

بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی برخی از جمعیت‌های پونه‌سا گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS

امین باقی‌زاده^{۱*}، زهرا مشایخی^۲ و محمدعلی ابراهیمی^۳

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته،

کرمان، ایران، پست الکترونیک: amin_4156@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۶

چکیده

پونه‌سا گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.)، یک گیاه دارویی، اسانس‌دار و معطر متعلق به خانواده نعناعیان است که به نام نعناع گربه‌ای معروف است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی قسمتی از ژرم‌پلاسم پونه‌سا گربه‌ای با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS بررسی شد. اندام‌های هوایی این گیاه از رویشگاه‌های مختلف جمع‌آوری و بعد به‌دور از نور خورشید خشک شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام گردید. از ۱۱ آغازگر تصادفی RAPD برای واکنش PCR استفاده شد. ۱۵ جمعیت مورد بررسی براساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به ترتیب در چهار و پنج گروه قرار گرفتند. از ۱۵ جمعیت جمع‌آوری شده، ۸ جمعیت مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار گرفت. استخراج اسانس با روش تقطیر با آب و با کلونجر انجام شد. تعداد ۲۷ ترکیب از اسانس همه جمعیت‌ها شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از GC/MS، ۱۰۰٪ ترکیب‌های اسانس در جمعیت‌های سیرج، محمدآباد مسکون، سقدر ۲، دلفارد ۲ و میجان ۲ شناسایی شد. در نمونه‌های دهبکری، دلفارد ۱ و سقدر ۱ به ترتیب ۹۴/۸۴٪، ۹۹/۸٪ و ۹۶/۶٪ ترکیب‌های اسانس شناسایی شد. سه ایزومر نیتالاکتون بخش عمده ترکیب‌های اسانس را تشکیل دادند. بتا-کاریوفیلین، کاریوفیلین اکساید، بتا-پینن و آلفا-پینن نیز از ترکیب‌های اصلی اسانس بودند. براساس تجزیه خوشه‌ای بر روی داده‌های GC/MS، جمعیت‌های مورد نظر در ۳ گروه طبقه‌بندی شدند. مقایسه ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد که اسانس این ۸ جمعیت از لحاظ کمی و کیفی با هم متفاوتند که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اکولوژیکی مناطق رویش این جمعیت‌ها مانند تفاوت رطوبت، دما و ارتفاع از سطح دریا و یا سایر عوامل خاکی، جغرافیایی و ژنتیکی باشد.

واژه‌های کلیدی: پونه‌سا گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.)، تنوع ژنتیکی، RAPD، تنوع فیتوشیمیایی، کروماتوگرافی گازی.

مقدمه

خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که تنوع زیستی زیادی در سراسر جهان و به‌ویژه در نواحی مدیترانه‌ای و مرطوب دارد. گیاهان متعلق به این خانواده گیاهی، اهمیت زیادی از لحاظ کاربرد در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی دارند (Zargari, 1970). جنس پونه‌سا (*Nepeta* L.) یکی از جنس‌های بزرگ خانواده نعناعیان محسوب می‌شود که بیش از ۲۵۰ گونه از این جنس در جهان گزارش شده‌است. اغلب گونه‌های این جنس در ارتفاعات مناطق معتدله اروپا، آسیا و شمال غرب آفریقا انتشار دارند. افزون بر این، برخی دیگر از گونه‌ها نیز در نواحی گرمسیری و مرطوب آفریقا می‌رویند (Rechinger, 1982). تعداد گونه‌های متعلق به این جنس در ایران بیش از ۶۷ گونه گیاه علفی یک‌ساله و یا چندساله می‌باشد. برگ‌های این گیاه ساده بوده و در حاشیه دارای دندانه هلالی است. گل‌ها به صورت گل‌آذین گرز متراکم و یا فاصله‌دار روی ساقه‌ها آرایش یافته‌اند (Jamzad, 2012). اغلب گونه‌های این جنس به دلیل داشتن اثرهای درمانی، در طب سنتی استفاده شده‌اند (Sajjadi & Mehregan, 2005). گونه *N. cataria* برای درمان سرماخوردگی، گونه *N. menthoide* برای تسکین درد معده و به‌عنوان مسکن، گونه *N. bracteata* به‌عنوان داروی ضدنفخ، ضدآسم و تب‌بر و گونه *N. racemose* به‌عنوان ضدعفونی‌کننده و همچنین اشتهاآور مورد استفاده قرار گرفته است (Mojab et al., 2009). خواص دارویی گونه‌های مختلف *Nepeta* به‌طور کلی به روغن‌های اسانسی و همچنین فلاونوئیدهای موجود در این گونه‌ها نسبت داده می‌شود (Ghannadi et al., 2003). مطالعات نشان می‌دهد که اسانس *N. cataria* خواص بیولوژیکی و فارماکولوژیکی دیگری نیز دارد. اسانس این گیاه به‌علت داشتن پنتا‌لاکتون، دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی است. از این رو می‌تواند در صنایع غذایی استفاده شود (Nedjalka, 1996). از سوی دیگر پنتا‌لاکتون فرمون جنسی

برخی از حشرات است، بنابراین با جذب حشرات (نظیر شته‌ها) و یا دفع آنها (موریانه و پشه) می‌تواند در کنترل بیولوژیکی آنها مؤثر باشد. از اسانس *N. cataria* L. در غلظت‌های متفاوت به‌عنوان دافع قوی تخم‌گذاری حشرات که آفت عمده دام بوده و باعث زیان‌های اقتصادی زیادی به صنایع دامپروری می‌شوند، استفاده شده است (Zhu et al., 2012). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که نوع و میزان ترکیب‌های موجود در اسانس گیاهان مناطق مختلف با هم تفاوت دارند که این امر می‌تواند ناشی از اثرهای محیطی و ژنتیکی متفاوت باشد. شناسایی یا تعیین هویت، اولین مرحله در مطالعه گیاه است و امروزه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی در تشخیص گیاهان کاربرد فراوانی پیدا کرده است. تشخیص گیاهان از یک گونه یا وارینه خاص، از طریق تفاوت‌های موجود در مشخصه‌های ژنتیکی آنها با سایر گیاهان امکان‌پذیر است. بررسی تنوع ژنتیکی پیش‌شرط اصلی تشخیص گیاهان از طریق روش‌های مولکولی است (Farsi & Zol'ala, 2003). روش‌های مولکولی امکانات ویژه‌ای را برای ارزیابی تنوع حیاتی ارائه می‌دهند و می‌توانند روش کلیدی مناسبی برای ایجاد راهبردهای حفاظتی ژرم‌پلاسم باشند (Paterson et al., 1988). تنوع ژنتیکی پایه و اساس همه برنامه‌های اصلاحی است و آگاهی از فاصله ژنتیکی گیاهان، برای اهداف اصلاحی مهم می‌باشد. نشانگرهای مولکولی امروزه به‌طور گسترده برای تعیین تنوع ژنتیکی بکار می‌روند. در بین نشانگرهای مولکولی به‌نظر می‌رسد نشانگر RAPD که اساس آن تکثیر قطعات تصادفی با استفاده از روش PCR می‌باشد، توانایی قابل توجهی برای بررسی تنوع ژنتیکی داشته و حداقل آنکه نیاز کمتری به تکنولوژی پیشرفته، میزان کار و هزینه در مقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی دارد (Kumar, 1999). در یک تحقیق تنوع ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) با نشانگر RAPD مطالعه شد، که براساس تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های مورد بررسی در ۶ گروه تقسیم شدند (Hatari & Dalir, 2011). نیز ۱۳ نمونه آویشن را

شد که عبارت بودند از: نیتالاکتون ۱، نیتالاکتون ۲، نیتالاکتون ۳، بتا-کاریوفیلین، سیس-بتا-فارنسنین، آلفا-هومولن، کاریوفیلین اکساید (Fakhr Ranjbar, 2010). در پژوهش دیگری، ترکیب شیمیایی اسانس *N. cataria* L. با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی سریع تعیین شد و ترکیب های عمده آن، ایزومرهای نیتالاکتون و بتا-کاریوفیلین گزارش گردید (Heuskin et al., 2009). اگرچه بر روی گیاه پونه‌سا گربه‌ای در ایران تحقیقاتی انجام شده اما هنوز تحقیقی روی جمعیت‌های مورد نظر در این تحقیق انجام نشده است. از این رو در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۵ جمعیت انتخابی با استفاده از نشانگر RAPD بررسی شد و جمعیت‌های مذکور با استفاده از روش‌های آماری تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی گروه‌بندی شدند.

با نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS بررسی کرد، در بررسی ژنتیکی از ۱۴۹ باند حاصل، ۱۴۲ باند چند شکل بودند. براساس تجزیه خوشه‌ای صفات فیتوشیمیایی، نمونه‌های آویشن در ۲ گروه دسته‌بندی شدند (Dalir, 2011). تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی ۱۸ ژنوتیپ آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) با نشانگر AFLP و روش GC/MS بررسی شد. داده‌های حاصل از نشانگر AFLP ژنوتیپ‌ها را در ۵ گروه جایابی کرد و تجزیه خوشه‌ای داده‌های بیوشیمیایی، ژنوتیپ‌ها را در ۴ گروه قرار داد (Hadian et al., 2011). Fakhr Ranjbar (۲۰۱۰)، با بررسی اسانس *N. cataria* L. بازده اسانس را ۱/۱٪ گزارش کرد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS انجام شد و ۷ ترکیب در اسانس شناسایی

جدول ۱- محل جمع‌آوری، ارتفاع از سطح دریا، موقعیت جغرافیایی و کد شناسایی ۱۵ جمعیت مورد بررسی

پونه‌سا گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.)

کد ژنوتیپ	طول جغرافیایی/شرقی	عرض جغرافیایی/شمالی	ارتفاع از سطح دریا/متر	محل جمع‌آوری استان (منطقه)/شهرستان	جمعیت
Bafq1	۳۱° ۳۶	۵۵° ۲۴	۱۳۰۰	یزد- بافق ۱	جمعیت ۱
Bafq2	۳۱° ۳۶	۵۵° ۲۴	۱۳۰۰	یزد- بافق ۲	جمعیت ۲
KOH1	۳۰° ۷۱	۵۱° ۵۶	۲۵۰۰	کهگیلویه- کهگیلویه ۱	جمعیت ۳
Mijan1	۲۸° ۴۲	۵۷° ۵۷	۱۶۱۶	کرمان- میجان ۱	جمعیت ۴
Saqder1	۲۸° ۵۰	۵۷° ۵۲	۱۷۱۰	کرمان- سقدر ۱	جمعیت ۵
KOH2	۵۱° ۵۶	۳۰° ۷۱	۲۵۰۰	کهگیلویه- کهگیلویه ۲	جمعیت ۶
Dalfard2	۲۸° ۵۶	۵۷° ۳۹	۱۴۷۸	کرمان- دلفارد ۲	جمعیت ۷
Mijan2	۲۸° ۴۰	۵۷° ۵۴	۱۲۱۲	کرمان- میجان ۲	جمعیت ۸
Sirch	۳۰° ۱۱	۵۷° ۳۳	۱۷۳۰	کرمان- سیرج	جمعیت ۹
Dalfard1	۲۹° ۱	۵۷° ۳۵	۲۲۴۱	کرمان- دلفارد ۱	جمعیت ۱۰
Saqder2	۲۸° ۴۸	۵۷° ۵۲	۱۷۶۳	کرمان- سقدر ۲ (گوریت)	جمعیت ۱۱
Bahabad	۳۱° ۳۲	۵۶° ۳۶	۱۵۵۰	یزد- بهاباد	جمعیت ۱۲
Taft	۳۱° ۴۴	۵۴° ۱۲	۱۲۰۰	یزد- تفت	جمعیت ۱۳
Moh-abad	۲۸° ۵۴	۵۷° ۵۴	۱۹۸۸	کرمان- محمدآباد مسکون	جمعیت ۱۴
Dehbakri	۲۹° ۵	۵۷° ۵۶	۲۱۰۰	کرمان- دهبکری	جمعیت ۱۵

هر آغازگر به مدت ۱ دقیقه، بسط آغازگر در دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه و تکمیل بسط در یک چرخه ۷ دقیقه‌ای در دمای 72°C انجام شد. دستگاه مورد استفاده برای الکتروفورز محصولات PCR در این تحقیق از نوع الکتروفورز افقی مدل E132 خریداری شده از شرکت Consort بلژیک بود. برای انجام هر بار الکتروفورز به هر نمونه DNA ی PCR شده یک میکرولیتر بافر بارگذاری محتوی (گلیسرول ۳۰٪، برموفل ۲۵٪ و زایلین سیانول ۲۵٪) اضافه کرده و مخلوط حاصل در چاهک‌های ژل‌های تهیه شده ریخته شد. برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت تقریبی ۲ ساعت انجام شد. سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ میلی‌مولار رنگ‌آمیزی شد. ژل رنگ‌آمیزی شده پس از دو تا سه مرتبه شستشو با آب مقطر، درون دستگاه Gel Documentation مدل Syngene تحت اشعه ماوراءبنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل با فرمت‌های مختلف توسط نرم‌افزار Gen snap (Ver 6.08.04) عکس تهیه شد (Haji Rezai et al., 2008).

اندازه هر یک از باندهای واضح در هر چاهک براساس طول و وزن مولکولی نشانگر استاندارد ۱۰۰bp توسط نرم‌افزار Genetools در تمام ژل‌های مربوط به ۱۱ آغازگر مشخص شد. وجود یا عدم وجود هر یک از باندهای مشاهده شده برای هر یک از ۱۱ آغازگر به ترتیب با اعداد ۱ و صفر امتیازدهی شدند و اطلاعات مذکور در نرم‌افزار اکسل به صورت ماتریس صفر و یک تنظیم و طبقه‌بندی شد. ماتریس حاصل توسط نرم‌افزار NTSYS.pc (Ver 2.02) و با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA تجزیه شد و دندروگرام مربوطه رسم شد. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام و پلات دو بعدی حاصل از آن نیز رسم شد.

علاوه بر این برای بررسی تنوع فیتوشیمیایی جمعیت‌های مذکور، اسانس‌گیری از هشت جمعیت منتخب انجام شد و شناسایی ترکیب‌های جمعیت‌ها، با روش GC-MS انجام شد. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای نسبت به گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس ترکیب‌های فیتوشیمیایی اقدام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

اندام‌های هوایی جمعیت‌های گیاهی پونه‌سا گربه‌ای از مناطق مختلف جمع‌آوری شد (جدول ۱) و پس از شناسایی دقیق در پاکت‌های کاغذی جداگانه نگهداری شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی

استخراج DNA، انجام PCR، الکتروفورز و آنالیز داده‌های RAPD

برای استخراج DNA ژنومی از بافت برگ، از روش CTAB استفاده شد. کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. سپس برای انجام PCR، تعداد ۱۱ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD (جدول ۲) مورد استفاده قرار گرفت. در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR، $1\mu\text{L}$ از DNA استخراج شده با غلظت $50\text{ng}/\mu\text{L}$ ، $2\mu\text{L}$ MgCl_2 با غلظت 50mM ، $2/5\mu\text{L}$ dNTP با غلظت $0/3\mu\text{L}$ DNA Taq Polymerase با غلظت $2/5\text{mM}$ ، $2\mu\text{L}$ آغازگر با غلظت $2\mu\text{m}$ ، $2/5\mu\text{L}$ بافر PCR دارای غلظت ۱۰ برابر و $14/7\mu\text{L}$ آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر (مدل Mastercycler) به صورت یک چرخه ۱ دقیقه‌ای واسرشت‌سازی آغازین در دمای 94°C ، سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی آغازین به مدت ۱ دقیقه در 94°C ، اتصال آغازگر به DNA تک رشته در دمای بهینه برای

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای RAPD استفاده شده

ردیف	نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
۱	UBC9	CCTGGGTTCC
۲	OPD04	TCTGGTGAGG
۳	OPC13	AAGCCTCGTC
۴	OPD03	GTCGCCGTCA
۵	OPN01	CTCACGTTGG
۶	OPC07	GTCCCGACGA
۷	۲۹۸ سینازن	CAGTGCTCTT
۸	H سینازن	GGTCAACCCT
۹	UB53	CTCCCTGAGC
۱۰	J سینازن	CCTCACCTGT
۱۱	OPC12	TGTCATCCCC

بررسی تنوع فیتوشیمیایی

استخراج اسانس

درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه متوقف شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون برابر ۷۰ الکترون ولت بود.

مشخصات دستگاه (GC/MS)

دستگاه گازکروماتوگراف، متصل به طیف‌سنج جرمی (Mass spectrophotometry) Agilent مدل ۵۹۷۵C، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، جنس ستون Phenyl Methyl Siloxane ۵٪، در برنامه حرارتی دمای اولیه ستون به مدت ۱ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و در دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه متوقف شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون برابر ۷۰ الکترون ولت بود.

عمل استخراج اسانس از ۸ جمعیت از ۱۵ جمعیت پونه‌سا گربه‌ای، از قسمت‌های هوایی گیاه شامل ساقه، برگ و گل با دستگاه کلونجر (Clevenger) و به روش تقطیر با آب و به مدت ۳/۵ ساعت انجام شد؛ سپس با استفاده از سرنگ، اسانس‌ها به ظرف‌های مخصوص اسانس منتقل شد و در نهایت آنها برچسب‌گذاری شده و تا زمان انجام GC-MS در دمای ۴°C نگهداری شدند.

مشخصات دستگاه گازکروماتوگرافی (GC)

دستگاه گازکروماتوگراف Agilent مدل ۷۸۹۰A، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، جنس ستون Phenyl Methyl Siloxane ۵٪، در برنامه حرارتی، دمای اولیه ستون به مدت ۱ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و در دمای ۲۸۰

شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

اسانس‌های حاصل با هگزان نرمال رقیق و به دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شدند و طیف‌های جرمی اجزاء تشکیل‌دهنده هر یک از روغن‌های اسانسی و کروماتوگرام‌های مربوطه بدست آمد. شاخص‌های بازداری (Retention index: RI) برای تمام اجزاء با تزریق آلکان‌های نرمال (C₈-C₁₈) به‌عنوان استاندارد به دستگاه GC، در شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها، با استفاده از زمان‌های بازداری محاسبه شدند. شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها با مقایسه طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری بدست آمده، با طیف جرمی و شاخص بازداری ترکیب‌های استاندارد (Adams, 2004; Davies, 1990) و همچنین با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی استاندارد موجود در کتابخانه‌های NIST و Wiley موجود در نرم‌افزار Lab solution دستگاه GC/MS انجام شد. درصد نسبی هر یک از ترکیب‌های تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانسی با توجه به سطح زیر منحنی آنها در کروماتوگرام مربوط بدست آمد. به‌منظور

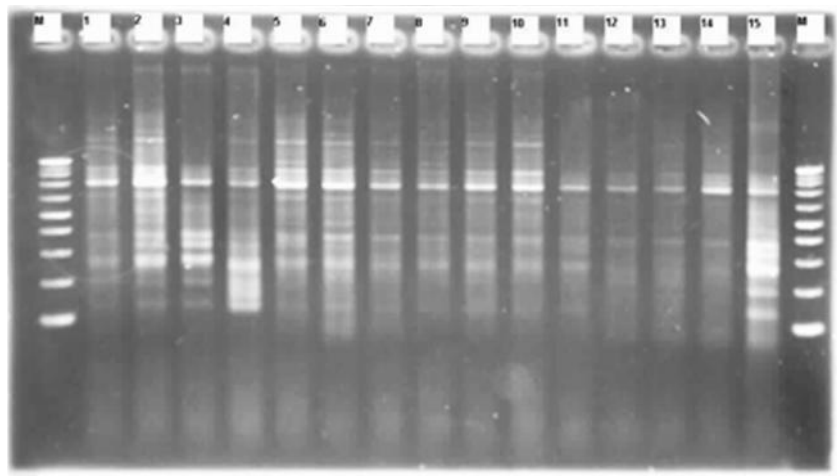
مقایسه نمونه‌های مختلف اسانس پونه‌سا گربه‌ای با یکدیگر، ترکیب‌های شناسایی شده حاصل از GC/MS توسط نرم‌افزار SPSS 12 تجزیه شده و خوشه مربوط برای هشت نمونه مورد بررسی رسم شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD

تعداد ۱۰۹ باند توسط ۱۱ آغازگر منتخب تکثیر شد که شامل ۱۰۴ باند چند شکل و تعداد ۵ باند یک شکل بودند (شکل ۱). باندها در محدوده ۲۵۰ تا ۲۸۵۰ جفت باز قرار داشتند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده (۱۶ باند) مربوط به آغازگر OPC07 و کمترین تعداد (۴ باند) مربوط به آغازگر OPD04 بود.

تنوع ژنتیکی ۱۵ جمعیت مختلف پونه‌سا گربه‌ای با استفاده از باندهای واضح ۱۱ پرایمر RAPD، بررسی شد و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه مختلف جایابی شدند (شکل ۲).



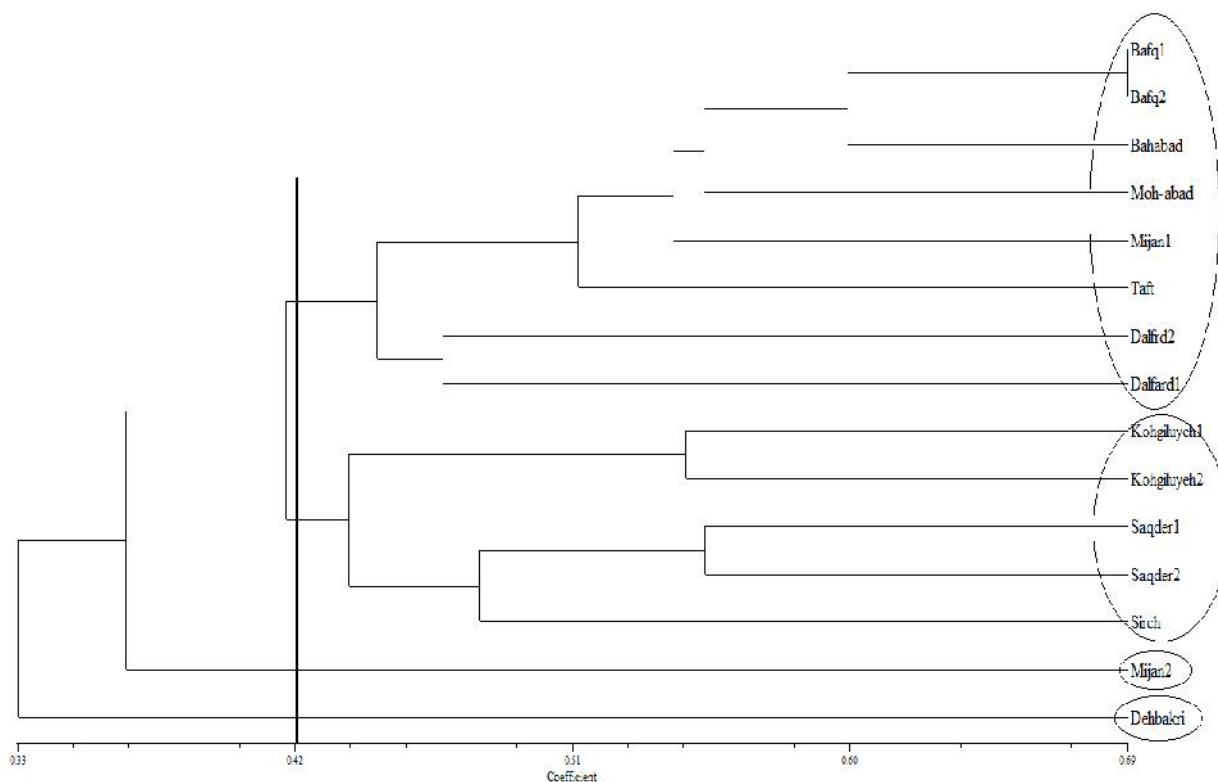
شکل ۱- نوارهای چند شکلی با نشانگر UB53 در ۱۵ ژنوتیپ پونه‌سا گربه‌ای پس از الکتروفورز

چاهک ۱: تفت، چاهک ۲: کهگیلویه و بویراحمد ۱، چاهک ۳: کهگیلویه ۲، چاهک ۴: بهاباد، چاهک ۵: بافق ۱، چاهک ۶: بافق ۲، چاهک ۷: دلفارد ۱، چاهک ۸: محمدآباد مسکون، چاهک ۹: دلفارد ۲، چاهک ۱۰: میجان ۱، چاهک ۱۱: سقدر ۱، چاهک ۱۲: سقدر ۲، چاهک ۱۳: سیرج، چاهک ۱۴: میجان ۲، چاهک ۱۵: دهبکری، M: نشانگر راهنما

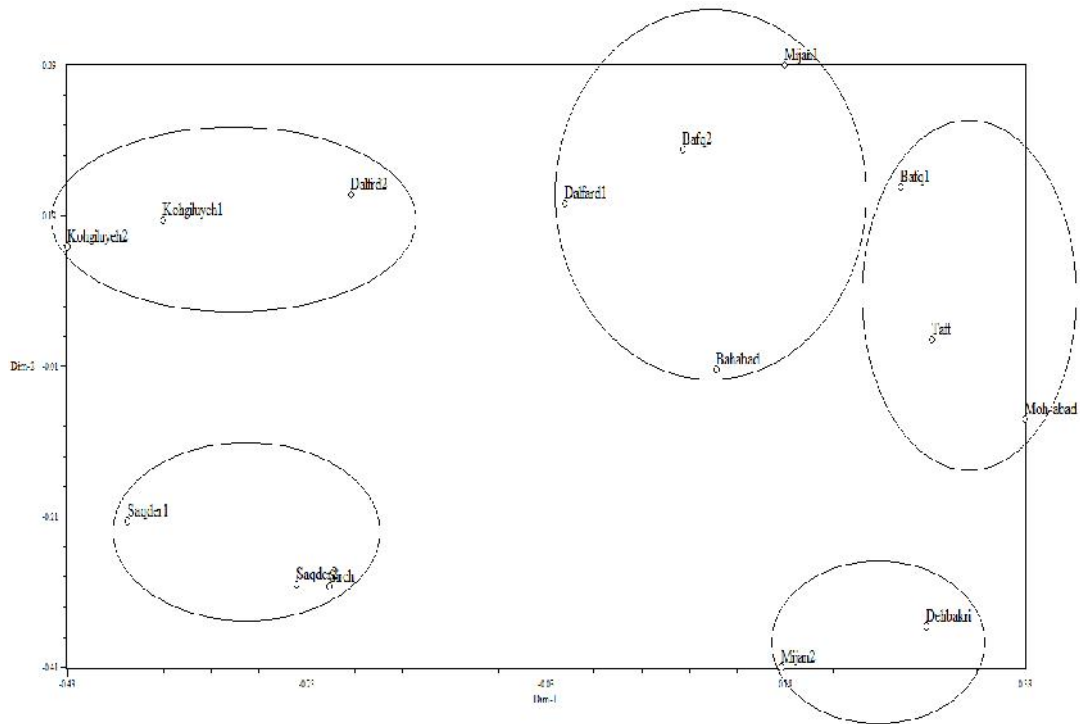
شناسایی شد و ایزومرهای نپتالاکتون، آلفا-پینین، بتا-پینین، بتا-کاریوفیلین، کاریوفیلین اکساید، ۲-متوکسی پاراکرزول و ۸،۱-سینثول به عنوان ترکیب‌های اصلی شناسایی شدند. ترکیب‌های شناسایی شده، شاخص‌های بازداري و درصد هر ترکیب در روغن‌های اسانسی گیاه، در جدول ۳ آورده شده است. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از GC/MS، هشت جمعیت مورد بررسی براساس ترکیب‌هایشان به سه گروه تقسیم شدند (شکل ۴).

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد، سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشتند به ترتیب ۱۳/۰۳٪، ۱۱/۹۴٪ و ۱۱/۲۱٪ از میزان کل تنوع را شناسایی کرده‌اند. براساس پلات دو بعدی (شکل ۳)، جمعیت‌ها در ۵ گروه متفاوت گروه‌بندی شده‌اند.

اسانس حاصل از اندام‌های هوایی در هر ۸ جمعیت پونه‌سا گربه‌ای به رنگ زرد کم‌رنگ مشاهده شد. از تجزیه و تحلیل کروماتوگرام و طیف‌های بدست آمده از GC/MS، از کل نمونه‌های مورد بررسی، ۲۷ ترکیب



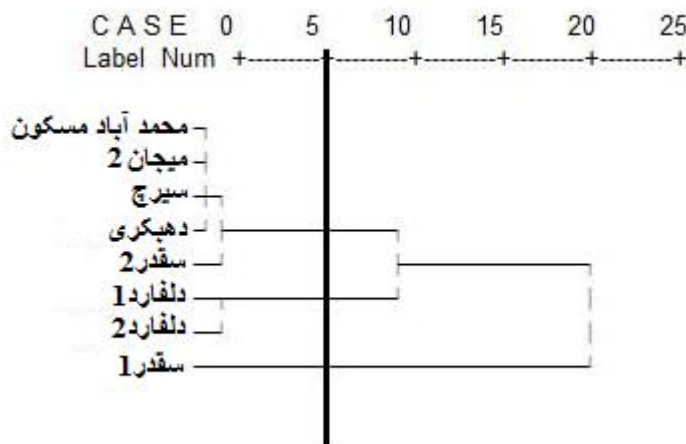
شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD



شکل ۳- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

جدول ۳- ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌های استخراج شده از ۸ جمعیت پونه‌سا گربه‌ای مورد بررسی

ردیف	ترکیب نام	شاخص بازداری (RI)	درصد ترکیب‌ها							
			۱ دهبکری	۲ سیرچ	۳ محمدآباد	۴ سقدر ۱	۵ سقدر ۲	۶ دلفارد ۱	۷ دلفارد ۲	۸ میجان ۲
۱	E-2-hexenal	۸۵۲	۰/۱	۰	۰	۱/۴	۰	۰	۰/۱	۰
۲	-pinene	۹۳۴	۰	۰	۰	۱/۱	۰/۱	۰	۰/۱	۰/۱
۳	sabinene	۹۷۱	۰	۰	۰	۰	۰/۱	۰	۰/۲	۰
۴	-pinene	۹۷۴	۰/۳	۰/۵	۰/۲	۸/۹	۰/۵	۰/۷	۰/۶	۰/۵
۵	1,8-cineole	۱۰۲۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۰	۰
۶	borneol	۱۱۶۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۱	۰
۷	-terpineol	۱۱۸۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۲	۰
۸	methyl salicylate	۱۱۹۲	۰	۰	۰/۲	۴/۶	۰/۴	۰	۰	۰
۹	2-methoxy-p-cresol	۱۲۱۴	۰/۸	۰/۸	۰/۵	۹/۱	۰/۷	۰/۴	۰/۴	۰/۴
۱۰	neral	۱۲۴۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۳	۰
۱۱	piperitone oxide	۱۲۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۸	۰
۱۲	geranial	۱۲۶۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۴	۰
۱۳	E-anethole	۱۲۸۴	۰/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۴	carvacrol	۱۳۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۲	۰
۱۵	piperitenone	۱۳۴۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۱	۰
۱۶	4a ,7 ,7a - nepetalactoe	۱۳۵۹	۱۹/۲	۲۲/۱	۲۴/۸	۱/۸	۲۶/۸	۷/۱۶	۸/۸	۲۴/۱
۱۷	piperitenone oxide	۱۳۶۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۳	۰
۱۸	4a ,7 ,7a - nepetalactone	۱۳۹۱	۷۰/۶	۷۲/۸	۷۱/۷	۵۸/۶	۶۶/۹	۸۶/۸	۷۹/۲	۷۰/۵
۱۹	4a ,7 ,7a - nepetalactone	۱۳۹۴	۲/۳	۲/۴	۱/۶	۰	۲/۸	۱/۵	۳/۳	۲/۶
۲۰	-caryophyllene	۱۴۱۷	۰/۳	۰/۷	۰/۵	۰	۰/۷	۰/۵	۰/۹	۰/۸
۲۱	-humulene	۱۴۵۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۹
۲۲	E- -farnesene	۱۴۵۷	۰	۰/۲	۰	۰	۰	۰	۰/۲	۰
۲۳	eugenol acetate	۱۵۲۲	۰	۰	۰	۱/۳	۰	۰	۰	۰
۲۴	elemol	۱۵۴۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۹	۰	۰
۲۵	Z-3-hexenyl benzoate	۱۵۶۸	۰	۰	۰	۱/۶	۰/۲	۰	۰	۰
۲۶	caryophyllene oxide	۱۵۸۰	۰/۸	۰/۵	۰/۵	۸/۴	۰/۹	۱/۲	۰/۸	۰/۹
۲۷	hexadecanoic acid	۱۹۸۰	۰/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از GC-MS ۸ جمعیت مورد بررسی

بحث

ضمن تأیید آغازگرهای استفاده شده، در این حالت برای گروه‌بندی نهایی استفاده از نتایج روش تجزیه خوشه‌ای توصیه می‌گردد. Liu و همکاران (۲۰۰۶) روی تنوع ژنتیکی ۸ جمعیت از گیاه *Lamiophlomis rotata* از تیره نعناعیان بومی تبت مطالعه نمودند که تنوع بالایی را درون جمعیت گزارش کردند. Pezhmanmehr و همکاران (۲۰۱۰) نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP تنوع ژنتیکی زیادی را بین ۲۰ اکوتیپ زیره پاریسی از نواحی مختلف ایران گزارش کردند. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های GC-MS، هشت جمعیت مورد بررسی در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول: نمونه‌های دهبکری، سیرچ، محمدآباد مسکون، میجان ۲ و سقدر ۲؛ همه ژنوتیپ‌های این گروه دارای سه ایزومر نیتالاکتون بودند و ترکیب ۲-Methoxy-p-Cresol در همه ژنوتیپ‌های این گروه وجود داشت. گروه دوم: دلفارد ۱ و دلفارد ۲؛ گروه دوم به علت وجود ترکیب‌هایی مانند ۸،۱-سینئول و پیریتنون از سایر گروه‌ها متفاوت بود. گروه سوم: سقدر ۱؛ گروه سوم هم با دارا بودن دو ایزومر نیتالاکتون، برخلاف وجود سه ایزومر نیتالاکتون در سایر نمونه‌ها و همچنین وجود ترکیب اوزنول استات، که در هیچ‌یک از نمونه‌ها وجود نداشت و نداشتن ترکیب بتا-

براساس تجزیه خوشه‌ای ۱۵ جمعیت پونه‌سا گربه‌ای در سطح تشابه ۰/۴۲ در چهار گروه مختلف قرار گرفتند. دامنه تشابه ژنتیکی بین ۰/۳۳ تا ۰/۶۹ بود (شکل ۲). گروه اول دارای دو زیرگروه می‌باشد، زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های بافق ۱، بافق ۲، بهاباد، محمدآباد مسکون، میجان ۱ و تفت بوده و در زیرگروه دوم ژنوتیپ‌های دلفارد ۱ و دلفارد ۲ قرار دارند. بافق ۱ و بافق ۲ در زیرگروه اول بیشترین تشابه ژنتیکی را دارند. گروه دوم دارای ۳ زیرگروه است، ژنوتیپ‌های کهگیلویه و بویراحمد ۱ و کهگیلویه ۲ در یک زیرگروه، ژنوتیپ‌های سقدر ۱ و سقدر ۲ در زیرگروه بعدی و ژنوتیپ سیرچ در زیرگروه سوم با بیشترین فاصله ژنتیکی با سایر زیرگروه‌ها قرار گرفت. در گروه سوم ژنوتیپ میجان ۲ قرار گرفت و در گروه چهارم نیز ژنوتیپ دهبکری قرار دارد که بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر گروه‌ها داشت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۵ جمعیت مورد بررسی را در ۵ گروه قرار می‌دهد که با نتایج تجزیه خوشه‌ای همخوانی ندارد. از آنجا که سهم مجموع سه مؤلفه اصلی اول در توجیه واریانس تنها ۳۶٪ می‌باشد، این عدم هم‌خوانی کاملاً مورد انتظار است. از این رو

Benth) مورد بررسی قرار گرفت. ۲۹ ترکیب در اسانس گیاه پونه‌سای یزدی شناسایی شد که اجزای اصلی آن ۸،۱-سینئول (۳۵/۲٪)، بتا-پینن (۲۱/۷٪)، سایینن (۷/۷٪)، ترانس-بتا-اوسیمین (۷/۱٪)، آلفا-پینن (۷/۱٪) و سیس-اوسیمین (۶/۹٪) بودند. ۳۳ ترکیب در اسانس گیاه پونه‌سای قهرودی شناسایی شد که اجزای اصلی آن اسپاتولنول (۲۵/۷٪)، لاواندولیل استات (۱۶/۷٪)، لیمونن (۶/۴٪) و ژرانیل استات (۴/۲٪) بودند. همچنین تعداد ۳۰ ترکیب در اسانس پونه‌سای تنک شناسایی شد که بیشترین ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس این گیاه به ترتیب شامل: آلفا-پینن (۱۹/۷٪)، ۸،۱-سینئول (۱۱/۸٪)، آلفا-بیسابولول (۶/۹٪) و دلتا-کادینن (۶/۸۲٪) می باشند (Batooli & Safaei-Ghomi, 2012). مقایسه ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس در جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد که اسانس این ۸ جمعیت از لحاظ کمی و کیفی ضمن اینکه با هم متفاوتند با مطالعات قبلی نیز تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای دارند که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اکولوژیکی مناطق رویش این جمعیت‌ها مانند رطوبت، دما و ارتفاع از سطح دریا و یا سایر عوامل خاکی، جغرافیایی و ژنتیکی باشد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر منصور میرتاج‌الدینی و خانم مهندس قنبری برای شناسایی جمعیت‌ها، کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- Adams, R.P., 2004. Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 16(11): 1902-1903.
- Akhgar, M.R. and Moradalizadeh, M., 2012. Chemical composition of the essential oils from stems, flowers and leaves of *Nepeta schiraziana* Boiss. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(1): 28-34.

کاربوفیلین از سایر گروه‌ها متمایز می‌شود. در ضمن مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های ژنتیکی و براساس داده‌های فیتوشیمیایی همخوانی چندانی نداشت. Ali و همکاران (۲۰۱۲) در یک تحقیق که بر روی نمونه‌های پونه‌سای قزوین انجام دادند، اسانس قسمت‌های هوایی گلدار این گیاه را مورد ارزیابی قرار داده و ۳۵ ترکیب را شناسایی کردند. عمده‌ترین ترکیب‌های موجود در اسانس شامل ۸،۱-سینئول (۳۱/۲٪)، 7a, 7, 4a-نیتالاکتون (۱۴/۵٪)، آلفا-تریپنئول (۵/۴٪)، بیزابولن (۵/۴٪)، تریپنن-۴-آل (۴/۸٪)، لینالول (۴/۵٪) و بتا-پینن (۳/۵٪) بود. در یک تحقیق نمونه‌های پونه‌سای شیرازی از منطقه سپیدان واقع در شمال غرب استان فارس جمع آوری شد و از ساقه، گل و برگ آن به‌طور جداگانه به‌روش تقطیر با آب اسانس‌گیری بعمل آمد. ترکیب‌های تشکیل دهنده روغن‌های اسانسی با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگراف گازی (GC) و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) جداسازی و شناسایی شدند. در هر یک از روغن‌های اسانسی ساقه و گل، ۱۴ ترکیب شناسایی شد که ۸،۱-سینئول (۴۵/۶٪) و ۳۹/۴٪، جرم‌اکرن D (۱۷/۴٪) و ۱۵/۸٪) و بتا-کاربوفیلین (۱۱/۷٪) و ۱۰/۶٪) از ترکیب‌های عمده به ترتیب در اسانس ساقه و گل بودند. از سوی دیگر، از میان ۱۸ ترکیب شناسایی شده در اسانس برگ، ۸،۱-سینئول (۳۸/۵٪)، بتا-کاربوفیلین (۱۴/۲٪) و کاربوفیلین اکسید (۱۱/۷٪) ترکیب‌های اصلی اسانس را تشکیل می‌دادند. در نتیجه در هر سه اندام مورد بررسی، ۸،۱-سینئول بیشترین درصد اسانس را به‌خود اختصاص داده و ایزومرهای نیتالاکتون که در بسیاری از گونه‌های *Nepeta schiraziana* گزارش شده، در گونه *Nepeta schiraziana* شناسایی نشد (Akhgar & Moradalizadeh, 2012). در تحقیقی دیگر، ترکیب‌های شیمیایی اسانس سه گونه از جنس پونه‌سای منطقه کاشان به نام‌های پونه‌سای یزدی (*Nepeta gloeocephala* Rech. F.)، پونه‌سای قهرودی (*N. sessilifolia* Bunge) و پونه‌سای تنک (*N. laxiflora*)

- (Lamiaceae). *Journal of Chromatography*, 1216(14): 2768-2775.
- Jamzad, Z., 2012. Colorful Flora of Iran (Labiatae Family). Publication of Research Institute of Forests and Rangelands and University of Tehran.
 - Kumar, L.S., 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advanced*, 17: 143-182.
 - Liu, J., Wang, L., Geng, Y., Wang, Q., Luo, L. and Zhong, Y., 2006. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau. *Genetica*, 128: 385-394.
 - Mojab, F., Nickavar, B. and Hooshdar Tehrani, H., 2009. Essential oil analysis of *Nepeta crispa* and *N. menthoides* from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1): 43-46.
 - Nedjalka, V., 1996. Constituents of essential oils from *Nepeta cataria* L., *N. grandiflora*. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 639-643.
 - Paterson, A.A., Londer, E. and Hewitt, I.D., 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335: 721-726.
 - Pezhmanmehr, M., Hassani, M.S., Fakhre Tabatabaie, M. and Hadian, J., 2010. Evaluation of genetic diversity and differentiation of some *Bunium persicum* (Boiss.) populations using RAPD markers. *Environmental Sciences*, 7(2): 63-76.
 - Rechinger, K.H., 1982. Labiatae. In *Flora Iranica*. No. 150, Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz, Austria, 590p.
 - Sajjadi, S.E. and Mehregan, I., 2005. Chemical constituents of essential oil of *Nepeta daenensis* Boiss. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5): 563-564.
 - Zargari, A., 1990. *Medicinal Plants* (Vol. 4). Tehran University Publications, Tehran, 923.
 - Zhu, J.J., Berkebile, Dennis R., Dunlap, C.E., Zhang, A., Boxler, D., Tangtrakulwanich, K., Behle, R., Baxendale, Frederick P. and Brewer Gary, J., 2012. Nepetalactones from essential oil of *Nepeta cataria* represent a stable fly feeding and oviposition repellent. *Faculty Publications: Department of Entomology*, Paper 340.
 - Ali, T., Javan, M., Sonboli, A. and Semnianian, S., 2012. Evaluation of the antinociceptive and antiinflammatory effects of the essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1): 48.
 - Batooli, H. and Safaei-Ghomi, J., 2012. Comparison of essential oil composition of three *Nepeta* L. species from Kashan. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(1):161-175.
 - Dalir, M., 2011. Evaluation of genetic, morphology and chemical diversity *Thymus* spp. Thesis for M.Sc., Payame Noor University of Tehran.
 - Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*, 503: 1-24.
 - Fakhri Ranjbar, H., 2010. Viability study of section *cataria* of genus *Nepeta* in Iran, Thesis for M.Sc., Tarbiyat Moalem University of Tehran.
 - Farsi, M. and Zol'ali, J., 2003. *Principles of Plant Biotechnology*. Publication of Ferdosi University, 495p.
 - Ghannadi, A., Aghazari, F., Mehrabani, M., Mohagheghzadeh, A. and Mehregan, I., 2003. Quantity and composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2): 103-105.
 - Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S., Mirjalili, M., Azizi, A., Ranjbar, H. and Friedt, W., 2011. Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. accessions growing wild in Iran. *Chemistry & Biodiversity*, 8(1): 176-188.
 - Haji Rezai, M., Baghizadeh, A., Javadi, Gh. and Sadeghizadeh, M., 2008. Evaluation of the genetic diversity of Kerman pistachio based on RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Biology*, 22(3): 462-469.
 - Hatari, Z. and Zamani, Z., 2012. Evaluation genetic biodiversity *Ziziphora tenuior* L. of Iran by RAPD markers. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 43(3): 80-84.
 - Heuskin, S., Godin, B., Leroy, P., Capella, Q., Wathélet, J. and Verheggen, F., 2009. Fast gas chromatography characterization of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L.

Investigation of genetic and phytochemical diversity of some catnip (*Nepeta cataria* L.) populations by RAPD molecular marker and GC/MS method

A. Baghizadeh^{1*}, Z. Mashayekhi² and M.A. Ebrahimi³

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, E-mail: amin_4156@yahoo.com

2- M.Sc. student of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran

3- Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran

Received: September 2017

Revised: May 2018

Accepted: July 2018

Abstract

Catnip (*Nepeta cataria* L.), also called catmint, is a medicinal plant containing aromatic compounds and belongs to the Lamiaceae family. In this study, phytochemical and genetic variations of some Catnip germplasm were analyzed using RAPD molecular marker as well as GC/MS. The shoots of plants were collected from various habitats and dried away from direct sunlight. DNA was extracted using (CTAB) method. Eleven RAPD primers were used in PCR reaction. Based on the results of cluster analysis, 15 populations were classified into four groups. Based on the results of principal component analysis, the plant populations were clustered into five groups. Eight of 15 collected populations were analyzed phytochemically. Essential oils were extracted via water steam distillation using Clevenger apparatus. Twenty-seven components were identified from all essential oil samples. The results of GC/MS method showed that among the samples, 100% of essential oil compounds were identified in populations of Sirch, Mohammad Abad-e-Maskoon, Saqder 2, Dalfard 2, and Mijan 2. The results also showed that in samples of Dehbakri, Dalfard 1, and Saqder 1, 94.84%, 99.8% and 96.6% of essential oil compounds were identified, respectively. Three isomers of Nepetalactone constituted the major essential oils compounds. B-caryophyllene, Caryophyllene oxide, -pinene, and -pinene were also of main essential oil compounds. Based on the cluster analysis of GC/MS data, the populations were classified into three groups. Comparison of consisting compounds of essential oils in the eight studied populations indicated that the essential oils extracted were different quantitatively and qualitatively. This could be probably due to the different ecological conditions of habitats such as humidity, temperature, altitude above sea level, or other terrestrial, geographical and genetic factors.

Keywords: *Nepeta cataria* L., genetic diversity, RAPD, phytochemical diversity, GC.