

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شماره ۲، صفحه ۲۴۱-۲۲۵ (۱۳۹۲)

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan.) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

سید فاضل میراحمدی^۱، محمدرضا حسندخت^{۲*}، فاطمه سفیدکن^۳ و محمداسماعیل حسینی^۴

۱- مربی، گروه مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ولایت، ایرانشهر، استان سیستان و بلوچستان

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
پست الکترونیک: mrhassan@ut.ac.ir

۳- استاد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۴- استادیار، پارک علم و فناوری دانشکده کشاورزی، صنایع غذایی و منابع طبیعی دانشگاه سیدنی، استرالیا

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۵

چکیده

در این مطالعه از نشانگرهای مولکولی RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ متعلق به ۲۵ جمعیت بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan.) ایران استفاده شد. از تعداد ۱۸ آغازگر مورد استفاده، تعداد ۳۲۲ باند قابل تشخیص مشاهده شدند که ۸۶/۶٪ از آنها (تعداد ۲۷۹ باند) در بین ژنوتیپ‌های مختلف چندشکلی نشان دادند. تعداد متوسط باندهای بدست‌آمده به ازای هر آغازگر ۱۷/۹ بود. مجموع قدرت تفکیک کل آغازگرها ۱۴۷ بود که هر کدام به‌طور میانگین قدرت تفکیک ۸/۱۷ را نشان دادند. در بین آغازگرهای مورد استفاده بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به آغازگر BA03 به میزان ۱۶/۶۷ بود. برای تعیین میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها، از ضریب تشابه جاکارد استفاده گردید. بیشترین میزان تشابه ژنتیکی (۰/۹۵) بین ژنوتیپ‌های محمدشهر-۲ و محمدشهر-۵ و کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر-۲ و پیرانشهر-۱ و نیز مشکین‌شهر-۶ و پیرانشهر-۱ به میزان ۰/۲۴ مشاهده گردید. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام و دندروگرام آن ترسیم گردید. در دندروگرام حاصل ژنوتیپ‌های مورد بررسی در ۱۵ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. دندروگرام بدست‌آمده تا حدود زیادی با تنوع جغرافیایی همخوانی داشت. در نهایت ژنوتیپ‌های پیرانشهر-۱ و تنگه‌گل-۲ بیشترین تفاوت را با سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند، به‌طوری‌که در گروه‌های کاملاً مجزایی قرار گرفتند و بیشترین شباهت (تشابه بالای ۰/۹۰) میان ژنوتیپ‌های جمعیت محمدشهر مشاهده شد. در مجموع نتایج این مطالعه وجود تنوع ژنتیکی در حد نسبتاً بالایی را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین نتایج این پژوهش، بیانگر کارآمدی نشانگرهای RAPD در ارزیابی تنوع ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم ژنوتیپ‌های گونه مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan.)، تنوع ژنتیکی، RAPD، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

بومادران (*Achillea*) متعلق به تیره Astraceae، دارای بیش از ۱۰۰ گونه گیاه علفی چند ساله، ریزوم‌دار و اغلب معطر می‌باشد که در سراسر دنیا از جمله اروپا، غرب آسیا، شمال آفریقا، بخش‌هایی از استرالیا، زلاندنو و آمریکای شمالی پراکنش دارد (Rechinger, 1963; Chevallier, 1996). این گیاهان در صنایع مختلف داروسازی، غذایی (متابولیت‌های موجود در این گیاهان اشتهاآور است و سبب هضم غذا می‌شود) و آرایشی و بهداشتی (تهیه کرم و پماد، شامپوهای ضد شوره سر) کاربرد گسترده‌ای دارند (Iran Pharmacopoeia, 2006; Omidbeigi, 2009). با توجه به مطالعاتی که تاکنون بر روی گونه‌های بومادران انجام شده‌است، ترکیب‌های غالب این جنس، اسانس‌ها، اسیدهای آمینه، آلکالوئیدها، فلاونوئید و تانن‌ها معرفی شده‌اند (Evans et al., 2002). گرچه اسانس‌ها اصلی‌ترین جزء متابولیت‌های ثانویه را در پیکره این گیاهان تشکیل می‌دهند، اما تحقیقات نشان می‌دهد که بعضی از گونه‌های این گیاه می‌توانند به‌عنوان منابع ارزشمندی از فلاونوئیدها مورد توجه قرار گیرند (Nadir et al., 1991).

گونه بومادران زرد یکی از گونه‌های دارویی جنس بومادران است که از گذشته‌های دور در طب سنتی کشور اردن به‌عنوان داروی ضد نفخ مورد استفاده قرار می‌گرفته است، در صورتی‌که در ترکیه به‌عنوان داروی تسکین‌دهنده دردهای شکمی و التیام‌دهنده زخم‌های پوستی کاربرد داشته‌است (Bader et al., 2003). فعالیت بالای ضدقارچی و ضدباکتریایی و نیز خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی اسانس این گیاه اخیراً به اثبات رسیده است (Baris et al., 2006). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Kupeli Akkol و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد خاصیت

التیام‌بخشی قابل ملاحظه عصاره اندام‌های هوایی این گیاه در مرحله گلدهی بر روی زخم‌های ناشی از بریدگی مدل‌های حیوانی به وضوح مشاهده گردید.

در ایران به‌دلیل عدم شناخت ذخایر ژنتیکی و ژن‌های مطلوب، برنامه اصلاحی درخور توجهی روی گیاهان دارویی انجام نشده است. بنابراین می‌توان با شناسایی گونه‌های مختلف و ارزیابی آنها، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققان را در دسترس آنها قرار داد. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان از انواع نشانگرها استفاده نمود. نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی به دلیل میزان چندشکلی قابل دسترس محدودتر در مقایسه با نشانگرهای DNA در امر طبقه‌بندی کمتر بکار گرفته می‌شوند. همچنین با توجه به محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و متأثر بودن از عوامل محیطی، کاربرد این گونه نشانگرها محدود است. نشانگرهای DNA، دارای قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی هستند (Smith & Smith, 1992).

با بکارگیری نشانگرهای مولکولی اصلاح گیاهان با سرعت و سهولت بیشتری صورت گرفته و انتخاب والدین برای تلاقی‌های بعدی در برنامه‌های اصلاحی با اطمینان بیشتری انجام می‌شود. استفاده از نشانگرهای RAPD از روشهایی است که به‌طور گسترده در بررسی‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا قادر است با استفاده از مقادیر اندک DNA اختلافات موجود بین گیاهان را در سطح DNA شناسایی کند و در عین حال نیازی به اطلاعات قبلی از ژنوم مورد مطالعه ندارد. از کاربردهای RAPD در اصلاح گیاهان می‌توان به ترسیم نقشه‌های ژنتیکی، انتخاب به‌وسیله مارکر (MAS: Marker Assisted Selection)، مطالعه انتقال

ژن‌های مفید از طریق ایتروگریسیون و ارزیابی ژرم‌پلاسم را نام برد (Boonparkob, 1996). این نشانگر که اساس آن تکثیر قطعات DNA توسط آغازگرهای غیر اختصاصی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد، به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA برای طراحی و ساخت آغازگرها، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه‌ها، عدم نیاز به کاوشگر، مواد پرتوزا، هزینه کم کاربرد و سرعت اجرای آن از جایگاه ویژه‌ای در بررسی‌های مولکولی به‌ویژه ارزیابی تنوع ژنتیکی برخوردار می‌باشد (Williams et al., 1990). یکی از عیوب نشانگرهای RAPD تکرارپذیری پایین این نشانگرها می‌باشد. به این معنی که به واسطه تفاوت نتایج ریپد با استفاده از ترموسایکلرهای مختلف و انجام روش‌ها بین بخش‌های مختلف با ابزار متفاوت، رسیدن به سطح قابل قبول تکرارپذیری بین آزمایشگاه‌ها ممکن است مشکل باشد (Naghavi et al., 2005). برای افزایش تکرارپذیری نتایج RAPD توجه به چند نکته ضروری می‌باشد. غلظت DNA ژنومی باید به دقت تعیین شده و میزان DNA مورد استفاده در واکنش، یکنواخت و در طیف مقدار تعیین شده باشد. معمولاً غلظت بین ۵ تا ۲۵ نانوگرم DNA برای واکنش ۲۵ میکرولیتر مناسب است. نوع دستگاه ترموسایکلر بر تکرارپذیری واکنش مؤثر می‌باشد، بدین جهت باید وضعیت حرارتی دستگاه مورد بررسی قرار گیرد. از دیگر عوامل مؤثر بر تکرارپذیری واکنش، تنظیم دمای اتصال آغازگر می‌باشد، معمول‌ترین دما برای اتصال آغازگر ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که این دما در محدوده ۳۲ تا ۴۲ درجه مورد آزمایش قرار گرفته و بهترین دما انتخاب می‌شود. البته طول آغازگرها و ترتیب بازهای آن نیز روی واکنش مؤثر بوده و باید دقیقاً کنترل شوند. بنابراین می‌توان با تکیه بر موارد

مذکور تا حد زیادی تکرارپذیری این روش را افزایش داد و عیب موجود را تا حد زیادی مرتفع نمود (Anolles & Gresshoff, 1998).

در سال‌های اخیر مطالعات بسیار زیادی با استفاده از نشانگر RAPD به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بسیاری از گونه‌های دارویی مانند *Achillea fragrantissima* (Morsy, 2007)، مرزه تابستانه (Hadian et al., 2008)، ارقام مختلف گلرنگ (Maali Amiri et al., 2001)، ریحان (Vieria et al., 2001) و باریجه (Talebi Kohyakhly et al., 2008) انجام شده‌است. هرچند این مطالعات در ارتباط با گونه بومادران بسیار محدود می‌باشد و تاکنون هیچ مطالعه‌ای با استفاده از این نشانگر در مورد بومادران زرد انجام نشده‌است.

بنابراین با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف جنس بومادران و ضرورت حفاظت و نگهداری گونه‌های دارویی آن، بررسی ژرم‌پلاسم بومادران زرد ایران با هدف مطالعه روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف آن به منظور اصلاح، اهلی‌سازی و تولید رقم‌های متناسب با نیاز صنایع وابسته صورت گرفته‌است. در این راستا، تحقیق حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی در بین برخی از جمعیت‌های بومادران زرد ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD پرداخته است تا تنوع ژنتیکی موجود را بررسی و روابط بین آنها را گزارش نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی در این مطالعه در کل شامل ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد بود که در فصل رویش (اوایل تابستان ۱۳۸۸) و در مرحله گلدهی کامل از ۲۵ منطقه واقع در ۱۲ استان ایران جمع‌آوری شده بودند (جدول‌های ۱ و ۲).

جدول ۱- مختصات و اطلاعات هواشناسی مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های بومادران زرد مورد مطالعه

ردیف	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی (شرقی)	عرض جغرافیایی (شمالی)	ارتفاع (متر)	T_{min}	T_{max}	H_{min}	H_{max}	H_{total}	P_{anal}	Sun
۱	هاور، خراسان شمالی	۵۷°۱۱'	۳۷°۲۸'	۲۹۸۰	۶/۸	۱۹/۷	۰/۴	۰/۸	۰/۴	۲۷۲/۴	۲۷۱۴
۲	گلول، خراسان شمالی	۵۸°۱۱'	۳۷°۳۷'	۲۱۰۰	۶/۸	۱۷/۵	۰/۴	۰/۷	۰/۵۳	۲۵۲/۷	۲۷۱۴
۳	چلمیر، خراسان شمالی	۵۸°۳۴'	۳۷°۳۱'	۱۵۸۴	۶/۸	۱۹/۷	۰/۴	۰/۸	۰/۵۸	۲۷۲/۴	۲۷۱۴
۴	آدگ، خراسان رضوی	۵۸°۵۳'	۳۶°۱۱'	۱۲۶۰	۶/۷	۲۱/۸	۰/۳	۰/۷	۰/۴۹	۲۳۹/۸	۳۰۷۲/۲
۵	آخلمد، خراسان رضوی	۵۸°۵۹'	۳۶°۱۱'	۱۱۵۵	۶/۷	۲۱/۸	۰/۳	۰/۷	۰/۴۹	۲۳۹/۸	۳۰۷۲/۲
۶	بوژان، خراسان رضوی	۵۹°۰۳'	۳۶°۱۱'	۱۶۰۰	۶/۷	۲۱/۸	۰/۳	۰/۷	۰/۴۹	۲۳۹/۸	۳۰۷۲/۲
۷	گلمکان، خراسان رضوی	۵۹°۱۳'	۳۶°۲۹'	۱۳۱۵	۶/۶	۲۰/۲	۰/۳۵	۰/۶۹	۰/۴۸	۲۱۲/۶	۲۸۹۸/۲
۸	آزغد، خراسان رضوی	۵۹°۲۴'	۳۶°۱۹'	۱۸۰۰	۷/۱	۲۱/۱	۰/۳۷	۰/۷۴	۰/۵۵	۲۵۵/۲	۲۸۹۲/۴
۹	گوچگی، خراسان رضوی	۵۹°۵۶'	۳۶°۳۱'	۲۱۰۰	۷/۱	۲۱/۱	۰/۳۷	۰/۷۴	۰/۵۵	۲۵۵/۲	۲۸۹۲/۴
۱۰	آرتکند، خراسان رضوی	۵۹°۵۱'	۳۶°۴۸'	۱۴۸۰	۷/۱	۲۱/۱	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۵۵	۲۵۵/۲	۲۸۹۲/۴
۱۱	آمان آباد، خراسان رضوی	۵۹°۳۲'	۳۵°۵۸'	۱۲۱۰	۷/۱	۲۱/۱	۰/۳۷	۰/۷۴	۰/۵۵	۲۵۵/۲	۲۸۹۴/۴
۱۲	تنگه گل، گلستان	۵۵°۴۹'	۳۷°۲۳'	۲۲۰	۱۱/۷	۲۳/۹	۰/۵۵	۰/۸۲	۰/۶۸	۵۶۴/۱	۲۴۳۹/۱
۱۳	سیاه‌بیشه، مازندران	۵۱°۳۳'	۳۶°۲۳'	۱۹۹۰	۶/۳	۱۴/۸	۰/۴۷	۰/۸	۰/۶۳	۵۰۳/۴	۱۹۵۹/۴
۱۴	محمدشهر، تهران	۵۰°۳۲'	۳۵°۴۸'	۱۱۴۰	۷/۸	۲۱/۲	۰/۳۲	۰/۶۹	۰/۴۷	۲۴۳/۸	۲۹۵۹/۷
۱۵	زنجان، زنجان	۴۸°۴۵'	۳۶°۳۰'	۱۶۴۰	۴	۱۸	۰/۳۷	۰/۷۵	۰/۵۴	۳۱۳/۱	۲۸۴۳/۲
۱۶	سردابه، اردبیل	۴۸°۱۵'	۳۸°۳۷'	۱۸۴۰	۲/۸	۱۵/۳	۰/۵۳	۰/۸۹	۰/۷۱	۳۰۳/۹	۲۴۵۴/۳
۱۷	مشکین‌شهر، اردبیل	۴۷°۳۸'	۳۸°۲۴'	۱۳۹۴	۵/۹	۱۵/۴	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۶	۳۸۳/۹	۲۵۰۳/۲
۱۸	ساطی، اردبیل	۴۷°۲۴'	۳۸°۱۵'	۱۹۲۰	۵/۹	۱۵/۴	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۶	۳۸۳/۹	۲۵۰۳/۲
۱۹	می‌شوداغ، آذربایجان شرقی	۴۵°۳۸'	۳۸°۱۹'	۲۴۵۰	۶/۹	۱۸	۰/۳۷	۰/۷۱	۰/۴۵	۲۸۸/۹	۲۷۹۴/۳
۲۰	قاسملو، آذربایجان غربی	۴۴°۴۳'	۳۷°۲۹'	۱۳۴۰	۵/۴	۱۷/۶	۰/۴۲	۰/۷۸	۰/۶	۳۴۱	۲۸۲۹/۳
۲۱	پیرانشهر، آذربایجان غربی	۴۵°۰۴'	۳۶°۴۱'	۱۸۴۲	۶/۲	۱۷/۹	۰/۳۷	۰/۷۱	۰/۵۱	۶۷۲/۷	۲۷۶۶/۴
۲۲	نور، کردستان	۴۶°۰۰'	۳۵°۵۲'	۱۸۳۰	۸/۷	۱۸/۶	۰/۳۴	۰/۵۸	۰/۴۴	۶۸۹/۳	۲۸۸۴/۶
۲۳	زریبار، کردستان	۴۶°۰۸'	۳۵°۳۲'	۱۲۸۵	۵	۲۰/۶	۰/۳۴	۰/۷۷	۰/۵۳	۹۹۱/۲	۲۹۶۷/۹
۲۴	إبرو، همدان	۴۸°۲۸'	۳۴°۴۱'	۲۲۵۰	۳/۳	۱۹/۱	۰/۳۶	۰/۷۷	۰/۵۴	۳۱۶/۶	۲۹۲۹/۱
۲۵	فیرزآباد، فارس	۵۲°۳۷'	۲۸°۴۸'	۱۶۰۰	۱۰/۱	۲۶/۷	۰/۳۶	۰/۶۵	۰/۴۹	۴۱۶/۶	۳۳۵۸/۶

T_{min} : میانگین دمای حداقل سالانه (درجه سانتی‌گراد)، T_{max} : میانگین دمای حداکثر سالانه (درجه سانتی‌گراد)

H_{min} : میانگین رطوبت نسبی حداقل سالانه (درصد)، H_{max} : میانگین رطوبت نسبی حداکثر سالانه (درصد)

H_{total} : میانگین رطوبت نسبی کل در هر سال (درصد)، P_{anal} : بارش کل سالانه (میلی‌متر)، Sun: تعداد ساعات آفتابی در سال

جدول ۲- اسامی قراردادی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در آزمایش RAPD

شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	علامت اختصاری	شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	علامت اختصاری
۱	پیرانشهر-۱	Pi-1	۲۱	اِبرو-۴	E-4
۲	زریبار-۶	Zar-6	۲۲	اِبرو-۶	E-6
۳	آزغد-۴	Az-4	۲۳	گوجگی-۶	G-6
۴	چلمیر-۲	Ch-2	۲۴	قاسملو-۶	Gh-6
۵	گلول-۱	Gol-1	۲۵	اُرتکند-۱	O-1
۶	نُور-۶	N-6	۲۶	اُرتکند-۲	O-2
۷	بوژان-۱	Bu-1	۲۷	اُرتکند-۳	O-3
۸	بوژان-۲	Bu-2	۲۸	اَمان‌آباد-۱	Am-1
۹	هاور-۱	H-1	۲۹	سردابه-۴	Sar-1
۱۰	هاور-۳	H-3	۳۰	اَخلمد-۲	Akh-1
۱۱	هاور-۴	H-4	۳۱	فیروزآباد-۲	F-2
۱۲	محمدشهر-۲	Mo-2	۳۲	فیروزآباد-۳	F-3
۱۳	محمدشهر-۵	Mo-5	۳۳	فیروزآباد-۶	F-6
۱۴	محمدشهر-۶	Mo-6	۳۴	زنجان-۶	Zn-6
۱۵	گلمکان-۳	Glm-3	۳۵	مشکین شهر-۲	Me-2
۱۶	گلمکان-۴	Glm-4	۳۶	مشکین شهر-۴	Me-4
۱۷	سیاه‌پیشه-۴	Si-4	۳۷	مشکین شهر-۶	Me-6
۱۸	ساطی-۲	Sat-2	۳۸	می‌شوداغ-۳	Mi-3
۱۹	ساطی-۵	Sat-5	۳۹	تنگه‌گل-۲	T-2
۲۰	آدگ-۶	Ad-6			

استخراج DNA

استخراج DNA از برگ‌های خشک ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده انجام شد. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری در سایه و دمای محیط خشک گردیدند، به طوری که از نظر ظاهری هیچگونه تفاوتی در رنگ بافت‌های گیاهی خشک با زنده وجود نداشت. به منظور استخراج DNA در این مطالعه از روش Sharp و همکاران (۱۹۸۸)

استفاده گردید، با این تفاوت که اصلاحاتی در مقادیر و نوع مواد مورد استفاده در بافر استخراج و همچنین پروتکل بکار گرفته شده اعمال شده بود. پس از استخراج DNA با روش مذکور کمیت و کیفیت آن با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (دستگاه نانودراپ) و الکتروفوروز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

آغازگرهای مورد استفاده

در این تحقیق از بین ۸۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی سری تیب‌مول‌بیول (TIB MOLBIOL Synthese Labor GmbH) و آپرون (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) که روی دو ژنوتیپ با خصوصیات ظاهری متفاوت مورد آزمایش قرار گرفتند، تعداد ۱۸ آغازگر که توانستند باندهای چندشکلی و پایدار تولید کنند، برای کلیه ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۴).

تنظیم شرایط PCR

کیت PCR از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد که شامل Taq DNA Polymerase, PCR buffer, dNTPs و MgCl₂ بود. هر مخلوط واکنش PCR شامل دو میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۱۰ μM و ۷/۵ میکرولیتر کیت PCR با غلظت ۲X بود که در نهایت با اضافه کردن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به مقدار ۴ میکرولیتر، حجم مخلوط واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسانیده شد. پس از آماده کردن محلول پایه جهت PCR و پس از سانتی‌فیوژ کوتاهی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler انجام شد. برای انجام واکنش PCR دوره‌های حرارتی به شرح جدول ۳ استفاده گردید.

برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از سایز مارکر Fermentas SM0311 استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ۱۳۰ دقیقه با جریان ۷۰ ولت انجام گردید. پس از این مرحله ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در لیتر رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو در آب مقطر به مدت

۱۵ دقیقه قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV توسط دستگاه ژل‌داک مشاهده شده و عکس‌برداری از ژل انجام شد.

محاسبات آماری

پس از انجام آزمایش RAPD برای بررسی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها، وجود یا عدم وجود یک باند خاص با اعداد یک و صفر مشخص گردید. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم‌افزار Excel، داده‌ها به نرم‌افزار NTSYS-pc Ver 2.02 منتقل شد. سپس ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بدست آمد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA: Principal Coordinate Analysis) انجام شد و پلات دو بعدی حاصل از آن رسم گردید. همچنین معیار آماری ضریب همبستگی کوفنتیک (r) نیز محاسبه شد که از طریق آن میزان شباهت بین ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفنتیک) با ماتریس تشابه سنجیده می‌شود.

برای هر آغازگر مورد استفاده در این آزمایش قدرت تفکیک محاسبه شد. این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد (Prevost & Wilkinson, 1999).

نتایج

هیجده آغازگر مورد استفاده در مجموع ۳۲۲ باند تولید کردند که از بین آنها ۴۳ باند در بین تمام ژنوتیپ‌ها یک شکل بودند و ۲۷۹ باند در بین حداقل سه ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند. اندازه باندهای تولید شده در تمام آغازگرها در محدوده ۲۵۰-۳۰۰۰ جفت باز تخمین زده شد. بیشترین تعداد باندهای تولیدی ۳۳

در بین ژنوتیپ های متعلق به این گروه بود. همچنین در ضریب تشابه ۰/۴۶ دندروگرام بدست آمده به ۱۵ گروه تقسیم شد. در این ضریب تشابه تمامی ژنوتیپ ها و توده های مورد بررسی بجز ۴ ژنوتیپ ننور-۶ (گروه چهارم)، سردابه-۱ و اخلمد-۱ (گروه هفتم) و گوجگی-۶ (گروه نهم)، منطبق با مناطق جغرافیایی نزدیک به هم، در خوشه مجزایی قرار گرفتند.

در مورد توده هایی که بیشتر از یک ژنوتیپ را در این مطالعه به خود اختصاص داده بودند مشاهده شد که بجز دو ژنوتیپ بوژان ۱ و ۲ که در دو خوشه جدا از هم قرار گرفتند، در بقیه موارد ژنوتیپ های مربوط به یک توده در یک خوشه واقع شدند و تشابه ژنتیکی بالایی را با هم نشان دادند.

در این تحقیق ضریب کوفتیک (r) که بیانگر میزان شباهت بین ماتریس حاصل از دندروگرام با ماتریس تشابه بود، ۰/۹۲ بدست آمد که نشان می دهد روش UPGMA برای تجزیه دندروگرام این مطالعه روش مناسبی بوده است.

در این تحقیق تجزیه به مختصات اصلی توانست ۱۸ عامل اصلی را بین داده های مولکولی مشخص نماید که در مجموع این عوامل توانستند ۶۳/۱٪ کل تغییرات را توجیه کنند. در بین این عوامل، عامل اول درصد بالایی از واریانس با میزان ۲۸/۷۱٪ را توجیه نمود. دو عامل دوم و سوم به ترتیب با ۴/۸۹٪ و ۳/۸۳٪ در رتبه های بعدی قرار گرفتند. این نتایج با نتایج تحقیقات Rahimmalek و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ۵ گونه بومادران با استفاده از نشانگرهای AFLP که در آن ۴۹/۵٪ از واریانس کل توسط سه عامل اول توجیه شدند، قابل مقایسه است.

عدد و به وسیله آغازگر BA03 و بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای OPC05، OPD03، OPN18 و OPN01 به ترتیب با مقادیر ۱۰۰، ۹۴/۷۴، ۹۴/۷۴ و ۹۴/۱۲ درصد بود. متوسط درصد چندشکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۸۷/۰۵٪ بود. مجموع قدرت تفکیک آغازگرها ۱۴۷/۰۱ بود و هر کدام به طور میانگین قدرت تفکیک ۸/۱۷ را نشان دادند (جدول ۴). در بین آغازگرهای مورد استفاده بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به آغازگر BA03 به میزان ۱۶/۶۷ بود. پروفیل بانندی دو آغازگر که چندشکلی مطلوبی را نشان دادند در شکل های ۱ و ۲ آمده است. براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه (جدول ۵)، کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ های مشکین شهر-۲ و پیرانشهر-۱ و نیز مشکین شهر-۶ و پیرانشهر-۱ (۰/۲۴) و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ های محمدشهر-۲ و محمدشهر-۵ (۰/۹۵)، محمدشهر-۳ و محمدشهر-۶ به میزان ۰/۹۴، هاور-۱ و هاور-۳ (۰/۹۱)، فیروزآباد-۳ و فیروزآباد-۶ (۰/۸۹) و نیز ارتکند-۱ و ارتکند-۳ (۰/۸۶) مشاهده شد. متوسط تشابه بین کل ژنوتیپ ها ۰/۴۰ بود.

با استفاده از دندروگرام حاصل (شکل ۳)، در ضریب تشابه ۰/۲۹ ژنوتیپ های مورد بررسی در دو گروه اصلی تقسیم بندی شدند که گروه اول شامل دو ژنوتیپ پیرانشهر-۱ و تنگه گل-۲ بود. میزان فاصله ژنتیکی این دو ژنوتیپ از هم و از سایر ژنوتیپ ها بسیار زیاد بود و به صورت کاملاً مشخصی از سایرین جدا افتاده بودند. گروه دوم شامل ۳۷ ژنوتیپ باقی مانده بودند که دامنه مشابهت بسیار وسیعی (۰/۳۵-۰/۹۵) را نسبت به هم داشتند که نشان از تنوع ژنتیکی بسیار بالا

جدول ۳- زمان و دمای لازم برای سه مرحله (واسرشت‌سازی، اتصال و بسط) در هر یک از دوره‌های حرارتی PCR

دوره	تعداد تکرار	مرحله انجام شده	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان مورد نیاز
۱	۱	واسرشت‌سازی	۹۴	۳ دقیقه
۲	۵	واسرشت‌سازی	۹۲	۱ دقیقه
		اتصال آغازگر به DNA	۳۹/۵	۱ دقیقه
۳	۳۷	بسط آغازگر	۷۲	۲ دقیقه
		واسرشت‌سازی	۹۲	۳۰ ثانیه
		اتصال آغازگر به DNA	۳۷/۵	۴۵ ثانیه
۴	۱	بسط آغازگر	۷۲	۲ دقیقه
		بسط نهایی	۷۲	۷ دقیقه
۵	۱	نگهداری	۴	+∞

جدول ۴- فهرست و مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده

ردیف	آغازگر	توالی ۵'→۳'	تعداد کل قطعات تکثیر شده (a)	تعداد قطعات چندشکلی (b)	درصد چندشکلی (b/a × ۱۰۰)	قدرت تفکیک (Rp)
۱	BA02	TGCTCGGCTC	۲۱	۱۹	۹۰/۴۸	۱۱/۲۳
۲	BA03	GTGCGAGAAC	۳۳	۲۸	۸۴/۸۵	۱۶/۸۷
۳	BA10	GGACGTTGAG	۲۰	۱۴	۷۰	۸/۷۶
۴	BA19	CCATCCGTTG	۱۶	۱۳	۸۱/۲۵	۷/۸۹
۵	BA20	GAGCGCTACC	۲۰	۱۵	۷۵	۶/۲۵
۶	OPAB04	GGCACGCGTT	۱۷	۱۴	۸۲/۳۵	۸/۷۶
۷	OPC05	GATGACCGCC	۱۴	۱۴	۱۰۰	۵/۷۹
۸	OPC07	GTCCCGACGA	۱۶	۱۴	۸۷/۵۰	۷/۶۴
۹	OPC09	CTCACGTTCC	۱۲	۱۱	۹۱/۶۷	۵/۷۴
۱۰	OPD03	GTCGCCGTCA	۱۹	۱۸	۹۴/۷۴	۹/۴۹
۱۱	OPE17	CTACTGCCGT	۱۳	۱۲	۹۲/۳۱	۵/۲۳
۱۲	OPG11	TGCCCCGTCGT	۲۳	۲۰	۸۶/۹۶	۱۰/۵۶
۱۳	OPK10	GTGCAACGTG	۱۴	۱۱	۷۸/۵۷	۵/۳۸
۱۴	OPN01	CTCACGTTGG	۱۷	۱۶	۹۴/۱۲	۶/۵۶
۱۵	OPN03	GGTACTCCCC	۱۶	۱۴	۸۷/۵۰	۶/۱۵
۱۶	OPN08	ACCTCAGCTC	۱۵	۱۳	۸۶/۶۷	۷/۱۲
۱۷	OPN13	AGCGTCACTC	۱۷	۱۵	۸۸/۲۴	۸/۴۶
۱۸	OPN18	GGTGAGGTCA	۱۹	۱۸	۹۴/۷۴	۹/۱۳
۱۹	مقدار کل	-	۳۲۲	۲۷۹	-	۱۴۷/۰۱
۲۰	میانگین	-	۱۷/۹	۱۵/۵	۸۷/۰۵	۸/۱۷

ول ۵- ماتریس تشابه بین ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد براساس داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD

۲۰	۱۹	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶
														۰/۵۴
													۰/۵۲	۰/۴۲
												۰/۴۸	۰/۵۵	۰/۵۲
											۰/۹۱	۰/۴۷	۰/۵۵	۰/۵۱
										۰/۸۶	۰/۸۲	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۴۹
									۰/۴۳	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۳۰	۰/۴۲	۰/۴۷
								۰/۹۵	۰/۴۵	۰/۴۹	۰/۴۶	۰/۳۰	۰/۴۴	۰/۴۸
							۰/۹۴	۰/۹۰	۰/۴۵	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۳۱	۰/۴۳	۰/۴۸
						۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۴۹	۰/۳۹	۰/۴۷	۰/۴۵
					۰/۷۳	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۸	۰/۴۹	۰/۵۰	۰/۴۱	۰/۴۹	۰/۴۹
				۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۵
			۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۴۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۴۲	۰/۴۳	۰/۴۴	۰/۳۵	۰/۳۸	۰/۳۸
		۰/۷۳	۰/۴۳	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۳۲	۰/۳۳	۰/۳۱	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۵
	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۳۹
۰/۴۸	۰/۳۶	۰/۴۱	۰/۳۸	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۴۰	۰/۳۹

جدول ۵- ماتریس تشابه بین ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد براساس داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD

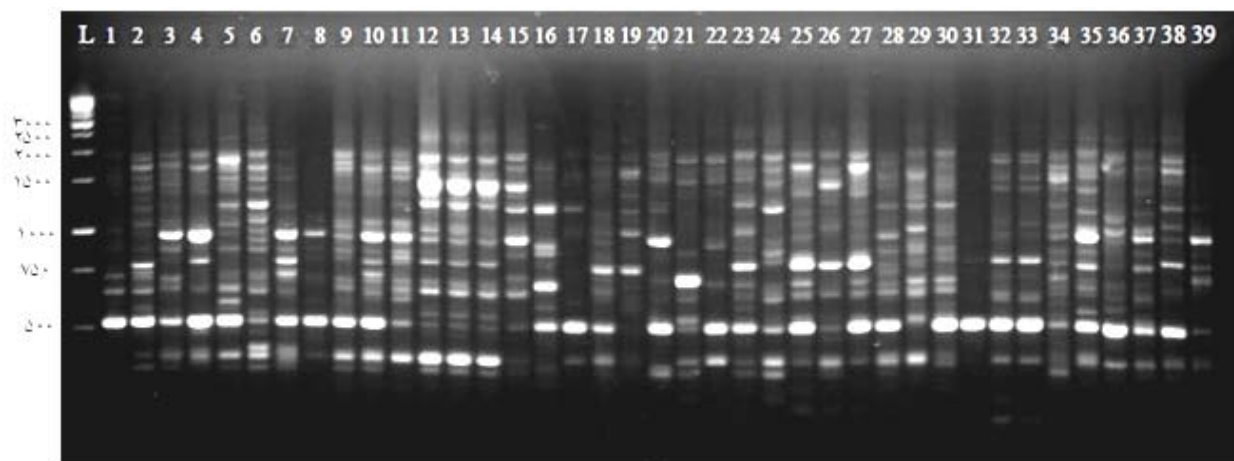
۲۰	۱۹	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶
۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۴۰	۰/۳۶	۰/۴۰	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۳۵	۰/۴۰	۰/۳۵
۰/۴۶	۰/۳۳	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۴۳	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۳۷
۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۰	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۸
۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۴۴	۰/۴۷	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۴۱
۰/۳۴	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۴۱	۰/۴۱
۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۳۸	۰/۴۴	۰/۴۰
۰/۴۷	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۴۷	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۴۱	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۴۵
۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۳۵	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۴۰	۰/۳۸
۰/۴۲	۰/۳۳	۰/۳۷	۰/۳۳	۰/۴۲	۰/۴۵	۰/۳۵	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۴۰	۰/۳۸
۰/۳۱	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۳۱
۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۴۱	۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۳۵	۰/۳۹
۰/۳۵	۰/۳۰	۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۳۰	۰/۳۵	۰/۳۹
۰/۴۴	۰/۳۵	۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۴۲	۰/۴۴	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۳۶	۰/۴۶	۰/۳۹
۰/۳۵	۰/۴۰	۰/۴۳	۰/۳۵	۰/۳۸	۰/۴۱	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۰	۰/۳۸	۰/۳۵
۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۴۱	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۲۷	۰/۳۴	۰/۳۲
۰/۳۴	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۲	۰/۳۹	۰/۳۴
۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۳۲	۰/۳۹	۰/۳۷
۰/۳۰	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۸	۰/۲۸

نه مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است.

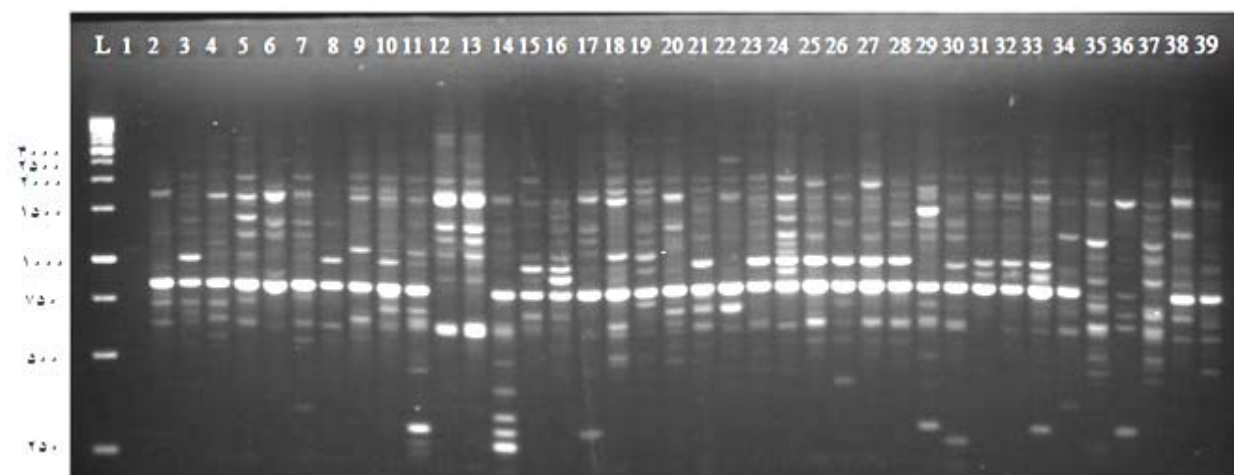
ادامه جدول ۵-

۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۸	۳۹
۰/۷۶														
۰/۸۶	۰/۷۷													
۰/۵۸	۰/۵۰	۰/۵۷												
۰/۴۲	۰/۳۴	۰/۴۱	۰/۵۳											
۰/۴۴	۰/۴۱	۰/۴۴	۰/۴۸	۰/۵۵										
۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۳۰									
۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۷۱								
۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۶۴	۰/۸۹							
۰/۳۷	۰/۳۱	۰/۳۷	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۳۶	۰/۲۹	۰/۳۹							
۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۹	۰/۳۲	۰/۲۷	۰/۳۳	۰/۴۵						
۰/۳۱	۰/۲۵	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۳۷	۰/۲۷	۰/۲۵	۰/۳۱	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۷۲				
۰/۴۰	۰/۳۴	۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۴۰	۰/۷۷	۰/۶۴			
۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۴۴	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۴۲	۰/۴۸	۰/۴۴	۰/۵۵		
۰/۳۰	۰/۲۴	۰/۲۷	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۲۹	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۳۳	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۳۹	

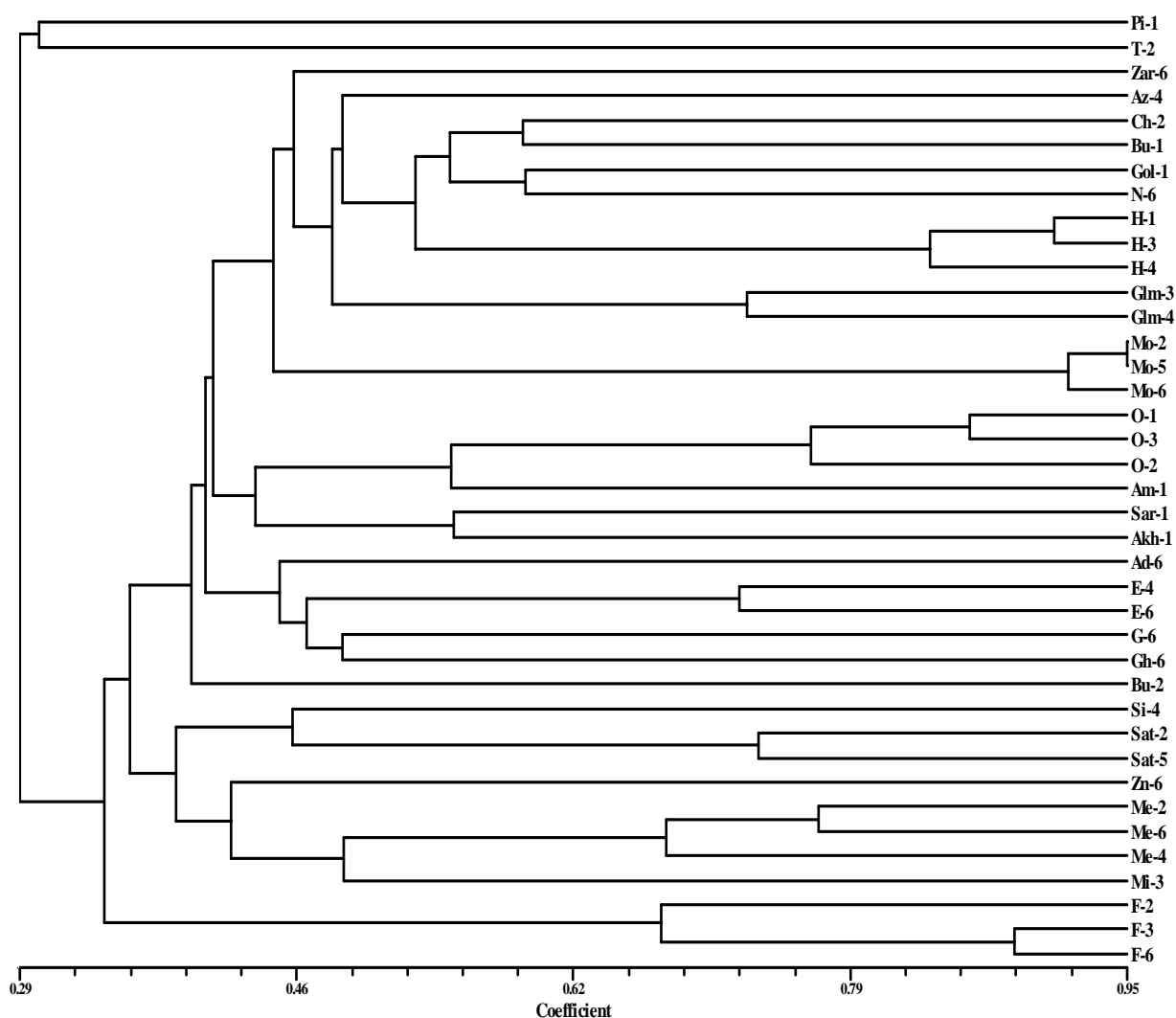
نه مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد مورد بررسی توسط آغازگر OPD03 (شماره‌ها در شکل براساس جدول ۲ می‌باشد).



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد مورد بررسی توسط آغازگر OPC05 (شماره‌ها در شکل براساس جدول ۲ می‌باشد).

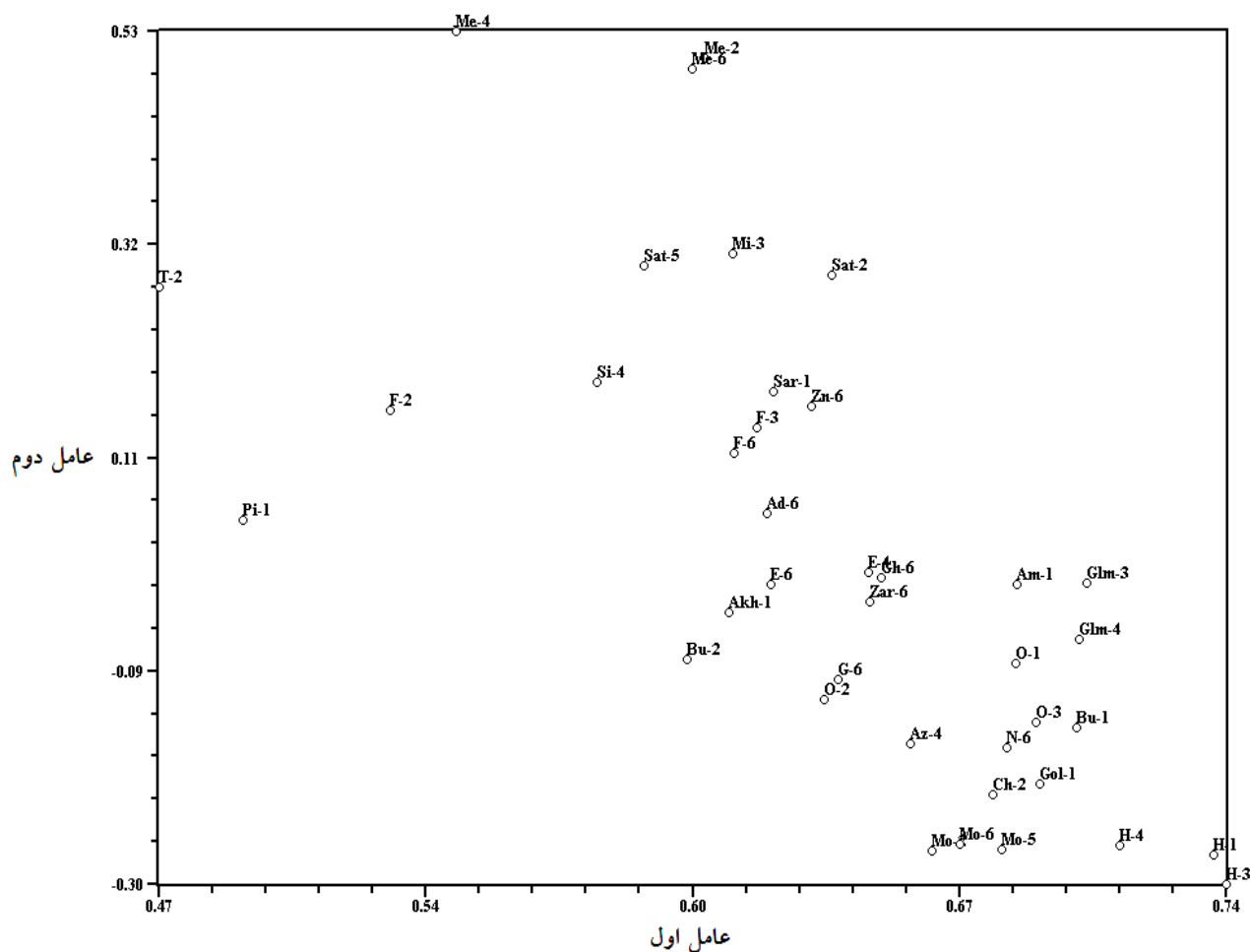


شکل ۳- دندروگرام مربوط به گروه بندی ۳۹ ژنوتیپ بومادران زرد با استفاده از داده های RAPD. ماتریس تشابه جاکارد و روش UPGMA (علائم اختصاری در شکل براساس جدول ۲ می باشد).

بحث

در تحقیق حاضر تنوع مولکولی ژنوتیپ های مختلف بومادران زرد ایران، جمع آوری شده از ۲۵ رویشگاه طبیعی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. درصد چندشکلی بالا (۸۷٪) و دامنه وسیع تشابه (۰/۹۵-۰/۲۴) بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ ها و جمعیت های این گیاه

در مناطق مورد مطالعه بود. در مطالعه ای که Morsy (2007) در کشور تونس بر روی پنج جمعیت *A. fragrantissima* از پنج منطقه در جنوب صحرای سینا با استفاده شش آغازگر RAPD انجام داد تعداد ۳۴ باند با میانگین ۶۵٪ چندشکلی و تشابه ژنتیکی ۰/۶۴-۰/۱۵ را بین ژنوتیپ های مورد بررسی گزارش نمود.



شکل ۴- الگوی دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های بومادران زرد مورد بررسی براساس دو عامل اصلی حاصل از داده‌های RAPD (علائم اختصاری در شکل براساس جدول ۲ می‌باشد).

که بیشترین و کمترین تنوع درون گونه‌ای به ترتیب داخل گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. santolina* وجود داشت. این نتایج همچنین نشان داد که گونه بومادران زرد *A. biebersteinii* در دندروگرام نسبت به سایر گونه‌ها در موقعیت کاملاً جداگانه‌ای قرار داشت.

نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز به خوبی تنوع بالای میان جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نشان داد. همچنین از آنجایی که نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه، توده‌های خودرو و بومی مناطق

همچنین این نتایج با یافته‌های Rahimmalek و همکاران (۲۰۰۹) نیز قابل مقایسه است. در این بررسی تنوع ژنتیکی بین و داخل ۵ گونه بومادران *A. millefolium*، *A. santolina*، *A. tenuifolia*، *A. filipendulina* و *A. biebersteinii* جمع‌آوری شده از ۵۷ توده با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. آنها توانستند با استفاده از ۹ آغازگر AFLP، ۳۱۳ باند با میانگین ۹۶/۱٪ چندشکلی را در بین پنج گونه بومادران مورد بررسی بدست آورند. نتایج تجزیه خوشه‌ای این مطالعه نشان داد

نمود. این تکنیک برای بررسی تنوع در بسیاری از گیاهان استفاده شده است و تمامی این مطالعات نشان داده‌اند که نشانگرهای RAPD، ابزاری مناسب و سریع برای بررسی روابط خویشاوندی و تجزیه ژنوم گیاهان هستند، هرچند به‌منظور غلبه بر مشکل تکرارپذیری کم، شرایط PCR باید کاملاً کنترل شده باشد (Naghavi et al., 2005). البته شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم‌پلاسم بومادران زرد ایران و همچنین در تدوین برنامه‌های اصلاحی آینده برای این گیاه به‌منظور دستیابی به گیاهان مورد نیاز با اهداف صنایع مرتبط مفید خواهد بود. به‌طوری‌که با بهره‌گیری از نتایج مولکولی و ارزیابی تنوع مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب برای توسعه و بهره‌گیری از آن وجود خواهد داشت.

منابع مورد استفاده

- Anolles, G.C. and Gresshoff, P.M., 1998. DNA Marker Protocols, Applications and Overviews. Wiley-Liss., New York, USA, 364p.
- Bader, A., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I., 2003. Essential oil composition of *Achillea santolina* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. collected in Jordan. Flavour and Fragrance Journal, 18: 36-38.
- Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilic, H., Ozkan, H., Sokmen, M. and Ozbek, T., 2006. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). Turkish Journal of Biology, 30(2): 65-73.
- Boonparkob, U., 1996. RAPD Polymorphism in Diploid Plums: Genetic Relationships and Genetic Linkage Maps. Texas A and M University, 256p.
- Chevallier, A., 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Publishing Inc, London, 336p.

جمع‌آوری شده بوده است، 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 یا گروه‌های نزدیک به هم قرار داشتند.

با توجه به توضیحاتی که در بالا به آن اشاره شد، براساس نتایج بدست‌آمده از طبقه‌بندی توده‌ها و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه که حکایت از همبستگی نسبی بین ژنوتیپ‌های بومادران زرد 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 به نتیجه خواهد رسید.

در این مطالعه آزمون دی‌پلات نیز همانند تجزیه خوشه‌ای به خوبی جدا شدن ژنوتیپ‌هایی را که فاصله ژنتیکی بیشتری با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند، نشان داد. به عبارتی نتایج این آزمون نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود، به‌طوری‌که ژنوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار داشتند در تجزیه دی‌پلات نیز در کنار یکدیگر قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود همانند تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های پیرانشهر-۱ و تنگه‌گل-۲ کاملاً از سایر ژنوتیپ‌ها جدا شدند. پس از آن ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر و فیروزآباد-۲ بودند که از سایر ژنوتیپ‌ها فاصله بیشتری گرفته بودند و در مکان جداگانه‌ای قرار داشتند.

در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تکنیک RAPD می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و توده‌های بومی بومادران زرد را نسبت به یکدیگر مشخص

- Prevost, A. and Wilkinson, M.J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
- Rahimmalek, M., Sayed Tabatabaei, B.E., Arzani, A. and Etemadi, N., 2009. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4): 354-361.
- Rechinger, K.H., 1963. *Flora Iranica* (No. 158). Akademische Druke-U, Verlagsanstalt Wien Austria, 234p.
- Sharp, P.J., Kreis, M., Shewry, P.R., and Gale, M.D., 1988. Location of β amylase sequences in wheat and its relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2): 289-290.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S., 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advance in Agronomy*, 47: 85-140.
- Talebi Kohyakh, E., Mohammad Aliha, M. and Naghavi, M.R., 2008. Genetic diversity in *Ferula gummosa* Boiss. populations of Iran using RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23(4): 514-522.
- Vieria, R.F., Grayer, R.J., Paton, A. and Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3): 287-304.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.E., Livak, K.J., Rafaiski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18(22): 6531-6536.
- Evans, W.C., Trease, G.E. and Evans, D., 2002. *Trease and Evans Pharmacognosy*. W.B. Saunders, London, 585p.
- Hadian, J., Tabatabaei, S.M.F., Naghavi, M.R., Jamzad, Z. and Ramak-Masoumi, T., 2008. Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 115(2): 196-202.
- Iran Pharmacopoeia., 2006. Pub. The Ministry of Health and Medical Education, Drug Administration. Tehran, Iran, 703p.
- Kupeli Akkol, E., Koca, U., Pesin, I. and Yilmazer, D., 2009. Evaluation of the Wound Healing Potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by *in vivo* Excision and Incision Models. *eCAM Advance Access Published*, 39: 1-7.
- Maali Amiri, R., Yazdi-Samadi, B., Ghanadha, M.R. and Abd-Misiiani, C., 2001. Detection of DNA Polymorphism in Land race Populations of Safflower in Iran Using RAJPD-PCR Technique. *Iranian Journal of Agriculture science*, 32(4): 737-745.
- Morsy, A.A., 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.
- Nadir, M.T., Hatam, N.A.R., Abdoul-Khaaliq, N. and Yousif, N.J., 1991. The constituents of *Achillea conferta*: phytochemical and antimicrobial studies. *International Journal of Pharmacognosy*, 29(2): 89-93.
- Naghavi, M., Ghareyazie, B., Hosseini Salekdeh, Gh., 2005. *Molecular Markers*. Tehran University Press. Tehran, Iran, P. 320.
- Omidbeigi, R., 2009. *Production and Processing of Medicinal Plants II*, (5. press), Pub. Behnashr, Iran, 438p.

Investigation of genetic diversity in populations of *Achillea biebersteinii* Afan. from Iran using RAPD molecular markers

S.F. Mirahmadi¹, M.R. Hassandokht^{2*}, F. Sefidkon³ and M.E. Hassani⁴

1- University of Velayat, Iranshahr, Sistan & Balouchestan, I.R.Iran

2* - Corresponding author, Assoc. prof., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran, E-mail: mrhassan@ut.ac.ir

3- Prof., Medicinal Plants Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran

4- Assis. Prof., Australian Technology Park, Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources, University of Sydney, Australia

Received: 02.04.2011

Accepted: 02.13.2012

Abstract

Genetic diversity of 39 genotypes from 25 populations of *Achillea biebersteinii* Afan., collected from different parts of Iran, were evaluated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) data. From a total of 18 primers used, 322 recognizable RAPD bands were detected of which 279 were polymorphic (86.6%). The average number of bands per primer was 17.9. Total resolving power was 147 with the mean of 8.17. Among the primers, maximum resolving power was recorded for the primer BA03 (16.67). Jaccard's similarity index was used for measuring genetic similarities among the genotypes. The highest similarity (0.95) was found between Mohammad Shahr-2 and Mohammad Shar-5 genotypes, whereas the lowest was observed between Meshkin Shahr-2 and Piran Shahr-1, and also Meshkin Shahr-6 and Piran Shahr-1 (0.24). UPGMA algorithm was used for cluster analysis. Cluster analysis separated the 39 genotypes into 15 main groups. The obtained clusters based on RAPD markers to some extent matched with the geographical origin of the studied populations of *A. biebersteinii*. Genotypes of Piran Shahr-1 and Tangehgol-2 showed the highest difference to the other genotypes and classified in separate groups, and maximum similarity was observed among the genotypes of Mohammad Shahr population with over 0.90 similarity. Results showed a high level of genetic diversity among the investigated genotypes. The results also indicated that RAPD technique was a suitable approach for assessing genetic diversity and germplasm management in populations of the species.

Key words: *Achillea biebersteinii* Afan., cluster analysis, genetic diversity, RAPD.