Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۳۷٦ - ۳٦۷

بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی بومادران *(Achillea wilhelmsii)* در ایران

Investigation of Genetic and Photochemical diversities of yarrow (*Achillea wilhelmsii*) in Iran

انسیه طاهری[۱]، رضا شیرزادیان خرم‌آباد[۱]، غلامرضا شریفی سیرچی*[۲]، عاطفه صبوری[۱]، خدیجه عباس‌زاده[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- به‌ترتیب دانشیار، مربی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان

Taheri E[1], Shirzadian Khorramabad R[1], Sharifi sirchi Gh*[2], Sabouri A[1], Abbaszadeh Kh[2]

1- MSc Student, Assistant Professors, Faculty of Agricultural Science, Guilan University
2- Associate Professor, Instructor, Faculty of Agricultural Science and Natural Resourcers, Hormozgan University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹٤/۵/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/٦/۲۸)

چکیده

در این تحقیق، تنوع فیتوشیمیایی و ژنتیکی سه توده بومادران در استان هرمزگان با استفاده از نه آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع نه آغازگر که برای انگشت‌نگاری انتخاب شد، در مجموع ۱۱۲ باند چندشکل تولید شد. مقدار متوسط باند چندشکل برای هر آغازگر ۱۲/٤٤ باند بود. بر اساس تجزیه کلاستر بر مبنای ضریب تشابه جاکارد با استفاده از الگوریتم UPGMA برای سه جمعیت بومادرانی که شامل ۳۰ نمونه گیاهی بود ژنوتیپ‌ها به سه گروه دسته‌بندی شدند. در این دسته‌بندی ژنوتیپ‌های هر توده در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. همچنین در این پژوهش ترکیب‌های شیمیایی و مقدار اسانس سه توده بومادران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت بالایی بین تمامی توده‌های مورد مطالعه در ترکیبات اسانسی بود. ترکیب δ-2-Carene با ۳۳/۷۹ درصد، بالاترین میزان ترکیب مشاهده شده در توده‌های بومادران بررسی شده در استان هرمزگان را به خود اختصاص داد. به‌طورکلی نتایج این آزمایش حاکی از تنوع بالای ژنتیکی و فیتوشیمیایی جمعیت های بومادران از لحاظ نشانگر مولکولی مورد استفاده و ترکیبات اسانسی بود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
تنوع فیتوشیمیایی
شاخص بازداری
RAPD
UPGMA

Archive of SID

مقدمه

بومادران، با نام علمی *Achillea wilhelmsii* C. Koch گیاهی از تیره *Asteraceae* می‌باشد (Amjad et al. 2012) از نظر نیازهای اکولوژیک، بومادران در طول دوره رشد به شرایط اقلیمی خاصی نیاز ندارد و تقریباً در هر اقلیمی رشد می‌کند. بومادران گیاهی است روز بلند که مناسب‌ترین دما برای رشد و گل‌دهی آن ۲۶- ۱۸ درجه سانتی‌گراد است. بنابراین در مناطق گرم و آفتابی بهتر رشد می‌کند و گل‌های بیش‌تری تولید می‌نماید (Omidbeigi, 2005). بعضی گونه‌های بومادران به دلیل درجه تحمل خشکی نسبتاً بالا، برای مقاصد زینتی در مناطقی که محدودیت آب وجود دارد استفاده می‌شوند (Khalil et al. 2011). بومادران دارای اثرات آنتی‌هموروئید و ضد تشنج بوده و دم کرده آن در درمان سوء هاضمه همراه با نفخ و زخم معده مؤثر می‌باشد (Potrich et al. 2010). عصاره آبی- الکلی آن اثر مهاری بر ترشح اسید معده دارد (Niazmand et al. 2010). هم‌چنین این گیاه در طب سنتی به‌عنوان اشتها آور، التیام دهنده‌ی زخم، ادرار آور، ضد نفخ، ضد تب، ضد التهاب و مسکن سرفه استفاده شده است (Asgarirad et al. 2010; Trumbeckait et al. 2011). عصاره متانولی گل و برگ آن، دارای خواص ضدباکتریایی است (Amjad et al. 2011). تحقیقات انجام گرفته توسط فتحی و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت آنتی اکسیدانی اندام‌های هوایی *Achillea wilhelmsii* را بیان می‌کند که نشان‌دهنده وجود میزان بالای متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است (Fathi et al. 2011) ترکیب‌های اسانسی بومادران، به‌دلیل اهمیت دارویی آن‌ها، در برخی از کشورها مورد بررسی قرار گرفته و مونه‌ها یا تیپ‌های شیمیایی (Chemotypes) متفاوتی از مناطق مختلف گزارش شده‌است. تحقیقات در کشورهای اروپایی نشان داده که ترکیب‌های اسانسی بومادران حاوی مقادیر بالایی از مونوترپن‌ها و کامازولن هستند (Judzentiene and Mockute, 2010). در مطالعه‌ای دیگر در ایران، ترکیب‌های شیمیایی اسانس سه توده بومادران زرد جمع آوری شده از اصفهان و لرستان بعد از کشت در شرایط مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت که چهار ترکیب اصلی کامفور، آلفا- ترپینئول ، بورنئول و اسپاتولنول بالاترین درصد اجزای اسانس را به خود اختصاص دادند (Rahimmalek et al. 2009). شناسایی صفات مهم و موثر در سازگاری، عملکرد و کیفیت گونه‌های گیاهی و ارزیابی پتانسیل ژنتیکی صفات فوق و جستجوی منابع ژنتیکی مطلوب برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و انتقال ژن- های مطلوب به ارقام مناسب، از جمله راه‌کارهای استراتژیک در به‌نژادی نوین است. اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر از جمله پارامترهای مهم در سازمان‌دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود (Sharma et al. 2002). استفاده از روش‌های ملکولی جهت آشکارسازی تنوع و روابط ژنتیکی توده‌های گیاهی در دو سطح درون و بین گونه‌ای از کارایی بالایی برخوردار است. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی پنج جمعیت *A. fragrantissima* از پنج منطقه در جنوب صحرای سینا با استفاده از شش آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۳۴ باند با میانگین ۶۵ درصد چندشکلی و تشابه ژنتیکی ۰/۶۴- ۰/۱۵ بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی گزارش شد (Morsy 2007). در تحقیق دیگری منشا هیبریدها و تمایز دو گونه‌ی تتراپلوئید *Achillea* در آسیای شرقی از نظر مورفولوژیک، مولکولی و اکوجغرافیایی مورد بررسی قرار گرفت و ۴۲۱ نوار چند شکل AFLP در ۱۶۹ فرد از ۱۹ جمعیت دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده شد (Guo et al. 2008).

با وجود این که بومادران یکی از گیاهان دارویی پرمصرف بازار جهانی در درمان بیماری‌ها و صنایع غذایی محسوب می‌شود، ولی هنوز در کشور ایران اطلاعات کافی در زمینه توده‌های بومی خالص شده وجود نداشته و رقم اصلاح شده‌ای از آن معرفی نشده‌است. شناخت گیاهان دارویی در عرصه‌های منابع طبیعی هر منطقه یکی از گام‌های مهم در زمینه توسعه پایدار گیاهان دارویی بوده و می‌تواند اطلاعات پایه‌ای قابل توجهی را در اختیار محققان گرایش‌های مختلف این حوزه تحقیقاتی و کاربردی قرار دهد (Zolfaghari et al. 2012).

استان هرمزگان را می‌توان به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های طبیعی گیاهان دارویی معرفی کرد. این زیستگاه‌ها بانک‌های ژنی طبیعی هستند که می‌توانند ذخایر ژنتیکی با ارزش گیاهان دارویی را به نحو احسن حفظ نمایند (Asgharnejad et al. 2010).

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف جنس بومادران و ضرورت حفاظت و نگهداری گونه‌های دارویی آن، بررسی تنوع ژنتیکی بومادران کوتاه دشتی هرمزگان، با هدف مطالعه روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف آن به منظور اصلاح، اهلی‌سازی و تولید رقم‌های متناسب با نیاز صنایع وابسته صورت گرفته است. همچنین با توجه به اثر چشمگیر شرایط محیطی بر مقدار و نوع ترکیبات موجود در اسانس گیاهان، در تحقیق حاضر میزان این ترکیبات در سه توده گیاه بومادران در استان هرمزگان، مورد بررسی مقایسه ای قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

با توجه به اطلاعات موجود در مرکز تحقیقات کشاورزی استان هرمزگان، سه منطقه پراکنش بومادران که از نظر ارتفاع از سطح دریا با یکدیگر متفاوت بودند انتخاب و در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. این مناطق شامل شهرستان‌های حاجی‌آباد، بشاگرد و پارسیان بود که به‌ترتیب در شمال، شرق و غرب این استان واقع شده‌اند. گیاه بومادران در منطقه حاجی آباد، پارسیان و بشاگرد به‌ترتیب به نام‌های محلی "سربرزه"، "بنجراشک" و "سرزرد" نام‌گذاری شده‌اند. از هر منطقه تعداد ۱۰ نمونه از *Achillea wilhelmsii* C. Koch، در مرحله گلدهی، به صورت تصادفی جمع‌آوری شد (شکل ۱).

شکل ۱- نمونه‌ای از بومادران جمع‌آوری شده از منطقه بشاگرد استان هرمزگان

استخراج DNA بر اساس روش CTAB (Murry and Thompson, 1980) و با استفاده از ٤٠٠ میلی‌گرم از برگ‌های جوان در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی دانشگاه هرمزگان صورت گرفت. پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکترفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به بررسی منابع، در این تحقیق از ۱۵ آغازگر تصادفی استفاده شد که تنها نه آغازگر باندهای پلی‌مورف قابل امتیازدهی و مشخص ایجاد نمودند. بنابراین تنها الگوهای باندی حاصل از این آغازگرها مورد بررسی و تجزیه آماری قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارایه شده‌است.

برای تهیه محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، کیت PCR از شرکت پیشگام مورد استفاده قرار گرفت. هر محلول واکنش، شامل ۳۰ نانوگرم از DNA ژنومی، یک میکرولیتر آغازگر RAPD، ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط کیت و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. محلول واکنش در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. ترمو سایکلر مورد استفاده در این تحقیق از نوع BIO RAD، (T100 Thermal Cycler) بود.

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، در ابتدا ماتریس داده‌های خام نشانگری در محیط Excel بر اساس حضور یا عدم حضور باندها به‌ترتیب با کد یک و صفر مشخص شد. ماتریس ضرایب تشابه به سه روش دایس، جاکارد و تطابق ساده به‌وسیله نرم‌افزار NTSYS pc ver. 2.02 محاسبه و متعاقباً رسم دندروگرام نیز به روش‌های اتصال ساده، اتصال کامل و UPGMA به‌وسیله همین نرم‌افزار انجام شد. هم‌چنین الگوریتم RB نیز برای رسم دندروگرام به‌وسیله نرم‌افزار gCLUTO V1/0 به کار برده شد.

نمونه‌های برداشت شده مربوط به هر یک از جمعیت‌ها که حاوی برگ، گل و سرشاخه‌های گیاه بود، با یکدیگر مخلوط شده و در دمای معمولی اتاق (۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند و سپس توسط آسیاب برقی پودر شدند. ۱۲۰ گرم از پودر گیاه خشک شده مربوط به هر جمعیت به‌طور جداگانه، جهت استخراج اسانس به روش تقطیر با آب به مدت سه ساعت توسط دستگاه کلونجر (تقطیر با آب) طبق روش فارماکوپه بریتانیا اسانس‌گیری شد (British Pharmacopoeia, 1988). در ادامه بازده اسانس بر اساس وزن خشک نمونه محاسبه شد. اسانس‌ها پس از آب‌گیری با استفاده از سولفات سدیم بی‌آب (Na_2SO_4)، تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی در یخچال (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جهت شناسایی اجزای متشکله اسانس‌های موجود در اندام‌های مختلف هر یک از توده‌های مورد بررسی، از دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) شامل ردیاب جرمی مدل Aglient 5975C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Aglient 7890 که از ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر برخوردار بود، استفاده شد. دمای محل تزریق (Inlet) دستگاه کروماتوگرافی گازی روی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی روی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آنالایزر (کوادروپل) روی ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای واسط بین MS، GC روی ۲۸۰ درجه سانتی-گراد تنظیم شد.

در هر مورد پس از تزریق مقادیر بسیار جزئی اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیف‌های جرمی ترکیبات مختلف موجود در آن بررسی شد. با توجه به خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آن‌ها با الگوهای کتابخانه‌ای، طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس‌ها شناسایی شدند. همچنین با توجه به سطح زیر منحنی هریک از پیک‌های کروماتوگرام GC و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی، درصد نسبی هر یک از اجزاء متشکله اسانس تعیین شد.

نتایج

از مجموع نه آغازگر انتخابی برای انگشت‌نگاری در مجموع ۱۱۲ باند چند شکل تولید شد. مقدار متوسط باند چند شکل برای هر آغازگر ۱۲/٤٤ باند بود (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی مناطق جمع‌آوری نمونه‌های بومادران (۱۳۹۳)

ردیف	استان	منطقه جمع‌آوری	طول جغرافیایی (شرقی)	عرض جغرافیایی (شمالی)	ارتفاع از سطح دریا (متر)	میانگین دما (سانتی‌گراد)	میزان بارندگی (میلی‌متر)	اقلیم
۱	هرمزگان	حاجی‌آباد(شمال)	۵٦°۱۵′	۲۷°۵۷′	۱٦۰۰	۲۲/۵	۳۰۰-۲۵۰	گرم و نیمه خشک بیابانی
۲	هرمزگان	پارسیان(غرب)	۵۳°۲۷′	۲۷°۷′	۸۰	۲۲/۵-۲۷/۵	۲۰۰-۱۵۰	گرم و نیمه خشک
۳	هرمزگان	بشاگرد(شرق)	۵۷°۵٤′	۲٦°٤۵′	۷۳۰	۲۵-۲۰	۲۵۰-۱۵۰	گرم و نیمه خشک

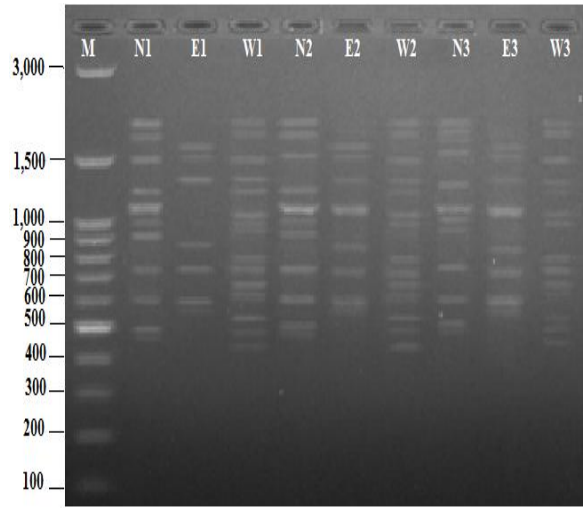
جدول۲- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق به همراه تعداد و درصد باند پلی‌مورفیک تولید شده توسط هر آغازگر

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	تعداد کل باندها	تعداد باند چندشکل	درصد باند چندشکل
RAPD-g11	TGCCCGTCGT	۳۳/۲	۱۱	۹	۸۱
RAPD-m2	ACAACGCCTC	۳۲	۱۵	۱٤	۹۳
RAPD-m3	GGGGGATGAG	۳٤	۱۱	۱۱	۱۰۰
RAPD-a2	TGCCGAGCTG	۳٤	۱۲	۱۲	۱۰۰
RAPD-a10	GTGATCGCAG	۳۳	۱۳	۱۲	۹۲
RAPD-e3	CCAGATGCAC	۳٤	۲۰	۱۸	۹۰
RAPD-f19	CCTCTAGACC	۳۲/۲	۹	۹	۱۰۰
RAPD-b10	CTGCTGGGAC	۳۰/۹	۱۳	۱۲	۹۲
RAPD-b11	GTAGACCCGT	۳۲	۱۵	۱۵	۱۰۰
مجموع	-	-	۱۱۹	۱۱۲	-
میانگین	-	-	۱۳/۲۲	۱۲/٤٤	۹٤/۲۲

www.SID.ir

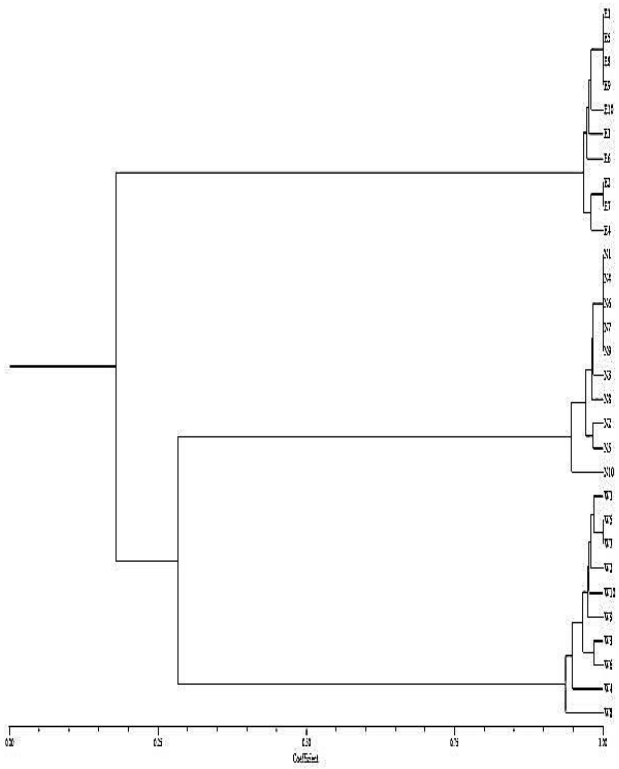
Archive of SID

تعداد باندهای چندشکل تولید شده توسط هر آغازگر در دامنه نه باند برای آغازگرهای RAPD. f19 و RAPD. g11 و ۱۸ باند برای آغازگر RAPD. e3 متغیر بود. از نه آغازگر استفاده شده، چهار آغازگر نوارهای ۱۰۰ درصد چند شکل (پلی‌مورفیک) ایجاد کردند. نمونه‌ای از الگوی نواری ایجاد شده با استفاده از آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی e3 در شکل ۲ نشان داده شده‌است.



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی نمونه‌های بومادران توسط آغازگر e3. M) نشانگر وزن ملکولی ۱۰۰ bp plus؛ N1، N2 و N3) سه تکرار از نمونه‌های مربوط به شمال استان هرمزگان (حاجی آباد)؛ E1، E2 و E3) سه تکرار از نمونه‌های مربوط به شرق استان هرمزگان (بشاگرد)؛ W1، W2 و W3) نمونه‌های مربوط به غرب استان هرمزگان (پارسیان)

نتایج بررسی ضریب کوفنتیک نشان داد در بررسی تنوع ژنتیکی به‌وسیله نشانگر RAPD در جمعیت بومادران ترکیب ضریب فاصله جاکارد و الگوریتم UPGMA بهترین نتیجه را در پی دارد. بر اساس تجزیه و تحلیل کلاستر بر مبنای ضریب تشابه جاکارد با استفاده از الگوریتم UPGMA برای سه جمعیت بومادران، ۳۰ ژنوتیپ مورد بررسی در سه گروه دسته‌بندی شدند. در این گروه-بندی، افراد هر یک از سه جمعیت کاملاً از هم جدا شدند (شکل ۳). مطالعه ارتفاع محل جمع‌آوری جمعیت‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت جمع‌آوری شده از ارتفاع ۱۶۰۰ متر، در یک گروه (N1 تا N10)، ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت-های جمع‌آوری شده از ارتفاع ۷۳۰ متر در گروه دوم (E1 تا E10) و در گروه سوم ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های جمع-آوری شده از ارتفاع ۸۰ متر (W1 تا W10) قرار گرفتند. در مجموع گروه‌بندی صفات نشان داد که گروه‌بندی حاصل از ارتفاع مبدأ رویشگاه‌های اولیه جمعیت‌ها تبعیت می‌کند. تجزیه خوشه‌ای به‌وسیله الگوریتم گروه‌بندی RB نیز موفق به جداسازی ژنوتیپ‌ها به سه گروه شد که این سه گروه در واقع همان سه جمعیت مورد بررسی بودند. نتایج تجزیه این روش در جدول ۳ ارایه شده‌است. همچنین نمای قله‌ای الگوریتم RB در شکل ٤ ارایه شده‌است.



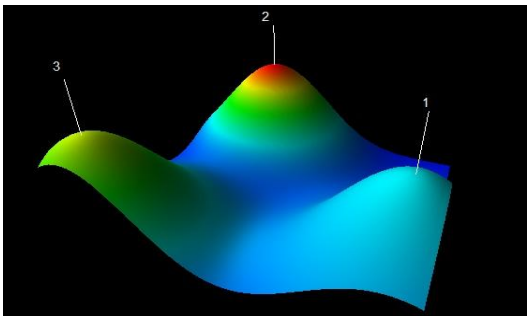
شکل ۳- دندروگرام مربوط به ۳۰ اکوتیپ بومادران با استفاده از نه ترکیب آغازگری RAPD و ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA به‌وسیله نرم-افزار NTSYS pc ver. 2.02

جدول ۳- نتایج تجزیه خوشه‌ای به‌وسیله الگوریتم گروه‌بندی RB

خوشه	اندازه خوشه	Isim	Isdev	ESim	ESdev
حاجی آباد (سربرزه)	۱۰	۱	۰	۰/۴۹۰	۰/۰۰۳
پارسیان (بنجراشک)	۱۰	۱	۰	۰/۵۱۸	۰/۰۰۵
بشاگرد (سرزرد)	۱۰	۱	۰	۰/۵۵۱	۰/۰۰۵

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- نمایش قله‌ای حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌وسیله الگوریتم گروه‌بندی RB با استفاده از نرم‌افزار gCLUTO V1/0؛ ۱. توده حاجی‌آباد (سربرزه)؛ ۲. توده پارسیان (بنجراشک)؛ ۳. توده بشاگرد (سرزرد)

در نمایش قله‌ای ژنوتیپ‌ها هر گروه به صورت قله‌ای نمایان شده که ارتفاع این قله‌ها نشان‌دهنده شباهت درون گروهی، حجم قله تعداد اعضای گروه، فاصله قله‌ها تفاوت افراد دو گروه با هم و نهایتاً رنگ قله انحراف استاندارد درونی اعضای هر گروه را نشان می‌دهد. به‌طوری که رنگ آبی بیان‌گر انحراف کم و رنگ قرمز بیان‌گر انحراف زیاد اعضای یک گروه است. همان‌طور که در شکل ٤ مشخص است جمعیت حاجی آباد و بشاگرد به‌ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین تنوع درون گروهی بودند. هر سه توده دارای تعداد افراد مساوی و فاصله نسبتاً مساوی از یکدیگر بودند. در جدول ٤ ترکیبات شناسایی شده در نمونه‌های هر یک از مناطق به همراه درصد و شاخص بازداری آن‌ها گزارش شده‌است. بازده اسانس در توده شمال، غرب و شرق استان به‌ترتیب ۰/۳، ۰/۵ و ۰/٤ درصد است. در اسانس توده شمال استان ۳۲ ترکیب شناسایی شد که ۸۹/۹۳ درصد کل ترکیبات را تشکیل می‌دهد. عمده این ترکیب‌ها عبارتند از: γ-2-carene (۱۱/۱۵درصد)، 1,8 cineol (۸/۹۳ درصد)، Eukalyptol (۸/۵۷ درصد)، p-Menth-1-en-4-ol (٦/۷۸ درصد) و (+)-2-Bornanone (۵/۸۳ درصد). این پنج ترکیب، ترکیبات اصلی این توده را شامل می‌شوند. در توده وحشی غرب، تعداد ۱۹ ترکیب که در مجموع ۵۹/۹۱ درصد کل ترکیبات را شامل می‌شود، مورد شناسایی قرار گرفت. ترکیبات عمده شناسایی شده از توده وحشی غرب را Thymol (۱۰/۵٦ درصد)، spatulenol (۹/۹۳ درصد)، cis-sabinol (۷/۷۵ درصد)، caryophilla-4(12),8(13)-dien-5β-ol (٦/۰۱) و 1,8 cineol (٤/۰۹ درصد)، تشکیل دادند. در اسانس توده شرق استان در مجموع تعداد ۲۵ ترکیب شناسایی شد که ۹٦/۲۵ درصد کل ترکیبات را تشکیل می‌دهد. عمده‌ترین آن‌ها شامل γ-2-carene (۲۲/٦٤ درصد)، Artemisia alcohol (۱۱/۱۲ درصد)، camphor (۷/٦۲ درصد)، (+)-2-Bornanone (۷/۹۳ درصد) و 1,8 cineol (٤/۵۸ درصد)، می‌باشد. بقیه اجزا به تفکیک در جدول ٤ ارایه شده‌است.

بحث

در این پژوهش جمعیت‌هایی از *Achillea wilhelmsii* با استفاده از بررسی داده‌های ملکولی حاصل از نشانگرهای RAPD و همچنین تجزیه و تحلیل اجزای اسانس، از نظر تنوع مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD در میان جمعیت-های بومادران، وجود تنوع ژنتیکی بالا را در میان این جمعیت‌های بومی در جنوب ایران نشان داد. این نتایج با یافته‌های Rahimmalek et al. (2009) نیز قابل مقایسه است. در این بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون پنج‌گونه بومادران شامل *A. santolina*، *A. tenuifolia*، *A. filipendulina* ، *A. millefolium* و *A. biebersteinii* جمع‌آوری شده از ۵۷ توده با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از نه آغازگر AFLP، ۳۱۳ باند با میانگین ۹٦/۱ درصد چندشکلی تولید شد (Rahimmalek at al. 2009). بررسی پتانسیل تنوع ژنتیکی به وسیله نشانگر ملکولی RAPD، نتایج مناسبی جهت تفکیک توده-های بومادران ارائه داد به‌طوری که تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب فاصله جاکارد و الگوریتم‌های رسم دندروگرام UPGMA و RB، به‌خوبی توانست توده‌های بومادران را تفکیک کند. در مطالعه‌ای که توسط Mirahmadi et al. (2012)، به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ بومادران با هشت آغازگر RAPD انجام شد نیز از ترکیب ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA برای رسم دندروگرام استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس ملکولی حاکی از تفاوت معنی‌دار بین توده‌ها بود. هم‌چنین از آن‌جایی که نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه، توده‌های خودرو و بومی مناطق جمع‌آوری شده می‌باشد، همان‌طور که انتظار می‌رفت میان پراکنش جغرافیایی و فواصل ژنتیکی رابطه مستقیمی وجود داشت و نمونه‌هایی که در نواحی جغرافیایی نزدیک به هم بودند در یک گروه قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- ترکیبات موجود در اسانس توده‌های وحشی *Achillea wilhelmsii* سه منطقه شمال، غرب و شرق هرمزگان

ردیف	ترکیبات	توده شمال درصد	توده غرب درصد	توده شرق درصد	شاخص بازداری
۱	Artemisia triene	_	_	۰/۷۷	۹۳۱
۲	alpha-pinene	۱/۵	۳/۷۵	۲/۰۸	۹۳۳
۳	camphene	۱/۰۸	۱/۹۴	۳/۴۲	۹۴۹
۴	Sabinen	۱/۵۲	۰/۳۳	_	۹۷۵
۵	Yamogi alcohol	۵/۷۵	_	_	۱۰۰۱
۶	δ-2-Carene	۱۱/۱۵	_	۲۲/۶۴	۱۰۱۸
۷	1,8 cineol	۸/۹۳	۴/۰۹	۴/۵۸	۱۰۲۳
۸	o-Cymene	۰/۸۷	۳/۰۵	۲/۶۹	۱۰۲۷
۹	Eukalyptol	۸/۵۷	_	۲/۳۶	۱۰۳۲
۱۰	γ-Terpinene	۲/۳۵	۰/۸	۱/۱۷	۱۰۶۰
۱۱	Sabinene hydrate	۰/۸۸	_	_	۱۰۶۹
۱۲	Artemisia alcohol	۰/۳۷	_	۱۱/۱۲	۱۰۸۷
۱۳	Terpinolene	۰/۳۵	۰/۱۲	_	۱۰۸۹
۱۴	Linalool	۲/۹۸	۱/۷۸	۳/۹۳	۱۱۰۲
۱۵	Isovaleric acid	۳/۲۹	۰/۶۵	۱/۷	۱۱۰۸
۱۶	Cis-2-p-menthene-1-ol	۰/۹۲	_	_	۱۱۲۳
۱۷	cis-sabinol	_	۷/۷۵	۳/۱۲	۱۱۴۲
۱۸	(+)-2-Bornanone	۵/۸۳	۱/۹۳	۷/۹۳	۱۱۴۷
۱۹	camphor	_	۲/۷	۷/۶۲	۱۱۵۰
۲۰	Pinocarvone	۲/۰۸	۰/۰۶	۰/۷۶	۱۱۶۵
۲۱	p-Menth-1-en-4-ol	۶/۷۸	۱/۰۷	۳/۸۲	۱۱۸۲
۲۲	Terpinen-4-ol	_	_	۶/۱۳	۱۱۸۹
۲۳	α-Terpineol	۳/۴۴	_	_	۱۱۹۵
۲۴	2-Pinen-10-ol	۱/۰۶	_	_	۱۱۹۹
۲۵	(Z)-Chrysanthenyl acetate	_	۰/۹	_	۱۲۶۱
۲۶	L-bornyl acetate	۱/۷۱	_	_	۱۲۸۶
۲۷	Lavandulyl acetate	_	_	۱/۵۴	۱۲۸۹
۲۸	Thymol	_	۱۰/۵۶	_	۱۲۹۳
۲۹	Sabinyl acetate	_	_	۱/۸۳	۱۲۹۴
۳۰	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	۰/۲۶	_	_	۱۳۳۸
۳۱	α-Cubebene	۲/۴۵	_	_	۱۳۸۰
۳۲	Methyleugenol	۱/۵۳	_	_	۱۴۰۶
۳۳	β-Gurjunene	۳/۲۳	_	_	۱۴۲۴
۳۴	β-cubebene	۲/۰۵	_	_	۱۴۳۴
۳۵	Germacrene D	۲/۳۶	_	_	۱۴۴۹
۳۶	Elixene	_	_	۰/۳۴	۱۵۰۱
۳۷	Nerolidol	۰/۶۲	_	_	۱۵۶۳
۳۸	Spatulenol	۰/۸۳	۹/۹۳	۲/۲۳	۱۵۸۴
۳۹	Caryophyllene oxide	۰/۶۸	۲/۵۲	۰/۷	۱۵۹۰
۴۰	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol	۱/۰۳	۶/۰۱	_	۱۶۴۳
۴۱	Naturalβ-Eudesmol	۳/۴۸	_	۲/۰۶	۱۶۵۸
۴۲	Hexahydrofarnesyl acetone	_	_	۰/۲۹	۱۸۴۵
۴۳	Phytol	_	_	۱/۴۲	۲۱۱۳

www.SID.ir

Archive of SID

براساس نتایج به‌دست آمده از طبقه‌بندی توده‌های مورد مطالعه که حکایت از همبستگی نسبی بین توده‌های بومادران از نظر پراکنش جغرافیایی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD داشت، احتمالاً فواصل جغرافیایی توده‌ها می‌تواند دلیلی بر دوری یا نزدیکی ژنتیکی آن‌ها باشد و در برنامه‌های به‌نژادی که نیاز به تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشد، گزینش بر مبنای تنوع جغرافیایی احتمالاً نتیجه بخش خواهد بود. در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تکنیک RAPD می‌توان در زمان کم، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و توده‌های بومی بومادران کوتاه دشتی را نسبت به یکدیگر مشخص نمود.

نتایج به‌دست آمده از بررسی فیتوشیمیایی بومادران در استان هرمزگان، نشان‌دهنده تنوع قابل ملاحظه در مقادیر اجزای اسانس‌های مورد بررسی می‌باشد. در اسانس گونه مورد مطالعه، میزان مونوترپن‌ها ٦٧/٤٤ درصد است که از این مقدار ٤٦/٥١ درصد مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و ٢٠/٩٣ درصد مونوترپن‌های هیدروکربنی می‌باشند. در مجموع بیش‌ترین درصد ترکیبات مونوترپنی اسانس هر سه توده، δ-2-Carene (٣٣/٧٩ درصد)، 1,8 cineol (١٧/٦ درصد)، 2-Bornanone- (+) (١٥/٦٩ درصد) و p-Menth-1-en-4-ol (١١/٦٧ درصد) می‌باشد. میزان سزکویی‌ترپن‌ها ٢٠/٩٣ درصد است که بیش‌ترین درصد ترکیبات آن را Spatulenol (١٢/٩٩ درصد)، Caryophylla-4(12), 8(13)-dien-5β-ol (٧/٠٤ درصد) و Naturalβ-Eudesmol (٥/٥٤ درصد) تشکیل می‌دهد. مقایسه نتایج بدست آمده از اسانس‌های مورد بررسی در این مطالعه، شباهت‌ها و تفاوت‌هایی را در ترکیب‌های آنها با گزارش‌های قبلی بر روی همین گیاه به وضوح نشان داد. در تحقیقی که در سال ٢٠١٠ در ایران روی اسانس *A. nobilis* subsp. *Neilreichii* در سه مرحله رویشی شامل آغاز گلدهی، اوج گلدهی و بعد از گلدهی انجام شد، α-thujone (٦٤-٢٥ درصد) به‌عنوان فراوان‌ترین ترکیب موجود در اسانس این زیرگونه شناسایی شد (Azizi et al. 2010). در گزارشی در رابطه با اجزای اسانس این گیاه در منطقه ازمیر ترکیه، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (٨٤ درصد) بیش‌ترین مقدار ترکیب‌های شناسایی شده را به خود اختصاص دادند. در این مطالعه ١،٨ سینئول و کامفور ترکیب‌های عمده تشکیل دهنده اسانس بودند (Kordali, 2009). هم‌چنین در گزارش مشابهی از اسانس *A. wilhelmsii* رویش یافته در نکا واقع در مازندران نیز مونوترپن‌ها (٨٩/٩ درصد) بالاترین مقادیر اجزای اسانس این گیاه را تشکیل می‌دادند و ٥/٣ درصد را سزکویی‌ترپن‌ها به خود اختصاص دادند (Azadbakht et al. 2003) که از این نظر با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. مجموع سه ترکیب δ-2-Carene، 1,8 cineol و 2-Bornanone- (+) که سهم عمده‌ای در ایجاد خواص اسانس نمونه‌های مورد مطالعه ایفا می‌کنند، به ترتیب در توده‌های شرق (بشاگرد)، شمال (حاجی آباد) و غرب (پارسیان) استان، ٣٣/١٥ درصد، ١٤/٧٦ درصد و ٦/٠٢ درصد بود. در مجموع می‌توان گفت در صورتی‌که به‌منظور استفاده در صنایع مرتبط بالاترین درصد اسانس و خاصیت اسانس مورد نظر باشد توده شرق با ٩٦/٢٥ درصد اسانس و ٣٥/١٥ درصد مجموع سه ترکیب عمده، مناسب‌ترین نمونه خواهد بود. تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موجود در اسانس گیاه *A. wilhelmsii* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، با اسانس گیاه مورد مطالعه در تحقیق حاضر را می‌توان ناشی از تفاوت شرایط اقلیمی و جغرافیایی این مناطق دانست.

شناخت ترکیبات موجود در گیاهان بومی کشورمان می‌تواند ما را در جهت استفاده‌های کاربردی از ذخایر گیاهی یاری نماید. همچنین از آن‌جایی که اثرهای بیولوژیکی اسانس حاصل از مواد گیاهی به‌شدت تحت تأثیر ترکیب‌های تشکیل دهنده آن‌هاست تنوع بالای ترکیب‌های اسانس *A. wilhelmsii* که در این مطالعه و مطالعات دیگر مشاهده شده‌است امکان گزینش توده‌هایی از این گیاه با فعالیت‌های بیولوژیکی خاص جهت کاربرد در صنایع دارویی و آرایشی- بهداشتی را امکان‌پذیر می‌سازد و اهمیت اقتصادی گیاه دارویی بومادران را بیش از پیش آشکار می‌نماید.

تفاوت‌های اکولوژیکی و جغرافیایی دو عامل مهم هستند که بر استراتژی‌های نمونه‌برداری و اصلاح گیاهان تاثیر می‌گذارد (Namkoong, 1986). تغییر در تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها معمولاً مرتبط با محدوده جغرافیایی، روش تولید مثل، سیستم جفت‌گیری، پراکندگی و باروری بذر می‌باشد (Gupta et al. 2008). تنوع ژنتیکی برآورد شده در این تحقیق می‌تواند به‌علت تمام این عامل‌های ذکر شده باشد. به‌طور کلی نتایج این آزمایش حاکی از تنوع بالا بین توده‌های بومادران در سطح استان هرمزگان بود.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم‌پلاسم بومادران ایران و همچنین در تدوین برنامه‌های اصلاحی آینده برای این گیاه به‌منظور دست‌یابی به گیاهان مورد نیاز با اهداف صنایع مرتبط مفید خواهد بود. به‌طوری که با بهره‌گیری از نتایج ملکولی و ارزیابی تنوع مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب برای توسعه و بهره‌گیری از آن وجود خواهد داشت.

منابع

Amjad L, Mohammadi-kamalabadi M, Mohammadi-sichani M (2011) Studing of antibacterial activity of flower and leaf methanol extract of *Achillea wilhelmsii* C.Koch. J Qom Univer Med Sci. 5:50-57. (In Farsi).

Amjad L, Mousavidehmourdi K, Saghazadeh M (2012) Antifungal potential of *Achillea wilhelmsii* flowers methanolic extract on different strains of *Candida albicans*. Int J Biol Med Res. 3:2107-2110. (In Farsi).

Asgarirad H, Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Saeidnia S, Ebrahimzadeh MA, Lotfi F (2010) In vitro antioxidant analysis of *Achillea tenuifolia*. African Journal of Biotechnology. 9: 3536-3541. (In Farsi).

Asgharnejad L, Saeidi Garakhani HR, Alikhani M (2010) Floristic and ecological characteristics of plants (Case study: Mntth in Semnan province), Booklet National Herbal studies, Sari. (In Farsi).

Azadbakht M, Semnani M, Khansari N. (2003) The essential oil omposition of *Achillea wilhelmsii* leaves and flowers. J Med Plants. ;2:55-59. (In Farsi).

Azizi M, Chizzola R, Ghani A, Oroojalian F (2010) Composition at different development stages of the essential oil of four *Achillea* species grown in Iran. Natural Product Communications. 5: 283- 290. (In Farsi).

British Pharmacopoeia. (1988). Published on the recommendation of the Medicine Commission. Volume 2, London: Her Majesty's Stationery Office; p. A138.

Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh MA (2011) Antioxidant activity and phenolic contents of *Achillea wilhelmsii* .Pharma online. 2: 942-949. (In Farsi).

Guo YP, Saukel J, Ehrendorfer F (2008) AFLP trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploidy complex *Achillea millefolium* agg. (Asteraceae).Taxon 57: 153-169.

Gupta S, SrivastavaM, MishraGP, NaikPK, Chauhan RS. (2008) Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different Jatrophacurcasgenotyps. Afr J Biotechnol. ; 7:4230-4243.

Judzentiene A, Mockute D (2010) Essential oil composition of two Yarrow taxonomic forms. Central European Journal of Biology. 5: 346-352.

Khalil SK, Hilaire RS, Khan A, Rehman A, Mexal JG (2011) Growth and physiology of yarrow species *Achillea millefolium* cv. Cerise Queen and *Achillea filipendulina* cv. Parker Gold at optimum and limited moisture. Aust J Crop Sci. 5:1698-1706.

Kordali S, Cakir A, Akcin TA, Mete E, Akcin A, Aydin T, Kilic H (2009) Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. And *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). Industrial Crops and Products. 29: 562-570.

Mirahmadi SF, Hasandokht M, Hassani ME, Sefidkon F (2012) Evaluation of genetic diversity among some wild populations of *Achillea bieberstenii* Afan. from Iran using morphological and agronomical traits. International Journal of Forest, Soil and Erosion 2: 8-17. (In Farsi).

Morsy AA (2007) Molecular variations of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) SCH.BIP. growing in five areas of south Sinai. International Journal of Agriculture and Biology. 9: 11-17.

Murry M, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res., 8: 4321-4325.

Namkoong G. (1986) Genetic and the forests of the future. Unasylva. ; 152:2-18.

Niazmand S, Khooshnood E, Derakhshan M (2010) Effects of *Achillea wilhelmsii* on rat's gastric acid output at basal, vagotomized, and vagal-stimulated conditions. Pharmacog Mag. 6: 282-285. (In Farsi).

Omidbaigi R. (2005) Approaches to the production and processing of medicinal plants, Behnashr Publications, Mashhad. vol: 1, pp: 347-8. (In Farsi).

Potrich FB, Allemand A, da Silva LM, Dos Santos AC, Baggio CH, Freitas CS, Mendes DA, Andre E, Werner MF, Marques MC (2010) Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *J Ethnopharmacol*. 130:85-92.

Rahimmalek M, Sayed Tabatabaei BE, Arzani A, Etemadi N (2009) Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochem. Syst. Ecol.* 37: 354-361. (In Farsi).

Rahimmalek M, Sayed Tabatabaei BE, Etemadi N, Hossein Golid SA, Arzania A, Zeinalie H (2009) Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. Industrial crops and products, 29: 348-355. (In Farsi).

Sharma KK, Crouch JH, Hash CT (2002) Application of biotechnology for crop improvement: prospect and constraints. Journal of Plant Science. 163: 381-395.

Trumbeckaite S, Benetis R, Bumblauskiene L, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viskelis P, Jakstas V (2011) *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. Food Chem. 127:1540-1548.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian medicinal and aromatic Plant Research, 28: 534-550. (In Farsi).

Zolfaghari A, Adeli E, Mozafarian VA, Babaei S, Habibi bibalan Gh (2012) Identification of medicinal plants and indigenous knowledge of local people Arasbaran (Case Study: Arasbaran forests, watershed Mrdanqm tea). The

www.SID.ir

Archive of SID

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

Investigation of Genetic and Photochemical diversities of yarrow (*Achillea wilhelmsii*) in Iran

Taheri E[1], Shirzadian Khorramabad R[1], Sharifi sirchi Gh[*2],Sabouri A[1], Abbaszadeh Kh[2]

1. MSc Student, Assistant Professors, Faculty of Agricultural Science, Guilan University
2. Associate Professor, Instructor, Faculty of Agricultural Science and Natural Resourcers, Hormozgan University
* Corresponding Author, Email: Sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

ABSTRACT

In this study, photochemical and genetic diversity of three yarrow's populations *Achillea wilhelmsii* C. Koch of Hormozgan province were evaluated using nine RAPD primers. In general, 112 polymorphic bands were produced from the applied primers. The mean value of polymorphic bands was 12/44 per primer bond. The Analysis of cluster base on Jacquard correlation coefficient was performed by using UPGMA algorithm on three populations of yarrow which contain 30 plant samples. Individuals in three populations were completely separated in clusters which revealed genetic distance between populations. In addition, the chemical compounds and the amount of essential oils, three Yarrow masses have been investigated at this study. The obtained results indicate that there were a high differences between all studied masses in their essential oil compounds. The compound of δ-2-Carene with 33/79 percent was the most observed compound in the studied Yarrow masses in Hormozgan province. In general, the results of this experiment showed that there was a high genetic and phytochemical diversity in *Achillea* (Yarrow) populations in terms of used molecular marker and their essential oil compounds.

Key Words

Achillea, Genetic Diversity, Phytochemical diversity, Retention index, RAPD, UPGMA

www.SID.ir