مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و پنج - زمستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه گزنه (*Nettele*) در بخش مرکزی مازندران با استفاده ازنشانگر مولکولی RAPD

غلامرضا بخشی خانیکی [*۱]، معصومه علی نژاد [۲]، سید کمال کاظمی تبار [۳]، رحمان حمیدی [۴]

۱- گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران - ایران
۲- گروه زیست شناسی علوم گیاهی دانشگاه پیام نور تهران، تهران – ایران
۳ - گروه کشاورزی دانشگاه مازندران، ساری – ایران
۴ - دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف: گزنه با نام علمی*Urtica dioica*به عنوان یکی از گیاهان دارویی جهت درمان بسیاری از بیماری ها به کار می رود. این گیاه در درمان بیماری های گوارشی به کار رفته، هم چنین اثر ضد حساسیتی داشته و کاهنده میزان قند خون و فشار خون می باشد. به دلیل اهمیت مواد موثره گیاهان دارویی در زمینه صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی باعث شده که توجه وتحقیق پیرامون این دسته گیاهان از نقطه نظر کشت، تولید و مصرف آن ها از اهمیت خاصی برخوردار باشد. در این تحقیق نمونه های گیاه از ناحیه مرکزی استان مازندران جمع آوری و مورد ارزیابی در سطح DNA قرار گرفتند.

مواد و روش ها: به منظور بررسی ژنتیکی و به دست آوردن روابط خویشاوندی نمونه های گزنه، DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج گردید. کمیت و کیفیت نمونه های DNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱ ٪ بررسی شد. برای انجام واکنش PCR از ۶ آغازگر RAPD استفاده گردید.

یافته ها: از مجموع ۱۵۵ باند تولید شده در RAPD، ۶۸/۳۸٪ باندها چندشکلی بودند. آنالیز داده ها با برنامه های NTSYS انجام و دندروگرام بر پایه روش UPGMA ترسیم شد.

نتیجه گیری: به طور کلی بررسی تنوع ژنتیکی در گزنه با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که این مارکر در شناسایی نواحی چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی می تواند مفید باشد.

کلمات کلیدی: *Urtica dioica*گزنه، تنوع ژنتیکی، RAPD، PCR

مقدمه

گزنه گیاهی چند ساله که تا حدود یک و نیم متر رشد نموده و دارای برگ های آویزان و کمابیش متمایل به خاکستری است. این گیاه توسط پرزها و تارهای مخروطی شکل پوشانده شده که در صورت لمس کردن ساقه به دست می چسبد و پوست را می گزد هم چنین برگ های این گیاه نیز پوشیده از کرک های گزنده می باشد که تولید خارش و سوزش می کند. ریشه این گیاه، خزنده و در ناحیه ای که سبز می شود کم کم تمام منطقه را فرا می گیرد(۲). ریشه خشک یا عصاره ریشه گزنه برای درمان بزرگ شدگی پروستات نیز کاربرد دارد. برگ ها و ریشه های گزنه در درمان تکمیلی ناراحتی های رماتیسمی مورد استفاده قرار می گیرند وگاهی اوقات نیز برای درمان التهاب مجاری ادراری و پیشگیری و درمان سنگ کلیه به کار گرفته می شوند. برگ های گزنه سرشار از مواد معدنی و ویتامین ها بوده و به عنوان مکمل غذایی مورد استفاده زیادی دارد (۱). شناخته شده ترین این جنس ها، گزنه ها هستند که جزو گیاهان بومی محسوب می شوند و در اکثر نواحی کره زمین پراکنده اند. *Parietaria officinalis* ، گونه ای است که در مناطق کمابیش مرطوب وجنگلی می روید. *Parietaria judaica*، گیاهی صخره روی است که در شیار صخره ها واغلب در مناطق

نویسنده مسئول :
گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران - ایران
پست الکترونیکی: bakhshi@pnu.ac.ir
تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۰۴/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]

به طور نسبی خشک رشد می کند. منطقه رویش گزنه در ایران در ییلاق های اطراف تهران، شمیرانات، کرج، جنگل های شمال ارسباران ودر دامنه سهند در آذربایجان است. گزنه بیش تر در نواحی مرطوب به طور خصوص مناطق شمالی ایران به حد فراوان می روید. نوع خودروی آن اغلب در اماکن مخروبه، باغ ها، نقاط مرطوب خارج از شهر، نواحی سایه دار و در کنار پرچین ها وجاده ها می روید (۳). خواص فراوان این گیاه باعث شده تا از لحاظ تنوع ژنتیکی و تعیین میزان روابط خویشاوندی مورد بررسی قرار گیرد. RAPD یک روش ملکولی معمول در آنالیز انگشت نگاری DNAبرای ژنوتیپ های مختلف، طبقه بندی ملکولی و موارد دیگر می باشد(۴). هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گیاه گزنه (*Nettele*) در بخش مرکزی مازندران با استفاده ازنشانگر مولکولی RAPD می باشد.

مواد و روش ها

جهت انجام این تحقیق ۹ نمونه از گیاه دارویی گزنه از مناطق مختلف استان مازندران (آمل، بابل، قائم شهر، کیاکلا، جویبار، ساری، نکا، بهشهر و گلوگاه) جمع آوری گردید. جهت به دست آوردن DNA از بافرها و محلول های CTAB استفاده شد. کد و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است.

جدول۱. کد و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (آغازگرهای ۱ تا ۳ باندهای واضح و تکرارپذیر نشان دادند).

ردیف	توالی پرایمر	کد پرایمر
۱	GGCACTGAGG	OPG-02
۲	GAGCCCTCCA	OPG-03
۳	AGCGTGTCTG	OPG-04
٤	GTGCCTAACC	OPG-06
٥	GAACCTGCGG	OPG-07
٦	TCACGTCCAC	OPG-08

استخراج DNA باروش CTAB گیاهان دارویی(۷) با اندکی تغییر به شرح ذیل انجام شد: ابتدا برگ های تازه و جوان نمونه های جمع آوری شده از ۹ منطقه مازندران را به وسیله آب مقطر شستشو داده تا بافت های گیاهی عاری از آلودگی شده و DNA آن ها با میزان خلوص بالاتری به دست آید. پس از خشک کردن برگ ها با کاغذ خشک کن حدود ۴ برگ از هر نمونه را جدا کرده درون هاون چینی به کمک نیتروژن مایع پودر و پس از انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری درسریع ترین زمان در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. به هر نمونه ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه در بن ماری قرار داده شد. در طی این مدت هر ده دقیقه یک بار، لوله ها به حالت افقی به آرامی تکان داده شدند. به هر نمونه ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم وایزوآمیل الکل به ترتیب به نسبت (۲۴:۱) اضافه کرده و به آهستگی بدون استفاده از ورتکس تا ۳۰ دقیقه به صورت افقی بالا و پایین کرده (invert) و سپس با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بخش شفاف و بالایی حاوی DNA به میکروتیوپ جدید منتقل شد. دوباره مقدار برابر حجم، کلروفورم و الکل ایزوآمیل به نسبت (۲۴:۱) اضافه شد و با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش شفاف بالایی حاوی DNA به میکروتیوپ جدید منتقل شد. به محلول حاوی DNA یک دوم حجم کلرید سدیم ۵ مولار اضافه شد و به آرامی به حالت افقی تکان داده شد. سپس دوسوم حجم ایزوپروپانول ۲۰- درجه سانتی گراد اضافه شد. میکروتیوپ را به آرامی به صورت افقی بالا و پایین کرده تا کلاف DNA تشکیل شود پس از آن میکروتیوپ به مدت نیم ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA رسوب خوبی بدهد. در مرحله بعد سانتریفیوژ محلول در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جهت رسوب DNA صورت گرفت. سپس خارج کردن محلول رویی و شستشوی رسوب DNA با اتانول ۷۰٪ به اندازه ۲ میلی لیتر در دو مرحله. قرار دادن تیوپ ها به صورت در باز در دمای اتاق تا اتانول به طور کامل تبخیر شود و رسوب DNA خشک گردد. پس از تبخیر کامل اتانول، ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به DNA اضافه شد. نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای انجام واکنش ابتدا محلول اصلی واکنش را با هم مخلوط کرده (ایجاد مخزن مخلوط) سپس ۲ میکرولیتر از DNA را داخل تیوپ ریخته و بعد ۲۳ میکرولیتر از محلول اصلی را به تیوپ حاوی DNA اضافه گردید. برای تکثیر از دستگاه ترمو سایکلر با این شرایط استفاده شد: ۱- دناتوره شدن اولیه (۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد)، ۲- دناتوره شدن بعدی (۱دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد)، ۳- اتصال (۱ دقیقه، ۳۲ درجه سانتی گراد)، ۴- سنتز (۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد)، ۵- سنتز نهایی (۸ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد). از مرحله ۲ تا ۴، ۳۵ سیکل تکرار شد. برای مشاهده محصولات PCR نمونه ها روی ژل آگارز ۱/۵٪ و در بافر TBE ×۱ تحت ولتاژ ۹۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای عکس برداری از ژل، از دستگاه ترانس مدل IIO۸ایلومیناتور استفاده گردید. نمونه های مختلف بر اساس باندهای پدیدار شده روی ژل آگارز با منظور نمودن یک برای حضور باند و صفر برای غیاب باند مشابه

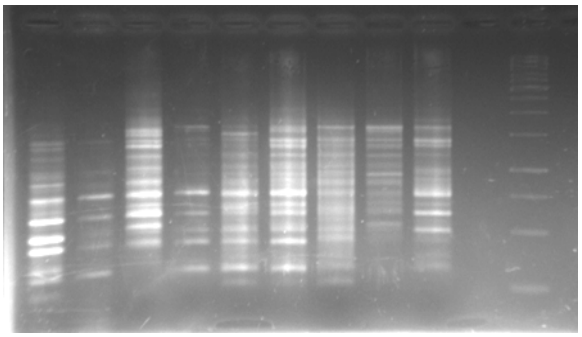
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]

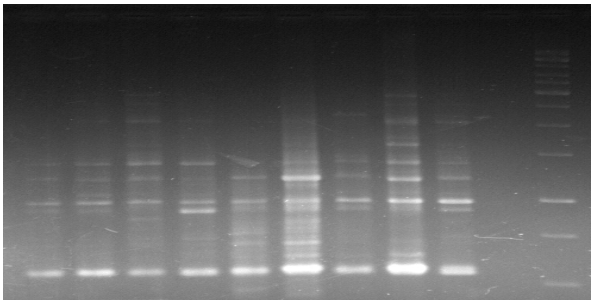
مقایسه شدند. در برنامه Microsoft Excel ماتریس صفرو یک تهیه و برای انجام محاسبه های بعدی انتخاب شدند. برای تجزیه و تحلیل داده های RAPDاز نرم افزار NTSYS (v.۲/۰۲)(۱۰) استفاده شد. ماتریس ایجاد شده توسط برنامه Excel به نرم افزار NTSYS جهت محاسبه شباهت ژنتیکی انتقال داده شد. ماتریس تشابه در کلاستربندی SAHN با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله UPGMA برای ایجاد یک دندرو گرام وارد شد.

نتایج

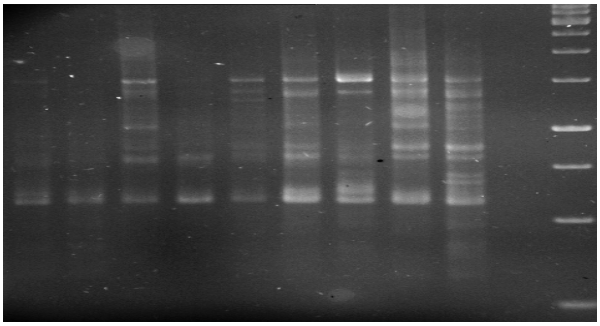
با استفاده از ۶ آغازگر RAPD تکثیر قطعات DNA ژنومی گزنه در PCR مورد ارزیابی قرارگرفت که تنها ۳ آغازگر باندهای واضح و تکرارپذیر را نشان دادند. با انجام واکنش PCR، تعداد ۱۵۵ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی در نمونه ها به دست آمد که ۱۰۶ باند معادل ۶۸ ٪ باندها چند شکل بودند. بیش ترین چندشکلی را پرایمر OPG-۰۳ (۶۱/۸۴%) و کم ترین چندشکلی را پرایمرOPG-۰۲ از خود بروز داد (شکل های ۲ و ۱). هم چنین پرایمرOPG-۰۴ نیز با اختلاف کمی نسبت به نشانگر OPG-۰۳ دومین مرتبه چندشکلی را به خود اختصاص داد (شکل ۳). پس از انتقال داده ها و ساخت ماتریکس فاصله ژنتیکی، ماتریس تشابه رسم و در نهایت دندروگرام با استفاده از روش UPGMA به دست آمد (شکل ۴). به منظور اندازه گیری و تعیین فواصل ژنتیکی، دوری یا نزدیکی، خویشاوندی یا عدم خویشاوندی نمونه های گیاهی موجود در یک کلکسیون از روش دسته بندی خوشه ای استفاده می شود. برای این ضرایب هر چه فاصله ژنتیکی بین دو دسته از کلاسترها بیش تر باشد نمونه هایی که در آن دو دسته قرار می گیرند از هم دورترند. دندروگرام ترسیم شده در فاصله ژنتیکی ۴۸ ٪ دو گروه اصلی را بین ۹ نمونه مشخص کرد. در گروه اول شهرهای آمل، بابل و کیاکلا با هم در یک گروه قرار گرفتند که گزنه های شهرهای آمل و بابل با ضریب تشابه ۸۵٪ بیش ترین شباهت را از نظر الگوی باندی دارا می باشند. هم چنین گزنه های شهرهای آمل و بابل نسبت به شهر کیاکلا با ضریب تشابه ۶۱٪ از نظر شباهت در رده بعدی قرار گرفتند. گروه دوم که خود به سه زیرگروه تقسیم شده است شامل نمونه های شهرهای: ۱- جویبار، ۲- ساری، نکا، گلوگاه و ۳- قائمشهر و بهشهر می باشد. گزنه های شهرهای نکا و گلوگاه با ضریب تشابه ۷۰٪ بیش ترین شباهت را با هم از نظر تنوع ژنتیکی دارا می باشند. هم چنین گزنه ساری نسبت به این دو شهر با ضریب تشابه ۶۶٪ در رده بعدی قرار می گیرد. نمونه های قائمشهر و بهشهر دارای شریب تشابه ۶۲٪ بوده و جویبار با ضریب تشابه ۵۳٪ در فاصله بیش تری نسبت به این دو زیرگروه قرار گرفته است. در نهایت گزنه آمل و بابل با بیش ترین شاخص تشابه نسبت به هم با نمونه جویبار دارای بیش ترین فاصله و تنوع ژنتیکی در دندروگرام حاصل می باشند (۴۷ ٪). نمونه گیاهی کلیه شهرها در نقطه ای با ضریب تشابه ۷۱٪ دارای شباهت نسبی یا بیش ترین تنوع می باشند.



شکل ۱. الگوی باندی RAPD به دست آمده با آغازگر OPG-۰۲. M، نشان دهنده مارکر وزنی Ladderمی باشد.



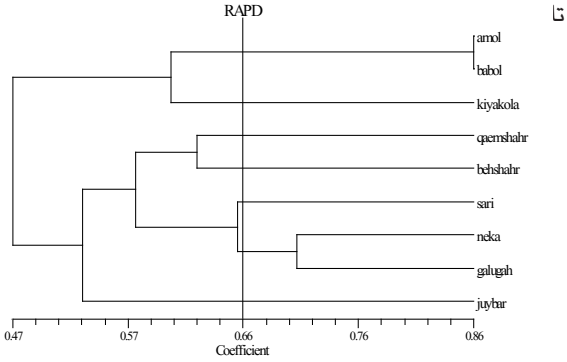
شکل ۲. الگوی باندی RAPD به دست آمده با آغازگر OPG-۰۳. M، نشان دهنده مارکر وزنی Ladder می باشد.



شکل ۳. الگوی باندی RAPD به دست آمده با آغازگر OPG-۰۴. M، نشان دهنده مارکر وزنی Ladder می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]



شکل ۴. دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA برای ۹ نمونه گزنه با استفاده از نشانگر RAPD

بحث

گیاهان دارویی به علت دارا بودن متابولیت های ثانویه مانند پلی فنل ها و پلی ساکاریدها که به شدت با اسیدهای نوکلئیک باند شده، مشکل هایی را در طی استخراج DNA و تکثیر از طریق PCR به همراه دارند به همین دلیل DNA با کیفیتی از آن ها استخراج نمی شود، هم چنین ترکیب های مزبور به طور مستقیم و غیر مستقیم از فعالیت آنزیم سهایی چون پلیمرازها، لیگازها و آنزیم های برشی جلوگیری می کنند (۷). افزودن PVP نیز به حذف تانن ها و سایر پلی فنولیک ها از بافت کمک کرده و رنگ قهوه ای رسوب DNA را از بین می برد. در مطالعه های (۱۱) هم PVP در حذف پلی فنل ها موثر گزارش شده است. حضور CTABبه عنوان دترجنت در بافر استخراج، برای جداکردن پلی ساکاریدها از DNA استفاده می شود. هم چنین NACL موجود در بافر، سبب حذف پلی ساکاریدها و نیز باعث بالا بردن حلالیت آن ها در اتانول می شود که باعث جلوگیری از رسوب مواد همراه با DNA است که در تحقیق های نیز اثبات شده است (۹). نتایج این تحقیق نشان داد که روش استفاده شده برای استخراج DNA (CTAB گیاهان دارویی با اندکی تغییر) در مقایسه با روش های دیگر مانند روش دلاپورتا(۶) ساده، سریع، کم خطر و کم هزینه تر بوده و می تواند برای استخراج DNA از بافت برگی گیاهانی که دارای متابولیت های ثانویه زیادی هستند مورد استفاده قرار گیرد. با این روش، مقدار قابل توجهی DNA با کیفیت و خلوص بالا به دست می آید که نشان می دهد این پروتکل برای استخراج DNA گیاهان دارویی و آروماتیک که حاوی متابولیت های ثانویه پلی ساکاریدها و پلی فنل ها هستند، مفید می باشد. هم چنین نتایج آنالیز RAPD - PCR نشان داد که بیش ترین تعداد باندها را پرایمرهای OPG-۰۲ وOPG-۰۳ دارا بودند که با نتایج دیگران مطابقت دارد (۵). تعداد باندهای تکثیر شده توسط نشانگر RAPD ۱۵۵باند بوده است. که از این تعداد ۱۰۶باند پلی مورف بودند. در نتایج کومار و همکاران(۸)،از کل تعداد باندهای تکثیر شده توسط هر نشانگر، ۳۵ باند توسط نشانگر RAPD پلی مورف بودند. با توجه به دندروگرام به دست آمده، نمونه های آمل و بابل بیش ترین تشابه را نسبت به هم و با شهر جویبار دارای بیش ترین فاصله و تنوع ژنتیکی را دارا می باشند که این نشان دهنده قرابت و نزدیکی این دو گونه (آمل و بابل) و دوری آن ها نسبت به نمونه جویبار از نظر مولکولی می باشد که با توجه به موقعیت جغرافیایی آن ها مطابقت دارد. نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از این مارکرها در شناسایی نواحی چندشکلی و تعیین فاصله ژنتیکی می تواند مفید باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از آقایان مهندس پیمان سلیمانی منفرد به دلیل کمک در روند انجام این پروژه و مهندس شاهواری کارشناس آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری اعلام می دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]

منابع

۱. زرگری ع. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۵، ۹۴۲ صفحه.

۲. صفایی خرم م، جعفرنیا س، خسروشاهی س. مهم ترین گیاهان دارویی جهان (ترجمه). نشر مجتمع آموزش کشاورزی سبز ایران۱۳۸۷.، ۴۴۲ صفحه.

۳. مظفریان و. رده بندی گیاهی. انتشارات امیرکبیر، ۱۳۷۹، ۶۱۰ صفحه.

۴. نقوی م ر، قره یاضی ب، حسینی سالکده ق. ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، ۳۳۴ صفحه.

5. Baharmauria V, Narang N, Verma V, Sharma S. Genetic Variation and polymorphism in the Himalayan *nettle* plant *urtica* based on RAPD marker. Journal of Medicinal Plant Research, 2009, 3(3): 166 – 170.

6. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB.1983. A plant DNA mini-preparation. version II. Plant Mol Biol Reptr, 1983, 1: 19–21.

7. Khanuja SPS, Shasany AK, Dhawan S, Kumar S. Rapid procedure for isolating somaclones of altered genotypes in *Mentha arvensis*. J Med Aroma Plant Sci, 1999, 20: 359–361.

8. Kumar M, Qiang XU, Deng XIU. 2009. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. Jurnal of Scientia Horticulturae. Dio, 2009, 10: 1016-1018.

9. Pirttila AM, Hirsikorpi M, Kamarainen T, Jaakola L, Hohtola A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. Plant molecular Biology Reporter, 2001, 19: 273-280.

10. Rohlf FJ1993. NTSYS-PC Version 2. State University of New York, Exeter Software, Setauket, New York.

11. Sarwat M, Singh Negi M, Lakshmikumaran M, Kumar Tyagi A, Das S, Shankar Srivastava P. A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* L. for genetic diversity analysis. Electronic journal of Biotechnology, 2006, 9: 85-91.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.8.2]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-11]