فصلنامه علمی - پژوهشی گیاه و زیست بوم
سال ۱۰، شماره ۴۱، زمستان ۱۳۹۳

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های صبر زرد (*Aloe vera*) ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD

فاطمه نجات زاده*[۱]، یونس مستوفی[۲]، امیر موسوی[۳]، ستار طهماسبی انفرادی[۳]

چکیده

در این تحقیق، از نشانگر مولکولی RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۰ جمعیت صبر زرد (*Aloe vera*) ایران استفاده شد. از ۲۰ آغازگر استفاده شده، ۱۰ مورد، تعداد ۱۲۶ نوار قابل تشخیص ایجاد نمودند که ۸۴/۱٪ آن ها (۱۰۶ نوار) در بین جمعیت‌های مختلف چند شکلی نشان دادند. تعداد متوسط نوارها به ازای هر آغازگر ۱۲/۶ بود. برای تعیین میزان تشابه بین جمعیت‌ها، از ضریب تشابه دایس استفاده گردید. بیشترین میزان تشابه (۰/۶۲) بین دو نمونه سرکره a و برازجان a و کمترین میزان تشابه (۰/۱۲) بین دو نمونه بوشهر b و سرکره b مشاهده گردید. با استفاده از الگوریتم UPGMA یک دندروگرام بر مبنای ماتریس تشابه تهیه شد. تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌های مختلف صبر زرد را به ۲ گروه عمده تقسیم‌بندی نمود. نتایج این پژوهش، بیانگر کارآمد بودن نشانگرRAPD در تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های صبر زرد مورد مطالعه می باشد.

واژه‌های کلیدی: صبر زرد، *Aloe vera*، RAPD، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای

Archive of SID

[۱] - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوی، گروه کشاورزی و منابع طبیعی، خوی، ایران
[۲] - دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ایران
[۳] - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
* مکاتبه کننده : (fnejatzadeh@yahoo.com)

تاریخ دریافت: تابستان ۹۰ تاریخ پذیرش: زمستان ۹۰

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی، در کشور ایران دارای سابقه‌ای بسیار طولانی است. بررسی ویژگی‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی، اکوفیزیولوژیکی و اکولوژیکی این گیاهان به منظور بهره‌برداری پایدار و اقتصادی همراه با حفظ تنوع موجود در عرصه‌های طبیعی ایران بسیار حایز اهمیت می‌باشد. با انجام این مطالعات می توان از انقراض گونه‌های منحصر به فرد و متفاوت از لحاظ ژنتیکی جلوگیری به عمل آورده و ضمن ایجاد اشتغال و افزایش درآمد، این گونه‌ها را برای نسل‌های آینده و ایجاد توازن در طبیعت حفظ کرد. صبر زرد (*Aloe vera*) گیاهی است از تیره لیلیاسه که در ارتفاعات جنوبی ایران پراکنش دارد و بومی مناطق گرم و مرطوب می‌باشد. پیشینه تاریخی استفاده از این گیاه به بیش از۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح باز می‌گردد. صبر زرد دارای ترکیبات دارویی فراوان می‌باشد. از این رو توجه به حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه بسیار مهم است (Hasanuzzaman *etal*., 2008; Rezaie *etal*., 2005). تحقیقات فراوانی در کشورهایی نظیر هند، چین، ترکیه، آلمان، پاکستان، فرانسه، آمریکا، اسپانیا و ژاپن در رابطه با صبر زرد انجام شده است که از نظر موضوعی بیشتر این پژوهش‌ها، در زمینه خواص دارویی وکمترین آن‌ها مربوط به جنبه‌های زراعی، اکولوژیک و ژنتیکی گونه‌های گیاهی این جنس بوده ولی تاکنون تحقیقات ژنتیکی، استخراج DNA و بررسی تنوع ژنتیکی کمی در گیاه صبر زرد انجام شده است. نشانگرهای RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) از جمله نشانگرهایی هستند که به‌طور گسترده در بررسی‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ زیرا قادرند با استفاده از مقادیر کم DNA اختلافات موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی کنند و نیازی به اطلاعات قبلی در مورد ژنوم ندارند.

به دلیل این که در RAPD از آغازگرهای تصادفی استفاده می‌شود و دمای اتصال آغازگر نیز پایین است، آغازگر به جایگاه اختصاصی متصل نمی‌شود و غیراختصاصی نامیده می‌شود. این خصوصیت که در RAPD از آغازگرهای تصادفی استفاده می‌شود و نیاز به DNA کمی دارد باعث شده به تکنیکی ساده برای تجزیه و تحلیل سریع تبدیل گردد. RAPD تکنیک مناسبی برای مطالعات طبقه‌بندی گیاهان، بررسی روابط ژنتیکی، بررسی ساختار ژنتیکی جامعه، برنامه‌ریزی برنامه‌های تولید هیبرید و شناسایی والدین افراد است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸). یکی از راه‌های مناسب در شناسایی تنوع مولکولی در جمعیت‌های صبر زرد بومی ایران، استفاده از تکنیک RAPD می‌باشد که امکان شناسایی مولکولی جمعیت‌های صبر زرد را فراهم می‌سازد. به طور مسلم با بهره‌گیری از نشانگرهای تصادفی RAPD و همچنین ترکیب‌های موجود در جمعیت‌های صبر زرد در آینده، امکان شناسایی حتی نشانگرهای پیوسته با این ترکیب‌ها نیز وجود خواهد داشت. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۰ نمونه صبر زرد بومی ایران با استفاده از مارکرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق پاجوش‌های ۱۰ جمعیت صبر زرد جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی کشور شامل، برازجان، سرکره، بوشهر، بشاگرد، بندر عباس استفاده گردید (شکل ۱).

پس از جمع‌آوری پاجوش‌ها از نقاط جنوبی کشور در زمین مناسبی کشت شدند که در این خصوص، علاوه بر کشت گلدانی، در گلخانه تحقیقاتی

Archive of SID
www.SID.ir

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری نیز کشت صورت گرفت. برگ‌های جوان پس از برش در داخل فلاسک یخ قرار داده شدند و به فریزر با دمای ۲۰- درجه منتقل گردیدند. به منظور استخراج DNA از روش تغییر یافته، استفاده شد(*etal*.,1983 Dellaporta) . برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از الکتروفورز آگارز ۱ درصد و دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده گردید.

در این آزمایش از ۲۰ آغازگر شرکت سیناژن که دارای توالی ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی بودند، استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام گردید و شامل ۱/۹ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۱۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر ۰/۴ پیکومولی، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs و حدود ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و DNA پلی مراز به اندازه ۱/۳ واحد بود. چرخه حرارتی شامل ۴۵ چرخه بود که هر چرخه شامل مرحله واسرشت سازی به مدت یک دقیقه در درجه حرارت ۹۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط آغازگر به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه‌های حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز ران شدند. جهت مشاهده قطعات DNA، ژل به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در رنگ اتیدیوم بروماید قرار داده شد و سپس سطح آن با آب مقطر شسته شد و در دستگاه ویژه عکس‌برداری ژل قرار داده شد تا با اشعه ماوراء بنفش نوارها قابل رویت شوند. به منظور نمره‌دهی نوارها، وجود نوار در هر موقعیت به صورت عدد یک و عدم وجود نوار به صورت عدد صفر در نظر گرفته شد و در نهایت، ماتریس صفر و یک تشکیل گردید. میزان تشابه دو به دوی بین نمونه‌ها با استفاده از ماتریس تشابه دایس Nie & Li (1979) محاسبه و در نهایت به کمک این ماتریس دندروگرام ترسیم گردید. کلیه این محاسبات با استفاده از نرم‌افزار NTSYS Rohlf (1998) انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- محل جمع‌آوری جمعیت های مختلف صبر زرد روی نقشه کشور.

نتایج

تعداد کل نوارها، تعداد نوارهای چند شکل و درصد چند شکلی برای هر آغازگر در جدول ۱ نشان داده شده است. در استفاده از این ۲۰ آغازگر، ۱۰ آغازگر در مجموع ۱۲۶ نوار مشخص نشان دادند که ۱۰۶ نوار چند شکل بودند. یعنی حدود ۱/ ۸۴ درصد از این نوارها چند شکلی نشان دادند. بیشترین تعداد نوار، مربوط به آغازگر شماره ۱۹ با ۱۸ باند و کمترین، مربوط به آغازگر شماره۲۰ با ۷ باند بود. آغازگر شماره ۲۰ صد درصد چندشکلی نشان داد که بیانگر تنوع بالای نمونه‌های صبر زرد و قدرت زیاد این آغازگر در تفکیک ارقام می‌باشد. شکل ۲ وضعیت باندهی ۱۰ نمونه صبر زرد با استفاده از آغازگر شماره ۲۰ را نشان می‌دهد.

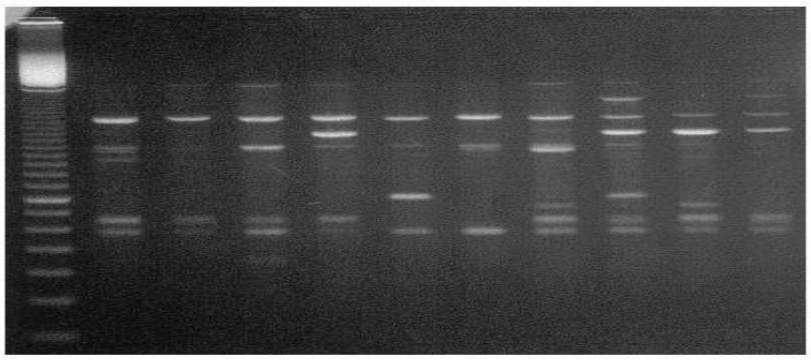
www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگر، تعداد کل نوارها، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی

ردیف	آغاز گر	توالی ´۳ ´۵	تعداد نوارهای تکثیر شده	تعداد نوارهای چند شکل	تعداد نوارهای یک شکل	درصد چند شکلی
۱	D-03	GTCGCCGTCA	۱۵	۱۳	۲	۸۷
۲	D-05	TGAGCGGACA	۱۰	۷	۰	۷۰
۳	D-07	TTGGCACGGG	۱۱	۸	۳	۷۳
۴	D-09	CTCTGGAGAC	۱۱	۸	۳	۷۳
۵	D-11	AGCGCCATTG	۱۴	۱۲	۲	۸۶
۶	D-13	GGGGTGACGA	۱۶	۱۴	۲	۸۷
۷	D-15	CATCCGTGCT	۱۰	۹	۱	۹۰
۸	D-17	TTTCCCACGG	۱۴	۱۲	۲	۸۶
۹	D-19	CTGGGGACTT	۱۸	۱۶	۲	۸۹
۱۰	D-20	ACCCGGTCAC	۷	۷	۰	۱۰۰

میزان تشابه بین جفت نمونه‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشتر نمونه‌ها با همدیگر تشابه کمی را نشان می‌دهند. بیشترین میزان تشابه (۰/۶۲) بین دو نمونه سرکره a و برازجان a و کمترین میزان تشابه (۰/۱۲) بین دو نمونه بوشهر b و سرکره b مشاهده گردید.

میانگین تشابه بین نمونه‌ها نیز ۰/۳۵ به دست آمد که بیانگر تفاوت نسبی خوب در سطح مولکولی بین نمونه‌ها می‌باشد.



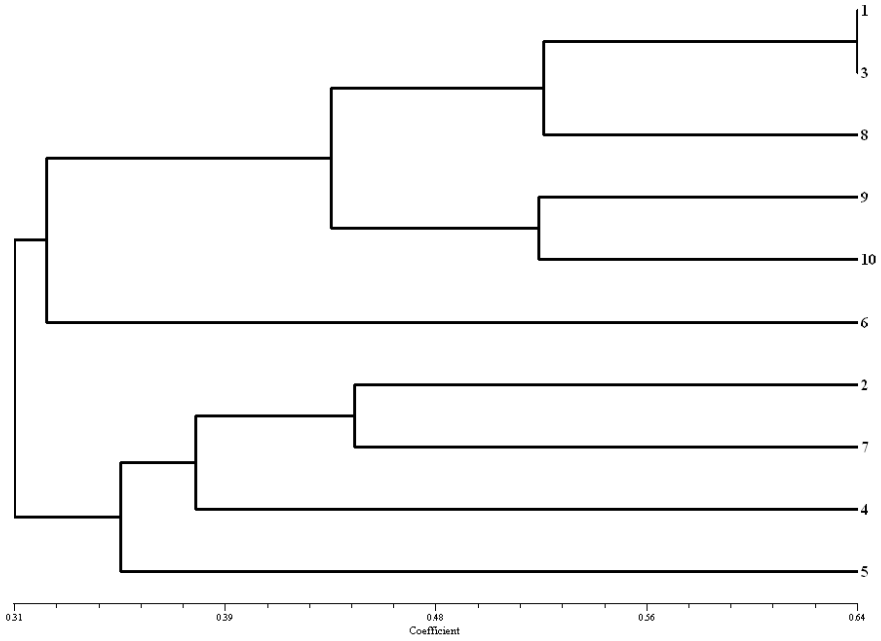
شکل ۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنوتیپ های صبر زرد با استفاده از آغازگر D-20 .
به ترتیب از سمت چپ مارکر Ladder و ژنوتیپ های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ - مقدار تشابه دایس، بین نمونه‌های صبر زرد از ۵ شهر مختلف

		برازجان a	برازجان b	سرکره a	سرکره b	بوشهر a	بوشهر b	بندرعباس a	بندرعباس b	بشاگرد a	بشاگرد b
۱	برازجان a	۱									
۲	برازجان b	۰/۳۷	۱								
۳	سرکره a	۰/۶۲	۰/۵۳	۱							
۴	سرکره b	۰/۲۴	۰/۳۶	۰/۲۴	۱						
۵	بوشهر a	۰/۳۴	۰/۳۸	۰/۳۴	۰/۳۱	۱					
۶	بوشهر b	۰/۴۲	۰/۳۴	۰/۳۷	۰/۱۲	۰/۲۳	۱				
۷	بندرعباس a	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۵۵	۰/۴۰	۰/۳۶	۰/۳۳	۱			
۸	بندرعباس b	۰/۵۷	۰/۳۱	۰/۴۶	۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۲۵	۰/۳۰	۱		
۹	بشاگرد a	۰/۴۱	۰/۲۹	۰/۳۶	۰/۱۴	۰/۲۰	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۳۴	۱	
۱۰	بشاگرد b	۰/۴۸	۰/۳۴	۰/۴۸	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۲۹	۰/۳۷	۰/۵۱	۰/۵۱	۱

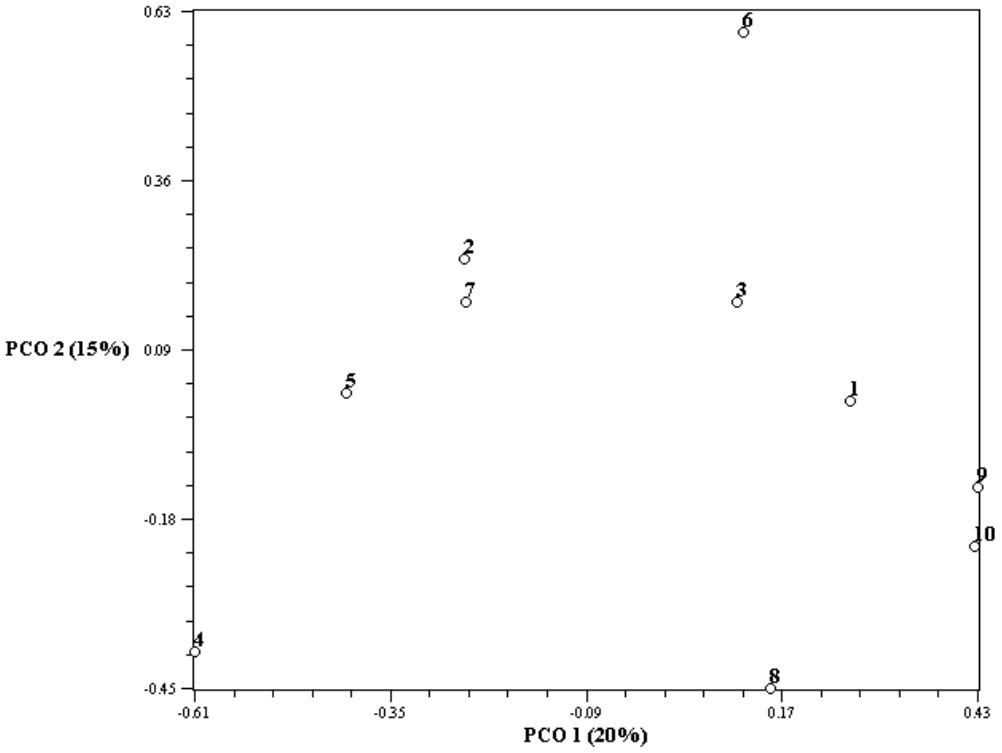
نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه دایس نشان می‌دهد (شکل ۳) که نمونه‌های گرفته شده از شهرهای متفاوت از نظر مولکولی با همدیگر تفاوت دارند. تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های صبر زرد را به دو گروه اصلی تقسیم نمود. در گروه اصلی اول، ۶ نمونه قرار گرفتند و در بین آن ها نمونه‌های برازجان b و بندرعباس a بیشترین تشابه را نشان می‌دهند. در گروه دوم ۴ نمونه قرار گرفتند که بیشترین تشابه بین بشاگرد a و بشاگرد b مشاهده گردید.



شکل ۳- دندروگرام گروه‌بندی جمعیت‌های صبر زرد بر اساس داده‌های حاصل از RAPD

www.SID.ir

علاوه بر تجزیه کلاستر، از تجزیه به مختصات اصلی نیز برای گروه‌بندی ارقام می‌توان استفاده کرد (شکل ۴) که نتایج پراکنش و توزیع نمونه‌ها بر اساس ۲ مولفه اول در شکل۳ آمده است. مولفه اول ۲۰ و مولفه دوم ۱۵ درصد از تغییرات کل را نشان می‌دهد.



شکل ۴- بای پلات تجزیه به مولفه اصلی برای مارکرهای RAPD نمونه‌های صبر زرد مربوط به شهرهای مختلف

www.SID.ir

نتایج گروه‌بندی نمونه‌ها در دو محور مختصات بر اساس ۳۵ درصد تغییرات مطابق با تجزیه کلاستر به خوبی قابل گروه‌بندی می‌باشد و در نتیجه نتایج تجزیه کلاستر را تایید می‌نماید.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق تنوع مولکولی نمونه‌های مختلف صبر زرد از ۵ مکان ایران که صبر زرد به طور طبیعی در آن‌ها رشد می‌کند، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. مقدار چند شکلی (۸۴/۱ درصد) به دست آمده در این آزمایش قابل توجه می‌باشد. به عنوان مثال (Tabaei Aghdaei *etal.*, 2007) میزان چندشکلی در ۱۲ جمعیت گل محمدی را ۶۷ درصد گزارش نموده‌اند که نسبت به نتایج این آزمایش، چند شکلی کمتری به دست آوردند. از بین ۱۰ آغازگر مورد استفاده، آغازگر شماره ۲۰ چندشکلی ۱۰۰ درصد را نشان داد که بیانگر قدرت بالای این آغازگر در بررسی تنوع مولکولی و همچنین بیانگر تنوع زیاد جمعیت های صبر زرد مورد بررسی می‌باشد. نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه اصلی نیز تنوع مناسب جمعیت‌ها را به خوبی نشان می‌دهد. بیشترین تشابه (۰/۶۲) بین نمونه‌های سرکره a و برازجان a مشاهده می‌شود که این دو ناحیه بسیار به همدیگر نزدیک می‌باشند. البته همبستگی خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نمی‌شود، یعنی نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نزدیک به همدیگر می‌باشند همیشه از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری را نشان نمی‌دهند.

به عنوان مثال، اگر چه نمونه شماره ۳ (سرکره a) و نمونه شماره ۲ (برازجانb) به لحاظ جغرافیایی بسیار نزدیک می‌باشد، ولی از نظر گروه‌بندی مولکولی در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند. از طرف دیگر، اگرچه نمونه‌های ۶ و ۸ بوشهر b و بندرعباس b از نظر جغرافیایی در ۲ منطقه جداگانه هستند، ولی در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند.

در یک تحقیق Nayanakantha *etal* (2010)، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جمع‌آوری شده صبر زرد از مناطق مختلف هند را با استفاده از صفات مرفولوژیکی و RAPD بررسی کرده‌اند که ژنوتیپ‌های صبر زرد در ۴ گروه قرار گرفتند. تعداد نوارهای چندشکل ۱۸۸ بود، یعنی به طور متوسط هر اغازگر ۱۱ نوار چندشکل نشان داد. متوسط ضریب تشابه در این تحقیق با روش جاکارد ۰/۶۴ به دست آمد که با نتایج ما همخوانی داشت.

Darokar *etal* (2005) به کمک نشانگر RAPD و AFLP تنوع ژنتیکی گونه‌های صبر زرد را بررسی کرده و گونه‌های صبر زرد را در ۳ گروه قرار دادند. درصد چندشکلی نوارها ۷۰ درصد به دست آمد که نسبت به نتایج ما درصد چندشکلی پایینی گزارش شده است. آغازگر شماره ۲۰ در تحقیق ما چندشکلی ۱۰۰ درصد را نشان داد که بیانگر قدرت بالای این آغازگر در بررسی تنوع مولکولی و همچنین بیانگر تنوع زیاد جمعیت‌های صبر زرد مورد بررسی می‌باشد نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در بسیاری از موارد تنوع ژنتیکی گونه‌های صبر زرد متاثر از پراکنش جغرافیایی نیست و نشانگرهای RAPD و AFLP ابزار موثری در ارزیابی تنوع ژنتیکی صبر زرد در مکان‌های جغرافیایی مختلف است همچنین مناطقی که تنوع ژنتیکی بیشتری برای آن‌ها مشاهده شده است باید به عنوان مناطقی برای نمونه‌گیری بیشتر به منظور حفظ ژرم پلاسم مورد توجه قرار گیرند.

در تحقیق دیگر Van Der Bank *etal* (2006)، تنوع ژنتیکی ۲ گونه صبر زرد را با استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

RAPD و فیتوشیمیایی بررسی کردند و در این گروه‌بندی نیز این دو مجموعه به طور کامل از یکدیگر تفکیک شدند. این گونه‌ها خصوصیاتی شبیه صبر زردهای ایران داشتند. در این تحقیق سطح تنوع ژنتیکی به نسبت پایین و رابطه خویشاوندی نزدیکی بین گونه‌های مورد آزمایش مشاهده گردید که با نتایج ما همخوانی نداشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از تکنیک RAPD می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی جمعیت‌های صبر زرد را نسبت به همدیگر مشخص ساخت. از این تکنیک برای بررسی تنوع در بسیاری از گیاهان استفاده شده است. تمامی این مطالعات نشان داده‌اند که مارکرهای RAPD، ابزاری مناسب برای تجزیه ژنوم گیاهان هستند، هرچند به منظور غلبه بر مشکل تکرارپذیری کم، شرایط PCR بایستی به طور کامل کنترل شده باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸). شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم پلاسم صبر زرد ایران و همچنین در تدوین برنامه‌های اصلاحی مفید خواهد بود. به طوری که با بهره‌گیری از نتایج مولکولی و ارزیابی تنوع فیتوشیمیایی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از آن وجود خواهد داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

رضایی، م. ب.، ک. جایمند، و.ا. مظفریان. ۱۳۸۵. شناخت ترکیبات شیمیایی صبر زرد. انتشارات سازمان جنگل‌ها و مراتع ایران، صفحه ۳۵-۳۲.

نقوی، م، ر.، ب، قره یاضی، ق. حسینی سالکده. ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۴۰ صفحه.

Darokar, M. P., R. Rai, A.K. Gupta, A.K. Shasany, S. Rajkumar, V. Sundaresan, S.P.S. Khanuja. 2005. Molecular assessment of germplasm diversity in *Aloe* species using RAPD and AFLP analysis. J. Med. Aroma. Plant. Sci, 25, 354- 361.

Dellaporta, S. L., J. Wood, J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation. version II. Plant Molecular Biology Reports, 1: 19-21.

Hasanuzzaman, M. K. U., K.M. Ahamed, A.M.M. Khalequzzaman, K. Shamsuzzaman Nahar. 2008. Plant characteristics, growth and leaf yield of *Aloe vera* as affected by organic manure in pot culture. Aust. J. Crop Scie, 2, 158-163.

Nayanakantha, N. M. C., B.R. Singh. A.K. Gupta. 2010. Assessment of genetic diversity in *Aloe* germplasm accessions from India using RAPD and morphological markers. Biol Scie, 39, 1-9.

Nie, M., W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of National Academy of Sciences of the USA, 76**,** 5269–5273.

Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.00.Exeter Software, Setauket, NY, 120p.

Tabaei Aghdaei, S. R., H. Hosseini Monfared, H. Fahimi, H. Ebrahimzade, M. Jebelly, M. R. Naghavi, A. Babaei. 2007. Genetic variations amongst Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) landraces from different regions of Iran. Iran J. Bot, 12, 121-127.

Van Der Bank, H., B.E. Van Wyk, M.Van Der Bank. 2006. Genetic variation in two economically important *Aloe* species (Aloaceae). Biochem.Sys. Ecol, 23, 251-256.

Archive of SID

www.SID.ir