

## ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه *Papaver bractaeum* Lindl. رشته کوه البرز با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT

جواد شقاقی<sup>۱\*</sup>، علاءالدین کردنائیج<sup>۲</sup>، اردشیر قادری<sup>۳</sup>

۱- گروه اصلاح نباتات، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

\* آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه شاهد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، صندوق‌پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

تلفن: ۵۱۲۱۲۱۳۳ (۰۲۱)، نمابر ۵۱۲۱۳۵۶۴ (۰۲۱)

پست الکترونیک: javad\_shaghghi@yahoo.com

doi: 10.29252/jmp.4.72.s12.90

تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۶

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۲۷

### چکیده

مقدمه: خشخاش کبیر *Papaver bractaeum* Lindl. از خانواده شقایقیان است که حاوی آکالوئید مهمی مانند تبائین می‌باشد.

هدف: بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت خشخاش کبیر در رویشگاه رشته کوه البرز.

روش بررسی: ۳۶ ژنوتیپ از سه جمعیت خشخاش (۱۲ فرد از هر جمعیت) انتخاب و بعد از استخراج DNA ژنومی به روش دوپیل و دوپیل با استفاده از ۲۶ آغازگر نشانگر مولکولی SCoT مورد پایش قرار گرفتند. محتوای تبائین کپسول با استفاده از روش کروماتوگرافی HPLC و مقایسه با منحنی استاندارد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

نتایج: از مجموع ۲۶ آغازگر، توسط ۱۲ آغازگر ۱۸۱ نوار قابل امتیاز تکثیر شد. دامنه و میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) به ترتیب برابر ۰/۲۳۳ تا ۰/۳۳۵ و ۰/۲۸۹ بود. شاخص قدرت تفکیک (RP) آغازگرها بین ۲/۶۱ تا ۶/۵ متغیر بود. واریانس درون و بین جمعیت‌ها به ترتیب ۵۷ و ۴۳ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر UPGMA، ۳۶ ژنوتیپ را به سه گروه تقسیم و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز آن را تأیید نمود. بیشترین شباهت (۰/۸۶) بین جمعیت (پلور- سیاه‌بیشه) و کمترین شباهت (۰/۷۶) بین جمعیت (تهم- سیاه‌بیشه) بود. میان جمعیت‌ها از نظر محتوای تبائین تفاوت وجود داشت. پلور بیشترین و تهم کمترین مقدار تبائین را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نشانگر مولکولی SCoT قابلیت تفکیک جمعیت‌های خشخاش کبیر را دارد و ابزاری کارآمد در مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های این گیاه می‌باشد. همچنین نتایج کلی نشان داد که تولید متابولیت ثانویه تبائین تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد.

گل‌واژگان: *Papaver bractaeum* Lindl. تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر SCoT



## مقدمه

دیگر که به صورت تصادفی و یا نواحی خاصی از ژنوم را که بیان ژنی ندارند را مورد پایش قرار می‌دهند این سیستم نشانگری آن بخش ژنوم را که بیان ژنی دارد را مورد پایش قرار می‌دهد که می‌تواند تنوع ژنتیکی بخشی از ژنوم را نمایان سازد که دارای کارکرد و بروز فنوتیپی باشد [۶]. نشانگر SCoT با موفقیت در بسیاری از برنامه‌های کاربردی مانند تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و رابطه ژنتیکی بین افراد گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۶، ۵، ۴]. یکی از پرسش‌های مهم در زمینه گیاهان دارویی این است که سهم محیط، ژنتیک و اثر متقابل این دو عامل در تنوع مورفوفیزیولوژیک و فیتوشیمیایی موجود در جمعیت‌های طبیعی این گونه چگونه است؟ یکی از راه‌های پاسخ به این پرسش، ارزیابی تنوع ژنتیکی بوسیله نشانگرهای مبتنی بر DNA است که بدون تأثیرپذیری از محیط، تفاوت ژنتیکی را میان جمعیت‌های یک گونه یا افراد درون جمعیت‌ها آشکار می‌سازد. اطلاعات محدود در مورد تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های خشخاش کبیر لزوم انجام این تحقیق را توجیه می‌کند. بر این اساس، تنوع ژنتیکی سه جمعیت خشخاش کبیر جمع‌آوری شده از رشته کوه البرز با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT، در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

پژوهش حاضر شامل سه جمعیت خشخاش کبیر (*Papaver bracteatum* Lindl.) (جدول شماره ۱) موجود در بانک بذر پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی می‌باشند که پیشتر از رشته کوه البرز جمع‌آوری شده‌اند. بذرها پس از استریل شدن (۱ دقیقه اتانول ۷۰ درصد، ۸ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و سپس شستشو با آب مقطر استریل) در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با غلظت یک چهارم نمک کشت شدند.

تا به امروز بیش از ۲۰۰,۰۰۰ ترکیب طبیعی در گیاهان شناسایی شده است [۱۰]. برخی از گونه‌های خشخاش دارای الکلوئیدی مانند کدئین، مورفین و تاکسول هستند که به عنوان دارو کاربرد فراوانی دارند [۲۲]. الکلوئیدهای دسته بنزیل ایزوکوئینولین (BIAS) دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه متنوع و گسترده‌ای هستند که تاکنون حدود ۲۵۰۰ عدد از مشتقات آن از جمله مورفین شناخته شده است [۱۴]. الکلوئیدهای گروه مورفین دسته مهمی از ترکیبات دارویی ضد درد هستند [۲۳]، که دارای اثرات ضد سرطانی و ضد مخدر می‌باشند [۱۷]. گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) به عنوان تنها منبع تجاری و تولید غیرقانونی متابولیت ثانویه مورفین با عملکرد تولید پایین است [۲۴، ۲۱]. در مقابل، گیاه خشخاش کبیر که توسط شارقی و لاله‌زاری در سال ۱۹۶۷ میلادی به عنوان منبع غنی از متابولیت تبائین معرفی شد، به دلیل عدم تولید ترکیبات اعتیادآور از اهمیت زیادی برخوردار است. تبائین به طور تجاری به کدئین و سپس به سایر آپیات‌ها تبدیل می‌شود [۲۷]. خشخاش کبیر ( $2n=2X=14$ ) متعلق به بخش *Oxytona* با دگرگرده‌افشانی خارجی و سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی می‌باشد [۱۸، ۱۱].

گیاه خشخاش کبیر به طور طبیعی در ارتفاع بیش از ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ متر در سه ناحیه مجزا از جمله رشته کوه‌های البرز در شمال ایران، رشته کوه‌های زاگرس در غرب و شمال غربی ایران و شیب شمالی قفقاز می‌روید [۱۱]. اطلاع از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های این گیاه اطلاعات مفید و کاربردی را در جهت اجرای برنامه‌های حفاظت ژنتیکی و به نژادی در آینده مهیا می‌کند [۱۵]. یکی از ابزارهای ارزشمند ارزیابی تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌باشند. این نوع از نشانگرهای مولکولی با پایش ژنوم بسته به نوعشان تفاوت‌های موجود در توالی DNA را آشکار می‌کنند. در این زمینه یکی از بهترین نشانگرها، سیستم نشانگری SCoT است که به صورت هدفمند توالی اطراف کد آغاز را مورد پایش قرار می‌دهد به عبارت دیگر برخلاف نشانگرهای



جدول شماره ۱- محل جمع‌آوری جمعیت‌های خشخاش کبیر

شماره جمعیت	نام منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)
جمعیت ۱	مازندران_آمل (پلور)	۲۴۴۶
جمعیت ۲	مازندران_چالوس (سیاه بیشه)	۲۷۹۵
جمعیت ۳	زنجان_زنجان (تهم)	۲۴۰۸

## استخراج DNA ژنومی

پس از جوانه‌زنی در مرحله پنچ یا شش برگی از هر جمعیت دوازده بوته انتخاب و DNA ژنومی آنها با استفاده از CTAB استخراج شد [۷]. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد سنجیده شد.

## شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

از ۲۶ آغازگر SCoT در جهت پایش ژنوم گیاه خشخاش کبیر استفاده شد (جدول شماره ۲). واکنش PCR در حجم‌های ۳۰ میکرولیتری و با ترکیب ۳ میکرولیتر (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده و ۱۵ میکرولیتر از رد مستر میکس شرکت آمپلیکون با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت Bio-Rad مدل T-100 انجام شد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک دوره ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۵°C (واسرشته‌سازی اولیه)، سپس ۳۸ دور با دمای ۹۵°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۴۰°C برای همه آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۱۵۰ ثانیه و بسط نهایت ۶ دقیقه در ۷۲°C بود.

الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر با بارگذاری ۱۰ میکرولیتر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز و رنگ‌آمیزی Gel stain (۱ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر ژل) ساخت شرکت SMOBIO انجام شد. الکتروفورز ژل‌ها با شرایط ۵ ولت بر سانتی‌متر به مدت ۱۵۰ دقیقه انجام شد. عکس‌برداری از ژل‌ها توسط دستگاه ژل‌داک شرکت SYNGENE انجام شد.

## آنالیز داده‌ها

در امتیازدهی نوارهای حاصل، برای حضور باند عدد ۱ و عدم حضور باند عدد صفر در نظر گرفته شد. با استفاده از نرم افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر در ردیف‌ها و نام ژنوتیپ‌ها در ستون قرار گرفت. ماتریس عدم تشابه، تجزیه‌ی خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار DARwin انجام شد. همچنین دندروگرام بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه DICE انجام شد. مقادیر پارامترهای مربوط به آغازگرها شامل محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) Polymorphic Information Content برای هر ترکیب آغازگر از رابطه  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - 2 \sum_{j=i+1}^n \sum_{k=j+1}^n P_i P_j P_k$  محاسبه شد که در آن Pi برابر با فراوانی آلل نام و n برابر با تعداد باندهای مشاهده شده است که با نرم‌افزار آنلاین iMEC محاسبه شد [۱، ۲]. برای تأیید صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCo) نیز به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی استفاده می‌شود. در این تحقیق تجزیه به مختصات اصلی به صورت توأم به همراه تجزیه خوشه‌ای در گروه‌بندی افراد به منظور روشن کردن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه کل تغییرات داده‌ها انجام شد. همچنین شاخص نشانگری از رابطه  $MI = PIC \times E$  به دست آمد که در آن E نشان‌دهنده تعداد باندهای چندشکل است. همچنین تجزیه واریانس مولکولی داده به منظور تعیین واریانس بین و میان جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام شد. تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص



جدول شماره ۲- مشخصات آغازگرهای SCoT

نام آغازگر	توالی	Tm (c)	GC content%
SC2	CAACAATGGCTACCACCC	54.7	55.60%
SC3	CAACAATGGCTACCACCG	55.2	55.60%
SC4	CAACAATGGCTACCACCT	53.5	50%
SC5	CAACAATGGCTACCACGA	54	50%
SC6	CAACAATGGCTACCACGC	55.9	55.60%
SC8	CAACAATGGCTACCACGT	54.3	50%
SC9	CAACAATGGCTACCAGCA	54.3	50%
SC10	CAACAATGGCTACCAGCC	55.1	55.60%
SC11	AAGCAATGGCTACCACCA	55.4	50%
SC12	ACGACATGGCGACCAACG	59.8	61.10%
SC16	CCATGGCTACCACCGGCC	61.9	72.20%
SC21	CACCATGGCTACCACCAT	55.6	55.60%
آغازهایی که تکثیر نداشتند			
SC1	CAACAATGGCTACCACCA	53.8	50
SC7	CAACAATGGCTACCACGG	55.2	55.60
SC13	ACGACATGGCGACCATCG	59.3	61.10
SC14	ACGACATGGCGACCACCG	61.8	66.70
SC15	ACGACATGGCGACCGCGA	63.8	66.70
SC17	CATGGCTACCACCGGCC	61.9	72.20
SC18	ACCATGGCTACCACCGCG	61.5	66.70
SC19	GCAACAATGGCTACCACC	55.4	55.60
SC20	AACCATGGCTACCACCGC	59.1	61.10
SC22	CAATGGCTACCATTAGCC	51.8	50
SC23	ACCATGGCTACCACGGGC	61.1	66.70
SC24	CCATGGCTACCACCGCCA	61.1	66.70
SC25	CAATGGCTACCACTACAG	51.1	50
SC26	ACAATGGCTACCACCATC	53.2	50

Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Qst را به دست می‌دهد که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت توسط لگاریتم Likelihood برای هر K،  $\ln P(D) = L(K)$  تعیین می‌شود، از آنجایی که توزیع  $\ln P(D)$  عدد دقیق و واضحی از K واقعی را نشان نمی‌دهد، دلتا K ( $\Delta K$ ) مبنی بر برآورد ثانویه تغییر در Likelihood جهت برآورد دقیق مقدار واقعی K استفاده شد [۸]. در این روش شیب تابع احتمال در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت [۲۵]. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۲ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۳ تکرار منظور شد. برای این منظور از مدل ترکیبی (Admixture model) و استقلال فراوانی آلی با ۱۵۰۰۰ تکرار آزمایش (یا Burn in) و ۱۵۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار



## اندازه‌گیری محتوای آکالوئید تبائین

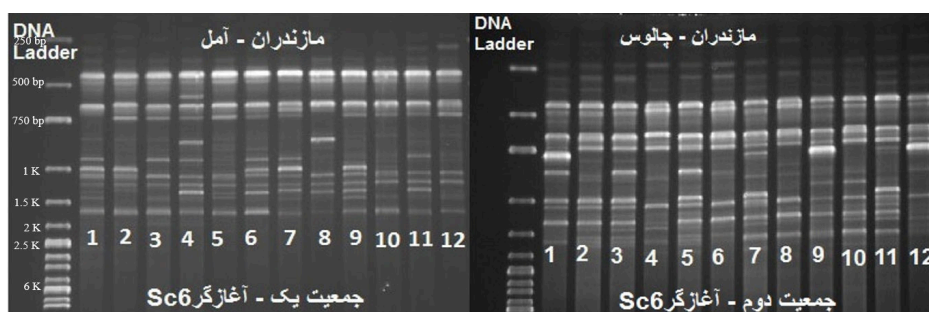
پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به دستگاه Knauer با مشخصات (نوع ستون: Eclipse-XBD-C18؛ با مشخصات: Knauer- UV 5  $\mu\text{m} \times 4.6 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ ؛ دکتور: 298 nm K2501؛ سرعت جریان: 0.8 ml/min؛ فاز متحرک: Methanol(500):Water(500):Ammonia (1.75%؛ دما: ۲۰ درجه سانتی‌گراد) تزریق شد [۱۶].

## نتایج

تنوعات ژنتیکی ژنوتیپ‌های مطالعه شده با استفاده از ۲۶ آغازگر مورد مطالعه فقط ۱۲ آغازگر در سطح جمعیت‌ها، آلل‌های چندشکل (پلی مورف) و قابل امتیازدهی را ایجاد نمودند. تجزیه‌های آماری بر اساس باندهای تکثیر یافته حاصل از ۱۲ آغازگر انجام شد. در مجموع ۱۸۱ ردیف باندهای بر روی ژل‌ها شناسایی و امتیازدهی شدند که همه قطعات در سطح جمعیت‌های مورد مطالعه چندشکل بودند. از سوی دیگر بیشترین تعداد باند تکثیر شده مربوط به آغازگر SC<sub>12</sub> با ۱۸ قطعه و کمترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر SC<sub>21</sub> با ۸ قطعه بود. شکل شماره ۱ الگوی باندهای بررسی شده با استفاده از آغازگر SC<sub>6</sub> در جمعیت پلور آمل و سیاه بیشه چالوس استان مازندران را نشان می‌دهد. شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی و سایر پارامترهای ژنتیکی مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در (جدول شماره ۳) ارائه شده است.

به منظور اندازه‌گیری محتوای متابولیت ثانویه تبائین از هر جمعیت به صورت تصادفی ساخت محلول استاندارد تبائین: ۲۰ میلی‌گرم پودر استاندارد تبائین را وزن و به بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس با اضافه کردن متانول به بالن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محلول‌های ۴، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ ppm از محلول حاصل حجم‌های ۲، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌لیتر برداشت و به بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال و با فاز متحرک به حجم رسانده شد و پس از عبور محلول‌های حاصل از صافی ۰/۴۵ میکرون به دستگاه تزریق و منحنی استاندارد رسم شد.

پنج میلی‌لیتر محلول ۰/۱۵٪ سدیم کربنات به یک گرم از نمونه پودر شده کپسول گیاه در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط حلال ایزوپروپیل الکل و کلروفرم به نسبت ۱ به ۳ به نمونه اضافه و به مدت ۱ ساعت به منظور استخراج در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل پس از فیلتر در فشار پایین فیلتر به دکانتور منتقل شده و یک بار با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد. سپس ۲ بار با استفاده از ۲۰ میلی‌لیتر محلول آبی ۰/۱ مولار اسید کلریدریک استخراج انجام گرفت و همه محلول آبی اسیدی به یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شده و برای تزریق به دستگاه HPLC با فاز متحرک به نسبت ۵: ۱ به حجم رسانده شد و



شکل شماره ۱- الگوی باندهای جمعیت‌های یک و دو خشخاش کبیر با آغازگر SC<sub>6</sub>



جدول شماره ۳- فراوانی‌های آلل و شاخص‌های تنوع ژنتیکی مربوط به نشانگرهای SC02

نام آغازگر	شاخص هتروزایگوسیتی	مجموعی اطلاعات چند شکل	نسبت سهم موثر	شاخص نشانگر	قدرت تشخیص	قدرت تفکیکی	الل مشاهده شده	تعداد الل موثر	شاخص قانون	شاخص پی
SC2	۰/۲۶۰	۰/۳۴۱	۱۰/۹۱۷	۶/۴۱۵	۰/۵۵۸	۶/۵۰۰	۱/۳۱۴	۱/۲۷۹	۰/۳۳۸	۰/۱۶
SC3	۰/۳۹۴	۰/۲۶۹	۱۰/۲۲۲	۴/۷۷۲	۰/۳۶۷	۵/۰۰۰	۱/۵	۱/۳۷۴	۰/۳۱۳	۰/۲۱۳
SC4	۰/۲۳۶	۰/۳۱۹	۱۰/۳۶۱	۷/۳۳۷	۰/۲۵۵	۷/۶۱۱	۱/۲۷۸	۱/۲۲۵	۰/۸۸۴	۰/۱۲۶
SC5	۰/۲۷۶	۰/۳۰۹	۱۴/۱۹۴	۴/۲۹۸	۰/۳۰۳	۴/۹۴۴	۱/۳۵۵	۱/۲۶۱	۰/۲۰۹	۰/۱۴۵
SC6	۰/۲۲۰	۰/۲۵۹	۱۱/۱۹۴	۵/۷۱۵	۰/۵۱۱	۵/۶۱۱	۱/۲۷۱	۱/۳۳۱	۰/۲۶	۰/۸۸۱
SC8	۰/۴۴۳	۰/۲۴۹	۹/۳۶۱	۵/۱۷۶	۰/۵۵۳	۵/۲۷۸	۱/۱۶۷	۱/۲۶	۰/۲۱۴	۰/۱۲۷
SC9	۰/۳۸۷	۰/۳۰۶	۱۳/۲۲۲	۶/۸۴۳	۰/۳۱۷	۶/۷۷۸	۱/۳۵۸	۱/۳۰۵	۰/۳۱۶	۰/۲۲۱
SC10	۰/۲۷۳	۰/۳۱۰	۱۷/۵۵۶	۳/۷۵۹	۰/۳۰۰	۶/۷۷۸	۱/۲۴۴	۱/۲۶۲	۰/۲	۰/۱۴۱
SC11	۰/۲۱۳	۰/۳۲۴	۱۴/۹۴۴	۳/۳۹۶	۰/۲۱۷	۳/۲۴۴	۱/۰۵۹	۱/۱۱	۰/۰۸۶	۰/۰۶
SC12	۰/۱۵۵	۰/۳۲۵	۱۶/۲۷۲	۷/۶۷۸	۰/۱۶۳	۳/۰۵۶	۱/۲۲۲	۱/۱۹۴	۰/۸۵۲	۰/۱۰۶
SC16	۰/۳۷۸	۰/۲۲۳	۱۰/۲۷۸	۶/۵۲۱	۰/۶۲۵	۳/۲۴۴	۰/۶۲۷	۱/۰۲۷	۰/۰۲۴	۰/۰۱۶
SC21	۰/۲۲۹	۰/۳۱۶	۶/۸۳۳	۱/۸۸۸	۰/۲۷۱	۲/۳۳۳	۱/۶۲۵	۱/۴۸۴	۰/۳۸۹	۰/۲۷
کل	۳/۸۸۳	۳/۳۷۱	۱۴۰/۵۵۶	۵۱/۲۰۶	۲/۵۹۰	۵۱/۷۷۸	۱۵۰/۴۰	۱۵۰/۲۱۲	۲/۵۵۵	۱/۷۱۶
میانگین	۰/۳۲۴	۰/۲۸۹	۱۱/۷۱۳	۴/۲۷۴	۰/۳۸۳	۴/۳۱۵	۱/۲۵۳	۱/۲۶۸	۰/۲۱۵	۰/۱۴۹

در این تحقیق تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد و ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند. بر اساس آماره P میان جمعیت‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. یعنی گروه بندی به صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان کلاسترها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون کلاسترها برابر ۵۷٪ و در بین کلاسترها تنوع برابر ۴۳٪ مشاهده شد. نتایج حاصل از واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون جمعیت‌ها نسبت به تنوع بین جمعیت‌ها بیشتر بوده است. این موضوع مشخصاً می‌تواند بیانگر عدم امکان برقراری جریان ژنی میان جمعیت‌هایی باشد که از لحاظ جغرافیایی کاملاً از هم دور و مجزا هستند (جدول شماره ۶). نتایج حاصل از نرم‌افزار Structure با توجه به (شکل شماره ۴) که تعیین کننده تعداد بهینه K (زیر جمعیت) می‌باشد، جمعیت‌ها را به شش زیرجمعیت مطابق (شکل شماره ۵) به طوری که اعداد در محور عمودی ضریب عضویت هر فرد به زیر جمعیت‌ها و اعداد در محور افقی کد ۳۶ ژنوتیپ را نشان می‌دهند و ژنوتیپ‌هایی که با رنگ‌های یکسان متعلق به یک زیر جمعیت بودند به یک زیرجمعیت منتسب شد (شکل شماره ۵). سنجش محتوای آلکالوئید تبائین کپسول نشان داد که جمعیت پلور بیشترین (۰/۸۵ درصد گرم ماده خشک) و جمعیت تهم کمترین مقدار (۰/۳۴ درصد گرم ماده خشک) تبائین کپسول را داشت (شکل شماره ۶). نتایج آنالیز داده‌های مبتنی بر نشانگر مولکولی و فیتوشیمی نشان داد که تولید تبائین می‌تواند تحت تأثیر توام عوامل ژنتیکی و محیطی باشد.

بر اساس شاخص فاصله ژنتیکی نی، بیشترین فاصله ژنتیکی با مقدار (۰/۲۶۲) بین جمعیت‌های تهم استان زنجان و سیاه بیشه چالوس بود و کمترین فاصله ژنتیکی با مقدار (۰/۱۴۷) بین جمعیت‌های استان مازندران (پلور آمل و سیاه بیشه چالوس) مشاهده شد (جدول شماره ۴). از لحاظ تعداد آلل‌های مؤثر، جمعیت تهم استان زنجان و پلور شهر آمل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر به خود اختصاص دادند. با توجه به شاخص شانون، شاخص نی و درصد چندشکلی جمعیت تهم استان زنجان دارای بیشترین تنوع و جمعیت پلور شهر آمل دارای کمترین تنوع در بین سه جمعیت خشخاش کبیر بود (جدول شماره ۵).

همچنین نتایج به دست آمده از ضریب همبستگی کوفتیک بین ماتریس تشابه به دست آمده از سه روش دایس، جاکارد و Simple matching با دندروگرام‌های حاصل از الگوریتم UPGMA محاسبه شد و نتایج آزمون مانتل، نشان داد که ماتریس تشابه مربوط به روش جاکارد مطابقت بیشتری با دندروگرام دارد. به طوری که بیشترین مقدار ضریب کوفتیک (۰/۹۱۰۵) مربوط به روش جاکارد و الگوریتم UPGMA بود (شکل شماره ۲).

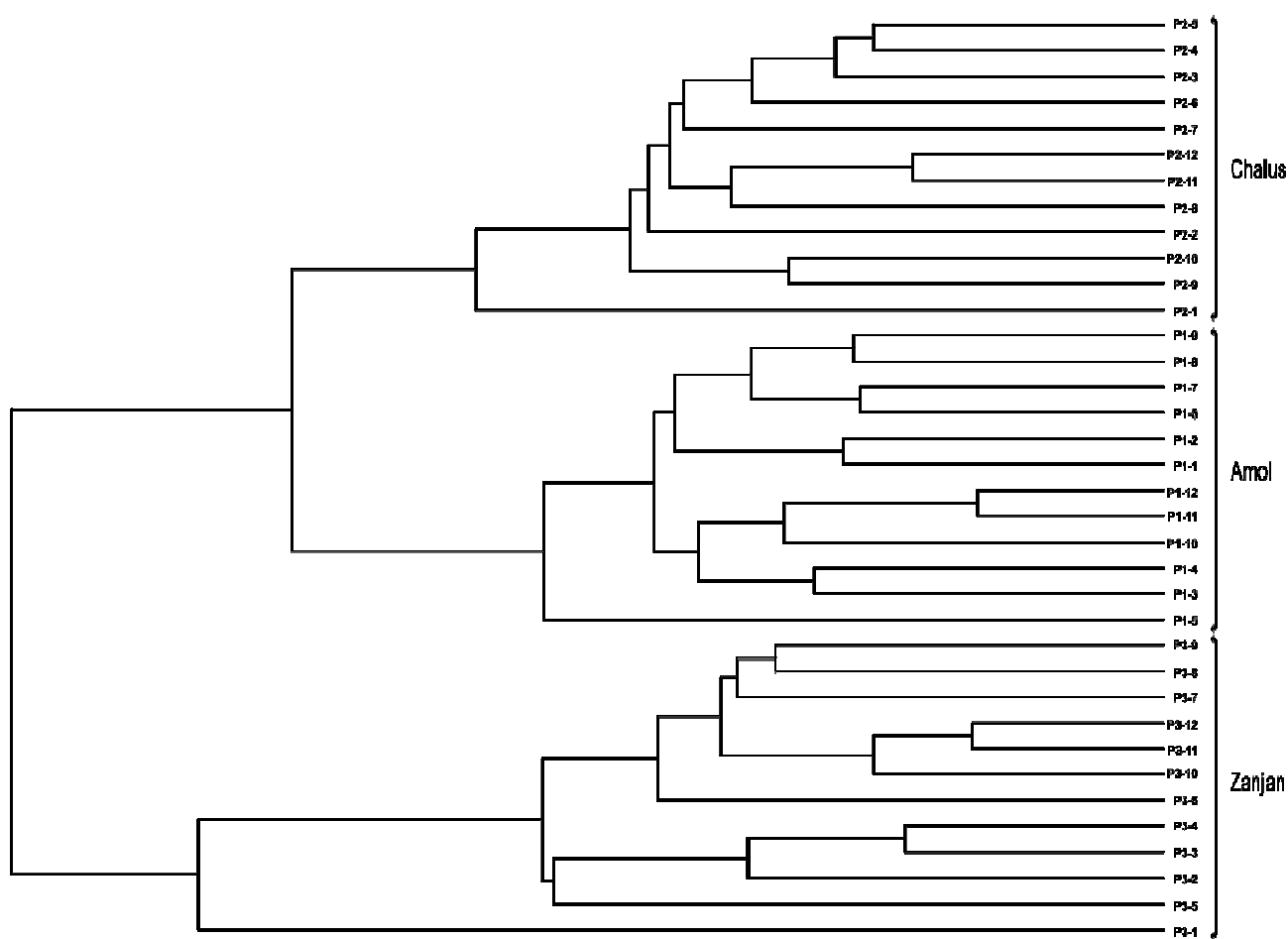
نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۴۲/۹۲ و ۱۷/۱۴ درصد و در مجموع ۵۸ درصد از واریانس موجود را توجیه کند. در ضمن دیاگرام پراکنش جمعیت‌ها بر اساس مختصات اول و دوم رسم شد (شکل شماره ۳)، که با تعداد خوشه‌های تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و جمعیت‌ها را به سه گروه تقسیم کرد.

جدول شماره ۴- ضرایب تشابه (بالای قطر) و فاصله (پایین قطر) بین سه جمعیت خشخاش کبیر بر اساس شاخص ژنی Nei

جمعیت‌ها	آمل (پلور)	چالوس (سیاه بیشه)	زنجان (تهم)
آمل (پلور)	***	۰/۸۶۳	۰/۷۸۶
چالوس (سیاه بیشه)	۰/۱۴۷	***	۰/۷۶۹
زنجان (تهم)	۰/۲۴۰	۰/۲۶۲	***

جدول شماره ۵- فراوانی آلل‌ها و شاخص‌های تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های خشخاش کبیر

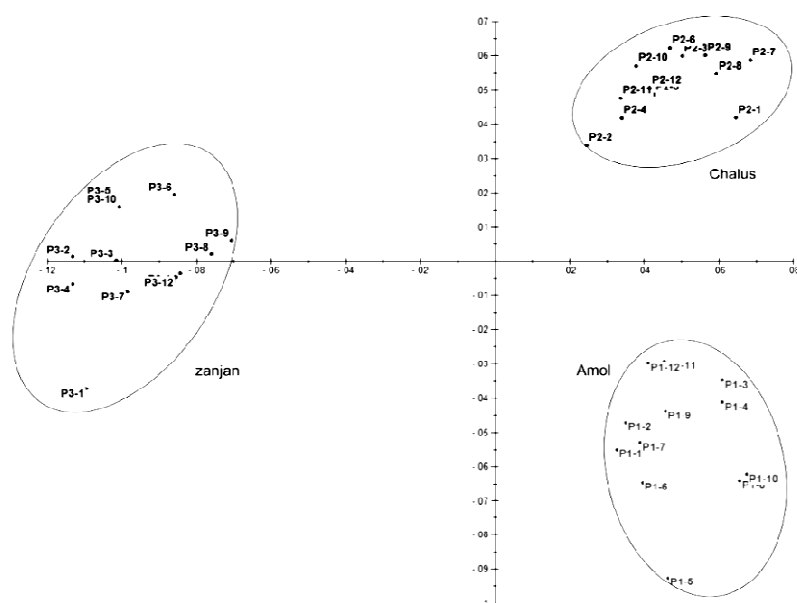
جمعیت	تعداد باند تکثیر شده	باند اختصاصی	شاخص تنوع ژنی	درصد چند شکلی (%)	تعداد مکان‌های آللی چند شکل	شاخص اطلاعات شانون	درصد نسبت آلل‌های مؤثر به آلل‌های مشاهده شده
پلور- آمل	۱۵۹	۱	۰/۱۲۶	۲۹/۸۳	۵۴	۰/۱۸۲	۱
سیاه بیشه- چالوس	۱۶۲	۰	۰/۱۴۱	۳۳/۱۵	۶۰	۰/۲۰۳	۱
تهم- زنجان	۱۶۳	۷	۰/۱۵۸	۳۸/۶۷	۷۰	۰/۲۳۰	۰/۹۹۳
میانگین	۱۶۱/۳۳	-	۰/۱۴۱	۳۳/۸۰	۶۱/۳۳	۰/۲۰۵	۱/۰۱۹



شکل شماره ۲- دندروگرام ۳۶ ژنوتیپ خشخاش کبیر بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد بر اساس داده‌های نشانگر SCoT.



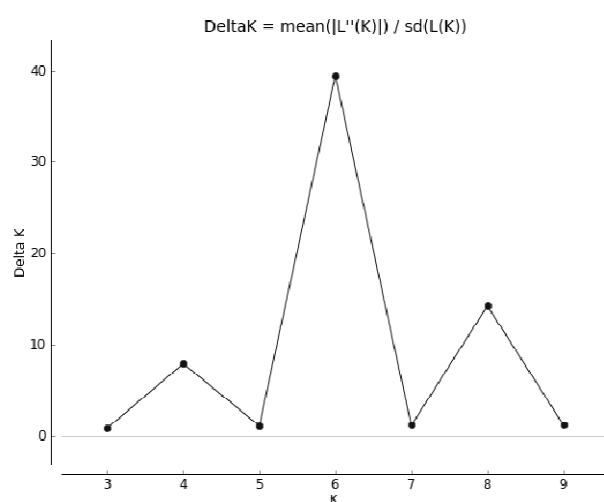




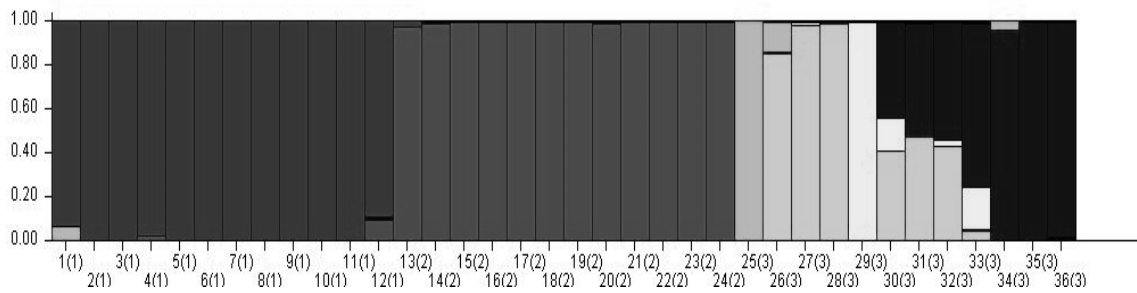
شکل شماره ۳ - نمودار تجزیه به مختصات اصلی (PC0) ژنوتیپ‌های سه جمعیت خشخاش کبیر بر اساس داده‌های نشانگر SCoT

جدول شماره ۶- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های خشخاش کبیر

Value	P	درصد واریانس (%)	واریانس تخمینی	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۰۱	۰/۴۳۵	۴۳	۱۰/۸۰۵	۱۴۳/۷۲۲	۲۸۷/۴۴۴	۲	بین جمعیت
-	-	۵۷	۱۴/۰۵۸	۱۴/۰۵۸	۴۶۳/۹۱۷	۳۳	درون جمعیت
		۱۰۰	۲۴/۸۶۳	-	۷۵۱/۳۶۱	۳۵	کل

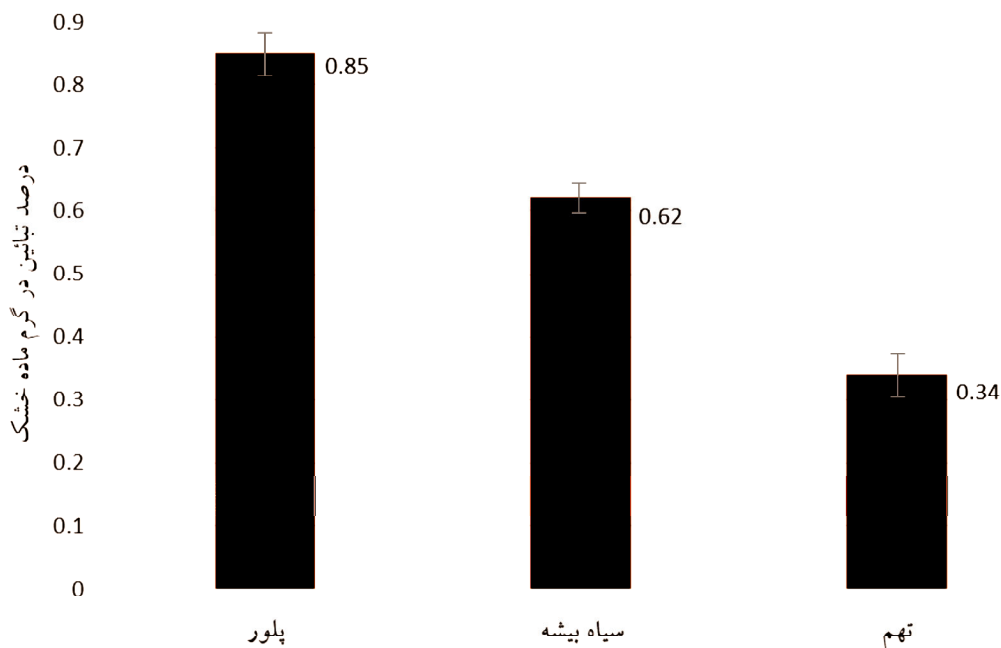


شکل شماره ۴- تعیین ساختار جمعیت، منحنی دو طرفه برای تعیین تعداد بهینه K



شکل شماره ۵- خویشاوندی ژنتیکی مجموع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگر مولکولی SCoT تجزیه شده در نرم‌افزار Structure. اعداد در محور عمودی ضریب عضویت هر فرد به زیر جمعیت‌ها و اعداد در محور افقی کد ژنوتیپ را نشان می‌دهند. ژنوتیپ‌ها با رنگ‌های یکسان متعلق به یک زیر جمعیت است.

محتوای متابولیت ثانویه تبائین در کیسول



شکل شماره ۶- محتوای تبائین کیسول در جمعیت‌های خشخاش کبیر رشته کوه البرز

می‌باشند، اشاره نمود [۹، ۳]. با توجه به مشاهده ۱۸۱ مکان چند شکل توسط ۱۲ ترکیب آغازگری مورد استفاده نتایج حاصل را می‌توان قابل اعتماد دانست. از طرفی باندهای مشاهده شده در سطح جمعیت‌ها، چندشکلی نشان دادند و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی میان جمعیت‌ها ۸۶ درصد بود.

## بحث

به طور کلی عواملی مختلفی برآورد روابط ژنتیکی میان افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از آن جمله می‌توان به تعداد نشانگرهای مورد استفاده، توزیع نشانگر در ژنوم، طبیعت مکانیزم‌های تکاملی که در واقع زیربنای تنوع محاسبه شده

گروه‌های حاصل از تجزیه کلاستر تأیید شدند.

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه آغازگرهای SC4، SC11، SC12 و SC21 نسبت به سایر آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه از مقدار PIC بالاتری برخوردار بودند، بنابراین می‌توان آنها را به عنوان مناسب‌ترین آغازگرهای SCoT در مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های خشخاش کبیر پیشنهاد کرد. میزان بالای چندشکلی مشاهده شده در قطعات حاصل از آغازگرهای SCoT و مقدار بالای شاخص PIC نشانگرها حکایت از توانایی مناسب این تکنیک در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه خشخاش کبیر داشت. به طور کلی نتایج حاصل از خوشه بندی حکایت از تنوع نسبتاً مناسب در بین نمونه‌های خشخاش کبیر داشت و این تکنیک قادر به تفکیک نمونه‌های با ناحیه جغرافیایی مشابه و نزدیک به هم بود.

از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان در مدیریت و حفاظت از ژرم پلاسماهای با ارزش خشخاش کبیر به خوبی استفاده نمود زیرا می‌توان جمعیت‌های با فاصله ژنتیکی زیاد را برای آغاز برنامه‌های به‌نژادی در خشخاش کبیر از طریق انجام دورگه‌گیری مورد بهره‌برداری قرار داد. به بیان دقیق‌تر می‌توان گفت از آنجایی که نشانگر SCoT سرنخ سرراستی از تنوع در مناطق ژنی می‌باشد، استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی دادن ژنوتیپ‌های شاخص در جمعیت‌های با فواصل ژنتیکی زیاد در جهت بهره‌وری از خاصیت هتروزیس به منظور اصلاح و افزایش ترکیبات دارویی خشخاش کبیر می‌تواند بسیار مؤثر باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای بین جمعیت‌های خشخاش کبیر، حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود. همچنین برداشت‌های بی‌رویه از گیاهان دارویی مانند خشخاش کبیر در آینده باعث نابودی این گونه با ارزش می‌شود، پس حفظ و نگهداری خارج از محل و ایجاد بانک ژرم پلاسما و تکثیر این گیاه نیز توصیه می‌شود.

مقدار میانگین شاخص درصد قطعات چند شکل در این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌های انجام شده با استفاده از آغازگر SCoT در سیاهدانه با ۳۲/۱۳ درصد قطعات چندشکل از مقدار بیشتری برخوردار بود ولی در مقایسه با مطالعه گیاه سیب‌زمینی با ۶۱ درصد قطعات چند شکل [۱۹، ۱۲] از مقدار تنوع کمتری برخوردار بود که علت این تفاوت‌ها در سطح تنوع به شرایط مختلفی مانند نحوه تولید مثل در گیاهان مورد مطالعه و محیط و ژنتیک گیاه بستگی دارد. البته گیاهان دگرگشن مانند خشخاش کبیر در مقایسه با گیاه خودگشنی مانند سیاهدانه و یا سیب‌زمینی که از طریق روشی تکثیر می‌شود از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردار هستند [۱۳]. مطالعه ۱۸۰ نمونه‌ی بانک ژن مربوط به گونه مختلف جنس *Papaver* متعلق به شاخه *Oxytona* از پنج ناحیه مختلف ترکیه با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR نشان داد که این سیستم نشانگری توانایی دسته‌بندی کردن اعضای شاخه *Oxytona* را دارد [۲۸].

میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در این تحقیق ۰/۲۸۹ بود که در مقایسه با PIC به دست آمده در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه سیاهدانه (۰/۰۶۱) بیشتر بود [۱۹]. بیشترین مقدار شاخص PIC مربوط به آغازگر SC12 با مقدار ۰/۳۳۵ و کمترین مقدار شاخص PIC مربوط به آغازگر SC16 با مقدار ۰/۲۳۳ بود. مطالعه تنوع ژنتیکی میان دو جمعیت *P. bracteatum* و *P. somniferum* با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR نشان از تنوع گسترده میان دو گونه مورد مطالعه بود [۲۹].

نیک‌کردار و همکاران در سال ۱۳۹۶ در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ توده گیاه دارویی رازیانه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT، ضمن اشاره به وجود تنوع ژنتیکی بالا، بیان داشتند که توده‌های مورد بررسی منبع ژنتیکی مناسبی جهت برنامه‌های به‌نژادی رازیانه می‌باشند همچنین بر اساس ماتریس تشابه جمعیت‌های مورد بررسی را ارزیابی کردند که نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد توده‌ها را در چهار گروه تقسیم کردند که بر اساس تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی



1. Amiryousefi A, Hyvonen J and Poczai P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences* 2018; 6 (6): e1159.
2. Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD and Sorrells ME. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 1993; 36: 181 - 186.
3. Antonio AFG, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO and Souza CL. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, SSR marker for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Gen. Mol. Bio.* 2004; 27: 579 - 88.
4. Bhattacharyya P, Kumaria S, Kumar S and Tandon P. Start codon targeted (SCoT) Marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl. An endangered medicinal Orchid species. *Geneme* 2013; 529: 21–26.
5. Bhawna AMZ, Arya L and Verma M. Use of SCoT markers to assess the gene flow and population structure among two different populations of bottle gourd. *Plant Gene.* 2017; 9: 80–86.
6. Collard BCY and Mackill DJ. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, Novel DNA marker technique for generating gene targeted markers in plants. *Plant Mol. Biol.* 2009; 27: 86–93.
7. Doyle JJ and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987; 19: 11-15.
8. Evanno G, Regnaut S and Goudet J. Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study. *Mol. Ecol.* 2005; 14: 2611-2620.
9. Farsi M and Zolali J. Principle of Plant biotechnology. Ferdosi Mashhad University Press 2004, pp: 495.
10. Fiehn O. Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002; 48: 155 - 171.
11. Goldblatt P. Biosystematic studies in *Papaver* section *Oxytona*. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 1974; 61: 264 - 296.
12. Gorji AM, Poczai P, Polgar Z and Taller J. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American J. Potato Res.* 2011; 88: 226-237.
13. Grime J, Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *J. Ecol.* 2002; 86: 902-910.
14. Hagel JM, MacLeod BP and Facchini PJ. Opium poppy. *Biotechnol. Agric. Forest.* 2007; 61: 169–187.
15. Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R and Dhawan AK. Microsatellite markers: an Overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* 2011; 177: 309–334.
16. Krenn L, Glantschnig S and Sorger U. Determination of the five major opium alkaloids by reversed phase high-performance liquid chromatography on a base-deactivated stationary phase. *Chromatographia* 1998; 47: 21-24.
17. Kyslikova E, Babiak P, Stepanek V, Zahradnik J, Palyzova A, Maresova H, Valesova R, Hajicek J and Kyslik P. Biotransformation of codeine to 14-OHcodeine derivatives by *Rhizobium radiobacter* R.89-1. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2013; 87: 1-5.
18. Milo J, Levy A and Palevitch D. The cultivation and breeding of *P. bracteatum*. In: J. Bernath (Editor) *Poppy - The Genus Papaver*, Harwood Academic Publisher, Amesterdam. 1998; pp: 279 - 289.
19. Mirzaei K and Mirzaghaderi G. Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. landraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. *Plant Genetic Resources* 2017; 15: 64-71.



20. Mohammadi S and Prasanna B. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 2003; 43: 1235-1248.
21. Nakagawa A, Minami H, Kim JS, Koyanagi T, Katayama T, Sat F and Kumagai H. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nature Communications* 2011; 2: 1-9.
22. Newman DJ and Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 2012; 75: 311-335.
23. Niknam S, Faramarzi MA, Abdi K, Yazdi MT, Amini M and Rastegar H. Bioconversion of codeine to semi-synthetic opiate derivatives by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 26: 119-123.
24. Nyman U. Selection for high thebaine/low morphine content (cpv. Morph: The) in *Papaver somniferum* L. *Hereditas* 1978; 89: 43-50.
25. Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genet.* 2000; 155: 945-959.
26. Rajesh MK, Sabana AA, Rachana KE, Rahman S, Jerard BA and Karun A. Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT analysis. *3Biotech.* 2015; 5: 999-1006.
27. Sharghi N and Lalezari I. *Papaver bracteatum* Lindl. a Highly Rich Source of Thebaine. *Nature.* 1967; 213: 1244.
28. Gurkok T, Kaymak E, Boztepe G, Koyuncu M and Parmaksiz I. Molecular characterization of the genus *Papaver* section *Oxytona* using ISSR markers. *Turk. J. Bot.* 2013; 37: 644-650.
29. Mohseni Z, Bernousi I, Mandoulakani B A and Darvishzadeh R. Genetic Diversity in *Papaver bracteatum* and *Papaver somniferum* Populations Revealed by ISSR Markers. *Bulgarian J. Agricultural Science* 2015; 21: 485-493.

