ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جنسی ژنوتیپ های بابونه ایران (*Matricaria spp, Anthemis* spp) با نشانگر مولکولی RAPD

محی الدین پیرخضری (۱)، حسنی محمد اسماعیل (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی ، دانشگاه تهران، ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

چکیده

در این مطالعه نشانگر RAPD برای تعیین سطوح تنوع بین ۱۹ ژنوتیپ بابونه ایران استفاده شد. ۱۰۰ آغازگر تصادفی برای واکنش PCR بکار رفت که ۱۶ تا از آنها چند شکلی مشخص نشان دادند. این آغازگرها ۲۱۸ باند ایجاد کردند که ۲۱۷ تا از آنها چند شکل بودند. تجزیه کلاستر ژنوتیپ ها بر اساس باندهای چند شکل RAPD، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA تشکیل شد. بالاترین و پایین ترین تشابه به ترتیب ۸۱٪ و ۱۳٪ بود و جنس ها وگونه ها به خوبی از هم تفکیک شدند. ضریب همبستگی کوفنتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام نسبتاً بالا است (r = ۹۶٪) که همبستگی خوب بین ماتریس تشابه و دندروگرام را نشان می دهد. نشانگر RAPD نشان داد که ابزار مناسبی برای مطالعه روابط ژنتیکی بابونه ها است.

واژه های کلیدی: ، تنوع ژنتیکی، بابونه، نشانگر مولکولی RAPD، *Matricaria* spp, *Anthemis* spp,

مقدمه

بابونه ها گیاهانی شامل چندین جنس و گونه از تیره کاسنی هستند. برای جنس آنتمیس ۴۷ گونـه و بـرای ماتریکاریـا ۲ گونه در ایران گزارش شده است (رشینگر ۱۹۸۶). تعدادی از بابونه ها گیاهان دارویی مهمی هستند (تیلر۱۹۸۸). مـصرف بابونه از گذشته دور در جهان مستند و در فارماکوپه های ۲۶ کشور آمده است (سالامون۱۹۹۲). دو گیاه بابونـه آلمـانی و رومی متداولترین گیاهان دارویی در بین بابونه ها هستند. بیشترین بررسی های علمی بر روی آنها صورت گرفته اسـت و ۱۲۰ ترکیب در آنها شناسایی شده که ۲۰ تا از آنها مشترک است (مان و استابا۱۹۸۶). در برنامـه هـای اصـلاحی دانـستن اطلاعات و طبیعت تنوع ژنتیکی ضرری است. روشها متداول انگشت نگاری ژنتیکـی ماننـد ایـزوزایم هـا و نـشانگرهای مبتنی بر DNA، ابزار نیرومندی برای مطالعات ژنتیکی هستند(گپس ۱۹۹۳). در بین نشانگرهای مولکـولی چنـد شـکلی DNA حاصل از تکثیر تصادفی(RAPD) بدلیل سادگی و سرعت بطور گسترده در بررسیهای تنوع ژنتیکـی، فیلـوژنی و سیستماتیک، نقشه های پیوستگی ژنتیکی و نشاندار کردن ژنها (ویلیامز وهمکاران۱۹۹۰، ولش و مکللن ۱۹۹۰) بکار رفته است. بیشتر مطالعات تنوع ژنتیکی بابونـه هـا بـر اسـاس صـفات مورفولـوژیکی و ترکیبـات شـیمیایی(تاویانـا ۲۰۰۱ و مارینهو۲۰۰۶) و خواص درمانی عمدتا بابونه آلمانی (مک کی ۲۰۰۶ و گوما۲۰۰۲) بوده است. تاکنون بررسی بین جنـسها و گونه های بابونه ایران بر اساس نشانگرDNA گزارش نشده است. مطالعه حاضر با هـدف تجزیـه برخـی ژرم پلاسـم بابونه های ایرانی و تعیین روابط خویشاوندی آنها با نشانگر RAPD صورت گرفت.

مواد و روش ها

بذر تعداد ۶ توده بابونه آلمانی از رویشگاههای طبیعی استانهای فارس و بوشهر و ۱۳ توده گونـه هـای مختلـف جـنس آنتمیس از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه و در آبان ماه ۸۵ در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه

تهران-کرج کشت گردید. استخراج DNA از برگهای تازه به روش مینی پرب موری وتامسون (۱۹۸۰) تغییر یافته بصورت بالک انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با بردن روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه الکترو فورز و همچنین با دستگاه اسپکترومتر بررسی گردید.از DNA استوک DNA کار به غلظت ۱۰ نانو گرم بر ماکرو لیتر تهیه گردید برای بررسی چند شکلی بین ژنوتیپهای از ۱۰۰ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلوتیدی سری TIB MOLBIOL(BA,BB,BC,BD,BD) استفاده شد. با بررسی تولید باندهای چند شکل روی سه ژنوتیپ آغازگرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند. از ۱۰۰ آغازگر ۱۸ تا تولید باندهای چند شکل با تکرار پذیری بالا نمودند که برای تکثیر قطعات DNA در دستگاه PCR استفاده شد. هرواکنش PCR در نشانگر RAPD با حجم ۱۵µl، شامل مخلوط آنزیم *Taq* دی ان ای پلیمراز با نام تجارتی Amplicon(محصول کشور دانمارک تهیه شده از شرکت آریا طب ژن -ایران) 2.0X شامل بافر واکنش PCR ، ۱/۵ mM $MgCl_2$، , dNTPs)به میزان ۷,۵ ماکرو لیتر، آغازگر ۱ ماکرو لیتر و۱ ماکرو لیتر (۱۰ ng) DNA الگو و ۵,۵ ماکرو لیتر آب مقطر استریل بود . شرایط PCR با چرخه های دمایی بصورت یک سیکل ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C و۱ دقیقه۹۲، تعداد ۵ سیکل به صورت ۳۹°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و تعداد ۳۵ سیکل به صورت ۹۲°C به مدت۳ دقیقه، ۳۷°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل۷۲°C به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل I-cycler انجام گردید. محصول حاصل در چاهکهای ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر TBE ریخته شد. نمونه ها به مدت ۱۳۰ دقیقه با جریان ۷۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از این مرحله ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵µg/L رنگ‌آمیزی شد و سپس شستشو درآب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه، بعد توسط دستگاه ژل داک قطعات تکثیر یافته دی ان ای تحت نور UV مشاهده و عکس برداری شدند. بعد از تشکیل ماتریس رتبه های یک و صفر، ماتریس تشابه ژنوتیپ ها با استفاده از نرم افزار NTsys (Ver 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکاردمحاسبه گردید. در نهایت تجزیه خوشه ای بر اساس ماتریس فواصل انجام شد و دندروگرام به روش UPGMA بدست آمد.

نتایج و بحث

برای بررسی چند شکلی DNA بین ژنوتیپ ها با استفاده از ۱۶آغازگر تصادفی در مجموع ۲۱۸ قطعه تولید کردند که ۲۱۷ قطعه چند شکل بود (۹۹,۵٪). تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای از ۷ عدد (TIB BE15) تا ۲۷ عدد (TIB BD16) با میانگین ۱۳,۶ قطعه در پرایمر بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگر ها در محدوده ۳۵۰۰-۳۰۰ جفت باز تخمین زده شد. تفاوت در شدت باند دهی در نظر گرفته نشده است. ضریب همبستگی کوفنتیکی که نشان دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه و دندوگرام می باشد۰(۹۶/۰= r) بدست آمد. نتایج ماتریس تشابه بین ۱۲/۰ تا ۸۱/۰ بود. تجزیه کلاستر روابط ژنتیکی بین گونه ها را نشان میدهد(شکل ۱). تجزیه PCo بمنظور تعیین روابط ژنتیکی بین ژنوتیپها انجام گرفت که تجزیه کلاستر و PCo نتایج بالا را تایید کردند. بر اساس PCoA حداقل تشابه ۱۲/۰ بین *Matricaria* chamomilla و *Anthemis tinctoria* بود. بالاترین تشابه بین توده های بابونه آلمانی *M. chamomilla*)) و سپس بین توده های بابونه رومی(*A. nobilis*) در سطوح ۲/۰ تا ۲۶/۰ مشاهده شد، این دو بابونه در ترکیبات اسانس نیز تشابهاتی دارند (مان واستابا ۱۹۸۶). تشابه بین توده های *M. chamomilla* در دامنه ۶۱/۰ تا ۸۱/۰ بود و برای *M. aurea* در سطح ۶۲/۰ مشاهده شد اما تشابه بین گونه های *M. chamomilla* و *M. aurea* در دامنه ۱۸/۰ تا ۲۷/۰ بود. بیشترین تشابه بین گونه های جنس آنتمیس بین *A. altissima* و *A. hyaline* مشاهده شد. تجزیه کلاستر نشان داد که RAPD قادر است گونه های مختلف بابونه را بخوبی از هم تفکیک کند. در مجموع گونه

های مورد بررسی در پنج کلاستر قرار گرفتند. در کلاستر A ۶ توده *M. chamomilla* قرار گرفتند و زیر کلاستر پراکنش جغرافیایی توده های فارس و بوشهر را تفکیک نمود. در کلاستر B و C گونه ها و جنسها بخوبی متمایزند. در کلاستر D *A. odonostephana,* *A. pyretrum* , و *A. sp* (ناشناخته برای بانک ژن) قرار گرفتند. در کلاستر های E و F گونه *Anthemis nibilis* با تشابه ژنتیکی ۱۹٪ قرار گرفته است. این گونه در نواحی مختلف ایران بطور گسترده میروید و بیشترین تنوع را در بین گونه های مورد بررسی به خود اختصاص داده است. این مطالعه نشان داد که RAPD ابزار مناسبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در ژنوتیپ های بابونه است.

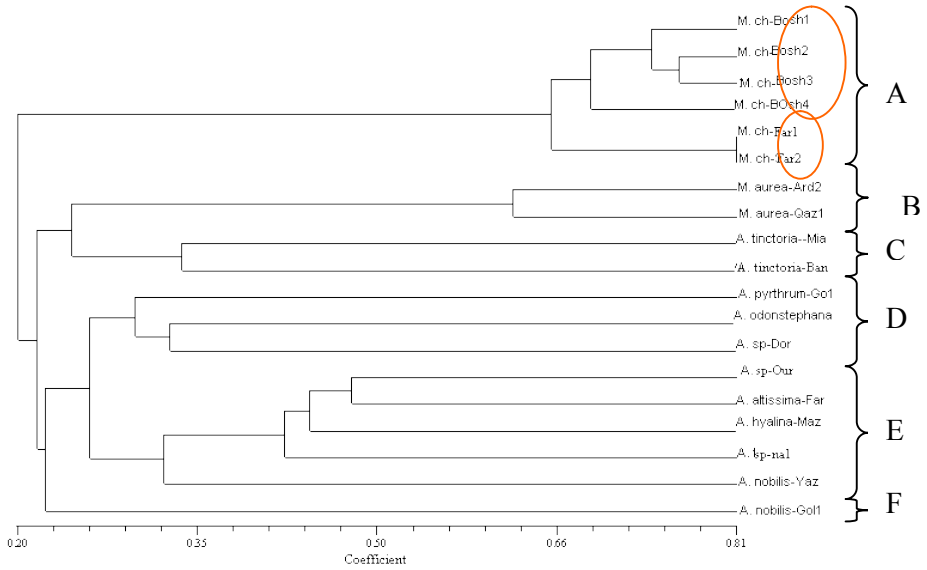
منابع:

Mann, C., and staba, E.j., 1986. The Chemistry, Pharmacology, and Commercial Formulation of Chamomile. Herbs Spices and Medicinal plants. p: 235-279

Marinho, M.P. De Biaggi, L.V. Klezia Morais S. B. Cid Aimbire, M. S. Almeriane, M. W.S., 2006, Comparison of chemical constituents of (*Chamomilla recutita*L.) rauschert essential oil and its anti-chemotactic activitry. Braz. Arch. Boil. Technol. 49 (5),

Salamon, I., 1992. Chamomile, A Medicinal Plant. The Herb, Spice, and Medicinal Plant Digest, 10:1-4.

Williams, J. G. K A. R., Kubelik, K. J., Livak, J. A., Rafalski and Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531–6535.



۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۱۹ توده بابونه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA

Assessment of inter- and intra-genus genetic diversity of Iranian chamomile genotypes using RAPD markers

Pirkhezri mohialdin[1], Hassani mohammad esmael[2]
1- Student of MSc horticulture, agriculture faculty, Tehran university 2- Assistant professor of horticulture department, agriculture faculty, Tehran University, karaj, Iran

Abstract
In this study RAPD markers were used to determine the diversity level among 19 Iranian chamomile genotypes. One hundred decamer random primers were used for PCR reactions, among which 16 showed reliable polymorphic patterns. These primers produced 218 bands, of which 21v were polymorphic. Cluster analysis of the genotypes was performed based on data from polymorphic RAPD bands, using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA clustering method. The highest and lowest similarities detected between genotypes were 0.81 and 0.13, respectively. Genuses and species at cluster analysis were considerably separated. Cophenetic correlation coefficient between similarity matrix and cophenetic matrix of dendrogram was relatively high (r=0.96) showing the goodness of fit of the dendrogram. RAPD markers showed to be a useful tool for studying the genetic relationship of chamomiles.

Keywords: Genetic diversity, chamomile, *Matricaria* spp, *Anthemis* spp, RAPD markers,