بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون دو گونه بومادران ایران

مصطفی فرج‌پور و محسن ابراهیمی*
گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران
*نویسنده مسئول: Mebrahimi@ut.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۶ اکسشن‌های دو گونه بومادران ایران شامل *A. vermicularis* و *A. wilhelmsii* با استفاده از هفت آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع شش آغازگر که برای انگشت‌نگاری انتخاب شد، ۴۶ باند بدست آمد که اکثر آن‌ها چند شکل بودند. بر اساس تجزیه کلاستر بر مبنای ضریب تشابه جاکارد با استفاده از الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌ها به دو گروه دسته‌بندی شدند. در این دسته‌بندی ژنوتیپ‌های هر گونه در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی نتایج تجزیه کلاستر را تأیید کرد. هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون دو گونه بومادران با استفاده از مارکر ISSR بود. به‌طورکلی نتایج این آزمایش حاکی از تنوع بالای ژنتیکی بین و درون این دو گونه بومادران بود.

***کلمات کلیدی:* *A. vermicularis*، *A. wilhelmsii*، ISSR، تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی**

مقدمه

بومادران از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی مورد مصرف توسط جوامع و تمدن‌های مختلف در طول تاریخ بوده و پراکندگی وسیعی در جهان دارد. این گیاه در برخی نقاط کشور به‌صورت وحشی می‌روید. بومادران به دلیل خواص متعدد دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی از گیاهان دارویی بسیار مهم در سطح دنیا بوده است. این گیاه بومی اروپا و غرب آسیا است (امیدبیگی، ۱۹۹۷).

گل‌ها، پیکر رویشی و برگ‌های بومادران خاصیت دارویی دارند. استفاده از دم‌کرده بومادران سبب کاهش فشارخون و نیز سبب مداوای نارسایی‌های کیسه صفرا می‌شود. اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های موردنظر ازجمله پارامترهای مهم در سازماندهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود (شارما و همکاران، ۲۰۰۲).

استفاده از روش‌های مولکولی جهت آشکارسازی تنوع و روابط ژنتیکی توده‌های گیاهی در دو سطح درون و بین‌گونه‌ای از کارایی بالایی برخوردار است.

در این مطالعه با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف جنس بومادران و ضرورت حفاظت و نگهداری گونه‌های دارویی آن، بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه بومادران شامل *A. vermicularis* و *A. wilhelmsii* ، با هدف مطالعه روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف آن به‌منظور اصلاح، اهلی سازی و تولید رقم‌های متناسب با نیاز صنایع وابسته صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

شانزده اکسشن از دو گونه *A. vermicularis* و *A. wilhelmsii* از بانک ژن موسسه جنگل‌ها و مراتع تهیه گردید (جدول-۱). نمونه‌ها در گلخانه کشت‌شده و در مرحله ۱۰cm از برگ‌های تازه آن‌ها نمونه‌گیری انجام شد. پس از ثبت مشخصات ، نمونه‌های برگی به‌طور جداگانه در کاغذ آلومینیوم پیچیده شده و توسط نیتروژن مایع منجمد گردیدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی با روش موری تامسون (۱۹۸۰) با استفاده از هگزا استیل‌تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ۲ درصد انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفروز افقی روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفتند. برای

انجام آزمایش تعداد ۷ آغازگر ISSR که در مطالعات گذشته پلی‌مورفیسم خوبی نشان داده بودند استفاده شد (فرج پور و همکاران، ۲۰۱۲).

اجزای واکنش زنجیرهای پلیمراز و شرایط تکثیر به ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است.

جدول -۱ اطلاعات مربوط به شش پرایمر استفاده شده در این تحقیق.

پرایمر	توالی	درجه حرارت آنیلینگ	تعداد کل باندها	تعداد باند پلی مورفیسم	درصد پلی مورفیسم	PIC	MI
ISSR1	$(CA)_8$-GT	۵۱	۱۱	۹	۸۲	۰/۳۹	۳/۵۱
ISSR2	$(GA)_8$-G	۵۳	۷	۴	۵۷	۰/۴۲	۱/۶۸
ISSR3	$(GT)_8$-C	۵۱	۸	۷	۸۷	۰/۴۰	۲/۸
ISSR4	$(AC)_8$-TG	۵۱	۶	۳	۵۰	۰/۴۶	۱/۳۸
ISSR5	$(GATA)_5$	۵۰	۷	۵	۷۱	۰/۲۱	۱/۰۵
ISSR6	$(TCT)_6$	۵۱	۷	۶	۸۶	۰/۴۱	۲/۴۶
کل			۴۶	۳۴			
میانگین			۷/۶۷	۵/۶۷	۷۲/۱۶		

جدول-۲ مواد لازم و مقدار هر یک از آن‌ها برای تهیه محلول پایه پی سی آر

مواد	غلظت پایه	غلظت نهایی	مقدار برای هر واکنش	مقدار برای ۲۰ نمونه
آب مقطر	-	-	۱/۸ µl	۱۶۲ µl
بافر پی سی ار	۱۰ X	۱ X	۱/۵ µl	۳۰ µl
کلرید منیزیم	۵۰mM	۱ mM	۰/۸µl	۱۶ µl
مخلوط نوکلئوتیدی	۱۰ mM	۰/۲mM	۰/۳µl	۶ µl
پرایمر	۱۰ µM	۰/۶ µM	۲ µl	۴۰ µl
دی ان ای الگو	۵ ng/۱۰ µl	۵ ng/۱۰ µl	۲ µl	۴۰µl
آنزیم تک	۵Unit/ µl	۵ Unit/ µl	۰/۳ µl	۶ µl
جمع			۱۵ µl	۳۰۰ µl

جدول-۳ زمان و دمای لازم برای سه مرحله (باز شدن، اتصال و بسط) در هر یک از دورهای حرارتی پی سی آر

۱	مرحله انجام شده	۱	۵ دقیقه	۹۴
	شروع باز شدن رشته DNA		۴۵ ثانیه	۹۲
۲	تک‌رشته‌ای شدن DNA	۳۵	۱ دقیقه	۵۰-۵۳
	اتصال آغازگر		۲ دقیقه	۷۲
	بسط آغازگر		۵ دقیقه	۷۲
۳	تکمیل بسط	۱	۵ دقیقه	۹۴

نتایج و بحث

در این تحقیق از هفت پرایمر ISSR که در بررسی‌های گذشته به‌عنوان پرایمرهای مناسب برای بررسی تنوع بومادران شناخته‌شده‌اند (فرج پور و همکاران، ۲۰۱۲)، استفاده شد (جدول-۱).

از یکی از پرایمرها در این تحقیق باندی مشاهده نشد که از آزمایش حذف گردید. با آنالیز باندها ۴۶ باند بدست آمد که ۳۴ باند (۷۲/۱۶ درصد) پلی‌مورف بود. بیشترین تعداد باند پلی‌مورف (۹) را پرایمر اول و کمترین تعداد باند پلی‌مورف (۴) را پرایمر دوم تولید کردند.

بیشترین شاخص اطلاعات چندشکلی را پرایمر چهارم داشت، هرچند که بالاترین شاخص نشانگر را پرایمر اول دارا بود. ازآنجاکه شاخص اطلاعات چندشکلی این دو پرایمر نزدیک می‌باشد اما شاخص نشانگر پرایمر اول حدود دو برابر پرایمر چهارم است، این پرایمر به‌عنوان بهترین پرایمر مطالعه شده در این تحقیق برای تولید باند پلی‌مورفیسم شناخته شد.

تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی نشان داد چهار مؤلفه اول حدود ۸۴ درصد از واریانس را توجیه می‌کنند (جدول-۲). مؤلفه اول ۵۵ درصد این واریانس را توجیه کرد. با توجه به زیاد بودن این مقدار واریانس توجیه شده به نظر این واریانس مربوط به تفاوت بین گونه‌ها باشد. مؤلفه‌های دوم تا چهارم به ترتیب ۱۱/۵۳، ۸/۴۶ و ۸/۲۶ درصد از واریانس کل را توجیه کردند.

جدول-۴ نتایج تجزیه به مختصات اصلی حاصل از داده‌های مولکولی

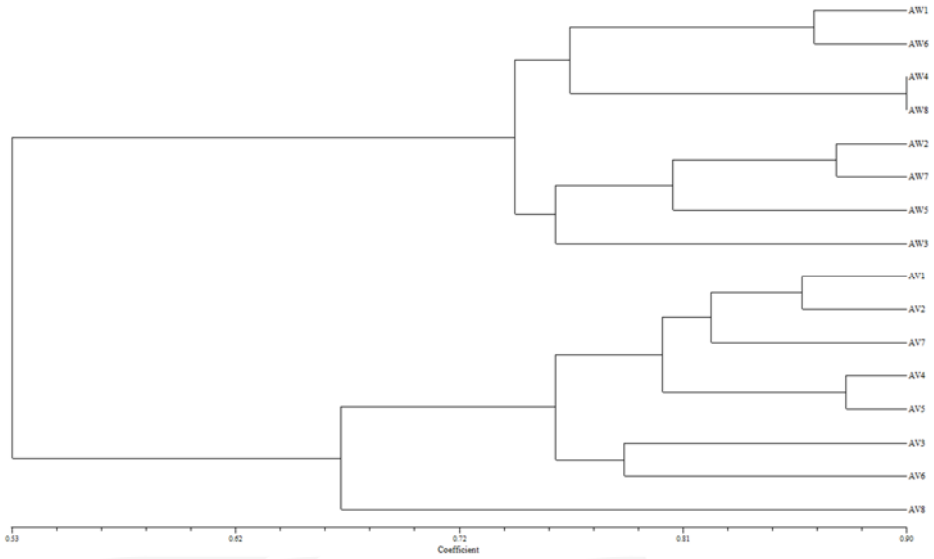
	۱PCOA	۲PCOA	۳PCOA	۴PCOA
مقدار ویژه	۰/۶۹۶	۰/۱۴۴	۰/۱۰۶	۰/۱۰۳
واریانس نسبی	۵۵/۶۷	۱۱/۵۳	۸/۴۶	۸/۲۶
واریانس تجمعی	۵۵/۶۷	۶۷/۲۰	۷۵/۶۶	۸۳/۹۲

به‌منظور ترسیم نمودار خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها، بر اساس الگوهای باندی ISSR از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA استفاده شد. ضریب کوفنتیک ماتریس ضرایب جاکارد و ماتریس کوفنتیک ۰/۹۲ شد، که نشان دهنده کارایی بالای روش به کار برده شده در ترسیم دندروگرام دارد. مشاهده دندروگرام حاصل نشان می‌دهد که اکسشن‌ها مطابق با دو گونه مورد بررسی در دو گروه مجزا تفکیک‌شده‌اند (شکل-۱).

در گروه اول اکسشن‌های گونه *A. vermicularis* قرار گرفتند. بیشترین تشابه بین اکسشن‌های این گونه بین دو اکسشن جمع‌آوری‌شده از استان آذربایجان غربی بود. دو اکسشن جمع‌آوری‌شده از استان کردستان نیز ضریب تشابه بالایی داشتند. اکسشن دیواندره در فاصله دوری نسبت به سایر اکسشن‌های این گونه قرار داشت. در گروه دوم که اکسشن‌های گونه *A. wilhelmsii* قرار گرفته بودند، بیشترین ضریب تشابه بین اکسشن بانه و طارم سفلی بود. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد دندروگرام تا حدودی بر اساس الگوی منطقه جمع‌آوری اکسشن‌ها می‌باشد.

دو گونه در دندروگرام در ضریب ۰/۵۳ به همدیگر رسیده‌اند که این ضریب با درصد واریانسی که مؤلفه اول توجه می‌کرد برابر است. یک مقایسه بین ماتریس‌هایی که توسط داده‌های مولکولی، مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و مواد معدنی بدست آمده بود انجام شد (داده‌ها نشان داده نشده است). این مقایسه توسط تست مانتل (مانتل، ۱۹۶۷) انجام شد، نتایج حاکی از آن بود که هیچ‌یک از مقایسه‌ها با داده‌های مولکولی معنی‌دار نیست.

محجوب و همکاران (۲۰۰۹) ضریب همبستگی غیر معنی‌داری (r=-۰/۰۱) بین دو ماتریس داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی در *Aegilops geniculata* گزارش کردند.



شکل-۱ دندروگرام به‌دست‌آمده برای اکسشن‌های دو گونه موردمطالعه بومادران با نشانگر ISSR

منابع

Farajpour, M., Ebrahimi, M., Amiri, R., Golzari, R., Sanjari, S., 2012. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker. Biochem Syst Ecol. 43: 73-79.

Mahjoub, A., EL-GHarib, M., and Mguis, K. 2009. Evalution of Genetic Diversity in *Aegilops geniculata* Roth Accession using Morphological and RAPD Markers. Pakistan Journal of Biological Sciences; 12(14): 994-1003

Mantel, N.A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res; 27: 209-220.

Murry, M, and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res., 8: 4321-4325.

Omidbeigi, R. 1997. Approaches for production and processing of medicine herbs. 2nd Volume. Tarahan-e Nashr Publication; 300-420.

Sharma, K.K., Crouch, J.H, and Hash, C.T. 2002. Application of biotechnology for crop improvement: prospect and constraints. Journal of Plant Science. 163: 381-395.

Assessment of Genetic Diversity among and Within Two Iranian *Achillea* Species

Mostafa Farajpour and Mohsen Ebrahimi*
Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Abourihan, University of Tehran, Tehran, Iran
*Corresponding Author: Mebrahimi@ut.ac.ir

Abstract

Sixteen accessions of two *Achillea* species (*A. vermicularis* and *A. wilhelmsii*) collected from provinces in Iran, were analyzed using inter-simple -sequence -repeat (ISSR) markers to evaluate their variability. A total of six ISSR primers generated 46 amplified fragments, most of which were polymorphic. The Jaccard similarity indices, as based on the ISSR profiles, were subjected to a complete linkage analysis, and the dendrogram revealed two groups. The results of the clustering showed that the accessions were separated based on the species. Principal coordinate analysis (PCoA) confirmed the results of the clustering. The objective of the present study was the identification of the genetic diversity among two *Achillea* species genotypes using ISSR markers. In general, the results of this experiment showed that there was a high genetic diversity among and within the two *Achillea* species.

***Keywords*: *A. vermicularis*, *A. wilhelmsii*, ISSR, Cluster analysis, Principal coordinate analysis.**