لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه

Archive of SID

اولین کنگره بین المللی
و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات
و سومین همایش علوم وتکنولوژی بذر
1st International and
13th Iranian Crop Science Congress
3rd Iranian Seed science and Technology Conference

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی حنا با استفاده از نشانگرمولکولی RAPD

گلرخ کلانتر معتمدی [۱]، امین باقی زاده [۲]، محمود ملکی [۳]، مسعود ترک زاده ماهانی [۳]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

۲.دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

۳.استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

(Email:rokh.gooolgmail.com)

چکیده

حنا با نام علمی*Lawsonia inermis* دارای خواص دارویی زیادی از جمله ضد تب، ضد درد و... است . به منظور بررسی تنوع ژنتیکی دوازده اکوتیپ مختلف گیاه دارویی حنا، نشانگرمولکولی RAPD مورد استفاده قرار گرفت. DNA ژنومی اکوتیپ های جمع آوری شده با روش CTABاستخراج شدند. پس از انجام واکنش PCR با چهار آغازگر، محصولات بدست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه خوشه ای و گروه بندی ژنوتیپ ها نیز بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام شد. آغازگرهایRAPD ، در مجموع ۸۲ قطعه DNA تکثیر کردند که از بین آنها تعداد ۷۵ قطعه چندشکلی (۹۱/۴ درصد) نشان دادند. کمترین تشابه ژنتیک بین دو اکوتیپ bb و gh_2 (۰/۲۲) و بیشترین تشابه ژنتیکی بین دو اکوتیپ gh_3 و j_5(۰/۷۳)مشاهده گردید. همچنین بر اساس این نشانگر اکوتیپها در پنج گروه مختلف قرار گرفتند .نتیجه این پژوهش نشان داد که نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه حنا نشانگر نسبتا کارایی است.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، حنا، نشانگرRAPD

مقدمه

گیاه حنا با نام علمی *Lawsonia inermis* از دیررباز در ایران به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرارگرفته است .حنا دارای خواص دارویی زیادی از جمله ضد تب ،ضد درد، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد سرطان، ضد انگل،ضد التهاب و.... می باشد.(۲)در گذشته از حنا در طب سنتی استفاده می شد ولی امروزه بیشتر رنگ این گیاه مورد استفاده قرار می گیرد. متاسفانه در حال حاضر این گیاه در ایران تولید انبوهی ندارد و تا به حال تنوع ژنتیکی این گیاه در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است و تنها Boubaya و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ حنا را با نشانگر RAPD انجام دادند (۱). اکوتیپ های جمع اوری شده از ۱۲ منطقه کرمان (شهداد ،بم ،قلعه گنج،کهنوج و....) به وسیله نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفته اند، که به منظور تشخیص تنوع ژنتیکی و تفاوتهای ژنتیکی موجود در بین اکوتیپهای استان کرمان می باشد .

www.agrobreedcongress.ir

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran

۴-۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر، کرج، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مواد وروش

نمونه گیاهی

در این مطالعه از ۱۲ اکوتیپ گیاه حنا (جدول۱)، که ازمناطق مختلف استان کرمان جمع آوری شده اند استفاده شد.

جدول ۱: اکوتیپ های حنا ی مورد مطالعه

ردیف	کد اختیاری	ژنوتیپ
۱	Bd ، Bb	شهرستان بم
۲	Gh_3 Gh_2, Gh_1	شهرستان قلعه گنج
۳	Sh_4، Sh_1	شهرستان شهداد
۴	J_5 , J_2	شهرستان جیرفت
۵	Rod	شهرستان رودبار
۶	R_1	شهرستان ریگان
۷	K	شهرستان کهنوج

استخراج DNA

DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش CTAB (۱) با اندکی تغیرات استخراج شد که کیفیت وکمیت DNA های به دست آمده توسط روشهای اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪تعیین گردید.

آغازگرها

برای شناسایی تنوع ژنتیکی از ۴ آغازگر RAPD استفاده شده است (جدول۲).

جدول۲.آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های حنا مورد مطالعه

ردیف	آغازگر	توالی اغازگر۳َ-۵َ
۱	C5	۳َ-GATGACCGCC-۵َ
۲	396	۳َ-GAATGCGGAG-۵َ
۳	PO-A13	۳َ-CAGCACCCAC-۵َ
۴	F1	۳َ-AGGAGTCGGA-۵َ

واکنش های زنجیره ای پلی مراز

تکثیر قطعات DNA با واکنش PCRدر حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت . واکنش های PCR شامل مراحل ، واسرشته سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ،در ادامه ۳۵ چرخه به صورت واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ، اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر ومرحله توسعه رشته جدید به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت .سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.ژل ها پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و عکس برداری مورد ارزیابی قرار گرفتند . باند های تکثیر یافته به صورت یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند)نمره دهی شدند.تجزیه تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار NTSYS

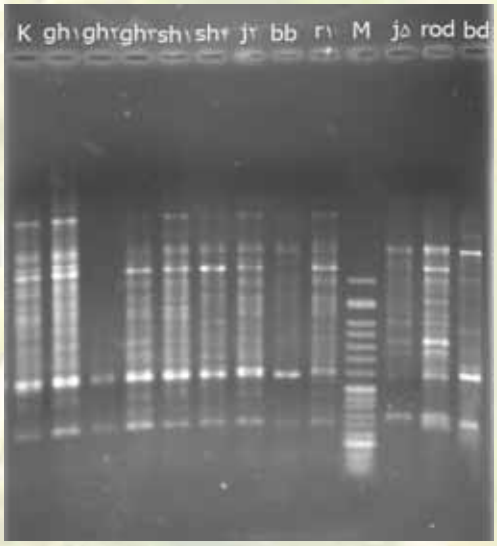
www.SID.ir

Archive of SID

صورت گرفت .تجزیه خوشه ای و گروه بندی ژنوتیپ ها نیز بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۲ اکوتیپ حنا با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع از ۴ آغازگر تصادفی مورد استفاده، ۸۲ قطعه DNA قابل نمره دهی تکثیر شدند که از بین آنها تعداد ۷۵ قطعه چندشکل (۹۱/۴ درصد) بودند. این نتیجه نشان می دهد که نشانگر مورد استفاده توانسته سطح بالایی از تفاوتهای بین اکوتیپها را در قالب باندهای چندشکل به ما نشان دهد که نشان دهنده کارا بودن این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی حداقل در گیاه دارویی حنا نیز هست.

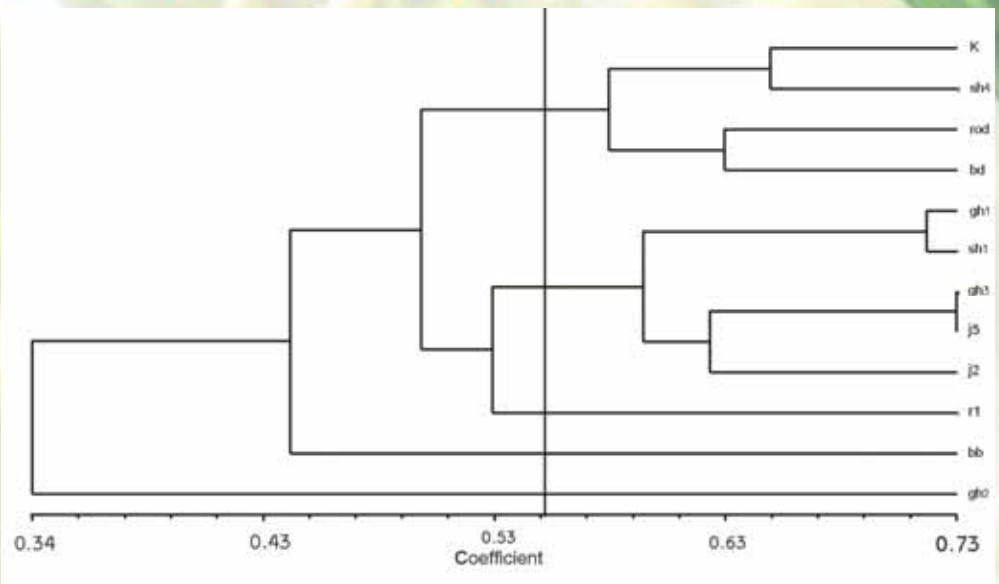


شکل ۱.الگو باندی حاصل از الکتروفورز DNA های تکثیر شده از ۱۲ اکوتیپ حنا توسط آغازگر ۳۹۶ در ژل آگارز ۱٪

ماتریس تشابه محاسبه شده در بین اکوتیپ های مذکور بیانگر کمترین تشابه در بین دو اکوتیپ Bb (اکوتیپ جمع آوری شده از شهرستان بم) و gh_2 (شهرستان قلعه گنج) (۰/۲۲) و بیشترین تشابه را در بین دو اکوتیپ gh_3 (شهرستان قلعه گنج) و J_5 (شهرستان جیرفت) (۰/۷۳) هستند. دندروگرام براساس روش UPGMA به دست آمد که تمام اکوتیپهای مورد مطالعه را در پنج گروه مختلف قرار داد. سه اکوتیپ r_1 (شهرستان ریگان)، Bb (شهرستان بم) و gh_2 (شهرستان قلعه گنج) به تنهایی در سه گروه مجزا قرار گرفتند و مابقی در دو گروه چهار (K، sh_4، rod، Bd) و پنج تایی (gh_1 ، sh_1 ، gh_3 ، j_5 ، j_2) قرار گرفتند (شکل۲). ضریب همبستگی کوفنتیک حاصل از دندروگرام و ماتریس تشابه ۰ / ۸ محاسبه شد که نشان دهندهٔ برازش مناسب بین ماتریس تشابه و دندروگرام است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲: دندروگرام حاصل از داده های نشانگرهای RAPD مربوط به ۱۲ اکوتیپ گیاه حنا با روش UPGMA

منابع

[1]. **Boubaya et al**. *Genetic diversity assessment of Lawsonia inermis germplasm in Tunisian coastal oases by ISSR and RAPD markers*.DENDEROBIOLOGY. **2013**. 69: p. 31–39.

[2]. **Gallo F.R et al**... . *Chemical Fingerprinting of Lawsonia inermis L. using HPLC, HPTLC and Densitometry*. Phytochemical Analysis. **2008**. 19: p. 550–559

[3]. **Maciel FL, TS Gerald and Echeverrigaray S** .*Random amplified polymorphic DNA markers variability among cultivars and landraces of common beans of South-Brazil*. **2001**.Euphytica, 120 (2): 257263

Assessment of genetic diversity of henna medicinal plant (Lawsonia inermis) using *RAPD* molecular markers

Golrokh kalantar motamedi [1], Amin Baghizadeh [2], Mahmoud Malki [3], Masoud Torkzadeh Mahani[3]

1-Post graduate Student, Department of Plant Breeding, Graduate University of Advanced Technology, Kerman-Iran

2- Associate Professor. Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman-Iran

3- Assistant prof Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman-Iran

(Email: rokh.gooolgmail.com)

Henna with Scientific name *Lawsonia inermis* has many medicinal properties such as antipyretic and analgesic. RAPD markers was used in this research to characterized the genetic diversity of different ecotype plants Henna. Genomic DNA was extracted by CTAB method from ecotypes collected. After the reaction PCR, the resulting products were analyzed with using 1% agarose gel. Cluster analysis grouped genotypes based on Jaccard's similarity coefficient using UPGMA method was conducted using NTSYS software. Based on RAPD primers 82 pieces of DNA is proliferation,that 75 pieces of them which were amplified polymorphic DNA (91.4%). The lowest genetic similarity was between the Bb and gh2 ecotypes (0.22) and the highest genetic similarity was observed between the gh3 and j5 (0.73) ecotypes. According to this marker, ecotypes were divided to five different groups. The results of this study showed that RAPD markers to assess the genetic diversity of henna plant markers are relatively efficient.

Key Words: Genetic diversity, Lawsonia inermis, RAPD marker

www.SID.ir

لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه