فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۳، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۵۲۲-۵۱٤ (۱۳۸٦)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) ایران، با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD

اسماعیل طالبی کویخی*[۱]، مسعود محمدعلیها[۲] و محمدرضا نقوی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، پست الکترونیک: tal_1351@yahoo.com
۲- عضو هیئت علمی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
* نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۸٦ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸٦

چکیده

در این تحقیق، از نشانگر مولکولی RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۳ جمعیت باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) ایران استفاده شد. هفت پرایمر مورد استفاده، تعداد ٦۹ باند قابل‌تشخیص ایجاد نمودند که ۹٤٪ آنها (٦٤ باند) در بین جمعیتهای مختلف چند شکلی نشان دادند. تعداد متوسط باندها به ازای هر آغازگر ۹/۱٤ بود. برای تعیین میزان تشابه بین جمعیتها، از ضریب تشابه دایس استفاده گردید. بیشترین میزان تشابه (۸۰/.) بین دو نمونه ریف و هملون و کمترین میزان تشابه (۱۷/.) بین دو نمونه هملون و سمنان مشاهده گردید. با استفاده از الگوریتم UPGMA یک دندروگرام بر مبنای ماتریس تشابه تهیه شد. تجزیه کلاستر، جمعیتهای مختلف باریجه را به ۳ گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. نتایج این پژوهش، بیانگر کارآمدی نشانگر RAPD در تعیین تنوع ژنتیکی جمعیتهای باریجه مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Ferula gummosa* Boiss.، RAPD، تنوع ژنتیکی، تجزیه کلاستر، باریجه.

مقدمه

استفاده از برخی گیاهان دارویی به‌عنوان محصولات فرعی مرتع، در کشور ایران دارای سابقه‌ای بسیار طولانی است و تعیین ویژگیهای ژنتیکی، فیزیولوژیکی، اکوفیزیولوژی و اکولوژیکی این گیاهان به‌منظور بهره‌برداری پایدار و اقتصادی همراه با حفظ تنوع موجود در عرصه‌های طبیعی مراتع ایران بسیار حائز اهمیت می‌باشد؛ تا از انقراض گونه‌های منحصر به فرد و متفاوت از لحاظ ژنتیکی جلوگیری به‌عمل آورده و ضمن ایجاد اشتغال و افزایش درآمد مرتع‌داران، این گونه‌ها را برای نسلهای آینده و ایجاد توازن در طبیعت حفظ کرد.

باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.)، گیاهی است از تیره چتریان که در بسیاری از ارتفاعات ایران پراکنش دارد و به‌طور محدودی نیز در برخی از کشورهای اطراف دیده می‌شود. پیشینه تاریخی استفاده از این گیاه به بیش از ۳۰۰۰ سال قبل باز می‌گردد. باریجه دارای ترکیبات

Archive of SID
www.SID.ir

اسانسی و رزینی فراوان می‌باشد. از این‌رو توجه به حفظ ذخائر ژنتیکی این گیاه بسیار مهم است (مؤمنی و شاهرخی، ۱۳۷۷؛ محمدی و علیها، ۱۳٦۸؛ ادنانی و همکارن، ۱۳۸٤).

تحقیقات فراوانی در کشورهایی نظیر هند، روسیه، ترکیه، آلمان، پاکستان، فرانسه، آمریکا، اسپانیا و ژاپن در رابطه با جنس کما (*Ferula*) انجام شده است که از نظر موضوعی بیشتر این پژوهشها، در زمینه خواص دارویی و کمترین آنها مربوط به جنبه‌های علوفه‌ای، زراعی، اکولوژیک و ژنتیکی گونه‌های گیاهی این جنس بوده است، ولی تاکنون تحقیقات ژنتیکی، استخراج DNA و بررسی تنوع ژنتیکی گیاه باریجه انجام نشده 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. به‌دلیل اینکه در RAPD از پرایمرهای تصادفی استفاده می‌شود و دمای اتصال پرایمر نیز پایین است، پرایمر به جایگاه اختصاصی متصل نمی‌شود و بنا به تعریف، غیر اختصاصی نامیده می‌شود (Williams *et al.*, 1990). این خصوصیت که در RAPD از پرایمرهای تصادفی استفاده می‌شود و نیاز به DNA کمی دارد، باعث شده به تکنیکی ساده برای تجزیه وتحلیل سریع تبدیل گردد (Welsh & McClelland, 1990). مشخص شده که 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، ۱۳۸٤). یکی از راههای مناسب در شناسایی تنوع مولکولی در جمعیتهای باریجه بومی ایران، استفاده از تکنیک RAPD می‌باشد که امکان شناسایی مولکولی جمعیتهای باریجه را فراهم می‌سازد. به‌طور مسلم با بهره‌گیری از نشانگرهای تصادفی RAPD و همچنین ترکیبهای اسانس موجود در جمعیتهای باریجه در آینده، امکان شناسایی حتی نشانگرهای پیوسته با این ترکیبها نیز وجود خواهد داشت. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۳ نمونه باریجه بومی ایران با استفاده از مارکرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

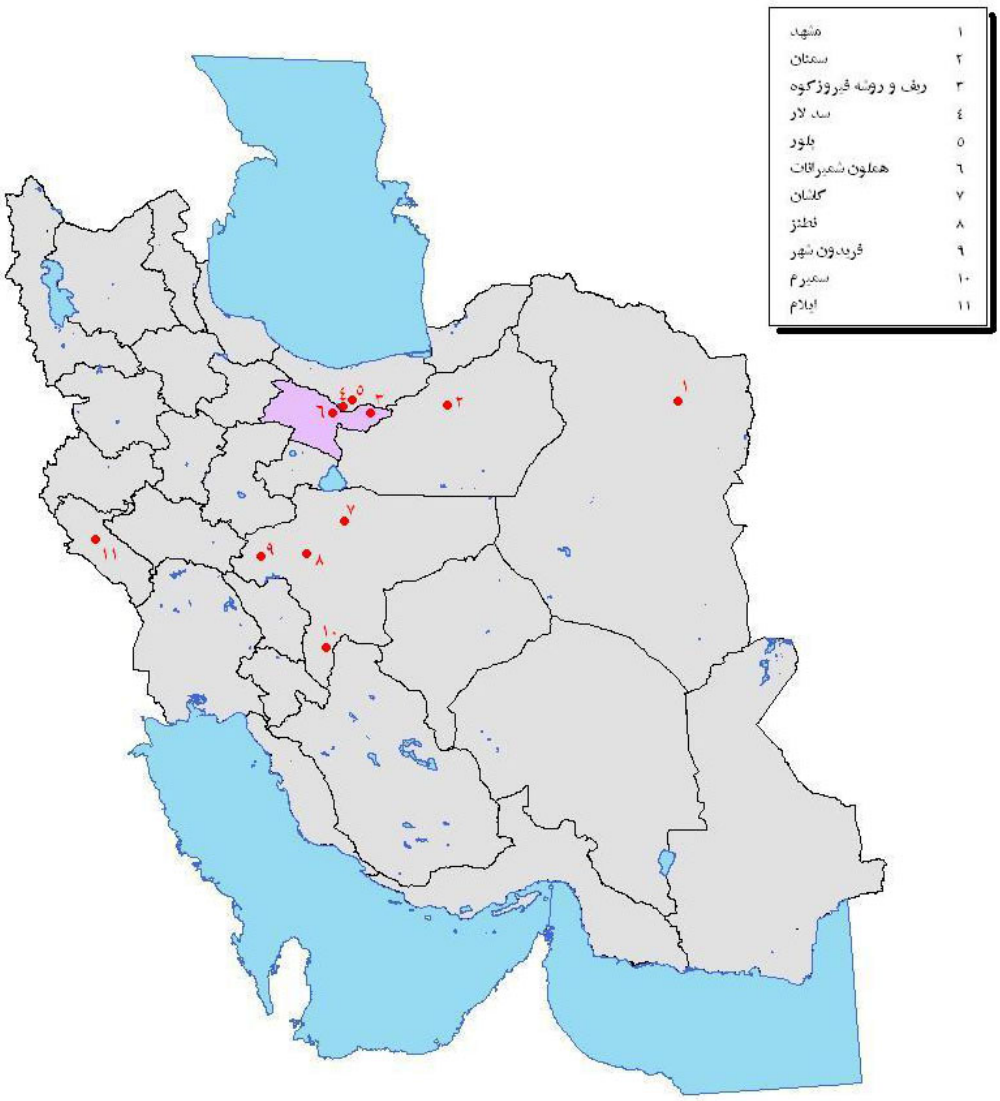
در این تحقیق بذرهای ۱۳ جمعیت باریجه که از مناطق مختلف کشور شامل، سد لار، ایلام، سمنان، مشهد، سرک فیروزکوه، نطنز، پلور آمل، هملون شمیرانات، ریف فیروزکوه، فریدونشهر، روشه فیروزکوه، کاشان و سمیرم جمع‌آوری شده بود، استفاده گردید (شکل ۱).

پس از جمع‌آوری بذرها از نقاط مختلف، کشور نسبت به بوجاری و خالص‌سازی آنها اقدام گردید تا در زمین مناسبی کشت شوند که در این خصوص، علاوه بر کشت گلدانی، در ایستگاه تحقیقات مراتع همند آبسرد نیز کشت صورت گرفت. برگها پس از برش در داخل فلاسک یخ قرار داده شدند و به فریزر با دمای ۲۰- درجه منتقل گردیدند.

به‌منظور استخراج DNA از روش تغییر یافته Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شد. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از الکتروفورز آگارز ۱ درصد و دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده گردید. در این آزمایش از ۷ پرایمر شرکت سیناژن که

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نقشه ایران که در آن محل جمع‌آوری جمعیتهای مختلف باریجه نشان داده شده‌است. (ریف، روشه و سرک شماره ۳ را شامل می‌شوند).

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 میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر پرایمر ۰/٤ پیکومولی، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs و تقریباً ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و DNA پلی‌مراز به اندازه ۱/۳ واحد بود. چرخه حرارتی شامل، ۳۵ چرخه بود که هر چرخه شامل مرحله واسرشت سازی به‌مدت یک دقیقه در درجه حرارت ۹۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمر به‌مدت یک دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط پرایمر به‌مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه‌های حاصل از

www.SID.ir

واکنش PCR بر روی ژل آگارز ران شدند. جهت مشاهده قطعات DNA، ژل به‌مدت 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 باندها قابل رؤیت شوند. به‌منظور نمره‌دهی باندها، وجود باند در هر موقعیت به‌صورت عدد یک و عدم وجود باند به‌صورت 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.

نتایج

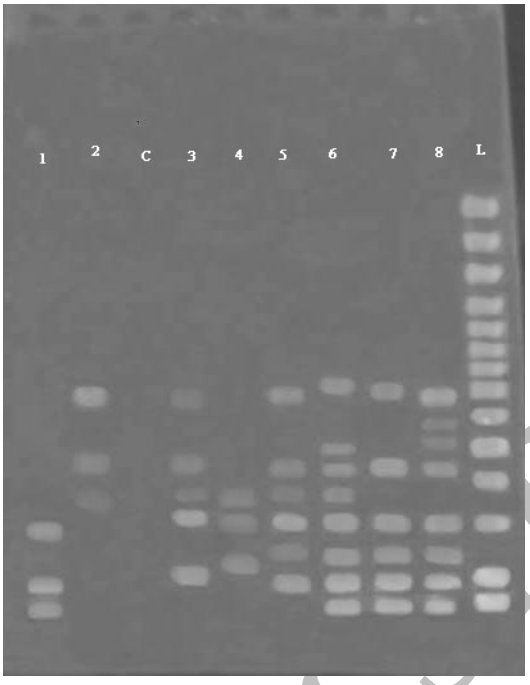
تعداد کل باندها، تعداد باندهای پلی‌مورف و درصد پلی‌مورفیسم برای هر پرایمر در جدول ۱ نشان داده شده‌است. در استفاده از این ۷ پرایمر در مجموع ٦٩ باند مشاهده شد که ٦٤ باند چند شکل بودند. یعنی حدود ۹٤ درصد از این باندها پلی‌مورفیسم نشان دادند. بیشترین تعداد باند، مربوط به پرایمر شماره ٥ با ۱۲ باند و کمترین، مربوط به پرایمر شماره ۲ و ۷ با ٦ باند بود. پرایمرهای شماره ۱، ۳، ٥، ۷ صددرصد پلی‌مورفیسم نشان دادند که بیانگر تنوع بالای نمونه‌های باریجه و قدرت زیاد این پرایمرها در تفکیک ارقام می‌باشد. شکل ۲ وضعیت باندهی ۸ نمونه باریجه با استفاده از پرایمر شماره ۳ را نشان می‌دهد.

جدول ۱- توالی پرایمر، تعداد کل باندها، تعداد باندهای پلی‌مورف و درصد پلی‌مورفیسم

شماره پرایمر	توالی پرایمر ٥´→۳´	تعداد کل باندها	تعداد باندهای پلی‌مورف	درصد پلی‌مورفیسم
۱	TTCGAGCCAG	۱۱	۱۱	۱۰۰
۲	GTGAGGCGTC	٦	٥	۸۳
۳	GGGGGTCTTT	۱۱	۱۱	۱۰۰
٤	CCGCATCTAC	۹	٦	٦٦
٥	GAACGGACTC	۱۲	۱۲	۱۰۰
٦	GTCCCGACGA	۹	۹	۱۰۰
۷	CTCACCGTCC	٦	٦	۱۰۰
میانگین		۹/۱٤	۸/٥۷	۹۲/۷۱

میزان تشابه بین جفت نمونه‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشتر نمونه‌ها با همدیگر تشابه کمی را نشان می‌دهند. بیشترین میزان تشابه (۸۰/.) بین دو نمونه ریف و هملون و کمترین میزان تشابه (۱۷/.) بین دو نمونه هملون و سمنان مشاهده گردید. میانگین تشابه بین نمونه‌ها نیز ٤۲/. بدست آمد که بیانگر تفاوت نسبی خوب در سطح مولکولی بین نمونه‌ها می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir



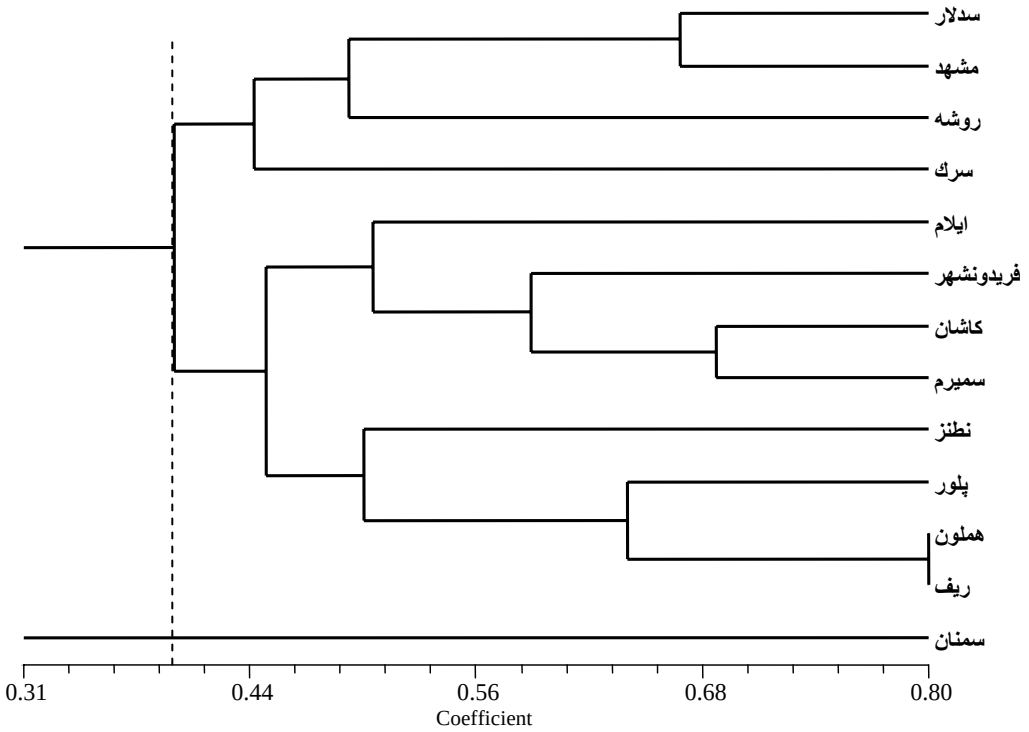
شکل ۲- الگوی باندهی ۸ نمونه باریجه با استفاده از پرایمر شماره ۳. L بیانگر سایز مارکر و C بیانگر چاهک کنترل است.

جدول ۲- مقدار تشابه دایس، بین نمونه‌های باریجه ۱۳ شهر مختلف

	سد لار	ایلام	سمنان	مشهد	سرک	نطنز	پلور	هملون	ریف	فریدونشهر	روشه	کاشان	سمیرم
سد لار	۱												
ایلام	/٤٩	۱											
سمنان	/٤٢	/٤٧	۱										
مشهد	/٦٧	/٥١	/٤٥	۱									
سرک	/٣٩	/٤٨	/٣١	/٥١	۱								
نطنز	/٤٣	/٤٧	/٣٦	/٥٠	/٣٤	۱							
پلور	/٢٧	/٤٤	/٢٣	/٤٣	/٤٣	/٥١	۱						
هملون	/٣٨	/٤٣	/١٧	/٤٩	/٣٣	/٤٩	/٦٩	۱					
ریف	/٣٧	/٣٨	/٢٤	/٥٣	/٤٥	/٤٩	/٥٨	/٨٠	۱				
فریدونشهر	/٤٠	/٥٢	/٣٧	/٣٤	/٣٥	/٤٣	/٥٢	/٤٢	/٥٠	۱			
روشه	/٥٣	/٤٧	/٣٣	/٤٥	/٤١	/٣٢	/٤٧	/٣٦	/٢٩	/٤٧	۱		
کاشان	/٣٥	/٥٣	/٢١	/٢٩	/٣٤	/٤٣	/٥٨	/٤٣	/٤٧	/٦٢	/٤٧	۱	
سمیرم	/٣٤	/٤٥	/١٨	/٢٧	/٢٢	/٤٤	/٤٠	/٣٨	/٣٧	/٥٥	/٤٢	/٣٢	۱

Archive of SID
www.SID.ir

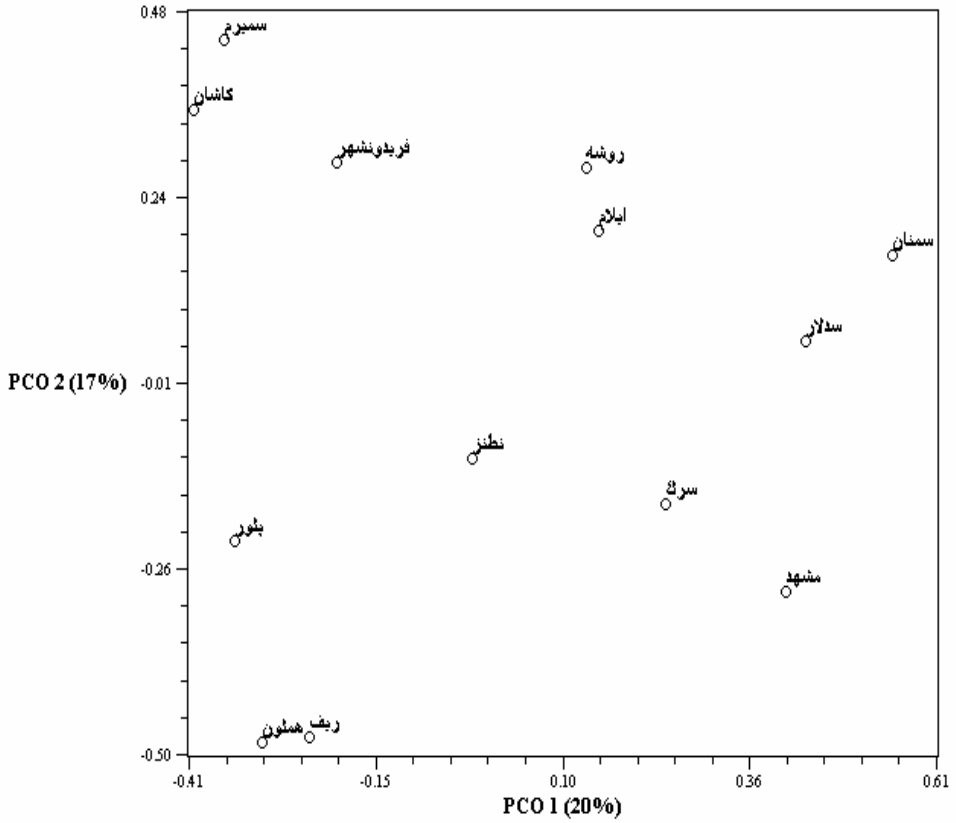
نتایج تجزیه کلاستر براساس ماتریس تشابه دایس نشان می‌دهد (شکل ۳) که نمونه‌های گرفته شده از شهرهای متفاوت از نظر مولکولی با همدیگر تفاوت دارند. تجزیه کلاستر، نمونه‌های باریجه را به سه گروه اصلی تقسیم نمود که در گروه اصلی اول، ٤ نمونه قرار می‌گرفتند و در بین آنها نمونه‌های سد لار و مشهد بیشترین تشابه را نشان می‌دهند. در گروه دوم، ۸ نمونه قرار گرفتند و قابل تقسیم به دو زیر گروه ٤ نمونه‌ای بودند. در این گروه، بیشترین تشابه بین هملون و ریف مشاهده گردید. در گروه سوم، تنها نمونه سمنان قرار گرفته بود و تفاوت عمده‌ای را با دیگر نمونه‌ها در سطح مولکولی نشان می‌داد.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD.

علاوه بر تجزیه کلاستر، از تجزیه به مختصات اصلی نیز برای گروه‌بندی ارقام می‌توان استفاده کرد (شکل ٤) که نتایج پراکنش و توزیع نمونه‌ها بر اساس ۲ مؤلفه اول در شکل ۳ آمده است. مؤلفه اول ۲۰ و مؤلفه دوم ۱۷ درصد از تغییرات کل را نشان می‌دهند.

www.SID.ir



شکل ٤- بای پلات تجزیه به مؤلفه اصلی برای مارکرهای RAPD نمونه‌های باریجه، مربوط به شهرهای مختلف.

نتایج گروه‌بندی نمونه‌ها در دو محور مختصات بر اساس ۳۷ درصد تغییرات بر خلاف تجزیه کلاستر به خوبی قابل گروه‌بندی نمی‌باشد و در نتیجه تا حد کمی نتایج تجزیه کلاستر را تأیید می‌نماید.

بحث

در این تحقیق تنوع مولکولی نمونه‌های مختلف باریجه از ۱۳ مکان ایران که باریجه به‌طور طبیعی در آنها رشد می‌کند، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. مقدار چند شکلی (۹٤ درصد) بدست‌آمده در این آزمایش نسبت به گیاهان دارویی دیگر بالاتر می‌باشد. به‌عنوان مثال، Tabaei-Aghdaei و همکاران (۲۰۰۷) میزان پلی‌مورفیسم در ۱۲ جمعیت گل‌محمدی را ٦۷ درصد گزارش نمودند که نسبت به نتایج این آزمایش، چند شکلی کمتری بدست آوردند. از بین ۷ پرایمر مورد استفاده، ٤ پرایمر پلی‌مورفیسم ۱۰۰ درصد را نشان دادند که بیانگر قدرت بالای این پرایمرها در بررسی تنوع مولکولی و همچنین بیانگر تنوع زیاد جمعیتهای باریجه مورد بررسی می‌باشد.

نتایج تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه اصلی نیز تنوع مناسب جمعیتها را به خوبی نشان می‌دهد. بیشترین تشابه (۸۰٪) بین نمونه‌های ریف و هملون 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 لزوماً از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری را نشان نمی‌دهند. به‌عنوان مثال، اگر چه سرک فیروزکوه به ریف و

Archive
www.SID.ir

هملون بسیار نزدیک می‌باشد، ولی از نظر گروه‌بندی مولکولی در گروههای مختلف قرار گرفته‌اند. از طرف دیگر، اگرچه نمونه‌های سد لار و مشهد از نظر جغرافیایی در ۲ منطقه جداگانه هستند، ولی در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند.

در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تکنیک RAPD می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی جمعیتهای باریجه 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 به‌منظور غلبه بر مشکل تکرارپذیری کم، شرایط PCR بایستی کاملاً کنترل شده باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٤). شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم پلاسم باریجه ایران و همچنین در تدوین برنامه‌های اصلاحی مفید خواهد بود. به‌طوری‌که با بهره‌گیری از نتایج مولکولی و ارزیابی تنوع فیتوشیمیایی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیتهای مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از آن وجود خواهد داشت.

منابع مورد استفاده

- ادنانی، س.م.، بشیری، ح. و باقری، ح.، ۱۳۸٤. بررسی ویژگیهای رویشگاهی و برخی ترکیبهای شیمیایی گیاه باریجه در استان قم. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۱: ۲۱۱-۱۹۵.
- محمدی، غ. و علیها، م.، ۱۳٦۸. مطالبی پیرامون باریجه. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، ۲٤ صفحه.
- مؤمنی، ت. و شاهرخی، ن.، ۱۳۷۷. اسانسهای گیاهی و اثرات درمانی آنها. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۵۸ صفحه.
- نقوی، م.ر.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق.، ۱۳۸٤. نشانگرهای مولکولی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳٤۲ صفحه.
-Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation. version II. Plant Molecular Biology Reports, 1: 19-21.
- Nie, M. and Li, W.H., 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., Hosseini Monfared, H., Fahimi, H., Ebrahimzade, H., Jebelly, M., Naghavi M.R. and Babaei A., 2007. Genetic variations amongst Damask rose (*Rosa damascena* Mill**.**) landraces from different regions of Iran. Iranian Journal of Botany, 12: 121-127.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, JA. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.

Archive of SID
www.SID.ir

Genetic diversity in *Ferula gummosa* Boiss. populations of Iran using RAPD molecular markers

E. Talebi Kohyakhy[1], M. Mohammad Aliha[2] and M.R. Naghavi[3]

1- Azad University of Science and Technology, Tehran, E-mail: tal_1351@yahoo.com
2- Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran
3- Agricultural College, University of Tehran, Karaj

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers have been used to characterize the genetic diversity among 13 Iranian landraces of *Ferula gummosa* Boiss. The 7 primers used in this study amplified 69 scorable RAPD bands among which 64 were polymorphic (94%). The average number of bands was 9.14 for each primer. Dice similarity index was used for measuring genetic similarities among landraces. The highest similarity (0.80) was found between Hamlon and Reef populations, whereas the lowest was between Hamloon and Semnan. UPGMA algorithm was used for cluster analysis. Cluster analysis separated the 13 landraces into three main groups. The results indicated that RAPD technique is an efficient tool for assessing genetic diversity in *Ferula gummosa* populations.

Key words: *Ferula gummosa* Boiss., RAPD, genetic diversity, cluster analysis.

Archive of SID

www.SID.ir