

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی دم شیر در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

ابوذر سورنی<sup>1\*</sup>، وحیده ناظری<sup>2</sup>، محمد رضا فتاحی مقدم<sup>3</sup>، الهه احدی دولت‌سرا<sup>4</sup>

<sup>1</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

<sup>2</sup>دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

<sup>3</sup>دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

<sup>4</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: 1391/4/4، تاریخ پذیرش: 1391/6/4

چکیده

گیاه دم‌شیر با نام علمی *Leonurus cardiaca* از خانواده Lamiaceae (نعناعیان) و زیر خانواده Lamioideae تنها گونه موجود از جنس *Leonurus* در ایران است. وجود ترکیبات مختلفی چون فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، تری‌ترپن‌ها، تانن‌ها، استرول‌ها، کاروتنوئیدها خواصی چون درمان بیماری‌های قلب و معده و اختلالات عصبی را برای این گیاه به همراه دارد. در این تحقیق نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسما 47 نمونه گیاهی از 6 جمعیت وحشی جمع‌آوری شده گیاه دارویی دم‌شیر در ایران مورد استفاده قرار گرفت. تعداد 60 آغازگر تصادفی در انجام واکنش PCR روی DNA ژنومی استخراج شده از برگ آزمایش شد که 28 آغازگر نوارهای چند شکلی تولید نمودند و در کل 364 نوار DNA بدست آمد که تعداد 325 نوار چند شکل بودند. تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA انجام گرفت. میزان حداقل تشابه ژنتیکی در این تحقیق 0/08 بین نمونه‌های درگز 1 و ساری 5 و حداکثر آن بین نمونه‌های ساری 7 و ساری 3 معادل 0/87 بدست آمد. در تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها در فاصله 20 دو کلاستر اصلی ایجاد شد که یکی از آن‌ها شامل نمونه‌های درگز و کلاستر دیگر شامل نمونه‌های خوانسار، کرمان، سراب، طالقان و ساری بود. بررسی تنوع درون جمعیت‌ها با استفاده از میانگین تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون نشان داد تنوع ژنتیکی در درون جمعیت سراب و طالقان ( $I = 0/15, h = 0/10$ ) نسبت به سایر جمعیت‌ها، بیشترین و در جمعیت ساری ( $I = 0/08, h = 0/05$ ) کم‌ترین بوده است. تلاقی ژنوتیپ‌های جمعیت درگز با دیگر جمعیت‌ها با توجه به فاصله ژنتیکی تعیین شده در این مطالعه می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید هیبریدهایی با عملکردهای مورد نظر باشد.

کلمات کلیدی: گیاه دم‌شیر، *Leonurus cardiaca*، چند شکلی، جریان ژنی، اصلاح

دم شیر گیاهی علفی پایا با ریزومی گسترده به ارتفاع 5,0 تا 5,1 متر با ساقه مستقیم، منشعب، چهارگوش، کم و بیش توخالی با بافت نسبتاً چوبی شده و 20 تا 25 چرخه گل در هر ساقه است.

دم شیر (*Leonurus cardiaca*) از خانواده Lamiaceae (نعنائیان) و زیر خانواده Lamioideae تنها گونه موجود از جنس *Leonurus* در ایران است (Mozafarian, 1996).



شکل 1- نمایی کلی از گیاه دارویی دم شیر.

Figure 1-An overview of the vegetative organs of medicinal plants *Leonurus cardiaca*.

دهد که برگ‌ها بالاترین میزان فلاونوئیدها و پلی-فنل کربوکسیلیک اسید را دارا هستند و گل‌ها در رده بعدی قرار دارند. ساقه‌ها پایین‌ترین میزان مواد فوق را دارا هستند (Popescu, 2009).

با توجه به نیاز برای تامین داروهای گیاهی با کیفیت مناسب و قابل اعتماد، روش‌هایی اصلاحی برای کشت تجاری و فرآیندهای پس از برداشت در دست بررسی است. Heuberger و همکاران (2010) برنامه‌هایی برای روش‌هایی اصلاحی، کشت تجاری و فرآیندهای پس از برداشت در شرایط جنوب آلمان برای انتخاب گونه‌های گیاهی جنس *Leonurus* مورد استفاده در چین از سال 1999 توسعه دادند. نتایج حاصل از آزمایشات مزرعه‌ای، روش‌های اصلاحی،

گل‌ها پوشیده از کرک‌های تک سلولی با کوتیکول نازک به رنگ گلی با خال‌های ارغوانی که به شکل مجتمع (8 تا 11 گل) در زاویه برگ‌های قسمت فوقانی ساقه قرار دارند (Zargari, 1990; Omidbeigi, 2010; Popescu, 2009; Ali & Nasir, 1990).

مواد موثره شناسایی شده از عصاره اندام‌های هوایی (برگ‌ها، گل‌ها و ساقه) گیاه دم شیر شامل فلاونوئیدها (آگلیکن‌ها و گلیکوزیدها)، پلی‌فنل کربوکسیلیک اسید، ایریدوئیدها، تری-ترپن‌ها (آگلیکن‌ها و گلیکوزیدها)، تانن‌ها، استرول‌ها، کاروتنوئیدها، مونوساکاریدها، پلی-ساکاریدها (موسیلاژها) و ترکیبات نیتروژن‌دار غیر از آلکالوئیدها می‌باشد. مطالعات نشان می‌-

2008). نشانگرهایی مانند AFLP و SSR به طور وسیعی برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان به کار می‌روند. نشانگر RAPD نیز روشی مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی است (Williams et al., 1990). زیرا قادر است با استفاده از مقادیر اندک DNA اختلاف موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی نموده در عین حال نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم مورد مطالعه ندارد. مطالعات نشان داده است که بخش زیادی از نوارهای RAPD در صورتی که در آزمایشات با رعایت دقت لازم تکرار شود دارای تکرارپذیری بالا و نتایج قابل اعتمادی خواهد بود (Chalmers et al., 1994). از این تکنیک نیز به طور گسترده برای بررسی تنوع در انواع گیاهان دارویی استفاده شده است.

در پژوهشی Chen et al (2009) از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی تنوع در 19 ژنوتیپ *Leonurus japonicus* یکی دیگر از گونه مهم جنس *Leonurus* استفاده کردند که در نتیجه تولید 164 نوار، 117 قطعه چند شکلی نشان دادند. YU Qi et al (2009) با استفاده از نشانگر AFLP تنوع 16 ژنوتیپ *Leonurus japonicus* را مورد بررسی قرار دادند. از 182 نوار تولیدی 144 نوار چند شکلی نشان دادند. Momeni deghi et al (2001) بررسی روابط ژنتیکی در 17 نژاد بومی جنس نعناع (*Menta*) را با استفاده از نشانگرهای RAPD در ایران با استفاده از 17 آغازگر 10 نوکلئوتیدی انجام دادند

خصوصیات گیاهی و شیمیایی مواد آزمایشی، مقایسه تجربی (آزمایشی) و وارداتی مواد گیاهی با توجه به کیفیت دارویی آن‌ها، انتقال روش‌های تولید و مواد گیاهی به کشاورزان متخصص، کاربرد دارویی و در نهایت اطلاع رسانی برای کاربران در زنجیره تولید در مورد مزایای تولید محلی مواد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. Heuberger . و همکاران (2010) از روش انتخاب همسانه برای اصلاح گونه‌های *Leonurus* استفاده کردند.

اهلی کردن یک گیاه دارویی فرآیندی طولانی است ولی اگر کار از یک ژنوتیپ مناسب آغاز شود فرآیند کوتاه‌تر خواهد شد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای تعیین ارقام و توده‌های مناسب اهلی سازی استفاده از صفات موفولوژیک است اما نتایج آن کاملاً دقیق نیست چون این خصوصیات به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار دارند. شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان به طور گسترده‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود. این تکنیک‌ها تنوع ژنتیکی را به طور مستقیم در سطح مولکول DNA بررسی می‌کنند و همچنین مشکلات تأثیر-پذیری از محیط را ندارند. با بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان میزان تفاوت و تشابه بین گیاهان را مورد بررسی قرار داد. همچنین با استفاده از نشانگرهای مولکولی امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های مسئول در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی وجود دارد (Kumar & Kumar Gupta, )

در کشور ایران به دلیل عدم شناخت ذخایر ژنتیکی و ژن‌های مطلوب، برنامه‌های اصلاحی درخت‌های توجیهی روی گیاهان دارویی صورت نگرفته است؛ لذا می‌توان با شناسایی گونه‌های مختلف و ارزیابی آن‌ها، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققین را در دسترس آن‌ها قرار داد. از جمله این گیاهان گیاه دم‌شیر است که تا کنون هیچ گونه مطالعه مولکولی در محدوده پراکنش جهانی آن جهت بررسی ژرم‌پلاسم با هدف مطالعه روابط ژنتیکی برای اصلاح، اهلی سازی و تولید ارقام متناسب با نیاز صنایع وابسته صورت نگرفته است. در این راستا تحقیق حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین برخی از جمعیت‌های دم-شیر در ایران با استفاده از نشانگر RAPD پرداخته است تا تنوع ژنتیکی موجود را بررسی و روابط بین آن‌ها را گزارش نماید.

#### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش شامل 47 نمونه گیاهی از 6 جمعیت جمع‌آوری شده از 6 استان مختلف ایران بود. نام، علامت اختصاری و محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در جدول شماره 1 ارائه شده است.

که از این 17 آغازگر 25 آغازگر چند شکلی بالایی نشان دادند.

در پژوهشی (2001) Pejman mehr et al تنوع ژنتیکی در بین و درون شش توده مختلف زیره پارسی (*Bunium persicum*) در ایران را با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که توده‌های مورد بررسی کاملاً از هم متمایز بوده و تکامل مستقل دارند.

Sing et al (2004) روابط ژنتیکی 30 توده متعلق به 5 گونه ریحان را با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که نشانگرهای RAPD تکنیکی مناسب، دقیق و موثر در تجزیه ژنتیکی جنس ریحان می‌باشد. (2007) Hadian et al تنوع ژنتیکی 28 توده ایرانی مرزه تابستانه (*Saturea hortensis*) را با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. از 16 آغازگر مورد استفاده در این تحقیق 218 نوار چند شکل تولید گردید که 181 نوار بین تمام توده‌ها چندشکل بود. ماتریس تشابه و نتایج حاصل از دندروگرام تولید شده از داده‌های RAPD نشان داد که این نشانگرها در تعیین روابط بین توده‌های بومی مرزه تابستانه در ایران از دقت خوبی برخوردار است.

جدول 1- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه جمعیت‌های دم‌شیر.

Table 1- Accessions of *Leonurus cardiaca*, used in this study, their species, origin and collection areas.

عرض جغرافیایی Latitude (N)	طول جغرافیایی Longitude (E)	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)	محل جمع‌آوری Location	استان Province	ردیف Population .no
N 29°18'36.71"	E 56°50'31.49"	2600	مادون Madun	کرمان Kerman	1
N 37°34'42.91"	E 58°42'1.47"	2194	درگز Dargaz	خراسان شمالی South Khorasan	2
N 36°10'27.80"	E 50°45'34.51"	1850	طالقان Taleghan	البرز Alborz	3
N 33°15'50.63"	E 50°17'57.65"	2210	خوانسار Khansar	اصفهان Isfahan	4
N 37°55'59.28"	E 47°31'40.24"	1687	سراب Sarab	اردبیل Ardabil	5
N 36°3'37.78"	E 53°12'3.58"	2170	ساری Sari	مازندران Mazandaran	6

یکسان از DNA نمونه‌ها (10 نانوگرم در میکرو لیتر) آماده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, I Cycler, USA) انجام شد. برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از 60 آغازگر تصادفی استفاده شد که در میان آن-ها 28 آغازگر نوارهای چند شکلی تولید نمودند. از این 28 آغازگر به عنوان آغازگرهای مناسب برای بررسی تنوع گیاه دم شیر استفاده شد. هر مخلوط واکنش PCR شامل 3 میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت 10 نانوگرم در میکرولیتر، 5,2 میکرو لیتر از آغازگر با غلظت 10 پیکو مول و

در فصل بهار، نمونه‌های برگ‌ها از رشد فصل بهار گیاهان جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از چند بار شستشو با آب مقطر و خشک کردن آب روی برگ‌ها، با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای 80- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد.

استخراج DNA از 8 تک بوته هر جمعیت با استفاده از روش تغییر یافته Pirttila et al. (2001) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز 1% تعیین شد و به کمک آن‌ها غلظت

ژل داک)، تحت نور اشعه فرابنفش نوارهای تکثیر یافته DNA مشاهده و عکس برداری شدند.

### تجزیه داده‌ها و آنالیز آماری

پس از انجام مراحل آزمایشگاهی، برای بررسی مراحل چند شکلی بین نمونه‌ها به حضور یک نوار خاص عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc (Ver 2.02) و استفاده از ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA محاسبه گردید. تجزیه پلات به صورت سه بعدی صورت گرفت. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار Bootstrap ترسیم شد. الگوی نواری داده‌های مولکولی برای تمام جمعیت‌ها و آنالیز تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx (Ver 6.41) محاسبه شد. ماتریس فاصله جمعیت‌ها به روش نی ( Nei's, 1972) و با استفاده از نرم افزار PopGene, Ver 1.31 صورت گرفت. تنوع ژنتیکی برای همه مکان‌های آلی با کمک آنالیز نی محاسبه شد (Nei's, 1972). قدرت تفکیک آغازگرها (Rp) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (جدول 2).

$$Rp = \sum I_b$$

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

### نتایج و بحث

در بررسی اولیه برای انتخاب آغازگر مناسب که تولید چند شکلی بیشتری بنماید، 60 آغازگر تصادفی RAPD مورد استفاده قرار گرفت

7/5 میکرولیتر کیت PCR با غلظت 2X بود که در نهایت با اضافه کردن 3 میکرو لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل حجم مخلوط واکنش PCR به 16 میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌های حرارتی شامل 94°C برای واسرشت سازی اولیه به مدت 4 دقیقه، تعداد 5 چرخه به صورت 92°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال 37°C به مدت یک دقیقه و 72°C به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات در چرخه دوم با 0/7 درجه کاهش دما در هر چرخه جهت اتصال بهتر آغازگر به DNA و تعداد 35 چرخه به صورت 92°C به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال 37°C به مدت 45 ثانیه و 72°C به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه 72°C به مدت 5 دقیقه برای تکمیل بسط انجام شد.

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصول واکنش در چاهک‌های ژل آگارز 1/2 درصد تهیه شده در بافر TBE بارگزاری و به مدت 120 دقیقه و شدت 75 ولت الکتروفورز شد. بدین صورت که برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه یک کیلو بیس پیر (1kb) مربوط به شرکت فرمنتاز (Fermentas) در چاهک اول استفاده شد و در بقیه چاهک‌ها DNA حاصل از PCR مربوط به نمونه‌های هر جمعیت بارگزاری شد. پس از الکتروفورز به منظور رنگ‌آمیزی، ژل به مدت 20 دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید 5,0 میکروگرم در میلی-لیتر قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه مخصوص عکس برداری از ژل (دستگاه

درگز با بیشترین تعداد نوار تولیدی توسط آغازگرها مورد پوشش قرار گرفته است. وجود تعداد بالای نوارهای اختصاصی این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها نشان از تفاوت این جمعیت با سایر جمعیت‌ها است که با اطلاعات تاکسونومی مطابقت دارد. جدایی جمعیت‌های کرمان و سراب با تعداد نوار اختصاصی بیشتر نسبت به سایر جمعیت‌ها حاکی از فاصله ژنتیکی بیشتر این جمعیت با دیگر جمعیت‌هاست.

استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند در جهت شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها در میان جمعیت‌های مورد بررسی بسیار موثر باشد. میزان حداقل تشابه ژنتیکی در این تحقیق 0/08 بین نمونه‌های درگز 1 و ساری 5 و حداکثر آن بین نمونه‌های ساری 7 و ساری 3 معادل 0/87 بدست آمد. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار Bootstrap تنوع ژنتیکی بالای بین جمعیت‌ها و یکنواختی و شباهت بین ژنوتیپ‌های درون جمعیت‌های مورد بررسی را تایید می‌کند (شکل 3). به طوری که در مقدار پایداری 100، ژنوتیپ‌ها را در 2 گروه اصلی جای داد. جدایی ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت درگز از استان کرمان در سطح پایداری 100 و تفکیک این جمعیت از جمعیت‌های دیگر با تفاوت فاحش را می‌توان به طور قطع به دلیل جدایی در زیرگونه (*subsp. turkestanicus*) و اختلافات اساسی در شرایط آب و هوایی، توپوگرافی و خاک منطقه دانست.

که از این تعداد 28 آغازگر چند شکلی قابل توجهی در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان دادند. بر اساس نتایج از کاربرد 28 آغازگر انتخابی در کل 364 نوار DNA بدست آمد که از این تعداد 325 نوار (89%) چند شکلی نشان داده و تنها 32 نوار (11%) یک شکل بودند. میانگین تعداد نوارها برای هر آغازگر 13 محاسبه شد. میانگین چندشکلی بدست آمده (89%) در الگوی نواری نسبتاً بالا بود که بیانگر مناسب بودن تکنیک RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های دم شیر ایران است. تعداد نوارهای چند شکل حاصل از آغازگرهای RAPD در بین جمعیت‌ها از 5 تا 21 نوار متغیر بود که بیانگر قدرت متفاوت آغازگرها در شناسایی چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی است. در بین آغازگرها بیشترین نوار تکثیر شده توسط آغازگر 02 TIBMBC- با 22 نوار تکثیر شده ایجاد شد که 21 عدد آن‌ها چند شکل بودند؛ و کم‌ترین نوار تکثیر شده مربوط به آغازگر TIBMBC-12 با 6 نوار تکثیر یافته بود که 5 عدد از آن‌ها چند شکل بودند (جدول 2). اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده 300-1500 جفت باز تخمین زده شد. میزان شباهت یا تفاوت بین جمعیت‌ها توسط ماتریس فاصله و همچنین دندروگرام حاصل از آن‌ها تعیین شد.

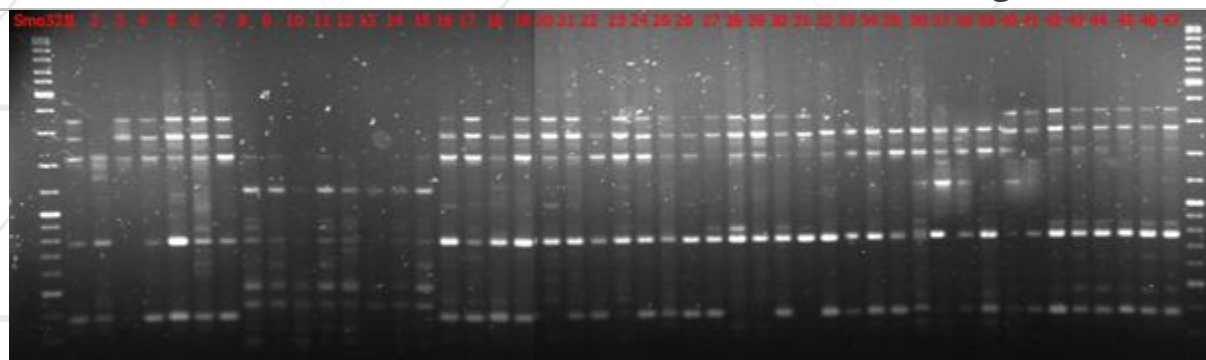
#### الگوی نواری جمعیت‌ها

الگوی نواری داده‌های مولکولی برای تمام جمعیت‌ها به شرح جدول شماره 3 محاسبه شد. نتایج نشان داد بخش بیشتری از ژنوم جمعیت

جدول 2- نوع، توالی و درصد چند شکلی آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز RAPD جمعیت‌های طبیعی دم‌شیر.

Table 2- Type, frequency and percentage of polymorphic primers used in the RAPD analysis of natural populations of *Leonurus cardiaca*.

قدرت تفکیک	درصد چند شکلی	تعداد قطعات چند شکل	تعداد کل قطعات تکثیر شده	توالی آغازگر Sequence	آغازگر Primer	ردیف No
RP value	% Polymorphic bands	Polymorphic bands	Total bands			
7.0	94%	16	17	5'TGCTCGGCTC3'	TIBMBA-02	1
3.4	83%	10	12	5'GTGCGAGAAC3'	TIBMBA-03	2
4.2	84%	11	13	5'GGACGACCGT3'	TIBMBA-06	3
6.8	88%	15	17	5'CCACAGCCGA3'	TIBMBA-08	4
3.8	76%	10	13	5'GGAAGTCCAC3'	TIBMBA-09	5
5.7	83%	10	12	5'GGACGTTGAG3'	TIBMBA-10	6
2.3	81%	9	11	5'TCGGGAGTGG3'	TIBMBA-14	7
2.8	88%	8	9	5'GAAGACCTGG3'	TIBMBA-15	8
7.9	100%	19	19	5'GAGCGCTACC3'	TIBMBA-20	9
5.0	84%	16	19	5'TCACGTGGCT3'	TIBMBA-03	10
4.6	90%	9	10	5'ACCAGGTCAC3'	TIBMBA-04	11
4.5	92%	12	13	5'GGGCCGAACA3'	TIBMBA-05	12
7.4	95%	21	22	5'ACAGTAGCGG3'	TIBMBA-02	13
6.6	94%	17	18	5'GGCTTGACCT3'	TIBMBA-03	14
2.4	85%	6	7	5'AACGTCGAGG3'	TIBMBA-10	15
2.6	100%	8	8	5'TTTTGCCCCC3'	TIBMBA-11	16
2.3	83%	5	6	5'CCTCCACCAG3'	TIBMBA-12	17
3.9	100%	11	11	5'CCGTTAGTCC3'	TIBMBA-17	18
4.5	71%	10	14	5'AGCACTGGGG3'	TIBMBA-20	19
6.6	100%	14	14	5'GAGCCCCGAA3'	TIBMBA-03	20
3.9	70%	7	10	5'GTGCGGAGAG3'	TIBMBA-05	21
1.2	85%	6	7	5'GGGAACCGTC3'	TIBMBA-12	22
4.2	91%	11	12	5'ACGCCTGTAG3'	TIBMBA-02	23
3.3	90%	10	11	5'TGGACTCGGT3'	TIBMBA-03	24
7.0	100%	20	20	5'CCCAAGGGAA3'	TIBMBA-04	25
5.6	90%	9	10	5'GGGAAAAGCC3'	TIBMBA-17	26
6.5	94%	17	18	5'CTGGTGCTCA3'	TIBMBA-19	27
3.4	100%	9	9	5'CAAAGGCGTG3'	TIBMBA-20	28
-	89%	11.6	13		میانگین	
-	-	325	364		جمع کل	



شکل 2- الگوی نواری حاصل از قطعات تکثیر 6 جمعیت گیاه دم‌شیر (7-1 جمعیت کرمان، 8-15 جمعیت درگز، 16-23 جمعیت طالقان، 24-31 جمعیت خوانسار، 32-39 جمعیت سراب و 40-47 جمعیت ساری)

Figure 2- Banding pattern of amplified fragments of sex populations *Leonurus cardiaca*.



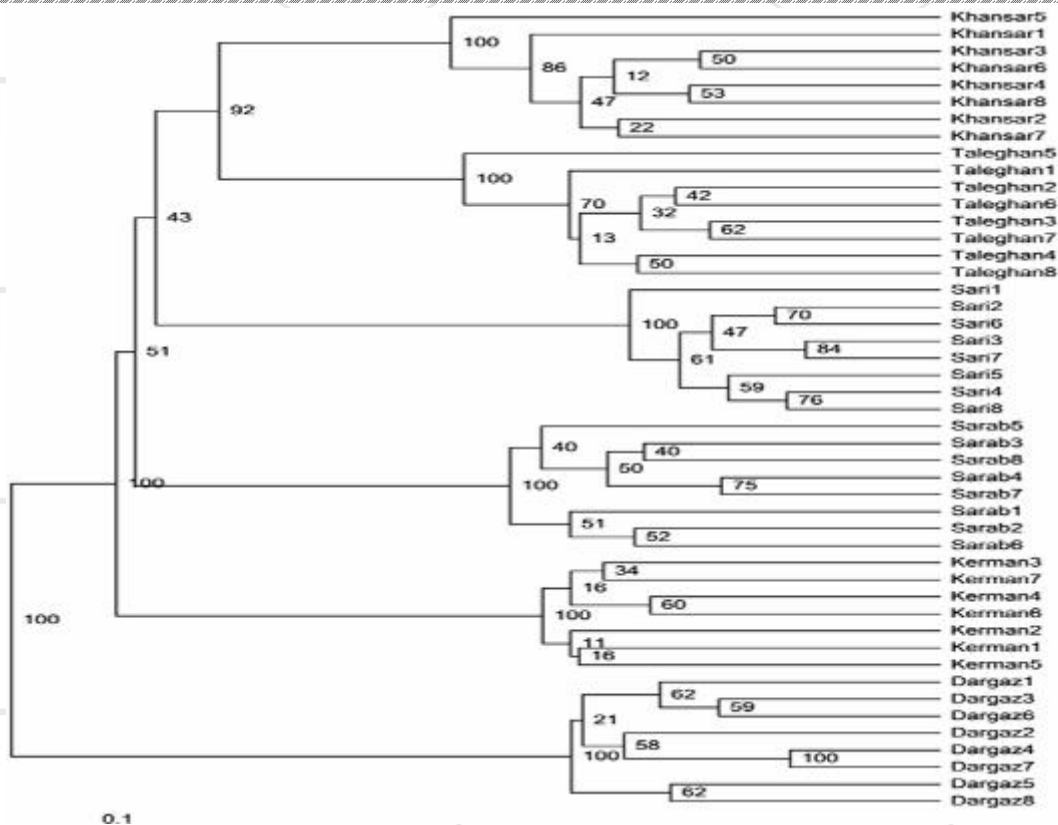
جدول 3- الگوی نواری داده‌های مولکولی برای جمعیت‌های دم‌شیر

Banding patterns, molecular data for populations *Leonurus cardiaca*

ردیف	جمعیت‌ها	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری
No	Population	Kerman	Dargaz	Taleghan	Khansar	Sarab	Sari
1	تعداد نوارها	10	136	128	111	124	102
2	تعداد نوارها با فراوانی $\leq 5\%$	110	136	128	111	124	102
3	No. Bands Freq. $\geq 5\%$ تعداد نوارهای اختصاصی	23	55	19	15	26	14
4	No. Private Bands تعداد نوارهای مشترک محلی با فراوانی $\leq 5\%$ در $\geq 25\%$ جمعیت‌ها	0	0	0	0	0	0
5	No. LComm Bands ( $\leq 25\%$ ) تعداد نوارهای مشترک محلی با فراوانی $\leq 5\%$ در $\geq 50\%$ جمعیت‌ها	35	44	49	40	46	43
6	No. LComm Bands ( $\leq 50\%$ ) میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار Mean He ( $2^*p^*q$ )	0.075	0.097	0.099	0.077	0.105	0.055
7	میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار غیر مرتبط $(2N.(2N-1))*He$ SE of Mean UHe	0.081	0.103	0.105	0.082	0.112	0.058

شبهه بود چرا که نمونه‌ها فقط در باغات و در پای درختان رشد می‌کردند ولی شرایط آب و هوایی منطقه ساری متفاوت از مناطق سراب و کرمان بود ولی تأثیر اقلیم به اندازه‌ای نبوده که بتواند بین جمعیت‌های یک زیرگونه اختلاف فاحشی از نظر ژنتیکی ایجاد کند. اما اقلیم منطقه طالقان، دسترسی به آب و نور و خاک مناسب در باغات توانسته این جمعیت را به جمعیت‌های سراب و خوانسار نزدیک کند.

اختلافات اساسی در صفات مورفولوژیکی این زیرگونه از قبیل ارتفاع ساقه، تعداد ساقه اصلی و فرعی و تراکم بوته‌ها به طور واضح در زمان نمونه برداری مشخص بود. جدایی ژنوتیپ-های جمعیت کرمان از ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های خوانسار، ساری و سراب در سطح پایداری 100 را با توجه به آنکه به یک زیرگونه تعلق دارند می‌توان به تفاوت فاحش در شرایط اقلیمی منطقه رابر کرمان با سه منطقه دیگر نسبت داد. اقلیم منطقه خوانسار و طالقان بسیار به هم



0.1

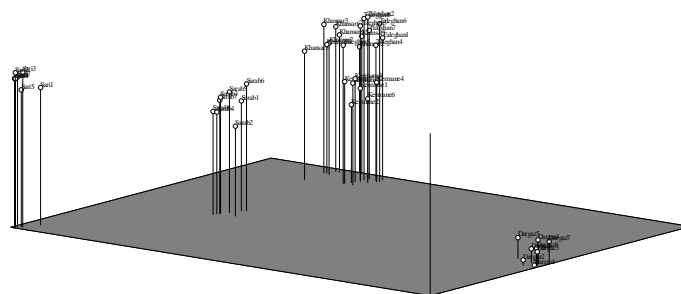
شکل 3- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های شش جمعیت دم‌شیر مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه.

Figure 3- Dendrogram of RAPD analysis on 47 accessions of *Leonurus cardiaca* based on Jaccard similarity coefficient.

ژنوتیپ‌ها و قرابت آن‌ها را نشان دهد. در این آزمون نیز جمعیت درگز به خوبی از جمعیت‌های دیگر جدا شد. جدایی ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت کرمان و نزدیکی ژنوتیپ‌های خوانسار و طالقان به وضوح قابل مشاهده است.

#### آزمون تجزیه پلات

در این تحقیق آزمون تری پلات برای بررسی فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از دو و سه عامل اصلی انجام شد که نتایج آن در شکل شماره 4 نشان داده شده است. این آزمون همانند تجزیه کلاستر بخوبی می‌تواند جدا شدن



شکل 4- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های شش جمعیت گیاه دم‌شیر مورد مطالعه توسط تجزیه پلات سه بعدی.

Figure 4- Grouping of RAPD analysis on 47 accessions of *Leonurus cardiac* based on a analysis of three-dimensional plot.

آنالیز منطقه‌ای نمونه‌ها

برای هر یک از مکان‌های آلی توسط نرم‌افزار Popgene محاسبه شد که میانگین هر یک از آن‌ها در زیر آمده است. به طور کلی مقادیر بالای 0/25 نشان دهنده تفاوت زیاد بین مناطق یا جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. این مسئله نشان می‌دهد که به دلیل دگرگشتی بین ژنوتیپ‌ها، نزدیکی بیشتری بین گیاهان دم‌شیر یک منطقه با گیاهان بین جمعیت‌ها دیده می‌شود. بر این اساس می‌توان از ژنوتیپ‌های مناطق مختلف که دارای صفات مطلوبی هستند و از نظر ژنتیکی دور از هم هستند برای دورگ‌گیری استفاده کرد.

در این ارزیابی شاخص تنوع ژنتیکی نی (Nei's, 1972) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) برای هر یک از جمعیت‌ها (جدول شماره 4) و تعداد آل‌های مشاهده شده، تعداد آل‌های موثر برای هر آغازگر (جدول شماره 5) محاسبه شد. بر اساس ارزیابی انجام شده قدرت هر آغازگر در تولید نوارهای چند شکل برای هر جمعیت مشخص شد. همچنین تنوع کل (Ht)، تنوع درون جمعیت‌ها (Hs)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst)، تخمین جریان ژنی از Gst یا G<sub>st</sub> (Nm)

جدول 4- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی گیاه دم‌شیر.

Table 4- Parameters of genetic diversity in populations *Leonurus cardiaca*.

PPB(%)	I*	h*	تعداد افراد No sampel	جمعیت‌های مورد بررسی Population
22.15%	0.11	0.08	7	کرمان Kerman
25.23%	0.14	0.10	8	درگز Dargaz
26.15%	0.15	0.10	8	طالقان Taleghan
24.00%	0.12	0.08	8	خوانسار Khansar
27.08%	0.15	0.10	8	سراب Sarab
14.77%	0.08	0.05	8	ساری Sari

\* h شاخص تنوع ژنتیکی نی، I: شاخص اطلاعاتی شانون، PPB(%): درصد نوارهای چند شکل

آغازگر در تولید نوار چندشکل در بین جمعیت- هاست، که به نحوی می‌توان آن را به تولید تعداد نوارهای اختصاصی برای آن جمعیت ربط داد، به گونه‌ای که تعداد آغازگر بیشتری در جمعیت درگز (9 آغازگر) نسبت به سایر جمعیت‌ها بیشترین تعداد آلل مشاهده شده را دارا بودند.

#### تجزیه خوشه‌ای مناطق

تجزیه خوشه‌ای مناطق تطابق کامل با دندروگرام حاصل از تفکیک ژنوتیپ‌ها را تایید می‌کند. بررسی ماتریس تشابه در این مطالعه بیشترین همسانی را در بین توده‌های خوانسار و طالقان و کم‌ترین همسانی را در بین توده‌های درگز و ساری نشان داد که به ترتیب حاکی از میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این جمعیت‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد (جدول 6). بررسی نتایج در غالب دندروگرام‌ها و نمودارها امکان جمع‌بندی سریع و آسان نتایج را امکان‌پذیر می‌سازد (شکل 2).

بررسی تنوع در درون جمعیت‌های دم‌شیر به کمک میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت سراب و طالقان ( $I = 0/15, h = 0/10$ ) نسبت به سایر جمعیت‌ها، بیشترین و در جمعیت ساری ( $I = 0/08, h = 0/05$ ) کم‌ترین بوده است. ضریب تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها ( $Gst$ ،  $Gst = (Ht - Hs) / Ht$ ) به مقدار  $0/72$  (72%) و برآورد جریان ژنی ( $Nm = 0.5 (1 - Gst) / Gst$ )، به طور متوسط تعداد مهاجرت رد و بدل شده در هر نسل در میان جمعیت‌ها برابر  $0/28$  (28%) با فرض تعادل هاردی واینبرگ محاسبه شد. مقدار پایین  $Nm$  نشان از تبادل پایین ژن در بین جمعیت‌های دم‌شیر است که می‌تواند به دلیل فاصله زیاد بین رویشگاه‌های این گیاه باشد. نتایج حاصل از بررسی تعداد آلل موثر و مشاهده شده حاکی از آن است که هر چه مقدار آلل مشاهده شده آغازگر به مقدار 2 (گیاه دم‌شیر  $2n$  است) نزدیک‌تر باشد نشان از قدرت بالای آن

جدول 5- پارامترهای تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر برای هر آغازگر در جمعیت‌های طبیعی گیاه دم‌شیر.

Table 5- Parameters, number of alleles observed and effective for each primer in populations *Leonurus cardiac*.

ne*						na*						
ساری	سراب	خوانسار	طالقان	درگز	کرمان	ساری	سراب	خوانسار	طالقان	درگز	کرمان	
sari	Srab	Khansar	Taleghan	Dargaz	Kerman	Sari	Sarab	Khansar	Taleghan	Dargaz	Kerman	
1.14	1.37	1.21	1.34	1.29	1.11	1.19	1.44	1.25	1.44	1.50	1.13	TIBMBA-02
1.05	1.20	1.10	1.02	1.00	1.17	1.10	1.40	1.10	1.10	1.00	1.20	TIBMBA-03
1.09	1.05	1.07	1.16	1.29	1.00	1.09	1.09	1.18	1.27	1.45	1.00	TIBMBA-06
1.13	1.15	1.29	1.33	1.21	1.03	1.20	1.27	1.53	1.40	1.27	1.13	TIBMBA-08
1.00	1.06	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.11	1.00	1.00	1.00	1.00	TIBMBA-09
1.09	1.00	1.00	1.00	1.09	1.00	1.10	1.00	1.00	1.00	1.10	1.00	TIBMBA-10
1.03	1.00	1.06	1.10	1.12	1.05	1.11	1.00	1.11	1.11	1.22	1.22	TIBMBA-14
1.06	1.46	1.24	1.17	1.00	1.00	1.25	1.63	1.25	1.38	1.00	1.00	TIBMBA-15
1.06	1.20	1.10	1.37	1.22	1.44	1.11	1.26	1.26	1.47	1.32	1.63	TIBMBA-20
1.00	1.20	1.06	1.04	1.09	1.00	1.00	1.31	1.06	1.19	1.13	1.00	TIBMBA-03
1.00	1.34	1.11	1.32	1.09	1.03	1.00	1.44	1.33	1.44	1.22	1.11	TIBMBA-04
1.00	1.04	1.09	1.16	1.02	1.19	1.00	1.17	1.17	1.17	1.08	1.25	TIBMBA-05
1.23	1.20	1.19	1.22	1.14	1.04	1.52	1.38	1.43	1.38	1.24	1.19	TIBMBA-02
1.26	1.21	1.13	1.19	1.00	1.25	1.41	1.29	1.29	1.24	1.00	1.29	TIBMBA-03
1.24	1.36	1.16	1.20	1.29	1.00	1.50	1.50	1.17	1.33	1.33	1.00	TIBMBA-10
1.26	1.10	1.30	1.03	1.31	1.00	1.38	1.25	1.63	1.13	1.38	1.00	TIBMBA-11
1.05	1.28	1.39	1.37	1.20	1.05	1.20	1.40	1.40	1.80	1.20	1.20	TIBMBA-12
1.23	1.31	1.15	1.12	1.14	1.14	1.45	1.36	1.36	1.27	1.18	1.18	TIBMBA-17
1.14	1.09	1.23	1.15	1.11	1.40	1.30	1.10	1.40	1.20	1.20	1.50	TIBMBA-20
1.48	1.26	1.06	1.22	1.25	1.24	1.71	1.36	1.07	1.43	1.36	1.43	TIBMBA-03
1.03	1.62	1.37	1.44	1.37	1.14	1.14	1.71	1.43	1.57	1.57	1.43	TIBMBA-05
1.14	1.33	1.14	1.20	1.16	1.04	1.17	1.33	1.17	1.33	1.17	1.17	TIBMBA-12
1.00	1.02	1.13	1.02	1.18	1.00	1.00	1.09	1.18	1.09	1.27	1.00	TIBMBA-02
1.27	1.17	1.15	1.00	1.28	1.10	1.30	1.20	1.20	1.00	1.40	1.10	TIBMBA-03
1.06	1.10	1.03	1.17	1.11	1.22	1.10	1.30	1.15	1.25	1.25	1.40	TIBMBA-04
1.39	1.31	1.40	1.39	1.21	1.22	1.44	1.33	1.56	1.44	1.22	1.33	TIBMBA-17
1.10	1.11	1.09	1.21	1.16	1.00	1.18	1.12	1.24	1.29	1.24	1.00	TIBMBA-19
1.39	1.22	1.11	1.21	1.53	1.06	1.56	1.22	1.11	1.22	1.67	1.11	TIBMBA-20

na\* تعداد آلل مشاهده شده، ne: تعداد آلل‌های موثر.

توان به شرایط آب و هوایی نسبتاً یکسان و شرایط آبی و خاکی نسبتاً مشابه محل جمع آوری دو نمونه دانست چرا که هر دو نمونه در باغات و در پای درختان که از آب و مواد غذایی کافی و سایه‌بان مطلوب بهره می‌بردند جمع آوری شدند. از طرف دیگر با توجه به نزدیکی مناطق جغرافیایی مذکور امکان جابه‌جایی مواد گیاهی دور از انتظار نمی‌باشد. نتایج جدول ماتریس

در ارزیابی ماتریس تشابه، میزان تشابه محاسبه شده در بین جمعیت‌های دم‌شیر، بر اساس نوارهای چند شکل در دامنه‌ای از 0/65 تا 0/85 قرار داشت که این تنوع بالا می‌تواند به واسطه توزیع جغرافیایی وسیع این گونه در ایران باشد. جمعیت‌های طالقان و خوانسار با میزان تشابه 0/85 بیشترین شباهت را در بین جمعیت‌های مورد مطالعه دارا بودند که دلیل آن را می-

## سورنی و همکاران، 1392

توجه به شباهت در طبقه‌بندی گیاه‌شناسی را می‌توان به شرایط خاص اقلیمی منطقه نسبت داد. تجزیه واریانس داده‌ها

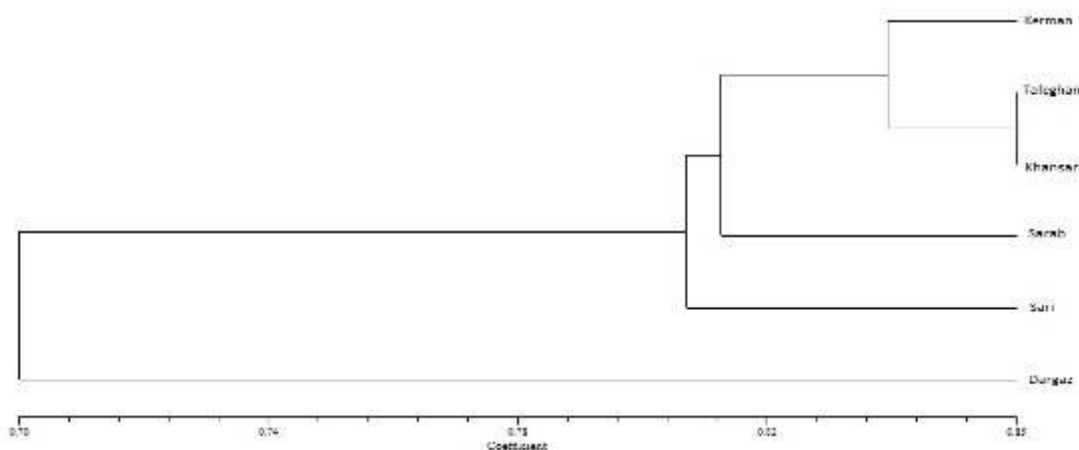
آنالیز تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) میزان تنوع درون و بین جمعیت‌های دم‌شیر را به ترتیب 66% و 34% نشان داد.

تشابه نشان داد که جمعیت‌های درگز و ساری با میزان تشابه 0/65 بیشترین تفاوت را در بین جمعیت‌های مورد بررسی از آن خود کرده‌اند که دلیل آن را می‌توان به اختلاف در زیرگونه (به ترتیب *turkestanicus* و *cardiaca*) و شرایط آب و هوایی کاملاً متفاوت این دو منطقه دانست. جدایی جمعیت کرمان از چهار جمعیت دیگر با

جدول 6- میزان تشابه بین شش جمعیت مورد مطالعه.

Table 6-The similarity between the six populations studied

جمعیت مورد بررسی	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری
Population	Kerman	Dargaz	Taleghan	Khansar	Sarab	Sari
کرمان Kerman	1.000					
درگز Dargaz	0.704	1.000				
طالقان Taleghan	0.826	0.703	1.000			
خوانسار Khansar	0.843	0.710	0.855	1.000		
سراب Sarab	0.793	0.708	0.814	0.817	1.000	
ساری Sari	0.789	0.657	0.800	0.821	0.800	1.000



شکل 5- گروه‌بندی شش جمعیت دم‌شیر مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه.

Figure 5-Grouping Six populations of *Leonurus cardiaca* based on similarity matrix.

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در مجموع این تحقیق توانایی نشانگرهای RAPD را در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های دم‌شیر نشان می‌دهد. در رابطه با 47 ژنوتیپ مورد بررسی نتایج بدست آمده نشان داد که در اکثر موارد هر چه محل‌های جمع‌آوری دو ژنوتیپ به هم نزدیک‌تر بوده شباهت‌های ژنتیکی بیشتری با هم داشتند. آنالیز تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها این مطلب را اثبات می‌کند. همان‌گونه که نمودار مربوط به تجزیه واریانس نشان داد 70% بین جمعیت‌ها تنوع وجود دارد در حالی که این مقدار در درون جمعیت‌ها 30% می‌باشد. آنالیز منطقه با دندروگرام حاصل از تفکیک ژنوتیپ‌ها مطابقت نشان می‌دهد. بنابراین طبق نتایج بدست آمده، تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها در اکثر مناطق وجود دارد که حاصل از ذخیره ژنتیکی قوی، شرایط آب و هوایی مختلف و اثر انتخاب می‌باشد. جدایی جمعیت درگز از سایر جمعیت‌ها با اطلاعات تاکسونومی و جدایی این

زیرگونه مطابقت دارد. بیشترین اختلاف جمعیت درگز و ساری را می‌توان به دلیل فاصله زیاد جغرافیایی و عدم تبادل مواد رویشی دانست که با اطلاعات تاکسونومی مطابقت دارد. شباهت بسیار زیاد جمعیت خوانسار و طالقان را می‌توان به دلیل نزدیکی دو منطقه و احتمالاً جابه‌جایی مواد رویشی دانست. هر چند جدایی زیرگونه‌ها و اطلاعات تاکسونومی نمی‌تواند دلیل قطعی و مطابق با اطلاعات ژنتیکی جمعیت‌ها باشد. با این وجود از دگرگشتن بودن این گیاه و جود تنوع بالای بین و درون جمعیت نمی‌توان صرف نظر کرد. بنابراین می‌توان از نمونه‌های مناطق دور از هم به عنوان والد جهت تلاقی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد از جمله تلاقی ژنوتیپ‌های جمعیت درگز با دیگر جمعیت‌ها می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید هیبریدهایی با عملکردهای مورد نظر باشد.

جدول 7- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های دم‌شیر.

Table 7-Analysis of variance molecular data (AMOVA) of populations *Leonurus cardiaca*.

درصد واریانس	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات	
Variance percentage	Estimate variance	Mean Square	Sum of Squares	Source	
70%	38.03	314.18	1570.93	5	بین جمعیت‌ها Among Pops
30%	16.40	16.40	672.55	41	درون جمعیت‌ها Within Pops
100%	54.43		2243.48	46	کل Total

منابع

- Ali SI, Nasir YJ (1990). Labiatae in Flora of Pakistan. No. 192. University of Karachi. 310pp.
- Chalmers KJ, Newton AC, Waugh R, Wilson J, Powell W (1994). Evaluation of the extent of genetic diversity in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics. 89: 504-508.
- Chen L, Zhao L, Bai Y, Hu R, Si J (2009). Genetic relationship analysis of different provenances of *Leonurus japonicus* by ISSR marker. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 341343-5.
- Hadian J, Tabatabai SM, Naghavi MR, Jamzade Z (2007). Evaluation genetic diversity *Satureia* in Iran. Ph.D. Thesis. Department of Horticultural Sciences, Tehran University.
- Heuberger H, Bauer R, Friedl F, Heuble G, Hummelesberger j, Nogel R, Seidenberger R, Londono TP (2010) Cultivation and breeding of Chinese medicinal plant in Germany. *Planta Medica*. 76: 1956-1962.
- Kumar J and Kumar Gupta P (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Report*. 2: 93-112.
- Momenideghi S, Shiran B and Razmjou KH (2001). Assessment of genetic relationships *Menta* using molecular markers RAPD. National Biotechnology Conference, Ferdowsi University of Mashhad, pp. 235-237.
- Mozafarian V (1996). lexicon of Iranian plant names. Publishing contemporary vocabulary.
- Omidbeigi R (2010). Production and processing of medicinal plants. Publication of Astan Quds Razavi.
- Pejmanmehr M, Hasani MA and Tabatabai SM (2001). Germination and genetic diversity studies of *Bunium* using molecular markers RAPD. Department of Horticultural Sciences, Tehran University.
- Popescu ML, Dinu M, Toth O (2009). Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study on *Leonurus cardiac* (Lamiaceae ). *Farmacial* 2033; 57: 4.
- Singh AP, Dwivedi S, Bharti SR, Srivastava A, Singh V and Khanuja SPS (2004). Phylogenetic relationships as in *Ocimum* revealed by RAPD markers. *Euphytica* 136: 11-20.
- Williams JGK, Kubelik AE, livak KJ, Rafaiski JA, and Tingey SC (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6536.
- Yu Q, Shen X, Shen Y, Chen J, Shi C, Wang Z (2009). AFLP Analysis of genetic diversity of *Leonurus japonicus* germplasm resources. *Zhongcaoyao* 40:1296-1299.
- Zargari A (1990). Medicinal plant. Publication of Tehran University.



**Study of genetic diversity of medicinal plant *Leonurus cardiaca* some populations in Iran using RAPD marker**

**Soorni A.<sup>1\*</sup>, Nazeri V.<sup>2</sup>, Fatahi R.<sup>2</sup>, Ahadi E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> MSc student of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

<sup>2</sup> Associate Professor of department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Motherwort (*Leonurus cardiaca*) is the only species of the genus *Leonurus* in Iran. It has many different compounds such as flavonoids, iridoids, triterpene, tannins, sterols, carotenoids useful to treat heart and therapy stomach diseases, any neurological disorders. In this study, RAPD molecular markers were used to evaluate genetic diversity among 30 accessions from six wild populations of motherwort in Iran. Totally 60 random primers were tested initially where 28 produced polymorphic and high resolution bands. In total, 364 DNA fragment were obtained, from which 325 were polymorphic. Cluster analysis of genotype based on the Dice similarity coefficient and UPGMA method was performed. The min and max population's values of genetic similarity were recorded between Dargaz 1 and Khansar 5 (0.12) and Sari 2 and Sari 3 (0.89) respectively. In the Cluster analysis genotypes were divided into two main groups at 20 distances, on included Dargaz and the other contained Sarab, Khansar, Kerman, Sari and Taleghan. Population diversity using Nei's genetic diversity (h) and Shannon index (I) showed that genetic variation within populations Sarab and Taleghan (h=0.10, I=0.15) was the highest and within Kerman population was the least (h=0.06, I=0.10). crosses genotypes of Dargaz population with other populations according to genetic distance determined in this study can be good option for Production Hybrid with desired functions.

**Keywords:** *Leonurus cardiaca*, Molecular markers, Breeding, Polymorphism, Gene flow.

---

\* Corresponding Author: Soorni A.

Tel: 09363623020

Email: soorni64@ut.ac.ir

