

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بابونه آلمانی کشت‌شده در ایران با استفاده از نشانگر SCoT

لیلی طحانی^۱، مهرآنا کوهی دهکردی^{۲*} و حمید دهقان‌زاده^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

۲- استادیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۵)

چکیده

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) گیاهی علفی و یکساله از تیره کاسنی است. بابونه از دیرباز عمدتاً به‌منظور استفاده از اسانس و عصاره آن در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، عطرسازی و چاشنی‌های غذایی به‌عنوان ستاره‌ای در میان گیاهان دارویی مطرح بوده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در نه جمعیت بابونه آلمانی با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT انجام شد. ده آغازگر SCoT استفاده شده در این تحقیق، نوارهای چندشکل با الگوی نواری واضح ایجاد کردند. در مجموع ۱۴۱ نوار ایجاد شد که ۱۴۰ نوار (۹۶/۵ درصد) چندشکلی نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هماهنگ‌شده توانست نمونه‌های جمعیتی بابونه را به چهار گروه تقسیم نماید. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی میزان تنوع بیشتری بین جمعیت‌ها (۵۵ درصد) نسبت به درون جمعیت‌ها مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد نشانگر مولکولی SCoT در تعیین میزان تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی نمونه‌های جمعیتی مورد مطالعه بابونه از کارایی بالایی برخوردار است.

واژگان کلیدی: قرابت ژنتیکی، چندشکلی، نشانگر مولکولی، تجزیه خوشه‌ای

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: m.kouhi@pnu.ac.ir

مقدمه

ایران دارای ذخایر با ارزش ژنتیکی گیاهان دارویی می‌باشد ولی طی چند دهه اخیر عمده‌ی مطالعات در زمینه حفظ و بهره‌برداری از ژرم‌پلاس‌م گیاهان زراعی و باغی بوده و توجه اندکی به گیاهان دارویی و زینتی شده است. برنامه‌های به‌نژادی از طریق تهیه و معرفی ارقام، نژادها و ژنوتیپ‌های جدید و اصلاح‌شده، در بهبود و افزایش کمی و کیفی محصولات کشاورزی پیشرفت‌های قابل‌ملاحظه‌ای داشته است (Solouki et al., 2008). شناخت الگوی تنوع ژنتیکی گونه‌ها و زیرگونه‌ها می‌تواند گام مهمی در جلوگیری از انقراض گونه‌ها، جلوگیری از رانده‌شدن ژنتیکی و توسعه کلکسیون‌های ذخایر ژنتیکی باشد. همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه در برنامه‌های به‌نژادی آتی آن حائز اهمیت است (Darvishian et al., 2016; Rahimmalek, 2007).

بابونه آلمانی (*Maticaria chamomilla*) گیاهی است علفی، یکساله از تیره کاسنی و بومی منطقه مدیترانه که منشاء آن را آسیای صغیر گزارش کرده‌اند (Omidbaigi, 2005). امروزه پراکندگی وسیعی از بابونه در اروپا، آسیای صغیر، آفریقای شمالی، آمریکای شمالی و جنوبی و استرالیا گزارش شده است (Tahir et al., 2002). در حال حاضر تولید عمده آن مربوط به کشورهای مجارستان، روسیه، آرژانتین، آلمان، چک، اسلواکی، فنلاند، مصر و هند می‌باشد. در ایران نیز گونه‌های مختلف سرده بابونه اروپایی (*Matricaria*) در نقاط مختلف کشور رشد می‌کند ولی این گیاه در کشور، عمدتاً در اصفهان، کهکیلویه و بویراحمد، گلستان و همدان زیر کشت رفته است. بابونه از جمله گیاهانی است که امروزه کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارویی، غذایی و زینتی دارد. بابونه خواص دارویی زیادی دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به اثرات آرام‌بخش، ضداسپاسم، تحریک‌کننده گلبول‌های سفید خون، تقویت سیستم‌دفاعی بدن و ضدحساسیت اشاره نمود (Golparvar, 2011).

در دهه‌های اخیر در کشورهای مطرح در زمینه تولید گیاهان دارویی از جمله بابونه، تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و ترکیبات اسانس ترکیبات اسانس مورد بررسی قرار گرفته است و توده‌های برتر نسبت به ارقام اصلاح‌شده شناسایی شده‌اند (Singh et al., 2011). در تحقیق حاضر از نشانگر مولکولی چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (SCoT)، به‌منظور مطالعه قرابت ژنتیکی ۹ جمعیت بابونه آلمانی کشت‌شده در ایران استفاده شد. این نشانگر مولکولی، از جمله نشانگرهای غالب و تکرارپذیر است که بر اساس مناطق کوتاه حفاظت‌شده اطراف رمز کدون آغاز ATG ژن گیاهی طراحی شده است (Collard and Mackill, 2009). در این روش تنها از یک آغازگر به‌عنوان آغازگر پیشرو و پس‌رو استفاده می‌شود. از آن‌جایی‌که نواحی طرفین کدون ATG، در همه‌ی گونه‌های گیاهی بسیار حفاظت‌شده است، بنابراین، این نواحی در طراحی نشانگرها در گونه‌های مختلف گیاهی می‌توانند مفید باشند (Gorji et al., 2011). تاکنون گزارش‌های متعددی از کارایی مناسب نشانگر SCoT ارائه شده است که از آن جمله می‌توان به تحقیق ابراهیمیان و همکاران (Ebrahimiyan et al., 2015) در مطالعه تنوع ژنتیکی زیره سبز اشاره نمود. از ده نشانگر SCoT مورد استفاده، ۴۸ باند تکثیر شد که به میزان ۶۲/۳ درصد چندشکلی نشان دادند. در تحقیق دیگری به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی، شهلائی و همکاران (Shahlaei et al., 2014) از ده نشانگر SCoT و ده نشانگر ISSR استفاده نمودند. نشانگر SCoT ۳۶/۱۴ درصد و نشانگر ISSR ۲۳/۱۴ درصد چندشکلی نشان داد و گزارش شد نشانگر SCoT نسبت به نشانگر ISSR، برای شناسایی و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی مفیدتر بوده و اطلاعات دقیق‌تر و بهتری ارائه می‌دهد. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و حفاظت جمعیت‌های مختلف گونه‌های پسته وحشی، سرخه و همکاران (Sorkheh et al., 2016) از نشانگرهای SCoT و RAPD استفاده کردند و گزارش نمودند نشانگر SCoT با

پاکان‌بذر اصفهان تهیه شدند. گیاهان مورد نظر در گلخانه دانشگاه پیام‌نور اصفهان کشت شدند. از هر نمونه جمعیتی، چهار گیاه برای نمونه‌برداری انتخاب شد. نمونه‌برداری به‌منظور استخراج DNA از برگ‌های سبز، تازه و جوان هر گیاه به‌صورت جداگانه انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی داخل فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع قرار داده شدند تا کاملاً منجمد گردند و برای استفاده در دفعات بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

استخراج DNA و بررسی‌های مولکولی: به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های بابونه، روش CTAB (Murray and Thomson, 1980) مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از الکتروفورز نمونه‌های مورد نظر بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. در این پژوهش ۱۰ آغازگر SCoT بر اساس آغازگرهای گزارش شده در تحقیقات مشابه با بیشترین میزان چندشکلی (۱۰۰ درصد چندشکلی) انتخاب و برای ساخت به شرکت سیناژن ارسال شد (جدول ۲).

میانگین PIC بیشتر، اطلاعات بیشتری به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی انواع گونه‌های پسته در اختیار قرار داده است. در تحقیق رفیع‌زاده قرابت ژنتیکی هشت نمونه جمعیتی خارمریم با استفاده از ۳۶ نشانگر SCoT مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۲۵۵ باند قابل‌تشخیص به‌دست آمد که ۲۲۷ باند چندشکل (۹۸ درصد) بود (Rafizadeh, 2016).

تحقیق حاضر با هدف بررسی ارتباط فیلوژنتیکی موجود بین نه نمونه جمعیتی بابونه آلمانی کشت‌شده در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و ارزیابی کارایی این نشانگر در مطالعه قرابت ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی، انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به‌منظور اهداف اصلاحی این گیاه دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در مطالعه حاضر، نه نمونه جمعیتی بابونه آلمانی کشت‌شده در ایران مورد استفاده قرار گرفت. این بذور که از نقاط مختلف کشور شامل کرمانشاه، اراک، خرامه، آباده، دزفول، نایین، کلک‌گچساران، شیراز و اصفهان جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱)، از شرکت

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و محل جمع‌آوری جمعیت‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 1. Geographical properties and location of populations used in the present study

ردیف No.	نام جمعیت Population name	کد Code	محل نمونه‌برداری Location	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع (متر) Height (m)
1	آباده (Abadeh)	E	آباده (Abadeh)	52° 38' 54.098"	31° 9' 44.937"	2008
2	کرمانشاه (Kermanshah)	B	کرمانشاه (Kermanshah)	47° 4' 26.788"	34° 19' 25.172"	1351
3	اراک (Arak)	C	میقان (Meighan)	49° 45' 6.764"	34° 12' 12.695"	1665
4	شیراز (Shiraz)	D	خرامه (Kharameh)	53° 18' 58.049"	29° 29' 49.370"	1593
5	دزفول (Dezful)	F	خانومی (Khanoomi)	48° 24' 41.193"	32° 23' 14.668"	142
6	نایین (Naein)	G	انارک (Anarak)	53° 41' 39.625"	33° 18' 16.099"	1449
7	گچساران (Gachsaran)	H	کلک (Kalak)	50° 48' 21.516"	30° 21' 4.723"	722
8	شیراز (Shiraz)	M	پاسارگاد (Pasargad)	53° 10' 50.211"	30° 11' 19.080"	1853
9	اصفهان (Isfahan)	N	فساران (Fesaran)	51° 59' 54.553"	32° 33' 43.040"	1523

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای SCoT مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی بابونه

Table 2. SCoT primers used for Chamomile genetic variation study

نام آغازگر Primer	توالی نوکلئوتیدی آغازگر (5'-3' Sequence)	دمای ذوب TM (°C)	درصد GC GC %	منبع مورد استفاده Reference
SCoT1	ACGACATGGCGACCAACG	58.4	61	Zarei <i>et al.</i> , 2013
SCoT2	AACCATGGCTACCACCAC	56.3	55	Amirmoradi <i>et al.</i> , 2012
SCoT3	ACGACATGGCGACCATCG	58.4	61	Pakseresht <i>et al.</i> , 2013
SCoT4	CACCATGGCTACCACCAG	58.4	61	Zhang <i>et al.</i> , 2015
SCoT5	ACAATGGCTACCACTGAC	53.8	50	Jiang <i>et al.</i> , 2014
SCoT6	ACAATGGCTACCACCATC	53.1	50	Jiang <i>et al.</i> , 2014
SCoT7	ACCATGGCTACCACGGCA	58.4	61	Jiang <i>et al.</i> , 2014
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGC	56.3	55	Que <i>et al.</i> , 2014
SCoT9	ACCATGGCTACCACCGAG	58.4	61	Que <i>et al.</i> , 2014
SCoT10	AACCATGGCTACCACGC	58.4	61	Que <i>et al.</i> , 2014

محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار (V6.3) GenAlex و رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (V2.02) (Rohlf, 1998) انجام شد.

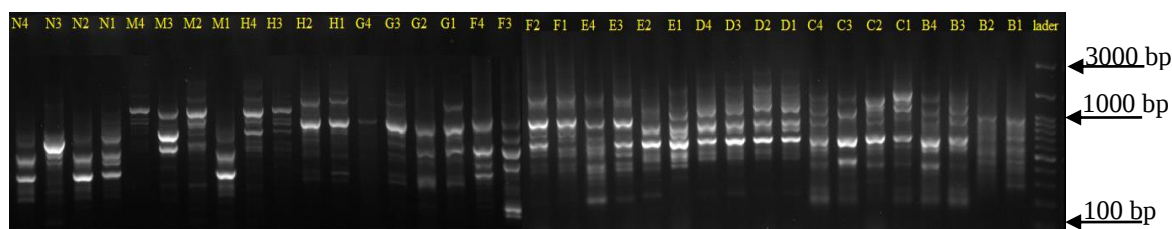
نتایج و بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از مجموع ده آغازگر مورد استفاده در نهایت ۱۴۱ نوار چندشکل در نه جمعیت بابونه مورد بررسی، حاصل شد. بیشترین تعداد نوار چندشکل در نشانگرهای SCoT2، SCoT10 و SCoT4 با ۱۶ نوار چندشکل و کم‌ترین تعداد نوار چندشکل، ۱۱ نوار، در نشانگر SCoT9 مشاهده شد. میانگین تعداد قطعات در هر آغازگر ۱۴/۱ بود و قطعات تکثیر شده در محدوده ۱۸۰-۳۰۰۰ جفت‌باز قرار گرفتند (شکل ۱). از مجموع ده آغازگر مورد استفاده، نه آغازگر چندشکلی ۱۰۰ درصد نشان داد (جدول ۳). نظر به این‌که آغازگرهای انتخاب شده بر اساس بیشترین چندشکلی (۱۰۰ درصد) از نتایج پژوهش‌های انجام شده در نیشکر (Que *et al.*, 2014)، ارکیده (Jiang *et al.*, 2014)، یولاف وحشی (Zarei *et al.*, 2013)، نخود (Pakseresht *et al.*, 2013) و Elymus (Zhang *et al.*, 2015) انتخاب شده بودند، میزان چندشکلی مشاهده شده در این تحقیق با نتایج گزارش شده در پژوهش‌های مذکور مشابهت نشان داد.

واکنش PCR (Polymerase chain reaction) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر مسترمیکس (مستمیکس رد، کمپانی Ampliqon، دانمارک)، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت حدود ۵۰ نانوگرم و ۱ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (مدل MyCycler، کمپانی Biorad، آمریکا) و چرخه حرارتی با شرایط: واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C؛ ۳۵ سیکل در دماهای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۰°C (یا متناسب با دمای اتصال آغازگر مورد نظر) برای ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲°C برای ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۲ درصد TBE با ولتاژ ۸۰ ولت، به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه انجام و با استفاده از دستگاه ژل‌داک (مدل Universal Hood II، کمپانی Bio Rad، آمریکا) عکس‌برداری شد. اطلاعات الگوی حاصل از نوارهای به‌دست آمده در طی الکتروفورز در قالب ماتریسی از صفر و یک تنظیم گردید. جهت رسم دندروگرام، آزمون متل برای ضرایب تشابه SM (Simple Matching)، Jacard و Dice انجام شد. در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I: Shanon's Information Index) برای هر یک از جمعیت‌ها توسط نرم‌افزار GenAlex (V6.3)

نشان داد و بعد از آن به ترتیب جمعیت دزفول (F) با ۳۵ نوار و میانگین ۲۴/۸۲ درصد، جمعیت کلک‌گچساران (H) با ۳۴ نوار و میانگین ۲۴/۱۱ درصد، جمعیت‌های اراک (C) و خرامه (D) با ۳۲ نوار چندشکل و میانگین ۲۲/۷۰ درصد، جمعیت نایین (G) با ۳۱ نوار و میانگین ۲۱/۹۹ درصد، جمعیت شیراز (M) با ۳۰ نوار چندشکل و میانگین ۲۱/۲۸ درصد، جمعیت اصفهان (N) با ۲۷ نوار و میانگین ۱۹/۱۵ درصد و کرمانشاه (B) با ۲۶ نوار و میانگین ۱۸/۴۴ درصد در مرتبه بعدی قرار گرفتند. دامنه نوارهای ایجاد شده بین ۱۸۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز بود (شکل ۱) که بیشترین اندازه نوارها مربوط به SCOT6، SCOT9 و SCOT3 با ۳۰۰۰bp و کمترین اندازه نوار مربوط به SCOT4 با ۱۸۰bp بود (جدول ۳).

میانگین درصد نوارهای چندشکل در تحقیق حاضر ۹۶/۵ درصد به‌دست آمد که با نتایج پژوهش‌های دیگری که با استفاده از نشانگرهای متفاوت به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های بابونه انجام شده بود، قابل مقایسه و از درصد بالایی برخوردار است. به‌عنوان نمونه در پژوهش‌های انجام شده در بابونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR (Ahmadi, 2013)، AFLP (Solouki et al., 2011) و RAPD (Ramezanpour, 2011)، به‌ترتیب میزان چندشکلی ۹۲/۷۸ درصد، ۸۰/۰۸ درصد و ۸۵ درصد گزارش شده است که می‌تواند متأثر از نحوه تولیدمثل گیاه و محیط باشد. بنابراین می‌توان اظهار داشت نشانگر SCOT از کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بابونه برخوردار بوده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، جمعیت آباده (E) با ۵۲ نوار چندشکل و میانگین ۳۶/۶۶ درصد، بیشترین تعداد نوار را



شکل ۱- الگوی نوارهای تکثیرشده با استفاده از آغازگر SCOT9 در ۳۶ گیاه مورد مطالعه *M. chamomilla*

Figure 1. Banding pattern of SCOT 9 marker in 36 studied plant of *M. chamomilla*

جدول ۳- چندشکلی ژنتیکی مشاهده شده در جمعیت‌های بابونه آلمانی مورد مطالعه با استفاده از ۱۰ آغازگر SCOT

Table 3. Genetic polymorphism generated by 10 SCOT markers in studied populations of German chamomile

نام	تعداد کل	تعداد نوار	درصد نوار	محتوای	شاخص
آغازگرها	نوارها	چندشکل	چندشکل	اطلاعات چندشکلی	نشانگر
Primer name	Total number of bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphic band	Polymorphic information content	Marker index
SCOT1	15	14	93	0.45	5.85
SCOT2	16	16	100	0.41	5.74
SCOT3	14	14	100	0.34	4.76
SCOT4	16	16	100	0.32	5.12
SCOT5	14	14	100	0.36	5.04
SCOT6	12	12	100	0.39	4.56
SCOT7	14	14	100	0.30	4.20
SCOT8	13	13	100	0.41	5.33
SCOT9	11	11	100	0.46	5.06
SCOT10	16	16	100	0.32	5.12
کل (Total)	141	140	-	3.7	50.7
میانگین (Average)	14.1	14	96.5	0.37	5.07

در این پژوهش مقدار PIC بین ۰/۳۰ و ۰/۴۶ و به‌طور میانگین مقدار PIC برابر با ۰/۳۷ بود. نشانگر SCoT9 بالاترین مقدار PIC (۰/۴۶) را دارا بود. مقادیر اطلاعات چندشکل (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هرچه اعداد به‌دست آمده بزرگتر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد (Zirak et al., 2018). شاخص نشانگر (MI) در SCoT1 با ۵/۸۵ دارای بیشترین مقدار بود و نشان‌دهنده قدرت تفکیک بسیار خوب این آغازگر است. بنابراین نشانگر SCoT1 به‌عنوان آغازگری با بهترین عملکرد در بین آغازگرهای مورد استفاده معرفی می‌شود و می‌توان آن را به‌عنوان نشانگری مناسب در مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بابونه پیشنهاد نمود. این نتیجه با گزارش رفیع‌زاده (Rafizadeh, 2016) بر روی هشت نمونه جمعیتی خارمریم با استفاده از این نشانگر مطابقت نشان می‌دهد، به‌طوری‌که این آغازگر در تحقیق مذکور نیز بالاترین عملکرد را نشان داد. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد (Thimmappaiah et al., 2009).

جهت رسم دندروگرام، داده‌ها به نرم‌افزار NTSYS منتقل شد. قبل از انجام تجزیه خوشه‌ای، از آزمون متل جهت انتخاب بهترین ضریب تشابه برای رسم نمودار استفاده شد. ضرایب همبستگی برای جاکارد ۰/۹۱، دایس ۰/۸۷۵۸ و SM ۰/۸۷۵ به‌دست آمد، بنابراین ضریب جاکارد به‌عنوان بهترین ضریب تشابه انتخاب شد. محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۹۱) در داده‌های حاصل از نشانگر SCoT نشان داد استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA بهترین روش برای ترسیم نمودار خوشه‌ای می‌باشد. این ضریب نشان می‌دهد که الگوریتم UPGMA به‌خوبی می‌تواند ماتریس تشابه محاسبه شده به روش جاکارد را به دندروگرام تبدیل کند. براساس

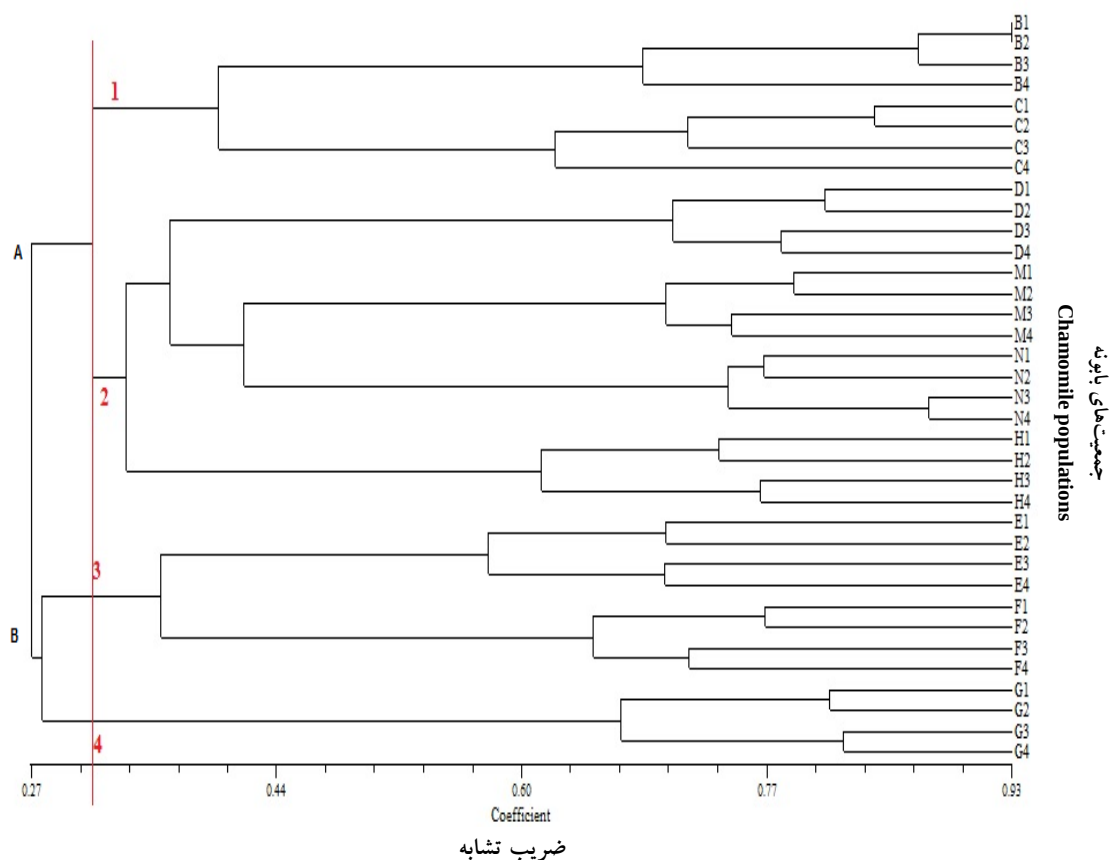
خوشه‌بندی انجام شده چهار گروه با سطح تشابه ۳۱ درصد حاصل شد (شکل ۲).

بر اساس گروه‌بندی انجام شده، گروه یک شامل ۲ خوشه بود که در خوشه یک، تکرارهای (B1-B4) و (C1-C4) از جمعیت کرمانشاه و اراک قرار داشتند؛ تکرارهای B1 و B2 کاملاً از نظر ژنتیکی شبیه هستند و در کنار هم قرار گرفتند. گروه دو نیز شامل دو خوشه بود که تکرارهای (H1-H4)، (N1-N4)، (M1-M4) و (D1-D4) داخل آن قرار گرفته است و متعلق به جمعیت‌های شیراز، اصفهان، کلک‌گچساران و خرامه می‌باشند. تکرارهای (H) از جمعیت گچساران در فاصله کمی دورتر از این گروه قرار گرفته است که از لحاظ جغرافیایی نیز مورد تأیید است و این فاصله نشان‌دهنده این است که این جمعیت در حال جدایی از این خوشه است. در گروه سوم تکرارهای (F1-F4) و (E1-E4) که مربوط به جمعیت شهرهای دزفول و آباده هستند و خوشه چهارم جمعیت نایین (G) را شامل شد (شکل ۲).

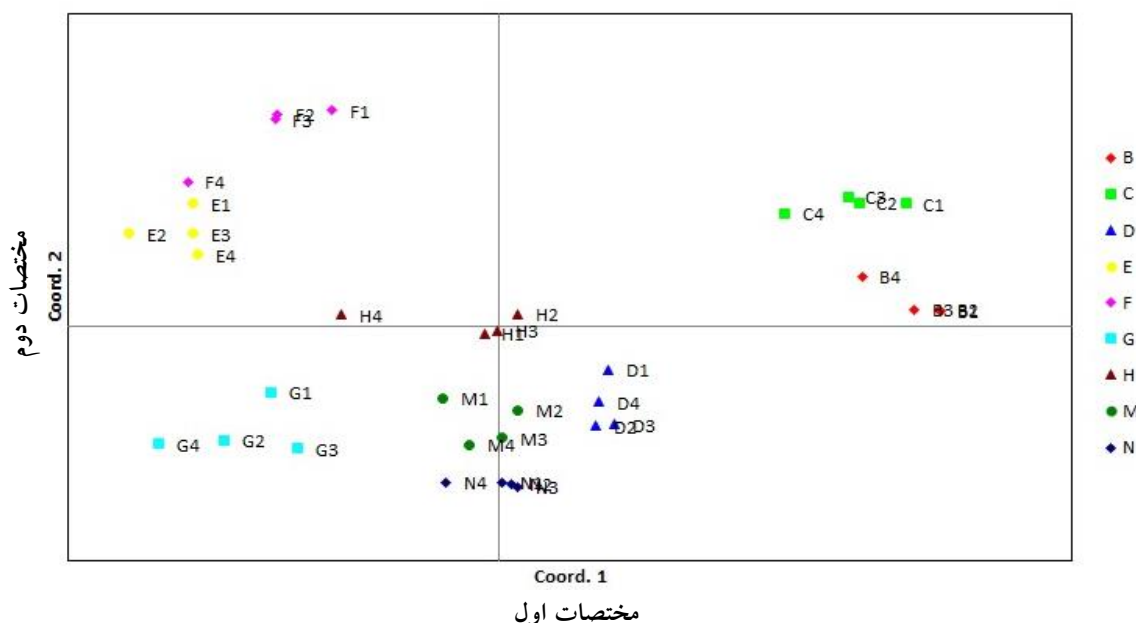
عدم تطابق کامل گروه‌بندی مولکولی و جغرافیایی این جمعیت‌ها نشان دهنده این است که آن‌ها احتمالاً منشاء ژنتیکی یکسانی داشته اما انتقال بذر گیاه توسط افراد از منطقه‌ای به منطقه دیگر می‌تواند سبب مبادله ژرم‌پلاسم شده باشد. هم‌چنین نظر به این‌که تنوع موجود در ارقام تحت تأثیر گزینش طبیعی، گزینش مصنوعی و جهش قرار می‌گیرد، لذا تفکیک ایجاد شده با استفاده از نشانگرهای مورد استفاده به‌طور کامل با مشخصات جغرافیایی ارقام مطابقت نشان نمی‌دهد (Shuorvazdi et al., 2014). در تحقیق احمدی (Ahmadi, 2013) بر روی بابونه آلمانی بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، پنج گروه مجزا به‌دست آمد که تنوع ژنتیکی توده‌های جمع‌آوری‌شده از توزیع جغرافیایی تبعیت نکرد به‌طوری‌که هیچ ارتباطی بین محل جمع‌آوری‌شده و فاصله ژنتیکی بین توده‌های بومی مشاهده نشد و فاصله ژنتیکی بسیاری با هم داشتند. در تحقیق شجاعی‌فر (Shojaifar, 2011) بر روی رازیانه نیز دندروگرام خوشه‌ای متعلق به نمونه‌های اصفهان و کاشان

نیاز است (Ebrahimi *et al.*, 2015). در این مطالعه نیز توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط چند مؤلفه اولیه دلیل بر توزیع نسبتاً مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می‌باشد و با توجه به اینکه نشانگر SCoT ماهیتاً مناطق کدشونده ژنوم را مورد هدف قرار می‌دهد که به‌طور متوازن در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند و در یک قسمت ژنوم پراکنده نشده‌اند، این نتیجه دور از انتظار نیست. نتایج این آزمون، نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود و جمعیت‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفتند، در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هماهنگ شده هم در کنار هم قرار گرفتند (شکل ۳).

در دو گروه مجزا قرار گرفتند و گزارش شد اگرچه از لحاظ جغرافیایی این دو شهر در کنار هم هستند ولی از لحاظ مولکولی در دو کلاس جداگانه قرار گرفته‌اند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هماهنگ شده (PCoA)، سه مؤلفه اول ۵۷/۸۶ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. در بررسی داده‌های حاصل از نشانگرهای ملکولی، توجیه بخش نسبتاً کمتری از تغییرات توسط چند مؤلفه‌ی اولیه، حاکی از توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده روی ژنوم می‌باشد (Sepahvand *et al.*, 2015). پس اگر نشانگرها از قسمت‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد پیوستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها مورد



شکل ۲- گروه‌بندی جمعیت‌های بابونه آلمانی بر اساس ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA
Figure 2. UPGMA dendrogram showing relationship of chamomile populations based on Jaccard's similarity coefficient.



شکل ۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی هماهنگ‌شده (PCoA) بر اساس فراوانی داده‌های نشانگر SCoT در گیاهان بابونه آلمانی

Figure 3. Principle coordinate analysis based on SCoT marker data in *M. chamomilla*

B: کرمانشاه؛ C: اراک؛ D: خرامه؛ E: آباده؛ F: دزفول؛ G: ناین؛ H: کلک‌گچساران؛ M: شیراز؛ N: اصفهان

B: Kermanshah; C: Arak; D: Kharamah; E: Abadeh; F: Dezful; G: Naein; H: Kalak Gachsaran; M: Shiraz; N: Isfahan

۱/۲۴۸۱ آلل بیشترین و در جمعیت ناین (G) با مقدار ۱/۱۳۸۲ کمترین بود. میزان تنوع در جمعیت آباده (E) بر اساس شاخص شانون و شاخص نی (برابر با $He = 0.4118$ و $I = 0.2091$) بیش از سایر جمعیت‌ها بود. این جمعیت دارای تنوع‌پذیری و همچنین میزان پراکندگی بالاتری نسبت به سایر جمعیت‌ها است و جمعیت اصفهان (N) از کمترین تنوع‌پذیری و پایین‌ترین میزان پراکندگی برخوردار بود (جدول ۵).

در ارزیابی ماتریس فاصله نه جمعیت از بابونه آلمانی بیشترین شباهت با فاصله ۰/۷۳۶ بین جمعیت‌های شیراز (M) و کلک‌گچساران (H) دیده شد و جمعیت‌های اراک (C) و اصفهان (N) با میزان فاصله ۱/۸۰۱ بیشترین تفاوت را در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان دادند (جدول ۶). البته بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت، با پیچیدگی همراه است (Belokurova, 2010).

جمعیت‌های بابونه برای مطالعه دقیق‌تر با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحلیل نشان داد سهم تنوع بین جمعیت‌ها (۵۵ درصد) از تنوع درون جمعیت‌ها (۴۵ درصد) بیشتر است که نشان‌دهنده یک جریان ژنی درون جمعیتی می‌باشد (جدول ۴). این نتایج با نتایج به دست آمده در تحقیق صالحی (Salehi et al., 2010) مشابهت نشان داد. در تحقیق مذکور نیز تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نتایج حاصل از کاربرد ۲۶ آغازگر (Intron-exon splice junction) ISJ در بابونه، تنوع بین جمعیتی بیش از تنوع درون جمعیتی گزارش شد.

بر اساس نتایج بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در جمعیت آباده (E) با ۱/۳۶۸۸ آلل و کمترین مقدار آن در جمعیت کرمانشاه (B) با ۱/۱۸۴۴ آلل بود. آلل‌های مؤثر (Ne) یعنی آلل‌هایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع خوبی می‌باشند، در جمعیت آباده (E) با

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های حاصل از نشانگر SCoT

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) using SCoT markers data

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of square	واریانس (%) Variance (%)
بین جمعیتی Between accession	8	711.028	55
درون جمعیتی Within accession	27	406.750	45
کل Total	35	1117.778	

جدول ۵- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در نه جمعیت بابونه آلمانی مورد مطالعه

Table 5. Genetic diversity indices in nine *M. chamomilla* populations

جمعیت‌ها Populations	B	C	D	E	F	G	H	M	N	میانگین Mean
Na	1.1844	1.2270	1.2270	1.3688	1.2482	1.2199	1.2411	1.2128	1.1915	1.2356
Ne	1.1478	1.1421	1.1797	1.2481	1.1696	1.1382	1.1651	1.1545	0.3234	1.0764
I	0.1130	0.1334	0.1398	0.2091	0.1421	0.1212	0.1385	0.1256	0.1018	0.1358
He	0.0788	0.0913	0.0973	0.1418	0.0699	0.0813	0.0943	0.0862	0.0677	0.0897

Na: تعداد آلل‌های متفاوت؛ Ne: تعداد آلل‌های موثر؛ I: شاخص اطلاعات شانون؛ He: تنوع ژنی

Na: Number of different alleles; Ne: Number of effective alleles; I: Shannon's information index; He: Ne's genetic diversity

B: کرمانشاه؛ C: اراک؛ D: خرامه؛ E: آباده؛ F: دزفول؛ G: ناین؛ H: کلک‌گچساران؛ M: شیراز؛ N: اصفهان

B: Kermanshah; C: Arak; D: Kharameh; E: Abadeh; F: Dezful; G: Naein; H: Kalak Gachsaran; M: Shiraz; N: Isfahan

جدول ۶- فاصله ژنتیکی بین نه جمعیت بابونه آلمانی مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد

Table 6. Similarity matrix among 36 German chamomile populations based on Jaccard coefficient

فاصله ژنتیکی Genetic distance	B	C	D	E	F	G	H	M	N
B	0.000								
C	1.074	0.000							
D	1.484	1.507	0.000						
E	1.707	1.783	1.559	0.000					
F	1.547	1.464	1.489	0.913	0.000				
G	1.515	1.505	1.306	1.106	1.081	0.000			
H	1.288	1.219	1.208	1.060	1.038	1.092	0.000		
M	1.052	1.057	1.032	0.870	1.061	0.856	0.736	0.000	
N	1.323	1.801	1.357	1.400	1.490	1.097	1.060	0.745	0.000

B: کرمانشاه؛ C: اراک؛ D: خرامه؛ E: آباده؛ F: دزفول؛ G: ناین؛ H: کلک‌گچساران؛ M: شیراز؛ N: اصفهان

B: Kermanshah; C: Arak; D: Kharameh; E: Abadeh; F: Dezful; G: Naein; H: Kalak Gachsaran; M: Shiraz; N: Isfahan

نوار چندشکل و کمترین تعداد در SCoT9 با ۱۱ نوار مشاهده شد. بیشترین میزان تنوع بر اساس شاخص شانون و شاخص نی در جمعیت آباد (E) به دست آمد در حالی که جمعیت اصفهان (N) از کمترین تنوع و پایین‌ترین میزان پراکندگی برخوردار بود. با توجه به این که میزان چندشکلی در جمعیت‌های آباد (E) بیش از سایر جمعیت‌هاست (۵۴/۶۴ درصد) لذا ارزش ژرم پلاسما این جمعیت برای محافظت و یافتن آلل‌های مفید بیشتر است. هم‌چنین با توجه به این نکته که تنوع ژنتیکی و چندشکلی در ناحیه مرکز و جنوب غرب بیشتر است به احتمال زیاد این ناحیه از پتانسیل بیشتری برای داشتن آلل‌های مفید برخوردار می‌باشد.

استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محصولات فرعی مرتع، در کشور ایران دارای سابقه بسیار طولانی است و تعیین ویژگی‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی، اکولوژیکی و اکوفیزیولوژی این گیاهان به دو منظور بهره‌برداری پایدار و اقتصادی همراه با حفظ تنوع موجود در عرصه‌های طبیعی مراتع ایران بسیار حائز اهمیت است. نشانگر SCoT به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف‌های بازی DNA، دقت و تکرارپذیری بالای آن، به عنوان یکی از مؤثرترین نشانگرهای ملکولی در مطالعه ژرم پلاسماهای گیاهی معرفی شده است. لذا در تحقیق حاضر استفاده از ده آغازگر SCoT، در مجموع ۱۴۱ نوار چندشکل در نه جمعیت بابونه ایجاد نمود. بیشترین تعداد نوار چندشکل در SCoT2، SCoT4 و SCoT10 با ۱۶

References

- Ahmadi, H.** (2013). Genetic diversity of german chamomile (*Matricaria chamomilla*) using ISSR and morphological markers. M.Sc. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran (In Persian).
- Amirmoradi, B., Talebi, R. and Karami, E.** (2012). Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, **298**: 1679-1688 (In Persian).
- Belokurova, V.B.** (2010). Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review). *Cytology and Genetics*, **44**: 174-185.
- Collard, B.C. and Mackill, D.J.** (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27**(1): 86-93.
- Darvishian, A., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., MirDrikvand, R. and Hosseinpour, T.** (2016). Assessment of genetic diversity among wheat genotypes of west Iran, using randomized markers. *Plant Genetic Researches*, **2**(2): 47-56 (In Persian).
- Ebrahimiyan, M., Mortazavian, S.M., Ebrahimi, M. and Ramshini, H.** (2015). Assessment of molecular diversity in some ecotypes of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) by SCoT markers, 2nd International and 14th Iranian Genetics Congress, University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian).
- Golparvar, A.R.** (2011). Genetic improvement of essence percent and dry flower yield in German chamomile (*Matricaria chamomilla*) populations. *I International Symposium on Medicinal, Aromatic and Nutraceutical Plants from Mountainous Areas*, Saas-Fee, Switzerland.
- Gorji, A.M., Pocai, P., Polgar, Z. and Taller, J.** (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, **88**: 226-237.
- Jiang, L.F., Qi, X., Zhang, X.Q., Huang, L.K., Ma, X. and Xie, W.G.** (2014). Analysis of diversity and relationships among orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers. *Genetics and Molecular Research*, **13**(2): 4406-4418.
- Murray, M.G. and Thomson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, **8**: 4321-4325.
- Omidbaigi, R.** (2005). *Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants*. Tarahan Nashr Publication, Tehran, IR (In Persian).
- Pakseresht, F., Talebi, R. and Karami, E.** (2013). Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer*

- arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **19(4)**: 563-574 (In Persian).
- Que, Y., Pan, Y., Lu, Y., Yang, C., Yang, Y., Huang, N. and Xu, L. (2014). Genetic analysis of diversity within a Chinese local sugarcane germplasm based on start codon targeted polymorphism. *BioMed Research International*, **2014**: 468375.
- Rafizadeh, A. (2016). Evaluation of phylogenetic relationships, population structure and genetic diversity of *Silybum marianum* populations using SCoT marker. M.Sc. Thesis, Payame Noor University, Tehran, Iran (In Persian).
- Rahimmalek, M. (2007). Isolation and design of microsatellite markers and study of genetic diversity in Yarrow's Yarn using morphological and molecular properties. Ph.D. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran (In Persian).
- Ramezanpour, M. (2011). Study of genetic structure of chamomile populations using molecular markers. M.Sc. Thesis, University of Guilan, Gilan, Iran (In Persian).
- Rohlf, F.J. (1998). *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02*. Exeter Software. Setauket, New York, USA.
- Salehi, K. (2010). Evaluation of genetic diversity among *Matricaria chamomilla* masses in Iran using semi-random markers of ISJ. M.Sc. Thesis, Lorestan University. Khorramabad, Iran (In Persian).
- Sepahvand, N., Sarhangi, M., Mehrabi, R. and Mostafavi, K. (2015). Study on genetic diversity of Quinoa morphotypes using microsatellite molecular markers. *Modern Genetics Journal*, **10(1)**: 115-122 (In Persian).
- Shahlaei, A., Torabi, S. and Khosroshahli, M. (2014). Efficacy of SCoT and ISSR markers in assessment of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) genetic diversity. *International Journal of Biosciences*, **5**: 14-22.
- Shojaifar, S. (2011). Study on the genetic diversity of the traits associated with the production of Iranian Fennel cultivars *Foeniculum vulgare* Mill. M.Sc. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran (In Persian).
- Shuorvazdi, A., Mohammadi, S.A., Norozi, M. and Sadeghzadeh, B. (2014). Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*, **1(1)**: 51-64 (In Persian).
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N. and Srivastava, M.K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacognosy Reviews*, **5(9)**: 82-95.
- Solouki, M., Mehdikhani, H., Zeinali, H. and Emamjomeh, A.A. (2008). Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*, **117(3)**: 281-287 (In Persian).
- Sorkheh, K., Amirbakhtiar, N. and Ercisli, S. (2016). Potential start codon targeted (SCoT) and inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) markers for evaluation of genetic diversity and conservation of wild *Pistacia* species population. *Biochemical Genetics*, **54(4)**: 368-387.
- Tahir, M.H.N., Sadaqat, H.A. and Bashir, S. (2002). Correlation and path coefficient analysis of morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations. *International Journal of Agricultural Biology*, **4(3)**: 341-343.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120(3)**: 411-417.
- Zarei, P., Badakhshan, H. and Mirzaghaderi, G. (2013). Investigation of genetic diversity in cultivated and wild oats genotypes using SCoT molecular marker. *The 1st International and 12th Congress of Iranian Genetics*, Tehran, Iran (In Persian).
- Zhang, J., Wengang, X., Wang, Y. and Zhao, X. (2015). Potential of start codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and Relationships among Chinese *Elymus sibiricus* accessions. *Molecules*, **20**: 5987-6001.
- Zirak, R., Soleimani, A., Zeinolabedini, M., Hatami Maleki, H. and Kheiri, A. (2018). Morphological and AFLP-based genetic diversity assessment of *Elaeagnus angustifolia* L. *Plant Genetic Researches*, **5(2)**: 41-54 (In Persian).

Evaluation of Genetic Diversity among Cultivated *Matricaria chamomilla* Populations in Iran Using SCoT Markers

Leili Tahani¹ Mehrana Koochi Dehkordi^{2,*} and Hamid Dehghanzade²

1- Former M.Sc. Student, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: September 27, 2018 – Accepted: June 5, 2019)

Abstract

German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) is an annual plant of the Asteraceae family. Chamomile has long been used in the pharmaceutical, cosmetics, perfumery and food industry. The aim of this study was to investigate the genetic diversity of nine chamomile accessions using the SCoT marker. A total of 141 scorable bands were produced by 10 SCoT primers, of which 140 bands (96.5%) showed polymorphism. Cluster analysis was performed using UPGMA algorithm based on Jaccard's coefficient of similarity. Cluster analysis using molecular data and UPGMA algorithm, classified the chamomile populations into four groups. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed greater inter-group variation (55%) than the intra-group variation (45%). The results of this study showed that SCoT markers have high efficiency in determining the genetic diversity and relationships of the chamomile populations.

Keywords: Genetic relationship, Polymorphism, Molecular marker, Cluster analysis

*Corresponding Author, E-mail: m.kouhi@pnu.ac.ir