

(*Echium amoenum* Fisch & Mey.)

RAPD

نورالدین حسین پورآزاد<sup>۱</sup>، قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۲\*</sup>، محمد آزادبخت<sup>۳</sup>، سیدکمال کاظمی تبار<sup>۴</sup> و احسان شکری<sup>۱</sup>

۱- کارشناس ارشد اصلاح نباتات پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- نویسنده مسؤل مکاتبات، استاد و محقق ارشد پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

پست الکترونیک: nh\_agri@yahoo.com

۳- استاد فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۱/۲۸

چکیده

در این تحقیق، از نشانگر مولکولی RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۶ اکوتیپ گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch & Mey.) جمع‌آوری شده از برخی مناطق شمال و غرب ایران استفاده شد. به این منظور DNA ژنومی با استفاده از روش STE استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۲۳ آغازگر RAPD بر روی DNA ی ژنومی مورد مطالعه انجام گردید. از تعداد ۴۳۸ نوار بانندی قابل تشخیص ایجاد شده ۳۸۵ بانند (۸۷/۹٪) در بین اکوتیپ‌های مختلف چندشکلی نشان دادند. نوارهای بانندی براساس وجود (۱) یا عدم وجود بانند (۰) کد گذاری شد. برای تعیین میزان تشابه بین اکوتیپ‌ها، از ضریب تشابه دایس استفاده گردیده و براساس آن تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام و دندروگرام مربوطه رسم گردید. تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های مورد مطالعه را در ۸ گروه اصلی طبقه‌بندی نمود. بیشترین تشابه (۰/۶۸) بین دو اکوتیپ قزوین- لرستان و کمترین میزان تشابه (۰/۳۳) بین اکوتیپ‌های جنت رودبار- گرگان مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که تنوع ژنتیکی نسبتاً خوبی بین اکوتیپ‌های گل گاوزبان ایرانی وجود دارد و نشانگر مولکولی RAPD ابزار مناسبی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های گل گاوزبان ایرانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گل گاوزبان ایرانی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای RAPD.

مقدمه

برنامه‌های اصلاحی است (Li et al., 2006). نشانگرهای مولکولی RAPD از جمله نشانگرهای DNA است که به طور وسیع در برنامه‌های تعیین تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در گونه‌های گیاهی بکار می‌رود. در ابتدا نشانگر RAPD بطور وسیع جهت نقشه‌یابی ژنی و شناسایی مکان‌های ژنی صفات کیفی بکار گرفته شد و سپس بطور

جمع‌آوری ژرم‌پلاسم اولین قدم در راه اصلاح گیاهان است. موفقیت اصلاح‌گر در برنامه‌های اصلاحی به انتخاب مواد ژنتیکی مناسب و تنوع کافی در آنها بستگی دارد. ارزیابی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم از گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب و انتخاب والدین در


چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم این گونه می‌تواند مفید باشد. در تحقیقی در چین، تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیتی در ۵ جمعیت گیاه دارویی چنگیوم اسمیرنیوئیدس (*Changium smyrnioides*) از خانواده آبیاسه توسط ۲۳ آغازگر RAPD بررسی گردید. از شاخص شانون (Shannon) برای تفکیک تنوع ژنتیکی استفاده شد. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی این گونه بالاست و احتمالاً به آنها اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی آسانتر سازگار شوند (Chengxin et al., 2003). منشأ گونه *Echium amoenum* ایران و کشورهای مدیترانه می‌باشد. گیاهان این جنس، علفی، دو تا چند ساله یا پایا و فاقد ساقه زیرزمینی می‌باشند، ریشه ضخیم، ارتفاع بطول تقریبی بین ۹۵-۲۰ سانتی‌متر و ساقه‌ها منفرد یا متعدد، پوشیده از کرک‌های روی هم خوابیده هستند (قهرمان، ۱۳۵۷). میوه مرکب از چهار فندقه و دارای فرمول گل ( $CA^5CO^5A^5G^2$ ) (تعداد ۵ عدد گلبرگ، ۵ کاسبرگ، ۵ پرچم و یک عدد مادگی دوشاخه) پوشیده از غده و با سطح ناصاف و چین‌خورده می‌باشد (آزادبخت، ۱۳۷۸). تحقیقات فراوانی توسط محققان علوم پزشکی در رابطه با اثرات دارویی گل گاوزبان ایرانی انجام پذیرفته است بیشتر این پژوهش‌ها در زمینه خواص دارویی و کمترین آنها مربوط به جنبه‌های زراعی در این گونه بوده است. اما تاکنون هیچ‌گونه تحقیقات ژنتیکی، استخراج DNA و بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاه انجام نشده است و پژوهش حاضر برای اولین بار در کشور اجرا گردید. از نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان برای حفاظت و مدیریت بهتر ژرم‌پلاسم‌های این گونه گیاهی استفاده نمود. امید آن می‌رود این تحقیق زمینه‌ساز گام‌های بعدی برای محققان کشور در جهت به‌نژادی گل گاوزبان ایرانی باشد.

گسترده جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی بکار رفت (Peakall et al., 1995). در تحقیقی تنوع ژنتیکی ۲۵ جمعیت از گیاه دارویی بابونه گاوی (*Matricaria chamomilla*) با استفاده از نشانگرهای تصادفی و نیمه‌تصادفی بررسی گردید. از ۲۹ آغازگر مورد استفاده تعداد ۳۶۹ باندها حاصل گردید که ۸۵/۴۴ درصد آنها پلی‌مورف بودند. گروه‌بندی مبتنی بر این نشانگرها و بررسی تنوع مورفولوژیکی، ۲۵ جمعیت مورد مطالعه را در ۵ کلاستر طبقه‌بندی نمود. ضریب تشابه جاکارد در دامنه ۰/۶۳-۰/۱۵ محاسبه گردید. نتایج حاصل گویای عدم تطابق تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی در این بررسی بود (Solouki et al., 2008). محققان بر این باورند که بین میزان تنوع ژنتیکی و تنوع براساس صفات مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی شباهت‌های زیادی وجود دارد. کوهستانی و همکاران (۱۳۸۷) تطابق نسبی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی را در زیره سیاه (*Bunium persicum* B.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و کروماتوگرافی گازی (GC) اثبات نمودند. با استفاده از ۳۰ آغازگر RAPD تعداد ۹ جمعیت شبدر سفید مورد مطالعه قرار گرفت، تجزیه داده‌ها و ترسیم دندروگرام، ارقام را به دو گروه تقسیم‌بندی نمود که گروه اول قدرت ایستادگی مرتعی بیشتر، در حالیکه گروه دوم دارای برگ‌های بزرگتری بودند (Gustine et al., 2002). یوسفی و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD میزان تنوع ژنتیکی در بین توده‌های بنگ دانه (*Hyosyamus niger* L.) را در حد متوسطی ارزیابی کردند. همچنین هاشمی و همکاران (۱۳۸۷) با ارزیابی تنوع مولکولی از طریق ۲۱ آغازگر RAPD میزان چندشکلی ژنتیکی را در بین ۱۵ توده بومی زیره پارس، ۴۱٪ اعلام نموده و نشان دادند که این نشانگر در شناسایی نواحی

## مواد و روشها

به جز نمونه‌های گیاهی سه اکوتیپ اصفهان، لرستان و کرمانشاه که از بانک ژن خصوصی تهیه گردیدند سایر نمونه‌ها (۱۳ اکوتیپ) از رویشگاههای طبیعی خود جمع‌آوری شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به

آزمایشگاه انتقال یافتند (جدول ۱). نظر به اینکه رویشگاههای طبیعی گل گاوزبان ایرانی در ارتفاعات مناطق کوهستانی واقع می‌باشند، دسترسی به این مکانها بسیار مشکل و پرهزینه بوده که این امر گستردگی مطالعات در اکوتیپ‌های بیشتر را محدود می‌سازد.

جدول ۱- مناطق جمع‌آوری گیاه دارویی گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*)


ردیف	محل جمع‌آوری	استان	کد
۱	جنت رودبار	گیلان	G <sup>۱</sup>
۲	گلوگاه	مازندران	P <sup>۲</sup>
۳	گرگان	گرگان	O <sup>۳</sup>
۴	نکا	مازندران	N <sup>۴</sup>
۵	اشگورات	گیلان	E <sup>۵</sup>
۶	اصفهان	اصفهان	S <sup>۶</sup>
۷	چالوس (کلاردشت)	مازندران	M <sup>۷</sup>
۸	بهشهر	مازندران	B <sup>۸</sup>
۹	کرمانشاه	کرمانشاه	K <sup>۹</sup>
۱۰	تالش	گیلان	T <sup>۱۰</sup>
۱۱	ارتفاعات دوهزار	مازندران	۲۰۰۰
۱۲	املش (رودسر)	گیلان	R <sup>۱۲</sup>
۱۳	نمین (گردنه حیران)	اردبیل	H <sup>۱۳</sup>
۱۴	قزوین (الموت)	قزوین	Z <sup>۱۴</sup>
۱۵	لرستان	لرستان	L <sup>۱۵</sup>
۱۶	سوجلما (ارتفاعات نکا)	مازندران	So <sup>۱۶</sup>

شد (جدول ۲). جهت الکتروفورز و تفکیک DNA حاصل از تکثیر، از هر نمونه ۷ میکرولیتر به همراه ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری استفاده گردیده و از نشانگر وزنی مارکر ۳ (Lambda DNA/EcoRI+HindIII) تهیه شده از شرکت فرمنتاس (Fermentas) جهت سنجش اندازه استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۶۵ برای مدت ۳ ساعت انجام شد و پس از اتمام عمل الکتروفورز و

برای دسترسی به DNA ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) روش بهینه شده (STE) (Sucrose - Tris - EDTA) بکار گرفته شد (حسین پورآزاد و همکاران، ۱۳۸۸). آغازگرهای مورد استفاده از شرکت سیناژن تهیه گردیدند و واکنش زنجیره‌ای PCR براساس روش Monika و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات انجام

شد (Rohlf, 1998). ماتریس کوفنتیک نیز جهت بررسی میزان انطباق تجزیه خوشه‌ای با داده‌ها محاسبه و ماتریس تشابه با ماتریس کوفنتیک مقایسه شد و ضریب همبستگی کوفنتیک نیز محاسبه گردید. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام گردید و پلات دو بعدی و سه بعدی حاصل از آن ترسیم شد. این روش چند متغیره برای تکمیل اطلاعات تجزیه خوشه‌ای انتخاب گردید.

رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، ژل با آب مقطر شسته شده و الگوی بانندی در زیر نور (UV) در دستگاه Gel Doc، مشاهده و عکس‌برداری شد (شکل ۱). حضور یا عدم حضور هر یک از نوارهای مشاهده شده در محدوده ۴۵۰ تا ۵۰۰۰ جفت باز برای هر کدام از ۲۳ آغازگر به ترتیب با اعداد صفر و یک امتیازدهی شد. پس از تهیه ماتریس صفر و یک، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc,2/02 ماتریس تشابه دایس، بدست آمد و تجزیه کلاستر به روش UPGMA انجام

جدول ۲- برنامه تنظیم شده جهت تکثیر آغازگرهای نشانگر مولکولی RAPD

ردیف	مرحله	تعداد چرخه	زمان (دقیقه)	دما (c°)
۱	واسرشت سازی اولیه DNA	۱	۵	۹۴
۲	تک‌رشته‌ای شدن DNA	-	۱	۹۲
۳	اتصال آغازگر	۳۸	۱	۳۸-۴۲
۴	تکثیر آغازگر	-	۲	۷۲
۵	تکثیر نهایی آغازگر	۱	۱۰	۷۲

## نتایج

گرگان-حیران (۰/۳۴) و بیشترین شباهت مربوط به اکوتیپ‌های قزوین-لرستان (۰/۶۸) و اکوتیپ‌های دوهزار-رودسر (0/65) بود (جدول ۴). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA)، در سطح تشابه (۰/۳۸)، ۸ گروه را نشان داد (شکل ۲). گروه اول شامل اکوتیپ جنت رودبار و اشگورات، گروه دوم شامل دو زیرگروه از اکوتیپ‌های بهشهر و گلوگاه بود. گروه سوم دارای دو زیرگروه بود که زیرگروه اول خود دارای زیرگروه‌های فرعی دیگری از چهار اکوتیپ اصفهان، کرمانشاه و اکوتیپ‌های دوهزار و رودسر بود و در زیرگروه دوم اکوتیپ‌های قزوین و لرستان جای گرفته بودند.

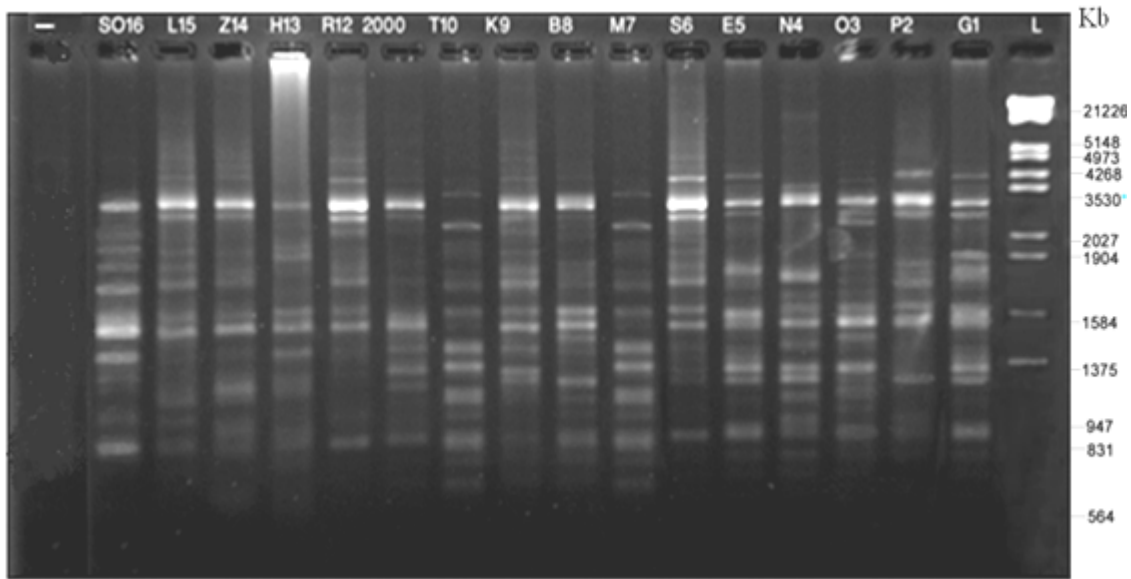
از ۲۳ آغازگر تکثیر شده بر روی DNA استخراج شده، تعداد ۴۳۸ نوار قابل تشخیص ایجاد گردید که ۳۸۵ تا از این باندها (۸۷/۹٪) چندشکل بوده و تعداد ۵۳ باند (۱۲/۱٪) یک‌شکل (Mono morph) بودند (جدول ۲). بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر شماره ۱۹ با ۲۴ باند و کمترین آنها با ۱۳ باند مربوط به آغازگر شماره ۱۱ بود. آغازگرهای شماره ۳، ۴، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ صد در صد چندشکلی نشان دادند (جدول ۳) که بیانگر تنوع بالای نمونه‌های گل گاوزبان ایرانی و قدرت زیاد این آغازگرها در تفکیک اکوتیپ‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین تشابه بین اکوتیپ‌های جنت رودبار-گرگان (۰/۳۳) و

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای RAPD استفاده شده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)

درصد چندشکلی	تعداد باندهای چندشکل	تعداد کل باندها	توالی آغازگر ۵' → ۳'	آغازگر	ردیف
۹۴	۱۵	۱۶	ACCGCGAGGG	OPD-01	۱
۸۷	۱۴	۱۶	GGACCCAACC	OPD-02	۲
۱۰۰	۱۸	۱۸	GTCGCCGTCA	OPD-03	۳
۱۰۰	۱۸	۱۸	TGAGCGGACA	OPD-05	۴
۹۴	۱۴	۱۵	CAGGCCCTTC	OPB-05	۵
۹۱	۲۰	۲۲	TTCCCCCTTC	OPB-13	۶
۱۰۰	۱۹	۱۹	TCCGCTCTGG	OPB-14	۷
۹۴	۱۵	۱۶	GGACCCCTAC	OPB-20	۸
۷۵	۱۲	۱۶	CAGGCCCTTC	OPA-01	۹
۹۴	۱۷	۱۸	CTGCTGGGAC	OPA-10	۱۰
۱۰۰	۱۳	۱۳	AATCGGGCTG	OPA-04	۱۱
۹۰	۱۹	۲۱	GGGAGACATC	OPH-20	۱۲
۱۰۰	۱۹	۱۹	GGAAGTCGCC	OPH-04	۱۳
۱۰۰	۲۱	۲۱	AATGGCGCAG	OPH-15	۱۴
۱۰۰	۱۸	۱۸	AGTCGTCCCC	OPH-05	۱۵
۸۷	۲۰	۲۳	GGTCGGAGAA	OPH-01	۱۶
۸۱	۲۱	۲۶	CATCCGTGCT	OPD-15	۱۷
۸۷	۲۰	۲۳	GAAACACCCC	OPH-08	۱۸
۸۷	۲۱	۲۴	AGCGCCATTG	OPD-11	۱۹
۸۹	۱۶	۱۸	TGGACCGGTG	OPC-08	۲۰
۷۰	۱۴	۲۰	GGCGGTTGTC	OPM-04	۲۱
۵۵	۱۱	۲۰	CCTGATCACC	OPF-03	۲۲
۵۵	۱۰	۱۸	CACAGACACC	OPN-12	۲۳
۸۸/۲۶	۱۶/۷۳	۱۹	-	-	میانگین
-	۳۸۵	۴۳۸	-	-	کل

کوفتیک حاصل از آن، به عبارت دیگر ورودی و خروجی دندروگرام، ضریب همبستگی کوفتیک برای دندروگرام حاصل محاسبه گردید. در شکل ۳ که مقایسه ماتریس تشابه دایس با ماتریس کوفتیک حاصل از آن را نشان می‌دهد، با توجه به نحوه آرایش نقاط می‌توان دریافت که همبستگی نسبتاً بالایی بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفتیک می‌باشد که مقدار ۸۲ درصدی ضریب همبستگی کوفتیک (r)، این مطلب را تأیید می‌نماید (شکل ۳).

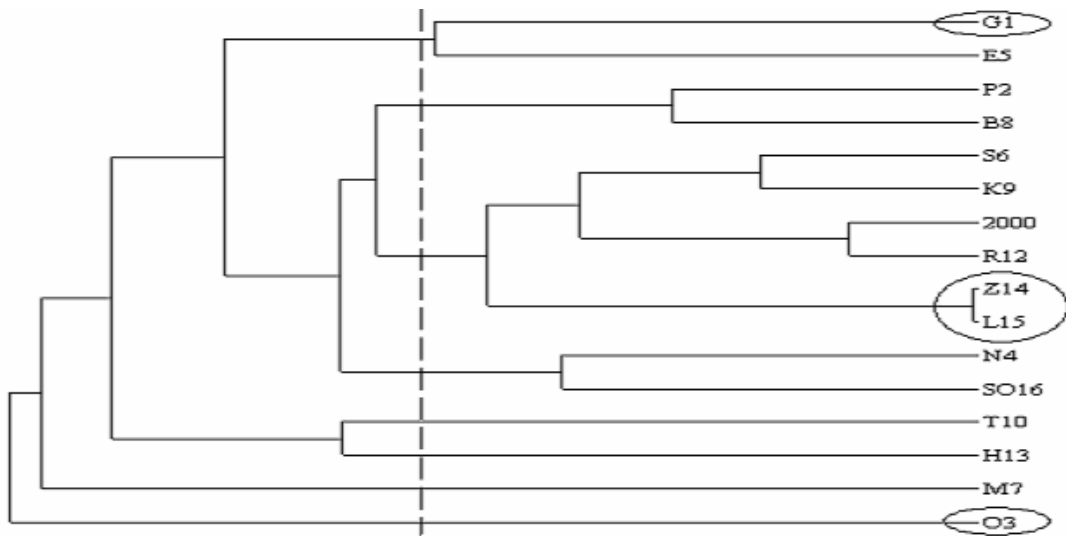
گروه چهارم دارای دو زیرگروه مجزا از اکوتیپ‌های نکا و سوچلما بود. در گروه پنجم اکوتیپ تالش، در گروه ششم اکوتیپ حیران، در گروه هفتم اکوتیپ کلاردشت و در گروه هشتم اکوتیپ گرگان قرار گرفتند (شکل ۲). در بررسی دندروگرام حاصل می‌توان دریافت که در اکثریت گروه‌ها، اکوتیپ‌هایی در کنار هم جای گرفته‌اند که دارای شرایط آب هوایی کاملاً مشابه و یا نسبتاً مشابهی می‌باشند. برای بررسی میزان همبستگی بین ماتریس تشابه و



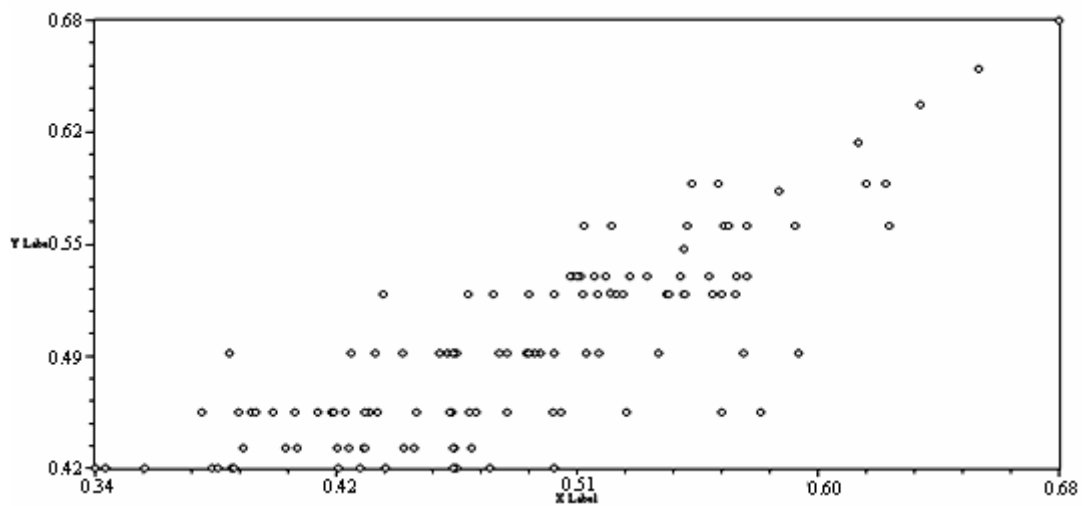
شکل ۱- چندشکلی مشاهده شده با نشانگر OPA-01 در اکوتیپ‌های مورد مطالعه

جدول ۴- ماتریس تشابه اکوتیپ‌های *E. amoenum* مبتنی بر نشانگرهای RAPD

اکوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
۱	۱															
۲	۰/۵۷	۱														
۳	۰/۳۳	۰/۴۶	۱													
۴	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۵۰	۱												
۵	۰/۵۴	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۵۰	۱											
۶	۰/۵۹	۰/۵۶	۰/۳۸	۰/۵۵	۰/۵۴	۱										
۷	۰/۴۶	۰/۴۷	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۴۲	۱									
۸	۰/۴۴	۰/۶۱	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/۴۳	۱								
۹	۰/۴۶	۰/۵۳	۰/۳۵	۰/۵۴	۰/۴۶	۰/۶۳	۰/۴۲	۰/۵۲	۱							
۱۰	۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۴۳	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۴	۰/۴۲	۰/۴۵	۱						
۱۱	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۳۸	۰/۵۶	۰/۴۹	۰/۶۱	۰/۴۳	۰/۵۵	۰/۵۶	۰/۴۲	۱					
۱۲	۰/۴۸	۰/۵۰	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۴۹	۰/۵۵	۰/۴۱	۰/۵۱	۰/۶۲	۰/۳۸	۰/۶۵	۱				
۱۳	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۳۴	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۳۹	۰/۴۶	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۵۶	۰/۵۰	۱			
۱۴	۰/۴۹	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۴	۰/۴۶	۰/۵۶	۰/۴۴	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۵۰	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/۵۷	۱		
۱۵	۰/۴۹	۰/۵۴	۰/۴۴	۰/۴۹	۰/۴۳	۰/۶۲	۰/۴۶	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/۴۱	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۵۲	۰/۶۸	۱	
۱۶	۰/۳۸	۰/۴۴	۰/۴۶	۰/۵۸	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۴۰	۰/۴۸	۰/۵۰	۰/۳۹	۰/۵۴	۰/۵۱	۰/۴۷	۰/۵۶	۰/۵۲	۱



شکل ۲- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی RAPD براساس الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA)



شکل ۳- مقایسه ماتریس تشابه دایس (X) با ماتریس کوفاکتیک حاصل از آن (Y)

کنیم. متخصصان اصلاح نباتات معتقدند که هتروزیس یا برتری دورگ‌ها بر میانگین والدین، به فاصله ژنتیکی بین والدین بستگی دارد. یک متخصص اصلاح نباتات می‌خواهد ارقام و ایتیه‌های مختلف را به منظور پی بردن به فاصله ژنتیکی آنها و استفاده از تنوع آنها در برنامه‌های اصلاح نباتات دسته‌بندی کند، روش‌های تجزیه خوشه‌ای

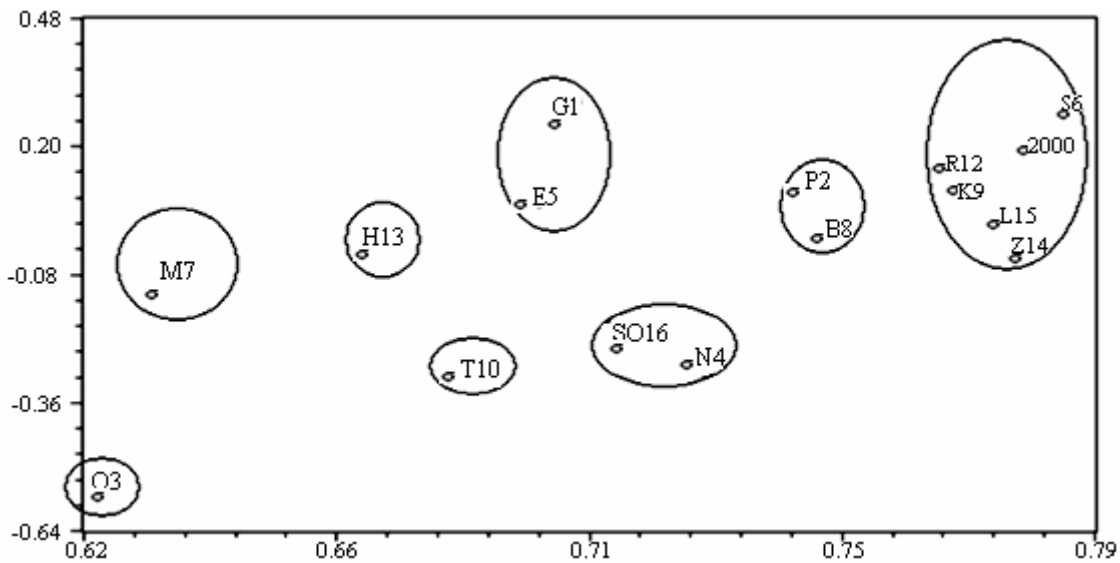
### بحث

برای موفقیت در برنامه‌های اصلاحی دانستن میزان قرابت ژنتیکی والدین اهمیت بسیار زیادی دارد. تجزیه کلاستر ما را یاری خواهد کرد تا به جای صرف وقت و هزینه زیاد، برای رسیدن به ژنوتیپ‌های مطلوب به جای انجام تلاقی‌های تصادفی از تلاقی کلاسترهای دور استفاده

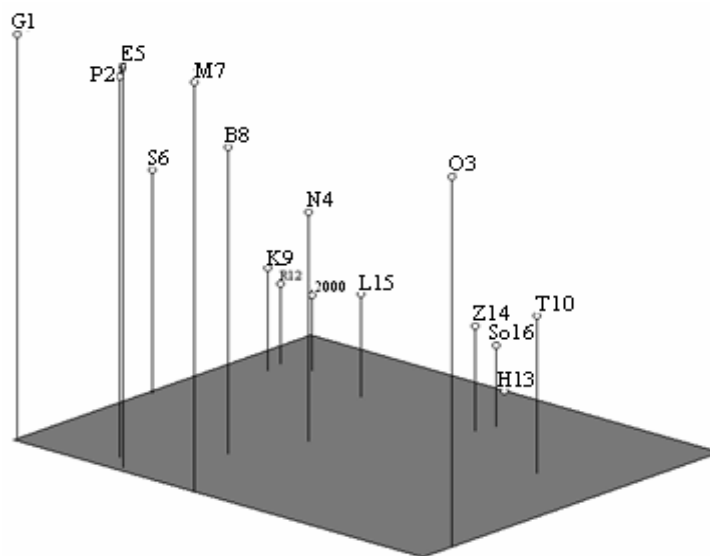
متفاوتی تفکیک یافته‌اند منطقی به نظر می‌رسد. De Masi و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی بر روی گیاه ریحان با استفاده از نشانگرهای RAPD گزارش دادند که ارتباط ضعیفی بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی حاصل از مطالعات ژنتیکی در بین توده‌های مورد مطالعه وجود دارد که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از برنامه EIGEN انجام گرفت و پلات دو بعدی و سه بعدی حاصل از آن ترسیم شد (شکل ۴ و ۵). این روش چند متغیره، یک روش گروه‌بندی است که برای کامل کردن اطلاعات تجزیه خوشه‌ای انتخاب گردید. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای تا حد زیادی هم‌خوانی داشت، البته در برخی از توده‌ها تفاوت‌هایی نیز در این زمینه قابل مشاهده می‌باشد. نتایج پراکنش و توزیع نمونه‌ها براساس ۲ مؤلفه اول در شکل ۴ آمده است. مؤلفه اول ۲۱/۱۶ و مؤلفه دوم با ۱۳/۷۳ درصد در مجموع ۳۴/۸۹٪ از تغییرات کل را نشان می‌دهند (شکل ۴). در پلات سه بعدی سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشتند، به ترتیب ۹/۶۱، ۷/۱۱ و ۶/۵۳ درصد از میزان کل تنوع را کنترل می‌کردند (شکل ۵).

این عمل را با استفاده از فرمول‌های ریاضی انجام می‌دهد (مقدم و همکاران، ۱۳۷۳). در این تحقیق تنوع مولکولی بیشتر اکوتیپ‌ها منطبق بر تنوع جغرافیایی آنها بود. عدم تطابق کامل تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی می‌تواند به دلیل جابجایی ژرم پلاسما باشد. انتقال بذر این گیاه از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط افراد می‌تواند سبب مبادله ژرم پلاسما شود. به عنوان مثال به‌رغم فاصله جغرافیایی زیادی که بین اکوتیپ لرستان و قزوین است اما در بررسی مولکولی این دو اکوتیپ در یک گروه قرار می‌گیرند، با توجه به اینکه شهرستان قزوین یکی از مهمترین مراکز خرید و فروش بذور گیاهان دارویی است این احتمال می‌رود که بذره‌های مربوط به اکوتیپ لرستان که از بانک ژن خصوصی تهیه گردیده به اشتباه همان بذه‌هایی باشد که از شهرستان قزوین جمع‌آوری گردیده است. در سایر موارد بیشتر اکوتیپ‌های دارای شرایط آب و هوایی مشابه و فاصله جغرافیایی نزدیک به هم مانند اکوتیپ‌های جنت رودبار - اشگورات و همچین سوچلما و نکا در گروه‌های مشابهی تفکیک یافته‌اند. اکوتیپ‌های جنت رودبار و گرگان که دارای کمترین میزان تشابه ژنتیکی می‌باشند با توجه به فواصل جغرافیایی زیادی که بین این دو اکوتیپ وجود دارد از اینکه در گروه کاملاً





شکل ۴- پلات دو بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای اکوتیپ‌های گل گاوزبان براساس نشانگرهای RAPD



شکل ۵- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

ایرانی مفید باشد. استنباط مهم دیگری که می‌توانیم از نتایج بدست آمده داشته باشیم مربوط به بهره‌گیری از پدیده هتروزیس است. همانطور که اشاره گردید برای پدیده هتروزیس باید والدینی را انتخاب کرد که دارای حداکثر فاصله ژنتیکی از جهت صفت مورد اصلاح باشند. از این والدین نه تنها می‌توان در تلاقی‌ها برای بهبود

در مجموع، نتایج حاصل نشان می‌دهند تنوع بالایی در ژرمپلاسم اکوتیپ‌های گل گاوزبان ایرانی حتی در برخی از اکوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد. این تنوع ژنتیکی بالا احتمالاً به آنها اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی آسانتر سازگار شوند. درک چنین تنوع بالایی می‌تواند در مدیریت ژرمپلاسم‌های گل گاوزبان

یادشده که در شناسایی محل رویش نمونه‌های مورد مطالعه ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر نمایم.

### منابع مورد استفاده

- آزادبخت، م.، ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. تهران: موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده. ۴۰۴ صفحه. ص ۲۵۵-۲۵۳.
- حسین پورآزاد ن.، نعمت‌زاده ق.ع.، شگری ا. و آزادبخت م.، ۱۳۸۸. مقایسه روشهای مختلف استخراج DNA ژنومی از گیاه دارویی گل گاوزبان ایرانی. مجموعه مقالات ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران. تهران.
- حسین پورآزاد ن.، نعمت‌زاده ق.ع.، شگری ا.، و کاظمی تبار س.ک.، ۱۳۸۸. معرفی روش سریع و ساده استخراج DNA در گیاهان دارویی. مجموعه مقالات ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران. تهران.
- دهقان کوهستانی، س.، ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی و شیمیایی ژرم‌پلاسما زیره سیاه (*Bunium persicum B.*) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و روش کروماتوگرافی گازی. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران.
- قهرمان، ا.، ۱۳۵۷. فلور رنگی ایران، جلد اول، انتشارات انجمن ملی حفاظت منابع طبیعی و محیط انسانی، شماره ۷۴
- مقدم، م.، محمدی شوطی، س.ا. و آقایی سربزه، م.، ۱۳۷۳. آشنایی با روشهای آماری چند متغیره. (ترجمه). انتشارات پیشناز علم. ۲۸۰ صفحه. ص ۱۷۳-۱۹۵.
- هاشمی، ه.، صفرنژاد، ع. و باقری، ع.، ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی زیره پارس (*Bunium persicum B.*) ایران با استفاده از نشانگر RAPD. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۶: ۲۴۶-۲۳۸.
- یوسفی هریکنده ئی، م.ج.، حسنی، م.ا.، مداح عارفی، ح. و محمدی پور، م.، ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های بنگ دانه (*Hyoscyamus niger L.*) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۷: ۱-۱۴.
- Chengxin, F., Qiu Y. and Kong, H. 2003. RAPD analysis for genetic diversity in *Changium*

صفت مورد نظر استفاده نمود بلکه می‌توان از ارتباط ژنتیکی والدین و دورگ‌ها استفاده کرده و از آن برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های دخیل در بیان صفت مورد نظر بهره‌مند گردید. به‌عنوان مثال، تلاقی‌های گیاهان موجود در اکوتیپ‌های جنت رودبار و گرگان احتمال دارد نسبت به صفات مشخص نتایج مورد انتظاری را حاصل نمایند. از مجموع اطلاعات بدست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر مولکولی RAPD ابزار مناسبی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در گل گاوزبان ایرانی بوده و قادر است اکوتیپ‌های مختلف این گیاه را از لحاظ تنوع ژرم‌پلاسمی بخوبی گروه‌بندی نماید. در پایان پیشنهادات زیر جهت مطالعات تکمیلی در این گیاه بصورت زیر ارائه می‌گردد:

- ۱- بررسی تنوع مورفولوژیکی اکوتیپ‌های مختلف این گیاه و مقایسه نتایج آن با نتایج حاصله از بررسی‌های مولکولی، ۲- طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم گل گاوزبان ایرانی به منظور ارقام‌بندی اکوتیپ‌های مختلف با نشانگرهای قدرتمند هم چون AFLP و ۳- بررسی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها با نشانگرهای اختصاصی و مقایسه آن با نتایج بدست‌آمده از نشانگر RAPD در این تحقیق، از جمله پیشنهادهایی هستند که با توجه به بومی بودن گیاه گل گاوزبان ایرانی و نبود اطلاعات دقیق ژنتیکی در خصوص این گیاه عملی نمودن آنها ضروری به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

از مدیریت محترم پژوهشکده برنج و مرکبات (وابسته به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری) جهت تقبل هزینه‌های این پروژه کمال تشکر را داریم. همچنین بر خود لازم می‌دانیم از اهالی و زارعان محترم مناطق

- Solouki M., Mehdikhani H., Zeinali H. and Emamjomeh A.A., 2008. Study of genetic diversity in chamomile based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 117: 281-285.
- Li. J.J., Pei G.L., Pang H.X., Bilderbeck A., Chen S.S. and Tao S.H., 2006. A new method for RAPD primers selection based on primers bias in nucleotide sequence data. *Journal of Biotechnology*, 126. 415-423.
- Monika, S.J., Sawicki, K., Polok, C., and Holdynski, R., 2006. Comparison of three polygonatum species from Poland based on DNA markers. *Ann. Bot. Fennici* 43: 379-388.
- *smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 44: 13-18.
- De Masi, L., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F. and Laratta, Bb., 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology*. 223:273-281.
- Gustine, D.L., Voigt P.W., Brummer E. and Papadopoulos A., 2002. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. *Crop Science*. 42: 343-347
- Peakall R., Smouse P.E. and Huff D.R., 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactloides*. *Molecular Ecology*, 4: 135-147.
- Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exeter software, Setauket, NY.

## Genetic diversity in several *Echium amoenum* Fisch& Mey. ecotypes from western and northern regions of Iran via RAPD markers

N. Hosseinpour Azad<sup>1</sup>, Gh.A. Nematzadeh<sup>\*2</sup>, M. Azadbakht<sup>3</sup>, S.K. Kazemitabar<sup>4</sup> and E. Shokri<sup>1</sup>

1- M.Sc., Rice and Citrus Research Institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, I.R.Iran.

2\*- Corresponding author, Prof., Rice and Citrus Research Institute, Sari University, Mazandaran, I.R.Iran.

E-mail: nh\_agri@yahoo.com

3- Prof., Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medicine, Mazandaran, I.R.Iran.

4- Assoc. Prof., Plant breeding, Department of Agronomy, Sari University, Mazandaran, I.R.Iran.

Received: 17.04.2010

Accepted: 05.03.2011

### Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers was used to characterize genetic diversity among 16 ecotypes of Iranian *Echium amoenum* collected from western and northern regions of Iran. Total genomic DNA was extracted by STE method and polymerase chain reaction (PCR) was performed using twenty three RAPD primers. From 438 scoreable bands, three hundred and eighty five bands among different ecotypes were polymorphic (87/9%). RAPD products were scored for presence (1) or absence (0) of each amplicon. Binary method and subsequently genetic similarity was calculated by employing Dice index. Cluster analysis was carried out according to UPGMA algorithm. Cluster analysis, classified ecotypes into eight main groups. The highest similarity (0.68) was found between Gazvin and Lorestan ecotypes, whereas, the lowest was between Gannat Roudbar and Gorgan. The results showed there was a moderate level of genetic diversity among *Echium amoenum* ecotypes. Moreover, results indicated that RAPD technique is an efficient tool for assessing genetic diversity in Iranian *Echium amoenum* ecotypes.

**Key words:** *Echium amoenum*, Genetic diversity, RAPD markers.