دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۴-۱ (۱۳۸۸)

# بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

**محمد جواد یوسفی هریکنده‌ئی [۱*]، محمد اسماعیل حسنی [۲]، حسن مداح عارفی [۳] و متین محمدی‌پور [۴]**

۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی گیاهان باغی، گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج پست الکترونیک: javadyousefi_138@yahoo.com
۲ - استادیار گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳- استادیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران
۴- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۲۴

## چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۹ توده مختلف بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد. به این منظور از برگ‌های جوان، DNA ژنومی استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از ۱۶ آغازگر RAPD بر روی DNA ی ژنومی توده‌های مورد مطالعه انجام گردید و ۲۰۸ نوار باندی DNA تولید نمود که ۱۹۶ تا از(۹۴/۳۱٪) باندها چند شکلی نشان دادند. نوارهای باندی براساس وجود (۱) یا عدم وجود باند (۰) کد گذاری و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc تجزیه داده‌ها انجام شد. با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ماتریس تشابه توده‌ها محاسبه شد و بر اساس آن تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام و دندروگرام آن ترسیم گردید. در دندروگرام حاصل، توده‌های مورد مطالعه در ۴ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. در نهایت توده اصفهان بیشترین تفاوت را با سایر توده‌ها نشان داد، به طوری که در گروهی کاملاً مجزا قرار گرفت و بیشترین شباهت میان توده‌های رودبار- ۲ و سیاهکل- ۱ با میزان تشابه ۰/۸۰ مشاهده شد. به طور کلی نتایج این مطالعه وجود تنوع ژنتیکی در حد متوسطی را در بین توده‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین نتایج این تحقیق بیانگر آن است که RAPD روش مناسبی برای انگشت‌نگاری و ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان توده‌های بنگ‌دانه می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بنگ‌دانه، تنوع ژنتیکی، توده، نشانگر مولکولی، RAPD

## مقدمه

بنگ‌دانه با نام علمی *Hyoscyamus niger*، یکی از گیاهان شاخص تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) است که به دلیل خواص دارویی شگفت‌انگیز خود از سال‌ها پیش در طب سنتی کاربرد داشته است (Duke, 1989). اهمیت بالای این گیاه دارویی به دلیل وجود تروپان آلکالوئیدهایی هم چون هیوسیامین و آسکوپولامین می‌باشد که از اندام‌های مختلف این گونه استحصال می‌شود و از ارزش دارویی و اقتصادی بالایی برخورداراست. از جمله خواص دارویی تروپان آلکالوئیدها می‌توان به اثر آرام‌بخشی آنها بر دستگاه عصبی مرکزی، تسکین پارکینسون، لرزش‌های زمان پیری، خواب آور، آنتی‌اسپاسم، اثر بی‌حس‌کننده

Archive of SID
www.SID.ir

عمومی، بازکننده مردمک چشم[1] اشاره کرد (Chevalier, 1996 و Strauss, 1989). این گیاه با ارزش دارویی در بسیاری از نقاط کشورمان به صورت خودرو می‌روید، به طوری‌که Khatamsaz و همکاران (۱۹۹۸) ۱۳ گونه جنس *Hyoscyamus* را از ایران گزارش کرده‌اند که از این بین، ۷ گونه انحصاری ایران هستند و این موضوع نشان دهنده غنای ژرم‌پلاسم بنگ‌دانه در ایران است.

یکی از موارد بسیار مهم در زمینه کار با گیاهان دارویی، اهلی‌سازی این گیاهان است، به طوری که جنبه اقتصادی این مهم به شکل قابل توجهی مورد توجه دولت‌ها می‌باشد، از این حیث که سالانه مقادیر قابل ملاحظه‌ای ارز می‌تواند وارد کشورهای دارای این مقوله مهم مرتبط با گیاهان دارویی گردد. با این توصیف، در ایران هنوز هیچ‌گونه رقم زراعی برای کشت و کار معرفی نگردیده و برداشت آن همچنان از محل رویشگاه‌های طبیعی صورت می‌گیرد. در ارتباط با این موضوع بخش قابل توجهی از ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی با ارزش ممکن است از بین رفته و کشورمان را از مزایای استفاده از ارقام اصلاح شده با کمیت و کیفیت بالاتر محروم سازد. ارزیابی روابط و خویشاوندی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاهی در اجرای صحیح برنامه‌های اصلاحی از جمله گام‌های اولیه‌ایست که باید برداشته شود. همین طور اطلاعات کافی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی از جمله ملزومات یک برنامه اصلاحی موفق می‌باشد (Vejdani, 1997، Mirzaie-Nodoushan *et al,*. 2002 ، Bernath, 1996 ، Bernath, 1996). در ارتباط با این موضوع مهم، پراکنش قابل توجه (Khatamsaz, 1998) و بومی بودن بنگ‌دانه در ایران، بستر مناسبی را جهت اجرای هر چه بهتر برنامه‌های اصلاحی و به‌ویژه اهلی‌سازی این گیاه با ارزش فراهم کرده است.

پیشرفت‌های چشمگیر و قابل توجه در زمینه ژنتیک سلولی- مولکولی، ابداع انواع مختلف نشانگرهای ژنتیکی به‌ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA را به همراه داشته است که در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از نشانگرهای مهم نشانگر RAPD می‌باشد (Abdemishani, & Nejatboushehri, 1993، Gupta *et al.,* 1999 و Kumar, 1999) که به شکل موثری در بررسی تنوع و میزان قرابت ژنتیکی و به عبارتی دیگر ارزیابی پتانسیل موجود در ذخیره ژنی گونه‌های دارویی مختلف مثل انگشتانه (*Digitalis obscura* L.) (نبوئر و همکاران، ۱۹۹۹)، ریحان (*Ocimuum basilicum* L.) (De Masi *et al.,* 2006) مرزه (*Satureja hortensis* L.) (Hadian *et al.,* 2008) و زیره پارسی (*Bunnium persicum*) (Pezhmanmehr, 2008 و Majeed, 2005) مورد استفاده قرار گرفته است. تاکنون تحقیقات بسیاری در رابطه با بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در گیاهان خانواده Solanaceae با استفاده از نشانگرهای RAPD شده است. به طور نمونه Stedje و Ziraba (۲۰۰۳) تنوع ژنتیکی در ۱۸ جمعیت جنس *Solanum* شامل گونه‌های *S. anguivi* و*S. aethiopicum* را توسط نشانگرهای RAPD بررسی کردند. در این بررسی نمونه‌های مختلف این جنس براساس داده‌های حاصل از آزمایش ۱۶ آغازگر RAPD، توسط دندروگرام حاصله گروه‌بندی شدند و میزان تنوع ژنتیکی و دوری و نزدیکی آنها مطالعه شد.

یوسفی (۲۰۰۹) مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌هایی از بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) ایران را با استفاده از

1- Mydriatique

Archive of SID

www.SID.ir

روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار داد، به‌طوری که در بین توده‌های مورد بررسی تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی مشاهده شد و توسط دندروگرام حاصل در ۳ گروه طبقه‌بندی شدند. براساس نتایج بدست آمده از گروه‌بندی توده‌ها با استفاده از نشانگرهای پروتئین بذری، فواصل جغرافیایی توده‌ها (توده‌های دارای منشأ متفاوت) احتمالاً دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی توده‌ها نمی‌تواند باشد.

همچنین Sheidai و همکاران (۲۰۰۰) پروتئین‌های بذری ۱۲ گونه جنس *Hyoscyamus* از ایران را با استفاده از روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار دادند. در نهایت گونه‌های مورد مطالعه در ۳ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند.

بنا بر این به دلایل پراکنش قابل توجه و همچنین بومی بودن این گونه دارویی با ارزش، هدف از این مطالعه انگشت‌نگاری ژنتیکی برخی از توده‌های بنگ‌دانه ایران به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD می‌باشد با این امید که این تحقیق بتواند گامی هر چند کوچک در جهت اهلی‌سازی این گیاه دارویی با ارزش بردارد.

## مواد و روشها

### ۱- مواد گیاهی

برای انجام این تحقیق بذر مربوط به ۱۶ توده از بانک ژن منابع طبیعی ایران و بذر ۲ توده از شرکت پاکان بذر اصفهان و بذر یک توده نیز از شهرستان کاشمر (کوه‌سرخ) تهیه شد، پراکنش جغرافیایی توده‌های مورد مطالعه در شکل ۱ آمده است. پس از تیمار بذرها با هورمون جیبرلین و جوانه‌دار شدن آنها، گیاهک‌های حاصل در گلخانه گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی کرج کشت گردیدند. بعد از برگ‌های تازه آنها جهت استخراج DNA استفاده شد. لیست بنگ‌دانه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

**شکل ۱- پراکنش جغرافیایی ۱۹ توده بنگ‌دانه مورد استفاده در این مطالعه**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- توده‌های بنگ‌دانه (*H. niger*) مورد مطالعه

| شماره | نام توده | منبع |
|---|---|---|
| ۱ | رودبار- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۲ | سیاهکل- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۳ | مرکزی- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۴ | خلخال | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۵ | تالش- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۶ | ارومیه | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۷ | گلستان- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۸ | تالش- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۹ | سیاهکل- ۳ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۰ | قزوین- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۱ | قزوین- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۲ | سیاهکل- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۳ | فومن | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۴ | گلستان- ۲ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۵ | مرکزی- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۶ | رودبار- ۱ | بانک ژن منابع طبیعی ایران |
| ۱۷ | کاشمر | کاشمر، کوه‌سرخ |
| ۱۸ | شیراز | شرکت پاکان بذر اصفهان |
| ۱۹ | اصفهان | شرکت پاکان بذر اصفهان |

**۲- استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)**

از برگ‌های جوان براساس روش Sharp و همکاران (۱۹۸۸) DNA ژنومی استخراج شد. به منظور مشخص کردن میزان تغییرات ژنتیکی هر توده (جمعیت) DNA ۵ گیاه منتخب از هر توده پس از استخراج مخلوط شد و مورد تجزیه قرار گرفت. واکنش‌های PCR براساس روش Williams و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد. از ۵۵ آغازگر ده نوکلئوتیدی تصادفی سری‌های A، B، C، D و E شرکت ۱۶TIB MOLBIOL عدد براساس تعداد و ثبات قطعات تکثیر یافته انتخاب شدند (جدول۳). واکنش‌های PCR در حجمی معادل ۱۵ میکرولیتر (مخلوطی از ۱ میکرولیتر DNAژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر، ۱ میکرولیتر آغازگر تصادفی RAPD با غلظت ۰/۲ میکرومولار، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر سترون‌شده و ۷/۵ میکرولیتر کیت PCR) انجام شد. فرایندهای تکثیر[1] در دستگاه ترموسایکلر برنامه‌ریزی شده براساس جدول ۲ انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، محصول واکنش در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵٪ تهیه شده با بافرTBE[2]

1 -Amplification
2 -Tris Borate- EDTA

Archive of SID

www.SID.ir

بارگیری و به مدت ۱۴۰ دقیقه و شدت جریان ۷۰ ولت الکتروفورز شد. به منظور محاسبه اندازه قطعات حاصل، در هر ژل اولین چاهک سمت چپ به مارکر ۱kb اختصاص داده شد. پس از الکتروفورز به منظور رنگ‌آمیزی، ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (با رعایت احتیاط کامل به دلیل سمی و خطرناک بودن آن) قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر با استفاده از دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور UV نوارهای تکثیر یافته DNA مشاهده و عکس‌برداری شدند.

**جدول۲- زمان و دمای لازم برای ۳ مرحله (باز شدن، اتصال و بسط ) هر یک از دوره‌های حرارتی PCR**

| مرحله | مرحله انجام شده | تعداد دوره | زمان | درجه حرارت |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | شروع باز شدن رشته DNA | ۱ | ۴ دقیقه | ۹۴ |
| ۲ | تک رشته‌ای شدن DNA | | ۱ دقیقه | ۹۴ |
| | اتصال آغازگر | ۳۵ | ۱ دقیقه | ۳۷ |
| | بسط آغازگر | | ۲ دقیقه | ۷۲ |
| ۳ | تکمیل بسط | ۱ | ۱۰ دقیقه | ۷۲ |

**۳- محاسبات آماری**

در نوارهای باندی ایجاد شده در محدوده ۲۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز به حضور هر باند (عدد یک) و عدم حضور باند (عدد صفر) داده شد و پس از تهیه ماتریس صفر و یک، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc, Version 2.02 [1] (Rohlf, 1998) و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ماتریس تشابه توده‌ها محاسبه شد و براساس تجزیه خوشه‌ای حاصل از این ماتریس تشابه، دندروگرام به روش UPGMA ترسیم گردید.

## نتایج

حاصل آزمایش ۱۶ آغازگر RAPD بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، تکثیر ۲۰۸ نوار بود که ۱۹۶ نوار از آنها (۹۴/۳۱٪) چند شکلی نشان داده و تنها ۱۲ نوار (۵/۶۹٪) از کل نوارهای ایجاد شده، یک شکل [2] بودند (جدول۳).

میزان چند شکلی به دست آمده در الگوهای باندی در این تحقیق در حد متوسط بود. تعداد باندهای چند شکل حاصل از آغازگرهای RAPD در بین توده‌ها از ۶ تا ۱۷ باند متغیر بود که بیانگر قدرت متفاوت نشانگرها در شناسایی چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی است. در بین آغازگرها بیشترین نوار تکثیر شده توسط آغازگر TIBMBD-19 با ۱۷ نوار تکثیر شده ایجاد شد که ۱۵ عدد آنها چند شکل بودند و کمترین نوار تکثیر شده مربوط به آغازگر TIBMBD-16 با ۶ نوار تکثیر یافته بود که هر ۶ نوار چند شکل بودند. پروفیل باندی مربوط به دو آغازگر TIBMBE19 و TIBMBE-24 که چند شکلی مطلوبی را نشان دادند در شکل۲ و۳ آمده است.

1 -Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System

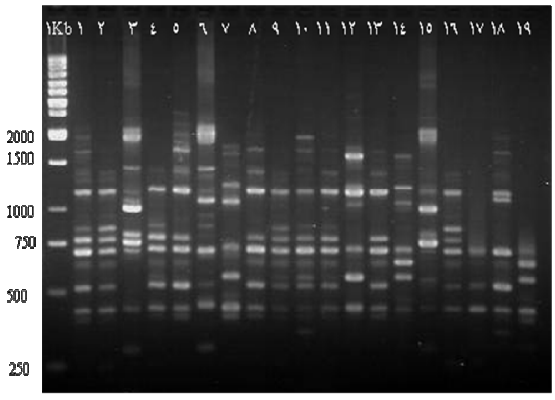
2 -Monomorph

Archive of SID

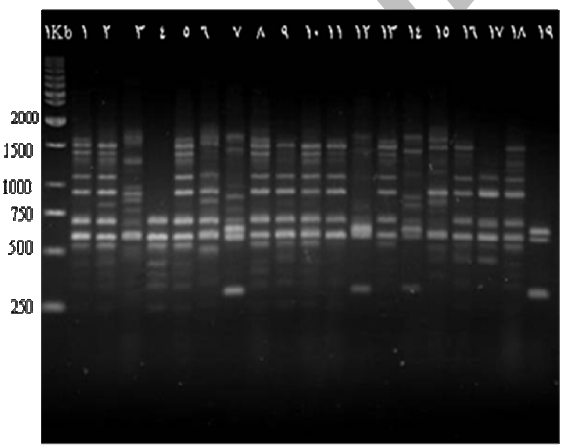
www.SID.ir

جدول۳- فهرست و مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده

| ردیف | آغازگر | توالی بازی | تعدادکل قطعات تکثیر شده (a) | تعداد قطعات چند شکل (b) | درصد چند شکلی ( b/a×۱۰۰) |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | TIBMBA-19 | 5´TGCTCGGCTC3´ | ۹ | ۹ | ۱۰۰ |
| ۲ | TIBMBA-13 | 5´GTGCGAGAAC3´ | ۱۴ | ۱۴ | ۱۰۰ |
| ۳ | TIBMBA-14 | 5´GGACGACCGT3´ | ۱۶ | ۱۵ | ۹۴ |
| ۴ | TIBMBA-20 | 5´GGAACTCCAC3´ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰۰ |
| ۵ | TIBMBB-10 | 5´CTTCGGTGTG3´ | ۱۲ | ۱۲ | ۱۰۰ |
| ۶ | TIBMBB-14 | 5´AAGTGCCCTG3´ | ۱۲ | ۱۱ | ۹۱ |
| ۷ | TIBMBC-03 | 5□´GGCTTGACCT3´ | ۱۶ | ۱۶ | ۱۰۰ |
| ۸ | TIBMBC-14 | 5´ACACCGTGCC3´ | ۱۳ | ۱۱ | ۸۵ |
| ۹ | TIBMBC-20 | 5´GGCTTGACCT3´ | ۱۵ | ۱۴ | ۹۳ |
| ۱۰ | TIBMBD-16 | 5´GAGGCGATTG3´ | ۶ | ۶ | ۱۰۰ |
| ۱۱ | TIBMBD-19 | 5´GAGGCGAGA3´ | ۱۷ | ۱۵ | ۸۸ |
| ۱۲ | TIBMBE-08 | 5´GGTCTTCCCT3´ | ۱۴ | ۱۴ | ۱۰۰ |
| ۱۳ | TIBMBE-12 | 5´AACGTCGAGG3´ | ۱۱ | ۹ | ۸۱ |
| ۱۴ | TIBMBE-18 | 5´CCTCCACCAG3´ | ۱۶ | ۱۵ | ۹۴ |
| ۱۵ | TIBMBE-19 | 5´CTGGTGCTCA3´ | ۱۲ | ۱۰ | ۸۳ |
| ۱۶ | TIBMBE-24 | 5´GAGCGTAATC3´ | ۱۵ | ۱۵ | ۱۰۰ |
| میانگین | – | – | ۱۳ | ۱۲.۲۵ | ۹۴/۳۱ |
| کل | – | – | ۲۰۸ | ۱۹۶ | – |




شکل۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی توده‌های بنگ‌دانه (۱ تا ۱۹) توسط آغازگر TIBMBE19




شکل۳- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی توده‌های بنگ‌دانه (۱ تا ۱۹) توسط آغازگر TIBMBE-24

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول۴- ماتریس تشابه توده‌های *H. niger* مبتنی بر نشانگر RAPD**

| توده بذری | | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | ۱۱ | ۱۲ | ۱۳ | ۱۴ | ۱۵ | ۱۶ | ۱۷ | ۱۸ | ۱۹ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | رودبار-۲ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۲ | سیاهکل-۱ | ۰/۸۰ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۳ | مرکزی-۲ | ۰/۳۷ | ۰/۳۸ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۴ | خلخال | ۰/۶۱ | ۰/۶۳ | ۰/۳۲ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۵ | تالش-۱ | ۰/۷۴ | ۰/۷۴ | ۰/۴۵ | ۰/۵۷ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | |
| ۶ | ارومیه | ۰/۵۰ | ۰/۵۴ | ۰/۴۹ | ۰/۳۹ | ۰/۴۴ | ۱ | | | | | | | | | | | | | |
| ۷ | گلستان-۱ | ۰/۴۱ | ۰/۴۳ | ۰/۴۳ | ۰/۳۳ | ۰/۳۵ | ۰/۴۱ | ۱ | | | | | | | | | | | | |
| ۸ | تالش-۲ | ۰/۷۷ | ۰/۷۳ | ۰/۴۷ | ۰/۵۸ | ۰/۸۰ | ۰/۴۹ | ۰/۳۷ | ۱ | | | | | | | | | | | |
| ۹ | سیاهکل-۳ | ۰/۷۸ | ۰/۷۸ | ۰/۴۳ | ۰/۶۸ | ۰/۷۲ | ۰/۵۱ | ۰/۳۸ | ۰/۷۷ | ۱ | | | | | | | | | | |
| ۱۰ | قزوین-۲ | ۰/۶۹ | ۰/۷۰ | ۰/۴۸ | ۰/۵۸ | ۰/۷۲ | ۰/۴۸ | ۰/۴۱ | ۰/۷۵ | ۰/۷۷ | ۱ | | | | | | | | | |
| ۱۱ | قزوین-۱ | ۰/۶۸ | ۰/۶۷ | ۰/۴۵ | ۰/۵۳ | ۰/۶۸ | ۰/۴۷ | ۰/۴۳ | ۰/۶۸ | ۰/۷۶ | ۰/۶۷ | ۱ | | | | | | | | |
| ۱۲ | سیاهکل-۲ | ۰/۴۳ | ۰/۴۳ | ۰/۳۸ | ۰/۴۵ | ۰/۴۶ | ۰/۳۶ | ۰/۵۹ | ۰/۴۲ | ۰/۴۴ | ۰/۴۵ | ۰/۳۹ | ۱ | | | | | | | |
| ۱۳ | فومن | ۰/۷۱ | ۰/۷۰ | /۴۶ | ۰/۵۰ | ۰/۸۰ | ۰/۵۰ | ۰/۴۲ | ۰/۷۶ | ۰/۷۲ | ۰/۶۹ | ۰/۷۲ | ۰/۴۰ | ۱ | | | | | | |
| ۱۴ | گلستان-۲ | ۰/۴۰ | ۰/۳۷ | ۰/۴۳ | ۰/۳۳ | ۰/۳۴ | ۰/۴۷ | ۰/۷۲ | ۰/۳۹ | ۰/۴۳ | ۰/۴۴ | ۰/۴۰ | ۰/۵۸ | ۰/۳۶ | ۱ | | | | | |
| ۱۵ | مرکزی-۱ | ۰/۴۰ | ۰/۴۳ | ۰/۵۲ | ۰/۳۳ | ۰/۵۱ | ۰/۴۹ | ۰/۳۹ | ۰/۴۵ | ۰/۴۶ | ۰/۴۹ | ۰/۴۳ | ۰/۳۳ | ۰/۴۸ | ۰/۳۹ | ۱ | | | | |
| ۱۶ | رودبار-۱ | ۰/۶۶ | ۰/۶۸ | ۰/۳۹ | ۰/۶۷ | ۰/۶۱ | ۰/۴۸ | ۰/۳۶ | ۰/۶۵ | ۰/۷۵ | ۰/۵۸ | ۰/۶۷ | ۰/۴۱ | ۰/۶۱ | ۰/۳۹ | ۰/۴۵ | ۱ | | | |
| ۱۷ | کاشمر | ۰/۴۹ | ۰/۴۴ | ۰/۲۵ | ۰/۵۰ | ۰/۳۹ | ۰/۳۹ | ۰/۲۹ | ۰/۴۶ | ۰/۵۶ | ۰/۴۴ | ۰/۴۹ | ۰/۳۲ | ۰/۴۲ | ۰/۲۹ | ۰/۲۶ | ۰/۶۱ | ۱ | | |
| ۱۸ | شیراز | ۰/۶۵ | ۰/۶۸ | ۰/۴۵ | ۰/۵۲ | ۰/۶۹ | ۰/۵۱ | ۰/۴۴ | ۰/۷۳ | ۰/۶۸ | ۰/۷۰ | ۰/۶۸ | ۰/۴۱ | ۰/۷۳ | ۰/۴۱ | ۰/۴۵ | ۰/۶۱ | ۰/۴۳ | ۱ | |
| ۱۹ | اصفهان | ۰/۳۰ | ۰/۲۵ | ۰/۲۹ | ۰/۴۱ | ۰/۲۳ | ۰/۲۶ | ۰/۴۳ | ۰/۲۷ | ۰/۳۳ | ۰/۲۹ | ۰/۳۳ | ۰/۳۸ | ۰/۲۴ | ۰/۴۱ | ۰/۲۴ | ۰/۳۶ | ۰/۳۲ | ۰/۲۸ | ۱ |

Archive of SID

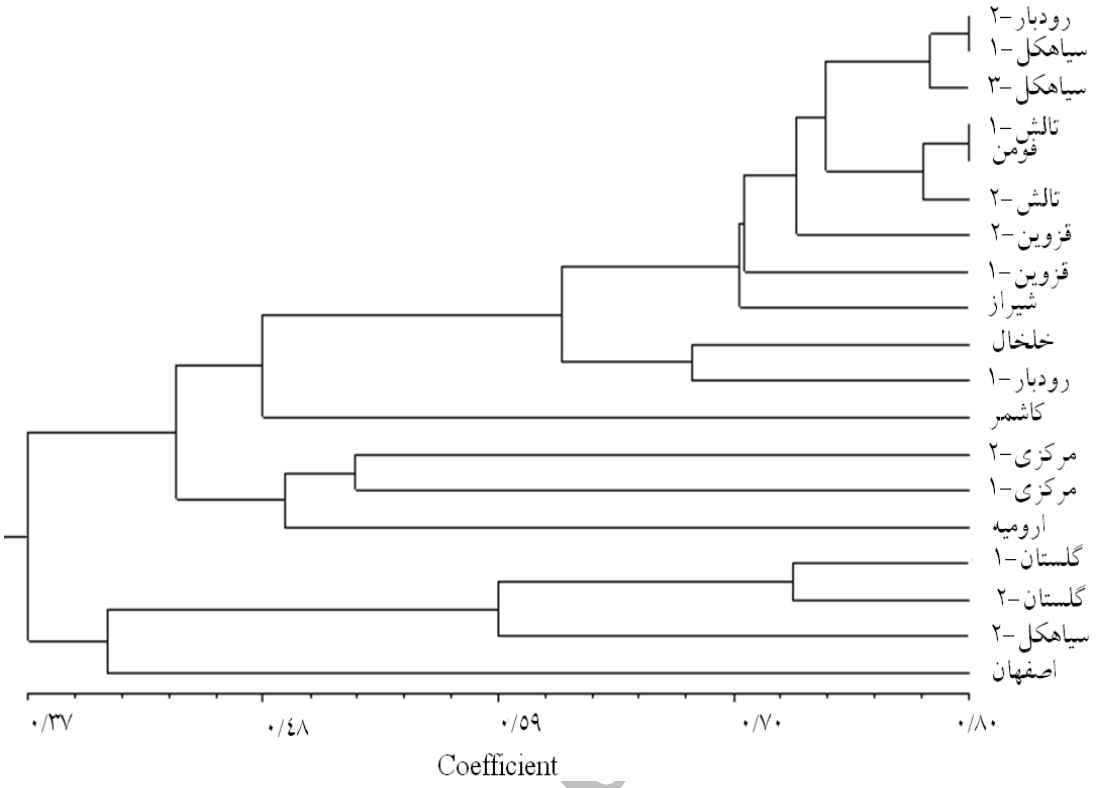
www.SID.ir

استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان توده‌های مورد بررسی بسیار مؤثر باشد. بررسی ماتریس تشابه در این مطالعه (جدول۴) نشان می‌دهد که بیشترین تشابه بین دو نمونه بنگ‌دانه جمع‌آوری شده از رودبار- ۲ و سیاهکل- ۱ با میزان تشابه ۸۰٪ و کمترین تشابه نیز بین بنگ‌دانه فومن و اصفهان با میزان تشابه ۲۳٪ وجود دارد که به‌ترتیب نشان‌دهنده میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این توده‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد. به عبارت دیگر میزان تشابه محاسبه شده در بین توده‌های بنگ‌دانه، براساس باندهای چند شکل در گستره‌ای از ۰/۲۳ تا ۰/۸۱ قرار داشت و میانگین تشابه نیز برابر ۰/۵۲ بود.

بررسی نتایج به صورت دندروگرام و نمودارهایی که تجزیه و تحلیل سریع و آسان را ممکن می‌سازد روش سودمندی است. با استفاده از دندروگرام حاصل (شکل۴)، در ضریب مشابهت ۰/۴۰ توده‌های مورد مطالعه در ۴ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند؛ گروه اول شامل توده‌های: رودبار- ۲، سیاهکل- ۱، سیاهکل- ۳، تالش- ۱، فومن، تالش- ۲، قزوین- ۲، قزوین- ۱، شیراز، خلخال، رودبار- ۱، کاشمر، گروه دوم شامل توده‌های: مرکزی- ۲، مرکزی- ۱، ارومیه، گروه سوم شامل توده‌های: گلستان- ۱، گلستان- ۲، سیاهکل- ۲ و گروه چهارم شامل توده اصفهان می‌باشد که این توده در یک دسته کاملاً مجزا نسبت به توده‌های دیگر قرار گرفت. از آنجایی که در دندروگرام مشخص است، گروه‌بندی توده‌های بنگ‌دانه توسط دندروگرام، تنوع ژنتیکی در حد متوسطی را در توده‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. همان طور که در دندروگرام مشخص است بیشتر توده‌های بنگ‌دانه جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف استان گیلان (به غیر از توده سیاهکل- ۲ و رودبار- ۱) تقریباً در کنار یکدیگر و در دسته‌های مجاور قرار گرفته‌اند. این موضوع در مورد توده‌های مربوط به استان قزوین، گلستان و مرکزی نیز دیده می‌شود، به طوری که توده‌های مربوط به استان‌های یاد شده در گروه و زیر گروه‌هایی نزدیک به هم دسته‌بندی شدند. همچنین گروه‌بندی بیشتر توده‌های استان گیلان در کنار هم و در کنار توده‌های استان قزوین ممکن است حاکی از شباهت‌های موجود در بین آنها باشد. قرار گرفتن توده مربوط به استان فارس (شیراز) در نزدیکی توده‌های استان قزوین احتمالاً نیز نشانگر همین موضوع است.

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل۴- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر داده‌های ۱۹توده بنگ‌دانه براساس ماتریس تشابه حاصل از RAPD**

قرار گرفتن توده‌های اصفهان و کاشمر با میزان تشابه به‌ترتیب ۰/۴۰ و ۰/۴۸ در گروه و زیرگروه مجزا حاکی از تفاوت این توده‌ها با هم و همچنین با سایر توده‌هاست. گروه‌بندی توده‌های گلستان- ۱، گلستان- ۲ و سیاهکل- ۲ نیز در یک گروه و با تفاوت نسبتاً زیاد نسبت به سایر توده‌ها شباهت این سه توده را نسبت به هم و تفاوت نسبتاً بالای آنها را نسبت به سایر توده‌ها نشان می‌دهد. همچنین دندروگرام مربوطه نشان می‌دهد که توده ارومیه نیز با تفاوتی نسبتاً زیاد و در ضریب مشابهت ۰/۴۹ نسبت به توده‌های دیگر در زیرگروهی مجزا گروه‌بندی شده است. در این تحقیق ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام $r$=۰/۹۲ می‌باشد که نشان می‌دهد روش UPGMA در این مورد روش مناسبی بوده است.

## بحث

ارزیابی تنوع در مجموعه‌ای از ژرم‌پلاسم‌های گیاهی گامی مهم در برنامه‌های اصلاحی و نیز مدیریت ژرم‌پلاسم به حساب می‌آید. در این راستا برآورد تنوع ژنتیکی در یک جامعه گیاهی، به شکل قابل توجهی به در دسترس بودن ابزار و تکنیک‌هایی برای یک محقق و اینکه چطور این ابزار و تکنیک‌ها با برنامه‌های اصلاحی مورد نظر همسو باشند، بستگی دارد. از طرف دیگر انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب هم در طبیعت و هم بطور مصنوعی وسیعتر می‌شود. با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی در آن، رابطه مشابهی بین کارآیی بهبود ژنتیکی اصلاح یک جامعه

Archive

www.SID.ir

و تنوع ژنتیکی برای صفت مورد علاقه موجود است. بنابراین حفظ و نگهداری ذخائر ژنتیکی ضروریست (Rout & Chrungoo 2007، Abdi & Maddah-Arefi, 2002 و Bernath, 2002).

نتایج این بررسی حاکی از تنوع ژنتیکی در حد متوسط در بین توده‌های مورد مطالعه بود. چند شکلی قابل ملاحظه‌ای در الگوهای باندی به دست آمد که بیانگر مناسب بودن تکنیک RAPD به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های مختلف بنگ‌دانه می‌باشد. همچنین نتایج این آزمایش تا حد زیادی مطابقت تنوع جغرافیایی با تنوع مولکولی به دست آمده از داده‌های RAPD را نشان داد (دسته‌بندی بیشتر توده‌های استان گیلان در کنار هم و نیز توده‌های استان گلستان، مرکزی و قزوین گواه همین موضوع است) که ممکن است بیانگر قرابت‌های ژنتیکی و خویشاوندی‌های احتمالی موجود بین برخی از توده‌های مورد مطالعه باشد. بطور نسبی مشابه با غالب نتایج بدست آمده در این مطالعه، Majeed (۲۰۰۵)، Hadian و همکاران (۲۰۰۸) بر پایه دندروگرام حاصل از نشانگرهای RAPD، به‌ترتیب دسته‌بندی توده‌های زیره پارسی و مرزه متعلق به نقاط جغرافیایی مشابه را در گروه و زیرگروه‌های نزدیک به هم گزارش نمودند.

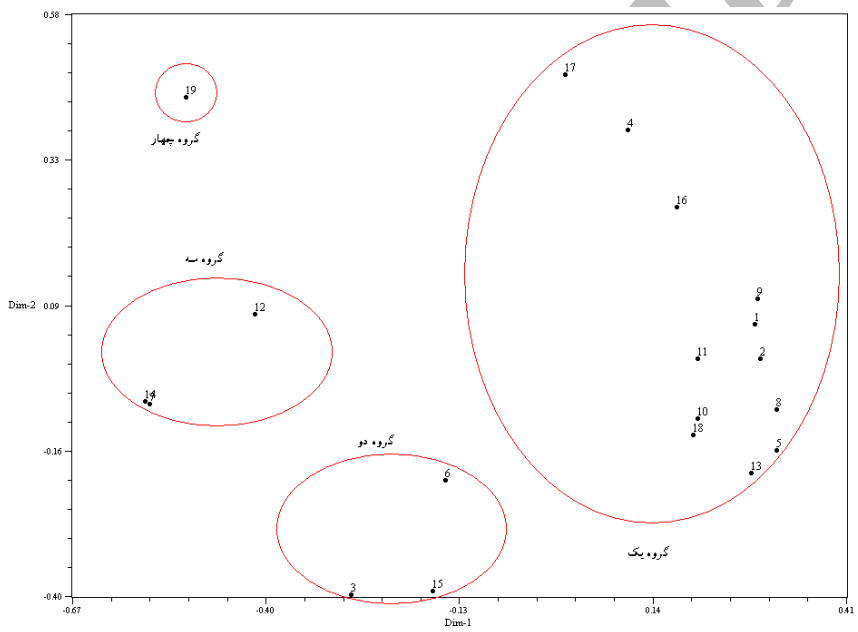
در برخی از موارد، بخش‌های کوچکی از دندروگرام عدم مطابقت تنوع جغرافیایی با تنوع مولکولی به دست آمده از داده‌های RAPD را نشان داد. به عنوان مثال، نمونه سیاهکل- ۲ در دسته‌ای کاملا متفاوت و دور از دیگر نمونه‌های استان گیلان قرار گرفته است و از سوی دیگر نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نسبتا دور می‌باشند مانند خلخال و رودبار- ۱ با میزان تشابه ۶۷٪ در دندروگرام در یک زیرگروه و در کنار هم دسته‌بندی شده‌اند. همچنین قرار گرفتن برخی از توده‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های یک استان در گروه و زیرگروه‌های مجزا و همچنین گروه‌بندی توده‌های برخی استان‌ها در مجاورت هم ممکن است ناشی از جابجایی ژرم‌پلاسم، تعداد کم پرایمرهای RAPD و یا احتمالاً بخاطر پراکنش وسیع این گونه در ایران باشد. از طرف دیگر توده‌هایی که از رویشگاه‌های مختلف یک استان جمع‌آوری شده و در دندروگرام در دسته‌های مجاور هم گروه‌بندی شده‌اند این احتمال نیز وجود دارد که نشانگرهای RAPD نتوانسته آنها را از هم تفکیک کند (ممکن است با استفاده از نشانگرهای مولکولی با دقت و تکرارپذیری بالاتر از هم تفکیک شوند). محققانی نظیر Pezhmanmehr (۲۰۰۸)، Nebauer و همکاران (۱۹۹۹)، De Masi و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعاتشان به‌ترتیب بر روی تنوع ژنتیکی زیره پارسی، گل انگشتانه و ریحان با استفاده از نشانگرهای RAPD گزارش کردند که ارتباط ضعیفی بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی حاصل از مطالعات ژنتیکی در بین توده‌های مورد مطالعه وجود دارد که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد. با توجه به توضیحاتی که در بالا به آن اشاره شد براساس نتایج بدست آمده از طبقه‌بندی توده‌های مورد مطالعه (همبستگی نسبی بین توده‌های بنگ‌دانه از نظر پراکنش جغرافیایی) با استفاده از نشانگرهای RAPD، به احتمال زیاد فواصل جغرافیایی توده‌ها می‌تواند دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی آنها باشد و در برنامه‌های به‌نژادی که نیاز به تنوع ژنتیکی بالایی باشد، گزینش بر مبنای تنوع جغرافیایی احتمالاً به نتیجه خواهد رسید.

تجزیه به مختصات اصلی (PCO) براساس داده‌های مولکولی یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را

Archive of SID

www.SID.ir

می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد بکار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. همچنین مولفه‌های PCO نشان‌دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشند. آرایش تجمعی توده‌های بنگ‌دانه با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر RAPD در شکل۵ نشان داده شده است. توزیع توده‌ها در این نمودار مطابق با توزیع توده‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل در این آزمایش می‌باشد و در واقع ابزار دیگری جهت نشان دادن پراکنش توده‌هاست که می‌تواند به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به شمار رود. همچنین دو مؤلفه اول، یعنی PCO1 و PCO2 به ترتیب برابر با ۲۱/۱۱٪ و ۱۲/۴۹٪ (مجموعاً ۳۳/۶۱٪) از واریانس کل را بیان کردند. یعنی نشانگرهای RAPD مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده‌اند و در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بنگ‌دانه مناسب عمل کرده‌اند.




**شکل۵- پلات دو بعدی مختصات اصلی (PCO) توده‌های بنگ‌دانه براساس نشانگرهای RAPD**

همان طور که در بالا اشاره شد، با توجه به احتمال ناکارآمدی تعداد کم نشانگرهای RAPD در گروه‌بندی برخی از توده‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های یک استان، این نیاز وجود دارد که با بکارگیری نشانگرهای دیگر DNA با دقت و تکرارپذیری بالاتر مثل AFLP یا SSR یا نشانگرهایی مثل آیزوزایم‌ها اطلاعات بیشتر و دقیقتری در ارتباط با میزان تنوع موجود در بین توده‌های مختلف بنگ‌دانه به دست آید. به طور کلی نتایج این تحقیق ثابت کرد که نشانگر مولکولی RAPD ابزار مناسبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در بین توده‌های بنگ‌دانه بوده و در برنامه‌های اصلاحی بنگ‌دانه جهت تعیین سریع، دقیق و صحیح تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی این گیاه دارویی قابل توصیه است.

Archive of SID

www.SID.ir

در پایان، با توجه به بومی بودن و پراکنش قابل توجه بنگ‌دانه در ایران، برای کارهای تحقیقاتی تکمیلی پیشنهادهای زیر ارائه می‌شوند:

۱- تحقیقات در زمینه اهلی‌سازی این گیاه ارزشمند در کشور ضروری به نظر می‌رسد.

۲- تحقیقات وسیعتر ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی با کارایی بیشتر مثل AFLP، SSR و آیزوزایم‌ها در جهت تعیین تنوع و گروه‌بندی دقیقتر آن می‌تواند بسیار سودمند باشد.

۳- بررسی تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مطالعات مرفولوژیکی، می‌تواند اطلاعات جامعتری در این زمینه در اختیار محققان قرار دهد.

## سپاسگزاری

از مسئولان بانک ژن منابع طبیعی ایران، بدلیل در اختیار گذاشتن ژرم‌پلاسم گیاهی، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارد.

## منابع مورد استفاده

- Abdemishani, S., Nejatboushehri, A., 1993. Supplementary Plant Breeding. University of Tehran Press. Vol (2), 335p.
- Abdi, N., Maddah-Arefi, H., 2002. Study of variation and seed deterioration of *Bromus tomentollus* germplasm, in natural resources genbank. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 7: 1-25.
- Bernath, J., 1996. Conventional breeding methods and their effectiveness in selection of medicinal and aromatic plants. In: Proceeding of the First International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg. pp. 154–161.
- Bernath, J., 2002. Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. Proc. Int. Cont. MAP. Acta Hortic. 576, 65– 68.
- Chevalier, A., 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants. Doring Kindersley, London. 219p.
- De Masi, L., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F., Laratta, B., 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). Eur. Food Res. Technol. 223: 273–281.
- Duke, J. A., 1989. Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, 7 Edition, Pp 240-241.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C. & Ramesh, B., 1999. Review of molecular markers and their application in wheat breeding. Plant Breeding, 118: 369-390.
- Hadian, J., Tabatabaei, S.M.F., Naghavi, M.R., Jamzad, Z., Ramak-Masoumi, T., 2008. Genetic diversity of Iranian of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. Sci. Hort. 115, 196-202.
- Khatamsaz, M., 1998. Flora of Iran (*Solanaceae*). Forest and Rangelands Research Institute Publication, Tehran.
- Kumar, L. S., 1999. DNA markers in plant improvement. Biotechnology Advances, 17: 143-183.
- Majeed, S., 2005. Assessment of genetic diversity and in-vitro conservation in *Bunium persicum* (Bioss) B. Fedtsch. Ph.D Thesis-Pakistan, Uinvesity of Islamabad.
- Mirzaie-Nodoushan, H., Shariat, H., Asadi-Corom, F.,2002. Evaluation of existing genetic variation in different populations of *Haloxylon* spp. Using electrophoresis technique. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 7: 99-117.
- Nebauer, S.G., Del Castillo-Agudo, L., Segura, J., 1999. RAPD variation within and among natural population of out crossing willow-leaved Foxglove (*Digitalis obscura* L.). Theoretical and Applied Genetics. 105: 985–994.
- Pezhmanmehr, M., 2008. Genetic diversity of *Bunium persicum* using RAPD markers. M.Sc. Thesis. University of Tehran.
- Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.00. Exeter Software, Setauket, NY.
- Rout, A., Chrungoo, N.K., 2007. Genetic variation and species relationships in Himalayan buckwheats as revealed by SDS PAGE of endosperm proteins extracted from single seeds and RAPD based DNA fingerprints. Genet. Resour. Crop. Evol . 54: 767–777.
- Sharp, P.J., Kreis, M., Shewry, P.R., Gale, M.D., 1988. Location of β-amylase sequences in wheat its relatives. Theoretical and Applied Genetics, 75: 289-290.

Archive of SID

www.SID.ir

national crop and plant breeding science congress. Faculty of Agriculture of Isfahan. 544-577p. Proc. Int. Cont. MAP. Acta Hortic. 576: 65–68.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.E., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.C., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 118: 6531–6535.
- Yousefi, M.J., 2009. Evaluation of genetic diversity of some Iranian black henbane accessions (*Hyoscyamus niger*) based on RAPD markers and seed proteins fingerprinting. M. Sc. Thesis. University of Tehran.
- Sheidai, M., Khatamsaz, M., Mosallanejad, M., 2000. Numerical taxonomy and seed protein analysis of *Hyoscyamus* species in Iran. Journal Science of Iran, 11: 87- 93.
- Stedje, B., Ziraba, R.B., 2003. RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. And *S. aethiopicum* L. (Solanaceae) in Uganada. Euphytica, 131: 293-297.
- Strauss, A., 1989. *Hyoscyamus niger* spp: *in vitro* culture and the production of tropane alkaloids. In: Bajaj, Y.P.S (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Foresty (Medicinal and Aromatic Plants II), Vol. 7. Springer Verlag, pp. 286-314.
- Vejdani, P., 1997. Importance of methods of conservation of plant genetic resources. Fourth

Archive of SID

www.SID.ir

# Evaluation of genetic diversity of several accessions of Iranian *Hyoscyamus niger* L. based on RAPD markers

**M.J. Yousefi*[1], M.E. Hassani[2], H. M.Arefi[3] and M. Mohammadipour[4]**

1- Corresponding Author, Former M.Sc in Department of Horticultural Sciences, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj *E-mail*: javadyousefi_138@yahoo.com
2– Assis. Prof., Department of Horticultural Sciences, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran.
3- Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R Iran
4- Former M.Sc in Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture of Zabol University, Zabol, I.R.Iran.

Received: 02.07.2008 Accepted: 15.10.2008

## Abstract

Genetic diversity of 19 accessions of *Hyoscyamus niger* L., collected from different parts of Iran, were evaluated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) data. Total Genomic DNA was extracted from young leaves of plants and Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using Sixteen RAPD primers and produced a total of two hundred and eight bands, with one hundred and ninety six polymorphic bands (94.31%) between single plants of the investigated accessions. RAPD products were scored for presence (1) or absence (0) of each amplicon evaluated using Binary method and subsequently genetic similarity was calculated by employing Dice index and cluster analysis was carried out according to UPGMA algorithm using NTSYS-pc software. Accession of Isfahan showed maximum difference with other accessions and classified in separate group and maximum similarity was observed between accessions of Roodbar- 2 and Siahkal- 1 with 0.80 similarity. Results showed a moderate level of genetic diversity among investigated accessions. The results also indicated that RAPD approach seemed to be best-suited for fingerprinting and assessing genetic diversity among *H. niger* accessions with high accuracy.

**Key words:** *Hyoscyamus niger* L., Genetic diversity, Accession, RAPD markers

Archive of SID

www.SID.ir