DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.5001

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۵۶-۲۴۲ (۱۳۹۲)

بررسی تنوع ژنتیکی در برخی از توده‌های بابونه (*Matricaria inodora* L.) با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولیRAPD

هادی مهدیخانی[1*]، محمود سلوکی[2] و حسین زینلی[3]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکترای گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
پست‌الکترونیک: hmehdikhani@Gmail.com
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱٤

چکیده

بابونه به دلیل کاربردهای متعدد در صنایع دارویی و بهداشتی، یکی از مهمترین گیاهان دارویی در تجارت جهانی محسوب می‌شود. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی بابونه براساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی، ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود در قالب طرح آگمنت کشت و صفات مختلف مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. چهل و چهار آغازگر تصادفی با توالی‌های ۱۰، ۱۵ و ۱۸ جفت نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت که ۲۹ آغازگر براساس کیفیت و اعتبار نتایج بدست آمده از آزمایشات، انتخاب شدند. برای تعیین تشابه بین توده‌های بومی از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد و گروه‌بندی توده‌ها به روش UPGMA انجام شد. در بین صفات مورد مطالعه، عملکرد گل در بوته، تعداد گل در بوته و وزن هزار دانه بیشترین ضریب تغییرات و روز تا پایان گل‌دهی و روز تا شروع گل‌دهی کمترین ضریب تغییرات را نشان دادند. دامنه ضریب تشابه ژنتیکی بین توده‌های بومی بین ۰/۷۲-۰/۲۰ بود و میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۹ برآورد گردید. تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی، توده‌های بومی مورد مطالعه را به پنج گروه تقسیم نمود ولی توده‌های بومی داخل گروه‌ها با یکدیگر متفاوت بودند. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع ژنتیکی توده‌های جمع‌آوری شده از توزیع جغرافیایی توده‌ها تبعیت نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: بابونه، توده بومی، RAPD، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

بابونه از قدیمی‌ترین و مهمترین گیاهان دارویی است و طی دهه‌های اخیر به سبب کاربردهای متعدد در صنایع آرایشی و بهداشتی جزء مهمترین گیاهان در عرصه تجارت جهانی بوده و مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Omidbaigi, 2000). بابونه به طور کلی به چندین گونه گیاهی گفته می‌شود که همگی از خانواده آفتابگردان بوده ولی از جنس‌ها و گونه‌های متفاوت می‌باشند. از نظر خواص دارویی شباهت زیادی به هم دارند و گل آنها مصرف دارویی دارد. این گیاه از دیرباز در طب سنتی مورد

توجه بوده و مصارف دارویی داشته است (Salamon, 1992). پزشکان یونانی این گیاه را به‌عنوان دارویی مفید برای درمان جمع‌شدگی خون توصیه می‌کردند. همچنین استفاده از چای بابونه برای ورم و التهاب دهان و شستشو توصیه شده است (Martens, 1995). گونه *Matricaria inodora* L. گیاهیست یکساله، به ارتفاع ۱۰۰-۱۵ سانتی‌متر، با ساقه راست و منشعب که در اروپا و آسیا پراکنش دارد. گل‌ها به شکل منفرد در انتهای هر ساقه قرار گرفته و بر خلاف سایر گونه‌های بابونه، فاقد بو می‌باشند. گل‌ها حاوی اسانس است که به صورت منفرد و یا مخلوط با اسانس‌های دیگر در صنایع عطرسازی کاربرد دارد (Letchamo & Marquard, 1993). این گیاه دارای خواص دارویی همانند ضد تشنج، ضدعفونی کننده، ضد التهاب، ضد آلرژی، تقویتی و محرک معده و ضد نفخ می‌باشد (Nirr, 2002; Pourohit & Vyas, 2004; Gosztola *et al.*, 2006).

با توجه به نقش تنوع ژنتیکی در پیشبرد اهداف اصلاح نباتات و اهمیت توده‌های بومی در این خصوص، بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های مولکولی همراه با روش‌های چند متغیره آماری پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی و تنوع ژنتیکی گیاهان دارند (Pandey *et al.*, 2008). نشانگرهایی که سطوح بالایی از تنوع را نشان دهند از کارایی بالایی برخوردار می‌باشند، بنابراین نشانگرهای مبتنی بر DNA مناسب‌ترین روش برآورد تنوع ژنتیکی بشمار می‌روند. نشانگر RAPD نیاز به مقدار کم DNA دارد، از آغازگرهای تصادفی بدون نیاز به داشتن اطلاعات اولیه و قبلی در مورد توالی ژنوم گیاه استفاده می‌شود (Klocke *et al.*, 2002; Kiani *et al.*, 2008) و به دلیل سهولت در ارزیابی روابط ژنتیکی، وقت و هزینه کم، کاربرد فراوان دارد (Ghobadi *et al.*, 2008; Samei *et al.*, 2008).

در تحقیقی Wagner و همکاران (۲۰۰۵) به مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های بابونه کشت شده در آلمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و AFLP پرداختند که ٤ رقم تتراپلوئید، ۲ رقم دیپلوئید، ٤ اینبرد لاین و ۲ جمعیت اصلاحی مواد ژنتیکی این آزمایش بودند. در نهایت این محققان گزارش کردند که نشانگرهای مولکولی برای گزینش ژنوتیپ‌ها قبل از مرحله گل‌دهی در رابطه با عملکرد اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس می‌تواند مناسب باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در ۲۰ توده بومی بابونه آلمانی همراه با ۵ واریته وارداتی از اروپا با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر RAPD نیز توسط Solouki و همکاران (۲۰۰۸) صورت گرفته است. در نهایت گزارش کردند که تجزیه خوشه‌ای ۲۵ جمعیت مورد مطالعه را به ۵ گروه تقسیم کرد و تنوع ژنتیکی توده‌های جمع‌آوری شده از تنوع جغرافیایی توده‌ها تبعیت نمی‌کند. همچنین Pirkhezri و همکاران (۲۰۱۰) به مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در ۲۱ توده بومی بابونه آلمانی همراه با ٤ واریته از مجارستان، آلمان و زراعی ایران با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر RAPD پرداختند. در نهایت گزارش کردند که تجزیه خوشه‌ای ۲۵ جمعیت مورد مطالعه را به دو گروه اصلی تقسیم کرد. در مطالعه‌ای Pirkhezri و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین خصوصیات ۲۳ توده بومی بابونه آلمانی و مقایسه آنها با سه رقم اصلاح شده آلمانی، مجاری و زراعی کشور با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و زراعی پرداختند و اعلام نمودند که تعدادی از توده‌های مورد مطالعه در برخی

صفات مانند تعداد گل در بوته و عملکرد بوته بهتر از ارقام اصلاح شده بودند، بنابراین ظرفیت کشت و کار یا تبدیل شدن به رقم را دارا می‌باشند.

در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به‌عنوان ابزاری توانمند برای شناسایی چند شکلی و مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (Ding *et al.*, 2009 ،Ebrahimi *et al.*, 2009).

در بین نشانگرهای مختلف مولکولی، از نشانگرهای RAPD به طور موفقیت‌آمیزی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات، بررسی روابط خویشاوندی، دسته‌بندی ژرم-پلاسم و شناسایی ارقام در گونه‌های مختلف دارویی از قبیل آویشن (Yavari *et al.*, 2012)، گل‌راعی (Arnoldt-Schmitt, 2002)، کنگر فرنگی (Messmer *et al.*, 2002)، درمنه (Sangwan *et al.*, 1999)، مرزنجوش (Klocke *et al.*, 2002)، انگشتانه (Nebaure *et al.*, 1999)، نعناع (Fenwick & Ward, 2001; Momeni *et al.*, 2006) و بابونه آلمانی (Wagner *et al.*, 2005; Solouki *et al.*, 2008; Pirkhezri *et al.*, 2010) استفاده شده است.

با وجود این‌که بابونه یکی از گیاهان دارویی باارزش بازار جهانی محسوب می‌شود هنوز در کشور ما اطلاعات کافی در زمینه توده‌های بومی موجود در کشور وجود ندارد و مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی بر روی بابونه محدود می‌باشد. این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه (*Matricaria inodora* L.) جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور براساس نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی و بررسی میزان سودمندی و کارایی آغازگرهای تصادفی در ایجاد چندشکلی انجام شد.

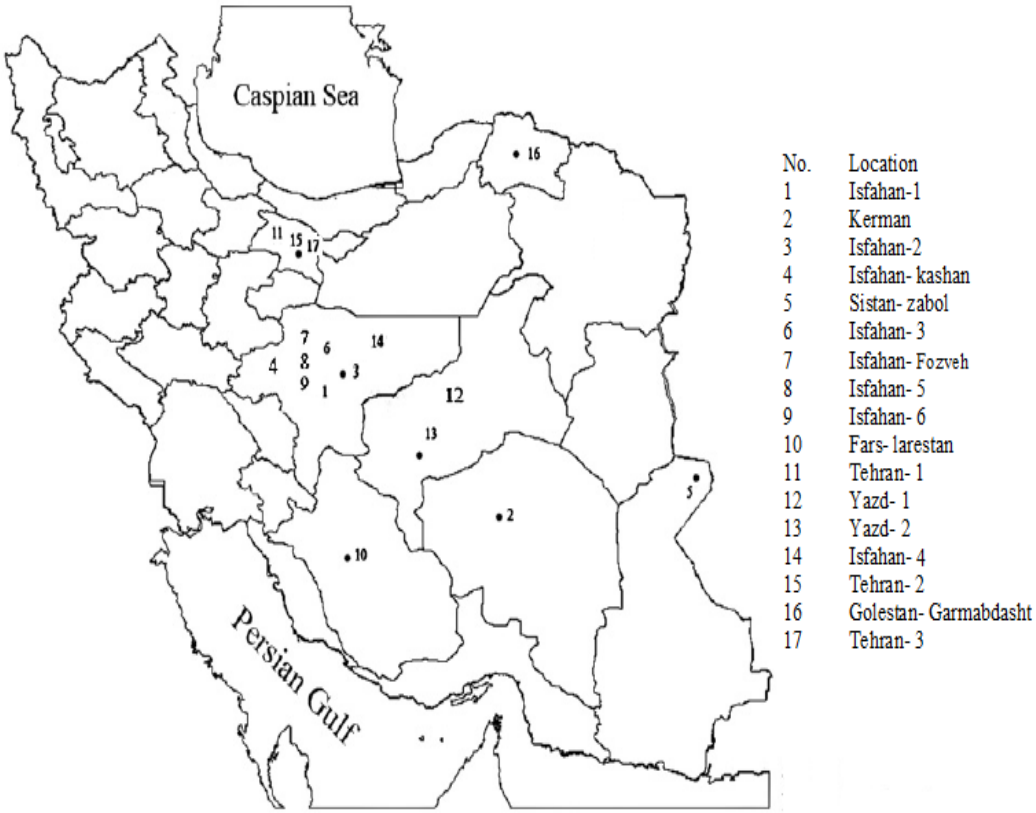
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. استفاده شد که یک نمونه در کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان کشت و نگهداری می‌شد و ۱٦ نمونه دیگر از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود (شکل ۱). برای این‌که نمونه‌های انتخابی بیانگر ژنوتیپ بابونه در هر منطقه باشند، در فصل گل‌دهی، چندین نمونه گیاهی از قسمت‌های مختلف هر منطقه برای انجام آزمایش انتخاب شد.

آزمایش مزرعه‌ای

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۸۵-۱۳۸٤ به صورت کشت پاییزه در ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان واقع در ۲۰ کیلومتری غرب شهر اصفهان به اجرا در آمد. عرض جغرافیایی محل ۳۲ درجه و ۳٦ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲٦ دقیقه شرقی می‌باشد. بذرهای ۱۷ توده بومی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور در قالب طرح آگمنت یا طرح ارزیابی مقدماتی عملکرد با ٤ بلوک و ٤ شاهد (شامل توده-های اصفهان-۱، تهران-۲، اصفهان- فزوه و اصفهان-٤) کشت شدند. به‌منظور تعیین وضعیت یکنواختی زمین، برآورد خطا و کنترل اثرات بلوک‌های ناقص، از ٤ توده شاهد استفاده شد. بذرها بر روی خطوطی به طول ۲ متر در چهار ردیف و به فاصله ٤۰ سانتی‌متر از یکدیگر به صورت سطحی کشت و با لایه نازکی از ماسه پوشانده شد و بعد از کشت آبیاری صورت گرفت. آبیاری از ابتدای کاشت تا زمان برداشت هر هفته یکبار انجام شد.



شکل ۱- نام و محل جمع‌آوری ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L.

در طی مراحل آزمایش و رشد گیاه، زمان شروع گل‌دهی و پایان گل‌دهی به طور مشاهده‌ای برای هر کرت یادداشت گردید. فاصله زمانی بین شروع گل‌دهی تا اتمام گل‌دهی، به‌عنوان طول دوره گل‌دهی در نظر گرفته شد. از دو ردیف میانی هر کرت آزمایشی تعداد ۱۰ بوته به صورت تصادفی انتخاب و صفات ارتفاع بوته، تعداد پنجه، تعداد گل در بوته، قطر گل، طول گل، عملکرد گل در بوته، وزن هزار دانه، درصد ماده خشک گل، تعداد گلچه زبانه‌ای، وزن تر ۱۰۰ گل، وزن خشک ۱۰۰ گل و تعداد شاخه فرعی گل‌دهنده اندازه‌گیری شد. برای محاسبه عملکرد گل در بوته و وزن خشک ۱۰۰ گل به‌ترتیب گل‌های هر بوته و ۱۰۰ گل انتخابی مربوط به هر کرت آزمایشی به مدت ٤٨ ساعت در آون در دمای ٦٨ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس عمل توزین انجام شد. برای تعیین درصد اسانس، ۵۰ گرم از گل‌های هر کرت آزمایشی انتخاب و اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ٤ ساعت انجام شد (Letchamo & Marquard, 1993).

پس از جمع‌آوری داده‌ها ابتدا میانگین، حداقل و حداکثر صفات و ضریب تغییرات آنها محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای توده‌های بومی به روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی برای متغیرهای استاندارد شده از طریق نرم‌افزار SPSS به‌منظور تشریح تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی صورت گرفت. در مرحله بعد برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین گروه‌های حاصل، گروه‌ها به‌عنوان تیمار و توده‌های بومی داخل گروه‌ها به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد و با نرم‌افزار SAS از طریق برنامه مدل خطی عمومی(GLM) تجزیه

گردیدند. سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

بررسی مولکولی

استخراج DNA

مطالعات مولکولی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه زابل به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین توده‌های بومی متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. انجام شد. استخراج DNA به روش تغییر یافته Doyle & Doyle (۱۹۸۷) که توسط Wagner و همکاران (۲۰۰۵) بهینه شده بود، انجام شد. به‌منظور تکثیر DNA مشترک بین بوته‌های هر توده بومی، برگ‌های ۱۰ بوته از هر توده بومی با یکدیگر مخلوط شدند و در نهایت ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی هر توده بومی جهت استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-vis 6405 تعیین شد. از کلیه نمونه‌های DNA، محلول پایه ۲۵ نانوگرمی در هر میکرولیتر تهیه و در واکنش PCR استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای انجام PCR از دستورالعمل Wagner و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (تریس ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۲۰ میلی مولار با pH برابر ۸)، کلرید منیزیم ۲ میلی-مولار، آغازگرهای ۱۰، ۱۵ و ۱۸ نوکلئوتیدی با غلظت ۵ پیکومول، ۰/٤ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی ($dNTP_s$)، ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز و آب دو بار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ ثانیه در ٤۲-۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای هر آغازگر متفاوت بود) و ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله پایانی به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. چهل و چهار آغازگر تصادفی با توالی-های ۱۰، ۱۵ و ۱۸ جفت نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر نمونه DNA سه بار تکرار شد و فقط نوارهای تکرارپذیر برای ارزیابی توده‌های بومی مورد استفاده قرار گرفتند.

محصولات تکثیری پس از بارگذاری در چاهک‌های مجزا توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد در بافر 0.5x TBE در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت تفکیک شدند. از نشانگر اندازه (50 bp DNA Ladder, GeneRuler) برای تشخیص نوارهای مختلف و تفکیک آنها از یکدیگر استفاده شد. الگوهای نواری پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید به کمک دستگاه ژل‌خوان در زیر نور ماوراءبنفش مشاهده شدند و در نهایت عکس‌برداری از نوارها انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

قطعات تکثیری (نوارها) براساس وجود و عدم وجود هر نوار به‌ترتیب با اعداد صفر و یک امتیازدهی شدند. ماتریس صفر و یک براساس داده‌های حاصل از امتیازبندی ژل‌ها تشکیل شد. برای تعیین تشابه بین توده‌های بومی از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard, 1908) استفاده شد. گروه‌بندی توده-های بومی با استفاده از روش UPGMA صورت گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز به‌عنوان مکمل روش تجزیه خوشه‌ای برای توصیف بهتر روابط ژنتیکی میان توده‌های

بومی انجام شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.02 (Rohlf, 1998) انجام شد.

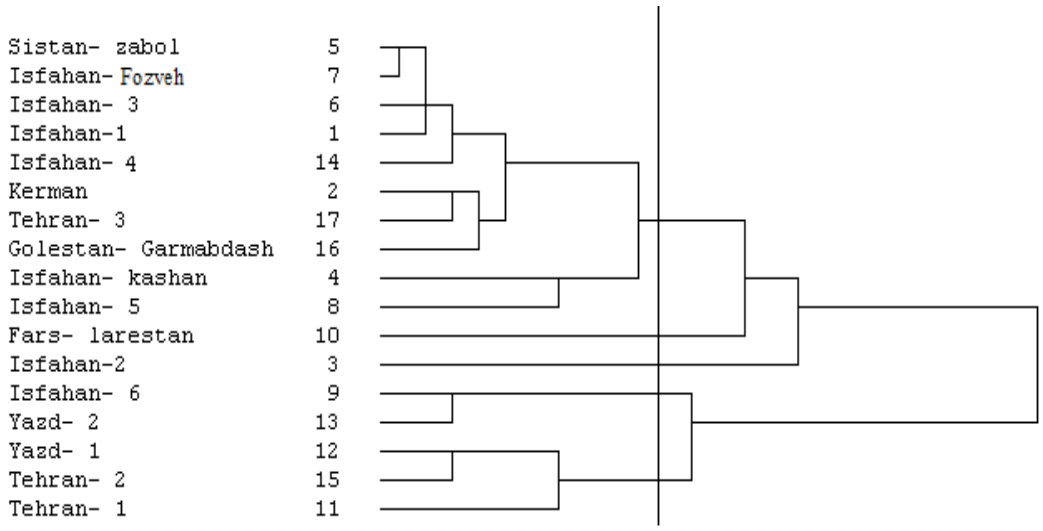
نتایج

بررسی مزرعه‌ای

نتایج تجزیه واریانس برای بررسی یکنواختی زمین آزمایشی نشان داد که اثر بلوک‌های ناقص برای صفت طول گل معنی‌دار بود، بنابراین تصحیح داده‌ها برای این صفت انجام شد. برای سایر صفات تفاوت معنی‌داری بین بلوک‌ها مشاهده نشد و نیازی به تصحیح داده‌ها برای اثر بلوک ناقص نبود. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین توده‌های شاهد نشان داد که این توده‌ها از نظر صفات طول دوره گل‌دهی، ارتفاع، عملکرد گل در متر مربع، وزن تر ۱۰۰ گل، وزن خشک ۱۰۰ گل، درصد ماده خشک گل و درصد اسانس با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند، در مورد سایر صفات اختلاف معنی‌داری بین توده‌ها مشاهده نشد.

نتایج تجزیه‌های آماری نشان داد که صفات عملکرد گل در بوته (CV=۱۱۲/۰۶)، تعداد گل در بوته (CV=۱۰۵/۷۵) و وزن هزار دانه (CV=۱۰۱/۰۶) بیشترین میزان تنوع فنوتیپی را داشتند. درحالی‌که صفات روز تا پایان گل‌دهی (CV=۳/۶۸)، روز تا شروع گل‌دهی (CV=۷/۹۶)، طول گل (CV=۸/۱۱)، تعداد گلچه زبانه‌ای (CV=۸/۷۱) و قطر گل (CV=۹/۹۱) کمترین میزان تنوع فنوتیپی را نشان دادند. در مطالعه حاضر میزان اسانس توده‌های مورد مطالعه بین ۰/۵- ۰/۰۸ درصد برآورد گردید که توده‌های فارس- لارستان و تهران-۱ بیشترین درصد اسانس و توده اصفهان-۳ کمترین درصد اسانس را داشتند.

تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیکی، توده‌های بومی مورد مطالعه را به پنج گروه تقسیم نمود (شکل ۲). سه توده یزد-۱، تهران-۱ و تهران-۲ در گروه پنجم، دو توده اصفهان-۶ و یزد-۱ در گروه چهارم، اصفهان-۲ در گروه سوم، فارس- لارستان در گروه دوم و سایر توده‌ها در گروه اول قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. با استفاده از صفات مورفولوژیک

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که بین گروه‌ها از نظر صفات روز تا پایان گل‌دهی، طول گل، شاخص برداشت، تعداد گلچه زبانه‌ای، عملکرد گل در متر مربع، درصد اسانس و وزن هزار دانه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی برای سایر صفات بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و این اختلاف برای بیشتر صفات ازجمله اجزای عملکرد بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱).

نتایج ماتریس فاصله بین توده‌های بومی نشان داد که توده فارس- لارستان که در گروه دوم قرار داشت بیشترین فاصله را با سایر توده‌های بومی داشت که این فاصله با اصفهان-۲ (۹۱/۸۱) از گروه سوم و تهران-۱ (۹۰/٤) و یزد-۱ (۸٤/۲٦) از گروه پنجم حداکثر بود. از طرف دیگر توده سیستان- زابل که در گروه اول قرار داشت کمترین فاصله را با سایر توده‌های بومی داشت که این فاصله با اصفهان- فزوه (۲/٤۹)، اصفهان-۳ (۵/۵٦) و کرمان (۷/۳۲) از گروه اول کمترین بود.

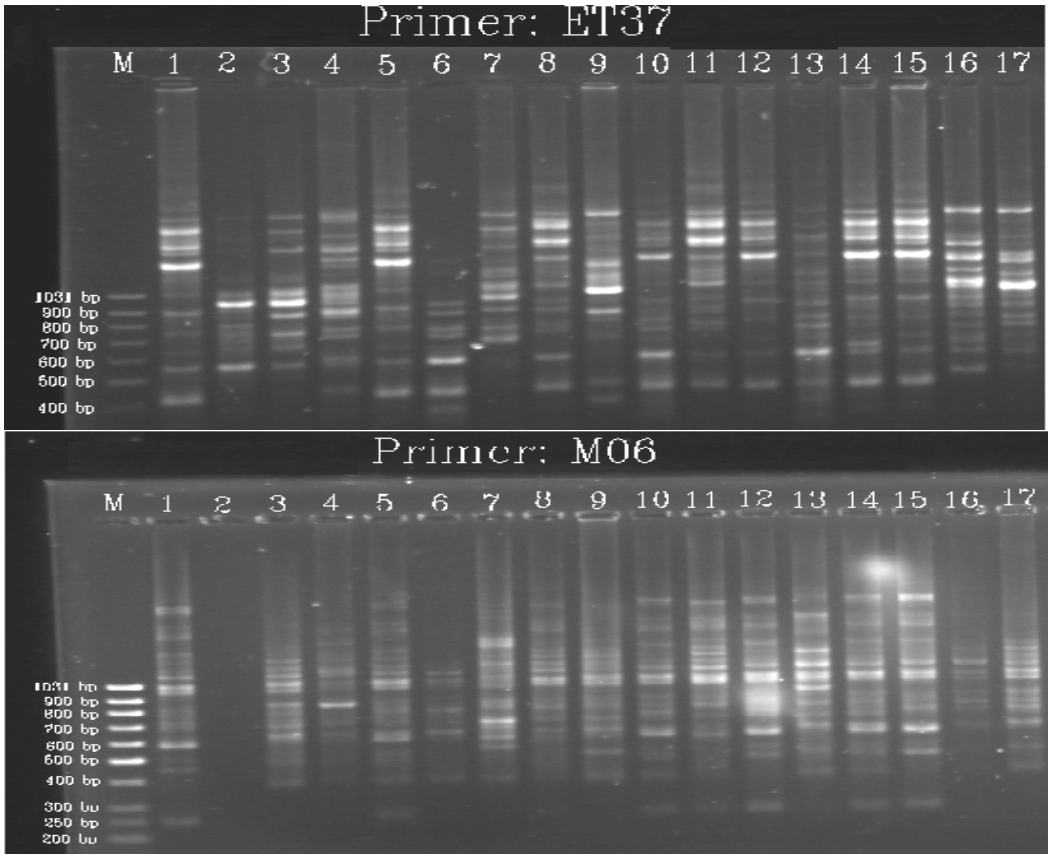
جدول ۱- مقایسه میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس آزمون دانکن در ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L.

صفات	میانگین مربعات	میانگین گروه‌ها				
	بین گروه‌ها	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ٤	گروه ۵
روز تا شروع گل‌دهی	۵۰۲/۲۷*	۱۷۷/٦۵ab	۱٤۸c	۱۷٤ab	۱٦۵bc	۱۹٤a
روز تا پایان گل‌دهی	۱۵۹/٦۵n.s	۲۵۸/۷۵	۲۵۰	۲۵۳	۲٤۲	۲٤۸
طول دوره گل‌دهی	۵۹٦/۰۱**	۸۱/۱b	۱۰۲a	۷۹b	۷۷b	۵٤c
ارتفاع گیاه	۸۲۹/٦۹**	۵۱/۸٦b	۲۳/۷۵c	٦٦/۷ab	۵۸/۰۳ab	۸۱/۸۵a
تعداد پنجه	۵۹/۰۸*	۳/٤۸b	۸/۲ab	۱b	۱٤/۳۲a	۷/۵۳ab
تعداد گل در بوته	۳۹۱٦۹/٤٤*	۷۱/۲٦b	۲۱٦/۵ab	۸/٦b	۳۵۵/٦۸a	۱۲٦/٤b
قطر گل	۱/٤۸*	۷/۸۲ab	۷/٦٤b	۸/۰۵ab	۸/۳۷ab	۹/۳۷a
طول گل	۰/٤٤n.s	٦/۹٦	٦/٦	٦/۷۵	۷/۵۷	۷/٦۱
عملکرد گل در بوته	٤۹/٤۲**	۲/۰۱b	۲/۷۳b	۱/۱۱b	۱۲/٤۲a	۵/۵۱b
شاخص برداشت	۷۸/۸۷n.s	۱۹/۱	۲٦/۰۳	۲۲/٤۸	۲۷/۳	۲۹/۳٦
وزن تر ۱۰۰ گل	۹۰/۲۷**	۱٦/۷۵b	٦/۷٤c	۲٦/٦٤a	۱۸/۱۵b	۲٤/۹۸a
وزن خشک ۱۰۰ گل	۲٤/٦۳**	۲/۹٦b	۱/۲٦c	۱۲/۹٤a	۳/۳۹b	٤/٤۱b
تعداد شاخه گل‌دهنده	۳۸۵/۵۹**	۹/۷b	۵۰/۵a	۱۱b	۱۱/۵b	۱۰/۲b
وزن هزار دانه	۰/۰۲n.s	۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
عملکرد گل در متر مربع	۲۸۰۱/۱۹n.s	۹۸/۷۵	۱۰۲/٦۹	٦۵/۵۳	۸۰/۷۹	۱۵٦/۸۹
درصد ماده خشک گل	۲۲٤/۲۱**	۱۷/۵۲b	۱۸/٦۹b	٤۸/۵۷a	۱۸/٦۳b	۱۷/٦٦b
درصد اسانس	۰/۰۲n.s	۰/۳۳	۰/۵	۰/۲	۰/۲	۰/۳۷
تعداد گلچه زبانه‌ای	۱/۱۵n.s	۱۹/۵۱	۱۷/٤۱	۱۹/٦٦	۱۹/۸۵	۱۹/۵۸

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد ، n.s عدم اختلاف معنی‌دار در هر ردیف اعداد دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بررسی مولکولی

دامنه نوارهای انتخابی بین ۱۵۰۰–۴۰۰ جفت باز بود و اغلب نوارهای مورد مطالعه در محدوده ۱۰۰۰–۶۰۰ جفت بازی قرار داشتند. چهل و چهار آغازگر با تـوالی‌هـای ۱۰، ۱۵ و ۱۸ جفت نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفـت کـه ۲۹ آغازگر براساس کیفیت و اعتبار نتایج به‌دست آمـده از آزمایشات، انتخـاب و ۱۵ آغـازگر دیگـر کـه محصـولات تکثیر شده آنها وضوح و تکرارپذیری کافی نداشتند حذف گردیدند. نمونه‌ای از الگوی نواری ایجاد شده با استفاده از دو آغــازگر ۱۰ نوکلئوتیــدی (M06) و ۱۸ نوکلئوتیــدی (ET37) در شکل ۳ نشـان داده شـده اسـت. تعـداد نـوار تکثیر شده و نوار چند شکل تولیـدی توسـط آغازگرهـای مختلف متفاوت بود، به‌نحوی‌که دامنـه تعـداد نـوار تولیـد شده بین ۲۲–۸ نوار و دامنه تعداد نوار چند شکل تولیـدی بین ۲۱–۵ بود (جدول ۲). درصد چنـد شـکلی آغازگرهـا بین ۱۰۰–۵۰ درصد متغیر بود که آغازگرهـای M-04، N-12، IT34 و ET38 با ۱۰۰ درصد چند شـکلی و آغـازگر C-05 بـا ۵۰ درصـد چنـد شـکلی بـه‌ترتیـب بیشـترین و کمتـرین درصـد چنـد شـکلی را داشـتند (جـدول ۲). در مجموع ۲۹ آغازگر مورد مطالعه، ۳۶۹ نوار تکثیـر نمودنـد که از این تعداد ۳۱۴ نوار (۸۵/۰۹ درصد) در بین توده‌های بومی مورد مطالعه چند شـکل بودنـد و ۵۵ نـوار (۱۴/۹۱ درصد) در بین تمام توده‌های بومی یک شکل بودند.



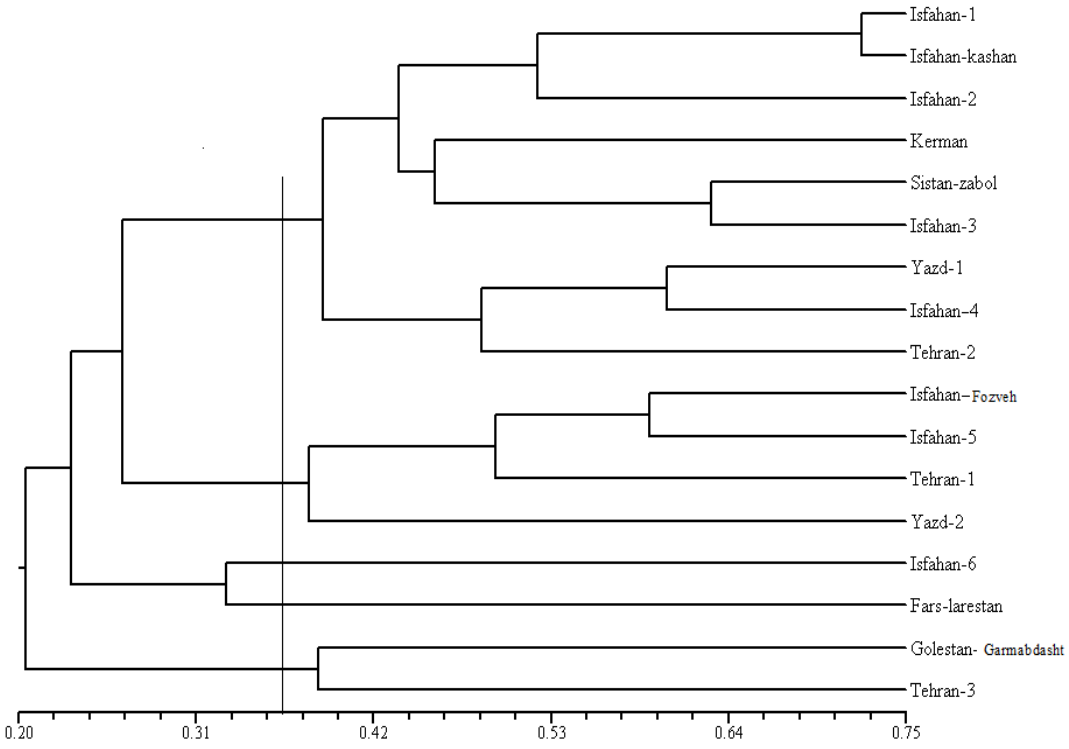
شکل ۳- الگوی نواری ایجاد شده در ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. با استفاده از دو آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی (M06) و ۱۸ نوکلئوتیدی (ET37)

(M: نشانگر اندازه، توده‌های بومی براساس جدول ۱ شماره‌گذاری شده‌اند).

جدول ۲- نوع، توالی، تعداد نوار تکثیر شده و چند شکل و درصد چند شکلی تولید شده با استفاده از نشانگر RAPD در ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L.

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (5'_3')	تعداد نوار تکثیر شده	تعداد نوار چند شکل	درصد چند شکلی
OP-F-01	ACGGATCCTG	۱۳	۱۱	۸٤/٦۱
OP-M-02	ACAACGCCTC	۱۵	۱۱	۷۳/۳۳
OP-M-04	GGCGGTTGTC	۹	۹	۱۰۰
OP-M-06	CTGGGCAACT	۱۳	۱۰	۷٦/۹۲
OP-N-05	ACTGAACGCC	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳
OP-C-05	GATGACCGCC	۱۰	۵	۵۰
OP-C-11	AAAGCTGCGG	۱۰	۷	۷۰
OP-F-03	CCTGATCACC	۹	۷	۷۷/۷۸
OP-C-04	CCGCATCTAC	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳
OP-Q-16	AGTGCAGCCA	۱۲	۹	۷۵
OP-N-16	AAGCGACCTG	۱٤	۱۳	۹۲/۸٦
OP-N-15	CAGCGACTGT	۱۳	۱۲	۹۲/۳
OP-N-14	TCGTGCGGGT	۱۱	۸	۷۲/۷۳
OP-N-12	CACAGACACC	۹	۹	۱۰۰
OP-N-06	GAGACGCACA	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳
IT1	CGGCAGGTCAGGTAAGT	۱٤	۱۳	۹۲/۸٦
IT2	GCAGAGGGCCAGGTAAGT	۱۷	۱۳	۷٦/٤۷
IT4	CGCGGAGAGCAGGTAAGT	۱٤	۱۳	۹۲/۸٦
IT33	GATGCCCCAGGTAAG	۱٤	۱۳	۹۲/۸٦
IT34	GCGGCATCAGGTAAG	۱۳	۱۳	۱۰۰
IT36	GTCGACCCAGGTAAG	۲۲	۲۱	۹۵/٤۵
ET35	ACCTACCTGCCGCAG	۱٦	۱۵	۹۳/۷۵
ET36	ACCTACCTGGGGCTC	۱٦	۱۳	۸۱/۲۵
ET37	ACTTACCTGAGGCGCGAC	۱۳	۱۲	۹۲/۳
ET38	ACTTACCTGCTGGCCGGA	۱۲	۱۲	۱۰۰
ET39	ACTTACCTGGCCAGCTGC	۱٤	۱۰	۷۱/٤۲
ET40	ACTTACCTGCCTGCCGAG	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
ET41	ACTTACCTGGCACGCCTC	۱۱	۹	۸۱/۸۲
ET42	ACTTACCTGCCTACGCGG	۸	٦	۷۵

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش مولکولی، توده‌های بومی مورد مطالعه را در پنج گروه مجزا قرار داد که دو توده تهران- ۳ و گلستان-گرمابدشت در گروه پنجم، فارس-لارستان در گروه چهارم، اصفهان-٦ در گروه سوم، چهار توده یزد-۲، تهران- ۱، اصفهان-۵ و اصفهان- فزوه در گروه دوم و نه توده دیگر همگی در گروه اول قرار گرفتند (شکل ٤). به‌منظور آزمون نکوئی برازش دندروگرام رسم شده با ماتریس تشابه ژنتیکی در توده‌های بومی مورد بررسی ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد که میزان آن r=۰/۹۹ برآورد شد که نکوئی برازش دندروگرام با ماتریس تشابه را تأیید نمود.



شکل ٤- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ توده بومی بابونه متعلق به گونه *Matricaria inodora* L. با استفاده از نشانگر RAPD

برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین توده‌های بومی و همچنین برای مشاهده فواصل ژنتیکی به صورت چند بعدی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز مکمل با روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از داده‌های روش مولکولی نشان داد که سه مؤلفه اصلی ٥٥/٧٦ درصد از کل واریانس را توجیه کردند. مؤلفه اول ٤٣/٦٦ درصد، مؤلفه دوم ٦/٧٣ درصد و مؤلفه سوم ۵/۳۷ درصد از کل تغییرات موجود را توجیه کردند.

بحث

نتایج تجزیه‌های آماری نشان داد که صفات عملکرد گل در بوته، تعداد گل در بوته و وزن هزار دانه بیشترین میزان تنوع فنوتیپی را داشتند، بنابراین گزینش برای این صفات

شانس موفقیت بالایی را دارد. درحالی‌که صفات روز تا پایان گل‌دهی، روز تا شروع گل‌دهی، طول گل، تعداد گلچه زبانه-ای و قطر گل، کمترین میزان تنوع فنوتیپی را نشان دادند که نشانگر عدم موفقیت در گزینش احتمالی برای این صفات می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه آماری یک متغیره با نتایج Pirkhezri و همکاران (۲۰۰۸) و Solouki و همکاران (۲۰۰۸) بر روی بابونه آلمانی مطابقت دارد. در مطالعه Pirkhezri و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۳ توده بومی بابونه آلمانی جمع‌آوری شده از غرب و جنوب غربی کشور نیز عملکرد گل در بوته، تعداد گل در بوته و درصد اسانس به‌ترتیب بیشترین ضریب تغییرات را داشتند، درحالی‌که صفات طول دوره رویشی، ارتفاع گیاه، تعداد گلچه زبانه‌ای و قطر گل با ضریب تغییرات کمتر از ۱۰، کمترین تنوع را داشتند. در مطالعه Solouki و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۰ جمعیت بابونه آلمانی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور عملکرد گل در بوته، تعداد گل در بوته و درصد اسانس به‌ترتیب بیشترین ضریب تغییرات را داشتند، درحالیکه صفات فنولوژیک، قطر گل و طول گل کمترین ضریب تغییرات را داشتند. در مطالعه Taviani و همکاران (۲۰۰۲) بر روی ۱۵ جمعیت بابونه آلمانی جمع‌آوری شده از اروپا، تنوع بالایی برای عملکرد و صفات کیفی گزارش شد.

در تحقیقی Pirkhezri و همکاران (۲۰۰۸) میزان اسانس توده‌های مورد مطالعه داخلی را بین ۰/۷۵–۰/۲ درصد گزارش نمودند و اعلام کردند که توده‌های دارای بیش از ۰/۷ درصد اسانس، توده‌های مطلوبی هستند. در مطالعه‌ای Solouki و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۰ توده بومی بابونه آلمانی کشور میزان اسانس توده‌های مورد مطالعه را بین ۰/۸–۰/۱ درصد گزارش نمودند و اعلام کردند که بین توده‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در مطالعه Taviani و همکاران (۲۰۰۲) اسانس جمعیت‌های اروپایی بابونه آلمانی بین ۰/۸۹–۰/۲۹ درصد برآورد گردید ولی بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، درحالی‌که Letchamo و همکاران (۲۰۰۶) درصد اسانس را برای بابونه‌های جمع‌آوری شده از بازار آمریکای شمالی بین ۰/۴۷–۰/۲۱ درصد گزارش کردند. در مطالعه حاضر میزان اسانس توده‌های مورد مطالعه بین ۰/۵–۰/۰۸ درصد برآورد شد که در مجموع به نظر می-رسد توده‌های بومی گونه *Matricaria inodora* L در مقایسه با گونه *Matricaria chamomilla* L درصد اسانس کمتری دارند.

دامنه ضریب تشابه ژنتیکی محاسبه شده براساس نشانگر RAPD بین توده‌های بومی بین ۰/۷۲–۰/۲۰ بود و میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۹ برآورد شد. در مطالعه Solouki و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۵ توده بومی بابونه آلمانی ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۶۳–۰/۱۵ گزارش شد که میانگین ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۳۵ برآورد شد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر شباهت بسیاری دارد و هر دو بیانگر وجود تنوع ژنتیکی مطلوب در توده‌های بومی داخل کشور می‌باشد. همچنین در مطالعه Pirkhezri و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ۲۵ توده بومی بابونه آلمانی ضریب تشابه ژنتیکی بین ۰/۷۸–۰/۱۵ گزارش شد. درحالی‌که در مطالعه Wagner و همکاران (۲۰۰۵) بر روی ۱۳ جمعیت بابونه آلمانی مورد کشت در آلمان، ضریب تشابه ژنتیکی با استفاده از RAPD بین ۰/۹۵–۰/۶۸ و با استفاده از AFLP بین ۰/۸۸–۰/۷۴ گزارش شد که مؤید وجود شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد کشت در آلمان می‌باشد. تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت-های بومی نشان می‌دهد که این جمعیت‌ها منابع ژنتیکی

باارزشی برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

به‌منظور آزمون نکوئی برازش دندروگرام رسم شده با ماتریس تشابه ژنتیکی در توده‌های بومی مورد بررسی ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد که میزان آن r=۰/۹۹ برآورد شد که نکوئی برازش دندروگرام با ماتریس تشابه را تأیید می‌نماید. بالا بودن ضریب همبستگی کوفنتیک بیانگر ارائه صحیح روابط موجود بین توده‌های بومی از طریق ترسیم دندروگرام می‌باشد. در مطالعه Solouki و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی، ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۸۶ و در مطالعه Pirkhezri و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی، ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۹۵ برآورد شد. در مطالعه Wagner و همکاران (۲۰۰۵) بر روی جمعیت‌های بابونه آلمانی برای RAPD ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۹۳ و برای AFLP ضریب همبستگی کوفنتیک r=۱ گزارش شد.

نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع ژنتیکی توده‌های جمع‌آوری شده از توزیع جغرافیایی توده‌ها تبعیت نمی‌کند. به‌طوری‌که هیچ ارتباطی بین محل جمع‌آوری و فاصله ژنتیکی بین توده‌های بومی مشاهده نشد و توده‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه لزوماً شبیه به هم نبوده و فاصله ژنتیکی بسیاری با هم داشتند. نتایج مشابهی در بابونه آلمانی توسط Solouki و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است که اعلام کردند تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه آلمانی از توزیع جغرافیایی آنها تبعیت نمی‌کند. درحالی‌که در مطالعه Wagner و همکاران (۲۰۰۵) بر روی بابونه آلمانی، تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد که این تقسیم‌بندی با منشأ ژنوتیپ‌ها مطابقت داشت ولی با ترکیبات شیمیایی رابطه‌ای نداشت. در مطالعه‌ای Wagner و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که نشانگرهای مولکولی برای گزینش ژنوتیپ‌ها قبل از مرحله گل‌دهی در رابطه با عملکرد اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس می‌تواند مناسب باشد.

تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیکی و مولکولی، توده‌های بومی مورد مطالعه را به پنج گروه تقسیم نمود ولی توده‌های بومی داخل گروه‌ها با یکدیگر متفاوت بود. نتایج مشابهی در بابونه آلمانی توسط Solouki و همکاران (۲۰۰۸) و Pirkhezri و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است. صفات مورفولوژیکی تحت تأثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرند که این عوامل در سطح DNA بی‌تأثیر هستند. این عوامل سبب می‌شود تا ژنوتیپ‌هایی که براساس داده‌های موجود در سطح DNA نزدیک به هم هستند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت باشند. به علاوه اینکه قطعات تکثیر یافته در RAPD الزاماً از نظر توالی نوکلئوتیدی یکسان نیستند و قطعه‌های با اندازه یکسان ممکن است متعلق به قسمت‌های مختلف ژنوم و دارای توالی متفاوت باشند. بنابراین داده‌های RAPD ممکن است هم‌سویی مورد انتظار را با خصوصیات مورفولوژیکی نداشته باشند. این امر با توجه به تأثیرپذیری صفات مورفولوژیکی از محیط دور از انتظار نیست، پس در برنامه‌های اصلاحی اگر گزینش فقط براساس صفات مورفولوژیکی باشد ممکن است نتایج مطلوبی نداشته باشد.

نشانگرهای مولکولی RAPD برای ارزیابی و مطالعه تنوع ژنتیکی ذخایر گیاهی که هیچ گونه اطلاعات اولیه برای DNA ژنومی و تنوع بین آنها وجود ندارد، ابزاری ساده و کارآمد می‌باشند. اطلاع از روابط ژنتیکی گونه‌های

وحشی برای بهره‌وری موفق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود آنها ضروریست. ارزیابی تنوع ذخایر ژنتیکی گیاهی که از شانس بالایی برای بروز ژن‌های مفید برخوردار می‌باشند از اولین پیش‌نیازهای ضروری برای برنامه‌ریزی در جهت حفاظت، اهلی‌کردن و بهره‌برداری پایدار از آنها می‌باشد.

به‌طورکلی با توجه به نتایج این تحقیق و همسویی آن با نتایج به‌دست آمده توسط Solouki و همکاران (۲۰۰۸)، Pirkhezri و همکاران (۲۰۱۰) و Wagner و همکاران (۲۰۰۵) می‌توان اعلام نمود که روش RAPD روشی مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه بابونه می‌باشد. برای بررسی تنوع ژنتیکی بابونه، داده‌های مورفولوژیکی و نشانگر RAPD مکمل یکدیگرند. با توجه به اینکه روش‌های مولکولی، تنوع ژنتیکی را در سطح DNA، یعنی منشأ تمام خصوصیات گیاه مورد ارزیابی قرار می‌دهند، بنابراین گروه‌بندی براساس داده‌های حاصل از آن می‌تواند مکمل تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مورفولوژیک باشد. ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی به وسیله استفاده از تعداد زیادی نشانگر همراه با صفات مورفولوژیک محقق می‌گردد. در مجموع نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق وسیله سودمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، تشخیص و شناسایی سریع و قابل اعتماد توده‌های بومی بابونه می‌باشد. البته توصیه می‌شود از نشانگرهای مولکولی کارآمدتر که دارای چند شکلی زیاد و فراوانی بیشتر در ژنوم می‌باشند در شناسایی و ارتباط ژنتیکی توده‌های بومی بابونه استفاده شود.

با توجه به وجود تنوع ژنتیکی بالا برای صفات زراعی مختلف بین توده‌های بومی مورد مطالعه به خصوص در مورد عملکرد و اجزای عملکرد، از طریق برنامه‌های به‌نژادی و گزینش، می‌توان اقدام به تولید ارقام مطلوب از نظر عملکرد گل، وضعیت رشدی و سایر خصوصیات نمود؛ اما در مورد درصد اسانس با توجه به تنوع ژنتیکی پایین و مقادیر کم برای توده‌های بومی این قضیه صادق نیست.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشگاه زابل و ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان که بودجه و امکانات لازم را جهت انجام این تحقیق فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری آقای مهندس امام جمعه مسئول آزمایشگاه و خانم سارانی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک مولکولی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

–Arnoldt-Schmitt, B., 2002. Characterization of *Hypericum perforatum* plants from various accessions by RAPD fingerprinting. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(2/3): 163-169.

–Ding, G. , Li, X., Ding, X. and Qian, L., 2009. Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers. Genetika, 45(3): 375-382.

–Doyle, J.F. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Buletinl, 19: 11-15.

–Ebrahimi, R., Zamani, Z. and Kashi, A., 2009. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 119(4): 345-351.

–Fenwick, A.L. and Ward, S.M., 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. Horticulture Science, 36: 761–764.

–Ghobadi, C., Khosh-khui, M. and Sayed-Tabatabaei, B. E. 2008. Aalysis of genetic relatedness and variation among some genotypes of grapevine grown in Isfahan province using randomly amplified polymorphic DNA markers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 12 (45): 627-635.

quantitative traits and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 118: 80–86.

–Pirkhezri, M., Hassani, M. E. and Fakhretabatabai, M., 2008. Evaluation of genetic diversity of some German chamomile populations (*Matricaria chamomilla* L.) using some morphological and agronomical characteristics. Journal of Horticultural Sciences, 22 (2): 87-98.

–Pirkhezri, M., Hassani, M. E. and Hadian, J., 2010. Genetic diversity in different populations of *Matricaria chamomilla* L. growing in southwest of Iran, based on morphological and RAPD markers. Research Journal of Medicinal Plant, 4(1): 1-13.

–Pourohit, S.S. and Vyas, S.P., 2004. Medicinal plants cultivation. Agrobios, India, 624 pp.

–Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter Software, New York.

–Salamon, I., 1992. Chamomile, a medicinal plant. The Herb, Spice and Medicinal Plant, 10: 1-4.

–Sangwan, R.S., Sangman, N.S., Jain, D.C., Kumar, S. and Ranade, S.A., 1999. RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variation of *Artemisia annua*. Biochemistry and molecular biology international, 47: 935-944.

–Samei K, Arzani, A. and Mirmohammadi Maibody, S. A. M., 2008. Genetic Diversity of Persian Clover Populations Using Semi-Random Markers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 12 (45): 157-164.

–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: 281-287.

–Taviani, P., Rosellini, D. and Veronesi, F., 2002. Variation for agronomic and essential oil traits among wild population of *Chamomilla recutita* L. from central Italy. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(4): 359-365.

–Yavari, A. R., Sefidkon, F., Zamani, Z. and Hassani, M. E., 2012. Evaluation of genetic diversity among and within some endemic populations of *Thymus migricus* Klokov & Desj.-Shost using RAPD molecular markers**.** Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(1): 35-47.

–Wagner, C., Friedt, W., Marquard, R. and Frank, O., 2005. Molecular analysis on the genetic diversity and inheritance of (-) α-bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*Chamomilla recutita*). Plant Science, 169: 917-927.

–Gosztola, B., Nemeth, E., Kozaka, A., Sarosi, Sz. and Szabo, K., 2006. Comparative evaluation of Hungarian chamomile (*M. recutita*) populations. Abstracts of the I International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. Presov University in Presov, Slovak, 2006: 34.

–Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sue la distribution florate. Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles, 44: 223-270.

–Kiani, M., Zamani, Z., Khalighi, A., Fatahi, R. and Byrne, D.H., 2008. Wide genetic diversity of *Rosa damascena* Mill. germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. Scientia Horticulturae, 115(4): 386–392.

–Klocke, E., Langbehn, J., Grewe, C. and Friedrich, P., 2002. DNA fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana.* Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9(2/3): 171-176.

–Letchamo, W. and Marquard, R., 1993. The pattern of active substances accumulation in chamomile genotypes under different growing conditions and harvesting frequencies. Acta Horticulture, 331: 357-361.

–Letchamo, W., Gosselin, A. and Lisin, G., 2006. Chamomile varieties and quality improvement issues. Abstracts of the I International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. Presov University in Presov, Slovak, 2006: 33.

–Martens, D., 1995. Chamomile: the herb and the remedy Prover. The Journal of the Chiropractic Academy of Homeopathy, 6: 15-18.

–Messmer, M., Scheider, E., Stekly, G. and Buter, B., 2002. Determination of the progenitors and the genetic stability of the artichoke cultivar saluschocke using molecular markers. Journal of Herbs, Spices and Medicinal plants, 9(2/3): 177-182.

–Momeni, S., Shiran, B. and Razmjoo, K., 2006. Genetic variation in Iranian Mints on the bases of RAPD analysis. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(10): 1898-1904.

–Nebaure, S.G., Castillo-Agudo, L. and Segura, J., 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved faxglove (*Digitalis obscura* L.). Theoretical and Applied Genetics, 98: 985-994.

–Nirr, B., 2002. Herbs cultivation & their utilization. Published by Asia Pacific Business Press Inc. Delhi, India, 483 p.

–Omidbaigi, R., 2000. Production and Processing of Medicinal Plants. Fekr-e-roz, Tehran, 247 pp.

–Pandey, S., Kumar, S., Mishra, U., Rai, A., Singh, M. and Rai, M., 2008. Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by

Study of genetic diversity in several scentless chamomile landraces (*Matricaria inodora* L.) based on morphological traits and RAPD molecular markers

H. Mehdikhani[1*], M. Solouki[2] and H. Zeinali [3]

1*- Corresponding author, Ph.D. Student, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. Iran
E-mail: hmehdikhani@gmail.com
2- Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, Zabol University, I.R. Iran
3- Assis. Prof., Agriculture and Natural Resources Research Center, Isfahan, I.R. Iran

Received:.04.04.2011 Accepted:.05.04.2013

Abstract

Chamomile is one of the most important medicinal plants in commerce that has many applications in drug and sanitary industries. In order to evaluate the genetic diversity of different scentless chamomile landraces (*Matricaria inodora* L.) based on morphological traits and molecular markers, 17 landraces were collected from different areas of Iran. In order to evaluate the morphological traits, the landraces were planted in an augmented design in Fozveh station of Agriculture Research Center of Isfahan. Forty-four arbitrary 10, 15 and 18-mer primers were used for PCR amplification of total genomic DNA. Twenty nine primers were selected based on the quality and reliability of their amplification. Genetic similarity between the genotypes was estimated using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method of cluster analysis was conducted on the collected data. Results showed that yield of flower per plant, number of flower per plant, and 1000 grain weight had maximum variance coefficient. Days to end of flowering and Days to flowering had minimum variance coefficient. Genetic similarity coefficient was estimated in a range of 0.20–0.72, with a mean of 0.39. According to the cluster analysis on both morphological and molecular markers, the studied landraces were classified into 5 clusters, but intra-groups landraces were different. Results of cluster analysis showed that genetic diversity was not coordinated to the geographical distribution.

Key words: Scentless Chamomile, Landrace, RAPD and Cluster analysis.