

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه دارویی بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.)

در شمال غرب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی (ISSR)

سیده فاطمه برقی^{۱*}، علی عزیزی^۲، جواد هادیان^۳، فرشته مسکنی^۴

۱- دانشجوی دکتری گیاهان دارویی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، ۲- استادیار گروه باغبانی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ۳- استادیار پژوهشکده گیاهان و

مواد اولیه دارویی شهید بهشتی، ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*نویسنده مسئول: mborghaei@yahoo.com

چکیده

کاوش در خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی و انتخاب نمونه‌های برتر از درون آن‌ها، گام مهمی در فرآیند اصلاح گیاهان دارویی در جهت تأمین مواد اولیه داروسازی گیاهی محسوب می‌شود. در پژوهش پیش رو تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کشت‌شونده مختلف بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.) در شمال غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، به منظور بهره‌برداری در پروژه‌های اصلاحی مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع از تعداد ۱۴ آغازگر مورد مطالعه، در مجموع ۹۴ باندها با وضوح بالا تولید گردید که از این تعداد ۱۰ باندها یک شکل (مونومورف) و ۸۴ باندها چندشکلی (پلی مورفیک) بودند. تعداد باندهای چندشکل بین ۸-۴ باندها به ازای هر آغازگر و با میانگین ۶ متفاوت بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ماتریس تشابه ژنتیکی جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام گردید که بر این اساس جمعیت‌های کشت‌شونده بادرشبی به دو گروه اصلی بر مبنای نشانگر ISSR تقسیم شدند. در گروه اول دندروگرام، توده‌های بادرشبی از جمعیت‌های کشتیجان، توپراق‌قلعه، باغچاقوق، نقده (آذربایجان غربی)، جهانگیر و حکم‌آباد (آذربایجان شرقی) قرار گرفتند. همچنین جمعیت‌هایی از کشتیجان (آذربایجان غربی)، جهانگیر و روستای شیراز (آذربایجان شرقی) در گروه دوم جای گرفتند. داشتن شناخت روی تنوع ژنتیکی می‌تواند در مدیریت ژرم پلاسماهای گیاهی و طراحی برنامه‌های مناسب جهت بهره‌برداری مستقیم یا اصلاح گیاه بادرشبی سودمند باشد. در جمع‌بندی کلی، نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع نسبتاً قابل توجه در جمعیت‌های بادرشبی دو استان واقع در شمال غرب ایران می‌باشد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بادرشبی، جمعیت‌های کشت‌شونده، تنوع، ISSR

مقدمه

در کشور ما به دلیل عدم شناخت ذخایر ژنتیکی و ژن‌های مطلوب، برنامه‌های اصلاحی قابل توجهی روی گیاهان دارویی و معطر صورت نگرفته است، با توجه به این موضوع می‌توان با شناسایی و بررسی خصوصیات ارقام و گونه‌های مختلف، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز را تأمین نمود. در این راستا موفقیت فرآیند به‌نژادی به میزان تنوع موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان آن‌ها بستگی دارد. به عبارتی مواد ژنتیکی، گنجینه با ارزشی هستند که اساس کار به‌نژادگر را بنیان می‌نهند (زینلی و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به این موضوع که یکی از محدودیت‌های عمده در زمینه تحقیقات گیاهان دارویی عدم وجود ژنوتیپ‌های مناسب برای سیستم‌های مختلف کاشت و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر با ترکیبات فعال زیستی بالا است، در حال حاضر بررسی میزان تنوع ژنتیکی جمعیت در ذخایر توارثی گیاهی یکی از قدم‌های اولیه در اکثر برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (Rahimmalek, 2012). با توجه به نقش تنوع ژنتیکی در پیشبرد اهداف برنامه‌های اصلاح نباتات شناسایی این تنوع از طریق روش‌های مولکولی و غیر مولکولی با اهمیت خواهد بود (Behera et al., 2008).

نشانه‌های ISSR از جمله نشانگرهای مبتنی بر PCR هستند که قطعه DNA موجود و قابل تکثیر بین دو ریزوماهواره را که در جهت مخالف هم قرار دارند را تکثیر می‌کند. این نشانگرها مزایای سه نشانگر RAPD، AFLP و SSR را دارا و فاقد معایبی از قبیل تکرار پذیری کم و هزینه بالا می‌باشند (Terzopoulos & Bebeli, 2008). نشانگرهای ISSR نیمه تصادفی بوده و از تکرارپذیری و چند شکلی بالایی برخوردار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد (Lin et al., 2010). بادرشی با نام علمی *Dracocephalum moldavica* از خانواده نعنائیان یکی از گیاهان دارویی مهم شناخته شده در سراسر دنیا است، که به علت داشتن اسانس و ترکیب‌های با ارزش در صنایع آرایشی و بهداشتی، غذایی و صنایع وابسته به داروسازی از کاربرد فراوانی برخوردار است (امیدبگی، ۱۳۸۶). با توجه به این موضوع که تاکنون هیچ گونه تحقیقاتی در سطح مولکولی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در گیاه دارویی بادرشی انجام نشده است، پژوهش حاضر در این زمینه پایه‌ریزی شده است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی در هفت جمعیت کشت شونده از این گیاه دارویی در سطح مولکولی توسط مجموعه‌ای از ۳۲ نشانگر ریزوماهواره‌ای (ISSR) به منظور مدیریت بهتر ژرم پلاسم موجود و استفاده بهینه از آن در برنامه‌های به‌نژادی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

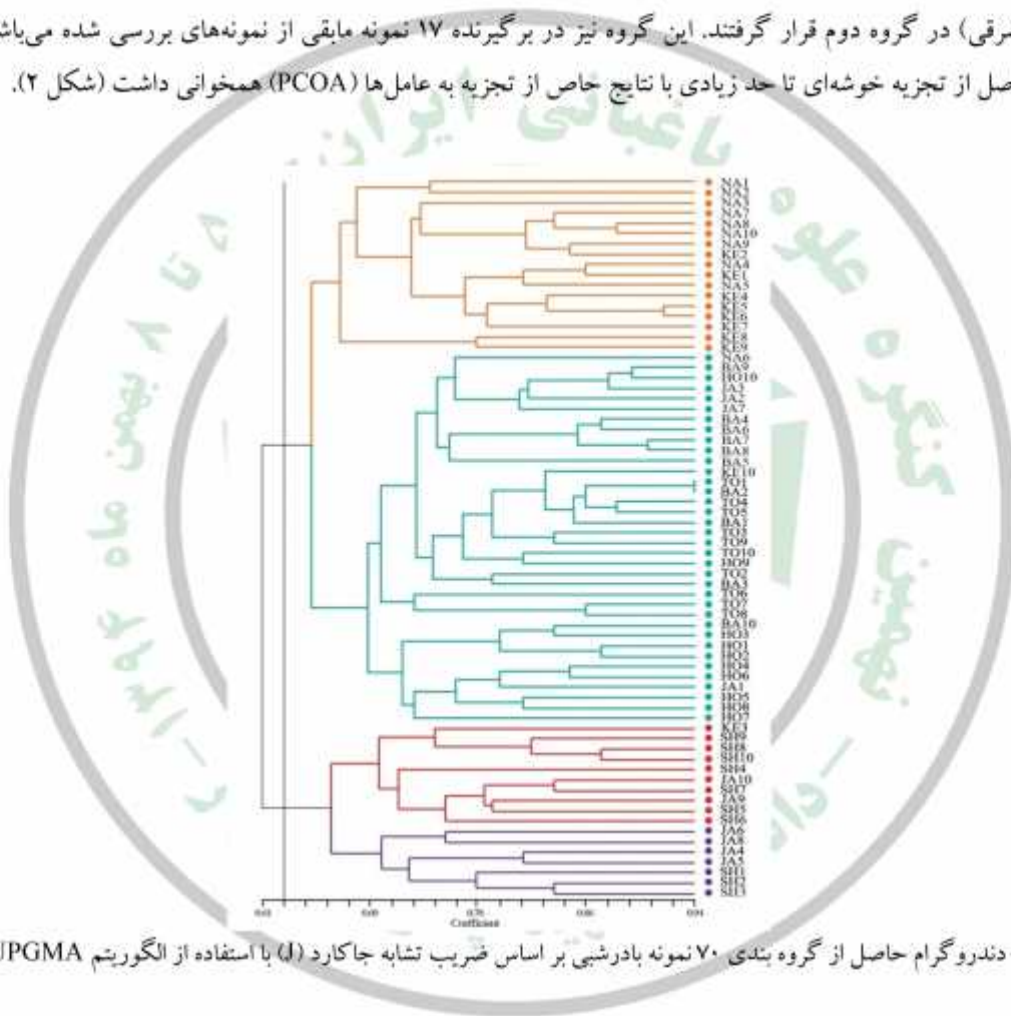
در این تحقیق به منظور انجام بررسی‌های مولکولی بذور هفت جمعیت کشت شونده گیاه دارویی بادرشی از مناطق مختلف در دو استان آذربایجان غربی (نقده، کشتیان، توپراق قلعه و باغچاقوق) و آذربایجان شرقی (حکم آباد، جهانگیر و روستای شیراز) واقع در شمال غرب ایران تهیه شدند و در مزرعه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان کشت شدند. نمونه‌های برگ گیاه بادرشی از تک بوته‌ها به طور جداگانه و در مجموع تعداد ۷۰ نمونه (۱۰ نمونه از هر جمعیت) به طور تصادفی انتخاب و برداشت شدند. استخراج DNA به روش تغییر یافته CTAB بر اساس دستورالعمل دوپیل و دوپیل با اندکی تغییرات استخراج گردید. در این تحقیق از ۳۲ جفت آغازگر ISSR استفاده گردید. محصول به دست آمده از واکنش‌های PCR الکتروفورز شدند و در نهایت رنگ آمیزی ژل به منظور قابل رؤیت شدن محصولات PCR تحت تابش اشعه ماوراءبنفش با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید انجام و به وسیله دستگاه ژل داک (Gel Documentantation) تحت نور UV مشاهده و عکس برداری گردید. از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین جمعیت‌ها استفاده گردید و گروه‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها UPGMA با نرم افزار NTSYSpc 1ver 2.02 محاسبه و نمودار خوشه‌ای آن ترسیم شد.

نتایج و بحث

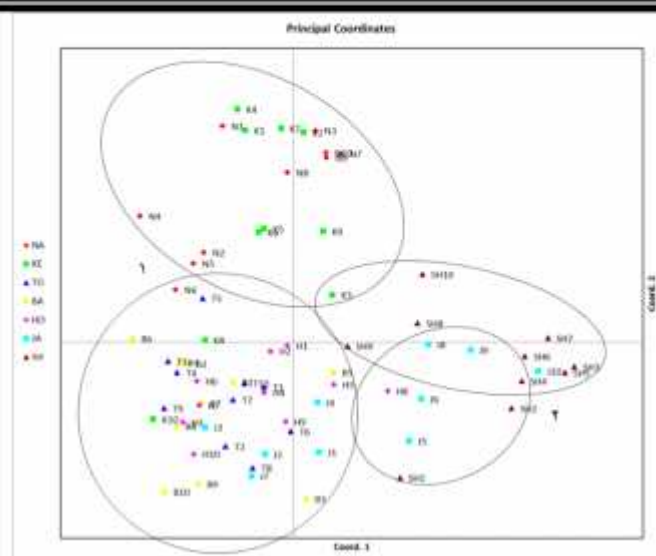
در این بررسی از ۳۲ آغازگر مورد استفاده از نظر تکرارپذیری و وضوح بانندی، تعداد ۱۴ آغازگر انتخاب شدند. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کشت شونده بادرشی جمع‌آوری شده از دو استان آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی با استفاده از ۱۴ سیستم نشانگری ISSR مورد بررسی قرار گرفت که در مجموع ۹۴ باند قابل امتیازدهی تولید کردند. از مجموع ۹۴ باند تولید شده ۱۰ عدد آن منومورف و ۸۴ تای آن پلی مورف (چندشکل) بود که میانگین درصد چندشکلی در این آغازگرها ۹۱/۴٪ بود که این میزان، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند. تعداد آلل برای هر آغازگر از ۴ تا ۸ و با میانگین تعداد آلل ۶ برای هر آغازگر مشاهده شد. آغازگر IS5 با ۸ قطعه چندشکل و آغازگرهای IS10، IS18 و IS20 با ۴ قطعه به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد قطعات چندشکل را دارا بودند. از بین ۱۴ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۰ آغازگر ۱۰۰ درصد چندشکلی را نشان دادند. کمترین درصد چندشکلی به میزان ۵۰٪ در آغازگر IS10 مشاهده شد. تعداد باند تکثیر شده و میزان چندشکلی بالا (۹۱ درصد چندشکلی) در توده‌های کشت شونده بادرشی مورد مطالعه بیانگر کارایی بالای آغازگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی آن‌ها بوده است. این

نتایج با سایر نتایج مطالعه‌های انجام شده در این زمینه مانند گونه‌های مریم‌گلی (Sepehri Javan *et al.*, 2012)، گونه دارویی ریواس (Hu *et al.*, 2014) و شاهی (Mohammed & Tesfaye, 2015) همخوانی داشت.

به‌طور کلی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از اطلاعات چندشکل (PIC) بالایی برخوردار بودند که این امر بیانگر چندشکلی و کارایی بالای آن‌ها در این مطالعه می‌باشد. بیشترین مقدار PIC به میزان ۰/۴۴ در آغازگر IS10 و کمترین مقدار آن به میزان ۰/۱۷ در آغازگر IS4 مشاهده گردید. میانگین PIC در این تحقیق برابر ۰/۳۳ بود (Muminovic *et al.*, 2004). بر اساس تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها در ۲ گروه قرار گرفتند. در گروه اول دندروگرام آغازگرهای ISSR توده‌های بادرشی از کشتیان، توپراق‌قلعه، باغچاقوق، نقده (آذربایجان غربی)، جهانگیر و حکم‌آباد (آذربایجان شرقی) قرار گرفتند. این گروه در برگرفته ۵۳ نمونه از کل نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. جمعیت‌هایی از کشتیان (آذربایجان غربی)، جهانگیر و روستای شیراز (آذربایجان شرقی) در گروه دوم قرار گرفتند. این گروه نیز در برگرفته ۱۷ نمونه مابقی از نمونه‌های بررسی شده می‌باشد (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حد زیادی با نتایج خاص از تجزیه به عامل‌ها (PCOA) همخوانی داشت (شکل ۲).



شکل ۱- دندروگرام حاصل از گروه بندی ۷۰ نمونه بادرشی بر اساس ضریب تشابه جاکارد (J) با استفاده از الگوریتم UPGMA



شکل ۲- نقشه پراکنش ۷۰ نمونه بادرشی، در اطراف دو مؤلفه اصلی (PCOA)

منابع

۱. امیدبگی ر. ۱۳۸۶. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد.
2. Behera. T.K., Gaikward, A.B., Singh, A.K. and Staub, J.E. 2008. Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). The Science Food Agriculture. 88: 733-7.
3. Hu. Y., Xie, X. Wang, L. Zhang, Yang, H.J. and Li, Y. 2014. Genetic variation in cultivated *Rheum tanguticum* populations. Genetics and Molecular Biology, 37, 3, 540-548.
4. Lin. X., Lou, Y. Liu, J. Peng, J. Liao, G. and Fang, W. 2010. Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. Genetics and Molecular Research 9 (3): 1398-1404.
5. Mohammed, S. and Tafsaye, K. 2015. Morphological characterization of *Lepidium sativum* population collected from Ethiopia. African journal of plant science. 9 (4): 215-222.
6. Rahimmalek. M. 2012. Genetic relationships among *Achillea tenuifolia* accessions using molecular and morphological markers. Plant Omics Journal. 5 (2): 128-135.
7. Sepehry Javan. Z., Rahmani, F. and Heidari, R. 2012. Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. Australian Journal of Crop Science. 6 (6): 1068-1073.
8. Terzopoulos. P.J. and Bebeli, P. J. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. Field Crops Res. 108: 39-44.

Assessment of genetic variation of *Dracocephalum moldavica* populations in the North West of Iran using ISSR markers

S.F. Borghei¹, A.Azizi², J.Hadian³, F.Maskani⁴

1-PhD Student of Medicinal & Aromatic Plants, Horticulture Department, Science & Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran 2-Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran 3-Research Institute of Medicinal Plants, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, 4-Former M.Sc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

*Corresponding author: mborgheci@yahoo.com

Abstract

Explore in the genetic characteristics of plant populations and selection the superior samples from them; is an important step in the breeding process of medicinal plants in order to providing

pharmaceutical raw materials. The present study was undertaken to assess genetic diversity in Iranian landraces (cultivated populations) of *Dracocephalum moldavica* from different locations in North West of Iran based on ISSR (Inter simple sequence repeats) markers. Forteen ISSR primers produced 94 amplified bands of which 10 were monomorphic and 84 were polymorphic. The numbers of observed polymorphic bonds (each bond as an Allele) were between 4-8 with average of 6. The dendrogram was constructed using UPGMA method based on Jaccard genetic similarity matrix with the help of NTSYSpc 2.02 software, which distinguished two main groups among seven cultivated population of *Dracocephalum moldavica* based on ISSR analyses. In the first group of dendrogram, Moldavian Balm populations included Keshtiban, Topragh Ghalee, Baghchajogh, Naghadeh (West Azerbaijan), Jahangir and Hokmabad (East Azerbaijan) were placed. Also the populations of the Keshtiban (West Azerbaijan), Jahangir and Shiraz Valley (East Azerbaijan) were placed in the second group. Our genetic diversity analysis could provide useful information for utilization of these materials, especially for genetic improvement. The present study demonstrated a broad diversity among Moldavian Balm landraces from North West of Iran. This knowledge could be useful in germplasm management, conservation and breeding programs of *D. moldavica*.

Key words: *Dracocephalum moldavica*, Moldavian Balm, genetic diversity, ISSR, DNA

