جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۳۱۱-۳۰۲ (۱۳۹۳)

بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های *Anthemis haussknechtti*، *A. pseudocutula* و *A. triumfetti* با استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل

مریم السادات ذکری[۱]، پروین صالحی شانجانی[۲*]، حمیده جوادی[۳] و علی علیزاده[۴]

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد واحد کرج

۲*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

پست‌الکترونیک: Psalehi@rifr-ac.ir

۳- مربی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۰۴

چکیده

بابونه گیاهی علفی و چندساله از خانواده Asteraceae است و جنس آنتمیس دومین جنس بزرگ این تیره محسوب می‌شود. آگاهی از تنوع و تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و اطلاع از نحوه عمل ژن‌های مربوطه، برای برنامه‌ریزی‌های به‌نژادی ضروریست و می‌تواند نقش مهمی را در اصلاح نباتات ایفا نماید. یکی از روش‌های بررسی تنوع در جوامع مختلف گیاهی الکتروفورز پروتئین‌هاست. به‌همین منظور و برای بررسی تنوع ژنتیکی سه گونه بابونة جنس *Anthemis*، ۹۰ ژنوتیپ از نه جمعیت (یک جمعیت از گونه *A. pseudocotula*، دو جمعیت از گونه *A.haussknechtti* و شش جمعیت از *A.triumfetti*) با استفاده از الگوی الکتروفورز مورد مطالعه قرار گرفتند. براساس الگوی SDS-PAGE، تعداد ۲۴ نوار مشاهده شد که گونه‌های *A.hausksnecktti* و *A.triumfettti* با ۲۳ باند بیشترین و گونه *A. pseudocutula* با ۱۷ باند، کمترین تعداد باند را داشتند. بیشترین تعداد باندهای پلی‌مورف در گونه *A.triumfetti* و کمترین تعداد در گونه *A.haussknecktti* مشاهده گردید. میانگین درصد پلی‌مورفیسم برابر با ۴۹/۰۷٪ بود. البته در هیچ‌یک از جمعیت‌ها باند خصوصی مشاهده نگردید. بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت رامیان متعلق به گونه *A.triumfetti* و ایوان از گونه *A.haussknecktti* بود. بیشترین فاصلة ژنتیکی و کمترین شباهت بین گونه‌های *A.haussknecktti* و *A.triumfetti*وجود داشت. تجزیه واریانس مولکولی تمایز ژنتیکی میان جمعیت‌های یک گونه را ۵۷٪ و تمایز درون جمعیت‌ها را ۴۳٪ نشان داد. البته همبستگی بین فواصل ژنتیکی حاصل از داده‌های پروتئینی و فواصل جغرافیایی نتایج را از لحاظ آماری معنی‌دار نشان داد (R^2= ۰/۳۰۴۹ و P=۰/۰۱).

واژه‌های کلیدی: بابونه، تنوع ژنتیکی، پروتئین‌های کل، الکتروفورز.

مقدمه

بابونه یکی از مهمترین گیاهان دارویی شناخته شده توسط انسان و از پرمصرف‌ترین این گیاهان در جهان است. بر این اساس در چند دهه اخیر در مناطق مختلف جهان به‌ویژه در کشورهای اروپایی تحقیقات زیادی پیرامون جنبه‌های به‌زراعی و به‌نژادی این گیاه انجام شده و همه‌ساله

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شاهد انواع محصولات تولیدی از این گیاه هستیم. کشت این گیاه در مقیاس وسیع، از ۲۰ سال پیش، در کشور آلمان‌غربی آغاز شد و در حال حاضر، مصرف سالانه بابونه در جهان شامل بابونه آلمانی و رومی بیش از ۴ هزار تن گل خشک است. بابونه در مناطق مختلف کشور ما نیز به صورت خودرو رشد کرده و در چند استان در سطحی محدود کشت می‌شود. با در نظر گرفتن این نکته که براساس مطالعات انجام شده بسیاری از بابونه‌های خودروی ایرانی در مناطقی مانند تهران، شیراز، دماوند و ... فاقد کامازولن (ماده مؤثره و دارویی بابونه) بوده و میزان اسانس آنها نیز بسیار کم است (Omidbeigi,1999; Jaimand & Rezaie, 2001). با توجه به نیاز شدید صنایع داروسازی و آرایشی- بهداشتی به این گیاه، انجام تحقیقات و برنامه‌های اصلاحی برای بهبود کیفیت بابونه‌های خودرو و زراعی کردن آنها ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر مهمترین شرط اصلاح ذخایر گیاهی، شناخت ساختار ژنتیکی آنهاست. به‌طوری‌که زیربنای هر برنامه اصلاحی با استفاده از پارامترهای ژنتیکی پی‌ریزی می‌شود. بنابراین آگاهی از تنوع و تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و اطلاع از نحوه عمل ژن‌های مربوطه، برای برنامه‌ریزی‌های به‌نژادی ضروری می‌باشد. اصلاح‌نباتات بر پایه تنوع و گزینش بنا شده و تنوع ژنتیکی حوزه فعالیت و انتخاب اصلاحگر را برای گزینش و دیگر عملیات اصلاحی افزایش می‌دهد. بررسی تنوع ژنتیکی راه را برای یافتن صفات مطلوب و انتخاب آنها توسط اصلاحگر، کوتاه‌تر و آسانتر می‌کند، همچنین با بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان دورترین افراد خویشاوند را شناسایی کرد و برای به‌دست آوردن بهترین تلاقی‌های ممکن که دارای بیشترین قدرت دورگ‌سازی با مزیت هتروزیس باشند، به‌کار برد.

یکی از روش‌های بررسی تنوع در جوامع مختلف گیاهی، مطالعه پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز است. از حدود ۳۰ سال قبل محققان دریافتند که مطالعه پلی‌مورفیسم پروتئین‌ها اهمیت خاصی در علوم ژنتیک، اصلاح نباتات، بیوشیمی و تکامل داشته و می‌تواند نقش مهمی در اصلاح نباتات ایفا کند. بر این اساس مطالعات زیادی بر روی بسیاری از گیاهان تیره‌های مختلف گیاهی ازجمله Poaceae (Duvall & Biesboer ,1989)، Cucurbitaceae (Reeves *et al*., 1998)، Fabaceae (Fonteelle, 1992)، *Pisum sativum* (Misset & Nisar *et al*., 2006)، جمعیت‌های گندم (Mohd *et al*., 2007)، جمعیت‌های پنبه (Naveed *et al*., 2005) و انگور (Nezamdust *et al*., 2004) انجام شده است. این گزارش‌ها کارایی نشانگرهای پروتئینی را در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاهی تأیید کردند.

یکی از دلایل اصلی برای استفاده از الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌ها این است که پروتئین‌ها محصول مستقیم ژن‌ها می‌باشند و تنوع ژنتیکی افراد باعث تغییر رفتار الکتروفورزی آنها می‌گردد (Ford & Gardiner, 1993). از سوی دیگر، پروتئین‌ها پس از تولید تقریبا پایدار و باثبات بوده و به‌ندرت تحت تأثیر شرایط و نوسانهای محیطی قرار می‌گیرند (Gray *et al*., 1973). همچنین پروفیل‌های پروتئینی اغلب برای هر گونه اختصاصی هستند (Rybicki & Purve, 2005).

تاکنون مطالعات گوناگونی برای بررسی تنوع ژنتیکی بابونه انجام شده است. در همین راستا Pirkhezri & Hasany (2009) با استفاده از نشانگرهای مولکولی (RAPD)، تنوع ژنتیکی درون و بین‌جنسی ژنوتیپ‌های بابونه ایران (*Matricaria* spp. و *Anthemis* spp.) را مورد بررسی قرار دادند. در سال ۲۰۰۲، Cirecelav و همکاران با مطالعة جنس‌های مختلف بابونه نشان دادند که از ترکیبات شیمیایی اسانس نیز می‌توان برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان استفاده کرد (Cirecelav *et al*., 2002). با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و مقدار اسانس Zeinali و همکاران (2008) نیز ۱۴ جمعیت بابونه تهیه شده از مناطق مختلف ایران را مورد بررسی قرار دادند. با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و آنزیمی، Nuri و همکاران (2010) تنوع ژنتیکی سه جنس *Anthemis*، *Matricaria* و *Tripleutospermum* را مورد بررسی قرار دادند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در این پژوهش نیز سعی گردید با انتخاب توده‌ها از مناطق جغرافیایی متفاوت، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف بابونه با استفاده از الگوهای پروتئینی و همچنین کارآمدی نشانگرهای پروتئینی در نشان دادن تنوع ژنتیکی موجود در بین جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بذر جمعیت‌های مورد مطالعه از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید. ابتدا بذرها در گلدان نشاکاری شده، پس از انتقال به مزرعه تحقیقاتی واقع در پردیس شماره ۲ مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و رسیدن به اندازه مورد نظر، نمونه‌برداری انجام شد. مشخصات مناطق مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. از ۹۰ جمعیت مورد مطالعه (هر جمعیت ۱۰ تکرار) به میزان یک گرم برگ جدا گردید. برگ‌ها به نسبت ۱:۱ با محلول استخراج (۵ میلی‌لیتر از محلول Tris-HCl، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول Na_2EDTA و ۲۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده) و در هاون سرد همگن شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، به‌منظور صاف کردن نمونه‌ها، در سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر عصارهبا ۱۰۰ میکرولیتر محلول base buffer (Tris-HCl نیم مولار، pH=۶/۸)، SDS ۰/۲٪ و ۲- مرکاپتواتانول ۰/۵٪ گلیسرول ۱٪ و برموفنل‌بلو ۰/۰۲٪) مخلوط شدند (Laemmli, 1970). نمونه‌ها به‌خوبی تکان داده شده و به مدت ۳ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه جوشانده شدند. نمونه‌ها بعد از این مرحله به فریزر منتقل گردیدند. ۷۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل سدیم دودسیل‌سولفات‌پلی‌اکریل‌آمید بارگیری گردید. ژل‌ها پس از انجام الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در داخل محلول تثبیت (شامل ۲۰ گرم تری‌کلرواستیک‌اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) قرار گرفتند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی (شامل کماسی‌بلو ۰/۲۵٪، متانل ۲۵٪ و اسیداستیک ۱۰٪)، رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت ژل‌ها برای وضوح نوارهای پروتئین به مدت ۱۲ ساعت در دو مرحله در محلول رنگ‌بر (شامل متانل ۲۵٪ و اسیداستیک ۱۰٪) قرار گرفتند. دستگاه مولد برق با ولتاژ ۱۸۰ ولت با شدت جریان ۸۰ میلی‌آمپر تنظیم شد. زمان جداسازی پروتئین حدود ۵ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتی‌متر بود.

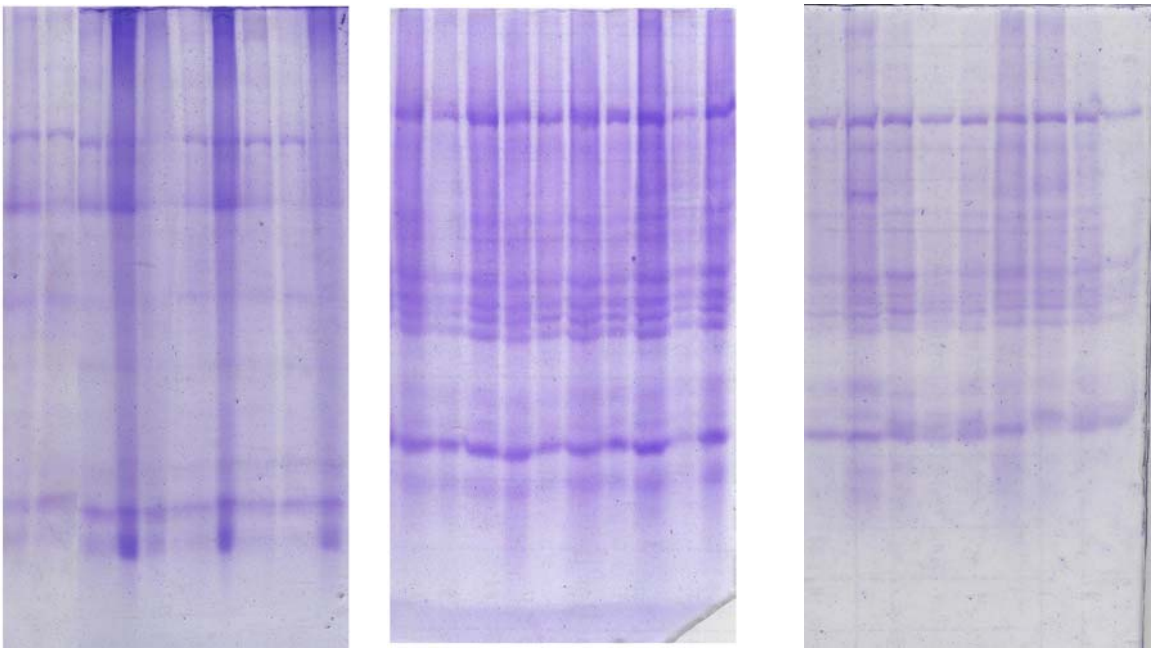
اطلاعات حاصل از پروتئین‌های کل به صورت باندهای مجزای پروتئینی برای هر ژنوتیپ روی ژل پلی‌آکریل‌آمید نمایان گردید. جایگاه هر باند از طریق حرکت نسبی آنها مشخص و به صورت اعداد کمی بیان شد. براساس وجود (عدد یک) و یا عدم وجود هر باند (عدد صفر) در فواصل مختلف نسبت به تشکیل ماتریس داده‌ها اقدام گردید. فراوانی باندها، نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف به تعداد کل باندها و پلی‌مورفیسم باندها با نرم‌افزار Gene Alex محاسبه گردید. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان‌گروهی توسط آزمون واریانس مولکولی (AMOVA) و برنامه نرم‌افزاری Arlequin 101تعیین گردید. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون Excoffier Permutation مطالعه شد. فاصله ژنتیکی برای نه جمعیت *Anthemis* براساس روش Nei (۱۹۷۸) برآورد شد. از تجزیهٔ خوشه‌ای و روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برای بررسی همبستگی بین صفات ژنتیکی و عوامل جغرافیایی از نرم‌افزار SPSS و معادله کارل- پیرسون استفاده گردید. همچنین، همبستگی کلیهٔ ترکیبات دوگانه صفات با یکدیگر با استفاده از آزمون منتل و توسط نرم‌افزار Mega مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل، در مجموع ۲۴ باند را در نه جمعیت بابونه مورد مطالعه نشان داد (شکل ۱). جمعیت‌های H-گرگان و T-گرگان با ۲۳ باند بیشترین و جمعیت P-گرگان با ۱۷ باند کمترین تعداد باند را داشتند. هیچ باند اختصاصی به محل در جمعیت‌ها مشاهده نشد.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی مناطق مورد مطالعه

نام گونه	محل جمع‌آوری	نام اختصاری	ارتفاع از سطح دریا (m)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین بارندگی سالیانه (mm)	حداکثر دمای سالیانه (° C)	حداقل دمای سالیانه (° C)	حداکثر رطوبت (٪)	حداقل رطوبت(٪)
A. haussknechtti	گلستان-گرگان	H-گرگان	۱۶۰	۵۴° ۴۶′	۳۶° ۵۰′	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
A. haussknechtti	ایلام-ایوان	H-ایوان	۱۱۴۰	۴۶° ۱۷′	۳۳° ۴۹′	۵۵۴/۱۴	۲۲/۷۲	۱۱/۶	۵۴/۲	۲۷
A. pseudocotula	گلستان-گرگان	P-گرگان	۱۶۰	۵۴° ۴۶′	۳۶° ۵۰′	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
A. triumfetti	مازندران-زیراب	T- زیراب	۱۹۰۰	۳۶° ۰۴′	۵۰° ۵′	۶۰۰	۲۳/۲۵	۵/۷	۷۵	۶۵
A. triumfetti	گلستان-گرگان	T-گرگان۱	۱۶۰	۵۴° ۴۶′	۳۶° ۵۰′	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
A. triumfetti	گلستان-گرگان	T-گرگان۲	۱۶۰	۵۴° ۴۶′	۳۶° ۵۰′	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
A. triumfetti	گلستان-رامیان	T- رامیان	۲۳۰	۵۵° ۰۸′	۳۷° ۰۱′	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
A. triumfetti	آذربایجان‌غربی- ارومیه	T-ارومیه۱	۱۳۳۲	۴۵° ۰۲′	۳۷° ۳۲′	۲۶۰/۲۸	۱۸/۴	۵/۶۳	۶۹/۹	۲۳/۹
A. triumfetti	آذربایجان‌غربی- ارومیه	T-ارومیه۲	۱۳۳۲	۴۵° ۰۲′	۳۷° ۳۲′	۲۶۰/۲۸	۱۸/۴	۵/۶۳	۶۹/۹	۲۳/۹



A. pseudocutula ***A. haussknechtti*** ***A. triumfetti***

شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز پروتئین‌های کل سه گونه از جنس *Anthemis*

جدول ۲- برخی پارامترهای تنوع ژنتیکی در ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis*

جمعیت	تعداد باند	باندهایی با فراوانی ≤ ۵٪	باندهایی با فراوانی ≥ ۲۵٪	باندهایی با فراوانی ≥ ۵۰٪	هتروزیگوسیتی (±SE)	پلی‌مورفیسم (درصد)
H-گرگان	۲۳	۲۳	۱	۲	۰/۳۰۷ ±۰/۰۳۹	۷۹/۱۷
H- ایوان	۲۱	۲۱	۰	۱	۰/۰۴۳ ±۰/۰۲۵	۱۲/۵۰
P-گرگان	۱۷	۱۷	۰	۰	۰/۱۳۸ ± ۰/۰۴۱	۳۷/۵۰
T-گرگان۱	۲۳	۲۳	۱	۲	۰/۱۵ ± ۰/۰۲۲	۷۰/۸۳
T-گرگان۲	۱۹	۱۹	۰	۰	۰/۱۱۹ ± ۰/۰۳۶	۴۱/۶۷
T-رامیان	۱۸	۱۸	۰	۰	۰/۱۱۴ ± ۰/۰۳۵	۴۵/۸۳
T- زیراب	۲۰	۲۰	۰	۱	۰/۳۱۳ ± ۰/۰۴۳	۷۵/۰۰
T-ارومیه۱	۲۰	۲۰	۰	۰	۰/۱۹۱ ± ۰/۰۴۳	۵۰/۰۰
T- ارومیه۲	۲۱	۲۱	۰	۰	۰/۰۷۰ ± ۰/۰۲۹	۲۹/۱۷

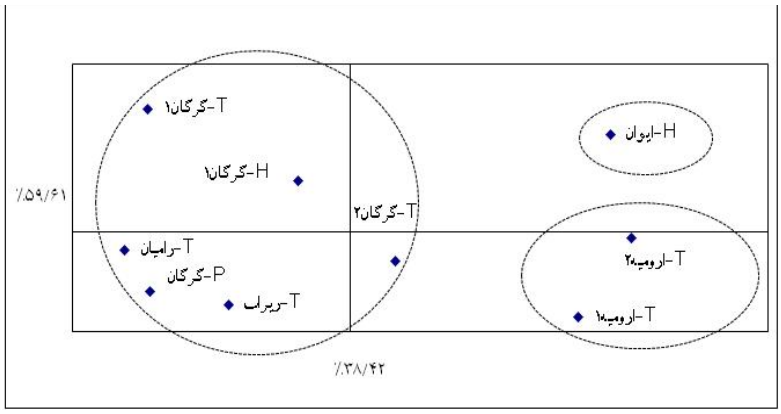
میانگین تعداد باندهای پلی‌مورف (هتروزیگوسیتی) نسبت به تعداد کل باندها در همه جمعیت‌ها از ۰/۰۴۳ تا ۰/۳۱۳ متغیر و به‌ترتیب مربوط به گونه H-ایوان و گونه T-زیراب بود. میانگین درصد پلی‌مورفیسم۴۹/۰۷٪ بود که کمترین درصد پلی‌مورفیسم مربوط به گونه H-ایوان و بیشترین میزان را جمعیت H-گرگان داشت (جدول ۲).

در جدول شماره ۳ تمایز ژنتیکی و جریان ژنی در دو محور نشان داده شده است. تمایز ژنتیکی رابطه معکوسی با جریان ژنی دارد، به‌این صورت که هرچه جریان و انتقال ژن بین جمعیت‌های یک گونه بیشتر باشد، تمایز ژنتیکی بین این جمعیت‌ها کمتر خواهد بود. با توجه به جدول، کمترین جریان ژن بین دو گونه T-رامیان و H-ایوان برقرار است (۰/۰۴۳) و این در حالیست که بیشترین تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت دیده می‌شود (۰/۸۵۲). در همین رابطه، دو جمعیت H-گرگان و T-گرگان ۱ دارای بیشترین جریان ژن (۰/۶۹۹) و کمترین تمایز ژنتیکی (۰/۲۶۳) هستند (جدول ۳).

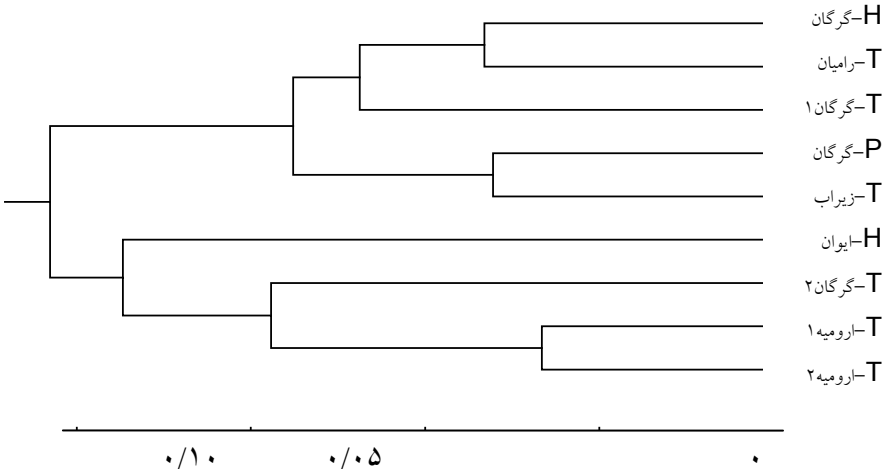
جدول ۳- جدول جریان ژنی (Nm) در محور پایین و تمایز ژنتیکی در محور بالا در ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* براساس پروتئین‌های کل

جمعیت‌ها	H- گرگان	H- ایوان	P- گرگان	T- گرگان۱	T- گرگان۲	T- رامیان	T- زیراب	T- ارومیه۱	T- ارومیه۲
H- گرگان		۰/۵۲۱	۰/۳۸۸	۰/۲۶۳	۰/۳۹۲	۰/۳۳۱	۰/۲۸۳	۰/۴۶۸	۰/۴۷۰
H- ایوان	۰/۲۳۰		۰/۷۹۳	۰/۶۶۵	۰/۷۷۱	۰/۸۵۲	۰/۵۹۳	۰/۷۶۱	۰/۷۷۳
P- گرگان	۰/۳۹۴	۰/۰۶۵		۰/۵۰۶	۰/۶۴۹	۰/۵۳۹	۰/۲۸۴	۰/۶۶۳	۰/۷۶۳
T- گرگان۱	۰/۶۶۹	۰/۱۲۶	۰/۲۴۴		۰/۵۳۵	۰/۴۹۵	۰/۳۸۵	۰/۶۵۴	۰/۶۴۲
T- گرگان۲	۰/۳۸۸	۰/۰۷۴	۰/۱۳۵	۰/۲۱۷		۰/۶۵۹	۰/۴۳۱	۰/۶۴۶	۰/۵۹۹
T- رامیان	۰/۵۰۶	۰/۰۴۳	۰/۲۱۴	۰/۲۵۵	۰/۱۳۰		۰/۴۱۵	۰/۷۵۶	۰/۷۸۳
T- زیراب	۰/۶۳۴	۰/۱۷۲	۰/۶۳۰	۰/۴۰۰	۰/۳۳۰	۰/۳۵۲		۰/۴۶۶	۰/۵۵۹
T- ارومیه۱	۰/۲۸۴	۰/۰۷۹	۰/۱۲۷	۰/۱۳۲	۰/۱۳۷	۰/۰۸۱	۰/۲۸۶		۰/۵۲۶
T- ارومیه۲	۰/۲۸۲	۰/۰۷۳	۰/۰۷۸	۰/۱۳۹	۰/۱۶۸	۰/۰۶۹	۰/۱۹۷	۰/۲۲۵	

برای تشریح فاصله ژنتیکی، از معادله Nei استفاده شد که بر این اساس بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت بین جمعیت‌های H–ایوان و T–رامیان (۰/۵۹۸) و کمترین فاصله و بیشترین شباهت بین جمعیت‌های T– ارومیه۱ و T– ارومیه۲ (۰/۱۳۳) بود. میانگین فاصله ژنتیکی برابر با ۱۳/۹۴محاسبه گردید. از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) استفاده شد. با توجه به اینکه۷۸/۱۲ درصد گوناگونی در میان ۳ مؤلفه اصلی اول قرار داشت، ۳ مؤلفه اول به‌عنوان مؤلفه‌های اصلی در نظر گرفته شدند. بر طبق مؤلفه اصلی اول (۳۸/۴۲٪) جمعیت‌های T–گرگان۱، H–گرگان۱، T–رامیان، P–گرگان و T–زیراب در یک گروه و جمعیت‌های H–ایوان، T–گرگان۲، T– ارومیه۱ و T– ارومیه۲ در گروه دوم قرار گرفتند؛ این در حالیست که براساس مؤلفه اصلی دوم (۵۹/۶۱٪) جمعیت‌های T–گرگان۱، H–گرگان۱ و H–ایوان در گروه یک و سایر جمعیت‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار رسته‌بندی ۹ جمعیت بابونه مورد مطالعه براساس فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مؤلفه اصلی

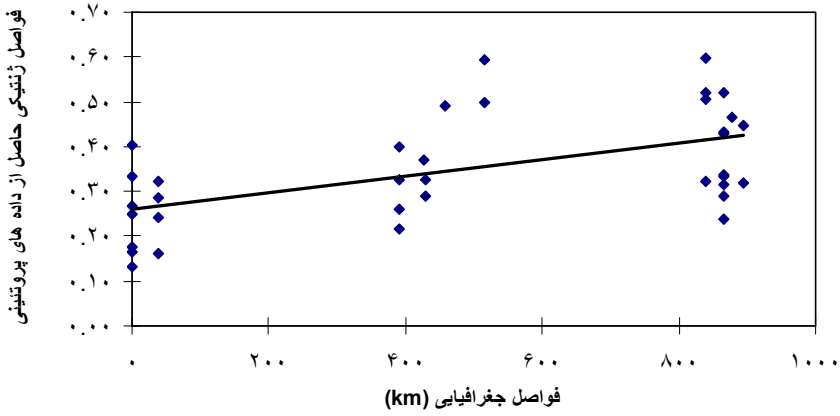


شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر روی ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* براساس پروتئین‌های کل

در شکل ۳ دندروگرام حاصل از تجزیة خوشه‌ای نشان داده شده که بر این اساس جمعیت‌های مورد مطالعه در فاصله ۰/۱۵ در سه خوشه قرار گرفتند. در خوشه اول جمعیت‌های H-گرگان۱، T-رامیان، T- گرگان۱، P-گرگان و T-زیراب قرار دارند. در خوشه دوم تنها جمعیت H-ایوان قرار می‌گیرد و در نهایت در خوشه سوم جمعیت‌های T-گرگان۲، T-ارومیه۱ و T-ارومیه۲ وجود دارد (شکل ۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت H-ایوان متمایز از سایر جمعیت‌ها بوده و دارای بیشترین فاصله ژنتیکی از آنهاست.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تمایز ژنتیکی میان‌جمعیت‌های یک گونه را ۵۷٪ و تمایز درون‌جمعیت‌ها را ۴۳٪ نشان داد. وجود تغییرات ژنتیکی درون‌جمعیتی، یک مزیت برای گونه‌ها در شرایط محیطی بی‌ثبات است که در اثر تبادل ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با یکدیگر پدید می‌آید (Endler, 1977).

همبستگی بین فواصل ژنتیکی حاصل از داده‌های پروتئینی و طول و عرض جغرافیایی با استفاده از آزمون منتل مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که نتایج از لحاظ آماری معنی‌دار بود (R^2= ۰/۳۰۴۹ و P=۰ /۰۱)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بین فواصل ژنتیکی حاصل از داده‌های پروتئینی و طول و عرض جغرافیایی همبستگی وجود دارد (شکل ۴).



شکل ۴- لگاریتم ضریب همبستگی بین داده‌های جغرافیایی و فواصل ژنتیکی حاصل از داده‌های پروتئینی (R^2=۰/۳۰۵ و p=۰/۰۱۰)

بحث

تاکنون مطالعاتی با استفاده از مارکرهای مختلف مانند RAPD، ISSR، RFLP وnDNA ITS بر روی گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف بابونه انجام شده است (Prikhezri & Hassani, 2009؛ Abid & Qaiser, 2009؛ Oberprieler, 2001؛ Nuri *et al.*, 2010). در این پژوهش نیز؛ گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف جنس *Anthemis* به‌عنوان پیش زمینه‌ای برای انجام برنامه‌های اصلاحی مطالعه گردید.

نتایج، حکایت از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های سه گونه از این جنس داشت؛ به‌طوری‌که بیشترین تعداد باند در گونه‌های *A. haussknechtti* و *A. triumfetti* و کمترین تعداد باند در گونه *A. pseudocutula* مشاهده گردید. براساس یافته‌های گاردینر و فورد اختلافات موجود در فراوانی باندها در افراد و به تبع آن در جمعیت‌های مختلف، ناشی از تفاوت در تعداد ژن‌های کد کننده پروتئین‌های گیاه است (Gardiner & Ford, 1993). این مطلب بیانگر این نکته است که می‌توان با استفاده از جمعیت‌هایی که الگوی پروتئینی

متفاوت و ویژگی‌های کمی بهتری دارند به تنوع ژنتیکی بالاتری دست پیدا کرد.

تسهیم واریانس ژنتیکی (AMOVA) نشان داد که تمایز و گوناگونی ژنتیکی بین‌گونه‌ای صفر درصد بود. مطالعاتی که توسط Nuri و همکاران (2010) و Tarighi (2011) بر روی سه جنس بابونه با استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل انجام شد، تمایز بین گونه‌ای ۳۵ و ۲۲٪ را نشان داد. علت تفاوت در نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات نوری و طریقی می‌تواند این امر باشد که در دو مطالعه ذکر شده از سه جنس متفاوت بابونه (*Matricaria*, *Anthemis* و *Tripleutospermum*) استفاده شد، درحالی‌که در این مطالعه تنها جنس *Anthemis* مورد مطالعه قرار گرفت. تمایز میان‌جمعیت‌های یک گونه ۵۷٪ و درون جمعیت‌ها ۴۳٪ است. در مطالعه Nuri و همکاران (2010) که بر روی گونه‌های *A. tinctoria*، *A. haussknechtii*، *A. altissima*، *T. sevanense* و *M. recutita* انجام شد، تنوع درون‌جمعیت‌ها ۴۵٪ (مشابه داده‌های حاصل از این مطالعه) ولی تنوع میان‌جمعیت‌های یک گونه ۲۰٪ گزارش شد که اختلاف زیادی با نتایج این مطالعه دارد (Nuri *et al*., 2010). نوری علت این امر (پایین بودن تمایز میان جمعیت‌ها) را ناشی از پدیده جریان ژن بین جمعیت‌های وحشی دانست. البته وجود تغییرات ژنتیکی درون‌جمعیتی یک مزیت برای گونه‌ها در شرایط محیطی بی‌ثبات و نتیجه تبادل ژنتیکی ژنوتیپ‌های متفاوت با یکدیگر است (Endler, 1977). این مسئله در مطالعات تکاملی برای تعیین ارتباط گونه‌های مختلف یک جنس به اثبات رسیده است (Mirali *et al*., 2007). وجود تنوع بالا در میان جمعیت‌های یک گونه در این مطالعه می‌تواند به دلیل دور بودن استان‌های مورد مطالعه از یکدیگر باشد که باعث می‌شود انتقال و جریان ژن در میان جمعیت‌ها کم شود. در حالی‌که اگر فاصله جغرافیایی کم باشد امکان جریان ژن بیشتر می‌شود؛ به‌طوری‌که هرچه جریان ژن بین دو جمعیت از ۱ بیشتر باشد جدایی ژنتیکی بین گونه‌ها کمتر می‌شود (Wright, 1931). همان طور که در نمودار PCoA و دندروگرام تجزیة خوشه‌ای نشان داده شده است، جمعیت‌هایی که از لحاظ مکانی به‌هم نزدیکتر هستند (از گونه‌های متفاوت) شباهت ژنتیکی بیشتری به‌هم دارند و در یک گروه قرار می‌گیرند.

با توجه به اینکه مناطق مورد مطالعه در این تحقیق دارای دامنه ارتفاعی متنوعی بودند (۱۳۳۲-۴۰ متر)، معنی‌دار بودن همبستگی فواصل ژنتیکی با عوامل جغرافیایی دور از انتظار نبوده و این همبستگی می‌تواند در اثر سازگاری جمعیت‌ها با شیب جغرافیایی و اختلاف ژنتیکی بین آنها باشد.

با استفاده از جدول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) مشخص گردید که جمعیت H-ایوان دارای بیشترین فاصله از سایر جمعیت‌ها بوده و در تجزیه به روش خوشه‌ای نیز این جمعیت در خوشة جداگانه‌ای قرار گرفت. به‌همین دلیل پیشنهاد می‌شود از این جمعیت برای انجام برنامه‌های اصلاحی و ایجاد تنوع ژنتیکی بالاتر استفاده شود.

با توجه به نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌شود متمایزترین جمعیت‌ها جهت تلاقی برای رسیدن به بیشترین میزان تنوع استفاده گردد. بدین‌ترتیب جمعیت‌های T-رامیان و H-ایوان که بیشترین فاصله ژنتیکی را با استفاده از نشانگر پروتئینی نشان دادند، برای دورگ‌گیری پیشنهاد می‌شوند. در همین رابطه لازم است تا آزمایش‌های بیشتری برای ایجاد هیبرید درون‌گونه‌ای و تولید واریته‌های سنتتیک انجام شود.

به دلیل اینکه نشانگر پروتئین‌های کل توانست سطح پلی‌مورفیسم و تمایز بالا را در میان جمعیت‌ها شناسایی کند و جمعیت‌های مختلف بابونه را از یکدیگر متمایز کند، بنابراین می‌توان گفت که از کارایی مطلوبی برخوردار است.

از آنجایی که ایران دارای شرایط اقلیمی و جغرافیایی متفاوتی است، پیشنهاد می‌شود برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر تفاوت‌های ژنتیکی، از سایر نشانگرها مانند نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی برای نقشه‌برداری کامل از ژنوم بابونه استفاده شود.

سپاسگزاری

به این وسیله از سرکار خانم رسول‌زاده، مسئول آزمایشگاه بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و سایر کارکنان گروه مذکور که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، تشکر می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

– Abid, R. and Qaiser, M., 2009. Taxonomic significance of the cypsela morphology in the tribe *Anthemideae* (*Asteraceae*) from Pakistan and Kashmir. Pakestanian Journal of Botany, 41: 555 – 570

– Cirecelav, G., De Mastro, G., D'Andrea, L. and Nano, G.M., 2002. Comparison of chamomile biotypes (*Chamomilla recutita* L.). ISHS Acta Horticulturae 330: Medicinal and Aromatic Plants Conference, 21:44-53

– Duvall, M.R. and Biesboer, D.D., 1989. Comparisons of electrophoretic seed protein profiles among North American populations of Zizania. Biochemical Systematics and Ecology, 17: 39–43.

– Endler, J.A., 1977. Geographical variation, speciation and clines. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.

– Gray, J.R., Fairbrothers, D.E. and Quinn, J.A., 1973. Biochemical and anatomical population variation in the *Danthonia sericae* complex. Botanical Gazette, 134:166-173.

– Gardiner, S.E. and Forde, M.B., 1993. Identification of Cultivars of Grasses and Forage Legumes by SDS-PAGE of seed proteins. In: Seed Analysis. Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (eds.). Springer-Verlag. pp. 43-61.

– Jaimand, K. and Rezaie, M.B., 2001. Investigation of medicinal chamomile (*Matricaria chamomile*) compounds in Tehran, Hamedan and Kazerun. Journal of Medicinal and Aromatic Plant 12:14-21.

– Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685.

– Mirali, N., EL-Khouri, S. and Rizq, F., 2007. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. Biologia Plantarum, 51: 660-666.

– Misset, M.T. and Fontenelle, C., 1992. Protein relationships between natural populations of *Ulex europaeus* and *U. galli* (Faboideae, Genisteae) and their hybrids. Plant Systematics and Evolution 179: 19–25.

– Mohd, S., Alam, Z., Zahir, A., Weqar, A., Taufiq, A. and Ikhtir, K., 2007. Characterization of wheat varieties by seed strong protein electrophoresis. African Journal of Biotechnology, 6: 497-500.

– Naveed, M., Motomitsu, K. and Ghulam, M.A., 2005. Genetic Differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Centeral European Agriculture, 6: 69-76.

– Nezamdust, M., Mahmoodzadeh, A., Jameie, R., Heidari, R. and Hakimi, J., 2004. polymorphysm of seed storage proteins of *Vitis vinifera* L. in Azarbayejan Gharbi and classifing them by cluster analysis. Iranian Journal of Biology, 17: 24-33

– Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics.89:590-583

– Nisar, M., Ghafoor, A., Rashid khan, M. and Sharif Qureshi, A., 2006. Screening of *Pisum Sativum* L. germplasm against Erysiphe pisi syd. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 48: 33-37.

– Nuri, F., Salehi Shanjani, P., Beikibandarabadi, A., Alizadeh, M., Tabaie aghdaie, R., and Hadad, R., 2010. Genetic diversity of some population of Iranian chamomile by using total protein and relationship between them and biochemistry characters. 12th Genetic Congress of Iran Tehran, 268 p.

– Oberprieler, C., 2001. Phylogenic relationship in *Anthemis* L. (Asteraceae-Anthemideae) based on nrDNA ITS sequence variation. Taxon, 50: 745–61.

– Omidbeigi, R., 1999. Study of some chemical types of Iranian chamomile and comparison them with trim ones. Modares Agriculture Science Journal, 20: 45-53.

– Pirkhezri, M. and Hasany, M.A., 2009. Assessment of genetic diversity within and between genotypes sexual Iran chamomile (Matricaria spp and Anthemis spp) with RAPD markers. Iranian Horticultural Science Congress, Gilan. Pp. 25-22

– Reeves, G., Francis, D. and Davies, M.S., 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. Annals Journal of Botany, 82: 99-105.

– Rybicki, E.D. and Purv, M., 2005. SDS polyacrylamide electrophoresis (SDS – PAGE). http://www.mcb.uct.ac.zu/sdspage.html

– Tariqi, M., 2011. The study of Differentiation of some species using enzyme and protein markers. Master's thesis. College of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Karaj.

– Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16: 97-159.

– Zeinali, H., Khoulanjani, M.B., Golparvar, A.R., Jafarpour, M., and Shiranirad, A.H. 2008. Effect of different planting time and nitrogen fertilizer rates on flower yield and its components in German chamomile (*Matricaria recutita*). Iranian Journal of Crop Science, 10:220-230

Assessment of genetic diversity of *Anthemis haussknechtti, A. pseudocutula* and *A. triumfetti* populations using electrophoretic pattern of total proteins

M. Zekri[1], P. Salehi Shanjani[2]*, H. Javadi[3] and A. Alizadeh[4]

1- M.Sc., Azad University, Karaj, I.R.Iran
2*- Asist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
E-mail: psalehi@rifr-ac.ir
3- M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
4- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran

Received: 04.03.2013 Accepted: 25.06.2013

Abstract

Chamomile, a herbaceous and perennial plant from Asteracaea and Anthemis is the second largest genus in the family. Knowledge of genetic diversity and differentiation related genes, genotypes and knowledge of how to operate, is essential for breeding programs and may play an important role in genetics, biochemistry and plant breeding .Therefore, genetic diversity of 90 genotype of *Anthemis* (one population *of A. pseudocotula*, two populations of *A. haussknechtti* and six populations of *A. triumfetti*) were studied by electrophoretic pattern of total proteins and investigated to determine extent of genetic diversity. On the basis of SDS-PAGE, 24 reproducible bands were observed. *A. haussknechtti* and *A. triumfetti* species had highest number of bands (23) and *A. pseudocutula* had minimum number of bands (17). Percentage of polymorphism was 49/07% and specific band was observed. Longest distance was observed between *A. haussknechtti (*Ivan*)* and *A. triumfetti* (Ramian). Analysis of molecular variance showed that genetic differentiation between and within the populations were 57% and 43% respectively. Correlation between the protein data, latitude and longitude showed significant differences (R^2=/03049 and P=0/010).

Keywords: *Anthemis,* electrophoresis , genetic diversity, total proteins.