نهایت اکوتیپ شیراز با ۶/۱۹ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره در رتبه آخر و دارای کمترین مقدار در میان تمامی اکوتیپ‌ها بود (شکل ۲).

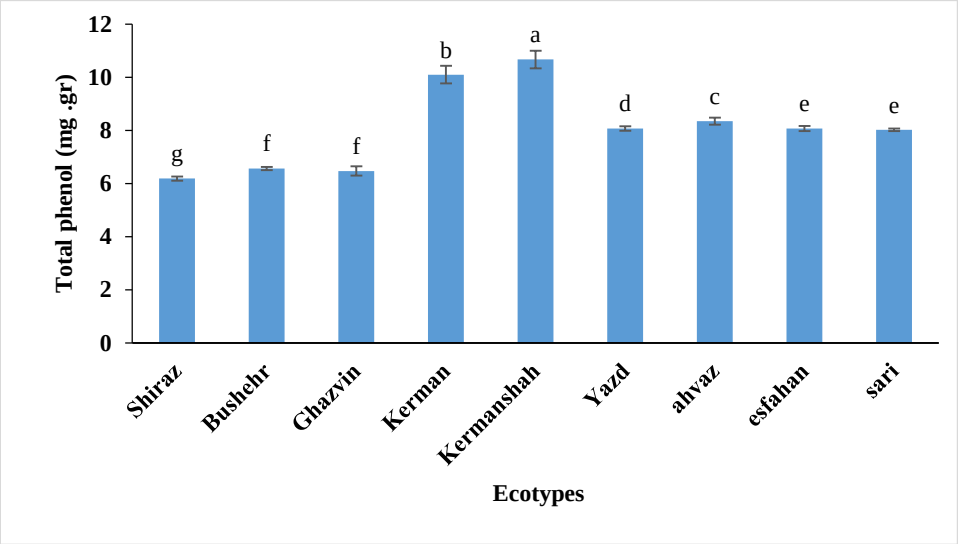
جدول ۳- تجزیه واریانس فنول کل اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Table 3. Total phenol variance analysis of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

SOV	DF	SS	MS	F
Genotype	8	96.635	12.07	**371.84
Error	27	0.88	0.03	
C.V.	**2.16**			

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

در بین تمامی اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق، اکوتیپ کرمانشاه با ۷۹۲/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بود (جدول ۴). در رتبه دوم نیز اکوتیپ یزد با ۷۱۱/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت و اکوتیپ‌های ساری، اصفهان، اهواز، بوشهر، قزوین، شیراز و کرمان همگی در یک گروه و به‌ترتیب با ۴۸۰/۴۶، ۴۷۵/۳۸، ۴۶۸/۵، ۴۶۷/۲۵، ۴۶۵/۵۸ و ۴۶۳/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در رتبه سوم قرار گرفتند (شکل ۳).



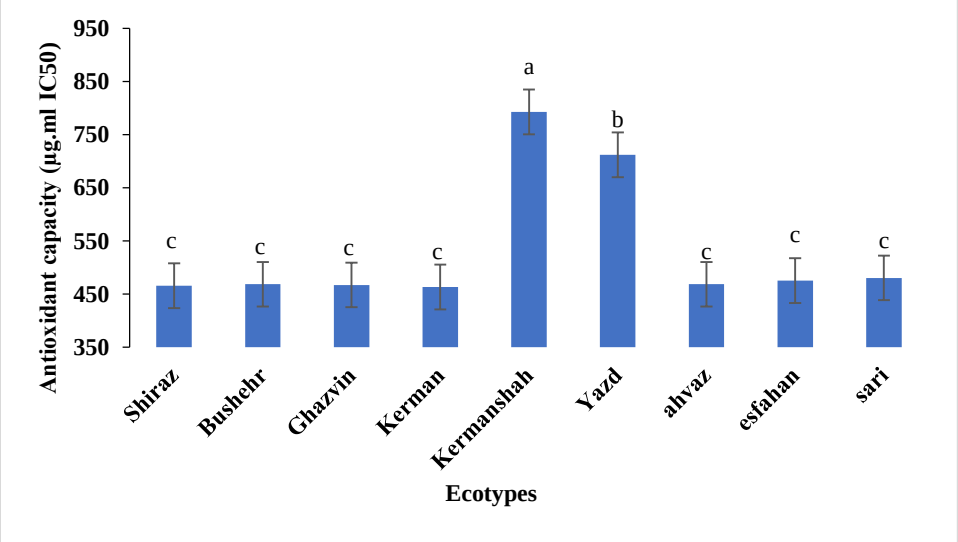
شکل ۲- مقایسه میانگین فنول کل در اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**)

Figure 2. Comparison of average total phenol in marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

جدول ۴- تجزیه واریانس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**)

Table 4. Variance analysis of antioxidant capacity of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

SOV	DF	SS	MS	F
Genotype	8	602976	75372	423.95**
Error	27	0.250	177.78	
C.V.	**2.42**			



شکل ۳- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**)

Figure 3. Comparison of the average antioxidant capacity in marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

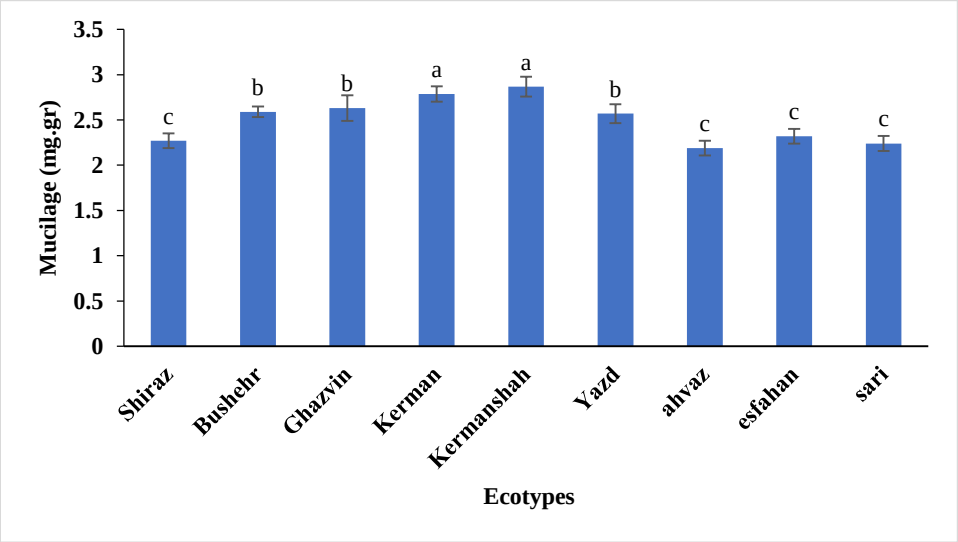
میزان موسیلاژ

از نظر میزان موسیلاژ اکوتیپ‌های کرمانشاه و کرمان هر دو در یک گروه و به‌ترتیب با ۲/۸۶ و ۲/۷۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک نسبت به سایر اکوتیپ‌ها در جایگاه اول قرار گرفتند (جدول ۵). اکوتیپ‌های قزوین، بوشهر و یزد نیز در یک گروه و به‌ترتیب با ۲/۶۳، ۲/۵۹ و ۲/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک در جایگاه دوم و اکوتیپ‌های اصفهان، شیراز، ساری و اهواز به‌ترتیب با ۲/۳۲، ۲/۲۷، ۲/۲۴ و ۲/۱۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک همگی در یک گروه و دارای کمترین میزان موسیلاژ نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بودند (شکل ۴).

جدول ۵- تجزیه واریانس موسیلاژ اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Table 5. Mucilage variance analysis of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

SOV	DF	SS	MS	F
Genotype	8	2.47	0.30	10.36**
Error	27	0.45	0.016	
C.V.	**5.52**			



شکل ۴- مقایسه میانگین میزان موسیلاژ در اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

Figure 4. Comparison of the average amount of mucilage in marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

محاسبه ضریب همبستگی پیرسون و تفسیر همبستگی بین صفات فیتوشیمیایی

پس از محاسبه همبستگی بین سه صفت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و میزان موسیلاژ، مشخص شد (جدول ۶) که این سه صفت به صورت دو به دو همگی با همدیگر همبستگی مثبت دارند، به این صورت که همبستگی بین فنول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۰/۹۰، همبستگی بین فنول کل و میزان موسیلاژ ۰/۶۳ و همبستگی بین موسیلاژ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۰/۸۱ بدست آمد. به‌طور کلی نتایج محاسبه همبستگی نشان‌دهنده وجود همبستگی مثبت و بالا بین صفات فیتوشیمیایی ارزیابی شده در این آزمایش بود.

جدول ۶- همبستگی صفات فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.)

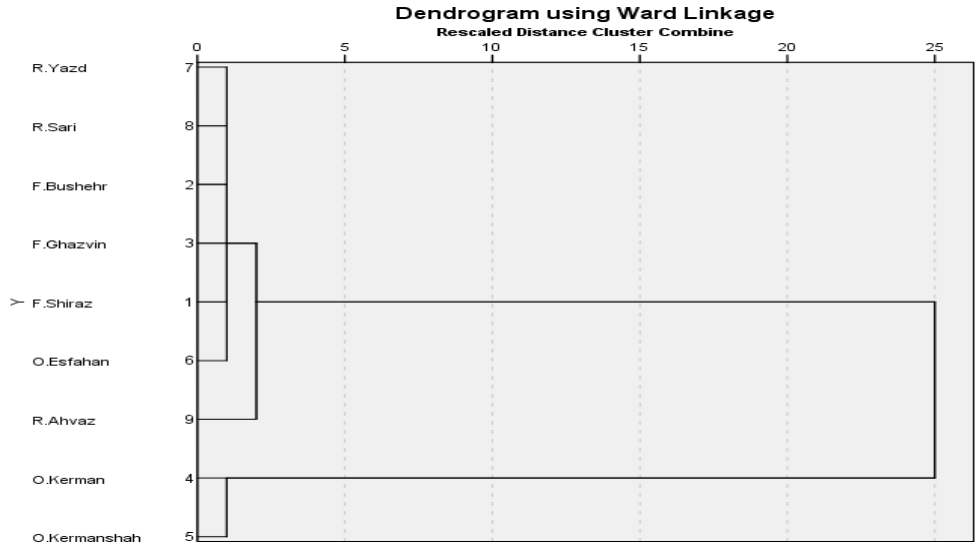
Table 6. Correlation of phytochemical traits of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

	Phenol content	Mucilage content	Antioxidant capacity
Phenol content	1	0.627*	0.904**
Mucilage content	0.627*	1	0.818**
Antioxidant capacity	0.904**	0.818**	1

* and **: significant at 5% and 1% probability levels

تجزیه خوشه‌ای داده‌های فیتوشیمیایی به روش WARD

پس از تجزیه خوشه‌ای داده‌های فیتوشیمیایی، اکوتیپ‌ها به‌طور کلی در دو گروه قرار گرفته، به‌نحوی‌که اکوتیپ‌های یزد، ساری، بوشهر، قزوین، شیراز، اصفهان و اهواز در یک گروه و اکوتیپ‌های کرمان و کرمانشاه که هر دو متعلق به گونه *A. officinalis* هستند در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۵).



شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.) براساس داده‌های فیتوشیمیایی به روش WARD

Figure 5. Cluster analysis and grouping of marshmallow (Althaea spp.) ecotypes based on phytochemical data using the WARD method
(O: *A. officinalis*, F: *A. ficifolia*, R: *A. rosea*)

ارزیابی مولکولی اکوتیپ‌های گل‌ختمی مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای SCoT

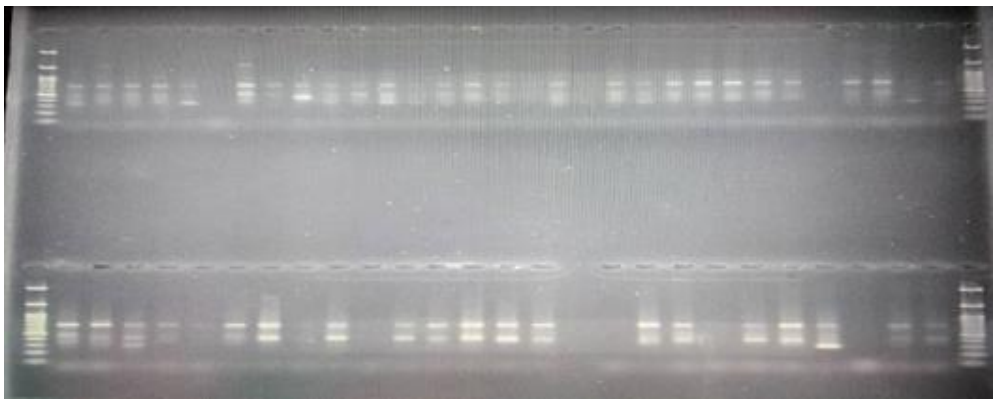
پس از تکثیر DNA اکوتیپ‌ها با استفاده از ۱۰ پرایمر ScoT در مجموع ۱۱۱ باند تکثیر شد که ۷۶ باند چندشکل بود (شکل ۶). بیشترین تعداد باند تکثیر شده با ۱۷ باند مربوط به ScoT1 و کمترین باند تکثیر شده نیز مربوط به ScoT7 با ۷ باند بود. بیشترین و کمترین باندهای چندشکل به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای ScoT1 و ScoT7 با ۱۲ و ۴ باند بود. میانگین تعداد کل باندها و باندهای چندشکل در این آزمایش به‌ترتیب ۱۱/۱ و ۷/۶ بود. مقدار PIC نیز بین ۰/۲۲٪ تا ۰/۳۴٪ متغیر بود، میانگین PIC ۰/۲۸ بدست آمد. کمترین و بیشترین میزان شاخص نشانگر MI به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای ScoT1 و ScoT6 با ۲/۸۵ و ۲/۴۸ بود. میانگین شاخص نشانگر MI در این مطالعه ۱/۵۵ بدست آمد. شاخص نشانگر Rp بین ۳/۷ و ۷/۴ متغیر و میانگین آن ۵/۴۸ بدست آمد. درصد چندشکلی در این تحقیق بین ۰/۵ تا ۰/۸۷ متغیر و میانگین آن ۰/۶۷ بود (جدول ۷).

جدول ۷- اطلاعات حاصل از آغازگرهای **SCoT** مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**)

Table 7. Information obtained from SCoT primers used in investigating the genetic diversity of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.)

Primer name	Tm (°C)	The total number of bands	Polymorphic bands	PIC	MI	Rp	Polymorphic percentage
SCoT1	52	17	12	0.34	2.85	6.5	70
SCoT2	54	8	7	0.30	1.82	5.4	87
SCoT3	53	11	6	0.28	0.90	6.3	54
SCoT4	56	9	5	0.26	0.71	5.9	55
SCoT5	59	12	9	0.31	2.09	4.8	75
SCoT6	58	14	11	0.29	2.48	4.3	78
SCoT7	55	7	4	0.22	0.5	3.7	57
SCoT8	57	9	5	0.24	0.66	4.6	55
SCoT9	59	14	9	0.28	1.61	5.9	64
SCoT10	54	10	8	0.30	1.99	7.4	80
Average	**55.7**	**11.1**	**7.6**	**0.28**	**1.55**	**5.48**	**67.5**

Tm: junction temperature, PIC: Relative polymorphism content, MI: Marker index, Rp: Resolution power

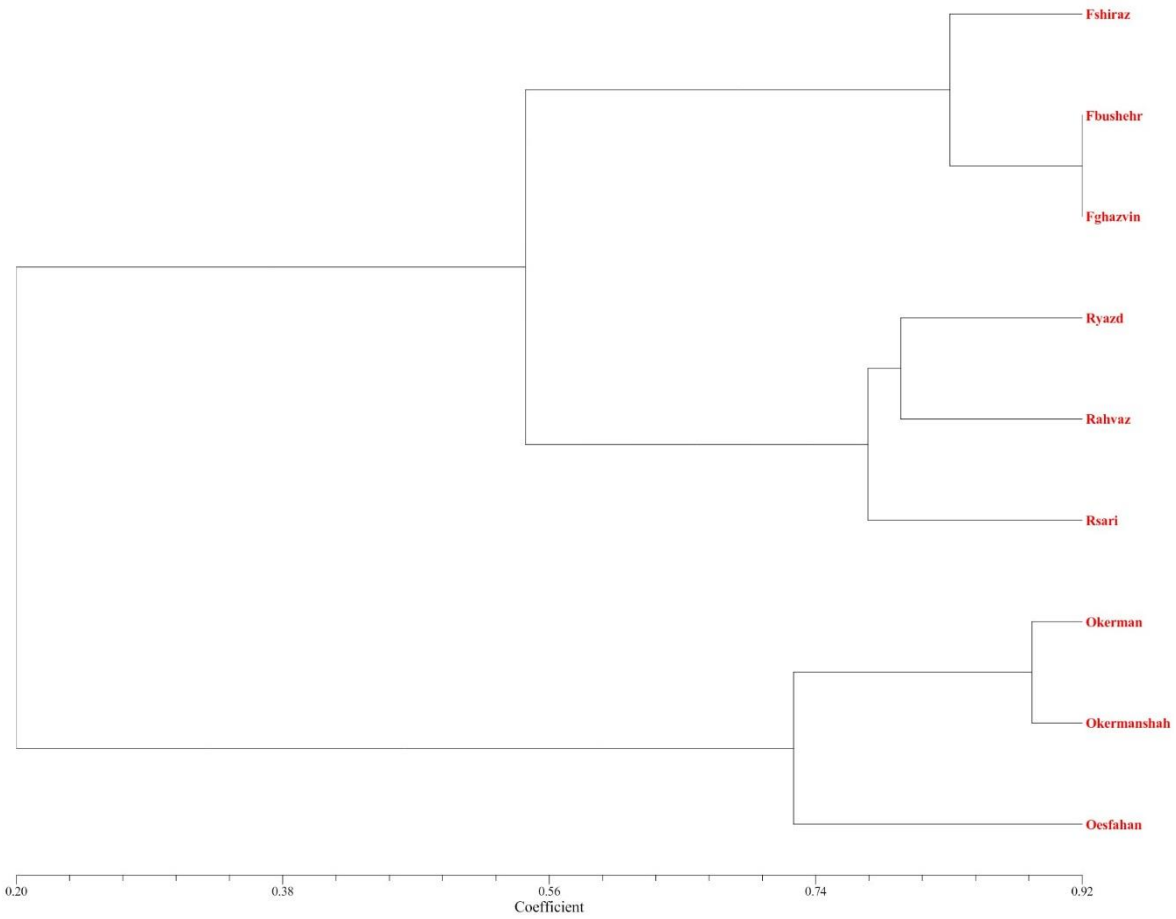


شکل ۶- الگوی باندی حاصل از تکثیر **DNA** ژنومی اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**) توسط آغازگر **SCoT1**

Figure 6. Banding pattern resulting from genomic DNA amplification of marshmallow ecotypes (*Althaea* spp.) by primer SCoT1

رسم دندروگرام و نمایش تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های گل‌ختمی مورد مطالعه

رسم دندروگرام با استفاده از ضریب تشابه JACARD و روش خوشه‌بندی UPGMA انجام شد (شکل ۷). نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی نشان داد که در سطح تشابه ۷۰٪ اکوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفته، به‌طوری که اکوتیپ‌های اصفهان، کرمانشاه و کرمان که هر سه مربوط به گونه *A. officinalis* هستند در گروه اول و اکوتیپ‌های یزد، ساری و اهواز که متعلق به گونه *A. rosea* بودند در گروه دوم قرار گرفتند. اکوتیپ‌های شیراز، بوشهر و قزوین نیز که همگی متعلق به گونه *A. ficifolia* هستند در گروه سوم قرار گرفتند. در رابطه با تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها، نتایج حکایت از آن داشت که در درون گونه *A. ficifolia* میزان تشابه ژنتیک بالایی بین اکوتیپ‌های قزوین و بوشهر وجود دارد. در درون گونه *A. rosea* بین اکوتیپ‌های یزد و اهواز تشابه ژنتیکی بیشتری وجود داشت. در رابطه با تنوع درون گونه‌ای در *A. officinalis* نیز اکوتیپ‌های کرمانشاه و کرمان تشابه ژنتیکی بیشتری با یکدیگر داشتند.

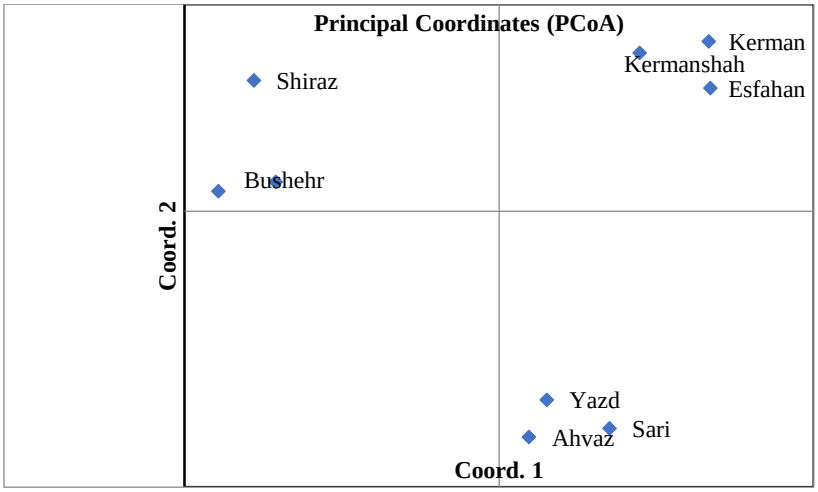


شکل ۷- تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی اکوتیپ‌های گل ختمی (***Althaea* spp.**) بر اساس داده‌های مولکولی به روش **WARD**

Figure 7. Cluster analysis and grouping of marshmallow (*Althaea* spp.) ecotypes based on molecular data by WARD method
(O: *A. officinalis*, F: *A. ficifolia*, R: *A. rosea*)

تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) داده‌های مولکولی

نمودار حاصل از تجزیه به مختصات اصلی اطلاعات حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد (شکل ۸). همانطور که مشاهده می‌شود اکوتیپ‌های مربوط به یک گونه به نوعی در یک گروه و نزدیک به هم قرار دارند. در تجزیه به مختصات اصلی نیز در درون گونه *A. ficifolia* مشخص است که دو اکوتیپ نسبت به هم فاصله نزدیک‌تری دارند، به‌نحوی که این دو اکوتیپ‌های بوشهر و قزوین هستند که طبق تجزیه خوشه‌ای نیز تشابه بالایی با یکدیگر دارند. در درون گونه *A. officinalis* نیز دو اکوتیپ که با هم فاصله نزدیک‌تری دارند اکوتیپ‌های کرمانشاه و کرمان هستند که این مورد هم با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت دارد.



شکل ۸- تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌های گل ختمی (*Althaea* spp.) براساس داده‌های مولکولی

Figure 8. Decomposition into main coordinates of marshmallow (*Althaea* spp.) ecotypes based on molecular data (O: *A. officinalis*, F: *A. ficifolia*, R: *A. rosea*)

بحث

تحقیقاتی که بر روی گیاهان دارویی رشد کرده در مناطق مختلف ایران انجام شده نشان داده است که میزان مواد مؤثره موجود در گیاهان رویشگاه‌های مختلف تفاوت چشمگیری با یکدیگر دارند، با توجه به این موضوع ممکن است اثر گیاهان مناطق مختلف برای درمان بیماری‌ها با یکدیگر متفاوت باشد (Dehghan *et al*., 2013). بنابراین بررسی کیفیت گیاهان رشد کرده در مناطق مختلف ایران از نظر صفات فیتوشیمیایی مهم این گیاهان حائز اهمیت است (Hajimehdipoor *et al*., 2008). در تحقیقی که توسط Ghahfarokhi و همکاران (۲۰۱۷) بر روی صفات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف گل‌ختمی انجام گردید، مشخص شد که بین جمعیت‌های مورد مطالعه آنها از نظر صفات فنول کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. این تحقیق با توجه به اختلاف معنی‌دار صفات فیتوشیمیایی در اکوتیپ‌های مختلف گل‌ختمی با نتایج تحقیق Ghahfarokhi و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت و مشخص شد که ترکیبات فیتوشیمیایی و مواد مؤثره در گل‌ختمی تحت تأثیر رویشگاه‌های مختلف قرار دارد. در تحقیق دیگری که توسط Heidari و همکاران (۲۰۱۴) بر روی میزان موسیلاژ در اندام‌ها و اکوتیپ‌های مختلف گل‌ختمی انجام گردید، مشخص شد که در تمامی اندام‌های گل‌ختمی موسیلاژ وجود دارد و میزان موسیلاژ نیز تحت تأثیر اقلیم‌های متفاوت متغیر است. در این تحقیق نیز میزان موسیلاژ در اندام ریشه گل‌ختمی و تفاوت میزان آن در جمعیت‌های مختلف نیز مورد تأیید قرار گرفت. نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای بسیار قدرتمند برای مطالعه تنوع ژنتیکی هستند و در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی تفاوت‌ها یا شباهت‌های اکوتیپ‌های مختلف کاربرد دارند (Mirzaie & Salari, 2021). در مطالعه‌ای که توسط Dastmalchi و همکاران (۲۰۱۲) بر روی تنوع ژنتیکی ختمی دارویی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP انجام گردید، مشخص شد که این نشانگر دارای کارایی لازم در نمایان کردن تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گل‌ختمی نیست و تحقیقات بیشتر با استفاده از نشانگرهای دیگر پیشنهاد شد. در تحقیق دیگری، توسط Dehghan و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی تنوع ژنتیکی ختمی دارویی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD پرداخته شد، مشخص گردید که نشانگرهای مولکولی می‌توانند در شناسایی نواحی چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف ختمی مفید باشند. در این تحقیق نیز با توجه به میزان PIC، درصد چندشکلی و سایر

شاخص‌های تنوع مشخص شد که نشانگر مولکولی SCoT توانایی تمایز و نمایان کردن تنوع ژنتیکی در گل‌ختمی را دارد و نتایج Dehghan و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر کارایی نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی ختمی مورد تأیید قرار گرفت. در تجزیه واریانس مولکولی مشخص شده، ۶۳٪ از تنوع مربوط به بین گونه‌ها و ۳۷٪ از تنوع نیز مربوط به درون گونه‌های مورد مطالعه است، دلیل بیشتر بودن تنوع بین گونه‌ای نسبت به تنوع درون گونه‌ای می‌تواند به علت ساختار گرده‌افشانی و همینطور مهاجرت باشد (Nezhadi *et al*., 2022). به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، می‌توان گفت با توجه به وجود تنوع فیتوشیمیایی و مولکولی قابل ملاحظه بین جمعیت‌های مورد مطالعه در این آزمایش، در تحقیقات آینده به منظور اصلاح گیاه گل‌ختمی برای افزایش صفات فیتوشیمیایی و ماده مؤثره می‌توان از اکوتیپ‌های بررسی شده در این تحقیق به‌عنوان جمعیت اولیه و یا والدین تلاقی به منظور استفاده از هتروزیس استفاده کرد.

References

- Hamilton, A.C., 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. Biodiversity and Conservation, 13: 1477-1517.
- Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M. and Tarroum, M., 2015. SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date palm cultivars. Pakistan Journal of Botany, 47(2): 637-643.
- Ali Shah, S.M., Akhtar, N., Akram, M., Shah, P.A., Saeed, T., Ahmed, K. and Asif, H.M., 2011. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. Journal of Medicinal Plant Research, 5(24): 5662-5666.
- Moalemi, R., Aghdasi, M. and Ghanati, F., 2012. Induction of Phenolic Compounds is Affected by Boron Supply in Marshmallow (*Althaea officinalis* L.) Cells, Progress in Biological Sciences, 2(1): 68-75.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. Plant Molecular Biology Reporter, 27(1): 86-93. https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5
- Dastmalchi, T., Omidi, M., Torabi, S., Madah Arefi, H., Etminan, A.R, Hassani, M.H. and Behzadi Rad, M., 2012. Evaluation of genetic variation in marsh mallow and hollyhock accessions (*Althaea* & *Alcea* spp L.) using AFLP markers, Journal of Genetics, 6(3): 79. magiran.com/p954664
- Dehghan, E., Dashti, H. and Baghizadeh, A., 2013. Antibacterial Effect of Ethanol Extract (*Althaea Officinalis*) on *Streptococcus Pyogenes* Compared with Prevalent Antibiotics In-Vitro. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences; 12(6): 461-74.
- Delnavaz Hashemlouyan, B., Shabani, S. and Ataee Azimi, O., 2012, Extraction and determination of content terpene phenol mucilage leaf stem and medicinal marshmallow seeds *Althaea officinalis* L., First National Conference on Life Sciences, Falavarjan, 29 February-1 March, https://civilica.com/doc/183246
- Ghahfarokhi, S.Z.A., Saeedi, K. and Lori Naieni, Z., 2017. Evaluation of total phenolic composition and antioxidant capacity of *Alcea koelzii* ecotypes. The second Conference on Agriculture, Genetic Engineering and Plant Protection of Iran, Kerman, 3 June, https://civilica.com/doc/688839
- Golshani, Y., Zarei, M. and Mohammadi, S., 2015. Acute/Chronic Pain Relief: Is *Althaea officinalis* Essential Oil Effective. Avicenna Journal of Neuro Psych Physiology, 2(4): 100-105.
- Hajimehdipoor, H., Amanzadeh, Y., Hasanloo, T., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M., 2008. Investigating On the Quality of Wild Licorice Roots Collected from Different Regions of Iran. Journal of Medicinal Plants, 7(27): 106-114.
- Heidari, A. and Kashefi, B., 2014. Evaluation of mucilage and phenol content in different organs of Hollyhock in three different ecological regions of Semnan province. 2nd National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture, Hamedan, 21 August, https://civilica.com/doc/305913
- Kianitalaei, A., Feyzabadi, Z., Hamedi, S. and Qaraaty, M., 2019. *Althaea Officinalis* in Traditional Medicine and modern phytotherapy. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research, 9(s2): 154-161. www.japer.in
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R., 2012. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. Chemical Engineering Research and Design, 90(5): 622-632.
- Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.-S., Jeong, H.-S. and Kim, J.H., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life Sciences, 73(2): 167-179.
- Majdanesiri, B., 2013. Phytochemical study of different ecotypes of marshmallow (*Alcea Koelzii*

L.) in Chaharmahal and Bakhtiari Province. The first regional congress of medicinal plants in the north of the country, Gorgan, 19 July, https://civilica.com/doc/247155

- Mirzaie, S. and Salari, H., 2021 Study on the genetic diversity of tomato's cultivars via SCoT marker. Agricultural Biotechnology Journal, 13(4): 101-120.
- Nezhadi, F., Karami, E., Fayyaz, F., Safari, H. and Rahimi, A., 2022. The evaluation of between and within species genetic diversity in seven different species of Achillea Accessions using SSR molecular markers. MGj 2022; 17(3): 307-322.
- Shabani, M., Ahmadi Golsefidi, M. and Mazandarani, M., 2017. Phytochemical, antioxidant, antimicrobial and essential oil study of various organs of *Althaea officinalis*. L. southeastern region of Gorgan. 1st National Conference on Phytochemistry of Medicinal Plants, Health Promotion and Trade, Gorgan, https://civilica.com/doc/913649
- Soltani, L., Ebrahimi, F. and Mohammadi Nezhad, Q., 2020. Marker association and genetic variation of agronomic traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using AFLP marker. Agricultural Biotechnology Journal, 12(2): 43-62. doi: 10.22103/jab.2020.14197.1139
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2005. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253. https://doi.org/10.4314/tjpr.v2i2.14607
- Uzunhisarcikli, M.E. and Vural, M., 2012. The taxonomic revision of Alcea and Althaea (Malvaceae) in Turkey. Turkish Journal of Botany, 36(6): 603-636. https://doi.org/10.3906/bot-1108-11
-Valiei, M., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower and root hexane extracts of *Althaea officinalis* in Northwest Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 5(32): 6972-6976. https://doi.org/10.5897/jmpr11.963
- Yadav, G.D. and Kamble, S.B., 2009. Synthesis of carvacrol by Friedel-Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 84(10): 1499-1508.