

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

سعیده سرحدی پور^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، امین باقی زاده^۳، داراب حسینی^۴

^۱ کارشناس ارشد اصلاح نباتات، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران

^۲ استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین المللی علوم محیطی و تکنولوژی پیشرفته کرمان، کرمان، ایران

^۴ استادیار گروه باغبانی مرکز تحقیقات کشاورزی کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۴ : تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

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 ۳۰ رویشگاه مختلف جمع‌آوری گردید. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته از برگ انجام شد. از ۱۵ آغازگر تصادفی که در واکنش PCR استفاده شد، تعداد ۱۰ آغازگر نوارهای بهتری تولید کردند. از این تعداد آغازگر، ۱۱۸ 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 ۳۰ جمعیت مورد بررسی در ۵ 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

مقدمه

می‌شود. عصاره متانولی حاصل از ریشه‌های آنغوزه دارای اثر بازدارندگی بر روی فعالیت^۶ 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 (Sammbamurty, 2006). تکنیک RAPD از نوع نشانگر مبتنی بر PCR است که در سال ۱۹۹۰ 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 ۸ تا ۱۰ 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 ۸ تا ۱۰ 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 ماده‌ای است که از ریشه این گیاه استخراج می‌شود که ارزش دارویی و صنعتی دارد (عسکری، ۱۳۷۸). آنغوزه شیره گیاهی یا صمغ اولئورزینی است که از تیغ‌زدن 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 (امیدیگی ۱۳۸۳). 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 سولفورده آن به فرمول‌های $C_7H_{14}S_2$ و $C_{11}H_{20}O_2$ است. این اسانس در مقابل هوا به سرعت اکسیده می‌شود و شامل دو نوع ترپن، پینن و یک سزکوئی ترپن با بوی لوند و ترکیبات که مجموعاً ۶۵ درصد آن را تشکیل می‌دهند نوع مرغوب آنغوزه دارای ۶۲ درصد رزین، ۲۵ درصد صمغ، ۷-۳ درصد اسانس، ۱/۲۸ درصد فرولیک اسید^۱ آزاد و به مقدار بسیار جزئی وانیلین می‌باشد (زرگری، ۱۳۵۷). همچنین ترکیبات جدیدی نظیر آزاfoئتیدین^۲، فروکولیسین^۳، آزاfoئتیدنول^۴ A، آزاfoئتیدنول^۴ B، از گروه کومارین‌های سزکوئی ترپنوئیدی از رزین صمغ آنغوزه جداسازی گردیده است (Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Murray, 2002). فعالیت پروتئاز ویروس هپاتیت C سبب تسهیل تکثیر ویروس هپاتیت C

4- Assafoetidnol A
5- Assafoetidnol B
6- Hcv protease

1- Ferulic acid
2- Assafoetidin
3- Ferocolicin

جدول ۱- کد و منطقه جغرافیایی توده‌های جمع‌آوری شده آنگوزه از استان‌های کرمان و یزد

کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه	کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه
۱	ماهان (کرمان)	۱۶	محل جمع‌آوری نمونه مسینانشهر بابک (کرمان)
۲	کرمان	۱۷	هتکنزند (کرمان)
۳	بیکران راین (کرمان)	۱۸	معدنکو هگچ چترود (کرمان)
۴	اختیارآباد (کرمان)	۱۹	دشت خاک زرنند (کرمان)
۵	کوهبنان (کرمان)	۲۰	خواجه گلی راور (کرمان)
۶	راویز شهر بابک (کرمان)	۲۱	سیرج (کرمان)
۷	مهریز (یزد)	۲۲	دودران راین (کرمان)
۸	دوربید (یزد)	۲۳	نراب راین (کرمان)
۹	درگاهان تفت (یزد)	۲۴	طنج مهریز (یزد)
۱۰	کوهپایه (کرمان)	۲۵	فخر اباد (یزد)
۱۱	باغبرزی (کرمان)	۲۶	هنزا (یزد)
۱۲	هینمان (کرمان)	۲۷	تفت (یزد)
۱۳	قلعه عسکر بافت (کرمان)	۲۸	جیرفت (کرمان)
۱۴	چترود (کرمان)	۲۹	بردسیر (کرمان)
۱۵	دارسنویه (کرمان)	۳۰	سیرجان (کرمان)

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برگ‌های تازه و جوان گیاه آنگوزه از ۳۰ رویشگاه مختلف (جدول ۱) 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 ۱۰ 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 ۱/۵ MI از بافر استخراج‌جرا که به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد بوده است، به آن اضافه می‌کنیم و اجازه می‌دهیم به مدت ۰/۵ تا ۱ ساعت در بن ماری دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد بماند. در این فاصله هر ۵ دقیقه یک بار محلول را به آرامی سروته کرده تا بافر به تمامی سطوح نمونه دسترسی داشته باشد. بعد از آن سانتریفیوژ در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ انجام، سپس مایعی که در قسمت بالا قرار گرفته را برداشته و در یک میکروتیوپ تمیز ریخته و به همان مقدار ایزوآمیل الکل و کلروفرم (۱:۲۴) اضافه شد به مدت ۱۵ دقیقه بادست خوب به هم می‌زنیم. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. در این مرحله سه فاز مجزا تشکیل می‌شود که فاز رویی و شفاف حاوی

اسیدهای نوکلئوتید است فاز وسطی حاوی پروتئین و فاز سوم حاوی کلروفروم است. مخلوط کلروفروم: ایزو آمیل الکل باعث ته نشین شدن پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها می‌شود. به همین علت فاز رویی شفاف دیده می‌شود. با توجه به اینکه گیاه دارویی آنغوزه دارای ترکیبات زیاد فنولی بود در این مرحله به میکروتیوپ‌های جدید SDS اضافه می‌کنیم. در این مرحله فاز رویی را به میکروتیوپ‌های جدید انتقال داده و مرحله قبل را بار دیگر به همان روش ذکر شده تکرار می‌شود. بسته به میزان پروتئین‌های موجود در مرحله استخراج می‌توان این مرحله را چندین بار انجام داد تا ناخالصی‌ها به‌طور کامل حذف شوند. مایع رویی را برداشته و به همان میزان NaCl با مولاریته ۵ و دوبرابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری می‌کنیم. در مرحله بعد در دمای اتاق با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی را با دقت از روی رسوب برداشته و رسوب را برای دو بار به مدت ۱۰ دقیقه با ۱ ml اتانول ۷۰ درصد در دمای اتاق با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. اتانول را حذف می‌کنیم و رسوب را به مدت ۰/۵ ساعت در دمای اتاق به صورت اریب گذاشته تا خشک شود. سپس مخلوط Tris-HCl 10Mm TE با pH=EDTA 1Mm با pH=۸ سرد یخچالی را به میزان ۵۰۰ ماکرولیتر اضافه کرده به همراه ۱۵۰ ماکرولیتر استات سدیم 3M با PH=6.5 و ۵۰۰ ماکرولیتر ایزوپروپانول سرد مخلوط کرده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- قرار داده شد. برای تهیه بافر ۱:۱۰ TE یک میلی لیتر از Tris-Hcl یک مولار را با ۰/۲ میلی لیتر از EDTA ۰/۵ مولار ترکیب گردید و با افزودن آب مقطر دیونیزه حجم محلول به ۱۰۰ 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

۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌دهیم. فاز رویی را حذف کرده و رسوب بار دیگر با 1ml اتانول ۷۰٪ شست و شو داده شد. اتانول را دور ریخته و رسوب را به مدت ۰/۵ ساعت گذاشته تا کاملاً خشک شود. در نهایت به آن ۷۵ ماکرولیتر TE اضافه شد. اگر DNA استخراجی خالص باشد به راحتی در TE حل می‌شود 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 ۱٪ در صد 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 قطعه‌هایی با وزن مولکولی کم مشاهده می‌شود. کیفیت و کمیت DNA در انجام PCR اهمیت دارد. ناخالصی و وجود مواد باقیمانده از مرحله استخراج بر عمل و دقت این واکنش اثر می‌گذارد 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 نمونه‌های با OD^{260/280}=1/8-2 که خلوص خوبی داشتند، انتخاب شدند. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نشان‌دهنده این است که نمونه‌ها از لحاظ پروتئین، فنل و یا دیگر جذب کننده‌های UV ناخالصی دارند و نسبت‌های بالاتر از ۲ 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:

1- Optical density

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

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: ۱- واسرشت آغازین DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل) انجام شد ۲- چهل سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر به مدت ۱ دقیقه، بسط آغازگر دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد ۳- تکمیل بسط در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه (یک سیکل) انجام پذیرفت. پس از انجام PCR که بیش از ۴ ساعت طول می کشد نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای ۲۰- تا زمان انجام الکتروفورز نگهداری می شوند. 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 ۲).

دستورالعمل (PCR): چرخه واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) به روش Wanntor و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. تعداد ۱۵ آغازگر تصادفی RAPD محصول شرکت سیناژن در این تحقیق استفاده شد. آنزیم Taq DNA Polymerase مخلوط، dNTPs، به اضافه PCR buffer (۱۰ برابر غلظت)، و محلول MgCl₂ از شرکت سیناژن تهیه شدند. مقدار ۱ μl از DNA الگو تهیه شده و مقدار ۲ μl از MgCl₂ با غلظت ۵۰ mM، مقدار ۲/۵ μl از dNTP با غلظت ۲/۵، مقدار Taq DNA polymerase ۰/۳ μl با غلظت ۵ unit/μl، مقدار ۲ μl از پرایمر با غلظت ۲ Mμ، مقدار ۲ μl از PCR Buffer دارای غلظت ۱۰ برابر KCl [۵۰۰ mM و Tris-HCl (pH=8/4)] و مقدار ۱۴/۷ μl آب دویار تقطیر استریل بود. مخلوط ۱۵ 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 ۷-۵

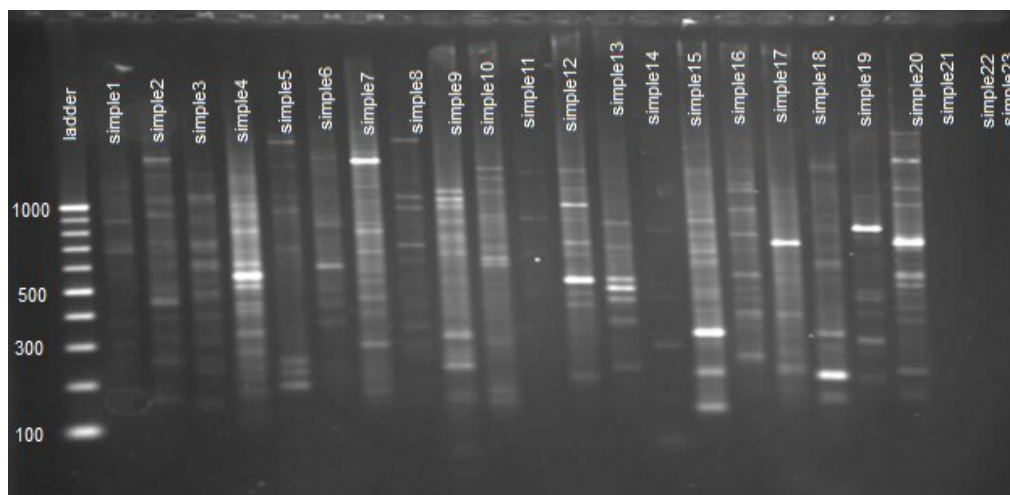
جدول ۲- نام پرایمرهای RPD و توالی مربوط به آنها

ردیف	نام پرایمر	توالی	دمای آنالیز
۱	OPNO1	CTCACGTTG(9)	۳۲
۲	OPDO3	GTCGCCGTC(9)	۴۱/۴
۳	H	GGTCAACCCT(10)	۳۲
۴	TIBMB19	TTGCGGACA(9)	۳۷
۵	OPC12	TGTCATCCC(9)	۴۱/۴
۶	398	CAGTGCTCTT(10)	۳۰
۷	TIBMBA14	CTTTGCGCA(9)	۳۷/۳
۸	TiBMBA11	CCACCTTCA(9)	۳۲
۹	UBC9	CCTGCGCTTA(10)	۳۷/۳
۱۰	OPK10	GTGCAACGT(9)	۳۷

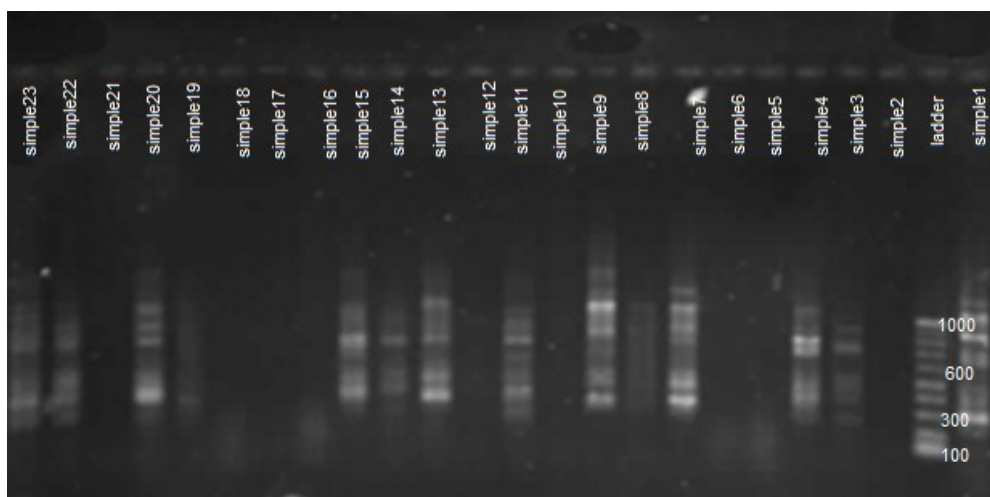
1- Polymerase chain reaction

طول کشید تا ژل بسته شود) و برداشتن شانه، بافر ۱X TBE، PH=۸ را در داخل تانک دستگاه الکتروفورز ریخته، حدود ۵ 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 ۱۴۰ دقیقه بود. به منظور برآورد جرم مولکولی محصولات واکنش زنجیره پلی مرز از نشانگر (Ladder) تا اندازه ۱۰۰bp تهیه شده از شرکت Fermentase به میزان ۶ ماکرولیتر استفاده شد. ژلباتیدیوم بروماید (۱۰µg/ml) به مدت ۱۵ 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 ۱ و ۲).

الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده حاصل از PCR: قطعات PCR برای هر پرایمر RAPD بر روی ژل آگاروز ۱٪ (W/V) و بافر TBE با ولتاژ ۹۹ به مدت ۱۴۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR برای نشانگرها مختلف به نسبت ۵ به ۱ با بافر (Loading 6X) مخلوط شد. بافر (Loading dye 6X) از سه ماده گلیسرول (برای افزایش چگالی DNA نمونه)، بروموفنل بلو و زایلن سیانول (مواد رنگی هستند که با ایجاد نوارهای رنگی، پیشرفت نمونه در ژل الکتروفورز را نشان می‌دهند)، تشکیل شده است. برای تهیه ژل آگارز ۱٪ به ترتیب ۱ گرم از پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر ۱X TBE، PH=۸ 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، ۱۵-۱۰ دقیقه



شکل ۱- ژل الکتروفورز افقی محصول PCR حاصل از مطالعه RAPD گیاه آنگوزه با استفاده از پرایمر UBC9 مربوط به جمعیت‌های (استان کرمان و یزد).



شکل ۲- ژل الکتروفورز افقی محصول PCR حاصل از مطالعه RAPD گیاه آنغوزه با استفاده از پرایمر OPDO3 مربوط به جمعیت‌های (استان کرمان و یزد)

بررسی همبستگی بین دندروگرام و ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفتیک محاسبه شد. همچنین آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام گرفت و پلات دو بعدی حاصل از دو مؤلفه اول آن رسم شد.

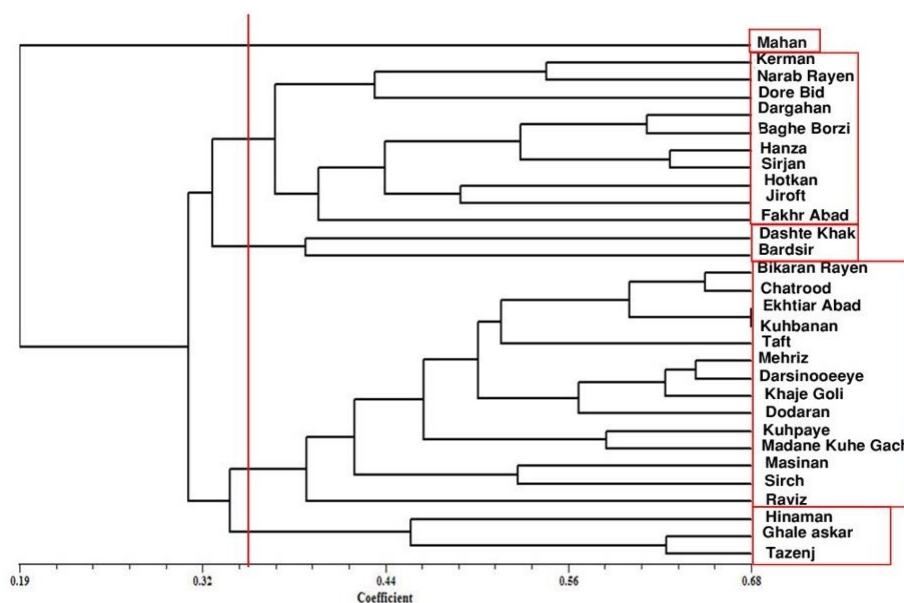
نتایج

مجموعاً ۱۲۷ قطعه DNA توسط ۱۰ آغازگر انتخاب شده برای آنالیز، تکثیر شد که از بین آنها ۹ قطعه در بین تمام ۳۰ توده یک شکل بودند و ۱۱۸ قطعه باقیمانده آنها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چند شکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. تعداد قطعات تکثیرشده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگر UBC9 و کمترین مربوط به آغازگر OPCL2 بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۱۵۰۰-۲۰۰۰ جفت باز تخمین زده شد. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر در سطح تشابه (۳۵٪) ۵ کلاس را نشان می‌دهد (شکل ۳). در کلاس ۱-

از ۱۵ آغازگر تصادفی تعداد ۱۰ آغازگر که باندهای بهتری داشتند، جهت آنالیز انتخاب شدند. در ابتدا باندهای واضح را مشخص کرده و با توجه به اندازه نشانگر ۱۰۰ 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 ۱۰ آغازگر انجام پذیرفت. بدین ترتیب 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 ۱۰ 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 بخش ورودی نرم‌افزار NTSYS انتقال داده شد. ماتریس فاصله با استفاده از ضریب تشابه دایس به کمک نرم‌افزار (NTSYS-Ver 2.02) حاصل شد، تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) انجام شد و دندروگرام مربوطه بدست آمد. به‌منظور

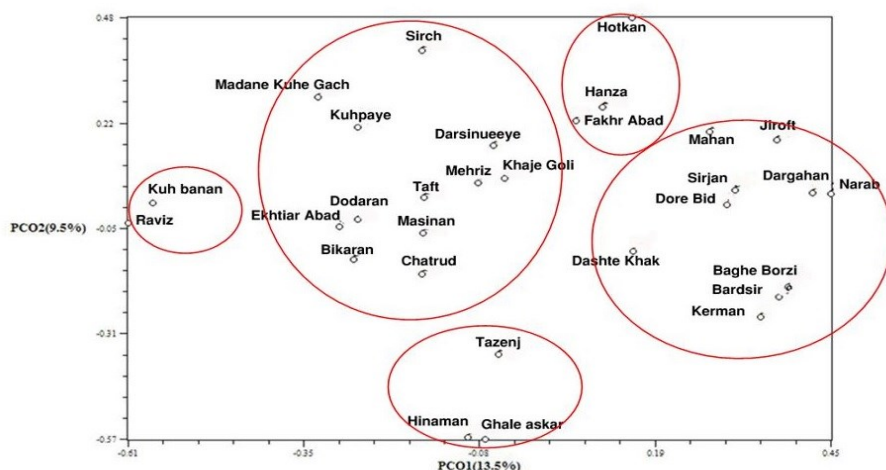
جزراویز شهر بابک را شامل می‌شوند. زیر کلاس ۲ خود به چندین زیر گروه دیگر تقسیم می‌شود. بیشتر توده‌ها در کلاس شماره ۲ متمرکز بودند که تنوع مولکولی اکثر این توده‌ها تا حد زیادی منطبق بر تنوع جغرافیایی بود. اما مواردی نیز وجود داشت که از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کردند. به‌عنوان مثال دو توده ماهان و کرمان 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 ۵ کلاس قابل مشاهده است (شکل ۴).

جمعیت‌های هی نمان، قلعه عسکر و طزنج مهریز قرار گرفته است، کلاس ۲- شامل جمعیت‌های راویز شهر بابک، سیرچ، مسینان شهر بابک، کوه کچ چترود، کوهپایه، دودران راین، خواجه گلی راور، دارسینویی، مهریز، تفت یزد، کوهبنان، اختیارآباد، بن در چترود، و بیکران راین، می‌شود، کلاس ۳- در برگیرنده جمعیت‌های دشت خاک زرنند و بردسیر است و کلاس ۴- 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 ۵- تنها جمعیت ماهان قرار دارد. کلاس ۲- که بیشترین ژنوتیپ‌ها را شامل می‌شود به دو زیر گروه تقسیم می‌شود که زیر گروه اول شامل راویز شهر بابک است و زیرگروه دوم بقیه اجزاء به



شکل ۳- دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش (UPGMA) با قطعات بدست

آمده از ۱۰ آغازگر در مطالعه RAPD



شکل ۴- نمودار رسته بندی ۳۰ جمعیت مطالعه شده با استفاده از دو مولفه اول آنالیز PCA در مطالعه RAPD

بحث

۲۰ توده بومی و ۵ توده اروپایی با کمک ۲۲ آغازگر مورد بررسی قرار گرفت که ۱۵ آغازگر ایجاد چند شکلی نمودند و دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاصل، ۵ گروه مجزا را تشکیل داده که نشان‌دهنده عدم تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی در این مطالعه بوده است (مهدی‌خانی، ۱۳۸۶). یاماگاشی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD به شناسایی ارقام و روابط ژنتیکی بین گونه‌های خرمالو پرداختند. در مجموع ۴۴۴ باند پلی مورفیک تشکیل شد (Yamagishi et al., 2005). منیرخان و همکاران در سال (۲۰۱۱) در پاکستان به بررسی ژرم‌پلاسم (*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

در تحقیق حاضر تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD در میان توده‌های آنغوزه وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در میان جمعیت‌های بومی آنغوزه جنوب شرق ایران (کرمان و یزد) نشان داد. مجموعاً ۱۲۷ قطعه DNA توسط ۱۰ آغازگر انتخاب شده برای آنالیز، تکثیر شد، که از این تعداد آغازگر ۱۱۸ قطعه چند شکل بدست آمد، بیشترین تعداد قطعه تکثیرشده مربوط به آغازگر UBC9 و کمترین مربوط به آغازگر opc12 بود. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر در سطح تشابه (۳۵٪) ۵ کلاس را نشان می‌دهد که کلاس دو بیشترین ژنوتیپ‌ها را شامل می‌شود که تنوع مولکولی اکثرین 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 استفاده از ۲۳ آغازگر RAPD تعداد ۴۷ جمعیت از گونه (*Bunium persicum*) مورد بررسی قرار گرفتند که براساس نتایج در ۱۰ گروه قرار داده شدند (کوهستانی و باقیزاده، ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای دیگر در بررسی ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی بایونه اروپایی براساس نشانگرهای ملکولی RAPD، ۲۵ توده از گونه (*Matricaria chamomile*) شامل

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 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.
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.

حتی در اکوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد درک چنین تنوع ژنتیکی در مدیریت و حفاظت ژرم پلاسماهای آنگوزه مفید باشد. در مطالعه حاضر با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تعداد ۳۰ نمونه مربوط به جمعیت‌های مختلف گونه آنگوزه در دو استان کرمان و یزد مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت و بدین منظور ۱۰ آغازگر به کار برده شد که حاصل آن ۱۲۷ 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 آنگوزه نشان می‌دهد که نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین این توده‌ها مناسب بوده توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان داده و توده‌ها را به خوبی گروه‌بندی نماید.

منابع

- ۱- امیددیگی، ر.، پیرمادی، م.، و کریم‌زاده، ق. ۱۳۸۳. بررسی روش‌های مختلف تیغ‌زنی بر عملکرد و بقای گیاه دارویی آنگوزه (*Ferula assa-foetide* L.).
- ۲- زرگری، ع. ۱۳۵۷. گیاهان دارویی (Vol. 2): دانشگاه تهران.
- ۳- عسکری، ف. ۱۳۷۸. بررسی کمی و کیفی ترکیب‌های موجود در اسانس (*Ferula assa foetida*) موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تحقیقات گیاهان دارویی و معطر.
- ۴- کوهستانی، س.د.، و باقیزاده، ا. ۲۰۰۸. 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، ۲۴(۴).
- ۵- مهدیخانی، ه. ۱۳۸۶. بررسی تنوع ژنتیکی بابونه (*Matricaria chamomile*) با استفاده از تکنیک RAPD پایان‌نامه کارشناسی ارشد.