بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای سه گونه بابونه(*Anthemis sp*) با استفاده از فعالیت آنزیمی پراکسیداز

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

[۱] کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

[۲] تهران، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۷

چکیده

بابونه (*Anthemis sp*) یکی از مهم ترین گیاهان دارویی دنیا است که با توجه به کاربرد روز افزون آن، از اهمیت بسیاری برخوردار است. گوناگونی آنزیمی جمعیتهای بابونه با استفاده ازالگوی الکتروفورز آنزیم پراکسیداز در نه جمعیت از سه گونه *Anthemis haussknechtti*، *A.psudocutula* و *A.triumfetti* مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۱ آلل مشاهده شده، سه آلل نادر(با فراوانی کمتر از ۰/۰۵ درصد) در گونه *A. triumfetti* دیده شد. چهار آلل مختص به محل در گونه‌های *A pseudocutula* و *A. triumfetti* و در لوکوسهای PXA و PXB ردیابی شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *A. pseudocutula* و *A. triumfetti* و کمترین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *A. triumfetti* و A. *haussknechtii* مشاهده شد. با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هماهنگ نشان داد که گونه *A. pseudocutula* بیشترین فاصله را از دو گونه دیگر داشته و در تجزیه خوشه ای نیز در کلاستر جداگانه ای قرار گرفت. بین داده های اکولوژیکی و فواصل ژنتیکی حاصل از تجزیه داده های آنزیمی، همبستگی دیده نشد ولی همبستگی بین طول و عرض جغرافیایی با فواصل ژنتیکی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در جمعیت های مورد مطالعه، تجزیه واریانس مولکولی در میان جمعیت های هر گونه ۱۸ درصد و درون جمعیت ها ۴۴ درصد می باشد.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، پراکسیداز، ایزوآنزیم، *Anthemis*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۲۸۲، پست الکترونیکی: Psalehi@rifr-ac.ir

مقدمه

بابونه رومی (*Anthemis sp*) گیاهی علفی، چند ساله و از خانواده Asteraceae است. مصرف بابونه (آلمانی و رومی) از گذشته دور در جهان مستند است و در فارماکوپه های ۲۶ کشور آمده است (۲۲). این گیاه، مدیترانه‌ای بوده و منشاء آن پرتغال، فرانسه و الجزایر است و در حال حاضر، مصرف سالانه بابونه در جهان شامل بابونه آلمانی و رومی، بیش از ۴ هزار تن گل خشک است(۱). بابونه یکی از مهم ترین داروهای شناخته شده توسط انسان و یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در اروپا، خاورمیانه، آمریکای شمالی، استرالیا و کشورهای آفریقایی است و بر این اساس در چند دهه اخیر در مناطق مختلف جهان به ویژه در کشورهای اروپایی تحقیقات زیادی پیرامون جنبه‌های به‌زراعی و به‌نژادی این گیاه انجام گرفته و همه ساله شاهد انواع محصولات تولیدی از این گیاه می توان بود. بهمین دلیل و با توجه به کاربرد روز افزون آن در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، عطرسازی و تهیه چاشنی‌های غذائی، بررسی تنوع ژنتیکی بابونه جهت

اصلاح و دستیابی به ژنوتیپهای برتر، امری ضروری به نظر می‌رسد.

تنوع ذخایر ژنتیکی علاوه بر کمک به پایداری پوشش گیاهی در مقابل تنشهای ناشی از عوامل زنده و غیر زنده، در اصلاح ارقام و دستیابی به ژنوتیپهای برتر نیز اهمیت دارد (۱۵). نشانگرهای بیوشیمیایی از دهه ۱۹۵۰ میلادی برای مطالعه گیاهان زراعی به صورت گسترده‌ای مورد استقبال قرار گرفت. از این نشانگرها برای شناسایی گونه‌های مختلف گیاهی، تفکیک هیبریدها، تعیین خلوص واریته‌ها، بررسی روابط تکاملی و تعیین میزان حساسیت گیاه نسبت به تغییرات و تنشهای محیطی استفاده می‌شود. نشانگرهای آنزیمی یکی از مهم ترین نشانگرهای بیوشیمیایی هستند که در سطح وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعاتی که بر پایه این نشانگرها انجام می‌شود از چندشکلی آیزوزیمی(isozym polymorphism) استفاده می‌شود (۲۰).

ایزوآنزیمها اشکال متفاوت و قابل مشاهده الکتروفورزی آنزیمها هستند که توسط ژنهای متفاوت و جایگاههای متفاوت ژنی کد می‌شوند. هر ژن می‌تواند در یک مکان ژنی، آللهای متفاوتی داشته باشد که این آللها با تغییرات جزئی، پروتئینهای تغییر یافته را کد می‌کنند. این پروتئینها زیر دسته‌ای از ایزوزیم‌ها یعنی آلوزیم‌ها هستند که ناشی از تفاوتهای آللی اند. بررسی گوناگونی آلوزیمی که ناشی از تغییرات در توالیهای DNA رمز کننده پروتئین می‌باشد، از روشهای متداول در زیست‌شناسی جمعیتهای گیاهی است(۲۳ و ۲۵).

آنزیم پراکسیداز به شماره اندکس (EC1.11.1X) و از گروه آنزیمهای اکسیدوردوکتاز است. گیاهان در برابر عوامل تنش‌زای محیطی پروتئینهایی با نام کلی پروتئینهای وابسته به عوامل بیماری‌زا (PRPs: Pathogen Related Proteins) تولید می‌کنند. این پروتئینها به گروههای مختلفی تقسیم می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند که اعضای یک تا پنج این پروتئینها (PRP1-PRP5) فعالیت آنزیمی ندارند ولی از PRP6 تا PRP11 همگی دارای فعالیت آنزیمی هستند و آنزیم پراکسیداز در خانواده PRP9 قرار دارد (۱۲، ۱۳ و ۲۴). در همین رابطه فعالیت آنزیم پراکسیداز در پسته رقم احمدآقایی آلوده به قارچ آسپرژیلوس(۱۰)، سیب‌های رقم زرد آلوده به باکتری سودوموناس(۲) و قارچ پنسیلیوم و خیارهای آلوده به فوزاریوم(۹) مورد بررسی قرار گرفته است. حداکثر فعالیت این آنزیم در فصول سرد سال گزارش شده است. با استفاده از این آنزیم می‌توان تأثیر تنش سرما بر گیاهان را مطالعه کرد و از این طریق می‌توان به گیاهانی مقاوم تر به سرما نیز دست پیدا کرد(۴). آنزیم پراکسیداز، از مهم ترین آنزیمها در سیر تحولات فیزیولوژیک گیاهان می‌باشد و به دلیل فراوانی باندها و نیز امکان وضوح باندها جهت مطالعات ایزوزیمی، همواره از جایگاه خاصی برخوردار بوده و بسیاری از محققین برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان از تفسیر زیموگرامهای الکتروفورزی این آنزیم استفاده کرده اند (۵، ۶، ۷، ۱۹ و ۲۱). البته برای بررسی تنوع ژنتیکی، تنها از آنزیم پراکسیداز استفاده نمی‌شود و گاهی، سایر آنزیمهای گیاهی به عنوان مارکرهای شیمیایی برای بررسی تنوع ژنتیکی مورد مطالعه قرار می‌گیرند(۵، ۱۱، ۱۶، ۱۷).

هدف از انجام این تحقیق شناسایی تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون گونه‌ای و میان گونه‌ای بابونه با استفاده از آنزیم پراکسیداز است تا از این طریق بتوان کارآیی آنزیم پراکسیداز را به عنوان یک نشانگر مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های متفاوت بابونه مورد مطالعه قرار داد. همچنین هدف دیگر، معرفی مناسب‌ترین والدین جهت هیبریداسیون است تا از این طریق و با استفاده از مطالعات آتی، مانند انتقال ژن بتوان جهت اصلاح گیاه دارویی بابونه اقدام نمود.

مواد و روشها

بذر جمعیتهای مورد مطالعه از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. جمعیتها شامل شش جمعیت از گونه *A. triumfetti* از استانهای مازندران، گلستان و آذربایجان غربی، دو جمعیت از گونه *A. haussknechtti* از استانهای ایلام و گلستان و یک جمعیت از گونه *A. pseudocotula* از استان گلستان بود. مشخصات جغرافیایی و اقلیمی هر منطقه در جدول ۱ آمده است. بذور ابتدا نشاکاری شده و بعد از انتقال به مزرعه تحقیقاتی واقع در ایستگاه البرز کرج(مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور) در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در ۱۰ تکرار کشت شدند. پس از رشد کافی و رسیدن به اندازه مورد نظر، نمونه‌برداری در اردیبهشت ماه از بوته‌های یکساله انجام گرفت. از ۹۰ نمونه متعلق به نه جمعیت مورد مطالعه(از هر جمعیت ۱۰ تکرار) به میزان یک گرم برگ جدا شد و به نسبت ۱:۲ با محلول استخراج (EDTAII ۱ درصد، pvp40 ۱ درصد و مرکاپتواتانول ۱ درصد) به خوبی در هاون سرد همگن شد. نمونه‌ها با دور ۴۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و عصاره آن خارج گردید. الکتروفورز به روش ژل پلی آکریل آمید حاوی ژل با غلظت ۱۲ درصد انجام شد. از هر نمونه به میزان ۷۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک تزریق و ولتاژ منبع الکتریکی روی حالت max و آمپر بر روی ۹۰ میلی‌آمپر(برای هر دو ژل) تنظیم شد. هنگامی که حرکت آنزیم درژل به ۸ سانتیمتر رسید، ژل از دستگاه جدا شده و درون محلول پراکسیداز گذاشته شد. بعد از حدود ۱۲ ساعت ژل، از این محلول خارج شده و در آب مقطر قرار داده شد.

اطلاعات حاصل از ژل آنزیم به صورت لوکوسهای PXA، PXB و PXC نشان داده شد و با توجه به این سه لوکوس و با شمارش تعداد باندهای به وجود آمده در هر لوکوس، ماتریس داده‌ها ترسیم گردید. میانگین تعداد آلل در هر لوکوس(Na)، تعداد آللهایی با فراوانی مساوی یا بیش از ۲۵ درصد و ۵۰ درصد و آللهای نادر(با فراوانی کمتر و یا مساوی ۰/۰۵ درصد) ، هتروزیگوسیتی و درصد پلی‌مورفیسم با نرم افزار Gene Alex محاسبه گردید. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان گروهی توسط آزمون واریانس مولکولی(AMOVA) و برنامه نرم‌افزاری ARLEQUIN 101 تعیین گردید. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون Excoffier مطالعه و فاصله ژنتیکی براساس معادله Nei برآورد گردید. با استفاده از فاصله ژنتیکی، تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام گرفت.

برای معرفی گیاهان مورد مطالعه، از حرف اول نام گونه و سپس نام شهر محل جمع آوری گیاه استفاده شد.

نتایج

تفسیر زیموگرام پراکسیداز از روش Thiebaut و همکاران انجام شد. ژل پراکسیداز به وسیله ۳ لوکوس ژنی رمز می‌شود، به طوری که دو زون دارای فعالیت کافی و پایدار هستند و تحت عنوان PXB و PXC مورد بررسی قرار می‌گیرند و زون سوم(PXA) وابسته به فصل می‌باشد که با مشاهدات صورت گرفته بر روی ژلهای پراکسیداز در این تحقیق لحاظ گردید. در لوکوس PXA اختلافات آللی وجود نداشت و تنها در جمعیت گرگان از گونه *A. pseudocutula* فراوانی آلل A و B برابر با ۰/۵۰۰ بود. لوکوس PXB با ۵ آلل، دارای اختلافات آللی قابل توجهی بود به طوری که فراوانی آللی از ۰/۰۰۰ تا ۰/۸۰۰ متغیر بود. بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل B درگونه *A. haussknechtii* و در جمعیت ایوان(۰/۸۰۰) و کمترین فراوانی، مربوط به آلل A در گونه *A. triumfetti* و در جمعیتهای گرگان و رامیان(۰/۰۵۰) بود. در لوکوس PXC چهار آلل دیده شد که بیشترین فراوانی مربوط به آلل A در گونه *A. triumfetti* و در جمعیت زیراب (۰/۸۷۵) و کمترین فراوانی در آلل D در جمعیت رامیان متعلق به گونه *A. triumfetti*(۰/۰۵۰) بود. در مجموع سه آلل نادر با فراوانی ۰/۰۵۰ در آللهای A و D گونه *A. triumfetti* (در لوکوسهای PXB و PXC) دیده شد. چهار آلل مختص به

محل در گونه‌های *A. triumfetti* و *A. pseudocutula* نیز مشاهده شد(جدول ۲).

متعلق به جمعیت گرگان و در لوکوسهای PXA و PXB

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی مناطق مورد مطالعه

شهر	استان	ارتفاع (m)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین بارندگی سالانه(mm)	حداکثر دمای سالانه	حداقل دمای سالانه	حداکثر رطوبت (٪)	حداقل رطوبت (٪)
گرگان	گلستان	۱۶۰	۳۶/۸۳	۵۴/۷۶	۵۵۴/۶۲	۲۵/۲۳	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
ایوان	ایلام	۱۱۴۰	۳۳/۸۱	۴۶/۲۸	۵۵۴/۱۴	۲۲/۷۲	۱۱/۶	۵۴/۲	۲۷
زیراب	مازندران	۱۹۰۰	۳۶/۰۴	۵۰/۵	۶۰۰	۱۰	۷ ،۵	۷۵	۶۵
رامیان	گلستان	۲۳۰	۳۷/۰۱	۵۵/۱۳	۵۵۴/۶۲	۲۳/۲۵	۱۳/۰۷	۸۱/۸۷	۵۳/۶۳
ارومیه	آذربایجان غربی	۱۳۳۲	۳۷/۳۵	۴۵/۰۳	۲۶۰/۲۸	۱۸/۴	۵/۶۳	۶۹/۹	۲۳/۹

جدول شماره۲- فراوانی آللی در ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* بر اساس داده های آنزیمی

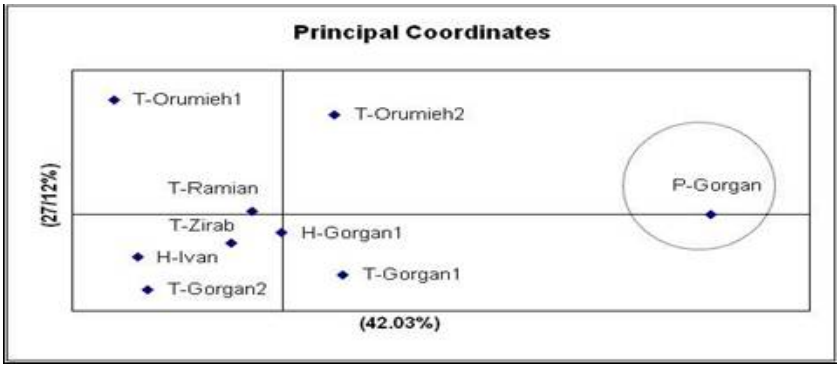
لوکوس	آلل	H-گرگان	H-ایوان	P-گرگان	T-گرگان۱	T-گرگان۲	T-رامیان	T-زیراب	T-ارومیه۱	T-ارومیه۲
PXA	A	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۵۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	B	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۵۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
PXB	A	۰/۳۰۰	۰/۰۰	۰/۵۵۰	۰/۰۵۰	۰/۱۰۰	۰/۰۵۰	۰/۵۰۰	۰/۱۵۰	۰/۴۵۰
	B	۰/۷۰۰	۰/۸۰۰	۰/۴۵۰	۰/۲۵۰	۰/۵۰۰	۰/۵۵۰	۰/۵۰۰	۰/۷۵۰	۰/۵۵۰
	C	۰/۰۰	۰/۲۰۰	۰/۰۰	۰/۲۵۰	۰/۴۰۰	۰/۴۰۰	۰/۰۰	۰/۱۰۰	۰/۰۰
	D	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	E	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
PXC	A	۰/۶۶۷	۰/۸۰۰	۰/۱۵۰	۰/۳۵۰	۰/۸۰۰	۰/۳۵۰	۰/۸۷۵	۰/۳۵۰	۰/۳۰۰
	B	۰/۳۳۳	۰/۲۰۰	۰/۸۵۰	۰/۴۰۰	۰/۲۰۰	۰/۳۵۰	۰/۱۲۵	۰/۰۰	۰/۲۵۰
	C	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۰	۰/۲۵۰	۰/۰۰	۰/۶۵۰	۰/۴۵۰
	D	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰

جدول۳- جدول تکثر ژنتیکی در ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* مورد مطالعه

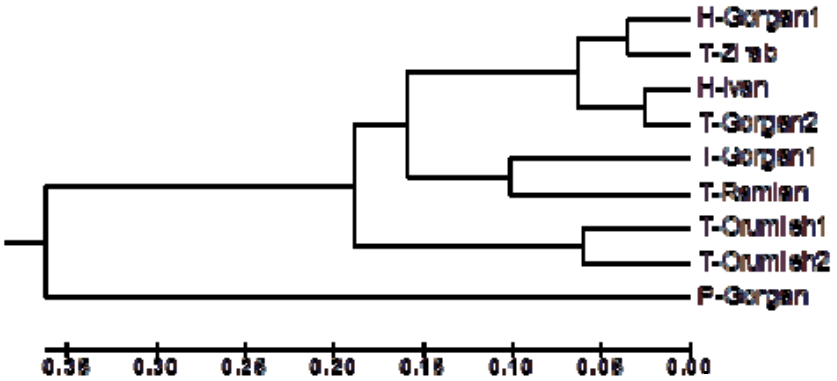
جمعیت	تعداد آلل(Na)	تعداد آللهایی با فراوانی ≥۵٪	تعداد موثر آلل(Ne)	ضریب شانون(I)	آللهای مختص به محل(Nr)	تعداد آللهایی بافراوانی≤ ۲۵٪	تعداد آللهایی با فراوانی ≤۵۰٪	هتروزیگوسیتی مشاهده شده(Ho)	پلی مورفیسم (%p)
H-گرگان	۱/۳۳۳	۱/۳۳۳	۱/۱۷۵	۰/۴۱۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۲۸۸	٪۶۶/۶۷
H-ایوان	۱/۳۳۳	۱/۳۳۳	۰/۹۸۰	۰/۳۳۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۲۱۲	٪۶۶/۶۷
P-گرگان	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۱/۷۷۴	۰/۶۰۱	۰/۶۶۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۱۷	٪۱۰۰
T-گرگان۱	۳/۰۰۰	۳/۰۰۰	۲/۳۴۰	۰/۸۹۶	۰/۶۶۷	۰/۳۳۳	۰/۶۶۷	۰/۴۷۵	٪۶۶/۶۷
Tگرگان۲	۱/۶۶۷	۱/۶۶۷	۱/۲۴۸	۰/۴۸۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۳۰۰	٪۶۶/۶۷
T-رامیان	۲/۳۳۳	۲/۳۳۳	۱/۷۹۲	۰/۶۹۲	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	۰/۶۶۷	۰/۴۰۸	٪۶۶/۶۷
T-زیراب	۱/۳۳۳	۱/۳۳۳	۱/۰۹۳	۰/۳۵۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۲۴۰	٪۶۶/۶۷
T-ارومیه۱	۱/۶۶۷	۱/۶۶۷	۱/۱۷۲	۰/۴۵۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	۰/۲۸۷	٪۶۶/۶۷
T-ارومیه۲	۱/۶۶۷	۱/۶۶۷	۱/۵۹۹	۰/۵۸۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	۰/۳۸۰	٪۶۶/۶۷

جدول۴- ماتریس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی (NEI) در میان ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* بر اساس داده های آنزیمی

جمعیتها	H-گرگان	H- ایوان	P- گرگان	T- گرگان۱	T- گرگان۲	T- رامیان	T- زیراب	T- ارومیه۱	T- ارومیه۲
H-گرگان	۰								
H-ایوان	۰/۰۶۹	۰							
P-گرگان	۰/۴۹	۰/۸۶۴	۰						
T-گرگان۱	۰/۳۷۳	۰/۳۷۱	۰/۶۳۳	۰					
T-گرگان۲	۰/۱۳۱	۰/۰۵۳	۰/۸۹۰	۰/۲۹۹	۰				
T-رامیان	۰/۲۲۴	۰/۱۶۶	۰/۶۲۲	۰/۲۰۳	۰/۱۵۶	۰			
T-زیراب	۰/۰۷۰	۰/۱۶۰	۰/۷۰۸	۰/۵۲۸	۰/۱۴۷	۰/۴۲۷	۰		
T-ارومیه۱	۰/۳۸۴	۰/۳۲۵	۱/۰۹۵	۰/۶۱۰	۰/۴۵۶	۰/۲۳۲	۰/۴۶۹	۰	
T-ارومیه۲	۰/۲۰۷	۰/۳۹۳	۰/۴۸۹	۰/۴۸۶	۰/۴۶۷	۰/۲۵۹	۰/۲۷۹	۰/۱۲۱	۰



شکل۱- نمودار رسته بندی (PoCA) ویژگیهای ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* بر اساس فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مولفه اصلی (مولفه اول۴۲/۰۳ و مولفه دوم ۲۷/۱۲)



شکل۲- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA بر روی ۹ جمعیت از ۳ گونه *Anthemis* برا ساس ایزوزیم ها

مقادیر تکثر و تنوع آللی در جدول ۳ در سطح جوامع مختلف نشان داده شده است. بالاترین میزان تعداد آلل(Na) متعلق به گونه *A. triumfetti* و جمعیت گرگان۱ و کمترین تعداد آلل در گونه *A. haussknechtii* و در جمعیتهای گرگان، ایوان و همچنین گونه *A. triumfetti* در جمعیت زیراب دیده شد (جدول۳) میانگین تعداد آلل برابر با ۱/۸۱ محاسبه گردید.

نسبتهای محاسبه شده تک تک هتروزیگوت‌ها در یک لوکوس به عنوان هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_O) تعریف می‌شود و برای اینکه میزان هتروزیگوسیتی، مستقل از فراوانی آللی باشد، از هتروزیگوسیتی مورد انتظار استفاده شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده در لوکوس PXA برابر با ۰/۰۵۶، در لوکوسPXB، ۰/۴۹۹ و در لوکوس PXC، ۰/۴۴۸ بود. میزان پلی‌مورفیسم در تمام جمعیتها یکسان و برابر با ۶۶/۶۷ درصد بود، به استثناء گونه *A. pseudocutula* که بالاترین میزان پلی‌مورفیسم (۱۰۰ درصد) را دارا بود (جدول۳). میانگین پلی‌مورفیسم برابر با ۷۰/۳۷ درصد محاسبه گردید.

برآورد نااریب فاصله ژنتیکی(Nei) در نه جمعیت مورد مطالعه نشان داد که بیشترین فاصله (۱/۰۹۵)و کمترین شباهت ژنتیکی بین دو گونه *A. triumfetti* (جمعیت ارومیه) و*A. pseudocutula* (جمعیت گرگان) و کمترین فاصله(۰/۰۵۳) و بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو گونه *A. haussknechtii*(جمعیت ایوان) و *A. triumfetti* (جمعیت گرگان) وجود داشت (جدول۴). از فاصله ژنتیکی بین جمعیتها برای آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (POCA) و تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA استفاده گردید. مؤلفه اصلی اول با ۴۲/۰۳ درصد و مؤلفه اصلی دوم با ۲۷/۱۲ درصد از واریانس و در مجموع سه مولفه(۹۱/۲۶ درصد) از کل واریانس، متغیرها را توجیه نمودند(شکل۱). نتایج تجزیه کلاستر نشان داد که جمعیتهای مورد بررسی در سه کلاستر قرار دارند که کلاستر اول شامل جمعیت های H- گرگان۱،T - زیراب، H- ایوان وT-گرگان۲ می‌شود. در کلاستر دوم جمعیتهای T- گرگان۱، T- رامیان، T- ارومیه۱ و T- ارومیه۲ قرار می‌گیرند. در کلاستر سوم تنها جمعیت P- گرگان قرار گرفت. بنابراین تجزیه خوشه‌ای گونه *A. pseodocutula* را در کلاستر جدا و متمایز از سایر گونه‌ها قرار داد؛ در واقع این گونه بیشترین فاصله ژنتیکی را از سایر جمعیتها داشته که نشان دهنده کمترین شباهت ژنتیکی این گونه با سایر گونه و جمعیتها است(شکل۲).

در جدول همبستگی صفات ژنتیکی با عوامل جغرافیایی نشان داده شد که تنها تعداد آلل با حداکثر دمای سالانه همبستگی معنی‌داری در سطح ۰/۵ درصد دارد. هیچ نوع همبستگی دیگری بین صفات ژنتیکی حاصل از داده‌های آنزیمی با عوامل جغرافیایی مشاهده نشد. همبستگی بین فاصله ژنتیکی حاصل از داده‌های آنزیمی با طول و عرض جغرافیایی با آزمون منتل مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد R^2 = ۰/۰۰۰۴ و P =۰/۴۸۰ است که از لحاظ آماری معنی‌دار نیست.

بحث

تفسیر زیموگرامهای الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز، تاکنون برای بررسی تنوع و تمایز ژنتیکی بسیاری از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۷ ، ۱۸ و ۲۱). در تحقیق حاضر، گروه‌بندی جمعیتها براساس فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز، تمایز ژنتیکی بالا و کلاسه‌های ژنتیکی متنوعی را نشان داد.

هتروزیگوسیتی مشاهده شده در لوکوس PXA برابر با ۰/۰۵۶، در لوکوس PXB، ۰/۴۹۹ و در لوکوس PXC، ۰/۴۴۸ بود و این در حالی است که میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این لوکوسها به ترتیب ۰/۱۱۱، ۰/۵۸۹ و ۰/۵۷۷ محاسبه شد. بنابراین هتروزیگوسیتی مشاهده شده از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بالاتر است که این به معنای

انحراف از تعادل هاردی- وینبرگ در جهت افزایش هتروزیگوت ها است.

در جمعیتهای مورد مطالعه، تجزیه واریانس مولکولی در میان جمعیتهای هر گونه ۱۸ درصد و درون جمعیتها ۴۴ درصد می‌باشد. وجود تغییرات ژنتیکی درون جمعیتی، یک مزیت برای گونه‌ها در شرایط محیطی بی‌ثبات است که در اثر تبادل ژنتیکی ژنوتیپها با یکدیگر پدید می‌آید (۱۴).

نتایج به دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که گونه *A. pseudocutula* بیشترین فاصله و تفاوت ژنتیکی را از سایر جمعیتها داشته است؛ در نمودار تجزیه خوشه‌ای نیز این گونه در کلاستر جداگانه‌ای قرار گرفته و این مطلب نشان می‌دهد که این گونه کاملاً از سایر گونه‌ها و جمعیتها متمایز بوده و به همین دلیل پیشنهاد می‌شود از این جمعیت برای ایجاد تنوع ژنتیکی و آزمایشهای تلاقی در ژرمپلاسم و در پروژه‌های اصلاحی استفاده شود.

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.

در تحقیق حاضر، گروه‌بندی جمعیتها براساس فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز، تمایز ژنتیکی بالا و کلاسه‌های ژنتیکی متنوعی را نشان داد، که با توجه به اینکه بذرهای بابونه همگی در یک منطقه کشت شده، نمونه‌برداری از بوته‌ها به صورت یکنواخت انجام گرفت و همه گیاهان تحت تأثیر شرایط محیطی یکنواختی هم بودند، چنین اختلافاتی می‌تواند ناشی از تفاوت ژنتیکی این گیاهان باشد؛ همچنین مقادیر فاصله ژنتیکی(Nei) نشان می‌دهد که آنزیم پراکسیداز جمعیتها را به خوبی از یکدیگر متمایز کرده و می‌تواند به عنوان نشانگر مناسبی برای تفکیک بین جمعیتهای این سه گونه از جنس *Anthemis* عمل نماید.

پیشنهاد می‌شود برای بررسی بیشتر و دقیق تر تفاوتهای ژنتیکی از سایر نشانگرها مانند نشانگرهای مولکولی برای نقشه برداری کامل از ژنوم بابونه استفاده شود.

منابع

۱. حاج سید هادی، م. ۱۳۸۴. بررسی اثرات تاریخ کاشت و تراکم گیاه بر روی رشد و نمو، عملکرد و مقدار ماده موثره گیاه بابونه. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ایران.

۲. خزایی،ف؛ اعتباریان، ح؛ روستایی،ع؛ علیزاده، ع. ۱۳۸۹. مطالعه میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز و فنل در میوه های سیب رقم زرد تیمارشده با با بکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Penicillium expansum* عامل کپک آبی سیب. مجله به زراعی نهال و بذر. جلد ۲-۲۶. شماره۴.

۳. رئیسی، ش؛ جلالی، غ؛ اسپهبدی،ک. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی گونه بلند مازو در جنگل های نکا و مازندران با استفاده از فعالیت آنزیمی پراکسیداز. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال سوم. شماره هفتم. صفحه ۲۲- ۱۱.

۴. شمس،ز؛ عصاره، م،ح؛ انتشاری، ش؛ متینی زاده، م؛ زارع ،ع. ۱۳۹۰. تأثیر تنش سرما بر فعالیت پراکسیداز در نهال های اکالیپتوس. دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد ۱۹ . شمارهٔ ۲. صفحهٔ ۳۱۳.

۵. صالحی شانجانی، پ. ۱۳۸۲. تنوع ژنتیکی پراکسیداز، لوسین آمینوپپتیداز و گلوتامات اکسالواستات ترانس آمیناز گونه *Fagus orientalis* LIPSKY در راشستانهای ایران. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۵. شماره ۳.

۶. فلاح، ح؛ طبری، م ؛ آزادفر، د؛ بابایی، ف. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی توده های در خطر انقراض سفیدپلت(*Populus caspica* Bornm) در جنگلهای میان بند شمال ایران. دوفصلنامه علمی- پژوهشی ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگل ایران. جلد ۱۹. شماره۲. صفحه ۳۰۳- ۲۸۹.

۷. کلاگری، م؛ جعفری مفید آبادی، ع؛ طبری، م؛ حسینی، م. ۱۳۸۶. بررسی تغییرات جوامع پده با استفاده از آنزیم پراکسیداز.

فصلنامه علمی- پژوهشی جنگل و صنوبر ایران. جلد ۱۵. شماره۲. صفحه ۱۲۲-۱۱۵.

۸. کریمی، ل؛ آزادفر، د. ۱۳۸۹. بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی سرخدار (*Taxuss baccata* L.) با استفاده از پراکسیداز شاخه و برگ. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیکی و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد۱۸. شماره۲. صفحه ۲۳۸-۲۲۷.

۹. مولوی، ا؛ امینیان، ح؛ اعتباریان، ح؛ شهریاری، د. ۱۳۸۹. مقایسه میزان فنل کل و آنزیم پراکسیدازدر دو رقم متحمل و حساس *Fusarium oxysporum* و *radicis cucumerinum*. گیاه پزشکی مجله علمی کشاورزی. جلد ۳۳ شماره ۱. شهریورماه.

۱۰. هادوی، م؛ منتصر کوهساری، ش ؛ سریری، ر. ۱۳۸۹. تغییرات الگوی الکتروفورتیک و فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه های پستهٔ احمد آقایی (*Pistacia vera* L.) رفسنجان در پاسخ به آلودگی با قارچ آسپرژیلوس نیجر(*Aspergillus niger*)، زیست شناسی گیاهی ایران. سال دوم. شماره دوم . صفحه ۳۰-۲۱.

11. Bayer,R.J. 1989. Patterns of Isozyme Variation in the *Antennaria roea*(Asteraceae) Polyploid Agamic Complex Systematic botany 14(3):pp 389-397

12. Caruso, C., Chilos,G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P. and Buonocore, V. 1999. Induction of pathogenesis related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. Plant Science 140: 107-120.

13. Chittoor, J. M., Leach. J. E., White, F. F. 1999. Pathogenesis related proteins in plants .171-193. CRC Press. London.

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

15. Espahbodi,K., Mirzaie Nadoushan, H., Tabari, M. and Akbarian, M. 2006. Investigation of genetic variation of wild service (*Sorbus torminalis*). using Morphological Analysis of fruits and leaves. Pajouhesh va sazandegi.72:44-54

16. Ferrer, M., Eguiarte, M., Luis, E. and Montan, C. 2004. Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert. Annals of Botany 94: 419–426.

17. Fore, S.A. and Guttma.. 1999. genetic structure of *Helianthus occidental* (Asteraceae) in a preserve with fragmented habitat. American journal of botany 86(7):988-995.

18. Gomory,D., Vysny, J., Comps, B. and Theibaut, B. 1992. Geoghraphica pattern of genetic differentiation and diversity in eurean beech (*Fagus sylvatica* L.) population in france. Biological. 47:571-579.

19. Haddioui, A., Zinelabidine Lalla, H., Nouri, M.., El Ajal, A., El Hansali, M. and Hanine, H. 2012. Genetic Diversity of Natural Populations of *Medicago truncatula* in Morocco Using Isozyme Polymorphism. World Journal of Agricultural Sciences 8 (1): 13-19

20. Heinze, B. 1997. Biochemical and molecular genetic methods available for the characterization of *Populus nigra* L. Populus nigra Network

21. Múdry, p. and Kraic, J. 2007. Inter- and Intra-Population Variation of Local Maize (*Zea mays* L.) Populations from Slovakia and Czech Republic. Czech J. Genet. Plant Breed. 43. (1): 7–15

22. Salamon, I. 1992. Chamomile: A Medicinal Plant the Herb. Spice and Medicinal Plant Digest.10 (1) : 345-354.

23. Tanksely, S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Mol, Bio. Rep. 1:3-8.

24. Van Loon, L.C. and VanStrien. E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins. their activities and comoarative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

25. Wendel, J.F. and Weeden, N.F.1989. Visualization and interperetation of plant isozymes. In: soltis. D.E and Soltis, P.S. (Eds). Isozymes in plant biology,: 5-54. Chapman and hall.London.

Study of genetic diversity in populations of three species of Chamomile (*Anthemis sp*) with peroxidase activity

Zekri M.[1], Salehi Shanjani P.[2], Javadi H.[2], Alizadeh A.[2]

[1] Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Karaj, I.R. of Iran

[2] Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Chamomile (*Anthemis sp*) is an important medicinal plant in the world that is widely used today. In order to investigate the proxidase diversity of three species of *Anthemis* (*A. pseudocotula*, *A. haussknechtti* and *A. triumfetti*) nine population were studied. From eleven abserved- alleles, there were three rare alleles in *A triumfetti* species .Four private alleles were seen in *A. pseudocutula* and *A. triumfetti* species(in PXA and PXB locus) .The higher and lower genetic distance were obtained between *A. pseudocutula* and *A. triumfett* and between *A. triumfetti* and *haussknechtti* respectively. Using principal components analysis. result showed that the *A. psudocutula* had the most distance from other species and cluster analysis was performed in a separate cluster. There was no correlation between ecological data and genetic character but correlation between latitude and longitude with genetic characters was significant at the 1% level. Analysis of molecular variance among populations was 18% and within of the population each species was 44%.

Key words: Genetic diversity، *Anthemis*، peroxidase، isoenzyme