

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه *Ferula assa-foetida* L. در جنوب شرق ایران،  
با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

سعیده سرحدی پور<sup>1\*</sup>، محمدرضا نقوی<sup>2</sup>، امین باقی زاده<sup>3</sup>، داراب حسنی<sup>4</sup>

<sup>1</sup> کارشناس ارشد اصلاح نباتات، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران

<sup>2</sup> استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج، ایران

<sup>3</sup> دانشیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین المللی علوم محیطی و تکنولوژی پیشرفته کرمان، کرمان، ایران

<sup>4</sup> استادیار گروه باغبانی مرکز تحقیقات کشاورزی کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 93/7/4 ؛ تاریخ پذیرش: 93/11/15

### چکیده

آنگوزه (*Ferula assa-foetida* L.) گیاهی مرتعی متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) و بومی نواحی استپی ایران و بخش‌هایی از افغانستان است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما آنگوزه در جنوب شرق ایران (استان‌های کرمان و یزد) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت. برگ‌های تازه و جوان گیاه آنگوزه از 30 رویشگاه مختلف جمع‌آوری گردید. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته از برگ انجام شد. از 15 آغازگر تصادفی که در واکنش PCR استفاده شد، تعداد 10 آغازگر نوارهای بهتری تولید کردند. از این تعداد آغازگر، 118 قطعه چندشکل بدست آمد که براساس حضور یا عدم حضور در نواربندی هر جمعیت امتیازدهی شده و جهت آنالیز انتخاب شدند. ماتریس صفر و یک، توسط نرم‌افزار NTSYS-pc با استفاده از ضریب تشابه دایس به ماتریس فاصله تبدیل شد و سپس با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) دندوگرام مربوطه رسم شد. بر این اساس 30 جمعیت مورد بررسی در 5 گروه جایابی شدند. کلاستر حاصله تا اندازه‌ای با تنوع جغرافیایی همخوانی داشت. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نتایج تجزیه کلاستر تقریباً مشابه بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از تکنیک RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف جغرافیایی مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنگوزه، تنوع جغرافیایی، تنوع ژنتیکی، RAPD

\*نویسنده مسئول: saeedeh.sarhadipour@gmail.com

## مقدمه

شود. عصاره متانولی حاصل از ریشه‌های آنغوزه دارای اثر بازدارندگی بر روی فعالیت<sup>6</sup> HCV-PR می‌باشد (Hussein et al., 2000). برگ‌های این گیاه ضد کرم، ضد نفخ و معرق می‌باشد. همچنین ساقه به عنوان مقوی کبد و مغز استفاده می‌شود. صمغ آنغوزه برای سقط جنین و جلوگیری از بارداری مؤثر می‌باشد (Koerper and Kolls, 1999). آنغوزه همچنین سبب کاهش فشار خون و رقیق شدن خون می‌شود (Sambamurty, 2006). تکنیک RAPD از نوع نشانگر مبتنی بر PCR است که در سال 1990 توسط ویلیامز و همکاران ابداع شد. این تکنیک مبتنی بر تکثیر قطعات تصادفی DNA انجام می‌شود و نیازی به آگاهی و اطلاع از توالی DNA الگو نمی‌باشد (Agarwal et al., 2008; Maciel et al., 2001). در این روش بر خلاف سایر روشهای مبتنی بر PCR از آغازگر منفرد به طول 8 تا 10 نوکلئوتید که توالی آن به طور اختیاری تعیین می‌شود استفاده می‌گردد. هر آغازگر بخش قابل توجهی از یک مکان ژنی را تکثیر می‌نماید که به آن DNA چند شکلی تکثیر یافته (RAPD) می‌گویند (Williams, 1990). در تکنیک RAPD آغازگرهایی با طول 8 تا 10 نوکلئوتید به کار می‌رود و محصولات تکثیر شده که از توالی قطعات RAPD الگو گرفته است بر روی ژل آگارز، بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل تشخیص می‌باشند (Gupta, 2010). در این روش قطعات حاصل از RAPD ابتدا کلون و سپس توالی یابی می‌وند و از اطلاعات حاصل از توالی یابی، جهت طراحی و ساخت آغازگرها که به انتها قطعه RAPD به دست آمده مکمل باشد، استفاده می‌کنند.

آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.) یکی از گیاهان مرتعی است و اهمیت آن به سبب وجود ماده-ای است که از ریشه این گیاه استخراج می‌شود که ارزش دارویی و صنعتی دارد (عسکری، 1378). آنغوزه شیره گیاهی یا صمغ اولئورزینی است که از تیغ زدن ریشه یا پایین ساقه و یا قطع ساقه گیاهان مولد از ناحیه یقه گیاه خارج می‌شود. معمولاً هر سه روز یکبار ترشحات نرم و سفید آن جمع آوری میگردد که در مجاورت هوا، قهوه‌ای، سخت و ترد می‌شود (امیدبیگی 1383). بررسی میزان عناصر موجود در گیاه آنغوزه نشان داده است که عناصری از قبیل آهن، استرانسیم، روی و مس به میزان قابل توجهی در این گیاه موجود است (Toderich et al., 2002). بوی بد اسانس آنغوزه مربوط به ترکیبات سولفورهای  $C_{11}H_{20}O_2$  و  $C_7H_{14}S_2$  است. این اسانس در مقابل هوا به سرعت اکسیده می‌شود و شامل دو نوع ترین، پینن و یک سزکوئیترین با بوی لاوند و ترکیبات که مجموعاً 65 درصد آن را تشکیل می‌دهند نوع مرغوب آنغوزه دارای 62 درصد رزین، 25 درصد صمغ، 7-3 درصد اسانس، 1/28 درصد فرولیک اسید<sup>1</sup> آزاد و به مقدار بسیار جزئی وانیلین می‌باشد (زرگری، 1357). همچنین ترکیبات جدیدی نظیر آزاfoetidin<sup>2</sup>، فروکولیسین<sup>3</sup>، آزاfoetidinol A<sup>4</sup>، آزاfoetidinol B<sup>5</sup>، از گروه کومارین-های سزکوئیترینییدی از رزین صمغ آنغوزه جداسازی گردیده است (Bandyopadhyay et al., 2002). فعالیت پروتئاز ویروس هپاتیت C سبب تسهیل تکثیر ویروس هپاتیت C می‌-

- 1- Ferulic acid
- 2- Assafoetidin
- 3- Ferocolicin
- 4- Assafoetidinol A
- 5- Assafoetidinol B

6- Hcv protease

جدول 1- کد و منطقه جغرافیایی توده‌های جمع‌آوری شده آنگوزه از استان‌های کرمان و یزد

کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه	کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه
1	ماهان (کرمان)	16	محل جمع‌آوری نمونه مسینانشهر بابک (کرمان)
2	کرمان	17	هتکنزرنند (کرمان)
3	بیکران راین (کرمان)	18	معدنکو هگیچ چترود (کرمان)
4	اختیارآباد (کرمان)	19	دشت خاک زرنند (کرمان)
5	کوهبنان (کرمان)	20	خواجه گلی راور (کرمان)
6	راویز شهر بابک (کرمان)	21	سیرج (کرمان)
7	مهریز (یزد)	22	دودران راین (کرمان)
8	دورید (یزد)	23	نراب راین (کرمان)
9	درگاهان تفت (یزد)	24	طننج مهریز (یزد)
10	کوهپایه (کرمان)	25	فخر اباد (یزد)
11	باغبری (کرمان)	26	هنزا (یزد)
12	هینمان (کرمان)	27	تفت (یزد)
13	قلعه عسکر بافت (کرمان)	28	جیرفت (کرمان)
14	چترود (کرمان)	29	بردسیر (کرمان)
15	دارسینویه (کرمان)	30	سیرجان (کرمان)

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** برگ‌های تازه و جوان گیاه آنگوزه از 30 رویشگاه مختلف (جدول 1) در استان‌های کرمان و یزد انتخاب گردید تا نمونه‌های مناسبی از تغییر پذیری جمعیت در شرایط رویشگاهی مختلف فراهم گردد.

**استخراج DNA:** جهت استخراج DNA بسیاری از گیاهان از برگ گیاه استفاده می‌شود، در این آزمایش از برگ جوان گیاه آنگوزه برای استخراج DNA استفاده شد. باتوجه به اینکه برگ آنگوزه دارای مقادیری اسانس و متابولیت‌های ثانویه همراه با پروتئین‌های زیادی است، چندین دستورالعمل مختلف بمنظور ارزیابی استخراج مناسب مورد آزمایش قرار گرفت تا در نهایت روش (miniperp-CTAB) در قالب (Doyle, 1990) با تغییراتی در مراحل شست و شو DNA و میزان مواد، جهت استخراج مطلوب

DNA ژنومی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. مراحل روش مورد استفاده بدین شرح است که: ابتدا مقدار 10 گرم برگ تازه، جدا شده از هر نمونه با کمک ترازو دیجیتالی وزن شده و در داخل هاون کاملاً استریل به کمک ازت مایع به‌طور کامل پودر شده است. این مرحله چندین بار به سرعت و با دقت کافی انجام شد. سپس بلافاصله 1/5 MI از بافر استخراج‌گرا که به مدت 10 دقیقه در بن ماری 65 درجه سانتی‌گراد بوده است، به آن اضافه می‌کنیم و اجازه می‌دهیم به مدت 0/5 تا 1 ساعت در بن ماری 65 درجه سانتی‌گراد بماند. در این فاصله هر 5 دقیقه یک بار محلول را به آرامی سروته کرده تا بافر به تمامی سطوح نمونه دسترسی داشته باشد. بعد از آن سانتریفیوژ در 24 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه با دور 13000 rpm انجام، سپس مایعی که در قسمت بالا قرار گرفته را برداشته و در یک

یک مولار را با 0/2 میلی لیتر از 0/5 EDTA مولار ترکیب گردید و با افزودن آب مقطر دیونیزه حجم محلول به 100 میلی لیتر رسانده شد. سپس PH=8 تنظیم و محلول حاصل برای مصرف اتو کلاو گردید و در دمای اتاق نگهداری شد. سانتریفیوژ را در دور 13000 rpm به مدت 15 دقیقه انجام می دهیم. فاز روی را حذف کرده و رسوب بار دیگر با 1ml اتانول 70٪ شست و شو داده شد. اتانول را دور ریخته و رسوب را به مدت 0/5 ساعت گذاشته تا کاملاً خشک شود. در نهایت به آن 75 ماکرولیتتر TE اضافه شد. اگر DNA استخراجی خالص باشد به راحتی در TE حل می شود یک نمونه DNA خوب کاملاً شفاف و بدون هیچ گونه مواد زائد در داخل میکروتیوپ است.

**تعیین کمیت و کیفیت DNA:** جهت مشاهده چشمی وضعیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه DNAهای روی ژل آگارز 1/0 درصد انجام شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV در دستگاه Documentation Gel مشاهده شدند. در این روش شکستگی DNA در ژل آگارز قابل بررسی است DNA شکسته شده بر روی ژل آگارز به صورت لکه یا اسمیر و یا به صورت قطعه هایی با وزن مولکولی کم مشاهده می شود. کیفیت و کمیت DNA در انجام PCR اهمیت دارد. ناخالصی و وجود مواد باقیمانده از مرحله استخراج بر عمل و دقت این واکنش اثر می گذارد از این رو از روش اسپکترو فتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. برای انجام این کار از دستگاه اسپکترو فتومتر Carry50 ساخت کمپانی Varian استفاده شد. بدین منظور نمونه های با  $OD^{260/280} = 1/8-2$  که خلوص خوبی داشتند، انتخاب شدند. نسبت های کمتر از 1/8 نشان دهنده این است که نمونه ها از

میکروتیوپ تمیز ریخته و به همان مقدار ایزوآمیل الکل و کلروفرم (1:24) اضافه شد به مدت 15 دقیقه بادست خوب به هم می زنیم. به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد و دور 13000rpm سانتریفیوژ انجام شد. در این مرحله سه فاز مجزا تشکیل می شود که فاز رویی و شفاف حاوی اسیدهای نوکلئوتید است فاز وسطی حاوی پروتئین و فاز سوم حاوی کلروفرم است. مخلوط کلروفرم: ایزو آمیل الکل باعث ته نشین شدن پروتئین ها و پلی ساکاریدها می شود. به همین علت فاز رویی شفاف دیده می شود. با توجه به اینکه گیاه دارویی آغوزه دارای ترکیبات زیاد فنولی بود در این مرحله به میکروتیوپ های جدید SDS اضافه می کنیم. در این مرحله فاز رویی را به میکروتیوپ های جدید انتقال داده و مرحله قبل را بار دیگر به همان روش ذکر شده تکرار می شود. بسته به میزان پروتئین های موجود در مرحله استخراج می توان این مرحله را چندین بار انجام داد تا ناخالصی ها به طور کامل حذف شوند. مایع رویی را برداشته و به همان میزان NaCl با مولاریته 5 و دوبرابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد به مدت 24 ساعت در یخچال نگهداری می کنیم. در مرحله بعد در دمای اتاق با دور 13000 rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی را با دقت از روی رسوب برداشته و رسوب را برای دو بار به مدت 10 دقیقه با 1ml اتانول 70 درصد در دمای اتاق با دور 13000 سانتریفیوژ انجام شد. اتانول را حذف می کنیم و رسوب را به مدت 0/5 ساعت در دمای اتاق به صورت اریب گذاشته تا خشک شود. سپس مخلوط TE HCl 10Mm Tris-EDTA 1Mm pH=8 با ماکرولیتتر اضافه کرده به همراه 150 ماکرولیتتر استات سدیم 3M با PH=6.5 و 500 ماکرولیتتر ایزوپروپانول سرد مخلوط کرده و به مدت 24 ساعت در فریزر -20 قرار داده شد. برای تهیه بافر 1:10 TE یک میلی لیتر از Tris-Hcl

1- Optical density

در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه (یک سیکل) انجام شد 2- چهل سیکل در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر به مدت 1 دقیقه، بسط آغازگر دمایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه انجام شد 3- تکمیل بسط در دمایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 8 دقیقه (یک سیکل) انجام پذیرفت. پس از انجام PCR که بیش از 4 ساعت طول می‌کشد نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای 20- تا زمان انجام الکتروفورز نگهداری می‌شوند. به منظور بررسی تکرارپذیری نوارهای RAPD عمل PCR تحت شرایط یکسان به طور تصادفی بر روی برخی از DNAهای مورد نظر و برخی از پرایمرها دوباره انجام شد که تکرارپذیری باندها به واضح تائید شد (جدول 2).

لحاظ پروتئین، فنل و یا دیگر جذب کننده‌های UV ناخالصی دارند و نسبت‌های بالاتر از 2 نشان‌دهنده وجود RNA در محلول است. بنابراین نمونه‌های نامناسب دور ریخته شد و دوباره استخراج در این نمونه‌ها صورت گرفت. برای تعیین غلظت DNA از رابطه زیر استفاده شد:

$$50 \times \text{عکس‌رقت} \times \text{غلظت DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260}(\text{nm})$$

**دستورالعمل (PCR):** چرخه واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) به روش Wanntor و همکاران (2006) با اندکی تغییرات استفاده شد. تعداد 15 آغازگر تصادفی RAPD محصول شرکت سیناژن در این تحقیق استفاده شد. آنزیم Taq DNAPolymerase مخلوط، dNTPs، به اضافه PCR buffer (10 برابر غلظت)، و محلول MgCl<sub>2</sub> از شرکت سیناژن تهیه شدند. مقدار 1 μl از DNA الگو تهیه شده و مقدار 2 μl از MgCl<sub>2</sub> با غلظت 50 mM، مقدار 2/5 از dNTP با غلظت 2/5Mm مقدار 0/3 μl TaqDNAPolymerase با غلظت 5unit/μl مقدار 2 μl از پرایمر با غلظت 2 Mμ مقدار 2/5 μl از، PCR Buffer دارای غلظت 10 برابر KCl 500 mM و Tris-HCl (pH=8/4) و مقدار 14/7 μl آب دوبار تقطیر استریل بود. مخلوط 15 μl PCR در این تحقیق ترموسایکلرهای مورد استفاده مدل Mastercycler در نوع ساده و گرادینت ساخت کمپانی Eppendorf بودند. دمای اتصال بهینه برای هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادینت به دست آمد و به این ترتیب مشاهده شد که این دما به طور متوسط 5-7 درجه کمتر از دمای ذوب هر آغازگر است. برنامه دمایی PCR داده شده برای همه آغازگرها یکسان بود ولی قسمت متفاوت در آنها دمای اتصال آغازگر به DNA تک رشته بود. تکثیر بدین صورت انجام گرفت: 1- واسرشت آغازین DNA

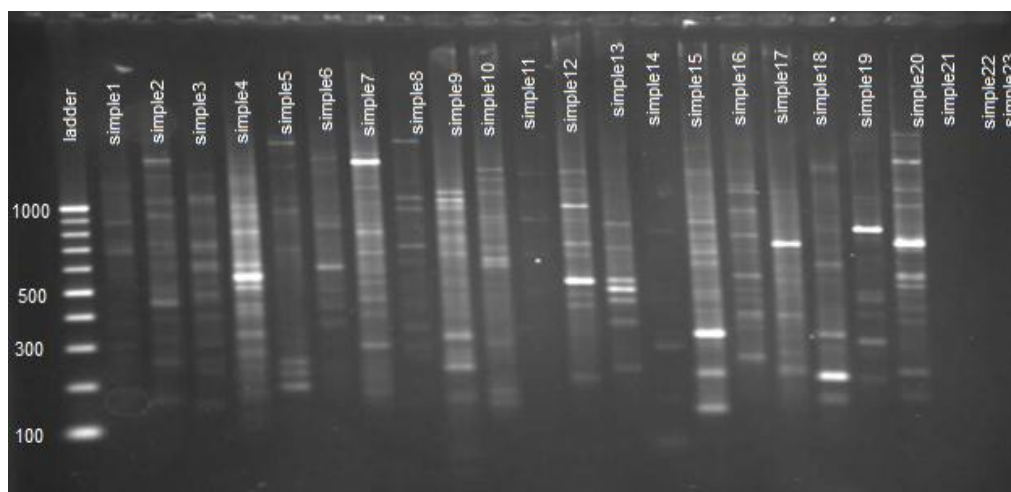
#### 1- Polymerase chain reaction

جدول 2- نام پرایمرهای RPD و توالی مربوط به آنها

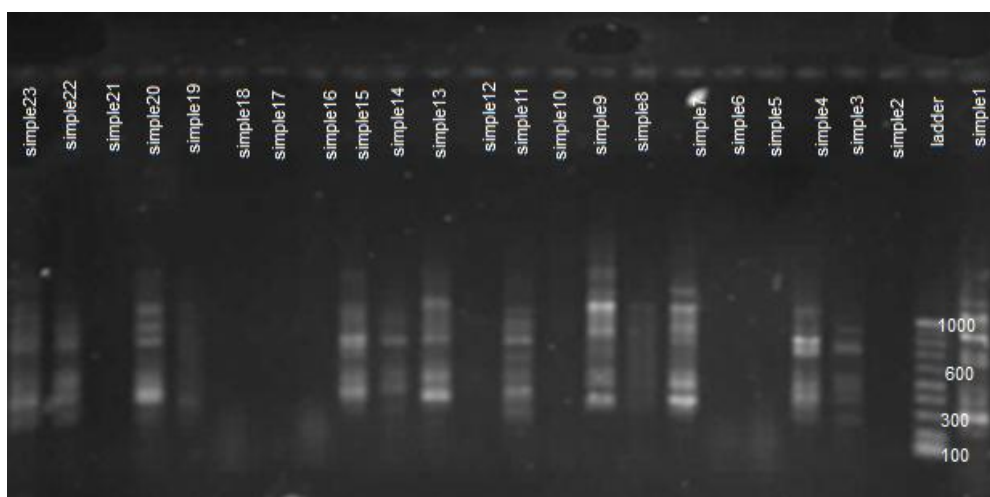
ردیف	نام پرایمر	توالی	دمای آنالینگ
1	OPNO1	CTCACGTTG(9)	32
2	OPDO3	GTCGCCGTC(9)	41/4
3	H	GGTCAACCCT(10)	32
4	TIBMB19	TTGCGGACA(9)	37
5	OPC12	TGTCATCCC(9)	41/4
6	398	CAGTGCTCTT(10)	30
7	TIBMBA14	CTTTGCGCA(9)	37/3
8	TiBMBA11	CCACCTTCA(9)	32
9	UBC9	CCTGCGCTTA(10)	37/3
10	OPK10	GTGCAACGT(9)	37

طول کشید تا ژل بسته شود) و برداشتن شانه، بافر TBE 1X، PH=8 را در داخل تانک دستگاه الکتروفورز ریخته، حدود 5 ماکرولیتر از نمونه‌ها با سمپلر به چاهک‌ها منتقل شدند. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق از نوع الکتروفورز افقی مدل E 132 از شرکت Consort بلژیک بود، که مدت run شدن 140 دقیقه بود. به منظور برآورد جرم مولکولی محصولات واکنش زنجیره پلی مرز از نشانگر (Ladder) تا اندازه 100bp تهیه شده از شرکت Fermentase به میزان 6 ماکرولیتر استفاده شد. ژلبا اتیدیوم بروماید (10µg/ml) به مدت 15 دقیقه رنگ آمیزی و بعد از شستشو، درون دستگاه Gel Documentaion مدل Syngene تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و در صورت مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل با فرمت‌های مختلف وسط نرم افزار Genesnap (Ver 6.08.04) عکس تهیه شد (شکل 1 و 2).

الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده حاصل از PCR: قطعات PCR برای هر پرایمر RAPD بر روی ژل آگاروز 1٪ (W/V) و بافر TBE با ولتاژ 99 به مدت 140 دقیقه انجام شد. محصولات PCR برای نشانگرها مختلف به نسبت 5 به 1 با بافر (Loading 6X) مخلوط شد. بافر (Loading dye 6X) از سه ماده گلیسرول (برای افزایش چگالی DNA نمونه)، بروموفنل بلو و زایلین سیانول (مواد رنگی هستند که با ایجاد نوارهای رنگی، پیشرفت نمونه در ژل الکتروفورز را نشان می‌دهند)، تشکیل شده است. برای تهیه ژل آگارز 1٪ به ترتیب 1 گرم از پودر آگارز در 100 میلی‌لیتر بافر TBE 1X، PH=8 در داخل یک ارلن مخلوط شد و به کمک حرارت حل گردید تا در نهایت محلول شفاف به دست آمد. سپس شانه الکتروفورز بر سینی مخصوص قرار گرفت و ژل در سینی ریخته شد و (پس از بستن ژل، 10-15 دقیقه



شکل 1- ژل الکتروفورز افقی محصول PCR حاصل از مطالعه RAPD گیاه آنغوزه با استفاده از پرایمر UBC9 مربوط به جمعیت‌های (استان کرمان و یزد).



شکل 2- ژل الکتروفورز افقی محصول PCR حاصل از مطالعه RAPD گیاه آنغوزه با استفاده از پرایمر OPDO3 مربوط به جمعیت‌های (استان کرمان و یزد).

اندازه باندهای چند شکل در هر آغازگر به‌عنوان یک متغیر مستقل در نظر گرفته شد. حضور یا عدم حضور هر کدام از باندهای مشاهده شده برای هر یک از 10 آغازگر به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند و بر این اساس در نرم‌افزار Excel یک ماتریس از اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. سپس داده‌ها به NEdit و بخش ورودی نرم‌افزار NTSYS انتقال داده شد.

از 15 آغازگر تصادفی تعداد 10 آغازگر که باندهای بهتری داشتند، جهت آنالیز انتخاب شدند. در ابتدا باندهای واضح را مشخص کرده و با توجه به اندازه نشانگر 100 bp استاندارد اندازه هر کدام از باندهای واضح در هر ستون زیر چاهک براساس طول و وزن مولکولی استاندارد مشخص شد. این عمل توسط نرم‌افزار (Genetools) در تمام ژل‌های مربوط به 10 آغازگر انجام پذیرفت. بدین ترتیب

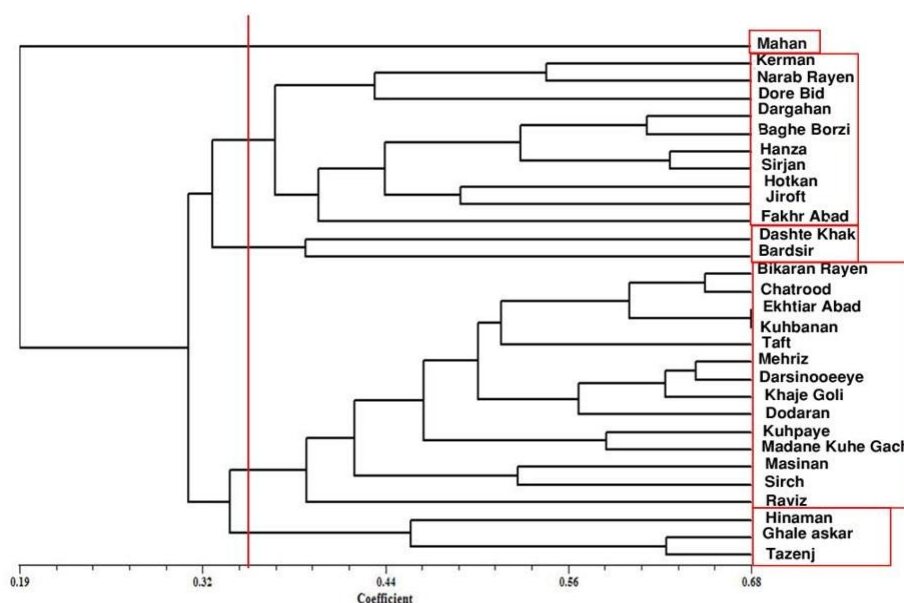
بابک، سیرچ، مسینان شهر بابک، کوه کچ چترود، کوهپایه، دودران راین، خواجه گلی راور، دارسینوییه، مهریز، تفت یزد، کوهبنان، اختیارآباد، بن در چترود، و بیکران راین، می‌شود، کلاس 3- در برگیرنده جمعیت‌های دشت خاک زرنند و بردسیر است و کلاس 4- شامل جمعیت‌های فخر آباد مهریز یزد، جیرفت، هتکن زرنند، سیرجان، هنزا مهریز یزد، باغ برزی، درگاهان تفت، دوربید، نراب راین و کرمان است و در کلاس 5- تنها جمعیت ماهان قرار دارد. کلاس 2- که بیشترین ژنوتیپ‌ها را شامل می‌شود به دو زیر گروه تقسیم می‌شود که زیر گروه اول شامل راوز شهر بابک است و زیرگروه دوم بقیه اجزاء به جز راوز شهر بابک را شامل می‌شوند. زیر کلاس 2 خود به چندین زیر گروه دیگر تقسیم می‌شود. بیشتر توده‌ها در کلاس شماره 2 متمرکز بودند که تنوع مولکولی اکثر این توده‌ها تا حد زیادی منطبق بر تنوع جغرافیایی بود. اما مواردی نیز وجود داشت که از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کردند. به‌عنوان مثال دو توده ماهان و کرمان گرچه از نظر جغرافیایی نزدیک به یکدیگرند اما از لحاظ مولکولی در دو کلاس جداگانه قرار گرفتند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نتایج مربوط به تجزیه کلاستر تا حد زیادی همخوانی داشت. البته در مورد برخی از توده‌ها تفاوت‌هایی وجود داشت. در پلات دو بعدی نیز 5 کلاس قابل مشاهده است (شکل 4).

ماتریس فاصله‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس به کمک نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) حاصل شد، تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) انجام شد و دندروگرام مربوطه بدست آمد. به‌منظور بررسی همبستگی بین دندروگرام و ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. همچنین آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام گرفت و پلات دو بعدی حاصل از دو مؤلفه اول آن رسم شد.

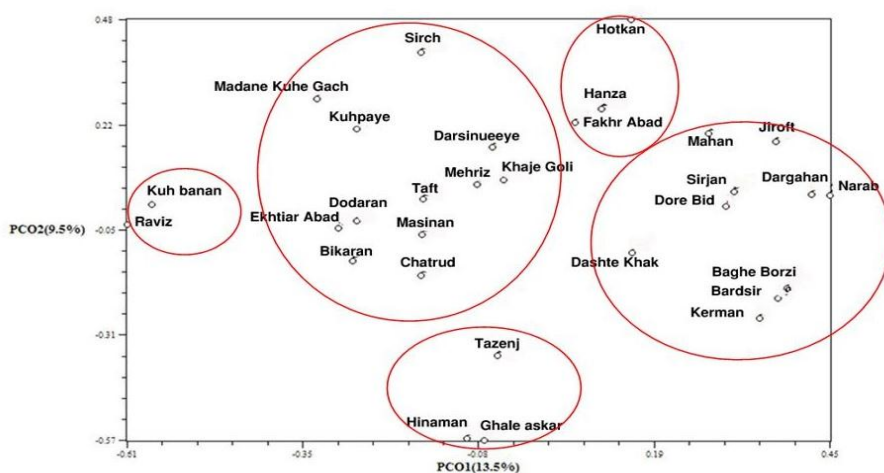
### نتایج

مجموعاً 127 قطعه DNA توسط 10 آغازگر انتخاب شده برای آنالیز، تکثیر شد که از بین آنها 9 قطعه در بین تمام 30 توده یک شکل بودند و 118 قطعه باقیمانده آنها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالایی قطععات چند شکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. تعداد قطععات تکثیرشده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگر UBC9 و کمترین مربوط به آغازگر OPCL2 بود. اندازه قطععات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده 1500-200 جفت باز تخمین زده شد. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر در سطح تشابه (0.35) 5 کلاس را نشان می‌دهد (شکل 3). در کلاس 1- جمعیت‌های هی نمان، قلعه عسکر و طرنج مهریز قرار گرفته است، کلاس 2- شامل جمعیت‌های راوز شهر





شکل 3- دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش (UPGMA) با قطعات بدست آمده از 10 آغازگر در مطالعه RAPD



شکل 4- نمودار رسته بندی 30 جمعیت مطالعه شده با استفاده از دو مولفه اول آنالیز PCA در مطالعه RAPD

تکثیر شده مربوط به آغازگر UBC9 و کمترین مربوط به آغازگر opc12 بود. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر در سطح تشابه (35٪) 5 کلاس را نشان می‌دهد که کلاس دو بیشترین ژنوتیپ‌ها را شامل می‌شود که تنوع مولکولی اکثر این توده‌ها تا حد زیادی منطبق بر تنوع جغرافیایی بود. دهقان کوهستانی و همکاران به بررسی تنوع ژنتیکی زیره سیاه استان کرمان پرداختند که در این تحقیق با

## بحث

در تحقیق حاضر تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD در میان توده‌های آنگوزه وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در میان جمعیت‌های بومی آنگوزه جنوب شرق ایران (کرمان و یزد) نشان داد. مجموعاً 127 قطعه DNA توسط 10 آغازگر انتخاب شده برای آنالیز، تکثیر شد، که از این تعداد آغازگر 118 قطعه چند شکل بدست آمد، بیشترین تعداد

نمونه مربوط به جمعیت‌های مختلف گونه آنغوزه در دو استان کرمان و یزد مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت و بدین منظور 10 آغازگر به کار برده شد که حاصل آن 127 قطعه چند شکلی بوده است. آنالیزهای انجام شده در ارتباط با حضور و عدم حضور این قطعات در نمونه‌ها تا اندازه‌های نشان دهنده تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف با تنوع جغرافیایی رویشگاه است و مجموع مطالعات انجام شده بر روی توده‌های آنغوزه نشان می‌دهد که نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین این توده‌ها مناسب بوده توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان داده و تودها را به خوبی گروه‌بندی نماید.

#### منابع

- 1- امیدبیگی، ر.، پیرمرادی، م.، و کریم‌زاده، ق. 1383. بررسی روش‌های مختلف تیغ‌زنی بر عملکرد و بقای گیاه دارویی آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.).
- 2- زرگری، ع. 1357. گیاهان دارویی (Vol. 2): دانشگاه تهران.
- 3- عسکری، ف. 1378. بررسی کمی و کیفی ترکیب‌های موجود در اسانس (*Ferula assa foetida*) موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تحقیقات گیاهان دارویی و معطر.
- 4- کوهستانی، س.د.، و باقیزاده، ا. 2008. بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما زیره [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch] استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 24(4).
- 5- مهدیخانی، ه. 1386. بررسی تنوع ژنتیکی بابونه (*Matricaria chamomile*) با استفاده از تکنیک RAPD پایان‌نامه کارشناسی ارشد.
6. Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4): 617-631.
7. Bandyopadhyay, D., Basak, B., Chatterjee, A., Lai, T.K., Banerji, A., Banerji, J. and Prangé, T. 2006. Saradaferin, a new sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assa*

استفاده از 23 آغازگر RAPD تعداد 47 جمعیت از گونه (*Bunium persicum*) مورد بررسی قرار گرفتند که براساس نتایج در 10 گروه قرار داده شدند (کوهستانی و باقیزاده، 2008). در مطالعه‌ای دیگر در بررسی ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی بابونه اروپایی براساس نشانگرهای ملکولی RAPD، 25 توده از گونه (*Matricaria chamomile*) شامل 20 توده بومی و 5 توده اروپایی با کمک 22 آغازگر مورد بررسی قرار گرفت که 15 آغازگر ایجاد چند شکلی نمودند و دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاصل، 5 گروه مجزا را تشکیل داده که نشان‌دهنده عدم تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی در این مطالعه بوده است (مهدی‌خانی، 1386). یاماگاشی و همکاران (2005) با استفاده از 25 آغازگر RAPD به شناسایی ارقام و روابط ژنتیکی بین گونه‌های خرمالو پرداختند. در مجموع 444 باند پلی مورفیک تشکیل شد (Yamagishi et al., 2005). منیرخان و همکاران در سال (2011) در پاکستان به بررسی ژرم پلاسما (*Brassica napus*) بر پایه مارکرهای ملکولی پرداخته و به این نتیجه رسیدند که مارکرهای ملکولی همانند RAPD توانایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی شلغم دارند (Khan et al., 2011).

#### نتیجه‌گیری نهایی

تکنیک RAPD توانست توده‌های بومی آنغوزه را از هم تفکیک کند و این روش ابزاری مناسب برای مطالعه تنوع درون توده ای آنغوزه است، در مجموع نتایج نشان می‌دهد که تنوع بالایی برای گونه‌های (*Frula assa-foetida*) بومی استان‌های کرمان و یزد حتی در اکوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد درک چنین تنوع ژنتیکی در مدیریت و حفاظت ژرم پلاسماهای آنغوزه مفید باشد. در مطالعه حاضر با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD تعداد 30

13. Murray, R.D. 2002. The naturally occurring coumarins Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (pp. 1-619): Springer.
14. Sambamurthy, A. 2006. Dictionary of Medicinal Plants: CBS Publishers & Distributors.
15. Toderich, K., Tsukatani, T., Black, C., Takabe, K., and Katayama, Y. 2002. Adaptations of plants to metal/salt contained environments: Glandular structure and salt excretion (Paper 552). *Kyoto, Japan: Kyoto Institute of Economic Research.*
16. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22):6531-6535.
17. Yamagishi, M., Matsumoto, S., Nakatsuka, A., and Itamura, H. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Scientia horticulturae*, 105(2): 283-290.
- foetida*. *Natural product research*, 20(10): 961-965.
8. Gupta, P. 2010. Elements of biotechnology: Rastogi Publications.
9. Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N., and Shimotohno, K. 2000. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytotherapy research*, 14(7): 510-516 .
10. Khan, W.M., Munir, I., Farhatullah, A. M, Iqbal, A., Ali, I., Ahmad, D., and Swati, Z. 2011. Assessment of genetic diversity of *Brassica juncea* germplasm using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(19): 3654-3658 .
11. Koerper, H., and Kolls, A. 1999. The silphium motif adorning ancient Libyan coinage: marketing a medicinal plant. *Economic botany*, 53(2):133-143.
12. Magiel, F., Gerald, L., and Echeverrigaray, S. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of south-Brazil. *Euphytica*, 120(2): 257-263.