دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌های گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با استفاده از نشانگرهای ITS

پرویز حیدری[۱]، علی اشرف مهرابی[۲] و علی اصغر نصراله نژاد قمی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: hidarip@yahoo.com)
۲- استادیار، دانشگاه ایلام
۳- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۳۰

چکیده

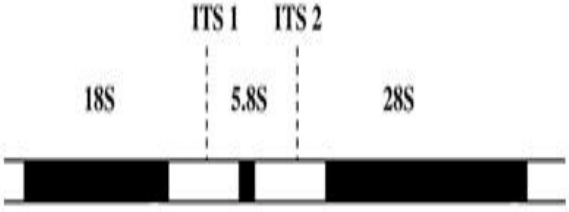
بادرنجبویه گیاهی دارویی، چند ساله و از خانواده نعناعیان می‌باشد. در این تحقیق، جهت بررسی تنوع ژنتیکی، ۱۴ توده از گیاه بادرنجبویه به همراه دو توده از گیاهان بادرشبو و ریحان (به عنوان گیاهان خارج از گروه) مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور مطالعه تنوع درون و بین توده‌های بادرنجبویه از نواحی ITS (توالی‌های فاصله‌انداز رونوشت) جهت طراحی نشانگر استفاده شد. همچنین با استفاده از چهار آنزیم Taq1، EcoR v، BssM1 و AspLE1 تنوع موجود در توالی قطعات تکثیر شده بررسی شد. نتایج نشان داد که آنزیم BssM 1 نسبت به دیگر آنزیم‌ها، چند شکلی بیشتری را در تعداد و طول قطعات حاصل از هضم نشان می‌دهد. نتایج آزمون مانتل نشان داد که ماتریس عدم تشابه دایس و الگوریتم نزدیکترین همسایه (N.J) بالاترین همبستگی جهت آنالیز اطلاعات را دارند. بیشترین میزان عدم تشابه به روش دایس در بین توده‌های بادرنجبویه، استان اصفهان و توده استان قزوین با ۰/۴۴ فاصله و کمترین میزان عدم تشابه بین توده‌های زنجان، تهران و کرج مشاهده شد که کاملاً مشابه هم بودند. در پنج توده بادرنجبویه (ایلام، شیراز، تبریز، قزوین و اصفهان) تنوع درون توده‌ای مشاهده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای توده‌ها را در هشت گروه مجزا تفکیک نمود و گیاه ریحان در مقایسه با بادرشبو فاصله ژنتیکی کمتری در توالی ITS با بادرنجبویه داشت.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه، نشانگرهای ITS، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

مقدمه

در میان تمام خانواده‌های گیاهی، نعناعیان[1] دارای بیشترین گونه‌های گیاهی دارویی می‌باشند. از جمله گیاهان این خانواده، بادرنجبویه[2] می‌باشد که خواص بسیار زیادی نظیر خاصیت مسکن، تب‌بر، ضد نفخ، ضد ویروسی و قارچی دارد. روغن‌های ضروری (اسانس‌ها) این گیاه به عنوان عوامل ضد تشکیل تومور شناخته شده‌اند (۶،۵). از نشانگرهای مولکولی برای بررسی خصوصیات ژرم پلاسم، شناسایی ژنتیکی گیاه، مطالعه ژنوم، تجزیه فیلوژنتیکی و ... استفاده می‌شود. نشانگرهای آی‌تی‌اس[3] بر مبنای نواحی داخلی فاصله انداز رونوشت‌ها قرار دارند و جزء مناطق مهم کروموزومی هستند که در کنار مناطق ژن‌های ریبوزومی قرار دارند (شکل ۱) و می‌توان از آنها به عنوان آغازگرهای همگانی (عمومی)[4] جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی بین و درون گونه‌ها استفاده نمود. نواحی آی‌تی‌اس جزء مناطقی از ژنوم هستند که در طی تکامل حفظ شده‌اند[5] (۱۰،۴).



شکل ۱- مناطق آی‌تی‌اس و محل قرارگیری در کنار ژن‌های ریبوزومی

از نواحی آی تی‌اس جهت بررسی سویه‌های جدید عوامل بیماری‌زا و همچنین روابط خویشاوندی در بین جانوران استفاده شد (۱۲،۴،۱). در پژوهشیاز طریق توالی‌یابی نواحی آی‌تی‌اس تنوع درون گروهی *Erysiphe aquilegia* (۷) و همچنین تنوع گونه‌های جنس *Fasciolidae* (۲) مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد آی‌تی‌اس‌ها توانایی لازم جهت تفکیک زیر گونه‌ها را از یکدیگر دارا می‌باشند. با تکثیر نواحی آی‌تی‌اس و هضم قطعات تکثیر شده، ۲۰ نمونه باقلا از هم تفکیک گردید (۱۴). با بررسی تنوع مورفولوژی و توالی‌یابی مناطق آی‌تی‌اس، جنس *Salvia* از خانواده نعناعیان گروه‌بندی شد، که بادرنجبویه فاصله ژنتیکی زیادی با جنس مذکور داشت (۱۵). با توجه به بررسی‌های انجام شده در زمینه مصارف داروئی و صنعتی گیاه بادرنجبویه، این گیاه می‌تواند به عنوان یک گیاه ارزشمند برای مطالعات و

1- *Labiateae*
2- *Melissa*
3- Internal transcribed spacer (ITS)
4- Universal
5- Conserve

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

پژوهش‌های اصلاحی مطرح باشد. بنابراین به نژادی گیاهی به منظور اهلی سازی و حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه ارزشمند، امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به مطالب فوق و اینکه نواحی کوهستانی در دامنه دو رشته کوه زاگرس و البرز و نواحی مرکزی ایران مناطق پراکنش و تنوع توده‌های گیاهان دارویی محسوب می‌شود. این تحقیق روی گیاه بادرنجبویه برای دستیابی بهوضعیت و ساختار تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های بادرنجبویه و همچنین امکان تمایز، طبقه‌بندی و تعیین روابط توده‌هابه کمک سطح چند شکلی در نشانگرهای آی‌تی‌اس ژن‌های ریبوزومی از اهداف مهم دیگری هستند که در این تحقیق دنبال می‌شوند.

مواد و روش‌ها

بذر ۱۴ توده مختلف گیاه بادرنجبویه به همراه دو توده ریحان و بادرشبو (گیاهان خارج از گروه)[1] از بانک بذر، باغ گیاهشناسی ایران واقع در موسسه جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شد (جدول۱). بعد از کشت همه نمونه‌ها و جوانه زدن آنها و رسیدن به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری، از همه نمونه‌ها DNA استخراج شد.

جدول ۱- مشخصات توده‌های بادرنجبویه استفاده شده در این تحقیق

توده	محل جمع‌آوری	شماره شناسه در بانک بذر	توده	محل جمع‌آوری	شماره شناسه در بانک بذر
۱	زنجان	-	۹	قزوین	۲۳۷۶۶
۲	ارومیه	-	۱۰	کرج	۳۸۷۷
۳	ایلام	-	۱۱	اصفهان – نجف آباد	۲۸۳۲۳
۴	کرمانشاه – سلام آباد غرب	-	۱۲	خراسان شمالی	۲۳۵۶
۵	کردستان – کامیاران	۲۲۵۹۵	۱۳	همدان	۱۴۳۲۰
۶	تهران – دماوند	۶۹۸۶	۱۴	اردبیل	۸۳۹۷
۷	تبریز	۱۵۳۸۳	۱۵	مازندران – لاهیجان*	۱۱۳۱
۸	شیراز	۱۷۹۰۱	۱۶	قزوین**	۱۷۰۶۹ و ۲۳۷۵۶

* مربوط به گیاه بادرشبو ** مربوط به گیاه ریحان

جهت بررسی تنوع درون توده‌ای از هر توده دو بوته انتخاب و استخراج DNA از بوته‌ها صورت گرفت و با اعداد ۱ و ۲ نشان داده شدند. روش استخراج DNA ژنومی بر اساس روش CTAB صورت گرفت (۹). کمیت وکیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین گردید. واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل دو میکرولیتربافر واکنش PCR، یک میکرولیتر Mg CL2، یک میکرولیتر مخلوط dNTP 1x، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، یک واحد آنزیم Taq (smartaq شرکت سیناکلون)، یک میکرولیتر

1- Out group

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

DNA الگو و حجم واکنش با آب استریل دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر رسید. شرایط PCR با چرخه‌های دمایی (جدول ۲) با نرمال سایکر شرکت Bio-Rad مدل I-Cycler انجام گردید. نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر اساس توالی آی‌تی‌اس موجود در بانک ژن و با استفاده از نرم افزار الیگو[1] طراحی (جدول ۲) و از شرکت تکاپوزیست تهیه گردیدند. در کل سه نوع نشانگر طراحی شد که هر کدام شامل یک آغازگر رفت[2] و یک آغازگر برگشت[3] بود (جدول ۲). پس از انجام واکنش PCR، پنج میکرولیتر از محلول PCR به همراه پنج میکرولیتر بافر بارگذاری در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر تی‌بی‌ای[4] ریخته شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت با جریان ۹۰ ولت الکتروفورز شدند. سپس ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/l رنگ آمیزی شد و قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور ماوراءبنفش مشاهده و عکسبرداری از ژل[5] صورت گرفت. جهت بررسی چند شکلی در داخل مناطق آی‌تی‌اس از آنزیم‌های برشی استفاده شد. جهت بالا بردن اطمینان از انتخاب صحیح آنزیم‌های برشی، از نرم‌افزار آنلاین webcutter استفاده شد و آنزیم‌های انتخاب شدند که در داخل مناطق آی‌تی‌اس جایگاه برش را داشته باشند (جدول ۳). هر آنزیم برشی با بافر نوع A رقیق شد و بعد از تهیه بافر واکنش، به هر ۱۵ میکرولیتر محصول PCR، ۱۰ واحد آنزیم برشی اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای مربوطه (جدول ۳) نگهداری شد.

سپس محصول برش بوسیله الکتروفورز با ژل پلی‌آکریلامید تفکیک گردید. الگوی الکتروفورزی آی‌تی‌اس‌های تکثیر شده و برش خورده روی ژل اکریل آمید تهیه و به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) نمره‌دهی شد. اطلاعات نمره‌دهی توده‌ها در نرم‌افزار EXCEL ذخیره و به فرمت قابل استفاده در نرم‌افزار DARwin 2006 تبدیل شد.

جدول ۲- توالی نشانگرهای مورد استفاده

نشانگر	منبع گیاهی	کد توالی در بانک ژن	توالی Forward 5′ ⟶ 3′	توالی Reverse 5′ ⟶ 3′
۱	باقلا	-	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG	AAAGACTCGATGGTTCACG
۲	ریحان	DQ667240	CTGGGGTCGCGGTCGA	GAGGAAGGAGAAGTGGTAACAAG
۳	بادرنجبویه	DQ667291	TATCATTTAGAGGAAGGA	GATATGCTTAAACTCAGC

1- Oligo software 2- Forward 3- Reverse 4- Tris Boric Acid EDTA (TBE) 5- Gel ducument

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

جدول ۳- آنزیم‌های برشیمورد استفاده به همراه جایگاه برش و دمای بهینه فعالیت آنها

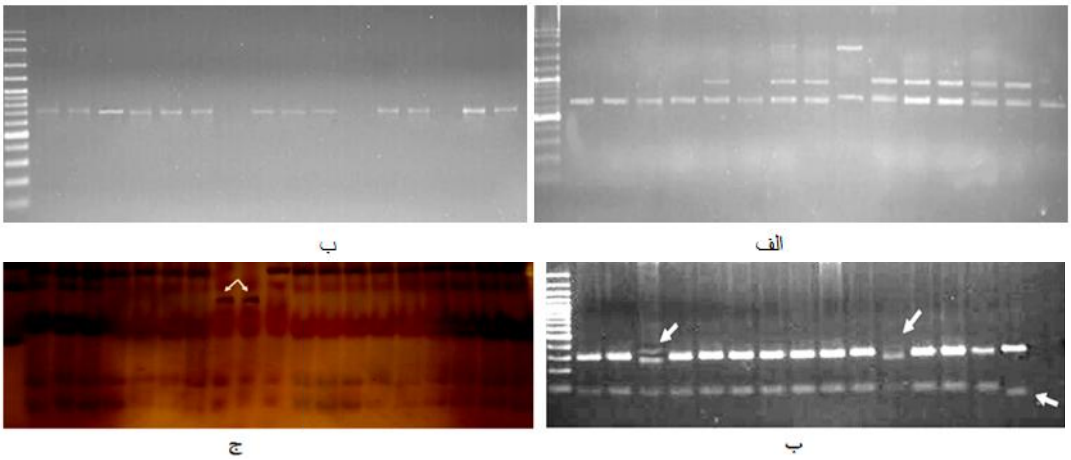
آنزیم برشی	جایگاه شناسایی	دمای فعالیت
Taq 1	5 ……TCGA…..3 3 ……AGCT…..5	۶۵ درجه سانتی‌گراد
EcoR v	5 ……GATATC…..3 3 ……CTATAG…..5	۳۷ درجه سانتی‌گراد
AspLE 1	5 ……GCGC…..3 3 ……CGCG…..5	۳۷ درجه سانتی‌گراد
BssM 1	5 ……GATC…..3 3 ……CTAG…..5	۳۷ درجه سانتی‌گراد

ماتریس عدم تشابه توده‌ها بر اساس روش‌های دایس و جاکارد (۱۱،۸) محاسبه و برای هر کدام از این ماتریس‌ها با استفاده از الگوریتم‌های نزدیک‌ترین همسایه‌ها (N.J) و UPGMA دندروگرام تهیه شد. تطابق درخت‌های ترسیم شده با ماتریس‌های عدم تشابه با استفاده از نرم افزار XLSTAT و آزمون مانتل انجام شد و بهترین ماتریس فاصله و درخت گزارش گردید. درخت مطلوب با استفاده ازنرم‌افزار MEGA5 بازسازی و گزارش گردید.

نتایج و بحث

با توجه به حفاظت شدگی مناطق آی‌تی‌اس توالی نشانگر شماره یک از توالی (آی‌تی‌اس ۱) گیاه باقلا استفاده شد و نتایج PCR با پرایمرهای این توالی و الکتروفورز با ژل آگاروز ۱/۵ درصد، نشان داد که در همه توده‌ها یک قطعه به طول تقریباً ۴۰۰ جفت بازی تکثیر و هیچ گونه چند شکلی مشاهده نگردید (شکل ۴) طول قطعه تکثیر شده با نتایج براسیلیرو و همکاران (۴) مطابقت داشت. نتایج هضم نشان داد که در داخل قطعات تکثیر شده چند شکلی وجود دارد (شکل۲- ب و ج) که آنزیم BssM 1 نسبت به دیگر آنزیم‌ها، چند شکلی بیشتری را در تعداد و طول قطعات حاصل از هضم نشان داد. نتایج PCR با نشانگرهای دو و سه چند شکلی در توده‌های بادرنجبویه را نشان داد و قطعات به طول ۷۰۰ باز را تکثیر نمودند (شکل ۳ الف و ب). با توجه به اینکه این نشانگرها (دو و سه) از توالی‌های ناقص موجود در بانک ژن طراحی گردیدند توانستند مناطقی دیگری را تکثیر نمایند. طبق امتیازبندی از باندهای تولید شده، آنالیز داده‌ها صورت گرفت. نتایج آزمون مانتل نشان داد که ماتریس عدم تشابه حاصل از روش دایس با ماتریس حاصل از الگوریتم نزدیکترین همسایه بیشترین همبستگی را دارند. (جدول ۴).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]



شکل ۲- تکثیر با نشانگر شماره یک (الف)، چند شکلی در نواحی ITS هضم شده با آنزیم EcoR V (ب) و Taq 1 (ج).
شکل ۳- چند شکلی در طول نواحی ITS تکثیر شده با نشانگر شماره دو (الف) و نشانگر شماره سه (ب)

جدول ۴- ضرایب کوفنتیک محاسبه شده با آزمون مانتل

	الگوریتم‌های ترسیم درخت	
ماتریس عدم تشابه	Neighbor Joining	UPGMA
Dice	r = 0.985**	r= 0.970**
Jaccard	r = 0.977**	r= 0.958**

** همبستگی کوفنیک معنی‌دار در سطح یک درصد

ساختار تنوع توده‌های بادرنجبویه

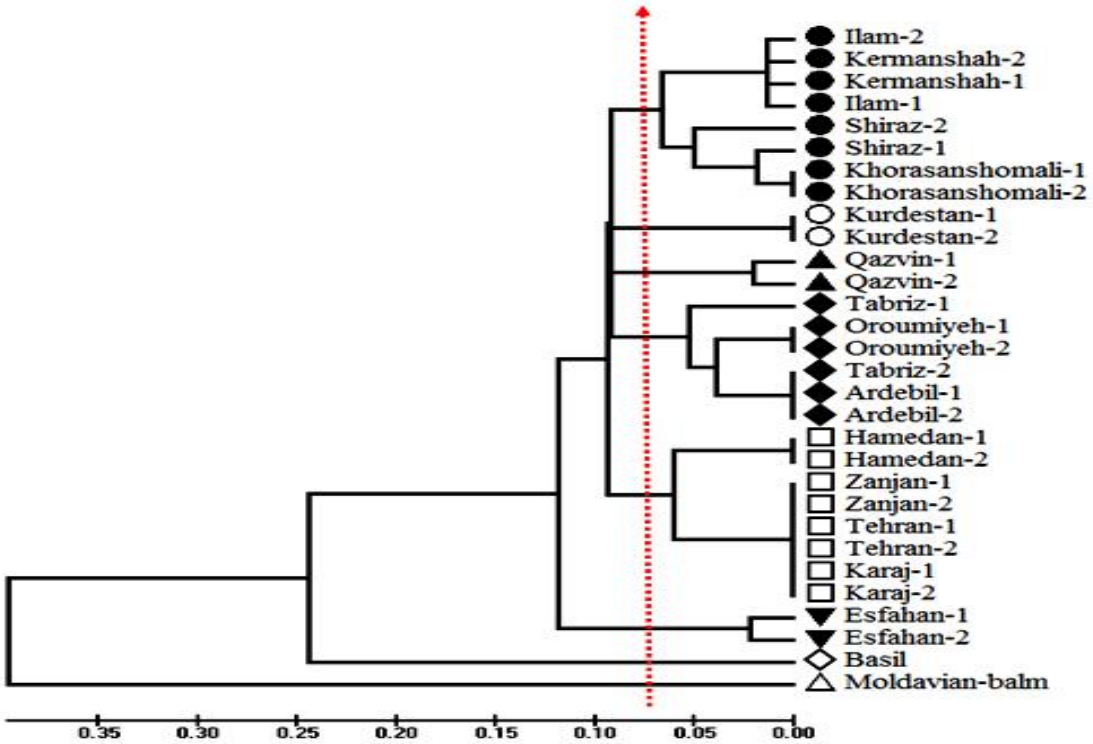
بیشترین میزان عدم تشابه در روش دایس برای توده‌های بادرنجبویه، بین توده استان اصفهان و توده استان قزوین مشاهده شد و کمترین میزان عدم تشابه بین توده‌های زنجان، تهران و کرج مشاهده شد که کاملاً مشابه هم بودند (جدول ۵). نتایج نشان داد (جدول ۵) که بیشترین تنوعدرون توده‌ای متعلق به توده‌های ایلام و شیراز می‌باشد. که این نتایج مشخص نمود که این توده‌ها دارای تنوع بیشتری نسبت به سایر توده‌های دیگر می‌باشند. برای دیگر توده‌ها تنوع درون جمعیت (توده) بالایی مشاهده نگردید.

گروه‌بندی توده‌های بادرنجبویه

گروه بندی ۱۴ توده بادرنجبویه به همراه دو توده خارج از گروه با استفاده از ماتریس عدم تشابه روش دایس و بوسیله الگوریتم نزدیکترین همسایه نشان داد توده‌ها در فاصله ژنتیکی نزدیکی به همدیگر می‌باشند (شکل ۲). از طریق محاسبه تابع تشخیص، کلیه توده‌ها در هشت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

گروه مجزا قرار گرفتند. محاسبه متوسط فاصله خالص میان گروه‌ها جهت برآورد میزان نزدیکی گروه‌ها به همدیگر نشان داد که دو گروه چهار و یک با ۰/۱۵ عدم تشابه دارای کمترین فاصله (بیشترین قرابت) و بیشترین فاصله بین گروه سه و گروه هشت (بادرشبو) با ۰/۸۸ فاصله وجود داشت. در گروه‌بندی بین توده‌های بادرنجبویه (بدون در نظر گرفتن دو توده خارج از گروه)، گروه‌های سه و شش با ۰/۴۲ فاصله دارای بیشترین فاصله بین گروهی (قرابت کمتر) بودند. در واقع بین توالی‌های آی‌تی‌اس این توده‌ها تفاوت کمی وجود دارد. بیشترین فاصله درون گروهی مربوط به گروه یک می‌باشد که ۰/۰۷ فاصله یا عدم تشابه درون گروهی را دارا می‌باشد. با توجه به این گروه‌بندی قرابت توده‌های زاگرس مرکزی با نمونه‌های شمال غرب و شمال شرق کشور و همچنین تنوع اندک در نمونه‌های مرکز کشور حاکی از تنوع بیشتر در مناطق زاگرس مرکزی است که در جمع‌آوری ژرم پلاسم بایستی به این نکته توجه شود. همچنین با توجه به دندوگرام (شکل ۴)، نمونه‌های اصفهان و شیراز با هم فاصله زیادی دارند و همچنین بین نمونه اصفهان و ایلام نیز فاصله ژنتیکی زیادی است پس مناطق اصفهان نیز به عنوان مرکز ثانویه این گیاه بایستی مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۴- گروه بندی ۱۴ توده بادرنجبویه، همراه با دو توده خارج از گروه با استفاده الگوریتم نزدیکترین همسایه بر اساس ماتریس عدم تشابه دایس

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

جدول ۵- ماتریس عدم تشابه به روش دایس برای توده‌های بادرنجبویه

Dice		زنجان		ارومیه		ایلام		کرمانشاه		کردستان		تهران		تبریز		شیراز		قزوین		کرج		اصفهان		خراسان شمالی		همدان		اردبیل		بادرشبو
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
زنجان	2	0.00																												
ارومیه	1	0.20	0.20																											
	2	0.20	0.20	0.00																										
ایلام	1	0.15	0.15	0.12	0.12																									
	2	0.23	0.23	0.20	0.20	0.07																								
کرمانشاه	1	0.15	0.15	0.12	0.12	0.00	0.08																							
	2	0.15	0.15	0.12	0.12	0.00	0.08	0.00																						
کردستان	1	0.28	0.28	0.25	0.25	0.12	0.20	0.12	0.12																					
	2	0.28	0.28	0.25	0.25	0.12	0.20	0.12	0.12	0.00																				
تهران	1	0.00	0.00	0.20	0.20	0.15	0.23	0.15	0.15	0.28	0.28																			
	2	0.00	0.00	0.20	0.20	0.15	0.23	0.15	0.15	0.28	0.28	0.00																		
تبریز	1	0.19	0.19	0.15	0.15	0.19	0.26	0.19	0.19	0.23	0.23	0.19	0.19																	
	2	0.11	0.11	0.08	0.08	0.11	0.19	0.11	0.11	0.23	0.23	0.11	0.11	0.07																
شیراز	1	0.15	0.15	0.12	0.12	0.08	0.15	0.08	0.08	0.20	0.20	0.15	0.15	0.19	0.11															
	2	0.23	0.23	0.20	0.20	0.15	0.23	0.15	0.15	0.20	0.20	0.23	0.23	0.19	0.19	0.08														
قزوین	1	0.20	0.20	0.25	0.25	0.28	0.36	0.28	0.28	0.17	0.17	0.20	0.20	0.23	0.23	0.28	0.28													
	2	0.23	0.23	0.28	0.28	0.31	0.39	0.31	0.31	0.20	0.20	0.23	0.23	0.26	0.26	0.23	0.23	0.04												
کرج	1	0.00	0.00	0.20	0.20	0.15	0.23	0.15	0.15	0.28	0.28	0.00	0.00	0.19	0.11	0.15	0.23	0.20	0.23											
	2	0.00	0.00	0.20	0.20	0.15	0.23	0.15	0.15	0.28	0.28	0.00	0.00	0.19	0.11	0.15	0.23	0.20	0.23	0.00										
اصفهان	1	0.20	0.20	0.25	0.25	0.20	0.28	0.20	0.20	0.33	0.33	0.20	0.20	0.31	0.23	0.20	0.28	0.42	0.44	0.20	0.20									
	2	0.17	0.17	0.22	0.22	0.17	0.25	0.17	0.17	0.30	0.34	0.17	0.17	0.28	0.20	0.17	0.25	0.39	0.42	0.17	0.17	0.04								
خراسان شمالی	1	0.19	0.19	0.15	0.15	0.11	0.19	0.11	0.11	0.23	0.23	0.19	0.19	0.21	0.14	0.04	0.11	0.31	0.26	0.19	0.19	0.23	0.20							
	2	0.19	0.19	0.15	0.15	0.11	0.19	0.11	0.11	0.23	0.23	0.19	0.19	0.21	0.14	0.04	0.11	0.31	0.26	0.19	0.19	0.23	0.20	0.00						
همدان	1	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	0.20	0.12	0.12	0.17	0.17	0.12	0.12	0.15	0.15	0.20	0.20	0.25	0.28	0.12	0.12	0.25	0.22	0.23	0.23					
	2	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	0.20	0.12	0.12	0.17	0.17	0.12	0.12	0.15	0.15	0.20	0.20	0.25	0.28	0.12	0.12	0.25	0.22	0.23	0.23	0.00				
اردبیل	1	0.11	0.11	0.08	0.08	0.11	0.19	0.11	0.11	0.23	0.23	0.11	0.11	0.07	0.00	0.11	0.19	0.23	0.26	0.11	0.11	0.23	0.20	0.14	0.14	0.15	0.15			
	2	0.11	0.11	0.08	0.08	0.11	0.19	0.11	0.11	0.23	0.23	0.11	0.11	0.07	0.00	0.11	0.19	0.23	0.26	0.11	0.11	0.23	0.20	0.14	0.14	0.15	0.15	0.00		
بادرشبو		0.78	0.78	0.88	0.88	0.78	0.89	0.78	0.78	0.76	0.76	0.78	0.78	0.79	0.79	0.78	0.78	0.88	0.89	0.78	0.78	0.76	0.75	0.79	0.79	0.76	0.76	0.79	0.79	
ریحان		0.47	0.47	0.56	0.56	0.47	0.58	0.47	0.47	0.44	0.44	0.47	0.47	0.50	0.50	0.47	0.47	0.56	0.58	0.47	0.47	0.44	0.41	0.50	0.50	0.44	0.44	0.50	0.50	0.64

توده‌های قزوین و اصفهان دارای میزان عدم تشابه بیشتری نسبت به سایر توده‌ها بودند. داشتن فاصله ژنتیکی زیاد در گیاهان یک گونه یک مزیت جهت تولید هیبریدهای پرعملکرد و مشاهده هتروزیس بیشتر است (۱). در دو گیاه خارج از گروه (بادرشبو و ریحان) تعداد باندهای مشترک کمتری با توده‌های بادرنجبویه تولید کردند که می‌تواند به علت تفاوت در جایگاه برش توالی‌ها یا در اثر تغییرات کروموزومی مانند: جابجایی‌ها، معکوس شدن و یا جهش باشد (۱۳). طبق دندروگرام بدست آمده توده‌های ارومیه، تبریز و اردبیل در یک خوشه قرار گرفتند و با توجه به اینکه توده‌های این مناطق دارای شرایط آب و هوایی تقریباً مشابهی هستند پس نواحی آی‌تی‌اس در طول زمان تغییرات زیادی نکرده‌اند (۳). توده سه که از استان ایلام جمع آوری شده با توده چهار از استان کرمانشاه قرابت زیادی با هم دارند و با

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

توجه به اینکه توده سه دارای تنوع درون توده‌ای می‌باشد، احتمال می‌رود که منشاء توده‌های کرمانشاه از ایلام باشند.

بررسی موجود نشان داد که آی‌تی‌اس‌ها توانایی تفکیک زیر گونه‌ها و ژنوتیپ‌های درون یک جمعیت را از یکدیگر دارا هستند. همانطوریکه قبلا ذکر شد نواحی فاصله انداز رونوشت‌های ژن‌های ریبوزومی جزء توالی‌های هستند که بصورت حفاظت شده‌ای در طی تکامل باقی مانده است این موضوع با استفاده نمودن از توالی آی‌تی‌اس باقلا به‌عنوان نشانگر در تفکیک توده‌های بادرنجبویه آشکار شد (۱۴). به علت توالییابی ناقص از نواحی آی‌تی‌اس بادرنجبویه و ریحان (الگوهای طراحی نشانگر دو و سه) چند شکلی در طول قطعات تکثیر شده مشاهده گردید. تغییر در داخل مناطق آی‌تی‌اس باعث تفاوت در جایگاه برش آنزیم و ایجاد چند شکلی گردید. این تغییرات می‌تواند در اثر شرایط آب و هوایی یک منطقه نسبت به منطقه دیگر متفاوت باشد (۳) و باعث گردید توده‌های از مناطق مختلف از یکدیگر تفکیک گردند (شکل ۴). با توجه به نتایج بدست آمده توده‌های ایلام، تبریز، شیراز و اصفهان دارای تنوع بیشتری نسبت به سایر توده‌ها هستند بنابر نظریه واویلوف، منشاء یا خواستگاه اولیه گیاهان متعلق به مراکزی است که بیشترین تنوع را دارا هستند (۱). لذا ضرورت دارد در جمع‌آوری ژرم‌پلاسم بادرنجبویه به این مناطق جغرافیایی کشور توجه بیشتری شود. با توجه به اینکه اکثر ژن‌های عامل مقاومت به بیماری‌ها، آفات، تنش‌های محیطی و ژن‌های عامل کیفیت محصول معمولاً در مراکز تنوع یافت می‌شوند، بنابراین به‌نژادگران با در دست داشتن اطلاعات صحیح و دقیق از تنوع ژنتیکی هر گیاه می‌توانند با کارآیی بیشتری نسبت به بهره‌برداری از منابع ژنتیکی مبادرت ورزیده و مستقیماً به جمع‌آوری ذخایر توارثی مورد نیاز اقدام کنند. به علاوه چنین اطلاعاتی منجر به توجه به نژداگران و دست‌اندر کاران حفظ منابع گیاهی به مسئله تنوع زیستی شده و باعث می‌شود که مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از همکاری بانک بذر، باغ گیاه‌شناسی ایران و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام تشکر می‌گردد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

منابع

1. Adams, B.J., A.M. Burnell and T.O. Powers. 1998. A phylogenetic analysis of Heterorhabditis (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. Nematol, 30: 22-29.
2. Adlard, R.D., S.C. Barker, D. Blair and T.H. Cribb.1993. Comparison ofthe second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). International Journal for Parasitological, 23: 423-425.
3. Ainouche, A.K. and R.J. Bayer.1999. Phylogenetic relationships in Lupinus (Fabacea: Papilionoideae) Based on internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. American Journal of Botany, 86(4): 590-607.
4. Brasileiro, B., M. Coimbra, J.M. Morais and N.T. de Oliveira. 2004. Genetic variability within Fusariumsolani species as revealed by PCR-Fingerprint based on PCR-markers. Brazilian Journal Microbial, 35: 205-210.
5. Carnal, A.P., A. Camat, D. Fraisse and J.L. Lamaison. 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L, subsp, officinalis) tea, *Pharm.* ActaHeIv, 72: 301-305.
6. Chambers, L.H. 1961. Chromosome numbers and breeding systems in Pycnanthemum (LABIATAE). BRITTONIA, 13: 116-128.
7. Cunnington, H.J., C.A. Lawrie and G.I. Pascoe. 2004. Unexpected ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence variation within Erysipheaquilegiaesensulato. Fungal Diversity, 16: 1-10.
8. Dice, L.R. 1945. "Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species". *Ecology*, 26(3): 297-302.
9. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantitiesof fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
10. Gultepe, M., U. Uzuner, K. Coskuncelebi, A.S. Belduz and S. Terzioglu. 2010. Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild*Primula*(Primulaceae) taxa of Turkey.Turkish Journal of Botany, 34: 147-157
11. Jaccard, P. 1901. "Étude comparative de la distribution floraledansune portion des Alpes et des Jura", *Bulletin de la SociétéVaudoise des Sciences Naturelles*, 37: 547-579.
12. Joseph, N., E. Krauskopf, M.I. Vera and B. Michot. 1999. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. Nucleic Acids Research, 27: 4533-4540.
13. Kessler, C. and V. Manta.1990. Specificity of restriction end onus cleanses and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3). Gene, 92(1-2): 1-248.
14. Souframanien, J., J. Archana and T. Gopalakrishna. 2003. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer region of rDNA in black gram (Vignamungo (L,) Hepper). CURRENT SCIENCE, 85(6): 798-802.
15. Walker, J.B. and K.J. Sytsma. 2007. Staminal Evolution in the Genus Salvia (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic Evidence for Multiple Origins of the Staminal Lever. Annals of Botany, 100: 375-391.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

Genetic Diversity of Balm (*Melissa Officinalis* L.) Landraces and Genetic Relationship Within and Between Them using ITS Markers

Parviz Haidari[1], Ali Ashraf Mehrabi[2] and Ali Asghar Nasrollah Nejad Ghomi[3]

1- Ph.D Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: hidarip@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Ilam University
3- Assistant Professor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: November 4, 2012 Accepted: July 21, 2013

Abstract

The lemon balm (*Melissa officinalis* L.) a perennial medicinal plant, of Labiateae family is grown in the most parts of Iran and it has shown the sedative, hypnotic, analgesic, antiviral and antimicrobial effects. In present study, genetic diversity of 14 landraces of balm with two out group landraces (basil and moldavian balm) was investigated. Study variation within and between landraces of balm ITS (Internal Transcribed Spacer) region was used to design markers. Also four enzymes Taq1, EcoR v, BssM1 and AspLE1 were used for investigating polymorphism in ITS region. Enzyme BssM1 showed the polymorphism in number and length of digested fragments better than other enzymes. Mantel test results showed that the most correlation was existed between of dice dissimilarity matrix and Neighbor joining algorithm for data analysis. Among balm landraces highest degree of dissimilarity (0.44) was observed from Esfahan and Qazvin landraces and the lowest from 1, 6 and 10 landraces were quite identical. Diversity was observed just for five of landraces (3, 7, 8, 9 and 11). Results of cluster analysis separated landraces on eight groups and Basil genetic distances were less than moldavian balm to the balm and highest distance between groups 3 and 6 with 0.42 and the most similarity was between groups 1 and 4 (dissimilarity=0.15).

Keywords: Lemon balm, ITS Markers, Genetic diversity, Cluster analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]