دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.) با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی

هادی مهدیخانی[۱]، محمود سلوکی[۲] و حسین زینلی[۳]

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد، (نویسنده مسوول: hmehdikhani@gmail.com)
۲- دانشیار دانشگاه زابل
۳- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

بابونه یکی از مهمترین گیاهان دارویی در عرصه تجارت جهانی است که ناشی از کاربردهای فراوان آن در صنایع دارویی و بهداشتی است. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی بابونه با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه‌تصادفی، ۱۶ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip. که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود مورد استفاده قرار گرفت. ۲۲ آغازگر تصادفی RAPD و ۲۲ آغازگر نیمه تصادفی طراحی شده بر اساس مکان‌های هدف اینترون (IT) و اگزون (ET) با توالی‌های ۱۵ و ۱۸ جفت نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت. دامنه تعداد نوارهای چند شکل تولیدی توسط آغازگرهای تصادفی بین ۱۳-۵ و توسط آغازگرهای نیمه تصادفی بین ۲۱-۶ بود. برای تعیین تشابه بین توده‌های بومی از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد و گروه‌بندی توده‌های بومی به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس هر دو گروه آغازگرها، توده‌های بابونه را به سه گروه تقسیم کرد. بر اساس ماتریس تشابه در هر دو گروه آغازگرها، توده تبریز کمترین میزان تشابه را با سایر توده‌های بومی مورد مطالعه داشت. مقایسه آماری بین دو گروه آغازگر تصادفی و نیمه تصادفی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه آغازگر از نظر تشکیل نوار و ایجاد چند شکلی وجود دارد. توانایی و کارآیی آغازگرهای نیمه‌تصادفی در ایجاد چند شکلی از آغازگرهای تصادفی بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: بابونه، تنوع ژنتیکی، آغازگرهای نیمه‌تصادفی، RAPD، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

بابونه به طور کلی به دو نوع گیاه گفته می‌شود که هر دو از یک خانواده ولی از دو جنس متفاوت (*Matricaria* sp.) و (*Anthemis* sp.) هستند. در اروپا و آمریکا چون هر دو گونه تقریباً خواص مشابهی را دارا

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

هستند به هر دو بابونه گفته می‌شود. این گیاه از دیر باز در طب سنتی مورد توجه بوده و مصارف دارویی دارد (۱۶). *Matricaria aurea* گیاهی است یک‌ساله، به ارتفاع ۲۰-۱۰ سانتیمتر با ساقه راست که گاهی در قاعده منشعب است و فقط دارای گل‌های دیسکی است (۱۰). این گیاه دارای خواص دارویی ضد تشنج، ضد عفونی‌کننده، ضد التهاب، ضد آلرژی، تقویتی و محرک معده و ضد نفخ است (۱۴، ۱۸).

ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌شود. روش‌های مولکولی همراه با روش‌های چند متغیره آماری، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی و تنوع ژنتیکی گیاهان دارند (۱۷). نشانگرهای مبتنی بر DNA، به ویژه نشانگرهای مبتنی بر PCR، به علت چند شکلی بالا، از ابزارهای مناسب برای برآورد تنوع ژنتیکی به شمار می‌روند. تکنیک RAPD روشی سریع، آسان و نسبتاً ارزان است که در این روش از آغازگرهای تصادفی بدون نیاز به داشتن اطلاعات اولیه و قبلی در مورد توالی ژنوم گیاه استفاده می‌شود. روش RAPD دارای معایبی می‌باشد که از جمله می‌توان به عدم تکرار پذیری نتایج به دلیل استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای اتصال پایین که موجب تکثیر غیر اختصاصی برخی از نقاط DNA می شود اشاره نمود. همچنین حساسیت زیاد به آلودگی و تغییرات شرایط PCR، دشواری امتیازدهی نوارها و تمایل این روش به تکثیر بخش تکراری، از معایب دیگر این روش است (۱۳).

با توجه به مشکلات و معایب روش RAPD، بهبود سیستم‌های دیگر مبتنی بر PCR با استفاده از تک آغازگرها، قدم بسیار مهمی برای جایگزینی این روش محسوب می‌شود. به همین منظور روش‌های تغییر یافته بر مبنای سیستم RAPD طراحی شده‌اند که یکی از این روش‌ها، استفاده از آغازگرهایی است که مکان آنها بر اساس نواحی برش اتصال اینترون- اگزون[1] می‌باشد که توسط وینینگ و لانگریج (۳۱) در سال ۱۹۹۱ پیشنهاد شد و بعداً توسط رافالسکی و همکاران (۲۱) بهبود یافت. آغازگرهای نیمه‌تصادفی در مقایسه با روش RAPD الگوی نواری تکرار پذیر با چند شکلی بالاتری تولید می کنند (۷، ۱۵). استفاده از توالی‌های مجاور اینترون به عنوان مکان هدف برای اتصال آغازگرهای PCR باعث ایجاد دو گروه از آغازگرهای مکان هدف اگزون[2] و مکان هدف اینترون[3] شده است (۲۰). نشانگرهای مبتنی بر DNA قادرند نقاط مختلفی از ژنوم را تکثیر کنند که ممکن است مربوط به نقاط رمز کننده (اگزون) یا قسمت‌های غیر رمز کننده (اینترون) باشند. آغازگرهای ET نواحی اگزونی ژنوم و آغازگرهای IT نواحی اینترونی ژنوم را تکثیر می‌کنند و از این نظر قابل شناسایی هستند (۵).

خانوجا و همکاران (۸) رابطه خویشاوندی یازده نمونه از دو گونه مختلف نعناع با استفاده از ۶۰ آغازگر تصادفی را بررسی کردند. تعداد

1- Intron-Exon Splice Junction 2- Exon Targeting 3- Intron Targeting

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

۶۳۰ نوار بدست آوردند که ۵۸۹ نوار (۹۳/۴۹ درصد) چند شکل بودند. این یازده نمونه نعناع در دو گروه اصلی قرار گرفتند. نتایج موید کارآیی نشانگرهای مولکولی در گروه‌بندی گونه‌های مختلف نعناع بود. واگنر و همکاران (۲۹) تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های بابونه کشت شده در آلمان را با استفاده از ۱۸ آغازگر RAPD و ۱۶ ترکیب آغازگری AFLP بررسی کردند. مواد ژنتیکی شامل چهار رقم تتراپلوئید، دو رقم دیپلوئید، چهار لاین اینبرد و دو جمعیت اصلاحی بودند. در مجموع ۱۹۵۲ نوار شامل ۴۴۵ نوار برای نشانگرهای RAPD و ۱۵۰۷ نوار برای نشانگرهایAFLP تولید شد که به ترتیب ۳۴۲ و ۱۰۹۷ نوار، چند شکل بودند.

تکنیک RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی، بررسی روابط خویشاوندی و شناسایی ارقام در گونه های دارویی مختلف از قبیل کنگر فرنگی (۱۱)، درمنه (۲۵)، گل راعی (۱)، خشخاش (۲۸)، موسیر (۳)، گل محمدی (۹)، نعناع (۴، ۱۲) و بابونه آلمانی (۲۷، ۲۹) به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است. همچنین سودمندی آغازگرهای نیمه تصادفی در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی از قبیل جو وحشی (۳۰)، سیب‌زمینی (۷)، چاودار (۲۲)، لوبیا (۱۵) و شبدر ایرانی (۲۴) گزارش شده است.

با وجود این که بابونه یکی از گیاهان دارویی با ارزش بازار جهانی محسوب می‌شود، اما هنوز اطلاعات کافی در زمینه توده‌های بومی موجود در کشور وجود نداشته و کشت زراعی آن متداول نشده است. همچنین مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی روی بابونه محدود می‌باشد. این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه جمع آوری شده از نقاط مختلف کشور با آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی و بررسی سودمندی و کارآیی این آغازگرها در ایجاد چند شکلی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی این آزمایش شامل ۱۶ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip. بود که دو توده بومی در کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان کشت و نگهداری می شد و ۱۴ توده بومی دیگر شامل توده‌های بومی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور بود. بذور ۱۶ توده بومی، در ایستگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان در قالب طرح آزمایشی آگمنت یا طرح ارزیابی مقدماتی عملکرد کشت و صفات مورفولوژیک بررسی شد (جدول ۱). برای تعیین درصد اسانس، ۵۰ گرم از گل‌های هر کرت آزمایشی انتخاب و اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. بذور توده‌های مختلف پس از انجام ارزیابی مزرعه‌ای جهت بررسی مولکولی جمع‌آوری شد. آزمایش در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه زابل به منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین توده‌های بومی براساس

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی انجام گرفت.

جدول ۱- نام، محل جمع‌آوری و برخی صفات مورفولوژیکی ۱۶ توده بومی بابونه مورد استفاده

شماره	نام ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	روز تا گل‌دهی	روز تا پایان گل‌دهی	ارتفاع گیاه	تعداد پنجه	تعداد گل در بوته	عملکرد گل در بوته	تعداد شاخه گل‌دهنده	وزن خشک ۱۰۰ گل	درصد اسانس
۱	اصفهان- شهرضا	شهرضا	۱۷۷	۲۵۸	۷۳/۴۳	۳	۱۰۸	۴/۲۱	۱۳/۶	۳/۹	۰/۲
۲	اصفهان-۱	کلکسیون	۱۹۴	۲۶۳	۹۲/۶۷	۱/۲	۴۱/۸	۲/۱۴	۱۲/۲	۴/۹۵	۰/۷۵
۳	اصفهان- ۲	کلکسیون	۱۹۴	۲۶۳	۱۰۶/۶۷	۱/۲	۳۱/۶	۱/۳۸	۹/۸	۳/۶	۰/۴
۴	اصفهان- ۳	اصفهان	۱۹۴	۲۷۳	۹۴/۰۸	۲/۲	۷۵/۲	۲/۲۹	۱۳/۴	۳/۰۴	۰/۶
۵	شهرکرد- ۱	شهرکرد	۱۸۷	۲۶۵	۸۵/۶۲	۱/۶	۵۷/۱	۱/۹۶	۱۱/۵	۳/۵۱	۰/۴
۶	اصفهان- فریدونشهر	فریدونشهر	۱۹۴	۲۵۳	۱۰۴/۱۵	۱/۸	۳۳/۸	۱/۳۷	۱۰/۸	۴/۰۶	۰/۱
۷	یزد	یزد	۱۹۲	۲۵۸	۱۲۲/۲۷	۲/۲	۱۵۰/۸	۵/۰۷	۱۸/۲	۳/۳۶	۱/۳
۸	سیستان- زابل	زابل	۱۹۴	۲۵۵	۱۰۴/۱۸	۳/۸	۸۰/۲	۳/۹۹	۱۱/۶	۴/۹۸	۰/۲
۹	گیلان	گیلان	۱۹۳	۲۵۸	۶۳/۸۳	۲۳	۳۲۶/۹	۱۳/۰۸	۳۰	۴	۰/۴
۱۰	شهرکرد- ۲	شهرکرد	۱۸۰	۲۵۸	۸۵/۸۸	۲/۲	۷۶/۸	۲/۵۳	۱۲	۳/۳	۰/۴
۱۱	آذربایجان- سردشت	سردشت	۱۹۴	۲۷۳	۸۵/۳۶	۱	۳۷/۴	۱/۳۹	۱۱	۳/۷۲	۰/۳۵
۱۲	تهران	تهران	۱۸۷	۲۶۵	۸۵/۵۵	۱/۷	۵۸/۲	۲/۹۶	۱۱/۲	۳/۱۵	۰/۵
۱۳	گیلان- رشت	رشت	۱۹۱	۲۶۳	۱۰۰/۷۳	۱/۲	۳۴	۱/۳۷	۱۱/۶	۴/۰۴	۰/۶
۱۴	آذربایجان- ارومیه	ارومیه	۱۹۳	۲۶۱	۸۴/۶۱	۱/۲	۴۹/۶	۲/۹	۱۲/۸	۵/۸۶	۰/۹
۱۵	تبریز	تبریز	۱۹۴	۲۶۲	۹۲/۸	۲/۱	۴۲/۸	۲/۴۱	۱۲/۵	۴/۵۹	۰/۷
۱۶	شهرکرد- ۳	شهرکرد	۱۹۰	۲۵۹	۹۴/۰۵	۱/۵	۳۹/۲	۱/۸۵	۱۳	۴/۹	۰/۶۵

استخراج DNA

استخراج DNA به روش دویل و دویل (۲) که توسط واگنر و همکاران (۲۹) تغییر یافته و بهینه شده بود انجام شد. به منظور تکثیر DNA مشترک بین بوته‌های هر توده بومی، برگ‌های ۱۰ بوته از هر توده بومی به مقدار مساوی با یکدیگر مخلوط شدند (۱۹) و در نهایت ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی هر توده بومی جهت استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل 6405 UV-vis و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. از کلیه نمونه‌های DNA، محلول پایه ۲۵ نانوگرمی در هر میکرولیتر تهیه و در واکنش PCR استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای انجام PCR از دستورالعمل واگنر و همکاران (۲۹) استفاده شد. واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (تریس ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸)،

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

کلرید منیزیم ۶ میلی‌مولار، آغازگرهای ۱۰، ۱۵ و ۱۸ نوکلئوتیدی با غلظت ۵ پیکومول، ۰/۴ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی ($dNTP_s$)، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز و آب دو بار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در ۶۷-۴۲ درجه سانتیگراد (برای هر آغازگر متفاوت بود) و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله پایانی به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. ۲۲ آغازگر تصادفی RAPD و ۲۲ آغازگر نیمه تصادفی از دو گروه آغازگرهای مکان هدف اینترون (IT) و مکان هدف اگزون (ET) با توالی‌های ۱۵ و ۱۸ جفت نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت (جداول ۲ و ۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر نمونه DNA سه بار تکرار شد و فقط نوارهای تکرارپذیر برای ارزیابی توده‌های بومی مورد استفاده قرار گرفتند.

محصولات تکثیری پس از بارگذاری در چاهک‌های مجزا توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد در بافر 0.5x TBE در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت تفکیک شدند. از نشانگر اندازه ۵۰ جفت باز (50 bp DNA Ladder, Gene Ruler) برای تشخیص نوارهای مختلف و تفکیک آنها از یکدیگر استفاده شد. الگوهای نواری پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید به کمک دستگاه ژل‌خوان در زیر نور ماوراءبنفش، مشاهده شدند و در نهایت عکس‌برداری از نوارها انجام شد (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نوارها براساس وجود یا عدم وجود هر نوار به ترتیب با اعداد صفر و یک امتیازدهی شدند. برای تعیین تشابه بین ژنوتیپ‌ها از ضریب تشابه جاکارد (۶) استفاده شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA صورت گرفت. برای تعیین نکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه و محاسبه همبستگی بین ماتریس تشابه با دندروگرام مربوطه، ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.02 (۲۳) انجام شد (شکل ۱).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

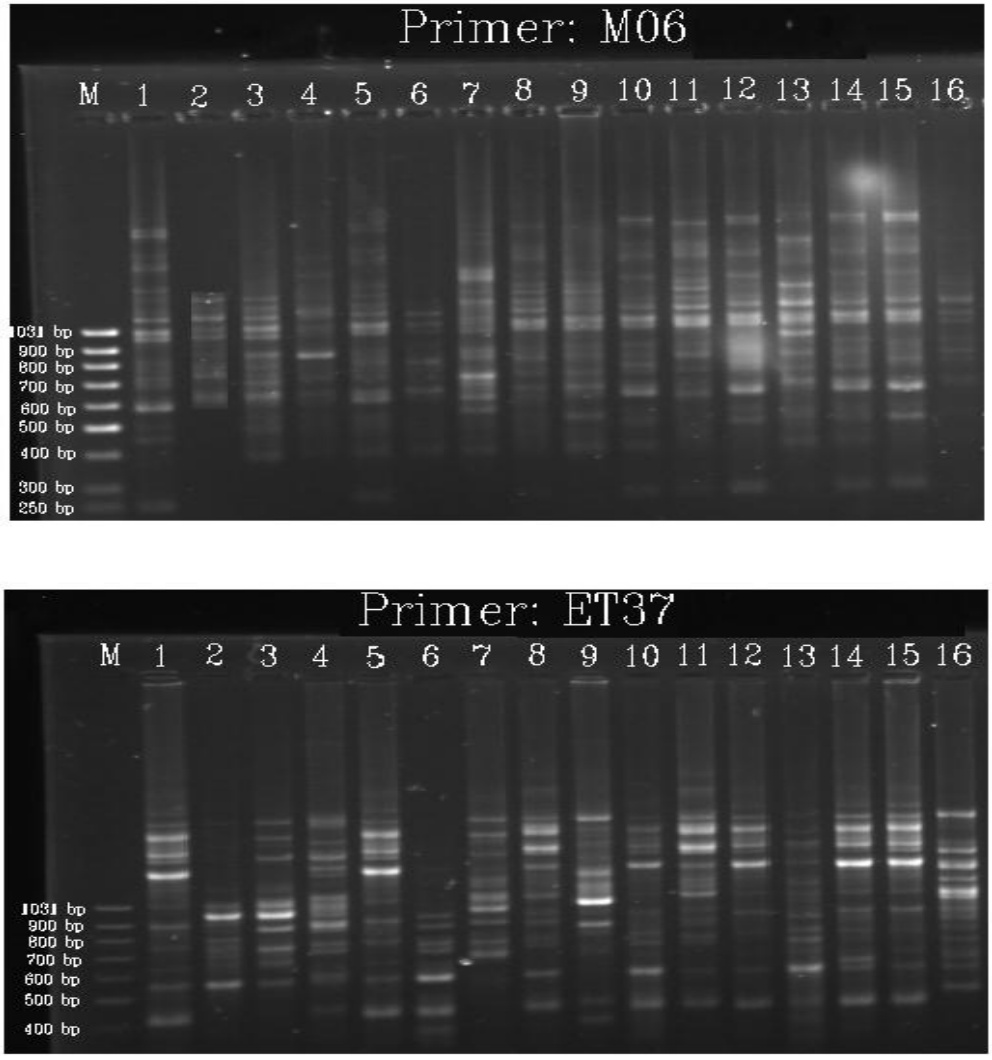
جدول ۲- تعداد نوار تکثیر شده و چندشکل و درصد چندشکلی تولید شده توسط آغازگرهای تصادفی در ۱۶ توده بومی مورد استفاده

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (5'_ 3')	تعداد نوار تکثیر شده	تعداد نوار چندشکل	درصد چندشکلی
OP-F-01	ACGGATCCTG	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱
OP-M-02	ACAACGCCTC	۱۵	۱۱	۷۳/۳۳
OP-M-04	GGCGGTTGTC	۹	۹	۱۰۰
OP-M-06	CTGGGCAACT	۱۳	۱۰	۷۶/۹۲
OP-N-05	ACTGAACGCC	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳
OP-C-05	GATGACCGCC	۱۰	۵	۵۰
OP-C-11	AAAGCTGCGG	۱۰	۷	۷۰
OP-F-03	CCTGATCACC	۹	۷	۷۷/۷۸
OP-C-04	CCGCATCTAC	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳
OP-Q-16	AGTGCAGCCA	۱۲	۹	۷۵
OP-N-16	AAGCGACCTG	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
OP-N-15	CAGCGACTGT	۱۳	۱۲	۹۲/۳
OP-N-14	TCGTGCGGGT	۱۱	۸	۷۲/۷۳
OP-N-12	CACAGACACC	۹	۹	۱۰۰
OP-N-06	GAGACGCACA	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳

جدول ۳- تعداد نوار تکثیر شده و چند شکل و درصد چند شکلی تولید شده توسط آغازگرهای نیمه تصادفی در ۱۶ توده بومی

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (5'_ 3')	تعداد نوار تکثیر شده	تعداد نوار چندشکل	درصد چندشکلی
IT1	CGGCAGGTCAGGTAAGT	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
IT2	GCAGAGGGCCAGGTAAGT	۱۷	۱۳	۷۶/۴۷
IT4	CGCGGAGAGCAGGTAAGT	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
IT33	GATGCCCCAGGTAAG	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
IT34	GCGGCATCAGGTAAG	۱۳	۱۳	۱۰۰
IT36	GTCGACCCAGGTAAG	۲۲	۲۱	۹۵/۴۵
ET35	ACCTACCTGCCGCAG	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵
ET36	ACCTACCTGGGGCTC	۱۶	۱۳	۸۱/۲۵
ET37	ACTTACCTGAGGCGCGAC	۱۳	۱۲	۹۲/۳
ET38	ACTTACCTGCTGGCCGGA	۱۲	۱۲	۱۰۰
ET39	ACTTACCTGGCCAGCTGC	۱۴	۱۰	۷۱/۴۲
ET40	ACTTACCTGCCTGCCGAG	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
ET41	ACTTACCTGGCACGCCTC	۱۱	۹	۸۱/۸۲
ET42	ACTTACCTGCCTACGCGG	۸	۶	۷۵

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]



شکل ۱- الگوی نواری ایجاد شده در ۱۶ توده بومی بابونه با استفاده از دو آغازگر تصادفی (M06) و نیمه تصادفی (ET37).(M: نشانگر اندازه، توده‌های بومی بر اساس جدول ۱ شماره‌گذاری شده‌اند).

نتایج و بحث

مقایسه چند شکلی حاصل از نشانگرها

دامنه نوارهای تشکیل شده بین ۱۵۰۰-۴۰۰ جفت باز بود و اغلب نوارها در محدوده ۱۰۰۰-۶۰۰ جفت بازی قرار داشتند از بین ۴۴ آغازگر استفاده شده در این آزمایش، ۲۹ آغازگر که الگوی نواری تکرار پذیر داشتند انتخاب و برای ارزیابی مواد ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. ۱۵ آغازگر دیگر به دلیل عدم ایجاد چند شکلی و عدم تکرار پذیری نتایج آزمایش حذف شدند. در بین ۲۹ آغازگر انتخابی، ۱۵ آغازگر تصادفی و ۱۴ آغازگر دیگر نیمه تصادفی بودند. در مجموع ۳۶۹ نوار تولید شد که به ازای هر آغازگر ۱۲/۷۲ نوار بود. متوسط تعداد نوار برای آغازگرهای تصادفی ۱۱/۶ و برای آغازگرهای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

نیمه تصادفی ۱۳/۹۳ نوار بود. از ۳۶۹ نوار تولیدی ۳۱۴ نوار چند شکلی نشان دادند که میزان چند شکلی به ازای هر آغازگر ۱۰/۸۳ نوار بود که برای آغازگرهای تصادفی ۹/۴ نوار و برای آغازگرهای نیمه تصادفی ۱۲/۳۵ نوار بود. در مجموع درصد چند شکلی ۸۵/۰۹ درصد برآورد شد که برای آغازگرهای تصادفی ۸۱/۰۳ و برای آغازگرهای نیمه تصادفی ۸۸/۷۲ بود (جداول ۲ و ۳). در مطالعه واگنر و همکاران (۲۹) روی ۱۲ جمعیت بابونه آلمانی با استفاده از ۲۲ آغازگر تصادفی همراه با ۱۶ جفت آغازگر برای نشانگر AFLP، درصد چند شکلی برای آغازگرهای تصادفی ۸۰/۰۸ درصد و برای نشانگرهای AFLP ۶۷ درصد گزارش شد. نتایج بررسی بیانگر توانایی بالای آغازگرهای تصادفی در ایجاد چند شکلی در بابونه می‌باشد و با نتایج به دست آمده از این آزمایش مطابقت دارد.

به نظر می‌رسد که آغازگرهای نیمه تصادفی در مقایسه با آغازگرهای تصادفی از کارآیی بیشتری در ایجاد چند شکلی در بابونه برخوردار هستند. به علاوه مقایسه آماری بین و گروه آغازگر تصادفی و نیمه تصادفی نشان داد که اختلاف معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) بین دو گروه آغازگر از نظر تشکیل نوار و اختلاف بسیار معنی‌داری (در سطح احتمال ۱ درصد) از نظر تعداد نوار چند شکل و درصد چند شکلی وجود دارد. به این ترتیب براساس نتایج تجزیه آماری نیز توانایی بیشتر آغازگرهای نیمه تصادفی در ایجاد چند شکلی تأیید شد. گاول و همکاران (۵) در مطالعه خود روی گندم و تریتیکاله با استفاده از آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی گزارش نمودند که آغازگرهای نیمه تصادفی از تکرار پذیری و چند شکلی بیشتری نسبت به روش RAPD برخوردارند. سمیعی و همکاران (۲۴) در مطالعه خود روی ۲۰ جمعیت شبدر ایرانی با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی متوسط تعداد نوار برای هر آغازگر نیمه تصادفی را ۱۱/۱ نوار گزارش نمودند. در پایان نتیجه گرفتند که آغازگرهای نیمه تصادفی کارآیی بالایی در ایجاد چند شکلی دارند و می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شبدر استفاده شوند. رافالسکی و همکاران (۲۱) با مطالعه ۱۲ لاین اینبرد ذرت گزارش کردند که برخی از آغازگرهای RAPD، الگوهای نواری با اطلاعات کم و یا فاقد اطلاعات تولید کردند. در حالی‌که با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی الگوی نواری چند شکل را مشاهده کردند. در پایان نتیجه گرفتند که آغازگرهای نیمه تصادفی از توانایی ایجاد چند شکلی در بین ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک برخوردارند. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق و گزارشات گیاهان مختلف به نظر می‌رسد که آغازگرهای نیمه‌تصادفی در مقایسه با آغازگرهای تصادفی از توانایی بیشتری در ایجاد چند شکلی برخوردارند.

شش آغازگر IT، ۹۴ نوار تولید کردند که ۸۶ نوار (۹۱/۴۹ درصد) چند شکلی نشان دادند که ۱۵/۶۷ نوار و ۱۴/۳۳ نوار چند شکل به ازای هر آغازگر بود. ۸ آغازگرET، ۱۰۱ نوار

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

تولید کردند که ۸۷ نوار (۸۶/۱۴ درصد) چند شکلی نشان دادند که ۱۲/۶۳ نوار و ۱۰/۸۸ نوار چند شکل به ازای هر آغازگر بود. به نظر می‌رسد که آغازگرهای IT در مقایسه با آغازگرهای ET چند شکلی بیشتری در بابونه تولید کردند که علت این امر را می‌توان تکثیر نواحی غیر کدکننده ژن‌ها دانست. به علاوه مقایسه آماری بین دو گروه آغازگر نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه آغازگر از نظر درصد چند شکلی وجود دارد. با توجه به اینکه نواحی اینترون از لحاظ تکاملی کمتر حفاظت شده‌اند و به بروز جهش‌های مختلف حساسیت بیشتری دارند و اینکه جهش‌ها مهم‌ترین عامل ایجاد کننده چند شکلی در مطالعات تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مولکولی هستند به همین دلیل چند شکلی بیشتر در نواحی اینترون توسط آغازگرهای IT مورد انتظار است. از طرف دیگر نواحی از ژنوم که قابلیت کد نمودن ژن‌ها را ندارند (اینترون ها) بیش از ۹۵ درصد ژنوم یک گیاه را تشکیل می‌دهند (۲۶) که آغازگرهای IT این نواحی را مورد هدف و تکثیر قرار می‌دهند لذا این دسته از آغازگرها احتمال بیشتری برای تکثیر قطعات DNA خواهند داشت (۸، ۱۵، ۲۱). نتایج آزمایشات روی گیاهانی از جمله شبدر ایرانی (۲۴)، گندم و تریتیکاله (۵) و چاودار (۲۲) نیز بیانگر این موضوع است که آغازگرهای IT چند شکلی بیشتری تولید می کنند، در حالی‌که در سیب‌زمینی (۷) تفاوت عمده‌ای بین آغازگرهای IT و ET در ایجاد چند شکلی مشاهده نشد.

پنج آغازگر ۱۵ نوکلئوتیدی، ۸۱ نوار تولید کردند که ۷۵ نوار (۹۲/۵۹ درصد) چند شکلی نشان دادند که تعداد نوار به ازای هر آغازگر ۱۶/۲ نوار و میزان نوار چند شکل به ازای هر آغازگر ۱۵ نوار بود. ۹ آغازگر ۱۸ نوکلئوتیدی، ۱۱۴ نوار تولید کردند که ۹۸ نوار (۸۵/۹۷ درصد) چند شکلی نشان دادند که تعداد نوار به ازای هر آغازگر ۱۲/۶۷ نوار و میزان نوار چند شکل به ازای هر آغازگر ۱۰/۸۹ بود. مقایسه آماری بین دو گروه آغازگر نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه آغازگر از نظر تشکیل نوار، تعداد نوار چند شکل و درصد چند شکلی وجود دارد. به این ترتیب بر اساس نتایج تجزیه آماری نیز توانایی بیشتر آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی در ایجاد چند شکلی در بابونه تأیید گردید. در سیب زمینی (۷) آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی و در چاودار (۲۲) آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی، چند شکلی بیشتری تولید کردند.

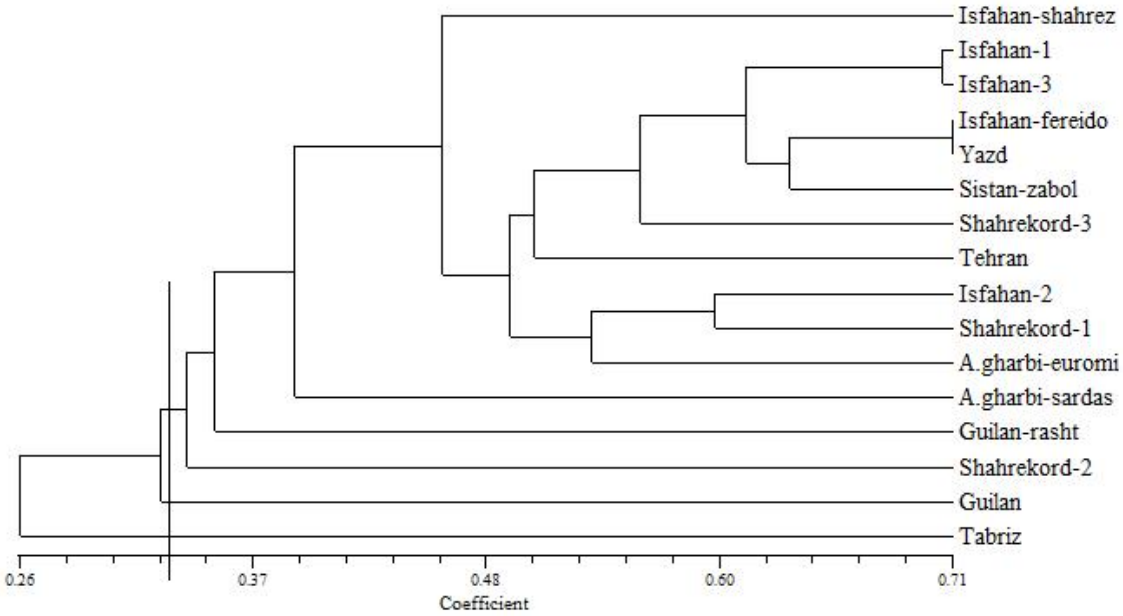
تنوع ژنتیکی بین توده‌ها

نتایج مطالعه با استفاده از آغازگرهای تصادفی نشان داد که بیشترین تشابه بین اصفهان-۱ با اصفهان-۳ و اصفهان- فریدونشهر به دست آمد. کمترین تشابه به ترتیب بین تبریز و آذربایجان غربی- سردشت با ضریب تشابه ۰/۱۴، تبریز با شهرکرد- ۲ و گیلان- رشت با ضریب تشابه ۰/۱۵ بود. در مجموع تبریز کمترین میزان تشابه را با سایر توده‌های مورد مطالعه داشت. دامنه ضریب تشابه ژنتیکی بین توده‌ها بین ۰/۷۱-۰/۱۴ بود و میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۹ برآورد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

شد. نتایج مطالعه با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی نشان داد که بیشترین تشابه بین اصفهان- فریدونشهر و یزد با ضریب تشابه ۰/۷۱ و اصفهان-۱ و اصفهان-۳ با ضریب تشابه ۰/۷۰ وجود داشت. کمترین تشابه به ترتیب بین گیلان با گیلان- رشت و تبریز با ضریب تشابه ۰/۱۹ و تبریز با شهرکرد- ۲ با ضریب تشابه ۰/۲۱ بود. دامنه ضریب تشابه ژنتیکی بین توده‌ها بین ۰/۷۱-۰/۱۹ بود و میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۴۴ برآورد گردید. در مطالعه سلوکی و همکاران (۲۷) روی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۶۳-۰/۱۵ گزارش شد که میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۵ برآورد شد. در مطالعه واگنر و همکاران (۲۹) روی ۱۳ جمعیت بابونه آلمانی ضریب تشابه ژنتیکی با استفاده از RAPD بین ۰/۹۵-۰/۶۸ و با استفاده از AFLP بین ۰/۸۸-۰/۷۴ گزارش شد. تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌های بومی نشان می‌دهد که این جمعیت‌ها منابع ژنتیکی با ارزشی برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی می‌باشند.

به منظور آزمون نکویی برازش دندروگرام رسم شده با ماتریس تشابه ژنتیکی در توده‌های مورد بررسی ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد که میزان r=۰/۹۳ برای آغازگرهای تصادفی، r=۰/۹۴ برای آغازگرهای نیمه تصادفی و r=۰/۹۶ برای تمامی ۲۹ آغازگر برآورد شد که نکویی برازش دندروگرام با ماتریس تشابه را تأیید می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۶ توده بومی بابونه با استفاده از مجموع آغازگرهای تصادفی و نیمه تصادفی.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

بالا بودن ضریب همبستگی کوفنتیک بیانگر ارائه صحیح روابط موجود بین توده‌ها از طریق ترسیم دندروگرام است. در مطالعه سلوکی و همکاران (۲۷) روی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی، ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۸۶ برآورد شد. در مطالعه واگنر و همکاران (۲۹) برای RAPD ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۹۳ و برای AFLP ضریب همبستگی کوفنتیک r=۱ گزارش شد.

نشانگرهای RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ذخایر گیاهی که هیچ گونه اطلاعات اولیه برای DNA ژنومی و تنوع بین آنها وجود ندارد، ابزاری ساده و کارآمد می‌باشند. اطلاع از روابط ژنتیکی گونه‌های وحشی برای بهره وری موفق از تنوع ژنتیکی موجود در آنها ضروری است. ارزیابی تنوع ذخایر ژنتیکی گیاهی که از شانس بالایی برای بروز ژن‌های مفید برخوردار می‌باشند از پیش نیازهای ضروری برای برنامه‌ریزی در جهت حفاظت، اهلی کردن و بهره‌برداری پایدار از آنها می باشد.

در مطالعه سلوکی و همکاران (۲۷) روی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی، تجزیه خوشه ای به روش UPGMA، ۲۵ ژنوتیپ را به پنج گروه تقسیم کرد که ۱۹ ژنوتیپ در یک گروه قرار گرفتند و ۶ ژنوتیپ دیگر در چهار گروه یک و دو ژنوتیپی قرار گرفتند. در مطالعه واگنر و همکاران (۲۹) روی بابونه آلمانی، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، نمونه‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد که این تقسیم‌بندی با منشأ ژرم‌پلاسم‌ها مطابقت داشت ولی با ترکیبات شیمیایی رابطه‌ای وجود نداشت. همچنین به مقایسه دو دندروگرام بدست آمده از دو نشانگر RAPD و AFLP پرداختند و اعلام کردند که ارتباط خوبی بین دو دندروگرام وجود دارد. واگنر و همکاران (۲۹) گزارش کردند که نشانگرهای مولکولی برای گزینش ژنوتیپ‌ها قبل از مرحله گل‌دهی در رابطه با عملکرد اجزاء تشکیل دهنده اسانس در بابونه می‌تواند مناسب باشد. در مجموع نشانگرهای مولکولی استفاده شده در این تحقیق وسیله سودمندی برای شناسایی سریع و قابل اعتماد توده‌های بابونه می‌باشد. بهتر است از تعداد آغازگر بیشتری به منظور پوشش سطح وسیع‌تری از ژنوم استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشگاه زابل که بودجه و امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری آقای مهندس امام‌جمعه مسئول آزمایشگاه و خانم سارانی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک مولکولی تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

منابع

1. Arnoldt-schmitt, B. 2002. Characterization of *Hypericum perforatum* plants from various accessions by RAPD fingerprinting. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(2-3): 163-169.
2. Doyle, J.F. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
3. Ebrahimi, R., Z. Zamani and A. Kashi. 2009. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 119(4): 345-351.
4. Fenwick, A.L. and S.M. Ward. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. Horticulture Science, 36: 761-764.
5. Gawel, M., I. Wisniewska and A. Rafalski. 2002. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cellular and Molecular Biology Letters, 7: 577-582.
6. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sue la distribution florate. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223-270.
7. Jrzetakiewicz, T., A. Nadolska-Orczyk and W. Orczyk. 2002. The use of RAPD and semi-random markers of verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum*. Cellular and Molecular Biology Letters, 7: 671-676.
8. Khanuja, S.P.S., A.K. Shasany, A. Srivaststava and S. Kumar. 2000. Assessment of genetic relationships in Mentha species. Euphytica, 111: 121-125.
9. Kiani, M., Z. Zamani, A. Khalighi, R. Fatahi and D. H. Byrne. 2008. Wide genetic diversity of *Rosa damascena* Mill. Germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. Scientia Horticulturae, 115(4): 386-392.
10. Letchamo, W., A. Gosselin and G. Lisin. 2006. Chamomile varieties and quality improvement issues. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. Presov University in Presov, Slovak: 33 pp.
11. Messmer, M., E. Scheider, G. Stekly and B. Buter. 2002. Determination of the progenitors and the genetic stability of the artichoke cultivar saluschocke using molecular markers. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(2-3): 177-182.
12. Momeni, S., B. Shiran and K. Razmjoo. 2006. Genetic variation in Iranian Mints on the bases of RAPD analysis. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(10): 1898-1904.
13. Nebaure, S.G., L. Castillo-Agudo and J. Segura. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved faxglove (*Digitalis obscura* L.). Theoretical and Applied Genetics, 98: 985-994.
14. Nirr, B. 2002. Herbs Cultivation & Their Utilization. Published by Asia Pacific Business Press Inc. Dehli, India. 483 pp.
15. Nowoseielski, J., W. Podyma and D.N.W. Sielska. 2002. Molecular research on the genetic diversity of Polishvarieties and landraces of *Phaseolus cocclineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cellular and Molecular Biology Letters, 7: 753-762.
16. Omidbaigi, R. 2000. Production and processing of medicinal plants. Fekr-e-roz. 247 pp. (In Persian)
17. Pandey, S., S. Kumar, U. Mishra, A. Rai, M. Singh and M. Rai. 2008. Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by quantitative traits and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 118: 80-86.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

18. Pourohit, S.S. and S.P. Vyas. 2004. Medicinal plants cultivation. Agrobios, India. 624 pp.
19. Prasert, K., M.J. Waterway, B.E. Coulman and M.G. Fortin. 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified bulk DNA. Euphytica, 89: 355-361.
20. Pujar, S., S.A. Tamhanker, V.S. Rao, U.S. Gupta, S. Naik and P.K. Ranjeker. 1999. Arbitrary primed-PCR based diversity assessment reflects hierarchical grouping of Indian tetraploid wheat genotypes. Theoretical and Applied Genetics, 99: 868-876.
21. Rafalski, A., M. Gidzinska and I. Wisniewska. 1997. PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds. In: A.S. Saftaris (ed.). Genetics, biotechnology and breeding of Maize and Sorghum. pp: 106-111. The Royal of Chemistry, Cambridge. UK.
22. Rafalski, A., L. Madej, I. Wisniewska and M. Gawel. 2002. The genetic diversity of Omponenty of rye hybrids. Cellular and Molecular Biology Letters, 2: 471-475.
23. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver.2.02. Exeter Software, New York. 160 pp.
24. Samei, K., A. Arzani and S.A.M. Mirmohammadi-Maibodi. 2008. Genetic diversity of Persian Clover populations using of semi-random markers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 12(45): 157-164. (In Persian)
25. Sangwan, R.S., N.S. Sangman, D.C. Jain, S. Kumar and S.A. Ranade. 1999. RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variation of *Artemisia annua*. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 47: 935-944.
26. Sharma, K.K., J.H. Crouch and C.T. Hash. 2002. Applications of biotechnology for crop improvement: Prospects and constraints. Plant Science, 163: 381-395.
27. Solouki, M., H. Mehdikhani, H. Zeinali and A.A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. Scientia Horticulturae, 117: 281-287.
28. Straka, P. and T. Nothnagel. 2002. A genetic map of *papaver somniferum* based on molecular and morphological markers. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(2/3): 235-241
29. Wagner, C., W. Friedt, R. Marquard and O. Frank. 2005. Molecular analysis on the genetic diversity and inheritance of (-) α-bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*chamomilla recutita*). Plant Science, 169: 917-927.
30. Weining, S. and R.J. Henry. 1995. Molecular analysis of DNA polymorphism of barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. Genetic Resources and Crop Evolution, 42: 273-281.
31. Weining, S. and P. Langridge. 1991. Identification and mapping of polymorphism in cereals base on polymerase chain reaction. Theoretical Applied Genetics, 82: 209-216.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]

Study of Genetic Diversity in Chamomile Landraces (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.) Using Random and Semi-Random Primers

Hadi Mehdikhani[1], Mahmood Solouki[2] and Hossein Zeinali[3]

1- PhD Student, Ferdowsi University of Mashhad
(Corresponding author: hmehdikhani@gmail.com)
2- Associate Professor, University of Zabol
3- Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan
Received: September 6, 2011 Acceptance: March 11, 2013

Abstract

Chamomile is one of the important medicinal plants in commerce that has many applications in drug and sanitary industries. In order to evaluate the genetic diversity of different chamomile landraces (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.) based on random and Semi-random primers, 16 landraces that collected from different areas of Iran were selected. Twenty-two random primers for RAPD marker and Twenty-two semi-random primers from IT (intron-targeting) and ET (exon-targeting) primers with 15-mer and 18-mer were used in this study. Genetic similarity between landraces was estimated using Jaccard's similarity coefficient. Cluster analysis was conducted with UPGMA method using NTSYS-pc ver 2.02 software. The number of polymorphic bands generated by random primers varied from 5-13 and varied from 6-21 for semi-random primers. According to the cluster analysis on both random and semi-random primers, 16 populations were classified into three groups. Based on similarity matrix, Tabriz landrace had minimum similarity with other landraces. Compare between random and semi-random primers showed that semi-random primers had more ability in produce polymorphism.

Keywords: Chamomile (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.), Genetic diversity, Semi-random primers, RAPD, Cluster analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-17]