بررسی تنوع ۲۸ گونه درمنه ایران با استفاده از روش PCR-RFLP بر اساس نواحی PB و B2B3 دی‌ان‌ای کلروپلاستی

الهه احدی دولت‌سرا [۱*]، سید علیرضا سلامی [۲]، مجید شکرپور [۲]، ابوذر سورنی [۱]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران. ۲- استادیار گروه مهندسی علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

*نویسنده مسئول: آدرس، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، صندوق پستی: ۷۸۷۱-۳۱۵۸۷ تلفن: ۰۹۳۰۲۴۲۶۸۸۴

پست الکترونیک: elaheahadi@ut.ac.ir

چکیده

آرتمیزیا یکی از بزرگترین و گسترده ترین جنس های خانواده آستراسه است به لحاظ پراکنش است. ۳۴ گونه از این جنس در ایران شناسایی شده است که برخی از این گونه‌ها اندمیک ایران هستند. به منظور بررسی تنوع ۲۸ گونه جنس ارتمیزیا و تعیین روابط خویشاوندی بین آن‌ها از روش PCR-RFLP بر اساس دو ناحیه PB و B2B3 دی ان ای کلروپلاستی استفاده شد. دو جفت آغازگر از بین آغازگرهای تست شده پس از هضم در مجموع ۴۰ نوار چند شکل واضح تولید کردند که به ترتیب برای آغازگر PB و B2B3 در محدوده 200-1600 bp و ۱۴۰۰-۲۰۰ قرار داشتند. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه به روش UPGMA 28 گونه مربوط به گیاه دارویی درمنه را در ۳ گروه اصلی جای داد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه به ترتیب بیشترین تشابه را میان گونه‌های *A. fragrans* و *A. annua* با مقدار ۰/۹۴ و کمترین تشابه را میان گونه‌های *A. absintium* و *A. armeniaca* با مقدار ۰/۳۲ نشان داد.کلمات کلیدی: درمنه، ناحیه PB و B2B3، PCR-RFLP، دی.ان.ای کلروپلاستی

کلمات کلیدی: درمنه، نواحی PB و B2B3، PCR-RFLP، دی.ان.ای کلروپلاستی

مقدمه

درمنه گیاهی از تیره کاسنی (این تیره به تیره گل آفتابگردان نیز شناخته می‌شود) است. درمنه و افسنطین نام‌هایی هستند که در زبان فارسی به اغلب قریب به اتفاق گیاهان جنس *Artemisia* که در ایران می‌رویند گفته می‌شود. این جنس بیش از ۵۰۰ گونه و زیر گونه را شامل می‌شود. بیشتر گونه‌ها چند ساله و فقط ۱۰ گونه یک یا دو ساله هستند. تاکنون ۳۴ گونه علفی یکساله و چندساله از این جنس در ایران شناسایی شده است که برخی از این گونه‌ها بومی ایران هستند (Kazemi et al., 2009). در ایران چند گونه انحصاری وجود دارد که از آن‌ها می‌توان به *Artemisia melanolepis*، *Artemisia kermanensis* و *Artemisia khorasanica* اشاره کرد. اهمیت این گیاه به دلیل وجود ترکیبات دارویی مهم همانند آرتمیزینین در آنها است. آرتمیزینین یک سسکوئی‌ترپن می‌باشد که در گذشته اهمیت این ترکیب به دلیل شناخت از تأثیر قابل ملاحظه آن در درمان انواع تب و هموروئید بوده است. اما امروزه توجه بیش از پیش به این گیاه و آرتمیزینین به دلیل خاصیت ضد مالاریایی آن می باشد. از دیگر ترکیبات مهم موجود در این جنس می‌توان به کومارین، فلاون و ترپن‌ها اشاره کرد (Ma et al., 2007) بسیاری از پراکسید ترپن‌ها مانند کتون، الکل و هیدروپراکسید از این گیاه جداسازی شده است (Bertea et al., 2005). دانشمندان بر این عقیده‌اند که با بررسی نمونه‌های گیاهی به ویژه نمونه‌های در خطر انقراض می‌توان با مطالعه تنوع ژنتیکی و تفسیر این داده‌ها در یک جمعیت زمینه حفاظت از آن‌ها را فراهم نمود (Panda et al, 2003).

از آنجایی که ژنوم اندامک‌ها به صورت تک والدی (در نهاندانگان بیشتر از والد مادری) به ارث می‌رسند و این مولکول‌ها به علت حفاظت شدگی بالای خود منبع غنی از نشانگرهای مولکولی می‌باشند، برای بررسی تنوع و روابط ژنتیکی موجود قابل استفاده‌اند که اهمیت بالایی را برای این دی.ان.اِها در مطالعات ژنتیک جمعیتی و روابط تکامل نژادی (فیلوژنی) مهیا می‌سازد. استفاده از مولکول

دی.ان.اِ اندامک میتوکندری در مطالعات ژنتیک به علت سرعت کمتر در جایگزینی نوکلئوتیدهایش کمتر متداول بوده و بیشتر از ژنوم کلروپلاست استفاده گردیده است (Newton, 1988; Palmer, 1992).

موارد و روش‌ها

جمع آوری و کشت گیاه

پس از تهیه بذر ۲۸ گونه مختلف درمنه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کشت این بذور تحت شرایط مناسب گلخانه انجام شد. نمونه‌های برگی با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج دی.ان.ای نگهداری شد.

Artemisia armeniaca ۱- Artemisia incana-۲ Artemisia fragrans-۳ Artemisia austeriaca-۴ Artemisia -۵ specigera Artemisia haussknechtii-۶ Artemisia turcomanica-۷ Artemisia chamaemelifolle-۸ Artemisia -۹ marschelliana Artemisia kopetdaghensis-۱۰ Artemisia siberi-۱۱ Artemisia pompestris-۱۲ Artemisia -۱۳ scoparia Artemisia annua-۱۴ Artemisia absinthium-۱۵ Artemisia vulgaris-۱۶ Artemisia diffusa-۱۷ Artemisia -۱۸ Artemisia teschveriana Artemisia khorasanica-۱۹ Artemisia dracunculus-۲۰ Artemisia selengensis- ۲۱ Artemisia -۲۲ Artemisia capilaris Artemisia turnifortiana-۲۳ Artemisia turanica-۲۴ Artemisia oloveriana-۲۵ Artemisia -۲۶ melanolepis Artemisia aucheri-۲۷ Artemisia ciniformis-۲۸

استخراج دی.ان.ای

استخراج دی.ان.ای از هر گونه با استفاده از روش تغییر یافته Pirttila و همکاران (۲۰۰۱) (استفاده از زغال فعال در مرحله اضافه کردن بافر جهت حذف ترکیبات فنلی و استات پتاسیم در بین دو مرحله شستشو با کلروفورم ایزوآمیل الکل) انجام گرفت. کمیت و کیفیت دی.ان.ای با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ تعیین شد و به کمک آن غلظت یکسان از دی.ان.ای نمونه‌ها (۵۰ نانوگرم در میکرو لیتر) آماده شد.

تکثیر در واکنش زنجیره ای پلیمراز

آغازگر PB:

این آغازگر ناحیه بین *psbB* [ATAYACCCAATGCCARATAG]- *clpp* [ATAAWAAGAACTAGCAGGTT] را تکثیر میکند و قطعه تکثیری در کلروپلاست تنباکو دارای طولی برابر bp ۲۶۳۹ می‌باشد.

آغازگر B2B3:

این آغازگر ناحیه بین *psbB* [CAGAAGCTTGGTCTAAAATTCC]- *petB* [GRTCCCAAGGGAARGAATAACCAGT] را تکثیر می‌کند و قطعه تکثیری در کلروپلاست تنباکو دارای طولی برابر bp ۲۷۸۱ می‌باشد.

شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز برای این جفت آغازگرها شامل ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۶/۵ درجه سانتی گراد (PB) ۵۴ درجه سانتی گراد (B2B3) به مدت ۳۰ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد.

هضم و برش توسط آنزیم برشی

هضم و برش قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط سه آنزیم محدودگر برشی *EcoR*I، *Hinf*I و *Taq*I (کمپانی Roche آلمان)، و بر اساس دستور العمل کارخانه تولید کننده صورت گرفت.

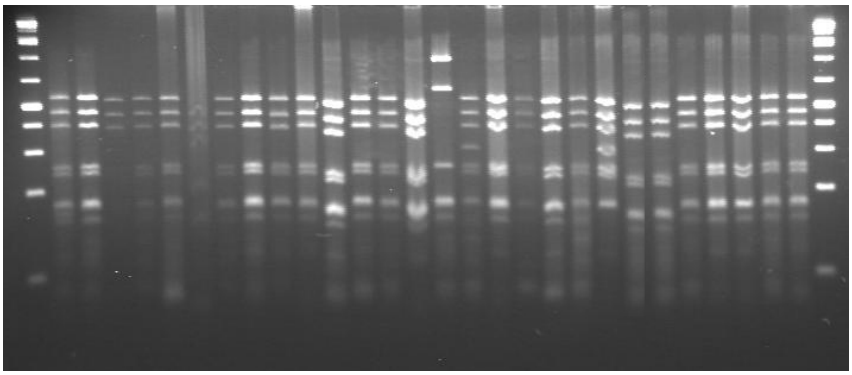
الکتروفورز قطعات حاصل از هضم برش توسط آنزیم های برشی

به منظور بررسی الگوی برش، پس از هضم آنزیمی محصول PCR، مخلوط واکنش هضم با حجم ۲۰ میکرولیتر توسط رنگ ژل رد روی ژل آگارز ۳ درصد با شرایط ۷۰ ولت به مدت ۴ ساعت الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

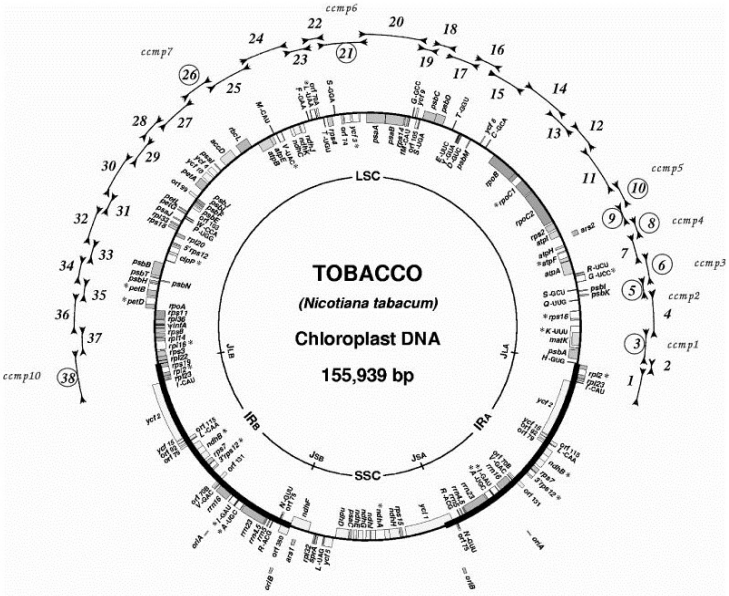
نتایج و بحث:

چند شکلی در مناطق غیر کدشونده دی.ان.اِ کلروپلاست در ۲۸ گونه درمنه مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا، ۴ جفت آغازگر عمومی (PB, B2B3, CS, BD)دی.ان.اِ کلروپلاست برای تکثیر بررسی شد و بعد از آن و با توجه به درجه تکثیر آغازگرها ۲ جفت آغازگر (B2B3 وPB) برای این مطالعه انتخاب گردید. تعداد ۲ جفت آغازگر دیگر مورد مطالعه چند باند یک شکل ایجاد می‌کردند یا اصلاً باندی تولید نکردند بنابراین، دارای ویژگی‌های لازم برای انجام این بررسی نبودند و به همین دلایل از بررسی حذف شدند.

قطعات حاصل از هضم محصول PCR برای آغازگر PB محدوده‌ای میانbp ۱۶۰۰ تا ۲۰۰ و برای آغازگر B2B3 محدوده‌ای میانbp ۱۴۰۰ تا ۲۰۰ را شامل می‌شد. دیاگرام شماتیک ناحیه تحت پوشش دو آغازگر در گیاه تنباکو با شماره‌های ۳۲ و ۳۴ در شکل ۲ مشخص شده است. هیچ حالت چند شکلی در محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل با استفاده از هر یک از جفت آغازگرهای مورد آزمایش مشاهده نشد.



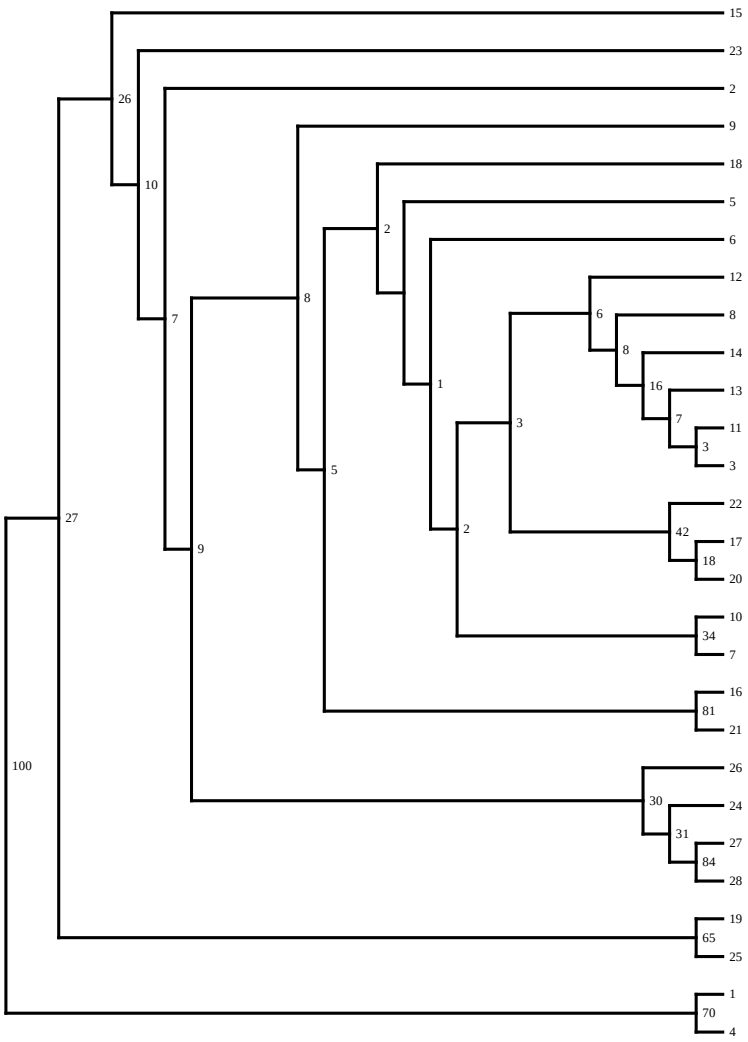
شکل ۱: ژل حاصل از ترکیب B2B3- *Taq*I در ۲۸ گونه درمنه. چاهک اول و آخر سایز مارکر kb plus ۱ (کمپانی فرمنتاز). نمونه شماره یک تا نمونه شماره ۲۸ (شماره گذاری از سمت چپ)



شکل ۲: موقعیت آغازگرها در ژنوم کلروپلاست تنیاکو. آغازگرهای مورد استفاده در موقعیت ۳۲ و ۳۴ (Grivet et al, 2001)

از ۲ نشانگر مورد استفاده در این آنالیز در مجموع ۵۲ نوار تولید شد که از این تعداد ۴۰ نوار چند شکلی نشان دادند (۷۷٪). دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه جاکارد به روش UPGMA روابط ژنتیکی میان ۲۸ گونه مربوط به گیاه دارویی درمنه را نشان داد. ضریب کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد r=۰/۸۹ به دست آمد که نمایانگر برازش مناسب دندروگرام به ماتریس تشابه بوده است. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار TreeView پایداری بالایی (۱۰۰-۵۵) را در تفکیک بعضی از گونه‌ها نشان داد. دندروگرام حاصل نمونه‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم کرد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه به ترتیب بیشترین تشابه با مقدار ۰/۹۴ میان گونه‌های *A. fragrans* و *A. annua* و کمترین تشابه را میان گونه‌های *A. absintium* و *A. armeniaca* با مقدار ۰/۳۲ نشان داد.

در بررسی فیلوژنی نمونه‌های درمنه مورد آزمایش گونه‌های *Artemisia annua*، *Artemisia scoparia*، *Artemisia siberi* و *Artemisia fragrans* دارای کمترین تکامل و *Artemisia austeriaca*، *Artemisia armeniaca* دارای حداکثر تکامل قابل تشخیص بودند. مطالعات متعدد در خصوص رابطه فیلوژنتیکی میان گونه‌های درمنه با استفاده از آغازگرهای کلروپلاستی دیگر از جمله ناحیه trnL–F و نیز آغازگرهای ITS در جهان انجام شده است. Torrellو همکاران (1999) و Valles و همکاران(2003) از قدرت تفکیک ITSها در بررسی روابط فیبوژنتیکی گونه‌های درمنه استفاده کردند. همانند این پژوهش، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ۲۱ گونه درمنه در کشور کره بر اساس توالی یابی ناحیه trnL-F نشان داده بود که نتایج مشابه الگوی باندهای حاصل از آنالیز PCR-RFLP است. نتایج نشان داد که از الگوهای باندی خاص گونه‌های *A. keiskeana*، *A. apiacea* و *A. sieversiana* می‌توان به عنوان یک مارکر خاص برای تمایز آن‌ها از دیگر گونه‌های درمنه استفاده کرد (Jeong et al, 2009). توالی یابی باندی خاص گونه‌های *oloveriana* *Artemisia*، *Artemisia marschelliana*، *Artemisia armeniaca* و *Artemisia austeriaca* می‌تواند راه مناسبی را برای دست-یابی به آغازگرهای مناسب جهت بررسی گونه‌های درمنه ایران باز کند.



شکل۳: دندروگرام ۲۸ گونه درمنه مورد بررسی با توجه به داده‌های پی.سی.آر-آر.اف.ال.پی که توسط نرم افزار TreeFree با ضریب تشابه جاکارد به دست آمده است.

منابع

Bertea, C.M., Freije, J.R., van der Woude. H., Verstappen, F.W.A., Perk, L., Marquez, V., De Kraker, J.W., Posthumus, M.A., Jansen, B.J.M., de, Groot, A., Franssen, M.C.R., Bouwmeester. H.J. 2005. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in Artemisia annua. Planta Med. 71: 40 - 7.

Grivet, D., Heizen, B., Vendramin, G.G., Petit, R.J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. Molecular Ecology Notes. 1: 345-349.

Jeong, H.L., Jei, W.L., Jung, S.S., Kyong, H.B., Sung, G.M. 2009. Molecular Authentication of 21 Korean *Artemisia* Species (Compositae) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Based on trnL–F Region of Chloroplast DNA. Biol. Pharm. Bull. 32(11) 1912—1916.

Kazemi, M., Dakhili, M., Rustaiyan, A., Larijani, K., Ahmadi, M.A., Mozaffarian, V. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of Artemisia tschernieviana Besser from Iran Pharmacognosy Research. 1:120-124.

Ma, C., Wang, H., Lu, X., Li, H., Liu, B., Xu, G. 2007. Analysis of Artemisia annua L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass . J. Chromatogr A. 50: 50 - 3.
Newton, K.J. 1988. Plant mitochondrial genomes: Organization, expression and variation. Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biology and Biotechnology. 39: 503-532.
Panda, S., Pedro Martin, J., Aguinaglde, I. 2003. Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. Genetic Resources and Crop Evolution. 50: 489-495.
Palmer, J.D. 1992. Mitochondrial DNA in plants systematics: Applications and limitations. In: Molecular Systematics of Plants (eds Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Doyle, W). pp. 36-49. Chapman and Hall, New York.
Pirttila, A.M., Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Jaakola, L., Hohtola, A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 273a-273f.
Torrell, M., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Valles, J. 1999. Infrageneric Phylogeny of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemidae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). Taxon 48: 721-736.

Valles, J., Torrell, M., Garnatje, T., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R., Susanna, A. 2003. Genus *Artemisa* and its allies, phylogeny of the subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemadea) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) Plant Biol. 5: 274-284.

Evaluation of variability of 28 Iran *Artemisia* species by PCR-RFLP based on PB and B2B3 region of chloroplast DNA

Elahe ahadi[1],* seied ali reza salami[2], majide shokrpour[2], aboozar soorni[1]

1,3MSc student of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran
2Associate Professor of department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Ira
*Corresponding author: elaheahadi@ut.ac.ir

Abstract

Artemisia is one of the largest and most widely distributed genus of Asteraceae. Thirty-four species belongs to this genus have been reported in Iran which a few of them are endemic. In order to investigate the variability and relationships of 28 *Artemisia* species from Iran PCR-RFLP was used based on PB and B2B3 regions of chloroplast genome. Among all primers were tested, two primers totally produced 40 high resolution polymorphic bands with the range of 200-1600 bp and 200-1400 bp for PB and B2B3 primers respectively. Cluster analysis based on the Jacard similarity coefficient and UPGMA method divided the 28 species into main three groups. The highest and the lowest similarity were obtained between A. fragrans and A. annua (0.94) and A. absintium and A. armeniaca (0.32) respectively.
Keywords: *Artemisia*, PB and B2B3 regions, PCR-RFLP, cpDNA