

بررسی تنوع و روابط ژنتیکی در برخی از توده‌های بنگ‌دانه (*Hyoscyamus spp.*) بر اساس چندشکلی حاصل از درج رتروترانسپوزونی

علیرضا اصغری میرک^{۱*}، سید سیامک علوی کیا^۲ و سید ابوالقاسم محمدی^۳

۱- مربی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور مشکین‌شهر، مشکین‌شهر

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰)

چکیده

بنگ‌دانه به‌واسطه آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین از ارزش دارویی بالایی برخوردار است. بهبود کیفیت و کمیت آلکالوئیدهای بنگ‌دانه با استفاده از روش‌های به‌نژادی پیشرفته، مستلزم ارزیابی تنوع این گیاه است. تنوع ژنتیکی این گیاه با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در مطالعات متعددی بررسی شده و برتری نشانگرهای مولکولی نسبت به سایر نشانگرها به اثبات رسیده است. به‌همین منظور، در سال ۱۳۹۸ تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ بنگ‌دانه جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های شمال‌غرب کشور، با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و REMAP مورد بررسی قرار گرفت. برای نشانگرهای IRAP از ترکیب ممکن حاصل از هشت آغازگر LTR، هفت ترکیب تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند. در نشانگر REMAP از ترکیب ۱۱ آغازگر ISSR با هشت آغازگر LTR استفاده شد که از ۸۸ ترکیب ممکن، ۱۲ ترکیب قابل امتیازدهی بودند. متوسط میزان اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای IRAP و REMAP به ترتیب ۰/۳۰ و ۰/۳۲ و میانگین شاخص نشانگر برای این دو نشانگر برابر ۲/۵۹ و ۲/۴۷ برآورد شد. بر اساس این معیارها، نشانگر REMAP در برآورد تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه کاراتر از IRAP بود. در تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از این نشانگرها، تنوع درون جمعیتی بیشتر از بین جمعیتی برآورد شد که نشان از تنوع بالای این توده‌ها در شمال‌غرب ایران می‌دهد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP نتوانست گونه‌ها و توده‌ها را از یکدیگر تفکیک نماید ولی بر اساس نشانگر REMAP، گونه‌های *H. pusillus* و *H. reticulatus* تا حد بالایی از هم تفکیک شدند. حصول شاخص شانون بالا در این پژوهش، نشان داد که نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP با درج بالای خود در ژنوم توده‌های بنگ‌دانه، تنوع ژنتیکی بالایی را در درون توده‌های بنگ‌دانه القاء نموده‌اند.

واژگان کلیدی: بنگ‌دانه، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای IRAP و REMAP

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: alirezapnugen@pnu.ac.ir

مقدمه

آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به‌طور عمده در گیاهان تیره سیب‌زمینی به‌ویژه جنس بنگ‌دانه یافت می‌شوند. بنگ‌دانه به‌واسطه این آلکالوئیدها از ارزش دارویی بالایی برخوردار است. به‌طوری که هیوسیامین در درمان بیماری‌های اعصاب و روان، تهیه داروهای ضد تهوع، درمان دریازدگی، درمان بیماری‌های مسافرتی، انبساط مردمک چشم، درمان عفونت چشم و برطرف کردن حالت‌های اسپاسم کاربرد دارد؛ و اسکوپولامین هم اثر بسیار قوی در آرام کردن سلسله عصبی دارد و دارای خواص خواب‌آوری و تقویت‌کننده اثر مورفین است و از آن برای تسکین ناراحتی‌های عصبی، پارکینسون، لرزش‌های زمان کهولت، تسکین دردهای میگرن، درد دندان و افزایش قوای جنسی نیز استفاده می‌شود (Yadav et al., 2018). تعداد ۹ گونه از این گیاهان، منحصراً در ایران و ۱۸ گونه آن در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارند. این موضوع نشان می‌دهد که ایران از نظر ژرم‌پلاسم بنگ‌دانه بسیار غنی است. کاربردهای گسترده آلکالوئیدهای بنگ‌دانه در صنعت داروسازی، به‌نژادی و افزایش کیفیت و کمیت آلکالوئیدهای این گیاه را ضروری می‌سازد. اولین قدم برای اجرای برنامه‌های به‌نژادی روی بنگ‌دانه، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین اکوتیپ‌های مختلف بنگ‌دانه است. با مطالعه تنوع ژنتیکی می‌توان از ذخایر ژنتیکی این گیاه حفاظت کرد و ضمن القای پدیده هتروزیس به تولید انبوه بذور هیبرید دست یافت. ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، زمان‌بر است و تعدادی از صفات تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرند. لذا این روش کارایی لازم را ندارد؛ اما نشانگرهای مبتنی بر DNA با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی را برطرف کرده‌اند (Hosseini et al., 2021). تعداد این نشانگرها بسیار فراوان هستند و

در هر مرحله از رشد گیاه، قابل استفاده می‌باشند. در ضمن این نشانگرها زمان و هزینه پروژه‌های به‌نژادی را کاهش می‌دهند (Kaab Omeer et al., 2021; Chen et al., 2020). انگشت‌نگاری ژنتیکی گونه‌های بنگ‌دانه با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک (Mirzadeh Waqfi, 2013)، آناتومی (Khosru Mehr et al., 2012)، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (Mahfouz and Ottai, 2011)، ایزوزیم‌ها (Kouhsari et al., 2006)، نشانگر RAPD (Yousefi, 2009) و نشانگر ISSR (Nejad Habib Vash et al., 2012) انجام گرفته است. به عقیده پژوهشگران، نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک، ارزیابی دقیق‌تری از تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه ارائه می‌دهند (Prasad et al., 2022). در این بین نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP به‌دلیل تولید چندشکلی بسیار بالا، تکرارپذیری بسیار مطلوب، سهولت فنی، پراکندگی در کل ژنوم، فراوانی و فعالیت بالا در اغلب ژنوم‌ها، پایداری درج و افزایش خطی آن‌ها در ژنوم، مستقل بودن جایگاه درج نسخ جدید از نسخه اولیه، به ابزاری بسیار ایده‌آل برای مطالعات فیلوژنی (Cayır and Sevindik, 2022)، تنوع ژنتیکی (Baloch et al., 2022)، انگشت-نگاری ژنومی ارقام (Carracedo et al., 2022)، گزینش به کمک نشانگر (Afanasenko et al., 2022)، نشانمند کردن ژن‌ها (Zanganeh and Sheidai, 2022) تبدیل گشته‌اند. از این نشانگرها سابقاً برای تعیین تنوع بین گونه‌های Solanaceae استفاده شده است، اما در مورد تنوع ژنتیکی بر روی گونه‌های بنگ‌دانه گزارشی تا به‌حال ارائه نشده است. به‌طور کلی Solanaceae یک خانواده با تعداد زیادی گونه است و برای مطالعات رتروترانسپوزونی نسبتاً مناسب است. بر این اساس پژوهشگران در مطالعات مختلف از جمله تشخیص اولین LTR رتروترانسپوزونی فعال Tnt1A از توتون (Grandbastien et al., 1989)، بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی (Rogers and Pauls, 2000)، ارزیابی تنوع ژنتیکی سیب‌زمینی (Manetti et al., 2007) و برای تمایز گوجه‌فرنگی از سیب‌زمینی، تاتوره و گونه‌های نزدیک

پس از ضدعفونی با الکل اتانل، وارد تانک ازت مایع شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۱). برای استخراج DNA از تلفیقی از روش‌های سقایی معروف و همکاران (Saghai-Marouf *et al.*, 1984) و پروبسی و همکاران (Probeski *et al.*, 1997) استفاده شد. برای تعیین کمیت DNA، غلظت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از نسبت‌های جذب نوری و طول‌موج‌های ۲۶۰/۲۸۰، ۲۶۰/۲۳۰ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب آلودگی‌های پروتئینی، پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی و ذرات معلق مورد سنجش قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی کیفی نمونه‌های DNA استخراجی، نمونه‌ها روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

(Lightbourn *et al.*, 2007) از نشانگرهای رتروترانسپوزونی استفاده کرده‌اند. این پژوهش به‌منظور ارزیابی امکان استفاده از نشانگر مولکولی رتروترانسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌های بنگ‌دانه جهت طبقه‌بندی و ارزیابی پتانسیل آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی آینده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۸ با مطالعه فلور ایران و کسب یک سری اطلاعات غیرمکتوب از پژوهشگران مرکز تحقیقات کشاورزی مغان، ابتدا رویشگاه این گیاهان در استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل شناسایی شدند. تعداد ۱۰ توده بنگ‌دانه و از هر توده ۱۰ بوته گزینش شد. برگ‌های جوان و سالم این جمعیت‌ها جمع‌آوری و

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های بنگ‌دانه مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of studied henbane genotypes

| گونه Species | تعداد ژنوتیپ No. of genotypes | استان Province | محل جمع آوری Gathering location | ارتفاع از سطح دریا Altitude | عرض جغرافیایی Latitude | طول جغرافیایی Longitude |
|-----------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>H. reticulatus</i> | 10 | | اردبیل Ardebil | 1350 | 382484 | 483001 |
| <i>H. reticulatus</i> | 10 | اردبیل Ardebil | خلخال Khalkhal | 1843 | 390428 | 477543 |
| <i>H. pusillus</i> | 10 | | مشکین‌شهر Meshkinshahr | 1400 | 383981 | 476777 |
| <i>H. niger</i> | 10 | | گیوی Givi | 1700 | 376868 | 483373 |
| <i>H. pusillus</i> | 10 | | تبریز Tabriz | 1348 | 380792 | 462885 |
| <i>H. niger</i> | 10 | | شبستر Shabestar | 1660 | 382130 | 455930 |
| <i>H. reticulatus</i> | 10 | آذربایجان شرقی East Azerbaijan | آذرشهر Azarshahr | 1468 | 374625 | 458521 |
| <i>H. pusillus</i> | 10 | | سراب Sarab | 1650 | 375770 | 473480 |
| <i>H. pusillus</i> | 10 | | اهر Ahar | 1341 | 382839 | 400412 |
| <i>H. niger</i> | 10 | | هریس Heris | 1800 | 382420 | 472220 |

در این پژوهش نشانگرهای IRAP و REMAP (Alavikia *et al.*, 2008) برای تجزیه و تحلیل ژنوم *Hyoscyamus spp.* مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲ و ۳). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکنیک‌های IRAP و REMAP مطابق با روش کلندار و شولمن (Kalendar and Schulman, 2006) با اندکی تغییرات جهت بهینه‌سازی واکنش، صورت گرفت. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD, C 1000™ Thermal Cycler) و چرخه‌های PCR بدین شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت-سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۶ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای اختصاصی بین ۳۶-۴۴ به مدت دو دقیقه (بسته به نوع آغازگر)، مرحله بسط به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس.

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد تفکیک شدند. در فناوری IRAP از آغازگرهای ۲۵ تا ۳۵ نوکلئوتیدی مکمل LTRهای سمت ۳' به ۵' رتروترانسپوزون-های ژنوم جو (*Hordeum vulgare*) استفاده شد (Alavikia *et al.*, 2008). برای ایجاد ترکیبات آغازگری REMAP، کل هشت آغازگر رتروترانسپوزونی و ۱۱ مورد از آغازگرهای ISSR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲ و ۳).

پس از اتمام مراحل PCR به منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده و چندشکلی بین نمونه‌ها از الکتروفوردر ژل آگارز ۱/۸ درصد با ولتاژ ۱۲۰V به مدت ۲ ساعت استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز ژل‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر رنگ‌آمیزی شدند و سپس رنگ‌بری آنها با آب مقطر انجام شد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در REMAP

Table 2. Characteristics of ISSR primers used in REMAP

| شماره Number | نام آغازگر Primer name | توالی ۵' → ۳' Sequence 5' → 3' | دمای ذوب (C°) Melting temperature (C°) | دمای اتصال (C°) Annealing temperature (C°) |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|--|--|
| 825 | ISSR1 | (AC)8T | 49.2 | 53 |
| 826 | ISSR2 | (AC)8C | 53.3 | 53 |
| 827 | ISSR3 | (AC)8G | 54.9 | 52 |
| 830 | ISSR4 | (TG)8G | 56.1 | ∅ |
| 834 | ISSR5 | (AG)8yT | 48 | 53 |
| 835 | ISSR6 | (AG)8yC | 50.3 | 49 |
| 840 | ISSR7 | (GA)8yT | 48 | ∅ |
| 841 | ISSR8 | (GA)8yC | 50.3 | 53 |
| 845 | ISSR9 | (CT)8rG | 50.3 | ∅ |
| 847 | ISSR10 | (CA)8rC | 50.3 | 49 |
| 848 | ISSR11 | (CA)8rG | 50.3 | 49 |

∅: به نشانه عدم تکثیر، r نشان دهنده A یا G و Y نشان دهنده C یا T می‌باشد.

∅: As a sign of non-replication; r: represents A or G and Y: represents C or T.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده در مطالعه

Table 3. The characteristics of retrotransposon primers used in the study

| نام و جهت آغازگر Name and direction of primer | توالی (5' → 3') Sequence (5' → 3') |
|--|---------------------------------------|
| Sukkula → | GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC |
| Nikita → | CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC |
| LTR6149 → | CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT |
| 3'LTR → | TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA |
| LTR6150 ← | CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACACATGTA |
| 5'LTR1 ← | TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA |
| 5'LTR2 ← | ATCATTCCCTCTAGGGCATAATTC |
| LTR7286 → | GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC |

جدول ۴- دمای اتصال بهینه آغازگرهای رتروترانسپوزونی به شکل مستقل و ترکیبات دوتایی (°C)

Table 4. Annealing temperature of retrotransposon primers either alone or in combinations (°C)

| نام آغازگر Primer name | Sukkula | Nikita | LTR6149 | 3'LTR | LTR6150 | 5'LTR1 | 5'LTR2 | LTR7286 |
|---------------------------|---------|--------|---------|-------|---------|--------|--------|---------|
| Sukkula | ∅ | | | | | | | |
| Nikita | 62 | ∅ | | | | | | |
| LTR6149 | ∅ | ∅ | 62 | | | | | |
| 3'LTR | ∅ | 66 | ∅ | 64 | | | | |
| LTR6150 | ∅ | ∅ | ∅ | 65 | ∅ | | | |
| 5'LTR1 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | | |
| 5'LTR2 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | 60 | |
| LTR7286 | ∅ | 59 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

∅: عدم تکثیر موفق

∅: No successful replication

ماتریس فاصله حاصل از نرم‌افزار GenAIEx 6.4 که بر اساس فاصله تعریف شده توسط هاف و همکاران (Huff *et al.*, 1993) برآورد شده بود، به نرم‌افزار MEGA (Tamura *et al.*, 2007) منتقل شد. سپس با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution دندروگرام رسم شد. به منظور تعیین سهم هر صفت از تنوع کل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. تجزیه به بردارهای اصلی PCOA نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.4 و بر اساس ماتریس فاصله هاف و همکاران (Huff *et al.*, 1993) با هدف ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد.

نتایج و بحث

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اسپکتروفوتومتری نشان داد که DNA استخراجی از برگ ژنوتیپ‌های مختلف بنگ‌دانه از کیفیت و کمیت نسبتاً خوبی برخوردار است. در استخراج DNA، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین $1/6 \pm 1/75$ بود. با استفاده از نسبت جذب ۳۲۰ نانومتر آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی، پلی‌فنولی و ذرات معلق نیز بررسی شد (جدول ۵).

محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از جمع مربع فراوانی آلی P_i^2 و جمع مربع فراوانی عدم وجود آلی P_j^2 و حذف لوکوس منومورف از طریق رابطه $PIC = 1 - \sum P_i^2$ محاسبه شد (Chadha and Gopalakrishna, 2007). شاخص نشانگری (MI) با استفاده از فرمول $MI = PIC \times EMR$ هر آغازگر محاسبه شد. در این رابطه EMR نسبت چندگانه مؤثر می‌باشد که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژنوتیپ است و برحسب رابطه $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه می‌شود. در این رابطه n_p تعداد کل جایگاه‌های ژنی چندشکل می‌باشد و β از رابطه $\beta = n_p / n_p + n_{np}$ به دست می‌آید. n_p تعداد باندهای چندشکل و n_{np} تعداد باندهای یک‌شکل می‌باشد (Powell *et al.*, 1996). این محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها با استفاده از شاخص اطلاعات شانون با رابطه $I = - \sum P_i \ln P_i$ تعیین شد. که در آن P_i فراوانی آلی i در یک جایگاه معین می‌باشد (Zhu *et al.*, 1998). به منظور تجزیه واریانس مولکولی بر اساس روش اکسفیر و همکاران (Excoffier *et al.*, 1992) و همچنین تجزیه به بردارهای اصلی از نرم‌افزار GenAIEx 6.4 (Peakal and Smouse, 2006) استفاده شد. برای انجام تجزیه فیلوژنی،

جدول ۵- نتایج اسپکتروفوتومتری تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراجی از ژنوتیپ‌های *Hyoscyamus* spp.

Table 5. Spectrophotometric results showing the quantity and quality of genomic DNA extracted from *Hyoscyamus* spp genotypes.

| تعداد نمونه | میانگین غلظت DNA (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | میانگین نسبت جذب | میانگین جذب |
|-------------------|--|---|---------------------------|
| Number of samples | Average DNA concentration (µg/ml) | The average absorption ratio is 260/280 | Average absorbance 320 nm |
| 96 | 771.5 ± 410 | 1.75 ± 1.6 | 0.005 ± 0.002 |

Mohsenzadeh (2018). محسن‌زاده گل‌فزایی و همکاران (2018) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون، میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرها را بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ و شاخص نشانگر را ۱/۱۵ تا ۵/۸۷ به‌دست آوردند. میانگین MI در این پژوهش برابر با ۲/۵۹ و مقادیر بیشینه و کمینه آن به‌ترتیب برابر با ۴/۳۴۴ و ۱/۰۷۳ برای آغازگر LTR6149 و ترکیب آغازگری LTR7286-Nikita به‌دست آمد (جدول ۶). آغازگرهای 3'LTR-LTR6150 و LTR6149 به‌ترتیب با شاخص نشانگری ۳/۵۶۰ و ۴/۳۴۴ می‌توانند کارایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها داشته باشند.

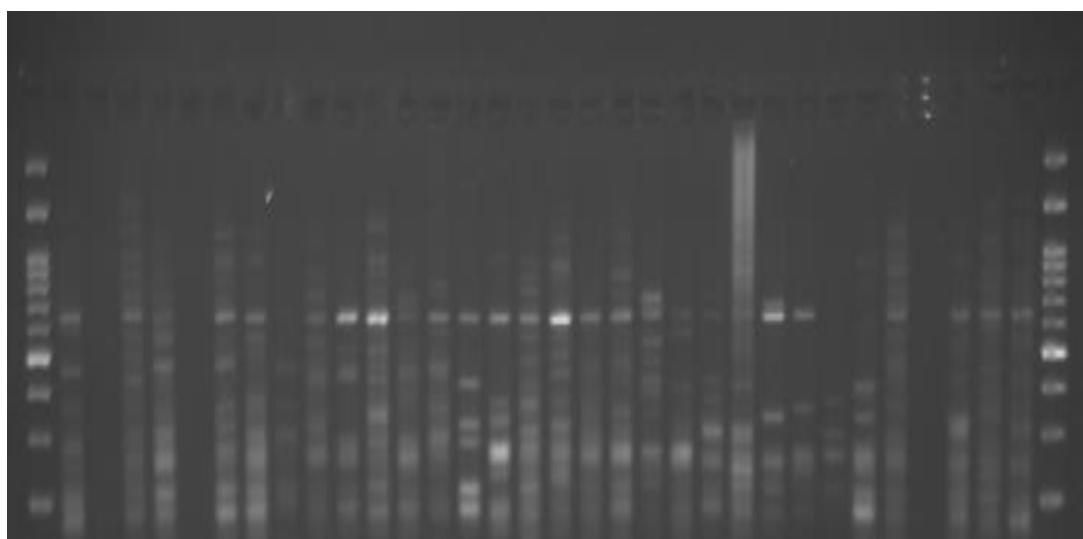
چندشکلی و کارایی نشانگرهای REMAP: از ۸۸ ترکیب ممکن حاصل از ۱۱ آغازگر ISSR و ۸ آغازگر LTR، ۱۲ ترکیب دارای تکثیر مطلوب بودند. حاصل این ۱۲ ترکیب، ۹۲ نشانگر چندشکلی با طول ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز بود. تعداد متوسط نشانگر به ازای هر ترکیب آغازگر، ۳/۶۳۶ و مقادیر آن از ۲/۰۱ برای ترکیب آغازگرهای 3'LTR و ISSR834 تا ۵/۶۹ برای ترکیب 5'LTR2 و ISSR841 متغیر بود. حداکثر و حداقل مقادیر PIC به‌ترتیب برابر با ۰/۴۰۵ و ۰/۲۷۶ برای ترکیب آغازگری 3'LTR-ISSR841 و میانگین آن برابر ۰/۳۲ محاسبه شد. میانگین MI برابر با ۲/۴۷ و مقادیر بیشینه و کمینه آن برابر با ۳/۴۶۰ و ۱/۲۱۷ برای ترکیب‌های آغازگری LTR7286-ISSR835 و 3'LTR-ISSR834 به‌دست آمد. آغازگرهای 5'LTR2-ISSR835، 5'LTR2-ISSR841، LTR7286-ISSR825، LTR7286-ISSR847 و LTR7286-ISSR835 با شاخص نشانگرهای نسبتاً بهتر، کارایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها داشتند (جدول ۷). محسن‌زاده گل‌فزایی و همکاران (2012) (Mohsenzadeh Golfzaei et al., 2012) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی توتون‌های گرمخانه‌ای میزان PIC را بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ گزارش کردند.

چندشکلی، اطلاعات ژنومی و کارایی نشانگرهای IRAP: از ۳۶ ترکیب ممکن حاصل از هشت آغازگر LTR، هفت ترکیب تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند. البته تمام هشت رتروترانسپوزون مورد بررسی تکثیر داشتند، اما نتایج نشان دهنده وجود تعداد کم رتروترانسپوزون‌های واجد LTR جو در ژنوم *Hyoscyamus* spp. است. ترکیبات آغازگری در مجموع ۵۹ نشانگر با طول ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز ایجاد کردند که تمام آن‌ها چندشکلی بودند (شکل ۱). تعداد متوسط نشانگرها به ازای هر ترکیب آغازگر، ۳/۶۷۵ و مقادیر آن از ۱/۵ برای ترکیب آغازگری LTR7286-Nikita تا ۵/۱۸ برای LTR6149 متغیر بود. پایین بودن این مقدار در مقایسه با مطالعات دیگر می‌تواند به دلیل تعداد کم نشانگر چندشکلی ایجاد شده توسط هر آغازگر باشد که خود نیز می‌تواند مبین فاصله زیاد این رتروترانسپوزون‌های LTR در ژنوم *Hyoscyamus* و در کل فراوانی اندک آن‌ها باشد. در این تحقیق محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) متوسطی با میانگین ۰/۳۰ برای نشانگرهای حاصل برآورد شد. حداکثر و حداقل مقدار PIC به‌ترتیب برابر با ۰/۴۳۴ برای ترکیب LTR6149-LTR6149 و ۰/۲۰۸ برای ترکیب آغازگری Sukkula-Nikita محاسبه شد (جدول ۶). دلیل پایین بودن مقدار PIC در نشانگرها می‌تواند مربوط به یکسان بودن الگوی درج رتروترانسپوزونی و در نتیجه یکسان بودن افراد از لحاظ ژنتیکی و تکاملی باشد. حسنی‌تسیه و همکاران (2014) (Hassani Tsieh et al., 2014) در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های مختلف توتون با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP، میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرها را بین ۰/۱۶ تا ۰/۳۳ و شاخص نشانگر را ۰/۳۴ تا ۶/۲۵ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌دست آوردند. گروهی از محققان در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵۱ ژنوتیپ سیب‌زمینی با استفاده از نشانگر iPBS، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها را ۰/۱۲ تا ۰/۳۱ به‌دست آوردند (Demirel et al., 2014).

جدول ۶- شاخص نشانگر (MI) و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) ترکیبات IRAP

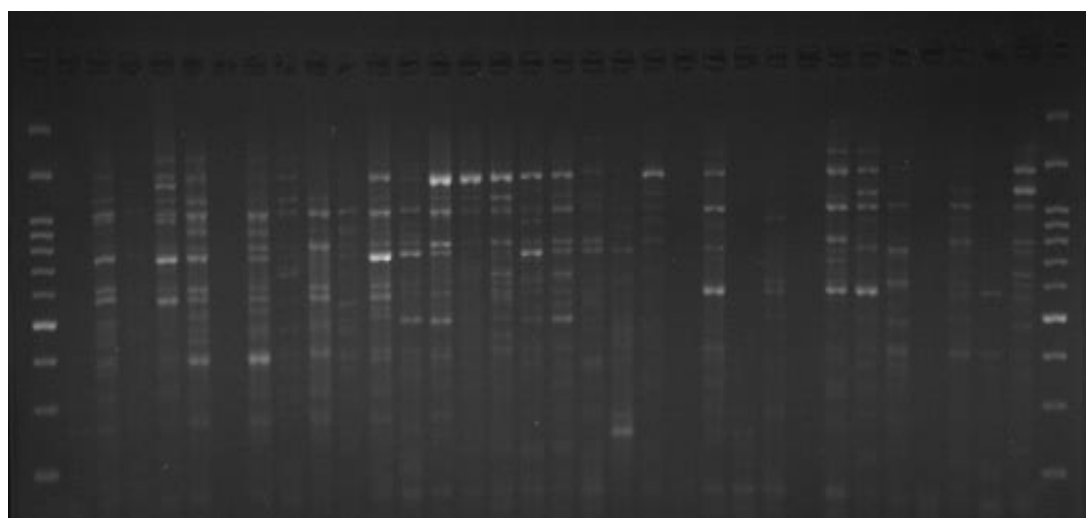
Table 6. Marker index (MI) and polymorphic information content (PIC) of IRAP combination

| ترکیبات آغازگری Premier combination | میزان اطلاعات چندشکلی Polymorphic information | شاخص نشانگر Marker index |
|--|--|-----------------------------|
| 3'LTR- Nikita | 0.290 | 2.033 |
| 3'LTR-3'LTR | 0.315 | 2.835 |
| 3'LTR-LTR6150 | 0.356 | 3.560 |
| LTR7286- Nikita | 0.268 | 1.073 |
| LTR6149-LTR6149 | 0.434 | 4.344 |
| 5'LTR2-5'LTR1 | 0.240 | 2.644 |
| Sukkula-Nikita | 0.208 | 1.665 |
| میانگین Mean | 0.30 | 2.59 |



شکل ۱- چندشکلی نشانگرهای IRAP حاصل از آغازگر 3'LTR در بنگ‌دانه

Figure 1. Polymorphism of IRAP markers from the 3'LTR primer in henbane



شکل ۲- چندشکلی نشانگرهای REMAP حاصل از ترکیب آغازگری ISSR835-LTR7286 در بنگ‌دانه

Figure 2. Polymorphism of REMAP markers resulting from ISSR835-LTR7286 primer combination in henbane

جدول ۷- شاخص نشانگر (MI) و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) ترکیبات REMAP

Table 7. Marker index (MI) and polymorphic information content (PIC) of REMAP combination

| ترکیبات آغازگری | میزان اطلاعات چندشکلی | شاخص نشانگر |
|---------------------|-------------------------|--------------|
| Premier combination | Polymorphic information | Marker index |
| 5'LTR2-ISSR835 | 0.369 | 3.329 |
| 5'LTR2-ISSR841 | 0.326 | 3.264 |
| 3'LTR-ISSR827 | 0.313 | 1.881 |
| 3'LTR-ISSR834 | 0.405 | 1.217 |
| 3'LTR-ISSR847 | 0.366 | 1.464 |
| 3'LTR-ISSR841 | 0.276 | 2.229 |
| 5'LTR1-ISSR826 | 0.278 | 2.863 |
| 5'LTR1-ISSR841 | 0.286 | 2.295 |
| LTR7286-ISSR825 | 0.286 | 3.388 |
| LTR7286-ISSR840 | 0.376 | 1.817 |
| LTR7286-ISSR847 | 0.302 | 3.460 |
| LTR7286-ISSR835 | 0.346 | 3.460 |
| میانگین | 0.32 | 2.47 |
| Mean | | |

نشان دهنده وجود تنوع مناسب بین ژنوتیپ‌های سیب-زمینی است. نیوو و ژاو (Niu and Zhao, 2010) در مطالعه-ی تنوع ژنتیکی ۷۳ رقم بادمجان توسط نشانگر مولکولی REMAP، شاخص اطلاعات شانون بین ارقام بادمجان را ۰/۵۴۲۴ به دست آوردند که نشان از تنوع بالا بین ارقام بادمجان می‌دهد (Niu and Zhao, 2010). برآورد شاخص تنوع شانون بالا در این پژوهش، نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون جمعیت‌های بنگ‌دانه و درج بالای نشانگرهای رتروترانسپوزونی در ژنوم جمعیت‌های بنگ‌دانه است.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): مطابق نتایج تجزیه واریانس مولکولی حاصل از ۵۹ نشانگر IRAP و ۹۲ نشانگر REMAP اختلاف بین گونه‌ها از لحاظ نشانگرهای IRAP غیرمعنی دار ولی از لحاظ نشانگرهای REMAP در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود (جدول ۹). واریانس بین و درون جمعیت‌ها از لحاظ هر دو سیستم نشانگر در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار بود و در هر دو سیستم نشانگر، واریانس درون جمعیت‌ها بیشتر از واریانس بین جمعیت‌ها برآورد شد. بر اساس نتایج حاصل می‌توان اظهار داشت که به علت بالا بودن واریانس درون جمعیت‌ها و همچنین کم بودن درجه آزادی بین گونه‌ها، تنوع بین

بررسی تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها: میزان تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها با استفاده از شاخص اطلاعات شانون (Zhu *et al.*, 1998) محاسبه گردید (جدول ۸). برای نشانگرهای IRAP به ترتیب بیشترین و کمترین سطح تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص تنوع ژنی شانون برابر با ۰/۵۲۳ و ۰/۲۶۷ بود. حداکثر و حداقل این مقدار برای نشانگرهای REMAP برابر با ۰/۵۱۶ و ۰/۳۰۶ برآورد شد. بیشتر بودن میزان شاخص شانون نشان دهنده تنوع درون جمعیتی است. مکان‌های ژنی که میزان شاخص شانون در آن‌ها بالاتر باشد، تنوع بین ژنوتیپ‌ها را بهتر نشان می‌دهند. حسنی تسیه و همکاران (Hassani Tsieh *et al.*, 2014) میانگین شاخص شانون را برای تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی توتون به ترتیب ۰/۵، ۰/۳۷، ۰/۲۶ و ۰/۳۷ به دست آوردند و آغازگرهای RTR-1، RTR-10، RTR-8، RTR-2 و UBC823+RTR-8 را که دارای بیشترین میزان شاخص شانون بودند را به عنوان آغازگرهای مطلوب برای توجیه بهتر تنوع ژنتیکی درون جمعیتی توتون معرفی کردند. در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی با استفاده از نشانگرهای ISSR، توسط سخدری و همکاران (Sokhdari *et al.*, 2013) شاخص اطلاعات شانون ۰/۵ به دست آمد که

مطالعه وجود دارد. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در جمعیت - های مورد مطالعه در مقایسه با تنوع بین جمعیتی بیشتر بود که این امر می‌تواند ناشی از وجود تفاوت‌های ژنتیکی زیاد در افراد درون جمعیت از لحاظ مکان‌های ژنی تکثیر یافته باشد و مؤیدی بر ناهمگنی درون جمعیت باشد.

گونه‌ای از نظر نشانگرهای رتروترانسپوزونی به‌ویژه IRAP قابل مشاهده نبود. از سوی دیگر با توجه به معنی دار بودن واریانس بین جمعیت‌ها نیز می‌توان اذعان داشت که واریانس‌های درون جمعیت نیز دارای مقادیر قابل توجهی می‌باشند و تنوع قابل ملاحظه‌ای در داخل جمعیت‌های مورد

جدول ۸- شاخص اطلاعات شانون مربوط ترکیبات آغازگری IRAP و REMAP

Table 8. Shannon information index related to IRAP REMAP primers

| REMAP ترکیبات آغازگری | شاخص اطلاعات شانون | IRAP ترکیبات آغازگری | شاخص اطلاعات شانون |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| REMAP primer combination | Shannon information index | IRAP primer combination | Shannon information index |
| 5'LTR2-ISSR835 | 0.414 | 3'LTR-Nikita | 0.368 |
| 5'LTR2-ISSR841 | 0.352 | 3'LTR-3'LTR | 0.397 |
| 3'LTR-ISSR827 | 0.414 | 3'LTR-LTR6150 | 0.424 |
| 3'LTR-ISSR834 | 0.516 | LTR7286-Nikita | 0.322 |
| 3'LTR-ISSR847 | 0.423 | LTR6149-LTR6149 | 0.523 |
| 3'LTR-ISSR841 | 0.318 | 5'LTR2-5'LTR1 | 0.318 |
| 5'LTR1-ISSR826 | 0.306 | Sukkula-Nikita | 0.267 |
| 5'LTR1-ISSR841 | 0.326 | - | - |
| LTR7286-ISSR825 | 0.343 | - | - |
| LTR7286-ISSR840 | 0.474 | - | - |
| LTR7286-ISSR847 | 0.338 | - | - |
| LTR7286-ISSR835 | 0.446 | - | - |
| میانگین REMAP | 0.778 | میانگین IRAP | 0.374 |
| Mean of REMAP | | Mean of IRAP | |

رتروترانسپوزونی مورد مطالعه در این جمعیت‌ها باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی توسط حسنی تسیه و همکاران (Hassani Tsieh *et al.*, 2014) روی تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های توتون نشان داد که از کل تنوع ژنتیکی، ۳۲/۷۳ درصد تنوع ژنتیکی بین تیپ‌ها و ۶۷/۲۷ درصد آن تنوع درون تیپ‌ها را توجیه می‌کند. محققان تنوع ژنتیکی ۲۴ جمعیت سیب‌زمینی تراپلوئید از کشورهای مختلف را با استفاده از نشانگرهای SCOT، ISSR و RAPD بررسی و با تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) نشان دادند که تنوع درون جمعیتی به‌طور قابل توجهی بالاتر از تنوع بین جمعیتی است (Gorji *et al.*, 2011).

به‌طور کلی ناهمگنی زیاد در درون جمعیت می‌تواند دلایل زیادی از جمله ماهیت پلی‌پلوئیدی، دگرگشتی، تلاقی‌های مختلف بین ارقام، اختلاط فیزیکی بذور و غیره داشته باشد. در این تحقیق بالا بودن تنوع در درون جمعیت می‌تواند به انجام تلاقی بین ارقام از گروه‌های مختلف، اختلاط بذور هنگام تکثیر یا کافی نبودن ترکیبات آغازگری برای پوشش کامل ژنوم و در نتیجه عدم ارزیابی کامل ژنوتیپ‌ها از لحاظ تنوع ژنتیکی در کل ژنوم مرتبط باشد. تنوع کمتر در بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان دهنده میزان بالای جریان ژنی مابین جمعیت‌ها می‌باشد. علاوه بر این، بخش بزرگی از تنوع درون جمعیت‌ها احتمالاً می‌تواند به‌خاطر فعالیت مختص جمعیت و چندشکلی درجی منحصر خانواده‌های

جدول ۹- نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشانگرهای IRAP و REMAP
Table 9. Results of molecular variance analysis of IRAP and REMAP markers

| نوع آغازگر Primer type | منابع تغییرات S.O.V | درجه آزادی D.F | مجذور مربعات S.S | میانگین مربعات M.S | درصد واریانس % Variance | واریانس برآورد شده Estimated Variance | شاخص تثبیت Fixatin index | P |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------------|-------|
| IRAP | بین گونه‌ها Between Species | 2 | 35.176 | 17.638 | 0 | 0.00 | 0.000 | 0.967 |
| | بین جمعیت‌ها Between Populations | 7 | 142.941 | 20.420 | 12 | 1.196 | 0.117** | 0.001 |
| | درون جمعیت‌ها Within Populations | 86 | 772.867 | 8.987 | 88 | 8.986 | 0.882** | 0.001 |
| | کل Total | 95 | 951.083 | | 100 | 10.183 | | |
| REMAP | بین گونه‌ها Between Species | 2 | 84.092 | 42.046 | 1 | 0.157 | 0.010 | 0.036 |
| | بین جمعیت‌ها Between Populations | 7 | 258.015 | 36.859 | 15 | 2.447 | 0.152** | 0.001 |
| | درون جمعیت‌ها Within Populations | 86 | 1157.633 | 13.461 | 84 | 13.461 | 0.838** | 0.001 |
| | کل Total | 95 | 1499.740 | | 100 | 16.065 | | |

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

** : Sighnificant at 1% probability level

دیگر افراد این گروه شامل ۱۱ ژنوتیپ از گونه *H.niger* و ۲۸ ژنوتیپ از گونه *H.reticulatus* بودند. در گروه یک، بیشتر ژنوتیپ‌های مربوط به توده‌های آذرشهر، اردبیل و خلخال که از گونه *H.reticulatus* هستند قرار گرفتند. گروه دوم مشتمل بر ۲۹ ژنوتیپ شد که به ترتیب تعداد ۱۰، ۱۰، ۵ و ۴ ژنوتیپ متعلق به اهر، سراب، هریس و گیوی بودند. از این تعداد، ۲۰ ژنوتیپ از گونه *H.pusillus* و ۹ ژنوتیپ از گونه *H.niger* بودند. گروه ۳، شامل ۲۸ ژنوتیپ بود که به ترتیب تعداد ۱۰، ۱۰، ۵، ۲ و ۱ متعلق به تبریز، مشکین-شهر، هریس، آذرشهر و شبستر بودند. در این گروه ۲۰ ژنوتیپ از گونه *H.pusillus*، ۶ ژنوتیپ از گونه *H.niger* و ۲ ژنوتیپ از گونه *H.reticulatus* قرار داشتند.

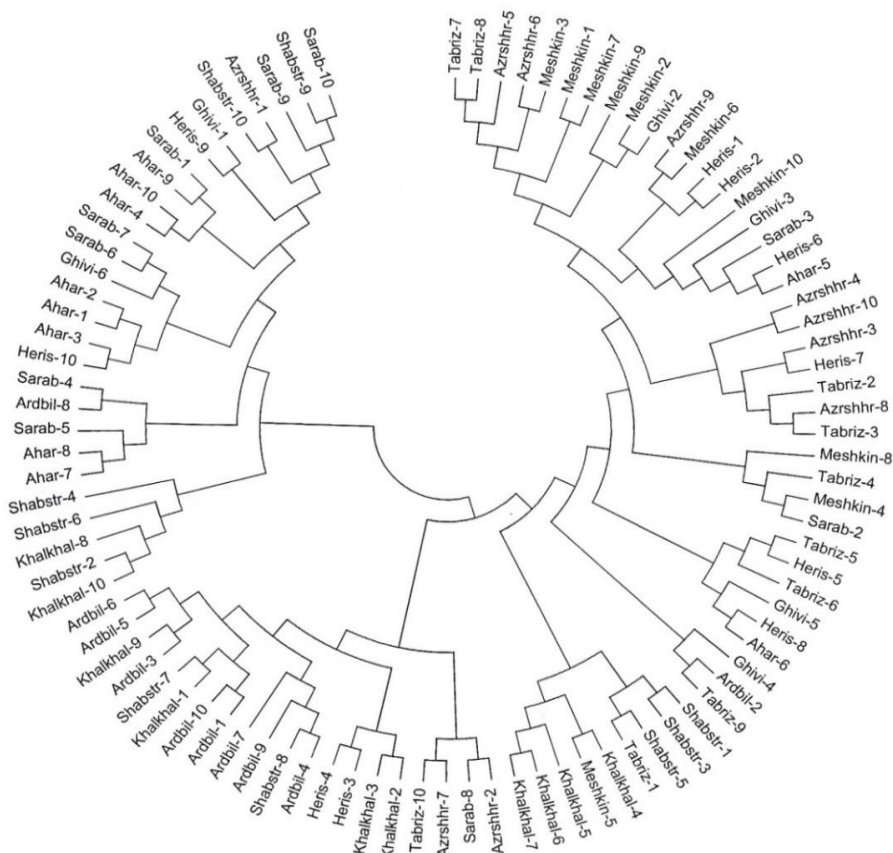
گونه *H.niger* در هر سه گروه وجود داشت و تفکیک مناسبی برای این گونه مشاهده نشد. ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر، آذرشهر و شبستر در حالی که دارای فاصله جغرافیایی بودند، در گروه‌های یک و سه هم‌گروه شدند. در حالت کلی در نتایج نشانگرهای REMAP در مقایسه با

تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای IRAP: دندروگرام حاصل از نشانگرهای IRAP بر اساس ماتریس فاصله‌های بین گروهی حاصل از ماتریس هاف و همکاران (Huff et al., 1993) با روش Minimum Evolution در شکل ۳ آورده شده است. با توجه به دندروگرام، برای ۹۶ ژنوتیپ بنگ‌دانه از گونه‌های *H.pusillus*، *H.reticulatus* و *H.niger* گروه‌بندی مناسبی برای تفکیک توده‌ها از یکدیگر مشاهده نشد و در حالت کلی می‌توان گفت که در توده‌ها از لحاظ نشانگرهای IRAP تفکیک چندانی از نظر جغرافیایی وجود نداشت. این امر نشان دهنده شباهت ژنتیکی بین توده‌های بنگ‌دانه در استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل است.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای REMAP: با توجه به دندروگرام (شکل ۴)، ۹۶ ژنوتیپ از گونه‌های *H.reticulatus*، *H.Pusillus* و *H.niger* در ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند. در گروه اول ۳۹ ژنوتیپ قرار گرفتند که به ترتیب تعداد ۹، ۲، ۱۰، ۸ و ۱۰ ژنوتیپ متعلق به شبستر، گیوی، اردبیل، آذرشهر و خلخال بودند. به عبارت

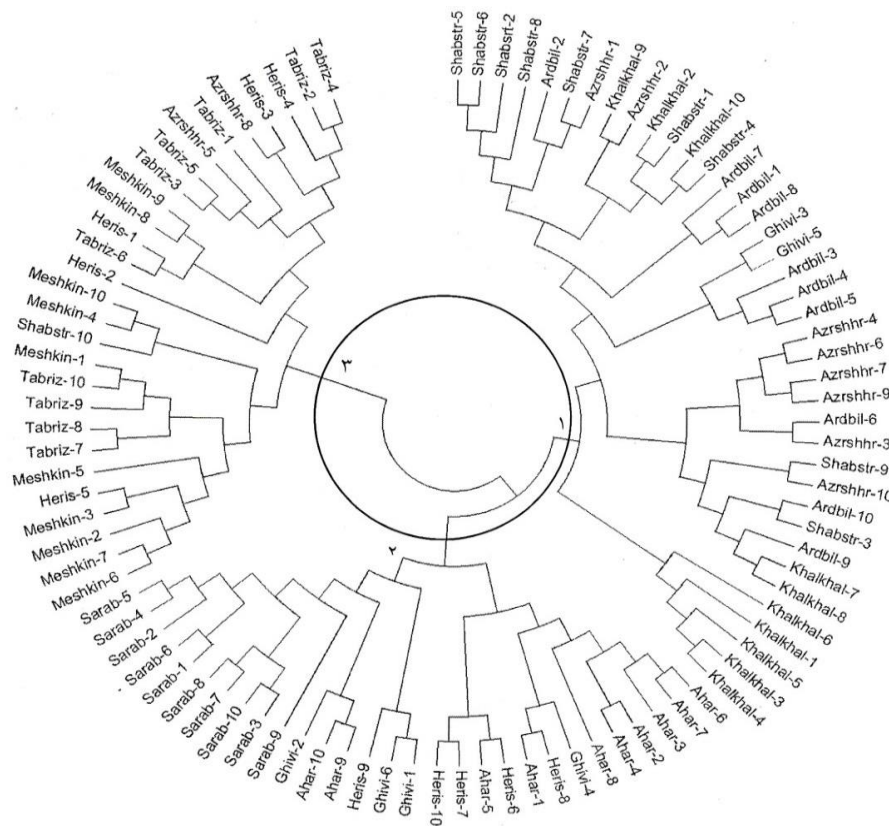
نشانه‌های IRAP تفکیک بهتری مشاهده شد. به طوری که تمام ژنوتیپ‌ها در توده‌های اردبیل، خلخال، اهر، سراب، مشکین شهر و تبریز به طور کلی تفکیک شدند و ژنوتیپ‌های مربوط به هر کدام از توده‌ها در یک گروه قرار گرفتند. البته این تفکیک به صورت نسبی برای ژنوتیپ‌های مربوط به توده‌های شبستر و آذرشهر نیز مشاهده شد. از نظر جغرافیایی نیز تفکیک قابل توجهی مشاهده نشد و ژنوتیپ‌هایی از مناطق جغرافیایی متفاوت با هم در یک گروه قرار گرفتند. به عنوان مثال، نمونه‌های جمع‌آوری شده از آذرشهر، شبستر، هریس و گیوی در زیرگروه‌های کاملاً متفاوت و دور از هم قرار گرفتند و مخالف نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نسبتاً دور از هم بودند مثل (مشکین شهر، شبستر و آذرشهر) در یک زیرگروه و در کنار هم دسته‌بندی شدند. در این مورد مقدم و همکاران (Moghaddam *et al.*, 2000) با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گندم دیپلوئید وحشی (*Triticum*

با نشانگرهای ایزوزایم بیان کردند که مناطق جغرافیایی نزدیک به هم ممکن است از نظر اکولوژیکی با یکدیگر کاملاً متفاوت باشند. همچنین مناطقی که از نظر جغرافیایی با یکدیگر فاصله دارند ممکن است از نظر شرایط فیزیولوژیکی به یکدیگر شبیه باشند که به خاطر قرار گرفتن توده‌ها در مناطق میکروکلیمایی مشابه می‌باشد. همچنین خارستانی و همکاران (Kharestani *et al.*, 2013) در این زمینه معتقد هستند که ممکن است بین گونه‌های وحشی شباهت زیادی از نظر ژنتیکی مشاهده شود و توده‌های جمع‌آوری شده از مکان‌های مشابه در گروه‌های مختلف قرار بگیرند. دندروگرام حاصل از نشانگرهای REMAP مناسب‌ترین درخت‌واره برای تفکیک توده‌ها می‌باشد. چون در ایجاد این نشانگرها نواحی ریزماهواره نقش دارند، پس در پراکنش، تمایز و تفکیک توده‌ها نسبت به توزیع رتروترانسپوزونی نقش بیشتری دارند.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از نشانگرهای IRAP با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution

Figure 3. Dendrogram of IRAP markers using Minimum Evolution algorithm



شکل ۴- دندروگرام حاصل از نشانگرهای REMAP با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution

Figure 4. Dendrogram of REMAP markers using Minimum Evolution algorithm

نتایج تجزیه و تحلیل PCoA بر اساس نشانگرهای

IRAP: در PCoA سه مؤلفه اصلی اول ۲۵/۲۸ درصد کل تغییرات را توجیه کردند که نشان می‌دهد نشانگرها در قسمت خاصی از ژنوم تجمع پیدا نکرده‌اند و توزیع نسبتاً یکنواختی در کل ژنوم دارند (جدول ۱۰).

رتروترانسپوزون‌های LTR دارای توزیع سراسری و معمولاً همگنی در ژنوم‌های گیاهی هستند. از سوی دیگر در تکنیک IRAP تکثیر قطعات هنگامی انجام می‌گیرد که دو رتروترانسپوزون به حد کافی به هم نزدیک باشند (Kalender and Schulamn, 2006)؛ بنابراین قرارگیری رتروترانسپوزون‌های LTR مختلف در نزدیکی یکدیگر و به شکل یکنواخت در کل ژنوم دور از انتظار نمی‌باشد. نتایج تجزیه به بردارهای اصلی، یافته‌های حاصل از تجزیه فیلوژنی را تأیید می‌کند. به طوری که با توجه به شکل ۵ گروه‌بندی کاملاً مشخصی بین جمعیت‌ها مشاهده نمی‌شود.

در پژوهشی که محسن‌زاده‌گلفزایی و همکاران (Mohsenzadeh Golfzaei *et al.*, 2012) روی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون انجام دادند، تجزیه به بردارهای اصلی نشان داد که دو مؤلفه اول در مجموع ۱۶۷۷ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند. تجزیه به مختصات اصلی در ارزیابی تنوع ژنتیکی تیپ‌های مختلف توتون با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP توسط حسنی‌تسیه و همکاران (Hassani Tsieh *et al.*, 2014) نشان داد که دو مؤلفه اول ۴۴/۳۹ درصد از کل واریانس را توجیه می‌کنند و سهم دو مؤلفه اول در توجیه واریانس کل به ترتیب ۳۰/۳۳ و ۱۴/۰۶ درصد بود. تجزیه به مختصات اصلی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ گیاه توتون با استفاده از نشانگر ISSR توسط شازده‌احمدی و خرازی (Shajdehahmadi and Kharazi, 2015) نشان داد که سه مؤلفه اول در مجموع ۷۹/۶۵ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند.

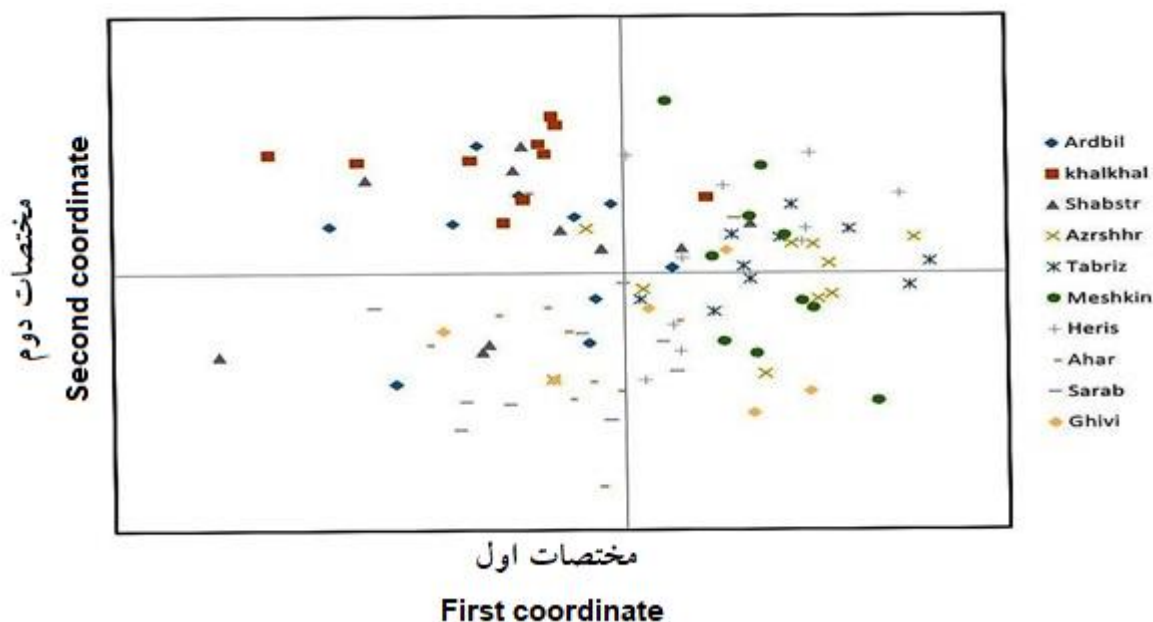
مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مؤلفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرفی توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (Fazli and HaghMyrza, 2012). به عبارت دیگر مناطق قابل تکثیر در کل ژنوم پراکنده بودند. پراکنش ژنوتیپ‌ها در یک نمودار سه‌بعدی بر اساس دو مؤلفه اصلی اول، همانند گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای سه گروه را معرفی کرد و توانست ارقام را تفکیک و تا حد بالایی نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید نماید (شکل ۶).

نتایج تجزیه و تحلیل PCoA بر اساس نشانگرهای REMAP: با استفاده از نشانگرهای REMAP، تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول در مجموع ۱۸/۷۴ درصد از واریانس کل را توجیه کردند (جدول ۱۰). تبیین کم توسط نشانگرهای REMAP، می‌تواند ناشی از تجمع پایین فواصل قابل تکثیر مابین جایگاه‌های ریزماهواره و رتروترانسپوزون، در مناطق خاصی از ژنوم باشد. کم بودن درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای

جدول ۱۰- درصد واریانس تبیین شده توسط بردارهای اصلی بر اساس نشانگرهای IRAP و REMAP در بنگ‌دانه

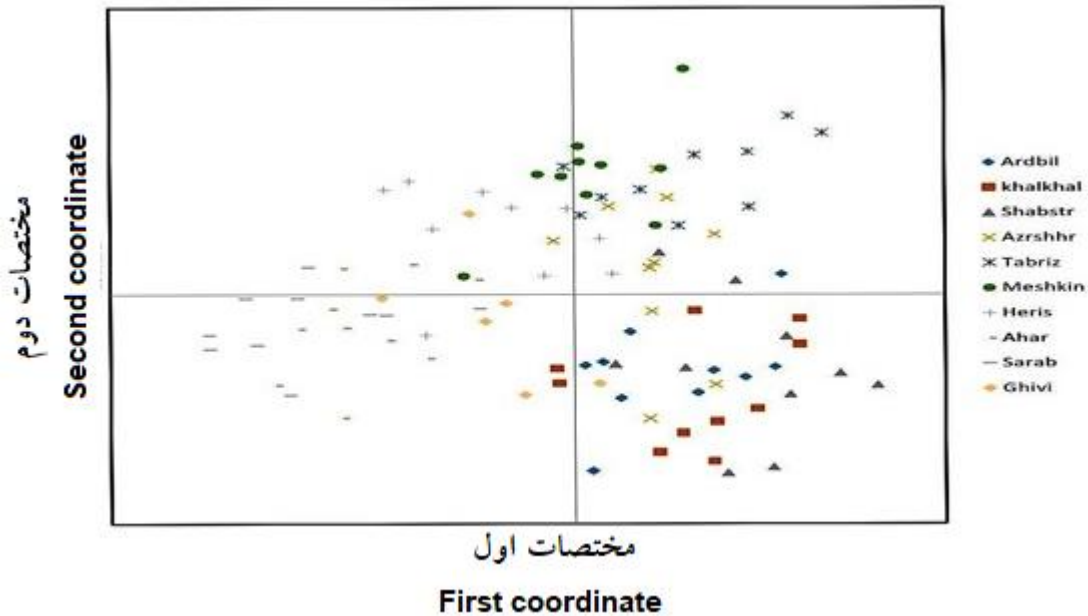
Table 10. Percentage of variance explained by the main vectors based on IRAP and REMAP markers in Henbane

| مؤلفه Component | IRAP | درصد واریانس تجمعی | نشانگرهای | درصد واریانس تجمعی |
|--------------------|------------------------------|---|---------------------------|---|
| | نشانگرهای IRAP markers | IRAP Cumulative variance percentage of IRAP | REMAP REMAP markers | REMAP Cumulative variance percentage of REMAP |
| 1 | 10.99 | 10.99 | 7.55 | 7.55 |
| 2 | 7.65 | 18.64 | 6.49 | 14.04 |
| 3 | 6/64 | 25.28 | 4.70 | 18.74 |



شکل ۵- دیاگرام دو بعدی مولفه‌های اول و دوم تجزیه و تحلیل PCoA مربوط به نشانگر IRAP

Figure 5. Two-dimensional diagram of first and second coordinates (axis) principal coordinate analysis (PCoA) in henbane based on IRAP markers



شکل ۶- دیاگرام دو بعدی مولفه های اول و دوم تجزیه و تحلیل PCoA مربوط به نشانگر REMAP
 Figure 5. Two-dimensional diagram of first and second coordinates (axis) principal coordinate analysis (PCoA) in henbane based on REMAP markers

بنگ‌دانه دارای نسخ کمتری از رتروترانسپوزون‌های جو در ژنوم خود هستند.

مقادیر تعداد نشانگر به ازای هر ترکیب IRAP نسبتاً پایین بود که این امر نشان دهنده تعداد کم رتروترانسپوزون‌های LTR جو در ژنوم بنگ‌دانه و در نتیجه فاصله زیاد آن‌ها از یکدیگر بود. مقادیر تعداد نشانگر به ازای هر ترکیب REMAP نسبتاً مطلوب بود که بیانگر حضور ریزماهورها در نزدیکی رتروترانسپوزون‌های LTR جو در ژنوم بنگ‌دانه می‌باشد. مقادیر PIC و MI برای نشانگرهای IRAP نسبتاً پایین بود ولی برای نشانگرهای REMAP در حد مطلوب بود که مؤید کارایی بالای نشانگرهای REMAP و همچنین نقش بارزتر ریزماهورها در ایجاد تنوع بود. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگرهای IRAP و REMAP تنوع معنی‌داری را در درون و بین توده‌های مورد مطالعه نشان داد و بر این اساس می‌توان اظهار داشت که این توده‌ها از تنوع ژنتیکی مطلوبی برخوردار هستند. در تجزیه خویشاوندی، نشانگرهای IRAP از کارایی بالایی در تفکیک توده‌ها و گونه‌های مورد مطالعه برخوردار نبودند ولی نشانگرهای REMAP تا حد قابل قبولی توده‌ها و

مقایسه نتایج حاصل از این روش‌ها نشان داد که درخت‌واره حاصل از داده‌های REMAP، مناسب‌ترین حالت خوشه‌بندی از نظر انطباق گروه‌بندی توده‌ها با اطلاعات جغرافیایی و مولکولی بود. نشانگرهای IRAP از این بابت چندان مطلوب نبودند که ناکافی بودن تعداد و توالی آغازگرهای IRAP، می‌تواند دلیل احتمالی ضعف این نشانگرها در تفکیک مناسب گروه‌ها باشد.

در این پژوهش از آغازگرهای رتروترانسپوزونی حاصل از ژنوم جو (*Hordeum vulgare*) در بررسی تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه استفاده شد. مشاهده کارایی نسبی این آغازگرها در مطالعه ژنوم *Hyoscyamus spp.* و وجود تشابه بین دو ژنوم بنگ‌دانه و جو، نقش اجدادی رتروترانسپوزون‌های BARE-1، Sukkula و Nikita را در تکوین و تکامل آن‌ها نشان می‌دهد. علوی‌کیا و همکاران (Alavikia et al., 2008) اظهار داشتند که تعداد نشانگرهای حاصل از آزمایش‌های IRAP و REMAP همبستگی مستقیمی با تعداد نسخ رتروترانسپوزون‌های مربوطه در ژنوم و آن نیز به‌نوبه خود ارتباط مستقیم با سطح تکامل فرد مورد مطالعه دارد. از آنجایی که تعداد نشانگرهای تولید شده در این پژوهش نسبتاً کم بوده می‌توان نتیجه گرفت که این توده‌های

شناسایی و توالی‌سنجی قرار گیرند تا در آینده به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد اعتماد تحت بهره‌برداری قرار گیرند.
سپاسگزاری

از زحمات مسئولان محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه تبریز و استاد گران‌قدر جناب آقای دکتر مصطفی ولیزاده کمال تشکر و سپاسگزاری به عمل می‌آید.

گونه‌های مورد مطالعه را تفکیک کردند. نشانگرهای REMAP به‌طور کامل گونه‌های *H. reticulatus* و *H. pusillus* را از یکدیگر تفکیک کردند ولی گونه *H. niger* در تمام خوشه‌ها پراکنده بود.
با توجه به تراکم پایین رتروترانسپوزون‌های LTR جو در ژنوم بنگ‌دانه بهتر است که رتروترانسپوزون‌های بنگ‌دانه مورد

References

- Afanasenko, O., Rozanova, I., Gofman, A., Lashina, N., Novakazi, F., Mironenko, N. and Zubkovich, A. (2022). Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3h for marker-assisted selection. *Agriculture*, **12**(4): 439.
- Alavikia, S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S. and Moghaddam, M. (2008) Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphic. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, **22**: 795-800.
- Baloch, F.S., Guizado, S.J.V., Altaf, M.T., Yuce, I., Çilesiz, Y., Bedir, M. and Gomez, J.C.C. (2022). Applicability of inter-primer binding site iPBS-retrotransposon marker system for the assessment of genetic diversity and population structure of Peruvian rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) germplasm. *Molecular Biology Reports*, **49**(4): 2553-2564.
- Carracedo, M.G., Alonso, S.B., Cabrera, R.S.B., Jiménez-Arias, D. and Perez, J.A. (2022). Development of retrotransposon-based molecular markers for characterization of *Persea americana* (Avocado) cultivars and horticultural races. *Agronomy*, **12**(7): 1510.
- Cayır, M.E. and Sevindik, E. (2022). Determining the genetic difference of some world cotton genotypes using iPbs (Inter-Primer Binding Sequences) retrotransposon markers. *Journal of Natural Fibers*, **19**(17): 15213-15224.
- Chadha, S. and Gopalakaishna, T. (2007). Comparative assessment of REMP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. *Current Science*, **93**: 688-692.
- Chen, H., Guo, A., Wang, J., Gao, J., Zhang, S., Zheng, J. and Yi, K. (2020). Evaluation of genetic diversity within asparagus germplasm based on morphological traits and ISSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **26**(2): 305-315.
- Demirel, U., Tindas, I., Yavuz, C., Baloch, F.S. and Çaliskan, M.E. (2018). Assessing genetic diversity of potato genotypes using inter-PBS retrotransposon marker system. *Plant Genetic Resources*, **16**(2): 137-145.
- Excoffier, L., Smous, P.E. and Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Fazli, P. and HaghMyrza, K. (2011). Study of genetic diversity in native chickpea mass with markers ISSR. *Modern Genetics*, **6**: 104-97.
- Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J. (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, **88**(3): 226-237.
- Grandbastien, M.A., Spielmann, A. and Caboche, M. (1989). *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature*, **337**: 376-380.
- Hassani Tsieh, S.F., Samizadeh Lahiji, H., Shoaie Deilami, M. (2014). Investigation of genetic diversity between and within tobacco types using ISSR markers, *New Genetics*, **9**(1): 1-12 (In Persian).
- Hosseini, S., Rahgozar, M.R. and Badakhshan, H. (2021). Investigating the genetic diversity of *Allium* L. species based on ISSR markers in Kurdistan province. *Plant Genetic Researches*, **8**(2): 57-68 (In Persian).

- Huff, D.R., Peakal, R. and Smouse, P.E.** (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* Engelm. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 927-934.
- Kalendar, R. and Schulman, A.** (2006). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*, **1**: 2478-2484.
- Kharestani, H., Nejad Ghomi, N.A.A. and Mehrabi, A.A.** (2013). Investigation of genetic diversity of incorn wheat using microsatellite markers, *Electronic Journal of Crop Production*, **2**: 1-16 (In Persian).
- Khosru Mehr, F., Jafari, A. and Hamdi, M.** (2012). A comparative anatomy of the stems of two Henbane species in Khorasan Razavi, *The First National Conference on Biological Sciences*, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran (In Persian).
- Lightbourn, G.J., Jelesko, J.G. and Veilleux, R.E.** (2007). Retrotransposon-based markers from potato monoplastids used in somatic hybridization. *Genome*, **50**: 492-501.
- Mahfouze, S.A. and Ottai, M.** (2011). Assessment of genetic variability for some *Hyoscyamus* species using biochemical and molecular markers. *Journal of Applied Sciences Research*, **7**: 1752-1759.
- Manetti, M.E., Rossi, M., Costa, A.P., Clausen, A.M. and Van Sluys, M.A.** (2007). Radiation of the *Tnt1* retrotransposon superfamily in three *Solanaceae* genera. *BMC Evolutionary Biology*, **7**: 34.
- Mirzadeh Waqfi, S.** (2013). Comparison of seed morphology of several species of *Hyoscyamus*. *Journal of Plant Research (Iranian Biology)*, **26(4)**: 537-545 (In Persian).
- Moghaddam, M., Ehdai, B. and Waines, G.** (2000). Genetic diversity in populations of wild diploid wheat (*Triticum urartu* Thum ex. Gandil.) revealed by Isozymes markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **47**: 323-332.
- Mohsenzadeh Golfzaei, M., Samizadeh Lahiji, H., Alami, A., Shoaie Deilami, M. and Talesh Sasani, S.** (2012). Investigation of genetic diversity of different greenhouse tobacco genotypes using ISSR and retrotransposon markers. *Iranian Journal of Crop Science*, **43(2)**: 371-380 (In Persian).
- Kaab Omeer, A., Pourmohammadi, P., Gilani, A., Alami, S.K., Farkhari, M.** (2021). Investigation of genetic diversity and classification of aerobic and local rice cultivars of Khuzestan province. *Plant Genetic Researches*, **8(2)**: 103-116 (In Persian).
- Kouhsari, S.M., Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H. and Khatamsaz, M.** (2006). Comparative study of six isoenzyme systems in some species of *Hyoscyamus* L., from Iran. *Pakistan Journal of Botany*, **38**: 107-119.
- Nejad Habib Vash, F., Rahman, F., Heidari, R. and Jamei, R.** (2012). Investigation of genetic diversity of henbane genotypes using ISSR molecular markers. *12th Iranian Genetic Congress*, Tehran, Iran (In Persian).
- Niu, Y.X. and Zhao, F.K.** (2010). Clustering Analysis and identification of genetic diversities in eggplant (*Solanum melongena* L.) varieties with REMAP. *4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Bali, Indonesia.
- Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E.** (2006). GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A.** (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.
- Prasad, P., Srivastava, A., Singh, V., Kushwaha, H. K., Kishor, R., Aftab, N. and Kumar, B.** (2022). Genetic diversity analysis of Prishniparni, *Uraria picta* Desv: A Dashmoola ingredient, to realize high yielding accessions. *The Nucleus*, **65(3)**: 341-350.
- Probeski, S., Grant Bialek, L. and Baun, B.R.** (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15**: 8-15.
- Rogers, S.A. and Pauls, K.P.** (2000). Ty1-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Genome*, **43**: 887-894.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of National Academy of Science*, **81**: 8014-8018.

- Shajdehahmadi, M. and Kharazi, M.** (2015). The use of ISSR molecular markers in the study of genetic diversity of some tobacco genotypes, *Plant Genetics Researches*, **2(2)**: 33-46 (In Persian).
- Sokhdari, A., Malekzadeh Shafaroodi, S., Asghari, A. and Kiani Freeze, M.** (2013). Analysis of the relationship between some agronomic traits with ISSR markers in 20 potato genotypes. *8th National Conference on Biotechnology of the Islamic Republic of Iran and the 4th National Conference on Biosafety*, University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian).
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- Yadav, R., Lal, R.K. and Gupta, M.M.** (2018). Prediction of morpho-genetic variability at intra-specific level and elite line selection in black henbane (*Hyoscyamus niger* L.). *Acta Scientific Agriculture*, **2(9)**: 94-103.
- 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, Tehran University, Tehran, Iran (In Persian).
- Zanganeh, F. and Sheidai, M.** (2022). Population genetic diversity and genetic affinity analyses of sweet orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by using IRAP molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **69**: 2437-2446.
- Zhu, J., Gale, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T. and Bryan, G.J.** (1998). AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 602-611.

Investigating Genetic Diversity and Relationships in some Henbane (*Hyoscyamus* spp.) Populations Based on Polymorphisms Resulting from Retrotransposon Insertion

Alireza Asghari Mirak^{1*}, Seyed Siamak Alaviakia² and Seyed Abolghasem Mohammadi³

1- Instructor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Meshginshahr, Meshginshahr, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received: July 14, 2022 – Accepted: September 11, 2022)

Abstract

Henbane has a high medicinal value due to the presence of hyoscyamine and scopolamine alkaloids. Improving the quality and quantity of henbane alkaloids using modern breeding methods requires evaluating the genetic diversity. The genetic diversity of henbane has been investigated using morphological, biochemical and molecular markers in several studies and the superiority of molecular markers over other markers has been proven. To this end, in 2018, the genetic diversity of 96 henbane genotypes collected from the habitats of northwest Iran was investigated using IRAP and REMAP molecular markers. For IRAP markers, out of 36 possible combinations obtained from eight LTR primers, seven combinations had a fine and scalable amplification. In the REMAP technique, the combination of 11 ISSR primers with eight LTR primers was used, and 12 combinations could be scored out of 88 possible combinations. The average amount of polymorphic information for IRAP and REMAP markers was 0.30 and 0.32, respectively, and the average marker index for these two markers was estimated as 2.59 and 2.47. Based on these criteria, REMAP marker was more efficient than IRAP in estimating the genetic diversity of henbane. In the analysis of molecular variance using IRAP and REMAP markers, intra-population variability was estimated to be higher than inter-population, which indicates the high diversity of these populations in northwestern Iran. Cluster analysis based on IRAP marker failed to separate species and populations, but REMAP marker was able to separate *H. pusillus* and *H. reticulatus* species to a high degree. A high shannon index in this research suggests that IRAP and REMAP retrotransposon markers resulted in a high genetic diversity within henbane populations with a high insertion in the genome of henbane populations.

Keywords: Henbane, Genetic diversity, IRAP and REMAP markers

* Corresponding Author, E-mail: alirezapnugen@pnu.ac.ir