دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایاننامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

تعیین روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گل راعی (*Hypericum perforatum*) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی

استاد راهنما

دکتر سید ابوالقاسم محمدی

استاد مشاور

دکتر سعید اهری زاد

پژوهشگر

راضیه اسدخانی ممقانی

بهمن ماه 89 شماره پایاننامه: 7

آتاما

و

آتاما

سونورام

خجسته باد نام خداوند نیکوترین آفریدگاران، که انسان را مشتاق به علم اندوزی آفرید و هر ذره از علم لایتناهی که شکافته شود دلیلی است بر اثبات وجود ذات اقدس او. خداوند را سپاسگذارم که یاریم نمود تا این مرحله را با موفقیت به اتمام برسانم.

استاد راهنمای ارجمند، جناب آقای دکتر سید ابوالقاسم محمدی، از این که زحمت راهنمایی این پایاننامه را قبول فرمودید و به لطف علم، صبر و شکیبایی بی‌نهایت شما استاد بزرگوار توانستم اجرای پایاننامه‌ام را به اتمام برسانم کمال تشکر و قدر دانی دارم و برایتان آرزوی سلامتی و سربلندی هر چه بیشتر دارم.

استاد مشاور محترم، جناب آقای دکتر سعید اهری زاد، به خاطر مشاوره‌های ارزشمندتان بسیار ممنون و سپاسگذارم و خرسندم از اینکه در محضر علم و اندیشه استاد بزرگواری چون شما کسب علم نموده‌ام.

استاد بزرگوار، جناب آقای دکتر محمد مقدم، از اینکه قبول زحمت فرمودید داوری و بازخوانی این پایاننامه را بر عهده بگیرید بی نهایت ممنونم. خداوند را سپاس در این دوره از تحصیلم افتخار شاگردی دانشمند فرزانه ای چون شما نصیبم شد.

از جناب آقای دکتر سید سیامک علوی کیا به خاطر راهنمایی‌های بی‌دریغشان سپاسگذارم. و برای تمامی اساتید محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تبریز آرزوی سربلندی و سرافرازی در تمام مراحل زندگی بخصوص مراتب علمیشان دارم.

از خانواده مهربانم به خاطر تمام حمایت‌ها، صبر و حوصله‌شان در تمام مراحل زندگیم متشکرم.

از سرکار خانم مهندس الناز شکوهی و جناب آقای امیر کهنمویی که در امر اجرای پایاننامه راهنمایی‌ام کرده‌اند ممنون و سپاسگذارم.از مسئول دفتری محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات سرکار خانم رنجبریان که همیشه زحمات ما را تقبل فرموده‌اند متشکرم.

از دوست و همراه بسیار خوبم، سرکار خانم مهندس سادا غفاریان بی‌نهایت ممنونم.

از تمام دوستان، هم آزمایشگاهی‌ها و هم کلاسی‌های عزیزم که یاریم کردند و همواره مایه امیدی بودند برای اجرای این پایاننامه کمال تشکر و قدردانی دارم و از خداوند مهربان برای تک تک آنها سلامتی، سربلندی و موفقیت تمنا دارم.

در نهایت با کسب اجازه از محضر استاد راهنمای بزرگوارم، که اجرای این پایاننامه بدون کسب دانش از دریای علم ایشان غیر ممکن بود، این پایاننامه را تقدیم می کنم به، مادر و پدرم.

نام خانوادگی دانشجو: اسدخانی ممقانی **نام**: راضیه

عنوان پایاننامه: تعیین روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌ها و ارقام خارجی گل راعی(*Hypericum perforatum*) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی

استاد راهنما: دکتر سید ابوالقاسم محمدی **استاد مشاور**: دکتر سعید اهری زاد

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته**: مهندسی کشاورزی **گرایش**: بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشگاه: تبریز **دانشکده**: کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی**: 1389/11/04 **تعداد صفحه**: 63

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گل راعی، نشانگرهای رتروترانسپوزونی

چکیده:

تعیین سطح تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی و روابط خویشاوندی افراد، گام اول در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان دارویی است. در این مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی هشت اکوتیپ ایرانی به همراه سه رقم خارجی با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP مورد ارزیابی قرار گرفت. در تکنیک IRAP، 311 نشانگر با استفاده از نه ترکیب هفت آغازگر رتروترانسپوزونی و ترکیبات دوتایی آن‌ها تولید شد که 298 نشانگر چندشکل بودند (95/81%). متوسط تعداد نشانگر چندشکل ایجاد شده توسط هر ترکیب آغازگری در کل نمونه‌ها (Np) و متوسط تعداد نشانگر برای هر ترکیب آغازگری در واحد فرد به ترتیب برابر 33/11 و 4/04 برآورد شد. متوسط میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب برابر 0/31 و 9/83 بود. در REMAP، 19 ترکیب آغازگری حاصل از هفت آغازگر رتروترانسپوزونی و نه آغازگر ISSR، در مجموع 864 نشانگر تولید کرد که 838 نشانگر چندشکل بودند (96/35%). در این سیستم نشانگری، NP برابر 44/10 و متوسط تعداد نشانگر برای هر ترکیب آغازگری در واحد فرد 5/20 برآورد شد. متوسط PIC و MI به ترتیب برابر 0/27 و 11/44 بود. با استفاده از داده‌های IRAP، ضریب فاصله تکاملی P- distance و الگوریتم Minimum-Evolution، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به چهار گروه منتسب شد. در این گروه‌بندی، ژنوتیپ‌های ارقام خارجی بجز برخی ژنوتیپ‌های Topas با هم گروه‌بندی شدند. خوشه‌بندی با استفاده از داده‌های REMAP، الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله تکاملی Jukes-Cantor، بهترین الگوی گروه‌بندی را ارایه کرد که مطابق با شرایط اکولوژیکی محل‌های جمع‌آوری ژنوتیپ‌ها بود. در دندروگرام حاصل، ژنوتیپ‌ها به سه گروه منتسب شدند. گروه اول و دوم شامل افراد اکوتیپ‌های ایرانی بود و تمام ژنوتیپ‌های ارقام خارجی با هم گروه‌بندی شدند. برای تعیین روابط بین جمعیت‌ها براساس داده‌های IRAP، REMAP و ترکیب آن‌ها، از ضریب فاصله نی و الگوریتم Neighbor-Joining استفاده شد. مقایسه نتایج حاصل نشان داد که گروه‌بندی بر اساس داده‌های REMAP متناسب با منشاء و شرایط اکولوژیکی مناطق جمع‌آوری جمعیت‌ها بود.

عنوان صفحه

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱-اهمیت گیاهان دارویی ۳
۱-۲-گل راعی ۳
۱-۲-۱-گیاه شناسی گل راعی ۵
۱-۲-۲-منشا و خاستگاه گل راعی ٦
۱-۲-۳-مواد موثره گل راعی ۷
۱-۳- تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها ۸
۱-۴- کاربرد نشانگرهای DNA در گیاهان دارویی ۹
۱-۵- رتروترانسپوزون‌ها ۹
۱-۵-۱- انواع رتروترانسپوزون‌ها ۱۰
۱-۵-۱-۱- رتروترانسپوزون‌های واجد LTR ۱۱
۱-۵-۱-۲- رتروترانسپوزون‌های فاقد LTR ۱۳
۱-۵-۲- توزیع رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم ۱۳
۱-۵-۳- نقش رتروترانسپوزون‌ها در تکامل ژنوم گیاهان ۱٤
۱-۵-۴- کاربردهای رتروترانسپوزون‌ها ۱۵
۱-۵-۵- استفاده از رتروترانسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای مولکولی ۱٦
۱-۶- نشانگرهای IRAP و REMAP ۱٦
۱-۷- کاربردهای نشانگرهای DNA در گیاهان دارویی ۱۹
اهداف ۲۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۲۲
۲-۲- ارزیابی مولکولی ۲۲
۲-۲-۱- تهیه نمونه‌های برگی جهت استخراج DNA ژنومی ۲۲
۲-۲-۲- استخراج DNA ژنومی ۲۲
۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲٤
۲-۴- آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک‌های IRAP و REMAP ۲۵
۲-۵- تجزیه‌های آماری ۲۷

فصل سوم: نتایج و بحث

3-1- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۲۹
3-2- چندشکلی و اطلاعات ژنومی حاصل از نشانگرها ۳۰
3-2-1- چندشکلی و کارایی نشانگرهای IRAP ۳۰
3-2-2- چندشکلی و کارایی نشانگرهایREMAP ۳٤
3-3- تنوع ژنتیکی درون و بین اکوتیپ‌های گل راعی ۳۹
3-3-1- تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۳۹
3-3-1-1- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ٤۱
3-3-2-روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ٤۳
3-3-2-1- گروه‌بندی براساس نشانگرهای IRAP ٤۳
3-3-2-2- تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) بر اساس داده‌های IRAP ٤٥
3-3-2-3- گروه‌بندی بر اساس نشانگرهای REMAP ٤۷
3-3-2-4- تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) بر اساس داده‌های REMAP ٤۹
3-3-2-5- گروه‌بندی با استفاده از ترکیب داده‌های IRAP و REMAP ٥۱
3-3-2-6- تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) بر اساس از ترکیب داده‌های IRAP و REMAP ٥۱
3-4- گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس داده‌های IRAP و REMA و ترکیب داده‌های آن‌ها ٥٤
نتیجه گیری ٥۷
پیشنهادات ٥۸
منابع مورد استفاده ٥۹

مقدمه

گیاهان دارویی از زمان‌های بسیار دور مورد استفاده جوامع بشری بوده و هر روز کاربرد آن‌ها روند افزایشی داشته است. بطوریکه در بسیاری از کشورهای پیشرفته و درحال توسعه، علاوه بر استفاده از این گیاهان در طب سنتی، در طب نوین نیز حداقل یک دارو با منشاء گیاهی در نسخه‌ها به چشم می‌خورد (امیدبیگی، 1379).

علی‌رغم کاربرد وسیع گیاهان دارویی در صنایع دارویی، آرایشی و صنعت هنوز کشت و کار آن‌ها مانند گیاهان زراعی و باغی رونق چندانی ندارد و بیشتر مواد مصرفی از منابع طبیعی و گیاهان خودرو تامین می-شود. بنابراین، برداشت بی‌رویه و عدم آشنایی جمع‌آوری کنندگان به زیست شناسی، مورفولوژی و نحوه تولید مثل گیاهان دارویی سبب انهدام آن‌ها شده و اغلب این گیاهان را در معرض خطر قرار داده است. در این راستا، زراعی کردن گیاهان دارویی به منظور تامین نیازهای صنایع مختلف و نیز حفظ و نگهداری این ذخایر ژنتیکی با ارزش، امروزه از اولویت‌های بخش کشاورزی بیشتر کشورهای جهان می‌باشد. نیل به هر دو هدف نیازمند جمع‌آوری و تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ژنوتیپ‌ها، گونه‌ها و جنس-های مختلف گیاهان دارویی است (محمدی، 1389).

تعیین سطح تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی و تعیین روابط ژنتیکی گیاهی، گام اولیه و اساسی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان می‌باشد (جوشی و همکاران، 2004). از روش‌های مختلف برای این اهداف استفاده شده است اما کاربرد نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیت‌ها به دلیل فراوانی ژنومی بالا، عدم تاثیرپذیری از عوامل محیطی و امکان بررسی در تمام مراحل رشد و نمو گیاهان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در گیاهان دارویی شناسایی و تمایز ژنوتیپ‌ها، گونه‌ها و جنس-های مختلف علاوه بر اینکه از نظر بررسی تنوع اهمیت دارد، بلکه کیفیت نهایی داروی استحصالی گیاه و

محتوی متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها نیز تحت تاثیر گونه و جنس است. چنین تفاوت‌هایی، مشکلات زیادی را در تعیین و تشخیص گیاهان دارویی، با استفاده از روش‌های کلاسیک (مورفولوژیکی و میکروسکوپی)، ایجاد می‌کند (محمدی، 1389). در این راستا، روش‌های مبتنی برDNA، برای شناسایی گونه‌های گیاهان دارویی و بررسی تنوع ژرم پلاسم‌های آن‌ها مناسب هستند. این امر به ویژه در مواردی که این گیاهان با گونه‌ها یا ارقام دیگر از نظر مورفولوژیکی یا فیتوشیمیایی غیر قابل تشخیص باشند، بسیار مفید می‌باشد (جوشی و همکاران، 2004).

گل راعی از جمله گیاهان دارویی است که به علت کاربردهای مختلف در صنایع دارویی و نیز ظرفیت-های تکاملی و سازگاری مورد توجه قرار گرفته است و مانند اغلب گیاهان دارویی به علت جمع‌آوری‌های بی‌رویه از زیستگاه‌های طبیعی در معرض خطر قرار دارد. بنابراین، تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی اکوتیپ‌های این گیاه می‌تواند گام اول در برنامه‌های اصلاح و حفاظت آن در کشور باشد که استفاده از نشانگرهای مولکولی مناسب نیل به این هدف را امکان‌پذیر خواهد کرد.

فصل اول

بررسی منابع

1-بررسی منابع

1-1-اهمیت گیاهان دارویی

متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی هم نقش‌های فیزیولوژیکی متعدد در چرخه زندگی گیاهان دارند و هم منابع مهم مواد دارویی محسوب می‌شوند (کوثاس و همکاران، 2007). فروش جهانی داروهای گیاهی از فرآورده‌ها و مواد خام با نرخ رشد 5-15% در سال برآورد شده است. در آمریکا درحدود شصت و دو بیلیون دلار کل فروش داروهای گیاهی تخمین زده شده است و احتمال داده می‌شود تا سال 2050 نرخ فروش به پنج تریلیون دلار برسد. در هندوستان نیز صنایع گیاهان دارویی سالانه رشدی در حدود 7-15% دارند چون تقاضا برای استفاده از گیاهان دارویی در تهیه موادشیمیایی گیاهی، مواد غذایی، لوازم آرایشی وفرآورده‌های مختلف افزایش یافته است، محققین هندی صنعت تولید گیاهان دارویی را به عنوان فرصت تجاری مناسب می‌دانند (هالوسکاوا و سلاروا، 1997). از بین گیاهان دارویی گل راعی از لحاظ متابولیت های ثانویه و ظرفیت‌های سازگاری و تکاملی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (بارکاسیا و همکاران، 2006).

1-2- گل راعی

خانواده Clusiaceae حدود 50 جنس و 1200 گونه دارد. جنس Hypericum شامل حدود 450 گونه است که به‌صورت علف‌های یک ساله تا چندساله، بوته و درخت در تمام مناطق معتدل جهان پراکنده است. گونه‌های *H. androsaemum* (tutsam), *H. perforatum* (St Jhon's wort) در استرالیا دارای پراکنش بالا

است (سورهنس و ژو، 2008). دو گونه *H. perforatum* و *H. maculatum* در اروپا رایج می باشد (ANHP، ۲۰۰۵).

گل راعی (*Hypericum perforatum*) با نام انگلیسی St. John's Wort عضوی از جنس Hypericum است که دارای 400 گونه در جهان می‌باشد. گل راعی اتوتتراپلوئید است که از دو برابر شدن کروموزوم‌های گونه اجدادی به وجود آمده است. گونه *perforatum* که در ایران با نام‌های گل راعی، گل هزار چشم، گل شهناز، چای کوهی و هوفاریقون نیز شناخته می‌شود، در مناطق شمال، شمال غرب و شرق، مرکز و جنوب کشور وجود دارد (صمصام شریعت، 1383). گل راعی تاریخچه استفاده طولانی دارد و به عنوان ضد اشتعال، داروی قابض، اختلالات ذهنی و دردهای عصبی و در زمان‌های گذشته به عنوان داروی مسکن، معالجه مالاریا، مرهمی برای زخم‌ها، سوختگی و نیش حشرات استفاده می‌شد. امروزه این گیاه به طور وسیع برای معالجه افسردگی به کار می رود (سورهنس و ژو، 2008).

تکثیر گل راعی با استفاده از ساقه‌های رونده یا بذر صورت می‌گیرد (پوتارود و گیراردین، 2004 و 2005). آپومیکسی یک فرایند رایج (حدود 97%) در تولید مثل گل راعی است (آرنولد اشمیت، 2000) و گونه *perforatum* یک گیاه با آپومیکسی اختیاری است. سیستم ریشه بصورت افقی گسترش می‌یابد و هر بوته حدود 15000 تا 30000 بذر در فصل تولید می‌کند. بذرها در خاک به مدت 10-6 سال توانایی ماندگاری دارند. تکثیر این گیاه معمولا زمانیکه گیاهان بوسیله علف‌چرانی، چمن‌زنی و آتش‌سوزی آسیب می‌بینند، تحریک می‌شود. بذرها بوسیله آب و حیوانات پراکنده می‌گردند. پوشش ژلاتینی بذرها گسترش آن‌ها را به فواصل طولانی توسط عوامل متحرک آسان می‌کند. بذرها همچنین می‌توانند با چسبیدن به چرخ-های وسایط نقلیه و علف‌های خشک شده منتقل شوند. بذرها به 6-4 ماه نیاز دارند تا بتوانند جوانه بزنند و 12 ماه برای آنها تا رسیدن به توانایی (قابلیت) جوانه زنی حداکثرکافی است. بذرها در دمای 25-21 سانتی-گراد بهترین جوانه زنی را دارند. بذرها در خاک‌های عریان، زیر نور خورشید یا بعد از باران‌های سنگین

جوانه‌زنی خوبی دارند. این گیاه در خشکی، خاک سنگریزه‌دار یا خاک‌های شنی رشد می‌کند و می‌تواند 4/3 تا pH 7/6 را تحمل کند. بیشترین مقدار پراکندگی آن در استرالیا در مناطقی با بارش سالیانه 760 میلی‌متر یا بیشتر اتفاق می‌افتد. کنترل گل راعی به عنوان علف‌هرز مشکل است زیرا سیستم ریشه وسیع و دانه‌هایی با طول عمر زیاد دارد. عملیات کشاورزی، وجین، چمن‌زنی یا آتش زدن باعث افزایش آن می‌گردد زیرا تیمارهای مکانیکی باعث تحریک آن می‌شود. برای کنترل گل راعی از سموم علف‌کش استفاده می‌شود، اما روغن موجود در سطح برگ‌ها دامنه استفاده از علف‌کش‌ها را محدود می‌کند. برای مبارزه با آن از کنترل بیولوژیک توسط سوسک‌های برگخوار نیز استفاده شده است (ANHP، 2005؛ سورهنس و ژو، 2008).

1-2-1-گیاه شناسی گل راعی

گل راعی گیاهی چند ساله است. ارتفاع ساقه آن 30-90 سانتی‌متر می‌باشد، ایستا، با شاخه‌های بالایی متعدد، بی‌کرک و صاف، برخی در دو مکان از ساقه های خود برجستگی دارند، رنگ زنگ زده که معمولا در قسمت پایه چوبی می‌باشد. برگ‌ها مقابل هم، بدون دمبرگ، کامل، بیضی یا مستطیل شکل هستند، در حدود 2 سانتی‌متر طول دارند و بی‌کرک با لکه‌های روشن و نقطه‌های حاشیه سیاه هستند که در برابر نور آشکار می‌شوند. (پوآرتاد و گیراردین، 2005؛ ANPH، 2005). گل‌های آن‌ها 4 سانتی‌متر قطر دارند، رنگ گلبرگ‌ها زرد براق و آرایش گل خوشه‌ای است، که پنج گلبرگ با نقطه‌های سیاه کوچک تصادفی در اطراف لبه‌ها دارد. گل‌ها کاسبرگ محدود دارند که خیلی کوچکتر از گلبرگ‌ها است. پرچم‌ها فراوان بوده و در سه گروه مرتب شده‌اند. سه غلاف دانه‌ها (تخمدان) 3سانتی‌متر طول دارد، رنگ آن‌ها قهوه‌ای زنگ زده است و سه سلول کپسول هر کدام با تعداد زیادی دانه دارد. میوه‌ها به این سه اتاق کپسول چسبیده‌اند که شامل هسته متراکم دانه‌ها هستند (ANPH، 2005). در فصل تابستان، این گونه از طریق گل‌آذین گرزن با گل‌های زرد روشن و غده‌های شفاف درونی روی برگ‌های با ظاهر سوراخ‌دار به آسانی شناخته می‌شود، که نام گونه

گیاه از این خصوصیت ناشی می‌شود (پوآرتاد و گیراردین، 2005؛ ANPH، 2005). گل راعی دارای دو مرحله رشدی می‌باشد: 1) در پاییز و زمستان، که به طور یکنواخت رشد می‌کند و دارای حالت روزت با ساقه‌های دوک‌دار و حصیری متراکم از برگ‌ها است. 2) در بهار و تابستان، که ایستاده، شاخه‌دار با یک ساقه یا بیشتر با طول 120-30 سانتی‌متر هستند. ساقه‌ها دو لبه طولی مقابل هم دارند. ریشه آن در حدود یک متر در خاک نفوذ می‌کند. ریزوم‌ها کم عمق هستند که هر سال بخش هوایی تازه از آن‌ها تولید می‌شود. هیپرسین رنگ‌دانه قرمز متمرکز شده در غده‌های روغنی سیاه است و برای احشام زمانیکه مقدار زیادی مصرف کنند سمی است (سورهنس و ژو، 2008).

دو گونه بومی *H. gramineum* و *H. japanicum* با گل راعی از یک جنس می‌باشند و با آن اشتباه گرفته می‌شوند. دو گونه طبیعی می‌توانند با عدم داشتن غده‌های روغنی در برگ‌ها و گلبرگ‌ها تشخیص داده شوند. این دو گونه دارای چهار ناحیه طولی در ساقه و عدم جمع شدن پرچم‌ها در دسته‌ها و خمیدگی در لبه برگ‌ها و گلبرگ‌های کمتر از 8 میلی متر طول (در حالیکه St. Jhon′s Wort دارای گلبرگ‌های با طول بیشتر از 8 میلی‌متر است) هستند، بوته‌های آن‌ها روی زمین خوابیده و پهن هستند و بندرت بیش از هشت سانتی متر طول دارند و برگ‌های آن‌ها کمتر از 10 سانتی‌متر است با این خصوصیات می‌توان آن‌ها را از گل راعی تشخیص داد (سورهنس و ژو، 2008).

1-2-2- منشا و خاستگاه گل راعی

گل راعی بومی اروپا، افریقای شمالی و غرب آسیاست و امروزه در استرالیا، آمریکای شمالی و جنوبی و نیز آفریقای جنوبی یافت می‌شود. در مناطق معتدل این گیاه خارج از زیستگاه‌های اصلی، در کنار جاده ها، علف‌زارها و چراگاه‌ها نیز رشد می‌کند و به عنوان یک علف هرز محسوب می‌شود (ژیلت و رابسون، 1981). در توده‌های پرتراکم گل راعی جایگزین گیاهان مرتعی شده و به عنوان گیاه علوفه‌ای استفاده می

شود (ANPH،2005).

1-2-3-مواد موثره گل راعی

گل راعی دارای تعدادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی شناخته شده شامل نفتودیانترون‌ها[1]، فلوروگلوسینول‌ها[2]، فلاونوئیدها[3]، تانین‌ها[4]، پروسیانیدین‌ها[5]، اسانس‌ها، آمینواسیدها، فنیل‌پروپانوئیدها[6]، زانتون‌ها[7] و سایر ترکیبات محلول در آب می‌باشد. در این میان، نفتودیانترون‌ها مانند هپرسین و سودوهیپرسین از ترکیبات مهم هستند و هیپرسین منبع مهمی برای تهیه ترکیبات دارویی به شمار می آید (صمصام شریعت، 1383). به دلیل اینکه این ترکیبات در مقابل رتروویروس‌ها فعال هستند، به نظر می‌رسد این فراورده‌ها در درمان ایدز مفید باشند. این گیاه از زمان یونانیان و رومیان باستان به عنوان یک گیاه دارویی برای درمان ناهنجاری‌های عصبی و روانی (اضطراب، بی‌خوابی، تند مزاجی، میگرن، خستگی، فیبروزیت، هیستری، درد اعصاب و سیاتیک)، ورم معده، خون ریزی و ناراحتی‌های ریوی استفاده شده است (پیینگ، 1999؛ فیلاندرینوس و همکاران، 2006). امروزه مطالعات زیادی روی تولید و فعالیت هیپرسین و سودوهیپرسین ها انجام می‌شود. عنوان شده است که آن‌ها به عنوان بازدارنده آنزیم‌هایی مانند مونوآمینو-اکسیداز[8] و کتسیل- اُ- متیل ترانسفراز[9] عمل می‌کنند. فرض شده است که این بازدارنده‌ها غلظت فرارسان‌ها را در سیستم عصبی افزایش می‌دهند و به این ترتیب باعث کاهش حالت‌های افسردگی می‌شوند (پوآرتاد و گیراردین، 2005).

[1] - Naphtodianthrones
[2]- Phloroglucinols
[3] - Flavonoids
[4] - Tannins
[5] - Procyanidins
[6] - Phenylpropanoids
[7] - Xanthones
[8]- Monoamino- oxidase
[9]- Catecil- o- methyl transferase

3-1- تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها

به غیر یکنواختی ساختار ژنوتیپی جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی گفته می‌شود. این غیریکنواختی باعث واکنش‌های متفاوت جمعیت‌ها در محیط‌های مختلف شده و توانایی زنده مانی و سازگاری جمعیت در مقابل شرایط نامساعد افزایش می‌دهد (راسل و همکاران، 1997). تنوع ژنتیکی لازمه برنامه‌های به‌نژادی گیاهی است و ماده اولیه مطالعات ژنتیک جمعیت، تکامل و فیلوژنتیکی می‌باشد. همچنین تعیین سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی، اطلاعات مفیدی برای برنامه‌های اصلاحی آن‌ها فراهم می‌کند (چن و همکاران، 2009). علاوه بر این، درمدیریت و حفاظت گونه‌ها، اطلاع از تنوع ژنتیکی ضروری است (وانگ و همکاران، 2007). یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی باعث آسیب‌پذیری آن‌ها در برابر اپیدمی‌ها و عوامل نامساعد محیطی می‌شود که در نتیجه باعث کاهش و افت عملکرد می‌گردد. همچنین شناسایی روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و افراد امکان شناسایی و انتقال ژن‌های عامل تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را از خویشاوندان وحشی به گیاهان زراعی فراهم می‌کند. بنابراین، شرط لازم برای اصلاح و بهبود صفات گیاهی مهم، شناخت ساختار ژنتیکی مجموعه ژرم‌پلاسم است (کمار و بنتزن، 1999).

در فرآیند مطالعه تنوع ژنتیکی تفاوت بین افراد، جمعیت‌ها و یا گروه‌ها با استفاده از روش‌های آماری خاص و براساس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات مختلف، بررسی می‌شود. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده علاوه بر صفات مورفولوژیک، از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای مکمل استفاده می‌شود. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونه‌های گیاهی می‌تواند اطلاعات اساسی برای برنامه‌های به‌نژدای و حفاظت منابع ژنتیکی فراهم کند. برای انتخاب والدین جهت انجام تلاقی-های مطلوب و انتخاب روش اصلاحی مناسب نیز اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها الزامی است (راسل و همکاران، 1997).

1-4- کاربرد نشانگرهای DNA در گیاهان دارویی

اگر چه پتانسیل نشانگرهای مولکولی برای اصلاح کنندگان نبات از حدود 70 سال پیش شناخته شده است، اما کاربرد آن‌ها تا حدود 30 سال پیش به دلیل عدم وجود نشانگرهای مناسب بسیار محدود بوده است (آرنولد اشمیت، 2000). نشانگرهای مبتنی بر DNA برای شناسایی گونه‌ها و تعیین تقلبی بودن گیاهان دارویی، بررسی تنوع گیاهان زراعی و باغی، شناخت گیاهان تراریخته و نیز برای تعیین نحوه تولید مثل گیاهان دارویی استفاده می‌شوند (جوشی و همکاران، 2004). در دو دهه گذشته استفاده از نشانگرهای مولکولی در مطالعات تنوع ژنتیکی، ژنتیک مولکولی، اصلاح مولکولی و ژنتیک جمعیت متداول و کمک زیادی به علوم مختلف کرده است. در نتیجه پیشرفت‌های سریع در زمینه ژنتیک مولکولی انواع متعددی از تکنیک‌ها ابداع شده‌اند که می‌توان از آن‌ها برای مطالعه چند شکلی‌های DNA و انتخاب والدین مطلوب جهت تولد دورگ‌های برتر بهره گرفت. نشانگرهای مولکولی ازنظر ویژگی‌هایی مانند فراوانی ژنومی، سطح چند شکلی قابل شناسایی، جایگاه اختصاصی، تکرارپذیری و نیازهای تکنیکی با هم تفاوت دارند. یک نشانگر به طور کلی برای طیف وسیعی از کاربردها مناسب نیست.

امروزه انواع مختلفی از نشانگرهای DNA در علوم گیاهی برای اهداف مختلف استفاده می‌شوند. نشانگرهای مبنی بر رتروترانسپوزون‌ها نسل نسبتاً جدیدی از نشانگرهای DNA هستند که به‌دلیل چند شکلی بالا و سهولت استفاده، کاربرد فراوانی در مطالعه گونه‌های گیاهی بخصوص در مواردی‌که نشانگر ریزماهواره وجود ندارد، پیدا کرده‌اند (محمدی، 1389).

1-5- رتروترانسپوزون‌ها

DNA تکراری بخش اعظم DNA هسته‌ای گیاهان عالی را تشکیل می‌دهد و بر اساس سازماندهی آن به زیر گروه‌هایی تقسیم می‌گردد. DNAهای تکراری پشت سر هم که شامل، ماهواره‌ها، ماهوارک‌ها و

ریزماهواره‌ها است. گروه دوم شامل DNAهای تکراری پراکنده در سراسر ژنوم می‌باشد. اکثریت این توالی-های پراکنده، عناصر جابجا شونده هستند که براساس نحوه انتقال به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند (فلاول و همکاران 1992). عناصر جابجا شونده گروه اول شامل رتروترانسپوزون‌ها و دیگر رتروالمنت‌ها هستند که ابتدا در ژنوم جانوران و مخمر مشاهده شدند. جابجایی آن‌ها توسط یک RNA حدواسط و ساخته شدن DNA مکمل با استفاده از آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس[1] و درج مجدد در ژنوم رخ می‌دهد. عناصر گروه دوم به صورت نسخه‌های DNA جابجا می‌شوند و شامل ترانسپوزون‌هایی مانند Ac/Dc، En/spm، Mu و ... می‌باشند. ترانسپوزون‌های کوتاه‌تر مانند MITEs[2]ها بیشتر شبیه ترانسپوزون‌های غیرخود جابجا شونده هستند (وسلر و همکاران، 1996). گزارش شده است که رتروترانسپوزون‌ها در تکامل گیاهان نقش دارند و امروزه از آن‌ها به عنوان نشانگرهای DNA برای کاربردهای مختلف استفاده می‌شوند (کاساکوبرتا و سانتیاگو، 2003).

1-5-1-انواع رتروترانسپوزون‌ها

از لحاظ ساختاری، رتروترانسپوزون‌ها به دو گروه رتروترانسپوزون‌های واجد LTR[3] و فاقد LTR تقسیم می‌شوند. رتروترانسپوزون‌های واجد LTR شامل Ty1-copia و Ty3-gypsy هستند و در کلیه گیاهان وجود دارند. در گیاهانی با ژنوم بزرگ تعداد نسخه این گروه به چند میلیون می‌رسد. رتروترانسپوزون‌های فاقد LTR به دو دسته LINEs[4]، SINEs[5] تقسیم می‌شوند که LINEها در ژنوم کلیه

[1] - Reverse transcription

[2] - Miniature inverted-repeat transposable element

[3]-Long terminal repeat

[4]-Long interspersed repetitive elements

[5]-Short interspersed repetitive elements

گیاهان وجود دارند اما SINEها در معدودی از نهاندانگان و بازدانگان یافت می‌شوند (کمار و بنتزن، 1999؛ تودوروسکا، 2007؛ منصور، 2008).

1-5-1-1-رتروترانسپوزون‌های واجد LTR

بطوریکه از نام رتروترانسپوزون‌های واجد LTR مشخص است دو انتهای رتروترانسپوزون با LTR احاطه شده است که تاثیر زیادی در ترکیب و درج رتروترانسپوزون در ژنوم دارد. این توالی بین 100 جفت-باز یا یک کیلوباز طول دارد. این توالی‌های LTR هیچ پروتئینی را رمز نمی‌کنند، بلکه دارای توالی شروع و خاتمه جهت نسخه برداری رتروترانسپوزون‌ها می‌باشد (منصور، 2008).

گروه Ty1-copia

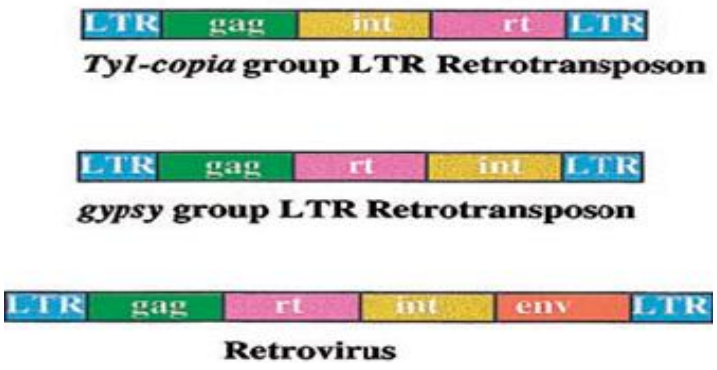
این رتروترانسپوزون‌ها به یک توالی معکوس کوتاه ختم می‌شوند که معمولا بصورت ´5-TG-3´ و ´5-CA-3´ هستند و دارای سه چارچوب قرائت آزاد gag، pol و Int می‌باشند. این ژن‌ها و پروتئین‌های آن‌ها همگی محصول یک مولکول mRNA هستند. بدین ترتیب که پروتئین‌های رمز شده توسط این ژن‌ها بصورت یک پلی‌پروتئین هستند و این پلی‌پروتئین توسط پروتئاز رمز شده توسط توالی pol شکسته می-شود. ژن gag پروتئینی را رمز می‌کند که هم در تمایز ژن pol موثر بوده و همچنین یک آنزیم رونویسی کننده معکوس برای همانندسازی رتروترانسپوزون‌ها را رمز می‌نماید. این آنزیم همچنین نقش ریبونوکلئازی (RNAaseH) را دارد که باعث تجزیه RNA در زمان تولید cDNA می‌شود. ژن Int پروتئینی را رمز می‌کند که به cDNA حاصل از رتروترانسپوزون‌ها در عمل الحاق به ژنوم کمک می‌نماید. در برخی مواقع پروتئین-های gag، Int و pol در یک چارچوب قرائت ترجمه‌ای (TRF)[1] رمز می‌شوند. اما برخی مواقع، دو یا بیشتر

[1]- Translational reading frame

از دو چارچوب وجود دارد که در چارچوب و آغاز ترجمه تغییر ایجاد می‌کند و این تغییر باعث ایجاد اختلاف در بیان ژن‌های مختلف یک رتروترانسپوزون واحد خواهد شد. رتروترانسپوزون‌های واجد LTR ابتدا در هسته به صورت mRNA نسخه برداری شده و سپس برای انتقال به نقاط دیگر ژنوم به DNA دورشته‌ای تبدیل می‌گردند. این رتروترانسپوزون‌ها در صد بالایی از ژنوم را به خود اختصاص داده‌اند (کمار و بنتزن، 1999؛ تودوروسکا، 2007؛ منصور، 2008).

گروه Ty3-gypsy

این گروه بسیار شبیه به گروه اول است و تفاوت اساسی آن‌ها در ترتیب ژن‌های pol و Int می‌باشد. اغلب شبیه به رتروویروس‌ها می‌باشند و مقایسه توالی آنزیم رونویسی معکوس نشان داد که این گروه از رتروترنسپوزون‌های دارای LTR از منشا رتروویروس‌های جانوری هستند. در واقع رتروویروس‌ها از این رتروترانسپوزون‌ها با تکامل کسب ژن env (envolpe) که پوشش پروتئینی ویروس را ایجاد می‌کند، بوجود آمده‌اند (شکل 3-1) (کمار و بنتزن، 1999).



شکل 1-1- تفاوت توالی رتروترانسپوزون‌های واجد LTR و رتروویروس‌ها.