Archive of SID

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۴، صفحه ۶۸۱-۶۷۳ (۱۳۹۶)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.105906.1750

بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی ژرم‌پلاسم کلپوره (*Teucrium polium* L.) استان کرمان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS

امین باقی‌زاده[1*]، مژگان مقدری[2] و غلامرضا بخشی‌خانیکی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، پست الکترونیک: amin_4156@yahoo.com

۲- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، ایران

۳- استاد، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاهیست علفی، پایا و پرشاخه که در نواحی مختلف اروپا و خاورمیانه ازجمله ایران به‌صورت وحشی می‌روید. برای بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم این گیاه در استان کرمان، ابتدا با استفاده از روش CTAB استخراج DNA از ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده انجام شد. از ۱۵ آغازگر RAPD برای انجام PCR استفاده شد. داده‌های بدست آمده حاصل از الکتروفورز توسط نرم‌افزار NTSYS با ضریب تشابه دایس و به‌روش UPGMA آنالیز شدند. سپس به‌منظور بررسی تنوع فیتوشیمیایی ژرم‌پلاسم کلپوره از ۷ ژنوتیپ از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر اسانس‌گیری بعمل آمد و با استفاده از دستگاه GC/MS تجزیه و شناسایی اسانس انجام شد. بر روی داده‌های حاصل از نتایج GC/MS توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه خوشه‌ای انجام و دندروگرام مربوطه رسم گردید. پس از انجام الکتروفورز محصولات حاصل از PCR پرایمرهای RAPD، ۱۸۲ باند ایجاد شد که در محدوده ۲۳۰ تا ۲۳۰۰ جفت باز قرار داشتند که از این تعداد، ۱۶۹ باند (۹۳٪) چند شکلی نشان دادند. میزان تشابه ژنتیکی نمونه‌ها بین ۰/۳۷ تا ۰/۷۲ بود. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، نمونه‌های جمع‌آوری شده در چهار گروه قرار گرفتند. مواد موجود در اسانس ژنوتیپ‌های کوهبنان، باغین، شهر بابک، عنبرآباد، راور و کرمان ۱۰۰٪ شناسایی شد. در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های فیتوشیمیایی، نمونه‌های مورد نظر در سه گروه طبقه‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی، کلپوره (*Teucrium polium* L.)، RAPD، اسانس، GC/MS.

مقدمه

Teucrium polium از تیره نعناع است که به‌نام‌های محلی مریم نخودی و کلپوره معروف است. این جنس در ایران دوازده گونه دارد (Mozaffarian, 1994). کلپوره گیاهیست علفی، پایا، پرشاخه به ارتفاع ۱۰ تا ۳۵ سانتی‌متر، دارای ظاهر سفید پنبه‌ای که برگ‌های آن بدون دمبرگ، باریک، دراز و پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای در سطح پهنک است. گلهایی به رنگ سفید تا سفید مایل به زرد دارد. ساقه گیاه به‌صورت پرپشت و پرشاخه و یا به‌حالت خوابیده دیده می‌شود. این گیاه معمولاً در نواحی بایر، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زارهای نواحی مختلف اروپا،

www.SID.ir

Archive of SID

منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب‌غربی آسیا ازجمله ایران می‌روید و در مصر، عربستان، قطر و اردن یافت می‌شود. مصرف گیاه طبق بررسی‌هایی که بعمل‌آمده در رفع سردرد و ضعف عمل دستگاه تغذیه، بیماری‌های دستگاه تناسلی، ادراری و تأخیر یا عدم وقوع قاعدگی به علت ضعف عمومی مؤثر بوده و اثر ضدتشنج دارد. همچنین سرشاخه‌های گلدار گیاه در طب سنتی به‌صورت دم‌کرده برای رفع دردهای دوره آبستنی بکار می‌رود (Mozaffarian, 1994). اثرات ضد باکتری و ضد تب، ضد التهاب و ضد زخم نیز در مصرف عصاره این گیاه دیده شده است (Esmaili & Amiri, 2009). بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصان اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم، یاری می‌نماید و مطالعه الگوپذیری و تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها، نشان‌دهنده سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت می‌باشد و در تعیین اولویت‌های کاشت در مناطق مختلف می‌تواند کمک‌کننده باشد (Ghareyazi, 2001). Welsh و Peterson در مطالعه چند شکلی‌ها با آغازگرهای اختیاری، ثابت کردند که این روش می‌تواند بین نژادهای همه موجودات تقریباً بکار رود و در شناسایی و بررسی نژادها با ارزش باشد (Welsh & Peterson, 1991). در تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴ ژنوتیپ مریم‌گلی برزیلی انجام شد، ۱۸ آغازگر انتخابی Random amplified polymorphic DNA (RAPD) مورد استفاده قرار گرفت و ۱۹۵ باند مشاهده شد. دندروگرام براساس ضریب تشابه جاکارد و فاصله اقلیدوسی به‌روش UPGMA رسم شد و ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند (Echeverrigaray *et al.*, 2006). Hatri و Zamani تنوع ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) را با نشانگر RAPD مطالعه کردند. آنالیز داده‌ها انجام و از ضریب تشابه جاکارد برای بررسی میزان تشابه استفاده شد، تجزیه خوشه‌ای نیز انجام شد و بر این اساس نمونه‌ها در ۶ گروه تقسیم شدند (Hatri & Zamani, 2011). Dalir (۲۰۱۱) نیز ۱۳ نمونه آویشن (*Thymus*) را با نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS بررسی کرد، در بررسی تنوع ژنتیکی از ۱۴۹ باند، ۱۴۲ باند چند شکل بودند و تنوع ژنی بدست آمده ۳۵٪ بود. براساس تجزیه خوشه‌ای نیز صفات فیتوشیمیایی در ۲ گروه دسته‌بندی شدند. در بررسی اسانس گیاه مریم‌گلی در ترکیه نشان داده شده است که عمده‌ترین ترکیب‌های این گیاه، بتا-پینن ۱۸٪، بتا-کاریوفیلن ۱۷/۸٪ و آلفا-پینن ۱۲٪ می‌باشند (Ricci *et al.*, 2005). در پژوهش Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) در نمونه‌ای مربوط به بروجرد ۴۴ ماده شناسایی شد که مهمترین ترکیب‌های شناسایی شده شامل آلفا-پینن ۱۲/۹۵٪، بتا-کاریوفیلن ۱۲/۳۵٪، جرماکرن B ۱۱/۷۴٪، بتا-پینن ۸/۷۵٪، لیمونن ۷/۶۰٪ و کاریوفیلن اکسید ۵/۵۷٪ می‌باشند (Esmaili & Amiri, 2009). همچنین در تحقیقی که توسط Hassan و Muhtadi (۱۹۷۹) انجام شد ۸۰ ماده از اسانس جداسازی شد که بیشترین مواد به‌ترتیب اسپاتولنول، آلفا-پینن، سیس وربنول، بتا-پینن، لیمونن و وربنون بود. هدف اصلی این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی ژرم‌پلاسم کلپوره استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی و بررسی میزان تطابق تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی به‌منظور فراهم آوردن اطلاعات ژنتیکی و فیتوشیمیایی لازم برای برنامه‌های اصلاحی بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۵ ژنوتیپ کلپوره جمع‌آوری شده از مناطق زرند، کوهبنان، بافت، رفسنجان، سرچشمه، کرمان، باغین، سیرجان، عنبرآباد، شهداد، راور، راین، داوران، شهربابک و دلفارد استان کرمان در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA به‌روش CTAB انجام شد. برای بررسی کمّیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای انجام واکنش‌های PCR از دستورالعمل وانتورپ با اندکی تغییرات استفاده گردید (Shahriari & Emamjomehe, 2002). ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق از نوع اپندورف گرادیانت بود. PCR با برنامه زیر انجام شد؛ یک چرخه: شروع واسرشت‌سازی DNA به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C،

www.SID.ir

Archive of SID

۴۰ چرخه: هر چرخه شامل سه مرحله زیر؛ تک رشته‌ای شدن DNA به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال آغازگر به DNAی تک رشته‌ای به مدت ۴۰ ثانیه در دمای مناسب (با توجه به TM پرایمر متفاوت بود) و بسط آغازگر به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲°C، یک چرخه: تکمیل بسط ۵ دقیقه ۷۲°C.

پس از تکمیل چرخه‌های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند (Shahriari & Emamjomehe, 2002). غلظت و حجم مواد واکنش PCR و نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده به‌ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است.

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیناژن تهیه شده بودند. دستگاه مورد استفاده برای الکتروفورز در این تحقیق از نوع الکتروفورز افقی مدل $E_{۱۳۲}$ شرکت Consort بلژیک بود. برای انجام هر بار الکتروفورز به هر نمونه DNAی PCR شده یک میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه کرده و مخلوط حاصل در چاهک‌های ژل‌های تهیه شده ریخته شد. برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت تقریباً ۲ ساعت انجام شد.

جدول ۱- مواد مورد استفاده در PCR

اجزای واکنش	مقدار ماده در هر واکنش (میکرولیتر)	غلظت ماده در هر واکنش
DNA الگو	۱	۵۰ng/µl
آب دو بار تقطیر شده	۱۴/۷	-
بافر (۱۰ برابر)	۲/۵	۱۰x
dNTP	۲/۵	۲/۵mM
کلرید منیزیم	۲	۵۰mM
آغازگر	۲	۲ µM
DNA تک پلیمراز	۰/۳	۵unit/µl

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر
۵۳ سیناژن	5´ CTCCCTGAGC 3´
۵۴ سیناژن	5´ CTCCCTGAGC 3´
۶۲ سیناژن	5´ TTCCCCGTCG 3´
۶۳ سیناژن	5´ TTCCCCGCCC 3´
۶۹ سیناژن	5´ GAGGGCAAGA 3´
۷۰ سیناژن	5´ GGGCACGCGA 3´
۷۴ سیناژن	5´GAGCACCTGA 3´
۷۵ سیناژن	5´ GAGGTCCAGA 3´
۳۷۶ سیناژن	5´ CAGGACATCG 3´
۳۹۱ سیناژن	5´ GCGAACCTCG 3´
۳۹۲ سیناژن	5´ CCTGGTGGTT 3´
۳۹۵ سیناژن	5´ TCACTTGAGG 3´
۳۹۶ سیناژن	5´ GAATGCGAGG 3´
۳۹۷ سیناژن	5´ GGGCTGTGCC 3´
۳۹۹ سیناژن	5´ TTGCTGGGCG 3´

سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ میلی‌مولار رنگ‌آمیزی شد. ژل رنگ‌آمیزی شده پس از دو تا سه مرتبه شستشو با آب مقطر درون دستگاهGel Documentation مدل Syngene تحت اشعه ماوراءبنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل با فرمت‌های مختلف توسط نرم‌افزار Gene snap عکس تهیه گردید (Haji Rezai *et al.*, 2008). سپس با استفاده از نرم‌افزار Gene Tools و به کمک نشانگر راهنما (نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp محصول شرکت Fermentas به میزان ۳µl در هر ژل)، اطلاعات مربوط به باندهای چاهک‌ها ازجمله سایز باندهای مشاهده شده بدست آمد و بعد داده‌ها در نرم‌افزار اکسل به‌صورت ماتریس صفر و یک تنظیم و طبقه‌بندی شدند. ماتریس بدست آمده توسط نرم‌افزار NTSYS و با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA تجزیه شد و دندروگرام مربوطه رسم شد

www.SID.ir

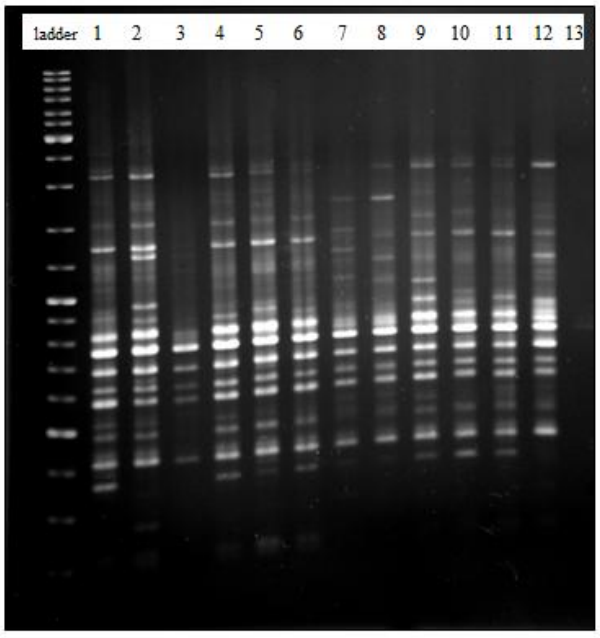
Archive of SID

(Dehghan kohestani *et al.*, 2008). برای تجزیه فیتوشیمیایی، هفت نمونه متفاوت از سراسر استان از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده انتخاب و با روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر مدل USP به مدت ۴ ساعت اسانس‌گیری هر نمونه انجام شد. برای آنالیز اسانس و تشخیص اجزای تشکیل‌دهنده آن از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنجی جرمی مدل QP5050 شرکت Shimadzu ژاپن استفاده شد. کروماتوگرافی با ستون Cross linked 5% Phenyl methyl siloxane با ضخامت لایه ۰/۱۸µm، DB-5MS (40mx18mm) و با برنامه دمایی ۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بعد ۲۷۵–۶۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت 5°C/min انجام شد. گاز هلیم با سرعت یک میلی‌متر در دقیقه و ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ev، به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت اجزای اسانس با استفاده از مقایسه طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک willey 2000 موجود در نرم‌افزار lab solution دستگاه GC-MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد، براساس سری آلکان‌های C8-C19 تزریق شده با شرایط یکسان و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی شدند (Jaymand & Rezaei, 2006). به‌منظور مقایسه نمونه‌های مختلف اسانس کلپوره با یکدیگر، ترکیب‌های شناسایی شده حاصل از GC/MS توسط نرم‌افزار SPSS 12 تجزیه شده و خوشه مربوطه برای هفت نمونه مورد بررسی رسم شد.

نتایج

آنالیز باندهای حاصل از ۱۵پرایمر RAPD

درمجموع ۱۸۲ قطعه DNA توسط ۱۵ آغازگر انتخاب شده برای آنالیز تکثیر گردید که از میان آنها ۱۳ قطعه در بین تمام ۱۵ توده یک شکل بودند و باقیمانده آنها (۱۶۹ قطعه) چند شکلی نشان دادند، که حکایت از درصد بالای قطعات چند شکل در میان نمونه‌های مورد مطالعه دارد (۹۳٪). تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود، به‌طوری که بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۱۸ عدد و مربوط به آغازگر ۳۷۶ و کمترین تعداد ۸ عدد و مربوط به آغازگر ۶۳ بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۲۳۰۰–۲۳۰ جفت باز قرار داشت. نمونه‌ای از باندهای مذکور در شکل ۱ آورده شده است.

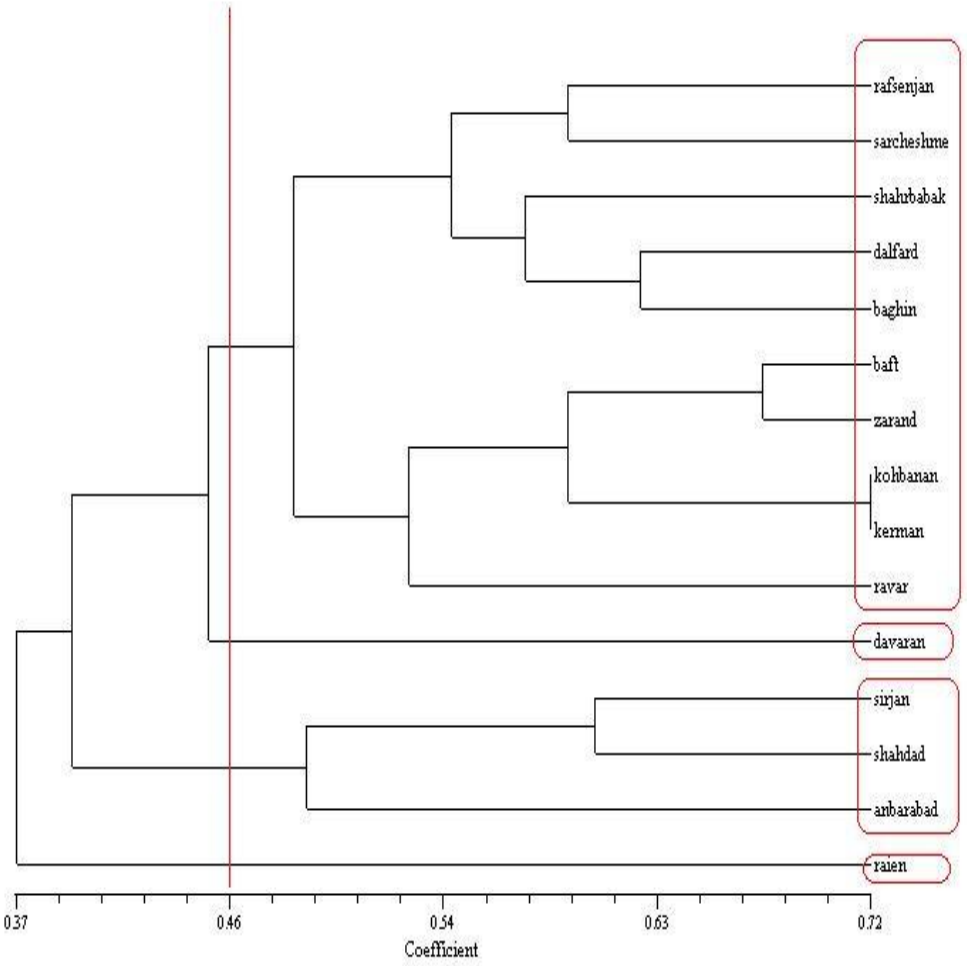


شکل ۱– عکس از ژل با آغازگر 392

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۲) میزان تشابه ژنتیکی در نمونه‌های مورد بررسی را بین ۰/۳۷ تا ۰/۷۲ نشان داد. در سطح تشابه (۰/۴۶) نمونه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. گروه ۱ شامل توده‌های رفسنجان، سرچشمه، شهر بابک، دلفارد، باغین، زرند، کرمان، راور، بافت و کوهبنان، گروه ۲ توده داوران، گروه ۳ شامل توده‌های سیرجان، شهداد و عنبرآباد و گروه ۴ توده راین می‌باشد.



شکل ۲- دندروگرام رسم شده حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های بدست‌آمده از تمامی آغازگرها

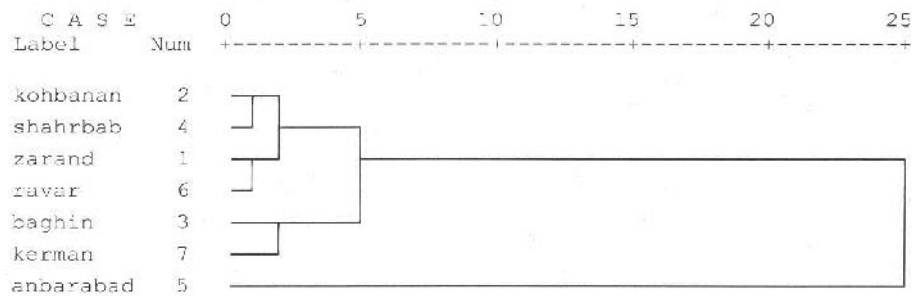
نتایج GC/MS

مواد موجود در اسانس نمونه‌های کوهبنان، باغین، شهر بابک، عنبرآباد، راور و کرمان ۱۰۰٪ و در اسانس نمونه زرند ۹۸/۹۲٪ شناسایی شد. نتایج نشان داد که ترکیب‌های عمده اسانس در نمونه زرند آلفا-پینن ۲۱/۱۷٪، بتا-پینن ۹/۹۶٪، ترانس-وربنول ۹/۸۳٪، لیمونن ۷/۱۵٪، میرسن ۷٪ و کاریوفیلن اکسید ۵/۹۳٪ و در اسانس مربوط به نمونه کوهبنان، آلفا-پینن ۲۶/۴۸٪، بتا-پینن ۱۱/۸۸٪، ترانس-وربنول ۱۰/۱۹٪، لیمونن ۹/۹۳٪ و ترانس-پینوکارونول ۵/۶۵٪ و در اسانس مربوط به نمونه باغین، آلفا-پینن ۱۹/۵۷٪، ترانس-وربنول ۱۲/۳۰٪، پینوکارونول ۸/۲۷٪، بتا-پینن ۸/۰۲٪ و وربنون ۷/۲۸٪ و در اسانس مربوط به

www.SID.ir

Archive of SID

شهر بابک، آلفا-پینن ۲۵/۹۱٪، بتا-پینن ۱۲/۱۱٪، ترانس-وربنول ۹/۶۲٪، پینوکارونول ۸/۲۷٪، میرسن ۶/۵۹٪، ترانس-پینوکارونول ۵/۱۲٪ و در اسانس مربوط به عنبرآباد، ترانس-وربنول ۱۴/۰۵٪، سپاتولنول ۱۱/۲۸٪، اکسید کاریوفیلن ۹/۲۶٪، جرماکرن دی ۵/۸۵٪، میرتنول ۵/۵۸٪ و در نمونه مربوط به راور، آلفا-پینن ۲۱/۸۹٪، بتا-پینن ۹/۹۰٪، میرسن ۸/۸۶٪، ترانس-وربنول ۸/۶۷٪، لیمونن ۸/۵۴٪ و در نمونه مربوط به کرمان، آلفا-پینن ۱۳/۳۰٪، ترانس-وربنول ۱۱/۸۹٪، بتا-پینن۸/۱۴٪، میرسن ۶/۸۶٪ و ترانس-پینوکارونول ۶/۶۸٪ می‌باشد. به‌طور کلی در اسانس زرند، ۲۰ ترکیب، در اسانس کوهبنان ۱۹ ترکیب، در اسانس باغین ۲۲ ترکیب، در اسانس شهر بابک ۲۰ ترکیب، در اسانس عنبرآباد ۲۸ ترکیب، در اسانس راور ۲۴ ترکیب و در اسانس کرمان ۲۴ ترکیب وجود داشت. برای ترکیب‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS12 و روش اتصال بین گروهی تجزیه خوشه‌ای انجام شد و دندروگرامی برای اطلاعات بدست آمده از GC/MS رسم شد (شکل ۳). برش در فاصله اقلیدوسی ۴، هفت ژنوتیپ مورد بررسی را در ۳ گروه مجزا قرار داد. گروه ۱ به دو زیرگروه تقسیم می‌شود، زیر گروه اول، کوهبنان و شهر بابک، زیرگروه دوم، زرند و راور، در گروه دوم نمونه‌های باغین و کرمان و در گروه سوم نمونه عنبرآباد قرار گرفت. نتایج نشان داد ژنوتیپ‌هایی که از نظر آب و هوایی مشابه بودند در کنار هم قرار گرفته‌اند.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های فیتوشیمیایی

بحث

تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی، نمونه‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. در گروه ۱ توده‌های رفسنجان، سرچشمه، شهر بابک، دلفارد، باغین، زرند، کرمان، راور، بافت و کوهبنان قرار گرفتند. در خوشه‌بندی هفت ژنوتیپ از نمونه‌های مذکور براساس داده‌های فیتوشیمیایی نیز نمونه‌های کوهبنان، شهر بابک، زرند و راور در یک گروه قرار گرفتند. دو نمونه باغین و کرمان نیز در فاصله اقلیدسی ۵ به این گروه می‌پیوندند. در گروه ۳ حاصل از خوشه‌بندی مولکولی توده‌های سیرجان، شهداد و عنبرآباد قرار دارند که در خوشه‌بندی فیتوشیمیایی نیز نمونه عنبرآباد در گروه جداگانه‌ای قرار گرفته است. در تحقیقی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی ۱۸ ژنوتیپ آویشن شیرازی (*Zataria moltiflora* Boiss.) با نشانگر AFLP و روش GC/MS مورد بررسی قرار گرفت، که داده‌های حاصل از نشانگر AFLP ژنوتیپ‌ها را در ۵ گروه جایابی کرد، همچنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های بیوشیمیایی، ژنوتیپ‌ها را در ۴ گروه قرار داد (Hadian *et al.*, 2011). نتایج این تحقیق نشان داد که حتی میان توده‌های نزدیک به هم، تنوع قابل توجهی وجود دارد که می‌توان از آن در جهت پیشبرد برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. علاوه‌براین،

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی ۱۵ نمونه مورد بررسی با تنوع فیتوشیمیایی ۷ توده انتخابی مورد بررسی مطابقت دارد. براساس پژوهش‌های Kabuche و همکاران (۲۰۰۵) در مورد آنالیز اسانس گیاه کلپوره که در الجزایر انجام شده است، مشخص شد که آلفا-کادینول ۴۶/۸٪، ۳-بتا،هیدروکسی-آلفا-مورولن ۲۲/۵٪، آلفا-پینن ۹/۵٪ و بتا-پینن ۸/۳٪ مواد اصلی تشکیل‌دهنده این اسانس می‌باشند. آلفا-پینن ۲۸/۸٪، بتا-پینن ۷/۲٪ و پارا-سیمن ۷٪ از ترکیب‌های اصلی گیاه کلپوره رشد کرده در کرواسی می‌باشند (Cozzani *et al.*, 2005). در حالی‌که ۸-سدران-۱۳ اُل ۲۴/۸٪، بتا-کاریوفیلن ۸/۷٪، جرماکرن دی ۶/۸٪ و سابینن ۵/۲٪ عمده‌ترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس کلپوره در اردن می‌باشد (Aburjai *et al.*, 2006). طبق تحقیقاتی که در اسپانیا انجام شده است تعداد ۲۹ ترکیب از اسانس این گیاه بدست آمده است که مهمترین آنها آلفا-پینن ۱۵/۸٪، بتا-پینن ۱۱/۷٪ و سابینن ۲/۷۵٪ می‌باشند (Ricci *et al.*, 2005). در بررسی اسانس این گیاه در ترکیه نیز نشان داده شده‌است، که عمده‌ترین ترکیب‌های آن بتا-پینن ۱۸٪، بتا-کاریوفیلن ۱۷/۸٪ و آلفا-پینن ۱۲٪ می‌باشند (Tariq *et al.*, 1989). در پژوهش Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) در نمونه مربوط به بروجرد، ۴۴ ماده شناسایی شد که مهمترین ترکیب‌های شناسایی شده شامل آلفا-پینن ۱۲/۹۵٪، بتا-کاریوفیلن ۱۲/۳۵٪، جرماکرن B ۱۱/۷۴٪، بتا-پینن ۸/۷۵٪، لیمونن ۷/۶۰٪، کاریوفیلن اکسید ۵/۵۷٪ و جرماکرن D ۴/۹۰٪ می‌باشند. همچنین در تحقیقی که توسط Hassan و Muhtadi (۱۹۷۹) انجام شد، ۸۰ ماده از اسانس جداسازی شد که بیشترین مواد به‌ترتیب اسپاتولنول، آلفا-پینن، سیس وربنول، بتا-پینن، لیمونن و وربنون بود که درمجموع ۵۰٪ از اسانس را تشکیل می‌دادند. نتایج نشان می‌دهد که در بیشتر نمونه‌های مورد بررسی آلفا-پینن درصد قابل توجه‌ای را به خود اختصاص می‌دهد. در نمونه عنبرآباد بیشترین مقدار مربوط به ترانس-وربنول است (۱۴/۰۵٪). در مواد شناسایی شده در اسانس باغین، توژان به‌میزان ۱/۱۹٪ دیده شد که در نمونه‌های دیگر وجود نداشت. در نمونه عنبرآباد آلفا-پینن و بتا-پینن وجود نداشت و بعضی از مواد که در این اسانس وجود دارد در سایر نمونه‌ها دیده نشد. نمونه عنبرآباد در مجموع تفاوت‌های زیادی با نمونه‌های دیگر دارد. در نمونه زرند نرولیدول به میزان ۱۵/۴۶٪ وجود داشت که در نمونه‌های دیگر وجود نداشت. بیشتر ترکیب‌های شناسایی شده مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها هستند. بنابراین به نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی اسانس *T. polium* مرهون ترکیب‌های ترپنی به‌ویژه کاریوفیلن، آلفا-پینن و بتا-پینن باشد که بیشترین درصد ترکیب شیمیایی اغلب اسانس‌ها را به خود اختصاص داده‌اند (Autore *et al.*, 1984). بتا-پینن واسطه مهمی در ساخت ترکیب‌های معطر سنتزی است و جزئی از روغن است که در طعم‌دهنده‌ها استفاده می‌شود. لیمونن مهمترین و گسترده‌ترین ترپن شناخته شده می‌باشد و به‌ویژه در صنایع عطرسازی و نیز به‌عنوان طعم‌دهنده مصرف می‌شود. همچنین در کارخانجات ساخت پلیمر و چسب مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاریوفیلن یک سزکویی‌ترپن دو حلقه‌ای است که در صنایع عطرسازی، صابون‌سازی، آرایشی و بهداشتی مصرف می‌شود. در مطالعه Mirza (۲۰۰۱) و مطالعه Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) و همچنین نمونه‌های مورد بررسی این تحقیق، بتا-کاریوفیلن، بتا-پینن، آلفا-پینن، جرماکرن-دی و لیمونن با وجود تفاوت‌هایی که در درصد آنها مشاهده می‌شود، از مواد شاخص موجود در اسانس این گیاه محسوب می‌شوند. از تفاوت‌های قابل توجه وجود آلفا-فارنزان و بی‌سیکلو جرماکرن به میزان قابل توجه در گزارش Mirza (۲۰۰۱) است، در حالی‌که ترکیب‌های مذکور در مطالعه Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) و مطالعات تحقیق مذکور شناسایی نشد (Mirza, 2001). جرماکرن‌بی در مطالعه Esmaili و Amiri (۲۰۰۹)، از ترکیب‌های اصلی موجود در اسانس است که در مطالعه Mirza (۲۰۰۱) و نمونه‌های این تحقیق مشاهده نشده است. جرماکرن‌دی در نمونه‌های کرمان، کوهبنان، راور و عنبرآباد مشاهده شد که با نتایج Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) مطابقت دارد. در مجموع نتایج نشان می‌دهد که تنوع بالایی برای گونه‌های کلپوره بومی استان کرمان حتی در ژنوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد. این تنوع ژنتیکی

www.SID.ir

Archive of SID

بالا احتمالاً به آنها اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی آسانتر سازگار شوند. درک چنین تنوع بالایی می‌تواند در مدیریت و حفاظت ژرم‌پلاسم‌های کلپوره مفید باشد. مجموع مطالعات انجام شده بر روی توده‌های کلپوره نشان می‌دهند که نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین این ژنوتیپ‌ها مناسب بوده و توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان داده و ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی گروه‌بندی کند. اطلاع از فاصله‌های ژنتیکی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی به‌ویژه در انتخاب والدین برای تلاقی‌ها مفید باشد. ضمناً تفاوت‌های مشاهده شده در داده‌های فیتوشیمیایی ممکن است به‌دلیل تفاوت در روش اسانس‌گیری، زمان جمع‌آوری گیاه و یا تفاوت‌های اکولوژیکی محل‌های جمع‌آوری گیاه باشد.

منابع مورد استفاده

- Aburjai, T., Hudaib, M. and Vanni, C., 2006. Composition of the essential oil from Jordanian germander (*Teucrium polium* L.). Journal of Essential Oil Research, 18: 132-133.
- Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasco, M.R., Lembo, M., Mascolo, N. and Menghini, A., 1984. Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. Pharmacological Research Communications, 16: 21-29.
- Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Tomi, F. and Casanova, J., 2005. Chemical composition of *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.) from Crosia. Flavour and Fragrance Journal, 20(4): 436-441.
- Dalir, M., 2011. Evaluation of Genetic, Morphology and Chemical Diversity *Thymus* spp. Thesis for M.Sc., Payam Noor University of Tehran.
- Dehghan Kohestani, S., Baghizadeh, A., Ranjbar, G. and Babaeian Jelodar, N., 2008. Investigation of genetic diversity in Persian Cumin (*Bunium persicum* Boiss.) germplasm from Kerman province using RAPD molecular markers. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(4): 414-427.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G. and Varagas, N., 2006. Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *salvia officinalis* L. based on RAPD markers. Botucatu, 8: 13-17.
- Esmaili, A. and Amiri, H., 2009. Survy on antimicrobial effect and identify compounds substance *Teucriuom polium*. Journal of Esfahan University Pure Science, 31: 15-22.
- Ghareyazi, B., 2001. Workshop on Application of DNA Molecular Markers in Natural Resources and Agriculture. University of Guilan.
- Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S., Mirjalili, M., Azizi, A., Ranjbar, H. and Friedt, W., 2011. Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. accessions growing wild in Iran. Chemistry & Biodiversity, 8(1): 176-188.
- Haji Rezai, M., Baghizadeh, A., Javadi, Gh. and Sadeghizadeh, M., 2008. Evaluation of the genetic diversity of Kerman pistachio based on RAPD molecular markers. Iranian Journal of Biology, 22(3): 462-469.
- Hassan, M.M. and Muhtadi, F.J., 1979. GC/Mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. Journal of Pharmceutical Sciences, 68(16): 800-801.
- Hatri, Z., Zamani, Z., Nazeri, V. and Tabrizi, L., 2011. Evaluation genetic biodiversity *Ziziphora teneuior* L. of Iran by RAPD markers. Iranian Jornal of Horticultural Sciences, 43(3): 337-344.
- Jaymand, K. and Rezaei, M., 2006. Essential oils, distillation systems, test methods and oil retention indices. Medicinal Plants Publisher, Tehran, 350p.
- Kabuche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabuche, A., Aitkaki, Z. and Benlabed, K., 2005. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. International Journal of aromatherapy, 15(3): 129-133.
- Mirza, M., 2001. The quantitative and qualitative chemical composition of essential oil of *Teucrium polium*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 10: 27-38.
- Mozaffarian, V., 1994. An Encyclopedia of Plants, Plant Classification. Tehran University Press, 750p.
- Ricci, D., Franternale, D., Giamperi, L.A., Bucchini, F., Epifano, H., Burini, G. and Curini, M., 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology, 98: 195-200.
- Shahriari, F. and Emamjomehe, A., 2002. Polymerase Chain Reaction PCR (Translation). Astan Quds Press, 228p.
- Tariq, M., Ageel, A.M., Alyahya, M.A., Mossa, J.S. and Alsaid, M.S., 1989. Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. International Journal of Tissue Reactions, 11(4): 158-159.
- Welsh, J.C. and Peterson, M.M., 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids Research, 19: 303-306.

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of genetic and phytochemical diversity of *Teucrium Polium* L. germplasm in Kerman province by RAPD molecular marker and GC/MS method

A. Baghizadeh[1*], M. Moghaddari[2] and GH. Bakhshi Khaniki[2]

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran E-mail: amin_4156@yahoo.com
2- Payam Noor University, Tehran, Iran

Received: May 2016 Revised: August 2017 Accepted: August 2017

Abstract

Teucrium polium L. is an herbaceous, perennial and hyperbranched plant. *Teucrium polium* grows in different parts of Europe and the Middle East, such as Iran. In order to determination of genetic diversity of *Teucrium Polium* gemlplasm in Kerman province, 15 genotypes were collected. The DNA was extracted using CTAB method. Fifteen RAPD primers were used for PCR. The electrophoresis results were analyzed using NTSYS software applying UPGMA method with Dice coefficient. To assess the phyto-chemical diversity of *Teucrium polium* germplasm, the essential oil of seven genotypes of *Teucrium Polium* was prepared by hydro distillation. The identification and analysis of essential oil composition was done by GC/MS with calculation and study of retention indices and mass spectrometry. Cluster analysis was done for the results of GC/MS by SPSS12 software. After electrophoresis of PCR products, 182 bands were found in the range of 230 to 2300 bp. A number of 169 bands (93%) were polymorphic. The genetic similarity of the genotypes was 0.37 to 0.72. Based on cluster analysis of molecular data, the collected samples were divided into four groups. The essential oil constituents in Kohbanan, Baghin, Shahrbabak, Anbarabad, Ravar and Kerman genotypes were identified. The samples were classified into three groups by cluster analysis of phytochemical data.

Keyword: Genetic and phytochemical diversity, *Teucrium polium* L., RAPD, essential oil, GC/MS.

www.SID.ir