

## مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن ایران با استفاده از نشانگرهای نیمه‌تصادفی ISJ

فرزانه مجیری<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۳</sup>، حسن مداح عارفی<sup>۴</sup>، هادی احمدی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گرایش اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

<sup>۴</sup> دانشیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۰۱

### چکیده

آویشن (*Thymus spp.*) از مهمترین گیاهان دارویی خانواده نعناعیان است. دورگه‌گیری بین گونه‌ای و اینترگرسیون مهمترین عامل تنوع گونه‌ای بالا در آویشن است که شناسایی گونه‌ها را با مشکل روبرو کرده است. با توجه به مشکلات موجود در اصلاح این گیاه دارویی، استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA می‌تواند ابزار قدرتمندی در ارزیابی ژرمپلاسم و بهره‌برداری‌های به‌نژادی به شمار آید. در این مطالعه از ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی اینترون-اگزونی (semi random intron-exon splice junction) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۷۰ توده آویشن ایران استفاده گردید. مجموع آغازگرها ۶۹۴ باند قابل امتیازدهی تولید کردند که ۶۸۳ باند آنها چندشکل بود. تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار DARwin5 و روش میانگین فاصله و ماتریس تشابه دایس، توده‌ها را به شش گروه تقسیم کرد. بیشترین شباهت بین دو توده *T. kotschyanus* و *T. transcaucasicus* از قزوین و گیلان و کمترین شباهت مربوط به توده *T. lancifolius* فارس و *T. fedtschenkoii* از آذربایجان غربی بود. بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی به ترتیب مربوط به آغازگر IT15-36 و IT18-2 بود. بیشترین و کمترین شاخص نشانگر را به ترتیب دو آغازگر ET15-33 و ET18-6 به خود اختصاص دادند. نتایج نشان دادند که گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حدودی با منشأ جغرافیایی هماهنگی داشت و توانست تا حدودی گونه‌ها را از هم تفکیک نماید. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای نیمه‌تصادفی در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن ایران مناسب بوده است.

واژه‌های کلیدی: آویشن، نشانگر نیمه‌تصادفی، ISJ، تنوع ژنتیکی، چندشکلی

## مقدمه

طبیعی متغیر است (Valdeyron *et al.*, 1977). محققین گزارش کردند که بعلت دگرگرده‌افشانی آویشن، دورگه‌گیری در آن به خصوص در انواع تتراپلوئید بسیار معمول است (Stahl-Biskup & Saez, 2002). همچنین گزارش شد که گونه‌های آویشن به علت دورگه‌گیری بین گونه‌ای بسیار متنوع‌اند (Nei, 1973; Yeh *et al.*, 1999). بیشتر گونه‌های جنس *Thymus* به دلیل سهولت دورگه‌گیری بین گونه‌ای، هیبریدهای بارور فراوانی تولید می‌کنند که تنوع ژنتیکی بالایی در این جنس ایجاد می‌نماید بطوریکه در این جنس چندین هیبرید طبیعی وجود دارد (Jamzad, 2009). بنابراین می‌توان این گونه بیان کرد که ارزیابی تنوع ژنتیکی در توده‌های آویشن با استفاده از ابزاری دقیق (مثل نشانگرهای مولکولی DNA) می‌تواند در پیشبرد امور به‌نژادی این گیاه مفید واقع شود.

محققین پس از مطالعه تنوع آلوزایمی گونه بومی *Thymus loscosii* گزارش کردند که تنوع ژنتیکی بالایی در این جمعیت وجود دارد (Lopez-Pujol *et al.*, 2004). در تحقیقی، تنوع ژنتیکی و چندشکلی شیمیایی ۳۱ نمونه از گونه *Thymus caespitius* از دو منطقه متفاوت با نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج داده‌های مولکولی با نتایج به دست آمده از اطلاعات نیمرخ مواد شیمیایی مطابقت نداشت. همچنین همبستگی مستقیمی بین مکان جمع‌آوری، آنالیز شیمیایی و بررسی‌های مولکولی یافت نشد. بنابراین پیشنهاد شد که ابزارهای

آویشن *Thymus spp.* از جمله پرکاربردترین گیاهان دارویی است که به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی فراوان با کاربردهای دارویی، ضد عفونی‌کننده، غذایی و صنعتی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. نام آویشن به کلیه گونه‌های *Thymus* مخصوصاً *T. kotschyanus* (آویشن منطقه طالقان) که پراکنندگی زیادی در ایران به ویژه در دامنه‌های البرز و نواحی شمال ایران دارد، اطلاق می‌شود (Zargari, 1973). از آنجا که شناسایی آویشن به دلیل دورگه‌گیری بین گونه‌ای، دگرگشتی و پلی‌پلوئیدی آن با مشکلاتی همراه است، استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA نسبت به سایر نشانگرها که نسبت به شرایط متفاوت متغیر هستند، ابزار قدرتمندی در استفاده موثر از گیاهان دارویی محسوب می‌شود. از مهمترین کاربرد نشانگرهای مولکولی DNA ارزیابی تنوع ژنتیکی است. آگاهی از این تنوع برای انتخاب دقیق والدین مناسب جهت استفاده در تلاقی‌ها و معرفی رقم مناسب اهمیت فراوانی است (Kumar, 1999; Sharma *et al.*, 2002). مطالعاتی در مورد تنوع مورفولوژیکی، آلوزایمی و ژنتیکی جنس آویشن توسط محققین صورت گرفته است. گیاه آویشن دارای سیستم تولیدمثلی دگرگرده‌افشان می‌باشد که گرده‌افشانی آن بوسیله حشرات به خصوص زنبورهای عسل صورت می‌گیرد (Brabant *et al.*, 1980) و نسبت خودگشتی آن از صفر تا ۸۰ درصد در شرایط

تعداد نوکلئوتید متفاوت دارند که برخی از این آغازگرها نواحی غیر کدکننده اینترونی و برخی دیگر نواحی کدکننده اگزونی را تکثیر می‌کنند و از این نظر قابل تشخیص‌اند (Rafalski et al., 1997; Przetakiewicz et al., 2002; Nowoseiowski et al., 2002). چندشکلی حاصل از این آغازگرها به دلیل تفاوت در تکثیر قطعاتی از ژنوم گیاه است که مورد رونویسی قرار می‌گیرند (Rafalski et al., 1997). از آنجا که این آغازگرها کاملاً تصادفی نیستند، الگوی بانندی آنها نسبت به نشانگر تصادفی RAPD پیچیدگی کمتر، تکرار پذیری بالاتر و چندشکلی بیشتری را داراست (Rafalski et al., 2002; Rafalski et al., 1997). این آغازگر همانند RAPD نیاز به دانستن اطلاعات اولیه در مورد ردیف توالی DNA جهت طراحی و ساخت آغازگرها ندارد. یکی از معایب آغازگرهای ISJ توارث غالبیت آنهاست. از نشانگرهای ISJ در بررسی تنوع ژنتیکی برخی گیاهان استفاده شده است (Samiei et al., 2008; Rafalski et al., 1997; Bandani et al., 2005). اگر چه از نشانگرهای ISJ برای مطالعات تنوع ژنتیکی در مورد سایر گیاهان استفاده شده است، اما تاکنون تحقیقی از نشانگر ISJ جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن ایران صورت نگرفته است. در این تحقیق با توجه به توانمندیهای این نشانگر با ارزش، برای اولین بار به مطالعه تنوع ژنتیکی ۷۰ توده آویشن ایران با استفاده از ۳۰ آغازگر نیمه تصادفی ISJ پرداخته شد که از این تنوع ژنتیکی برای استفاده در

مولکولی دیگری باید برای شناسایی میزان نفوذ ژنتیک و محیط در ترکیبات مواد شیمیایی استفاده گردد (Trindade et al., 2008). در تحقیقی شش نشانگر میکروساتلایت در گونه تتراپلوئید *Thymus praecox* agg. مطالعه شد. اطلاعات توالی حاصل از ۱۵۰ آلل میکروساتلایت و نواحی دو طرف آنها، در این مطالعه تنوع زیادی را نشان داد که ممکن است مشخصه‌ای برای پلی‌پلوئیدها باشد. همچنین مشخص شد که تکنیک PCR برای تعیین تعداد کپی آلی تحت وراثت پلی‌زومی بسیار مناسب بوده است (Landerogott et al., 2006). در تحقیقی تنوع ژنتیکی، مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی هفت توده آویشن با نشانگر میکروساتلایت ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین ۲۰ آغازگر، ۷ آغازگر باندهای چندشکل تولید کردند. بیشترین تعداد لوکوس در *T. praecox* agg. و کمترین در *T. serpyllum* بود. همچنین در این مطالعه با انجام یکسری آزمایشات مزرعه‌ای تنوع مورفولوژیکی گسترده‌ای درون توده‌های آویشن مشاهده شد (Smolik et al., 2009).

یک نوع از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، نشانگرهایی است که توالی آغازگرهای آنها بر اساس نواحی برش اتصال اینترون-اگزون یا ISJ<sup>۱</sup> طراحی شده‌اند. در ابتدا از این نشانگر در تنوع ژنتیکی گونه‌های غلات استفاده شد (Weining & Langridge, 1991; Weining & Henry, 1995). آغازگرهای ISJ توالی‌هایی با

1- Intron-exon Splice Junction

جنگل‌ها و مراتع کشور (کرج) نگهداری می‌شوند (جدول ۱). از آنجایی که هدف اصلی از مطالعه روی این گیاه بررسی تنوع ژنتیکی تمامی این توده‌ها به منظور تعیین میزان تنوع ژنتیکی و تعیین والدین مناسب جهت اهداف آینده بهنژادی این گیاه بود، لذا از کلیه توده‌ها استفاده گردید زیرا ممکن می‌نماید که برخی از توده‌های با منشأ نامشخص از پتانسیل مناسبی در بهره‌برداریهای به‌نژادی برخوردار باشند و لذا نایستی شانس آنها را در ارزیابی‌ها نادیده در نظر گرفت.

انتخاب والدین تلاقی توده‌های مختلف و سایر کاربردهای بهنژادی استفاده می‌شود.

#### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل ۶۳ توده از مناطق مختلف ایران (گیلان، سمنان، قزوین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، تهران، کردستان، یزد، اصفهان، لرستان، مرکزی، خراسان و کرمان) و ۷ توده آویشن با منشأ جغرافیایی نامشخص بود که همگی در مزرعه تحقیقاتی بانک ژن موسسه تحقیقات

#### جدول ۱- نام گونه‌ها و محل جمع‌آوری توده‌ها.

**Table 1- Name and loction of species accessions.**

گونه‌ها (Species)	منشأ جغرافیایی (Locality)	گونه‌ها (Species)	منشأ جغرافیایی (Locality)
<i>T. daenensis</i>	قزوین، مرکزی، اصفهان، لرستان، سمنان Qazvin, Markazi, Isfahan, Lorestan, Semnan	<i>T. migricus</i>	آذربایجان غربی West Azarbaijan
<i>T. vulgaris</i>	مرکزی Markazi	<i>T. fedtschenkoi</i>	زنجان، آذربایجان غربی، سمنان Zanjan, West Azarbaijan, Semnan
<i>T. pubescens</i>	گیلان، زنجان، قزوین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان Guilan, Zanjan, Qazvin, West Azarbaijan, East Azarbaijan, Kurdistan	<i>T. kotschyanus</i>	تهران، قزوین، کردستان، آذربایجان غربی، زنجان، کرمان Tehran, Qazvin, Kurdistan, West Azarbaijan, Zanjan, Kerman
<i>T. transcaucasius</i>	زنجان، گیلان Zanjan, Guilan	<i>T. transcaspicus</i>	یزد، خراسان Yazd, Khorasan
<i>T. lancifolius</i>	مرکزی، کردستان، فارس، لرستان، اصفهان Markazi, Kurdistan, Fars, Lorestan, Isfahan		

هر توده ۲۰ بوته به طور تصادفی انتخاب و از هر بوته تعداد مساوی برگ جدا شد و یک جمعیت بالک تشکیل گردید. استفاده از جمعیت بالک

این تحقیق در سال ۸۹-۱۳۸۸ در آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام گرفت. جهت استخراج DNA ژنومی، از

Henry, 1995) واکنش PCR در دو مرحله در دستگاه ترموسایکلر مدل Master cycle gradient 5331 صورت گرفت (Przetakiewicz *et al.*, 2002). چرخه‌های حرارتی شامل تک رشته‌ای شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه دمایی بود که در ۷ چرخه اولیه، دمای اتصال آغازگر دو درجه سانتی‌گراد و در طول ۳۳ چرخه بعدی شش درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای ذوب آغازگر در نظر گرفته شد. در تمامی چرخه‌ها، تک رشته‌ای شدن به مدت ۴۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه و مرحله سنتز به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مرحله سنتز نهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از افزودن سه میکرولیتر بافر بارگذاری ۱x (loading buffer)، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه، عکسبرداری زیر نور UV با دستگاه ژل‌دک مدل ITech صورت گرفت. برای امتیازبندی باندها، اطلاعات حاصل به صورت کد صفر (عدم وجود باند) و کد یک (وجود باند) در برنامه Excel وارد شد. برای تعیین ارتباط ژنتیکی نمونه‌ها تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار DARwin5 به روشهای دایس، جاکارد<sup>۱</sup> و ضریب تطابق ساده<sup>۲</sup> (SM) انجام شد و مناسبترین روش انتخاب شد.

جهت حذف تنوعات درون گروهی و نشان دادن تنوعات واقعی بین توده‌ها، روش مفیدی است. با توجه به وجود ترکیبات بازدارنده مثل ترکیبات فنلی، تاننی و پلی‌ساکاریدها در برگ گیاه آویشن، استخراج DNA از این گیاه با مشکلاتی روبروست. به‌طوریکه برای بدست آوردن DNA ژنومی با کیفیت مطلوب، روش‌های مختلف استخراج DNA از برگ آویشن انجام شد و در نهایت روش استخراج Khanuja *et al.*, (1999) با اندکی تغییرات به عنوان بهترین روش معرفی شد (Mojiri *et al.*, 2010). به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر مدل Biophotometr- eppendorf 6131 دارای کووتی با حجم ۵۰۰ میکرولیتر استفاده شد. همچنین برای تعیین کمیت DNA در مقایسه با غلظت‌های مختلف DNA لامبدا از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. از تمامی محلولهای DNA، یک محلول پایه با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد و برای واکنش PCR استفاده گردید. آغازگرهای بکار رفته نیز دارای غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر بودند. مخلوط واکنش ۱۵ میکرولیتری PCR شامل ۴۵ نانوگرم در میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، کلرید منیزیم با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار از هر کدام، ۰/۵ پیکومول از هر آغازگر و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. به علت اختصاصی بودن قسمتی از توالی آغازگرها (Rafalski *et al.*, 1997; Przetakiewicz *et al.*, 2002; Weining &

1- Jacard

2- Simple Matching

سایر گیاهان با آغازگرهای ISJ، نشان داد که این آغازگرها در آویشن کارایی بالاتری نسبت به برخی دیگر گیاهان دارد. تعداد کل باندهای چندشکل از ۱۷ عدد باند برای آغازگر ET<sub>18-6</sub> تا ۲۷ عدد باند برای آغازگرهای ET<sub>12-27</sub> و ET<sub>15-34</sub> متغیر بود. کمترین چندشکلی را آغازگر ET<sub>12-26</sub> با ۹۱ درصد چندشکلی نشان داد. بیشترین و کمترین میزان اطلاعات چندشکلی را آغازگرهای IT<sub>15-36</sub> و IT<sub>18-2</sub> به ترتیب با ۰/۴۰ و ۰/۲۱ تشکیل دادند. میانگین این شاخص برای کل آغازگرها ۰/۳۱ بدست آمد. همچنین بیشترین و کمترین شاخص نشانگر را به ترتیب دو آغازگر ET<sub>15-33</sub> و ET<sub>18-6</sub> تشکیل دادند. بنابراین آغازگر ET<sub>15-33</sub> پتانسیل تولید باند بیشتری را نسبت به سایر آغازگرها دارد (جدول ۲).

در این تحقیق توده‌های آویشن به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس به شش گروه تقسیم شدند (شکل ۱). گروه اول فقط شامل آویشن *T. daenensis subs lancifolius* از استان فارس (توده ۳۸) بود. علت جدا قرار گرفتن این توده احتمالاً به علت تفاوت شرایط اقلیمی محل جمع‌آوری آن نسبت به بقیه توده‌های این گونه بود. گروه دوم دندروگرام بیشترین تعداد توده‌های آویشن را در خود جای داد.

تعداد باندها و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC<sup>۱</sup>) با فرمول  $PIC = \sum [2p_i (1-p_i)]$  (Thimmappaiah *et al.*, 2008) و شاخص نشانگر (MI<sup>۲</sup>) با فرمول  $MI = PIC \cdot \beta$  (Thimmappaiah *et al.*, 2008) برای هر آغازگر محاسبه گردید. در این معادلات  $p_i$  فراوانی باند  $i$ ام و  $\beta$  درصد چندشکلی برای هر آغازگر می‌باشد. تجزیه هماهنگ اصلی نیز با نرم‌افزار NTSYS برای تعیین نحوه پراکنش نشانگرها در سطح ژنوم و تعیین سهم هر مولفه در توجیه تنوع انجام شد (Rohlf, 1998).

## نتایج و بحث

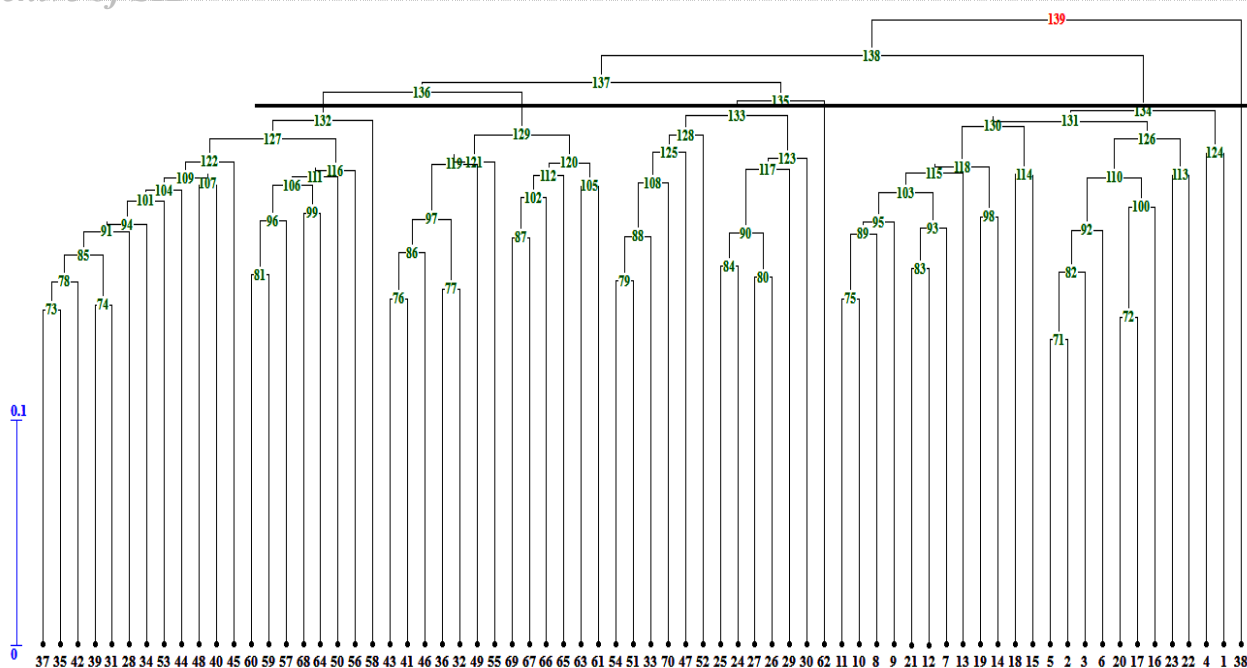
در این تحقیق ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی ۶۸۳ باند چندشکل تولید کرد که ۹۸ درصد از کل ۶۹۴ عدد باند تولید شده را شامل گردید. متوسط تعداد کل باندها به ازای هر آغازگر ۲۳/۱۳ عدد و برای هر ژنوتیپ ۹/۹۱ عدد بود. همچنین متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ۲۲/۸۰ عدد بود. در مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی ارقام لوبیا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، متوسط تعداد باند به ازای هر ژنوتیپ ۱۱/۵ عدد گزارش شد (Nowoseielski *et al.*, 2002). متوسط تعداد باند تولید شده به ازای هر یک از ژنوتیپهای چاودار ۸/۹ عدد برآورد شد (Rafalski *et al.*, 2002). در مطالعه‌ای دیگر میانگین تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر یک از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ۱۴ عدد گزارش شد (Gawel *et al.*, 2002). مقایسه این نتایج با دیگر نتایج بر روی

1- Polymorphic Information Content  
2- Marker Index

جدول ۲- اطلاعات چندشکلی حاصل از آغازگرهای ISJ در توده‌های آویشن.

Table 2- Polymorphism information obtained by ISJ primers in *Thymus* accessions.

ردیف	نام آغازگر	کل	باندهای	درصد	میزان اطلاعات	شاخص
Row	Primer name	باندها	چندشکل	چند شکلی	چندشکلی	نشانگر
		Total bands	Polymorphism bands	Percent of polymorphism	(PIC)	(MI)
1	IT <sub>10-1</sub>	24	24	100	0.32	7.68
2	IT <sub>10-2</sub>	22	21	95	0.34	7.14
3	IT <sub>10-3</sub>	25	25	100	0.31	7.75
4	IT <sub>10-4</sub>	25	24	96	0.27	6.48
5	IT <sub>10-5</sub>	23	23	100	0.28	6.44
6	IT <sub>10-6</sub>	25	25	100	0.36	9.0
7	ET <sub>12-25</sub>	23	22	96	0.30	6.6
8	ET <sub>12-26</sub>	22	20	91	0.22	4.4
9	ET <sub>12-27</sub>	27	27	100	0.33	8.91
10	ET <sub>12-28</sub>	21	20	95	0.34	6.8
11	ET <sub>12-29</sub>	21	20	95	0.35	7.0
12	ET <sub>12-30</sub>	26	26	100	0.31	8.06
13	IT <sub>15-31</sub>	23	22	96	0.30	6.6
14	IT <sub>15-32</sub>	26	26	100	0.26	6.76
15	IT <sub>15-34</sub>	25	25	100	0.33	8.25
16	IT <sub>15-35</sub>	18	18	100	0.33	5.94
17	IT <sub>15-36</sub>	23	23	100	0.40	9.2
18	ET <sub>15-31</sub>	20	20	100	0.27	5.4
19	ET <sub>15-32</sub>	27	26	96	0.27	7.02
20	ET <sub>15-33</sub>	26	26	100	0.36	9.36
21	ET <sub>15-34</sub>	27	27	100	0.28	7.56
22	ET <sub>15-35</sub>	20	20	100	0.35	7.0
23	ET <sub>15-36</sub>	21	21	100	0.27	5.67
24	IT <sub>18-1</sub>	25	25	100	0.28	7.0
25	IT <sub>18-2</sub>	22	22	100	0.28	4.62
26	ET <sub>18-6</sub>	18	17	94	0.22	3.74
27	ISJ <sub>1</sub>	21	21	100	0.34	7.14
28	ISJ <sub>3</sub>	24	24	100	0.26	6.24
29	ISJ <sub>5</sub>	24	24	100	0.36	8.64
30	ISJ <sub>9</sub>	20	19	95	0.30	5.7
	Total	694	683	98	0.33	7.30



شکل ۱- دندروگرام حاصل از روش UPGMA توده‌های آویشن به کمک نرم‌افزار DARwin

Figure 1- Dendrogram of *Thymus* accessions based on UPGMA method as revealed by DARwin5 software.

در این گروه قرار داشتند. در گروه سوم فقط یک توده از *T. daenensis subs daenensis* (توده ۶۲) قرار داشت که از نظر نوع گل‌آذین و میزان کرک اندام‌های مختلف با دیگر توده‌های آویشن دنیایی اختلاف داشت. علاوه بر آن این توده از نظر شرایط اقلیمی محل جمع‌آوری از منطقه گرمسیری سمنان بود، در حالیکه بقیه توده‌ها از مناطق سردسیری کشور (اصفهان، لرستان، مرکزی و قزوین) جمع‌آوری شده بودند. در گروه چهارم دندروگرام چند توده از آویشن *T. kotschyanus* (توده‌های ۲۵، ۲۷، ۴۷، ۵۲ و ۵۴)، آویشن *T. pubescens* (توده‌های ۲۴، ۲۶، ۳۰ و ۵۱)، یک نمونه *T. transcaspicus* از یزد (توده ۳۳) و یک نمونه *T. daenensis subs daenensis* از سمنان (توده ۷۰) دیده شد. در گروه پنجم تمام

مشاهده شد که اکثر توده‌های آویشن *T. kotschyanus* از مناطق سردسیری کشور شامل آذربایجان غربی (توده‌های ۹ و ۱۵)، قزوین (توده‌های ۳، ۵ و ۲۰)، زنجان (توده‌های ۷، ۸ و ۱۰) و کردستان (توده‌های ۱۹ و ۲۱) در این گروه قرار داشتند. علاوه بر آن یک توده از آویشن *T. fedtschenkoi* از آذربایجان غربی (توده ۱۸) با چند توده آویشن *T. pubescens* (توده‌های ۶، ۱۳، ۱۶ و ۱۷) و یک ژنوتیپ هیبرید که از تلاقی *T. pubescens* \* *T. fedtschenkoi* (توده ۱۲) بدست آمده بود، در این گروه جای گرفتند. توده *T. transcaspicus* از قزوین (توده ۲۲)، چهار توده از آویشن *T. daenensis subs lancifolius* (توده‌های ۱، ۴، ۱۴ و ۲۳) و تمام توده‌های آویشن *T. transcaucasicus* (توده‌های ۲ و ۱۱)



تصور نمود و یا ممکن است ناشی از مبادله و جابجایی بذرها باشد. در این گروه همه توده‌های *T. vulgaris* قرار داشت که توده‌های ۲۸، ۵۳ و ۵۹ از مرکزی بودند اما منشأ جغرافیایی دو توده ۳۴ و ۶۰ آن نامشخص بود. نتایج ضرایب شباهت دندروگرام نشان داد که توده ۶۰ بیشترین شباهت را با توده ۵۹ آویشن *T. vulgaris* و توده ۳۴ این گونه نیز بیشترین نزدیکی را با توده ۵۳ آویشن *T. vulgaris* دارد. بنابراین می‌توان گفت که به احتمالاً دو توده ۳۴ و ۶۰ آویشن *T. vulgaris* نیز از استان مرکزی خواهند بود. در مجموع در دندروگرام ۷۰ توده آویشن بیشترین شباهت بین دو توده *T. kotschyanus* و *T. transcaucasius* به ترتیب از قزوین (توده ۵) و گیلان (توده ۲) و کمترین شباهت مربوط به توده *T. daenensis* *subs lancifolius* از استان فارس (توده ۳۸) و آویشن *T. fedtschenkoi* از آذربایجان غربی (توده ۴۸) بود. نتایج گروه‌بندی نشان داد که تمام توده‌های آویشن *T. vulgaris* در گروه ششم، تمام توده‌های *T. migricus* در گروه پنجم و تمام توده‌های *T. transcaucasius* در گروه دوم دندروگرام بودند. توده‌های آویشن *T. daenensis subs daenensis* همگی به جزء دو نمونه (توده‌های ۶۱ و ۶۲) در گروه ششم قرار داشتند. پراکندگی و تنوع بالایی درون توده‌های آویشن *T. kotschyanus* در کل دندروگرام دیده شد. این پراکندگی نیز در توده *T. pubescens*، *T. fedtschenkoi*، *T. transcaspicus* و *T. daenensis subs lancifolius*

توده‌های *T. migricus* (توده‌های ۵۵، ۶۷ و ۶۹) که همگی از آذربایجان غربی بودند قرار داشتند. همچنین یک ژنوتیپ هیبرید از تلاقی *T. kotschyanus* \* *T. trautvetteri* از آذربایجان غربی (توده ۶۳)، چهار توده آویشن *T. pubescens* که دو نمونه از آذربایجان شرقی (توده ۳۲ از مراغه و توده ۳۶ از قره‌چمن) و یک نمونه از کردستان (توده ۴۳) و یک نمونه از زنجان (توده ۴۹)، دو توده *T. kotschyanus* از زنجان (توده ۴۶) و آذربایجان غربی (توده ۶۶) و چند توده آویشن دنیایی از هر دو زیر گونه مربوطه (توده ۴۱ از کردستان، توده ۶۱ از لرستان و توده ۶۵ از مرکزی) وجود داشت. در گروه ششم تمام توده‌های موجود از آویشن *T. vulgaris* (توده‌های ۲۸، ۳۴، ۵۳، ۵۹ و ۶۰) و اکثر توده‌های آویشن *T. daenensis* از دو زیر گونه *T. daenensis* و *T. lancifolius* از لرستان (توده‌های ۳۷، ۴۰، ۴۴ و ۵۸)، مرکزی (توده‌های ۵۶ و ۶۸)، اصفهان (توده‌های ۳۹، ۴۲، ۴۵ و ۶۴) و قزوین (توده ۳۵) قرار داشتند. همچنین یک ژنوتیپ هیبرید *T. pubescens* \* *T. lancifolius* از مرکزی (توده ۵۷) و یک توده آویشن *T. transcaspicus* از خراسان (توده ۳۱)، به همراه یک نمونه از *T. fedtschenkoi* از میان‌دواب آذربایجان غربی (توده ۴۸) و یک نمونه از آویشن *T. kotschyanus* از نقده آذربایجان غربی (توده ۵۰) در این گروه قرار گرفته بودند. علت قرار گرفتن نمونه استان خراسان در این گروه با شرایط اقلیمی متفاوت از بقیه را می‌توان تصادفی

و ISJ نشان داد که آغازگرهای ISJ مورد استفاده کارایی چندانی در تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها نداشتند و مطابقتی بین دندروگرام حاصل از ISJ با تنوع حاصل از نشانگر RAPD و مورفولوژیکی مشاهده نگردید (Vahabi *et al.*, 2008). عده‌ای از محققان طی مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ گلرنگ با نشانگر ISJ گزارش کردند که تطابق خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد (Ramezani *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای دیگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم بومی سیستان از نشانگرهای نیمه تصادفی ISJ و نشانگر PCR-RAPD استفاده شد. نتایج حاصله از آن روابط خویشاوندی ارقام گندم با دو منشأ بومی سیستان و غیربومی را به خوبی آشکار کرد (Bandani *et al.*, 2005). در تحقیقی که بر روی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم دوروم با نشانگرهای ISJ انجام شده بود گزارش شد که این نشانگرها قادر به تفکیک ارقام گندم دوروم از یکدیگر بوده است (Farahani & Arzani, 2004).

نتایج حاصل از تجزیه هم‌هانگ اصلی نشان داد که چهار مولفه اول ۲۱/۸۳ درصد از کل واریانس را توجیه نموده است که سهم مولفه اول ۷/۹۰ درصد بود (جدول ۳). سهم کم مولفه‌های اول در توجیه واریانس کل بیانگر این است که آغازگرهای مورد استفاده در تمام سطح ژنوم گیاه پراکنده‌اند و به عبارتی در نقاط خاصی از ژنوم متمرکز نگردیده‌اند. در واقع این وضعیت خلاف مطالعات و نتایج آنالیزهای آماری مشابه روی

گردید. بنابراین می‌توان این گونه بیان کرد که این گونه‌ها توانایی بالایی در پذیرش مواد ژنتیکی از گونه‌های مختلف را دارند، به عبارت دیگر احتمال رخداد هیبریداسیون بین گونه‌ای و جریان ژنی در این گونه‌ها بسیار بالاست. همچنین از آنجا که این توده‌ها از مناطق با اقلیم‌های متفاوت جمع‌آوری شده‌اند به علت اثر متقابل ژنوتیپ و محیط، ژنتیک این گیاهان طی تکامل طولانی مدت از محیط تأثیر پذیرفته است. بنابراین یکی از احتمال‌های ممکن در خصوص توجیه این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به منشأ جغرافیایی و اثرات محیطی که از آن منشأ گرفته‌اند باشد. برای مثال سه توده آویشن *T. fedtschenkoi* شامل دو توده از آذربایجان غربی (توده‌های ۱۸ و ۴۸) و یک توده از سمنان (توده ۷۰) بود که هر کدام در یک گروه دندروگرام قرار گرفتند. با کمی تأمل درمی‌یابیم که توده آویشن *T. fedtschenkoi* از سمنان (توده ۷۰) مجاور توده آویشن *T. daenensis* از سمنان (توده ۶۲) و *T. kotschyanus* از کرمان (توده ۵۲) قرار گرفته بود. همچنین دو توده آویشن *T. fedtschenkoi* از آذربایجان غربی (توده‌های ۱۸ و ۴۸) مجاور دیگر گونه‌ها که از نظر منشأ جغرافیایی مشترک بودند قرار داشتند. بنابراین علت تنوع زیاد درون گونه *T. fedtschenkoi* را می‌توان احتمالاً به شرایط اقلیمی مشابه این مناطق نسبت داد. نتایج مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت بارهنگ (*Plantago ovata*) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی RAPD

نشانگر مفیدی برای سایر مطالعات ژنتیکی و اصلاحی توده‌های آویشن ایران به منظور مطالعه صفات مهم و بررسی روابط خویشاوندی در جنس آویشن است. همچنین مشخص شد که آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ مورد استفاده، لوکوس‌های سازگاری اقلیمی را کمتر پوشش داده‌اند لذا تنوع ژنتیکی حاصل از داده‌های مولکولی با منشأ جغرافیایی تا حدودی مطابقت داشت. همچنین داده‌های حاصل از آغازگرهای ISJ توانستند تا حدودی گونه‌های آویشن را از هم تفکیک کنند. پیشنهاد می‌شود که جهت ارائه یک دید جامع‌تر از تمامی آویشن‌های ایران نمونه‌گیری به عمل آید و سایر نشانگرهای مولکولی در مطالعات تنوع ژنتیکی نیز مورد استفاده قرار گیرند.

### سپاسگزاری

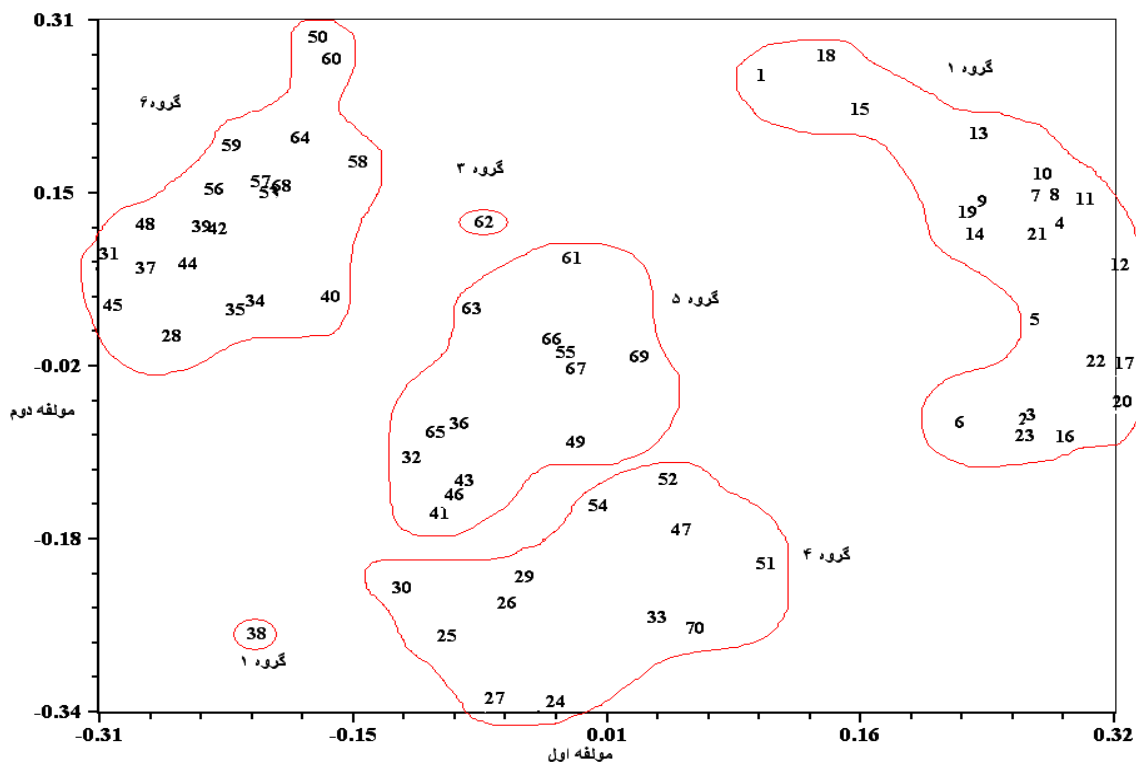
از موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به خاطر در اختیار گذاشتن توده‌های آویشن قدردانی می‌نمائیم. از مسئولین مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان که تأمین مالی این طرح را برعهده داشتند نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

صفات مورفولوژیک می‌باشد؛ زیرا در مطالعه صفات مورفولوژیک محقق بدنبال تعیین مؤلفه‌ها و صفاتی است که بیشترین واریانس را توجیه کنند در حالیکه در مطالعات ملکولی اگر درصد واریانس بدست آمده توسط مؤلفه‌های اول عدد بزرگی باشد نشان دهنده آن است که بیشتر مناطق ملکولی تکثیر شده در بخش‌های خاصی از کروموزومها یا ژنوم متمرکز گردیده‌اند و لذا این موضوع یک وضعیت مطلوب جهت بررسی جامع‌تر تنوع در سطح کل ژنوم نیست. در مطالعه روابط ژنتیکی سه گونه نعنای با استفاده از نشانگر R-ISSR نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول ۲۹/۸۵ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند که عدد پایین بدست آمده نشان‌دهنده توزیع بسیار مناسب نشانگرهای R-ISSR در سراسر طول ژنوم بوده است (Rahimmalek, 2011). نتایج این گروه‌بندی (شکل ۲) کاملاً با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. مطالعاتی که بر روی سویا (Li & Nelson, 2002) و روی پنبه (Linos et al., 2002) با نشانگر تصادفی RAPD صورت گرفت، مناسب بودن این تجزیه را تأیید نموده است. از آنجا که اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به وجود تنوع ژنتیکی بوده پس انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری است. مطالعه حاضر نشان داد که نشانگر ISJ

جدول ۳- مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مولفه و واریانس تجمعی حاصل از تجزیه همابنگ اصلی بر اساس نشانگرهای نیمه تصادفی.

**Table 3- Eigen values, proportion of variance explained by each component and cumulative variance of principle coordinate analysis based on semi-random markers.**

واریانس تجمعی Cumulative variance	درصد واریانس Percent of variance	مقادیر ویژه Eigen values	مولفه‌های اصلی Main components
7.90	7.90	2.70	مولفه اول First component
13.04	5.14	1.76	مولفه دوم Second component
17.50	4.46	1.53	مولفه سوم Third component
21.83	4.33	1.48	مولفه چهارم Fourth component



شکل ۲- نمودار دو بعدی توده‌های آویشن با استفاده از تجزیه همابنگ اصلی.

**Figure 2- Two dimensional diagram of *Thymus* accessions using principal coordinate analysis.**

- Bandani AR, Mohhamadi AGh, Imamjomeh AA, Khalafbaghi MR, Ranan S, Akbari Moghadam H (2005). Estimation of genetic diversity in genotypes of wheat using RAPD-PCR (Random primers) and ISJ (Semi-Random Primers) markers. Proc. of 4<sup>th</sup> National Biotechnology Congress of Iran. Milad tower Conference Hall, of Tehran.
- Brabant Ph, Gouyon PH, Lefort G, Valdeyron G, Vernet Ph (1980). Pollination studies in *Thymus vulgaris* L. (Labiatae). Acta Oecologica. Oecologia Plantarum 1: 37-45.
- Farahani E, Arzani A (2004). The use of semi-random marker for evaluation of genetic diversity among cultivars and F1 hybrids of durum wheat. Proc. of 4<sup>th</sup> International Iran & Russia Conference.
- Gawel M, Wisniewska I, Rafalski A (2002). Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 577-582.
- Jamzad Z (2009). *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Reaserch Institute of Forests and Rangelands of Tehran, Iran Press.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S (1999). Rapid isolation of DNA dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter 17: 1-7.
- Kumar LS (1999). DNA marker in plant improvement. Biotechnology Advances 17: 143-182.
- Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R (2006). Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. Theoretical and Applied Genetic 113: 453-465.
- Li Z, Nelson RL (2002). RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese provinces. Crop Science 42: 1737-1744.
- Linos AA, Bebeli PJ, Kaltsikes PJ (2002). Cultivar identification in upland cotton using RAPD markers. Australian Journal of Agriculture Research 53: 637-642.
- Lopez-Pujol J, Bosch M, Simon J, Blanche C (2004). Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). Annals of Botany 93: 323-332.
- Mojiri F, Zabeti SM, Ismaili A, Nazarian-Firouzabadi F, Madah-Arefi H, Ahmadi H (2010). Optimization genomic DNA extraction method in medicine leaf of plant in *Thymus* spp. Proc. of 4<sup>th</sup> Regional Congress on Advances in Agricultural Research Sanandaj. May. 12-13, 2010. University of Kordestan, Sanandaj. pp. 100.
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. of the National Academy of Sciences, United States America. 70: 3321-3323.
- Nowosielski J, Podyma W, Nowosielska D (2002). Molecular research on the genetic diversity of polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 753-762.
- Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W (2002). The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 671-676.
- Rafalski A, Gidzinska M, Wisniewska I (1997). PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds. Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghum. Royal Society Chemistry Cambridge. UK, pp. 106-111.
- Rafalski A, Madej L, Wisniewska I, Gawel M (2002). The genetic diversity of components of rye hybrids. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 471-475.

- Rahimmalek M (2011). Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers. *Agricultural Biotechnology* 10: 11-17.
- Ramezani M, Ismaili A, Nazarian-Firouzabadi F, Bakhshkhaniki Gh (2009). Study of genetic diversity among safflower genotypes (*Carthamus tinctorius* L.) using ISJ molecular markers. M.Sc. thesis of Payam Noor University, Tehran.
- Rohlf M (1998). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Samiei K, Arzani A, Mirmohammadi Maibody SAM (2008). Evaluation of genetic diversity of Iranian indigenous clover populations, using random and semi randoms primers. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 12: 157-164.
- Sharma KK, Crouch JH, Hash CT (2002). Applications of biotechnology for crop improvement: Prospects and constraints. *Plants Science* 163: 381-395.
- Smolik M, Jadczyk D, Korzeniewska S (2009). Assessment of morphological and genetic variability in some *Thymus* accessions using molecular markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37: 234-240.
- Stahl-Biskup E, Saez F (2002). Thyme: The genus *Thymus*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 551-553.
- Thimmappaiah W, Santhosh G, Shobha D, Melwyn GS (2008). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118: 1-7.
- Trindade H, Costa MM, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG (2008). Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, SaoJorage and Terceira islands (Azores). *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 190-197.
- Vahabi AA, Lotfi A, Solouki M, Bahrami S (2008). Molecular and morphological markers for the evaluation of diversity between *Plantago ovata* in Iran. *Biotechnology* 4: 702-709.
- Valdeyron O, Domme B, Vernet Ph (1977). Self-fertilization in male fertile plants of a gynodioecious species: *Thymus vulgaris* L. *Heredity* 2: 243-249.
- Weining S, Henry RJ (1995). Molecular analysis of DNA polymorphism of barley (*Hordeum spontaneum* L.) germplasm using the polymerase chain reaction. *Genetic Research Crop Evolution* 42: 273-281.
- Weining S, Langridge P (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetic* 82: 209-216.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999). POPGENE: The user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zargari A (1973). Medicinal plants, Volume IV, Fifth Edition. Tehran University Press.

## Study of Genetic Diversity of Iranian *Thymus* Accessions, Using ISJ Semi-random Markers

Mojiri F.<sup>1</sup>, Ismaili A.\*<sup>2</sup>, Nazarian F.<sup>2</sup>, Madah Arefi H.<sup>3</sup>, Ahmadi H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Former M.Sc. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

<sup>2</sup> Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

<sup>3</sup> Associated professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

<sup>4</sup> Associated professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran.

### Abstract

*Thymus* is one of the famous medicine herbs of Lamiaceae genus. Due to the high potential of hybridization and introgression among *thymus* species, they have high genetic variability and study of genetic variability is difficult in this genus. According to the existing problems in the field of breeding of this medicine herb, use of molecular markers could be a valuable tool for evaluation and exploitation of germplasm. In this study, for assessment of genetic diversity among 70 Iranian *Thymus*, 30 semi-random ISJ (Intron-exon Splicing Junction) primers were used. Total primers produced 694 bands that 683 bands were polymorphic. Average band number per primer and per genotype was 23.13 and 9.91, respectively. Cluster analysis using DARwin5 software and UPGMA method based on Dice's similarity matrix divided accessions into 6 clusters. The highest similarity was estimated between *T. kotschyanus* and *T. transcaucasicus* and lowest similarity was estimated between *T. lancifolius* and *T. fedtschenkoi*. The highest and lowest of polymorphic information content (PIC) revealed by IT<sub>15-36</sub> and IT<sub>18-2</sub> primers, respectively. The highest and lowest marker index (MI) included ET<sub>15-33</sub> and ET<sub>18-6</sub> primers, respectively. Results showed that clustering based on cluster analysis partly adapted with geographical origin dispersion. Totally, application of semi-random primers could be useful in assessment of genetic diversity of *Thymus* accessions.

**Key words:** *Thymus*, Semi-random Marker, ISJ, Genetic Diversity, Polymorphism.

\* Corresponding Author: Ismaili A.

Tel: +986614200012

E-mail: ahmad\_ismaili@yahoo.com