

ارزیابی تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های بنگ‌دانه بر اساس نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP

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

۱. مربی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، مشگین شهر، اردبیل، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۹

چکیده

بنگ‌دانه به دلیل آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین از ارزش دارویی بالایی برخوردار است. تنوع ژنتیکی این گیاه با استفاده از نشانگرهای مختلف ارزیابی شده است. ولی تاکنون از کاربرد نشانگرهای رتروترانسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی و بهبود کیفیت و کمیت آلکالوئیدهای این گیاه گزارشی ثبت نشده است. لذا در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۰ جمعیت بنگ‌دانه با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و REMAP بررسی شد. برای نشانگرهای IRAP از ۳۶ ترکیب ممکن حاصل از هشت آغازگر LTR، هفت ترکیب، تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند. در تکنیک 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 به علت نقش بارزتر ریزوماهواره‌ها در برآورد تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه کارا تر از IRAP بود. در تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP تنوع درون جمعیتی بیشتر از بین جمعیتی برآورد شد 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 و تنوع مطلوب این جمعیت‌ها در شمال غرب ایران باشد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر IRAP موفق به تفکیک گونه‌ها از یکدیگر نبود ولی نشانگر REMAP توانست گونه‌های *H. pusillus* و *H. reticulatus* را تا حد بالایی از هم تفکیک کند.

کلیدواژه‌گان: بنگ‌دانه، تنوع ژنتیکی، نشانگر IRAP، نشانگر REMAP

مقدمه

بنگ‌دانه به‌عنوان یکی از گیاهان شاخص تیره سیب‌زمینی به دلیل استحصال تروپان آلکالوئیدهایی همچون هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین از اندام‌های مختلف آن از ارزش دارویی و اقتصادی بالایی برخوردار است. اثر آرام‌بخشی آلکالوئیدهای این گیاه بر دستگاه عصبی مرکزی، تسکین پارکینسون، تعدیل لرزش‌های زمان پیری، خواص خواب‌آوری، آنتی‌اسپاسم، اثر بی‌حس‌کننده عمومی و بازکننده مردمک چشم، نشان از اهمیت والای این گیاه در علم پزشکی دارد (Sengupta *et al.*, 2011). ۱۳ گونه از این گیاه در دنیا به ثبت رسیده که ۷ گونه آن، انحصاری ایران می‌باشد و این موضوع نشان‌دهنده غنای ژرم‌پلاسم بنگ‌دانه در ایران است. با عنایت به اهمیت اقتصادی و دارویی بنگ‌دانه، اولین قدم برای اجرای برنامه‌های اصلاحی روی بنگ‌دانه، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین اکوتیپ‌های مختلف آن می‌باشد. عواملی از قبیل جهش، پلی‌پلوئیدی، نوترکیبی، عناصر ترانسپوزونی و واردات ارقام جدید (مهاجرت) باعث ایجاد تنوع ژنتیکی می‌شوند (Gill *et al.*, 2021). مطالعه تنوع ژنتیکی نه‌تنها برای سازمان‌دهی و حفاظت مواد گیاهی، بلکه برای بهره‌مندشدن از پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید نیز اهمیت دارد (Begna, 2021).

در شیوه سنتی، ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک صورت می‌گرفت، این روش زمان‌بر بوده و در آن، تعدادی از صفات تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرند و با توجه به اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ، این روش کارایی لازم را نداشت. امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرات ناشی از عوامل محیطی، توانسته‌اند بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی را برطرف نمایند (Naghavi *et al.*, 2004). استفاده از این نشانگرها سبب کاهش مدت‌زمان اصلاح و هزینه‌های پروژه‌های اصلاحی می‌شود (Ren and Timko, 2001). انگشت‌نگاری ژنتیکی گونه‌های بنگ‌دانه با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک (Abou-Isba *et al.*, 2007; Mirzadeh Vaghefi, 2013)، آناتومی (Khosromehr *et al.*, 2012)، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (Mahfouz *et al.*, 2011)، ایزوزایم‌ها (Kouhsari *et al.*, 2006; Sharifi *et al.*, 2006)، نشانگر RAPD (Yousefi *et al.*, 2009) و نشانگر ISSR

(Nejadhabib Vash *et al.*, 2012) انجام گرفته است. مطابق نتایج تحقیقات انجام‌گرفته، ارزیابی مورفولوژیک بنگ‌دانه بسیار پیچیده و دشوار است و اغلب همراه با اشتباه می‌باشد (Khatamsaz and Zangirian, 1998). ولی به ادعان اکثر محققان، نشانگرهای مولکولی می‌توانند ارزیابی دقیق‌تری از تنوع ژنتیکی بنگ‌دانه ارائه دهند. در این میان، نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP به دلیل تولید چندشکلی بسیار بالا، تکرارپذیری بسیار مطلوب، سهولت تکنیکی، پراکندگی در کل ژنوم، فراوانی و فعالیت بالا در اغلب ژنوم‌ها، مستقل بودن جایگاه درج نسخ جدید از نسخه اولیه، پایداری درج و افزایش خطی آن‌ها در ژنوم، به‌ایزاری بسیار ایده‌آل برای مطالعات فیلوژنی (Guo *et al.*, 2006; Branco *et al.*, 2007)، تنوع ژنتیکی (Docking *et al.*, 2006)، انگشت‌نگاری ژنوم ارقام (Kalendar *et al.*, 1999)، گزینش به کمک نشانگر (Mohammad and Othman, 2005) و نشانمند کردن ژن‌ها (Kumar and Hirochika, 2001) تبدیل گشته‌اند. این نشانگرها سابقاً برای تعیین تنوع بین گونه‌های سولاناسه استفاده شده‌اند. اما در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های بنگ‌دانه تاکنون گزارشی ارائه نشده است. به‌طور کلی سولاناسه یک خانواده با تعداد زیادی گونه است و برای مطالعات رتروترانسپوزونی نسبتاً مناسب می‌باشد. از تشخیص اولین LTR رتروترانسپوزونی فعال Tnt1A از توتون و تنباکو (Grandbastien *et al.*, 1989) گرفته تا مطالعات بعدی در گوجه‌فرنگی (Rogers and Pauls, 2000) و سیب‌زمینی (Manetti *et al.*, 2007) نشان از مناسب‌بودن گونه‌های سولاناسه برای مطالعات رتروترانسپوزونی می‌باشد. همچنین از نشانگر IRAP برای تمایز گوجه‌فرنگی از سیب‌زمینی و تاتوره و گونه‌های نزدیک مرتبط استفاده شده است (Light bourn *et al.*, 2007). این تحقیق به‌منظور ارزیابی امکان استفاده از نشانگر مولکولی رتروترانسپوزونی در بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های بنگ‌دانه و تشخیص گونه‌های مطلوب‌تر جهت آغاز فرآیند زراعی‌سازی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

با مطالعه‌ی فلور ایران و کسب اطلاعات غیرمکتوب از پژوهشگران مرکز تحقیقات کشاورزی مغان، ابتدا رویشگاه این گیاهان شناسایی و از سه گونه بنگ‌دانه به نام‌های

تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۱). شناسایی و تعیین گونه‌ها توسط بخش هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهران انجام پذیرفت.

H. niger و *H. pusillus*، *H. reticulatus* ۱۰ جمعیت و از هر جمعیت ۱۰ فرد از نقاط مختلف استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل نمونه‌برداری شد. برگ‌های جوان و سالم پس از ضدعفونی با الکل سفید وارد تانک ازت مایع شده و

جدول ۱- ژنوتیپ‌های *Hyoscyamus* spp. مورد استفاده در آزمایش

گونه	تعداد ژنوتیپ	استان	محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
<i>H. reticulatus</i>	۱۰		اردبیل	۱۳۵۰	382484	483001
<i>H. reticulatus</i>	۱۰		خلخال	۱۸۴۳	390428	477543
<i>H. pusillus</i>	۱۰	اردبیل	مشکین شهر	۱۴۰۰	383981	476777
<i>H. niger</i>	۱۰		گیوی	۱۷۰۰	376868	483373
<i>H. pusillus</i>	۱۰		تبریز	۱۳۴۸	380792	462885
<i>H. niger</i>	۱۰		شبستر	۱۶۶۰	382130	455930
<i>H. reticulatus</i>	۱۰	آذربایجان شرقی	آذرشهر	۱۴۶۸	374625	458521
<i>H. pusillus</i>	۱۰		سراب	۱۶۵۰	375770	473480
<i>H. pusillus</i>	۱۰		اهر	۱۳۴۱	382839	400412
<i>H. niger</i>	۱۰		هریس	۱۸۰۰	382420	472220

جهت بهینه‌سازی واکنش، صورت گرفت. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD, C 1000TM Thermal Cycler) و چرخه‌های PCR بدین شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۶ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

در این پژوهش نشانگرهای IRAP و REMAP برای تجزیه و تحلیل ژنوم *Hyoscyamus* spp. مورد استفاده قرار گرفتند. در تکنیک IRAP از آغازگرهای ۲۵ تا ۳۵ نوکلئوتیدی مکمل LTR های سمت ۳' به ۵' رتروترانسپوزون‌های ژنوم جو (*Hordeum vulgare*) استفاده شد (Alavi-kia et al., 2008). این آغازگرها به صورت منفرد و ترکیبات دوجه‌دو با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA و فرآیند PCR

برای استخراج DNA از روش با حجم کم بر اساس تلفیقی از روش‌های Saghari-Marouf و همکاران (۱۹۸۴) و Porebski و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. برای تعیین کمیت DNA، غلظت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از نسبت‌های جذب نوری و طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰، ۲۶۰/۲۳۰ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب آلودگی‌های پروتئینی، پلی‌ساکارییدی و پلی‌فنلی و ذرات معلق مورد سنجش قرار گرفتند. سپس نمونه‌های DNA استخراج‌شده، از لحاظ کیفیت، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ مورد بررسی قرار گرفتند و مواردی مانند شکستگی DNA و وجود RNA در نظر گرفته شد. سرانجام نمونه‌های DNA پس از رقیق شدن به میزان ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر، توسط آغازگرهای IRAP و REMAP تکثیر گشته و محصولات تکثیری توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۲٪ با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکنیک‌های IRAP^۱ و REMAP^۲ مطابق با روش Schulman و Kalendar (۲۰۰۶)، با اندکی تغییرات

¹ Inter-retrotransposon amplified polymorphism

² Retrotransposone- microsatellite amplified polymorphism

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در REMAP

شماره	نام آغازگر	توالی ۳' → ۵'	دمای ذوب (C°)	دمای اتصال (C°)
۸۲۵	ISSR1	(AC) 8T	49/2	53
۸۲۶	ISSR2	(AC) 8C	53/3	53
۸۲۷	ISSR3	(AC) 8G	54/9	52
۸۳۰	ISSR4	(TG) 8G	56/1	∅
۸۳۴	ISSR5	(AG) 8yT	48	53
۸۳۵	ISSR6	(AG) 8yC	50/3	49
۸۴۰	ISSR7	(GA) 8yT	48	∅
۸۴۱	ISSR8	(GA) 8yC	50/3	53
۸۴۵	ISSR9	(CT) 8rG	50/3	∅
۸۴۷	ISSR10	(CA) 8rC	50/3	49
۸۴۸	ISSR11	(CA) 8rG	50/3	49

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

مختلف اتصال انجام شدند و بر اساس وضوح بالاتر و عدم وجود نوارهای متوالی، بهترین دمای اتصال انتخاب شد (جدول ۴).

برای ایجاد ترکیبات آغازگری REMAP، کل هشت آغازگر رتروترانسپوزونی و 11 مورد از آغازگرهای ISSR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول های ۲ و ۳). برای تعیین دمای اتصال بهینه واکنش های مذکور در بازه ای از دماهای

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده در این تحقیق

نام و جهت آغازگر	توالی ۳' → ۵'
Sukkula →	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC
Nikita →	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC
LTR6149 →	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT
3'LTR →	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA
LTR6150 ←	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACACATGTA
5'LTR1 ←	TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA
5'LTR2 ←	ATCATTCCCTCTAGGGCATAATTC
LTR7286 →	GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC

بروماید ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر رنگ آمیزی شدند و سپس رنگبری آنها با آب مقطر انجام شد. به منظور عکس برداری از ژل ها از دستگاه Gel Documentation مدل Biorad زیر نور UV استفاده شد.

پس از اتمام مراحل PCR، به منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده و چندشکلی بین نمونه ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱/۸ درصد در صد با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۲ ساعت با استفاده از بافر 1XTBE استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز ژل ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم

جدول ۴- دمای اتصال بهینه آغازگرهای رتروترانسپوزونی به شکل مستقل و ترکیبات دوتایی برحسب درجه سانتی‌گراد

	Sukkula	Nikita	LTR6149	LTR3'	LTR6150	5'LTR1	5'LTR2	LTR7286
Sukkula	∅							
Nikita	۶۲	∅						
LTR6149	∅	∅	۶۲					
3'LTR	∅	۶۶	∅	۶۴				
LTR6150	∅	∅	∅	۶۵	∅			
5'LTR1	∅	∅	∅	∅	∅	∅		
5'LTR2	∅	∅	∅	∅	∅	∅	۶۰	
LTR7286	∅	۵۹	∅	∅	∅	∅	∅	∅

∅: عدم تکثیر موفق

نرم‌افزار GenAlEx 6.4 (Peakal and Smouse, 2006) استفاده شد.

$$I = - \sum P_i \ln P_i \quad \text{رابطه ۵}$$

بررسی روابط خویشاوندی

برای انجام تجزیه فیلوژنی، ماتریس فاصله حاصل از نرم‌افزار GenAlEx 6.4 که بر اساس فاصله تعریف‌شده توسط Huff و همکاران (1993) برآورد شده بود، به نرم‌افزار MEGA (Tamural *et al.*, 2007) منتقل شد. سپس دندروگرام با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution رسم شد. به منظور تعیین سهم هر صفت از تنوع کل، از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.4 و بر اساس ماتریس فاصله Huff و همکاران (1993) با هدف ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه فیلوژنی انجام شد.

نتایج و بحث

چندشکلی، اطلاعات ژنومی و کارایی نشانگرهای IRAP از ۳۶ ترکیب ممکن حاصل از هشت آغازگر LTR، هفت ترکیب، تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند. ترکیبات آغازگری در مجموع ۵۹ امپلیکون با طول ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز ایجاد کردند که تمام آن‌ها چندشکل بودند (جدول ۶). تعداد متوسط امپلیکون به ازای هر ترکیب آغازگر ۸ و مقادیر آن از ۶ برای ترکیب آغازگری Sukkula-Nikita تا ۱۲ برای ترکیب آغازگری LTR6149-LTR6149 متغیر بود. پایین بودن این مقدار می‌تواند به دلیل تعداد کم نشانگر چندشکل ایجادشده توسط هر آغازگر باشد که خود

تجزیه‌های آماری

معیارهای کارایی نشانگر

الگوهای نواری نشانگرها به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شدند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Chadha and Gopalakrishna, 2007). شاخص نشانگری (MI) با استفاده از رابطه ۲ برای 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 ۳ محاسبه می‌شود. در این رابطه n_p تعداد کل جایگاه‌های ژنی چندشکل می‌باشد و β از رابطه ۴ به دست می‌آید. در رابطه ۴، 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.

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{PIC} = 1 - \sum P_i^2$$

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{MI} = \text{PIC} \times \text{EMR}$$

$$\text{رابطه ۳} \quad \text{EMR} = n_p \times \beta$$

$$\text{رابطه ۴} \quad \beta = n_p / n_p + n_{np}$$

بررسی تنوع ژنتیکی

تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها با استفاده از شاخص اطلاعات شانون با رابطه ۵ تعیین شد که در آن P_i فراوانی آلل i در یک جایگاه معین می‌باشد (Zhu *et al.*, 1998). به منظور تجزیه واریانس مولکولی بر اساس روش Excoffier و همکاران (1992) و همچنین تجزیه به بردارهای اصلی از

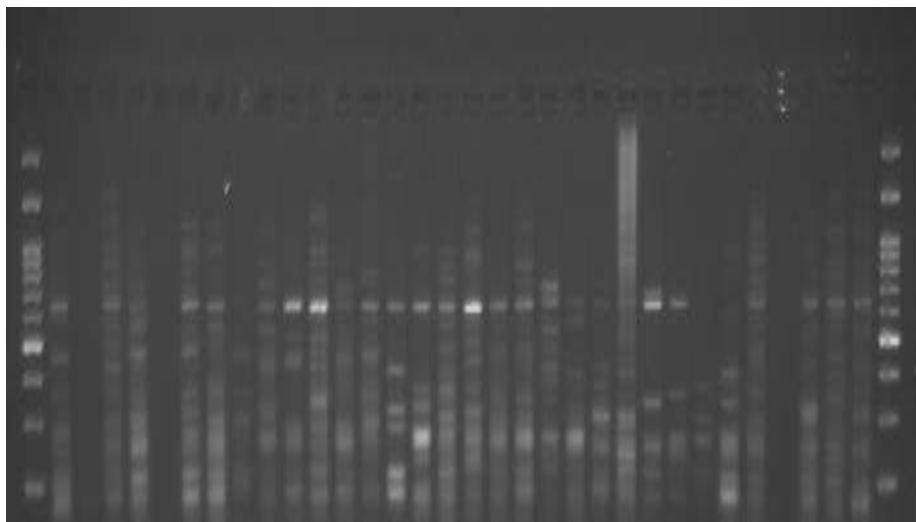
را ۰/۳۴ تا ۶/۲۵ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به دست آوردند (Hasni Tesseh *et al.*, 2015). Demirel و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵۱ ژنوتیپ سیب زمینی با استفاده از نشانگر iPBS، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها را ۰/۱۲ تا ۰/۳۱ به دست آوردند. محققان دیگری در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف 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 به دست آوردند (Mohsenzadeh Golfazaei *et al.*, 2012). میانگین MI در این پژوهش برابر با ۲/۵۹ و مقادیر بیشینه و کمینه آن به ترتیب برابر با ۴/۳۴۴ و ۱/۰۷۳ برای آغازگر LTR6149 و ترکیب آغازگری Nikita-LTR7286 به دست آمد (جدول ۶).

نیز می‌تواند مبین فاصله زیاد این رتروترانسپوزون‌های LTR در ژنوم *Hyoscyamus* و در کل فراوانی اندک آن‌ها باشد. ترکیب آغازگری LTR6149-LTR6149 با ۱۲ نوار بیشترین نوار تکثیرشده را به خود اختصاص داد که هر ۱۲ نوار، چندشکل بودند. پروفیل باندهای مربوط به ترکیب دو آغازگر 3'LTR-3'LTR که چندشکلی مطلوبی را نشان داد در شکل ۱ آمده است.

در این تحقیق مقدار متوسط PIC، برای نشانگرهای حاصل ۰/۳ برآورد شد. حداکثر و حداقل مقدار PIC به ترتیب برابر با ۰/۴۳۴ برای LTR6149 و ۰/۲۰۸ برای ترکیب آغازگری Sukkula-Nikita محاسبه شد (جدول ۶). سایر محققان 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

جدول ۶- تعداد قطعات تکثیرشده، تعداد قطعات چند شکل، شاخص نشانگر (MI) و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) ترکیبات IRAP

ترکیب آغازگری	تعداد کل قطعات تکثیرشده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI
3'LTR- Nikita	۹	۹	۱۰۰٪	۰/۲۹۰	۲/۰۳۳
3'LTR-3'LTR	۱۰	۱۰	۱۰۰٪	۰/۳۱۵	۲/۸۳۵
3'LTR-LTR6150	۱۱	۱۱	۱۰۰٪	۰/۳۵۶	۳/۵۶۰
LTR7286- Nikita	۴	۴	۱۰۰٪	۰/۲۶۸	۱/۰۷۳
LTR6149-LTR6149	۱۲	۱۲	۱۰۰٪	۰/۴۳۴	۴/۳۴۴
5'LTR2-5'LTR2	۷	۷	۱۰۰٪	۰/۲۴۰	۲/۶۴۴
Sukkula-Nikita	۶	۶	۱۰۰٪	۰/۲۰۸	۱/۶۶۵
میانگین	۸/۴۳	۸/۴۳	-	۰/۳۰	۲/۵۹
کل	۵۹	۵۹	-	-	-

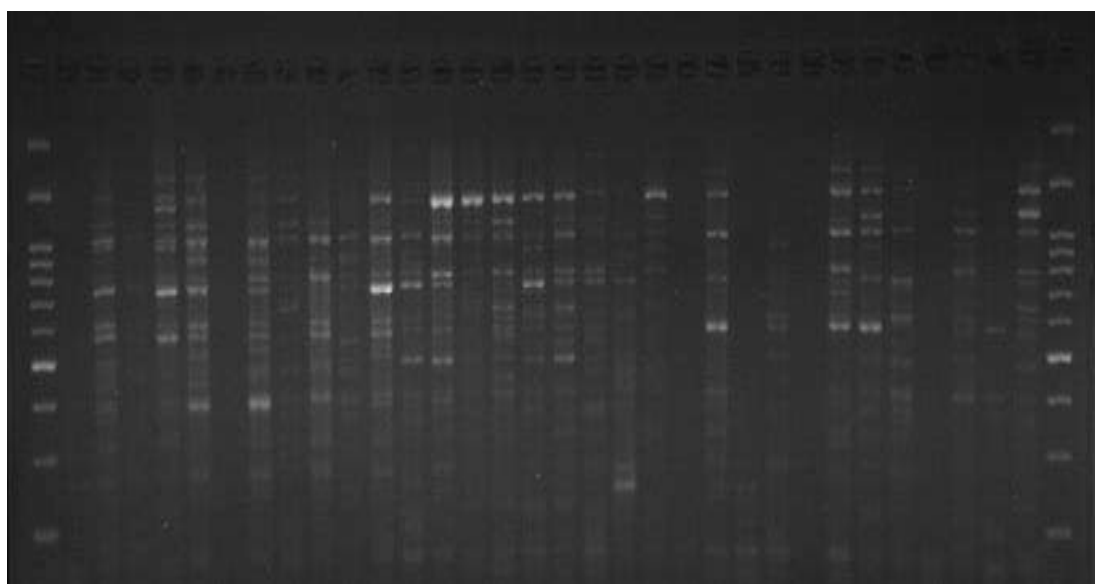


شکل ۱- چندشکلی نشانگرهای IRAP حاصل از آغازگر 3'LTR در بنگ‌دانه

مربوط به ترکیب دو آغازگر ISSR835-LTR7286 که چندشکلی مطلوبی را نشان داد در شکل ۲ آمده است. حداکثر و حداقل مقادیر PIC به ترتیب برابر با ۰/۴۰۵ برای ترکیب 3'LTR-ISSR834 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 ۳/۶۴ و ۱/۲۱۷ برای ترکیب‌های آغازگری-LTR7286-ISSR835 و 3'LTR-ISSR834 به دست آمد (جدول ۷). محققان دیگری در بررسی تنوع ژنتیکی توتون‌های گرمخانه‌ای میزان PIC را بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ گزارش کردند (Mohsenzadeh Golfazaei *et al.*, 2012).

چندشکلی و کارایی نشانگرهای REMAP

از 88 ترکیب ممکن حاصل از 11 آغازگر ISSR و هشت آغازگر LTR، 12 ترکیب دارای تکثیر مطلوب بودند. حاصل این ترکیبات آغازگر، 94 امپلیکون چندشکل با طول 200 تا 3000 جفت‌باز بود. تعداد متوسط نشانگر به ازای هر ترکیب آغازگر ۸ و مقادیر آن از 6 برای ترکیب آغازگرهای 3'LTR-ISSR834 تا 11 برای ترکیب 5'LTR2-ISSR841 متغیر بود. ترکیب آغازگری 5'LTR2-ISSR841 با ۱۱ نوار و ترکیب آغازگری 3'LTR-ISSR834 با ۶ نوار به ترتیب بیشترین و کمترین نوار تکثیرشده را به خود اختصاص دادند و تمامی نوارها چندشکل بودند (جدول ۷). پروفیل باندهای



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

جدول ۷- تعداد قطعات تکثیرشده، تعداد قطعات چند شکل، شاخص نشانگر (MI) و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) ترکیبات REMAP

ترکیب آغازگری	تعداد کل قطعات تکثیرشده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI
5'LTR2-ISSR835	۹	۹	۱۰۰٪	0/369	3/329
5'LTR2-ISSR841	۱۱	۱۱	۱۰۰٪	0/326	3/264
3'LTR-ISSR827	۸	۸	۱۰۰٪	0/313	1/881
3'LTR-ISSR834	۶	۶	۱۰۰٪	0/405	1/217
3'LTR-ISSR847	۹	۹	۱۰۰٪	0/366	1/464
3'LTR-ISSR841	۸	۸	۱۰۰٪	0/276	2/229
5'LTR1-ISSR826	۷	۷	۱۰۰٪	0/278	2/863
5'LTR1-ISSR841	۸	۸	۱۰۰٪	0/286	2/295
LTR7286-ISSR825	۷	۷	۱۰۰٪	0/286	3/388
LTR7286-ISSR840	۷	۷	۱۰۰٪	0/376	1/817
LTR7286-ISSR847	۷	۷	۱۰۰٪	0/302	3/460
LTR7286-ISSR835	۷	۷	۱۰۰٪	0/346	3/460
میانگین	۷/۸۳	۷/۸۳	-	0/32	2/47
کل	۹۴	۹۴	-	-	-

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 نشان‌دهنده تنوع درون جمعیتی است. مکان‌های ژنی که میزان شاخص شانون در آن‌ها بالاتر باشد، تنوع بین ژنوتیپ‌ها را بهتر نشان می‌دهند. در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی با استفاده از نشانگرهای ISSR، شاخص اطلاعات شانون ۰/۵ به‌دست آمد که مبین وجود تنوع مناسب بین ژنوتیپ‌های

سیب‌زمینی است (Sakhdari *et al.*, 2013). Niu و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی ۷۳ رقم بادمجان توسط نشانگر مولکولی REMAP، شاخص اطلاعات شانون بین ارقام بادمجان را ۰/۵۴۲۴ گزارش کردند که نشان از تنوع بالا بین ارقام بادمجان می‌باشد (Niu and Zhao, 2010). پژوهشگران دیگری در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴ توده گوجه‌فرنگی با استفاده از دو نشانگر RAPD و ISSR بیشترین شاخص تنوع شانون را ۰/۴۸ متعلق به رقم عنبر ایرانی به‌دست آوردند (Jahantigh Haghghi *et al.*, 2020). برآورد شاخص تنوع شانون بالا در این پژوهش، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون جمعیت‌های بنگ‌دانه و درج بالای نشانگرهای رتروترانسپوزونی در ژنوم جمعیت‌های بنگ‌دانه است.

جدول ۸- شاخص اطلاعات شانون ترکیبات آغازگری IRAP و REMAP

ترکیب آغازگری REMAP	I	ترکیب آغازگری IRAP	I
5'LTR2-ISSR835	۰/۴۱۴	3'LTR-Nikita	۰/۳۶۸
5'LTR2-ISSR841	۰/۳۵۲	3'LTR-3'LTR	۰/۳۹۷
3'LTR-ISSR827	۰/۴۱۴	3'LTR-LTR6150	۰/۴۲۴
3'LTR-ISSR834	۰/۵۱۶	LTR7286-Nikita	۰/۳۲۲
3'LTR-ISSR847	۰/۴۲۳	LTR6149-LTR6149	۰/۵۲۳
3'LTR-ISSR841	۰/۳۱۸	5'LTR2-5'LTR1	۰/۳۱۸
5'LTR1-ISSR826	۰/۳۰۶	Sukkula-Nikita	۰/۲۶۷
5'LTR1-ISSR841	۰/۳۲۶	-	-
LTR7286-ISSR825	۰/۳۴۳	-	-
LTR7286-ISSR840	۰/۴۷۴	-	-
LTR7286-ISSR847	۰/۳۳۸	-	-
LTR7286-ISSR835	۰/۴۴۶	-	-
میانگین REMAP	۰/۷۷۸	میانگین IRAP	۰/۳۷۴

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

مطابق نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس ۵۹ نشانگر IRAP و ۹۴ نشانگر REMAP (جدول ۹)، اختلاف بین گونه-ها از لحاظ نشانگرهای IRAP غیرمعنی‌دار ولی از لحاظ نشانگرهای REMAP در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود. واریانس بین و درون جمعیت‌ها از لحاظ هر دو سیستم نشانگر در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود و در هر دو سیستم نشانگر، واریانس درون جمعیت‌ها بیشتر از واریانس بین جمعیت‌ها برآورد شد. بر اساس نتایج حاصل می‌توان اظهار داشت به علت بالا بودن واریانس درون جمعیت‌ها و همچنین کم بودن درجه آزادی بین گونه‌ها، تنوع بین‌گونه‌ای از نظر نشانگرهای رتروترانسپوزونی به‌ویژه IRAP قابل مشاهده نبود. از سوی دیگر با توجه به معنی‌دار بودن واریانس بین جمعیت‌ها نیز می‌توان ادعان داشت واریانس‌های درون جمعیت نیز دارای مقادیر قابل توجهی می‌باشند و تنوع قابل ملاحظه‌ای در داخل جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در جمعیت‌های 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. به‌طور کلی ناهمگنی زیاد در درون جمعیت می‌تواند دلایل زیادی از جمله ماهیت چندپلوئیدی، دگرگشنی، تلاقی‌های

مختلف بین ارقام، اختلاط فیزیکی بذور و غیره داشته باشد. در این تحقیق بالابودن 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 نشان‌دهنده میزان بالای جریان ژنی مابین جمعیت‌ها می‌باشد. علاوه بر این، بخش بزرگی از تنوع درون جمعیت‌ها احتمالاً می‌تواند به دلیل فعالیت مختص جمعیت و چندشکلی درجی منحصر خانواده‌های رتروترانسپوزونی مورد مطالعه در این جمعیت‌ها باشد. گروهی از محققان برای بررسی تنوع ژنتیکی و سوماکلونالی، کالوس جدید (یک‌ماهه)، کالوس قدیمی (یک‌ساله) و برگ‌های تازه *Hyoscyamus niger* در شرایط *in vitro* تحت تأثیر نشانگر ISSR و انجام تجزیه واریانس مولکولی، تنوع بین جمعیتی را ۶۸ درصد برآورد کردند که نسبت به تنوع درون جمعیتی بیشتر بود (Goojgi et al., 2020). در پژوهشی وسیع که در دانشگاه کارولینای شمالی انجام شد، ۷۰۲ ژنوتیپ توتون با منشأ کشورهای مختلف دنیا با استفاده از ۷۲ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. تنوع درون جمعیتی در تجزیه واریانس مولکولی ۹۲/۱۸ درصد برآورد گردید که به‌نوبه خود مقدار تنوع قابل توجهی می‌باشد (Moon et al., 2009). گروهی از محققان در

واریانس مولکولی روی تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های توتون نشان داد از کل تنوع ژنتیکی، ۳۲/۷۳ درصد تنوع ژنتیکی بین تیپ‌ها و ۶۷/۲۷ درصد آن تنوع درون تیپ‌ها را توجیه می‌کند (Hasni Tesseh *et al.*, 2014).

ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR و با تجزیه واریانس مولکولی نشان دادند تنوع درون جمعیتی با ۷۹ درصد کل تغییرات ژنتیکی، در مرتبه بالاتری از تنوع بین جمعیتی قرار دارد (Jahantigh Haghighi *et al.*, 2020). نتایج حاصل از تجزیه

جدول ۹- نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشانگرهای IRAP و REMAP

P	ϕ_{pt}	Est Var	درصد واریانس	MS	SS	درجه آزادی	منابع تغییر	
۰/۹۶۷	-۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	%۰	۱۷/۶۳۸	۳۵/۲۷۶	۲	بین گونه‌ها	IRAP
۰/۰۰۱	۰/۱۱۷	۱/۱۹۶	%۱۲	۲۰/۴۲۰	۱۴۲/۹۴۱	۷	بین جمعیت‌ها	
۰/۰۰۱	۰/۱۰۹	۸/۹۸۶	%۸۸	۸/۹۸۷	۷۷۲/۸۶۷	۸۶	درون جمعیت‌ها	
-	-	۱۰/۱۸۳	%۱۰۰	-	۹۵۱/۰۸۳	۹۵	کل	
۰/۰۳۶	۰/۰۱۰	۰/۱۵۷	%۱	۴۲/۰۴۶	۸۴/۰۹۲	۲	بین گونه‌ها	REMAP
۰/۰۰۱	۰/۱۵۴	۲/۴۴۷	%۱۵	۳۶/۸۵۹	۲۸۵/۰۱۵	۷	بین جمعیت‌ها	
۰/۰۰۱	۰/۱۶۲	۱۳/۴۶۱	%۸۴	۱۳/۴۶۱	۱۱۵۷/۶۳۳	۸۶	درون جمعیت‌ها	
-	-	۱۶/۰۶۵	%۱۰۰	-	۱۴۹۹/۷۴۰	۹۵	کل	

مناسبتی مبنی بر تفکیک گونه‌ها از یکدیگر مشاهده نشد و در حالت کلی می‌توان گفت در جمعیت‌ها از لحاظ نشانگرهای IRAP تفکیک چندانی از نظر جغرافیایی وجود نداشت. این امر نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین گونه‌های جمعیت‌های بنگ‌دانه در استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل است.

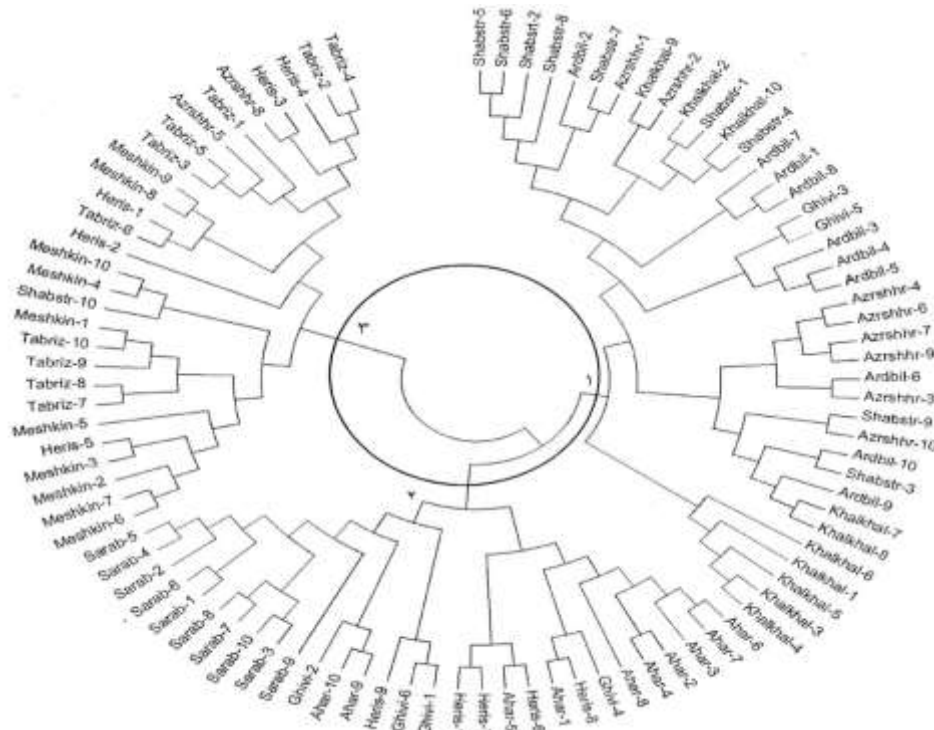
روابط خویشاوندی *Hyocymus spp.*

تجزیه فیلوژنی بر اساس نشانگرهای IRAP

دندروگرام حاصل از نشانگرهای IRAP بر اساس ماتریس فاصله‌های بین گروهی حاصل از ماتریس Huff و همکاران (۱۹۹۳) با روش Minimum Evolution در شکل ۳ آمده است. با توجه به دندروگرام، برای ۹۶ ژنوتیپ بنگ‌دانه از گونه‌های *H.niger* و *H.pusillus*، *H.reticulatus* گروه‌بندی

حاصل از نشانگرهای REMAP، مناسب‌ترین درخت فیلوژنی برای تفکیک جمعیت‌ها می‌باشد. با توجه به اینکه نواحی ریزماهواره در ایجاد این نشانگرها نقش دارند، پس در پراکنش، تمایز و تفکیک جمعیت‌ها نسبت به توزیع رتروترانسپوزونی نقش بیشتری ایفا می‌کند.

اکولوژیکی با یکدیگر کاملاً متفاوت باشند. همچنین محققان دیگری در این زمینه معتقد هستند که ممکن است بین گونه‌های وحشی شباهت زیادی از نظر ژنتیکی مشاهده شود و جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مکان‌های مشابه در گروه‌های مختلف قرار گیرند (Kharestani *et al.*, 2013). دندروگرام



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

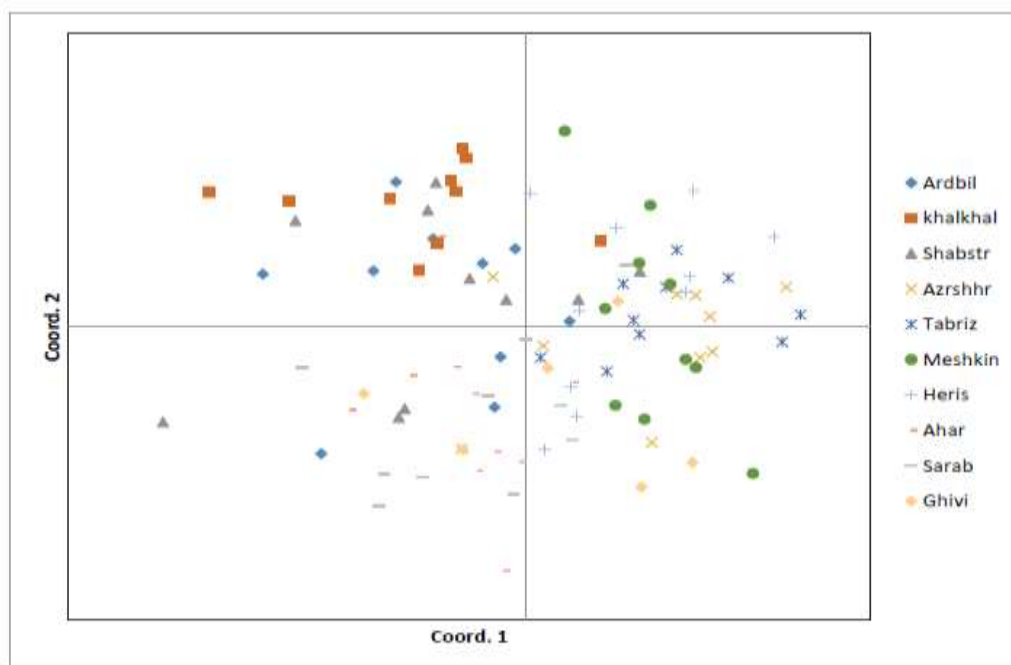
شکل ۵ گروه‌بندی کاملاً مشخصی بین جمعیت‌ها مشاهده نمی‌شود. در پژوهشی که محققان روی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون انجام دادند، تجزیه به بردارهای اصلی نشان داد دو مؤلفه اول در مجموع ۱۶/۷۵ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند (Mohsenzadeh Golfazaei *et al.*, 2012). تجزیه به مختصات اصلی در ارزیابی تنوع ژنتیکی تیپ‌های مختلف توتون با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP نشان داد 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 (Hasni Tesseh *et al.*, 2015).

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

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

مؤلفه	نشانگرهای IRAP	درصد واریانس تجمعی IRAP	نشانگرهای REMAP	درصد واریانس تجمعی REMAP
اول	۱۰/۹۹	۱۰/۹۹	۷/۵۵	۷/۵۵
دوم	۷/۶۵	۱۸/۶۴	۶/۴۹	۱۴/۰۴
سوم	۶/۶۴	۲۵/۲۸	۴/۷۰	۱۸/۷۴

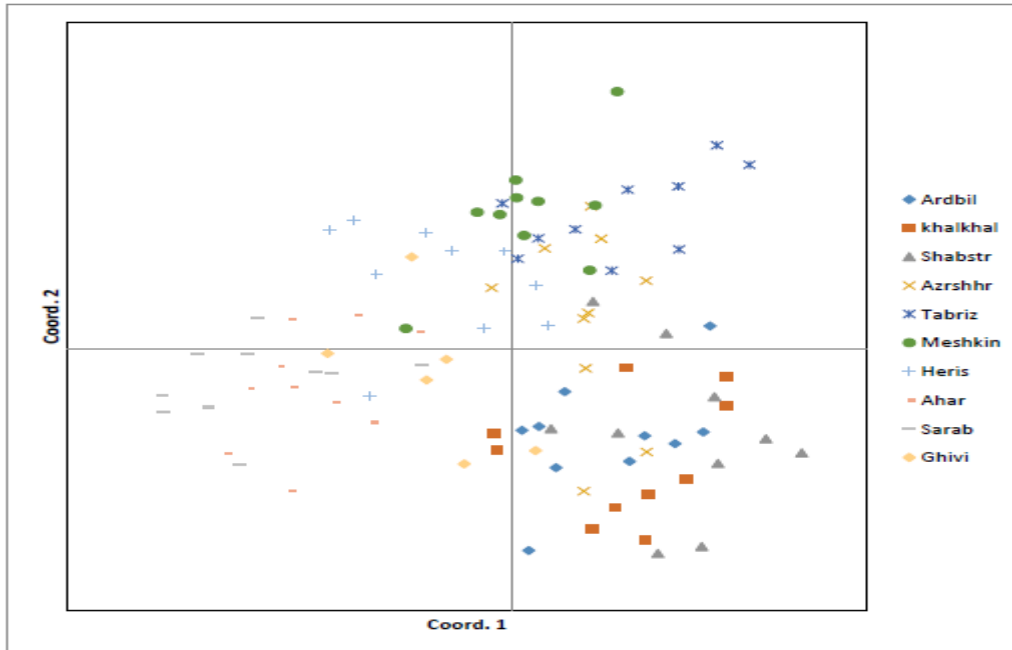


شکل ۵- نتایج تجزیه به بردارهای اصلی بنگ‌دانه بر اساس نشانگرهای IRAP

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 فیلوژنی را تأیید نماید (شکل ۶).

PCoA بر اساس نشانگرهای REMAP

با استفاده از نشانگرهای REMAP، تجزیه به مختصات اصلی نشان داد سه مؤلفه اول در مجموع ۱۸/۴۷ 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 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،



شکل ۶- نتایج تجزیه به بردارهای اصلی بنگدانه بر اساس نشانگرهای REMAP

نتیجه گرفت که جمعیت‌های بنگدانه دارای نسخ کمتری از رتروترانسپوزون‌های جو در ژنوم خود هستند.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، تعداد نشانگر به ازای هر ترکیب IRAP دارای مقادیر نسبتاً پایینی بود که نشان‌دهنده تعداد کم رتروترانسپوزون‌های LTR جو در ژنوم بنگدانه و در نتیجه فاصله زیاد آن‌ها از یکدیگر بود، درحالی‌که 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 جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد و بر این اساس می‌توان اظهار داشت این جمعیت‌ها از تنوع ژنتیکی مطلوبی برخوردار هستند. در تجزیه خوشباندی، نشانگرهای IRAP از کارایی بالایی در تفکیک جمعیت‌ها و گونه‌های مورد مطالعه برخوردار نبودند ولی نشانگرهای REMAP تا حد قابل قبولی جمعیت‌ها و گونه‌های مورد

مقایسه نتایج حاصل از این روش‌ها نشان داد درخت حاصل از داده‌های REMAP، مناسب‌ترین درخت فیلوژنی از نظر انطباق گروه‌بندی جمعیت‌ها با اطلاعات جغرافیایی و مولکولی است و این در حالی است که نشانگرهای IRAP از این نظر چندان مطلوب نبودند. ناکافی بودن تعداد و توالی آغازگرهای IRAP، می‌تواند دلیل احتمالی ضعف نشانگرهای IRAP 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 تشابهاتی بین دو ژنوم بنگدانه و جو، نقش اجدادی رتروترانسپوزون‌های BARE-1، Sukkula و Nikita را در تکوین و تکامل آن‌ها پررنگ می‌کند. این امر در زمینه بهره‌گیری از ژنتیک مقایسه‌ای، در مطالعه ژنوم گیاه بنگدانه می‌تواند حائز اهمیت باشد. Alavi-kia و همکاران (2008) اظهار داشتند 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 تولیدشده در این پژوهش نسبتاً کم بوده است می‌توان

صحیح تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی این گیاه دارویی قابل توصیه می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه تبریز و استاد گران‌قدر جناب آقای دکتر مصطفی ولیزاده، نهایت تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

مطالعه را تفکیک نمودند. نشانگرهای REMAP به‌طور کامل گونه‌های *H. pusillus* و *H. reticulatus* را از یکدیگر تفکیک کردند ولی گونه *H. niger* در تمام خوشه‌ها پراکنده بود. با این حال، نتایج این تحقیق ثابت کرد نشانگرهای رتروترانسپوزونی ابزار مناسبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در بین توده‌های بنگ‌دانه بوده و در برنامه‌های اصلاحی، بنگ‌دانه جهت تعیین سریع، دقیق و

منابع

- Abou-Isba, S.M., Abdel-Ghani, A.H. and Al-Qura'n, S. 2007. Variation in *Hyoscyamus* spp. populations from Jordan using morphological traits and RAPD markers. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 3(4): 411-428.
- Alavi-Kia, S.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(3): 795-800.
- Begna, T. 2021. Combining ability and heterosis in plant improvement. *Open Journal of Plant Science*, 6(1): 108-117.
- Branco, C.J.S., Vieira, E.A., Malone, G., Kopp, M.M., Malone, E., Bernardes, A., Mistura, C.C., Carvalho, F.I.F. and Oliveira, C.A. 2007. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Applied Genetics*, 48(2): 107-113.
- Chadha, S. and Gopalakrishna, T. 2007. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. *Current Science*, 96: 688-692.
- Chahota, R.K. and Sharma, S.K. 1993. Studies on genetic variability and component analysis in macrosperma and microsperma lentils. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 53(04): 411-417.
- Demirel, U., Tındaş, İ., Yavuz, C., Baloch, F.S. and Çalışkan, M.E. 2018. Assessing genetic diversity of potato genotypes using inter-PBS retrotransposon marker system. *Plant Genetic Resources*, 16(2): 137-145.
- Docking, T.R., Saade, F.E., Elliott, M.C. and Schoen, D.J. 2006. Retrotransposon sequence variation in four asexual plant species. *molecular evolution*, 62(4): 375-387.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- Fazli, P. and HaghMyrza, K. 2012. Study of genetic diversity in native chickpea mass with markers ISSR. *Modern Genetics*, 6: 97-104. (In Persian).
- Gill, R.A., Scossa, F., King, G.J., Golicz, A.A., Tong, C., Snowdon, R.J., Fernie, A.R. and Liu, S. 2021. On the role of transposable elements in the regulation of gene expression and subgenomic interactions in crop genomes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(2): 157-189.
- 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(6205): 376-380.
- Guo, D., Zhang, H. and Luo, Z. 2006. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Science*, 170(3): 528-533.
- Hasni Tesseh, S.F., Samizadeh Lahiji, H. and Shuai Dilmi, M. 2015. Investigating genetic diversity between and within tobacco types using ISSR markers. *Modern Genetics*, 9(1): 1-12. (In Persian).

- Hasni Tesseh, S.F., Samizadeh Lahiji, H. and Shua'i Dilmi, M. 2014. Evaluation of genetic diversity between and within different types of tobacco using IRAP and REMAP markers, *Crop Breeding*, 7(16): 1-9. (In Persian).
- Huff, D.R., Peakall, R. and Smouse, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and applied genetics*, 86(8): 927-934.
- Jahantigh Haghighi, Z., Fahmideh, L. and Fazlinsab, B. 2020. Evaluation of genetic diversity of different tomato cultivars using RAPD and ISSR markers. *Agricultural Biotechnology*, [10.22084/ab.2019.17227.1386](https://doi.org/10.22084/ab.2019.17227.1386). (In Persian).
- Kalendar, R., and Schulman, A. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*, 1: 2478-2484.
- Kalendar, R. and Schulman, A.H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature protocols*, 1(5): 2478-2484.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5): 704-711.
- Kharestani, H., Nasrolah Nejad Gomi, A. and Mehrabi, A.A. 2013. The evaluation of genetic diversity of Einkorn wheats using microsatellite markers. *Crop Production*, 6(2): 1-16. (In Persian).
- Khatamsaz, M., and Zangirian, E. 1998. SEM survey of pollen morphology in Iranian species of *Hyoscyamus L.* (Solanaceae). *The Iranian Journal of Botany*, 7: 151-163. (In Persian).
- Khatamsaz, M. and Zangirian, E. 1998. SEM survey of pollen morphology in Iranian species of *Hyoscyamus L.* (Solanaceae). *Botany*, 7(2): 151-163. (In Persian).
- Khosromehr, F., Jafari, A. and Hamdi, M. 2012. A comparative study of the stem anatomy of two Henbane species in Razavi Khorasan. the first national conference of biological sciences, Islamic Azad University, Flowerjan branch. Esfahan. (In Persian).
- Kouhsari, S.M., Sharifi, G.O.L.A.N.D.A.M., 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(1): 107-119.
- Kumar, A. and Hirochika, H. 2001. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends in Plant Science*, 6(3): 127-134.
- Lightbourn, G.J., Jelesko, J.G. and Veilleux, R.E. 2007. Retrotransposon-based markers from potato monoploids used in somatic hybridization. *Genome*, 50(5): 492-501.
- Mahfouze, S.A. and Ottai, M.E. 2011. Assessment of genetic variability for some *Hyoscyamus* species using biochemical and molecular markers. *Applied Sciences Research*, 7(12): 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(1): 1-12.
- Mirzadeh Vaghefi, S.S. 2013. Comparison the seed morphology of several species of *Hyoscyamus*. *Plant Research*, 26(4): 537-545. (In Persian).
- Moghaddam, M., Ehdaie, B. and Waines, J.G. 2000. Genetic diversity in populations of wild diploid wheat *Triticum urartu* Tum. ex. Gandil. revealed by isozyme markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(3): 323-334.
- Muhammad, A.J. and Othman, F.Y. 2005. Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar Rastali (*Musa AAB*) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(3): 241-249.
- Mohsenzadeh Golfazaei, M., Samizadeh Lahiji, H., Alami, A., Shua'i Dilmi, M. and Talesh Sasani, S. 2012. Investigating the genetic diversity of different greenhouse tobacco genotypes using ISSR and retrotransposon markers. *Plant Sciences*, 43(2): 371-380. (In Persian).

- Moon, H.S., Nifong, J.M., Nicholson, J.S., Heineman, A., Lion, K., Van der Hoeven, R., Hayes, A.J. and Lewis, R.S. 2009. Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. *Crop Science*, 49(6): 2149-2159.
- Naghavi, M.R., Ramshini, H.A., Fazeli, N.B. and Mardi, M. 2004. Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. *Biotechnology*, 2: 195-202. (In Persian).
- Nejadhabib Vash, F., Rahman, F., Heydari, R. and Jamei, R. 2012. Investigating the genetic diversity of Henbane genotypes using ISSR molecular markers, 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iranian Genetics Association. (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. In 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (pp. 1-5). IEEE.
- 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(1): 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(3): 225-238.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1): 8-15.
- Ren, N. and Timko, M.P. 2001. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 44(4): 559-571.
- Rogers, S.A. and Pauls, K.P. 2000. Ty1-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Genome*, 43(5): 887-894.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24): 8014-8018.
- Sakhdari, A., Malekzadeh Shafarodi, S., Asghari, A. and Kayani Fariz, M. 2013. Analysis of the relationship between some agricultural traits with ISSR markers in 20 potato genotypes, 8th National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and 4th National Biosafety Conference, University of Tehran, Iran. (In Persian).
- Sengupta, T., Vinayagam, J., Nagashayana, N., Gowda, B., Jaisankar, P. and Mohanakumar, K.P. 2011. Antiparkinsonian effects of aqueous methanolic extract of *Hyoscyamus niger* seeds result from its monoamine oxidase inhibitory and hydroxyl radical scavenging potency. *Neurochemical Research*, 36(1): 177-186.
- Sharifi, G.S., Kouhsari, M., Ebrahimzadeh, H and Khatamsaz, M. 2006. Isozyme analysis of seedling samples in some species of *Hyoscyamus* from Iran. *Pakistan journal of Botany*, 9:1685-1692.
- Sheydaei, M., Mosalanezhad, M. and Khatamsaz, M. 2000. Numerical taxonomy and seed protein analysis of *Hyoscyamus* species in Iran. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran*, 11: 83-92. (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(8): 1596-1599.
- Yousefi, M.J., Hassani, M.E., Jouzani, G.S., Arefi, H.M. and Mohammadipour, M. 2009. Genetic Variation of Some Iranian Black Henbane Accessions (*Hyoscyamus niger* L.) using RAPD and SDS-PAGE of Seed Proteins. *Plant Breeding*, 3(2): 92-98.
- 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.
- 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(5): 602-611.

Evaluation of genetic differences and similarities of henbane populations and genotypes based on IRAP and REMAP retrotransposition markers

Alireza Asghari Mirak*¹, Seyed Siamak Alavi kia², Seyed Abolghasem Mohammadi³

1. Lecture, Department of Agriculture, Payame Noor University, Meshginshahr, Ardabil, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Professor, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 23-06-2022

Accepted: 20-08-2022

Abstract

Henbane has high medicinal value due to hyoscyamine and scopolamine alkaloids. The genetic diversity of this plant has been evaluated using different markers. However, so far, there has been no report on the use of retrotransposon markers in studying genetic diversity and improving the quality and quantity of alkaloids of this plant. In this study, the genetic diversity of 10 henbane populations was investigated using IRAP and REMAP molecular markers. Among 36 possible combinations of 8 LTR primers, 7 combinations had appropriate and scalable amplification. In the REMAP technique, 11 ISSR primers were combined with 8 LTR primers, and of the 88 possible combinations, 12 combinations were scalable. The mean values of polymorphic information for IRAP and REMAP markers were 0.30 and 0.32, respectively, and the mean marker index for these two markers was 2.59 and 2.47, respectively. Taking into account these criteria, REMAP marker was more efficient than IRAP due to the more considerable role of microsatellites in the estimation of henbane genetic diversity. In the analysis of molecular variance using IRAP and REMAP markers, intra-population variation was estimated to be higher than inter-population. This finding can be due to the existence of many genetic differences in the individuals in the population in terms of amplified gene locations. It also indicates the heterogeneity within the population and the desirable diversity of these populations in northwest Iran. Cluster analysis based on IRAP marker failed to separate species, but REMAP marker could separate *H. pusillus* and *H. reticulatus* species to a high degree.

Keywords: Henbane, genetic diversity, IRAP marker, REMAP marker

*Corresponding Author Email: alirezapnu8475@gmail.com