Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) با استفاده از نشانگر ISSR

جلال خورشیدی[۱]، مجید شکرپور*[۲]، وحیده ناظری[۳]

[۱] دانشجوی سابق دکتری دانشگاه تهران، استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران.

[۲] دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[۳] استاد، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۷

چکیده

ارزیابی تنوع جمعیت‌های مختلف یک گونه گیاه وحشی از نخستین و مهمترین گام‌های اهلی‌سازی و اصلاح نژاد آن می‌باشد. گیاه دارویی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) از گیاهان اندمیک ایران بوده که به لحاظ درصد اسانس و نیز تیمول بالای آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و لذا ارزیابی جمعیت‌های مختلف آن در راستای اهلی‌سازی این گونه گیاهی امری ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور در این پژوهش از ۱۳ آغازگر ISSR جهت بررسی تنوع درون و بین جمعیتی هشت جمعیت از این گیاه شامل ملایر ۱، ملایر ۲، اراک، خانه‌میران بالا، خانه‌میران پائین، زاغه و شازند استفاده گردید که در مجموع ۲۹۳ باند ایجاد نمودند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده برای آغازگرها از ۰/۰۸ تا ۰/۱۵ متغیر بود. تنوع درون جمعیت‌ها بسیار بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بود، طوریکه ۹۸ درصد واریانس مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها ۲ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها بود. فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها ارتباط نزدیکی با فاصله جغرافیایی آنها نداشت. جمعیت جوزان دارای بیشترین و جمعیت شازند دارای کمترین تنوع بر اساس شاخص PIC بودند. بیشترین فاصله ژنتیکی بر اساس شاخص نی بین دو جمعیت شازند و خانه میران پایین و بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت ملایر ۱ با جوزان و خانه میران بالا مشاهده شد که می‌تواند در اهلی‌سازی و اصلاح‌نژاد آویشن دنایی حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: *آویشن دنایی، اندمیک، تنوع، ISSR.*

* نویسنده مسئول: مجید شکرپور تلفن: ۰۹۱۲۰۶۵۰۷۲۴ Email: shokrpour@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاهان دارویی انحصاری از طرفی به دلیل پراکنش جغرافیایی محدود و نیازهای زیست‌بومی خاصی که دارند و از طرفی دیگر به دلیل برداشت‌های بی‌رویه و غیر اصولی و نیز آسیب‌های اقلیمی (مثل خشکسالی)، آسیب‌های ناشی از انسان (مثل آتش‌زدن مراتع و جنگل‌ها، تغییر کاربری مراتع به زمین‌های زراعی یا ساخت و ساز و چراهای بی‌رویه)، دائم در معرض خطر انقراض و نابودی قرار دارند. برخی از این گیاهان دارای پتانسیل دارویی بالایی بوده و مقاومت بالایی به تنش های غیرزنده مثل خشکی، شوری و خاک‌های آهکی دارند و لذا اهلی‌کردن آنها می‌تواند توجیه اقتصادی داشته باشد (Alibrahim *et al*., 2004). اهلی‌سازی این گیاهان نه تنها می‌تواند از انقراض آنها جلوگیری نماید، بلکه تامین کننده نیازهای دارویی کشور نیز بوده و می‌تواند سود اقتصادی بالایی را با صادر کردن این گیاهان برای کشور ایجاد کرد و از طرف دیگر زمینه اشتغال‌زایی بالایی را نیز ایجاد کند (Najafi *et al*., 2005). نخستین گام در راستای اهلی‌کردن یک گیاه خاص، ارزیابی تنوع درون گونه‌ای جمعیت‌های مختلف آن گونه گیاهی به کمک نشانگرهای ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی جهت شناسایی میزان شباهت و تفاوت بین جمعیت‌ها، و نیز برتری‌های هر جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها بسته به هدف اصلاحگر می‌باشد (Nemeth, 2000). کاربرد نشانگرهای مختلف در ارزیابی جمعیت‌های مختلف از طرفی باعث افزایش سرعت و دقت انتخاب جمعیت برتر می‌گردد و از طرف دیگر هزینه‌های اهلی‌سازی را کاهش می‌دهد. بسته به امکانات موجود می توان از نشانگرهای مختلفی استفاده کرد. نشانگرهای ریخت‌شناسی، از جمله ساده‌ترین نشانگرها بوده که به آسانی قابل ارزیابی هستند و توارث آنها اغلب به صورت غالب و مغلوب می‌باشد. این نشانگرها ممکن است تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرند و در طی زمان تغییر پیدا کنند، لذا خیلی دقیق نیستند (Naghavi *et al*., 2004). نشانگرهای بیوشیمیایی شامل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و اسانس‌ها هستند که در واقع محصول تظاهر ژن بوده و تنوع در آنها می‌تواند بیانگر تنوع در توالی ژنوم باشد. نشانگرهای بیوشیمیایی نیز تحت تاثیر محیط بوده و لذا نمی‌توانند نشانگرهای خیلی دقیقی به حساب آیند و نیز ارزیابی برخی از آنها خیلی هزینه‌بر می‌باشند (Vicente *et al*., 2004). نشانگرهای مبتنی بر DNA بر پایه بررسی مستقیم ژنوم و تعیین چندشکلی DNA می‌باشند. به کمک این نشانگرها شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی امکان‌پذیر است. فراوانی فوق العاده این نشانگرها، عدم تاثیر پذیری آنها از شرایط محیطی خارجی و داخلی موجود، امکان به

www.SID.ir

Archive of SID

کارگیری آنها در مراحل نخست رشد گیاهان، فراهم نمودن امکان پژوهش روی گیاهان در خارج از فصل و محل کاشت، دقت و قابلیت مطلوب تفسیر نتایج، همبارز بودن بسیاری از این نشانگرها، امکان استفاده از آنها در مورد گونه‌های منقرض شده، سهولت تشخیص افراد خالص از ناخالص، سهولت امتیازدهی و تجزیه تحلیل نتایج، دسترسی به برنامه‌های رایانه‌ای قوی برای تجزیه و تحلیل و تفسیر سریع نتایج، از جمله مزایای کاربرد نشانگرهای مبتنی بر DNA می باشند. استفاده از هر سه نشانگر بطور همزمان می تواند نتیجه بهتری فراهم کند (Naghavi *et al*., 2004; Barzan *et al*., 2015; Saghalli *et al*., 2016). یکی از نشانگرهای مولکولی که در دهه‌های اخیر مورد توجه اصلاح‌گران قرار گرفته است، نشانگر ISSR[۱] است. استفاده از نشانگرهای ISSR به عنوان یک تکنیک حد واسط در بین نشانگرهای ملکولی SSR[۲]، RAPD[۳] و AFLP[۴] مطرح شده است. این تکنیک به طور وسیعی در پژوهش‌های تنوع ژنتیکی به کار می رود. زیرا اولاً نیازی به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم ندارد و ثانیاً هزینه این روش نسبت به روش‌هایی نظیر SSR و AFLP پائین‌تر و اجرای آن نیز راحت‌تر است (Aga & Bekele, 2005). ISSR دارای تکرارپذیری و پایداری بالاتری نسبت به برخی دیگر از نشانگرهای مبتنی به PCR نظیر RAPD است که دلیل این موضوع طویل‌تر بودن آغازگرها و بالا بودن دمای اتصال است (Su *et al*., 2009). در پژوهشی Rahimmalek *et al*. (2009) در بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز جغرافیایی ۱۷ توده آویشن دنایی با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR تعداد ۳۵۶ باند مشاهده کردند که تعداد ۲۲۸ باند چند شکل بودند. دندروگرام تولید شده از داده‌ها، توده‌های بررسی شده را در دو گروه ژنتیکی متمایز قرار داد و انشعاب ژنتیکی آنها ارتباط قوی با مناطق جغرافیایی و رویشگاهی آنها نشان داد. در پژوهشی دیگر Bigdeloo (2010) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و برون جمعیتی گیاه دارویی آویشن کرمانی از نشانگر ملکولی ISSR استفاده کرد که از مجموع ۱۲ آغازگر بکار رفته، تعداد ۱۲۷ باند با وضوح بالا تولید گردید که از این تعداد ۲۲ باند یک شکل و ۱۰۵ باند دارای چند شکلی بودند. در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ تک بوته *Thymus caespititus* جمع‌آوری شده از سه منطقه کوروا، فلوریس و گارسیوسا (پرتغال) با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR و ۱۷ آغازگر RAPD به ترتیب ۱۲۷ و ۱۹۹ باند چند شکل تولید شد. اطلاعات بدست آمده گیاهان جمع‌آوری شده از مناطق کوروا و فلوریس را در گروه جداگانه ای از گیاهان

[۱] - Inter simple sequence repeat

[۲] - Simple sequence repeats

[۳] - Random amplified polymorphic DNA

[۴] - Amplified fragment length polymorphism

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری شده از منطقه گارسیوسا قرار داد (Trindade *et al*., 2009). آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) از گیاهان دارویی انحصاری ایران بوده که به دلیل درصد اسانس بالا و نیز میزان تیمول بالای اسانس آن در مقایسه با سایر گونه‌های آویشن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Barazandeh & Bagherzadeh, 2007). از آنجائیکه این گونه پراکنش وسیعی در ایران داشته که نشان از سازگاری بالای آن با اغلب شرایط آب و هوایی ایران می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که شناخت بیشتر پتانسیل‌های دارویی این گیاه و نیز کمک به فرایند اهلی‌سازی آن بتواند از انقراض آن جلوگیری کرده و همچنین زمینه کشت‌وکار و اشتغال‌زایی زیادی را فراهم آورد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های این گونه با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در ابتدا مناطق پراکنش آویشن دنایی با استفاده از منابع مختلف شناسایی گردید (Jamzad, 2009). سپس در بین آنها، سه استان مرکزی، همدان و لرستان انتخاب شدند. به کمک نرم افزارهای google earth، GIS و نقشه های مدل رقومی ارتفاع [1] خصوصیات جغرافیایی هر منطقه استخراج گردید (جدول ۱). در اوایل مرداد ۱۳۹۱ به مناطق مورد نظر مراجعه کرده و بذور مربوط به هر جمعیت جمع‌آوری گردید. بذرهای جمع‌آوری شده در گلخانه گروه علوم و مهندسی باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران در گلدان‌های یکبار مصرف (ارتفاع ۹ و عرض ۶ سانتیمتر) و بستر کشت ماسه بادی و پیت (نسبت ۱:۱) تکثیر شدند.

به منظور استخراج DNA نمونه‌های گیاهی از روش دویل و دویل (Doyle & Doyle, 1990) استفاده شد. پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (دستگاه نانودراپ) و الکترفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بدست آمده و مقدار DNA در هر میکرولیتر بر حسب نانوگرم در هر میکرولیتر محلول توسط برنامه نرم افزاری دستگاه برای هر نمونه گزارش شد و با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد، کیفیت باند DNA هر نمونه مشخص شد. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش سری ISCS بودند که از شرکت سیناژن تهیه شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.

[1] - Digital Elevation Model

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق مورد پژوهش.

Table 1- Geographical characteristics of studied regions.

استان Province	منطقه جمع آوری Collecting site	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)	عرض جغرافیایی (N) Latitude (N)	طول جغرافیایی (E) Longitude (E)
همدان Hamedan	ملایر ۱ Malayer 1	1844	34° 15' 00"	48° 35' 59"
	ملایر ۲ Malayer 2	1891	34° 14' 49"	48° 35' 30"
	جوزان Jowzan	1843	34° 15' 05"	48° 58' 25"
مرکزی Markazi	اراک Arak	2032	33° 59' 35"	49° 32' 56"
	خانه میران بالا Khane mirane bala	2865	33° 59' 04"	49° 34' 04"
	خانه میران پایین Khane mirane paien	2250	34° 59' 14"	49° 34' 05"
	شازند Shazand	1979	33° 54' 14"	49° 23' 48"
لرستان Lorestan	زاغه Zaghe	1825	33° 45' 03"	49° 01' 06"

جدول ۲- آغازگرها، توالی و دمای ذوب آنها.

Table 2- Primers, sequences and melting temperature.

آغازگر Primer	توالی Sequence	Tm
ISCS77	5′-ACACACACACACACACT-3′	43.4
ISCS87	5′-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3′	50.7
ISCS64	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3′	50.7
ISCS65	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3′	44.6
ISCS70	5′-CACACACACACACACAG-3′	50.7
ISCS58	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3′	50.7
ISCS51	5′-CACACACACACACACART-3′	50.7
ISCS43	5′-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3′	41
ISCS47	5′-CACACACACACACACARG-3′	48.8
ISCS32	5′-ACACACACACACACACYG-3′	58.8
ISCS18	5′-DBDBCCACCACCACCACCA-3′	57.6
ISCS7	5′-TCTCTCTCTCTCTCTCTCC-3′	58.8
ISCS17	5′-DBDBCACCACCACCACCAC-3′	58.8

www.SID.ir

Archive of SID

برای به دست آوردن مناسب‌ترین دمای اتصال هر آغازگر، با استفاده از یک DNA تست گرادیان دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر[۱] انجام شد.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مخلوط ۱۵ میکرولیتری شامل ۷/۵ میکرولیتر کیت آماده آمپلیکون (شامل dNTPs، PCR buffer، Taq DNA Polymerase و MgCl2)، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر و ۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده آماده شد. سپس نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ به خوبی مخلوط شدند. PCR توسط دستگاه ترمو سایکلر Bio-Rad مدل C1000Touch با شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل ۵۰ ثانیه دمای ۹۴°C برای واسرشت سازی، ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگر به DNA واسرشت شده، ۲/۵ دقیقه دمای ۷۲°C برای گسترش رشته DNA جدید و ۵ دقیقه دمای ۷۲ °C برای گسترش نهایی بود.

پس از اتمام PCR، ۸ میکرولیتر از هر نمونه به همراه ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری در هر چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد ریخته شد. برای رنگ‌آمیزی از ژل رد، برای تخمین طول قطعات محصول PCR از سایز مارکر ۱ kb و برای الکتروفورز از بافر TBE استفاده گردید. الکتروفورز به مدت ۱۸۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت انجام گردید. پس از مدت زمان ذکر شده، عکسبرداری از ژل به کمک دستگاه ژل داک مدل UVP BioDoc-1tTM system انجام گرفت.

ارزیابی آغازگرها، میزان تنوع درون و بین جمعیت‌ها، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها، رسم نمودار دو بعدی جمعیت‌ها بر اساس مولفه‌های هماهنگ اصلی توسط نرم افزار GenALEx 6.4 انجام گرفت. محتوی پلی مورفیسم نسبی آغازگرها (PIC) با استفاده از فرمول $PIC= 1-\sum pi^2$ توسط نرم افزار PowerMarker 3.0 بدست آمد که در این فرمول p برابر با آلل iام هر جایگاه ژنی برای کلیه ژنوتیپ‌ها می‌باشد. شاخص تنوع ژنتیکی شانون با استفاده از فرمول $H= -\sum_i^n p_i \ln p_i$ محاسبه گردید که در این فرمول p_i فراوانی آلل iام و n تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در آن مکان ژنی است. شاخص تنوع ژنی نی نیز با استفاده از فرمول $H_i= 1-\sum_{j=1}^n pij^2$ بدست آمد که در این فرمول p_{ij} فراوانی آلل j برای نشانگر i و n مجموع آلل‌هاست. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از تجزیه ISSR به کمک نرم افزار PopGen32 انجام شد و ارتباط بین نشانگرهای ISSR و خصوصیات ریخت‌شناسی جمعیت‌های

[۱] - Thermocycler

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

مورد پژوهش نیز با استفاده از رگرسیون خطی چندگانه گام به گام به کمک نرم افزار SPSS21 بدست آمد.

نتایج و بحث

در این پژوهش ۱۳ آغازگر مورد استفاده قرار گرفت که در مجموع ۲۹۳ باند ایجاد نمودند. از این تعداد، ۲۷۱ باند چند شکل و تعداد ۲۲ باند یک شکل بودند. بیشترین تعداد باند (۳۴) توسط آغازگر ISCS64 و کمترین تعداد باند (۱۸) توسط آغازگرهای ISCS87 و ISCS17 بدست آمد. همچنین بیشترین (۳۴) و کمترین (۱۵) تعداد باند چند شکل به ترتیب توسط آغازگرهای ISCS64 و ISCS17 بدست آمد. میانگین تعداد کل باندهای مشاهده شده به ازای هر آغازگر ۲۲/۵ و میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر آغازگر ۲۰/۸ بود. بیشترین درصد چند شکلی (۱۰۰ ٪) با آغازگرهای ISCS64، ISCS65، ISCS43، ISCS47 و ISCS32 بدست آمد و کمترین درصد چند شکلی (۸۱ ٪) توسط آغازگر ISCS7 بدست آمد. میانگین چند شکلی در مجموع آغازگرها حدود ۹۲ ٪ بود (جدول ۳). اندازه باندهای تشکیل شده توسط آغازگرهای مورد پژوهش در محدوده ۵۰ تا ۵۰۰ جفت باز بودند. در پژوهشی Bigdeloo (2010) با استفاده از ۱۲ آغازگر تنوع جمعیت‌های مختلف آویشن کرمانی را مورد ارزیابی قرار داد که از مجموع ۱۲ آغازگر بکار گرفته شده، تعداد ۱۲۷ باند با وضوح بالا مشاهده کرد و از این تعداد، ۲۲ باند یک شکل و ۱۰۵ باند دارای چند شکلی بودند. همچنین وی بیشترین درصد چند شکلی توسط آغازگرهای مورد استفاده را ۹۴ درصد (آغازگر IS14) و کمترین را ۶۳ درصد (آغازگرهای IS23 و IS24) گزارش کرد. Mondak (2013) تنوع چند گونه مختلف آویشن را با استفاده از نشانگر ISSR به کمک ۱۲ آغازگر مورد ارزیابی قرار داد و بیشترین چند شکلی بدست آمده توسط آغازگرهای مورد استفاده را ۷۰/۴ درصد گزارش کرد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده برای ۱۳ آغازگر مورد استفاده با متوسط ۰/۱۱ از ۰/۰۸ تا ۰/۱۵ متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی بالا و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد (Mondak, 2013). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده، آغازگرهای ISCS70، ISCS7 و ISCS17 با داشتن بیشترین مقدار PIC نقش بیشتری در تمیز ژنوتیپ‌های آویشن دنایی در مقایسه با سایر آغازگرها داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- توالی و درصد چند شکلی مشاهده شده توسط آغازگرهای ISSR بکار رفته در جمعیت‌های مختلف آویشن دنایی.

Table 3- Sequence and observed polymorphism percentage by used ISSR primers in different populations of *Thymus daenensis* Celak.

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد کل باندهای مشاهده شده Total observed bands	تعداد باندهای چند شکل Number of polymorphic bands	درصد چند شکلی Polymorphism percentage	محتوی پلی مورفیسم نسبی (PIC) Polymorphism information content
ISCS77	5′-ACACACACACACACACT-3′	25	21	84	0.14
ISCS87	5′-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3′	18	17	94.4	0.08
ISCS64	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3′	34	34	100	0.09
ISCS65	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3′	21	21	100	0.09
ISCS70	5′-CACACACACACACACAG-3′	20	17	85	0.15
ISCS58	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3′	20	18	90	0.12
ISCS51	5′-CACACACACACACACART-3′	21	19	90.5	0.09
ISCS43	5′-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3′	24	24	100	0.09
ISCS47	5′-CACACACACACACACARG-3′	25	25	100	0.08
ISCS32	5′-ACACACACACACACACYG-3′	22	22	100	0.11
ISCS18	5′-DBDBCCACCACCACCACCA-3′	24	21	87.5	0.11
ISCS7	5′-TCTCTCTCTCTCTCTCTCC-3′	21	17	81	0.13
ISCS17	5′-DBDBCACCACCACCACCAC-3′	18	15	83.3	0.14
	میانگین Mean	22.5	20.8	92	0.11

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی نشاندهنده تنوع بسیار بالای درون جمعیت‌ها در مقایسه با بین جمعیت‌ها بود، طوریکه از کل واریانس مشاهده شده، ۹۸ درصد تنوع ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها ۲ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها بود (جدول ۴). بطور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. در گونه‌های دگرگشن به علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها بالا است. در مورد این گونه‌ها در صورتی که جریان ژنی بین

www.SID.ir

Archive of SID

رویشگاه‌ها تحت تاثیر عوامل غیرطبیعی چون تخریب رویشگاه‌ها در اثر چرای بی‌رویه، چرای مفرط و سایر عوامل قطع شود، فاصله ژنتیکی جمعیت‌های منقطع افزایش می‌یابد و به علت افزایش هوموژنی و افتراق بین جمعیت‌ها پس رفتگی ژنتیکی رخ خواهد داد (Hamrick & Godt, 1989). Bigdeloo (2010) در مطاله خود برروی ۷۰ ژنوتیپ مربوط به ۷ جمعیت آویشن کرمانی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR گزارش کرد که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی حدود ۶۷ درصد و تنوع بین جمعیتی حدود ۳۳ بود. همچنین Yavari (2009) با مطالعه ۶ جمعیت آویشن آذربایجانی با استفاده از ۲۱ نشانگر RAPD، میزان تنوع درون جمعیتی را ۷۶ درصد و تنوع بین جمعیتی را ۲۴ درصد گزارش کرد. Mondak (2013) به کمک ۱۲ نشانگر ISSR تنوع درون و بین جمعیتی چند گونه آویشن را مورد ارزیابی قرار داد و میزان تنوع بین و درون جمعیتی رابه ترتیب ۲۷ و ۷۳ درصد گزارش کرد.

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های آویشن دنایی.

Table 4- Molecular variance analysis of *Thymus daenensis* Celak. Populations.

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares	واریانس تخمینی Estimated variance	واریانس ژنتیکی (٪) Genetic variance (%)
بین جمعیت‌ها Among populations	7	26.71	0.428	2
درون جمعیت‌ها Within populations	49	23.72	23.72	98
کل Total	56	-	24.14	100

برای ارزیابی تنوع درون جمعیت‌ها از میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های موثر، شاخص تنوع شانون و درصد باندهای چند شکل استفاده گردید و میزان فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از شاخص نی (Nei, 1973) بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده مربوط به جمعیت جوزان و کمترین مربوط به جمعیت شازند بود. همچنین بیشترین تعداد آلل موثر در جمعیت جوزان و کمترین در جمعیت ملایر ۱ مشاهده گردید. در گیاه آویشن به دلیل میزان بالای دگرگشنی و تلاقی‌های درون و بین گونه ای، میزان

www.SID.ir

Archive of SID

هتروزیگوسیتی و تنوع بالاست. بر اساس شاخص شانون و نیز هتروزیگوسیتی بدست آمده، جمعیت‌های جوزان و زاغه دارای بیشترین تنوع و جمعیت شازند کمترین تنوع را داشت. نتایج درصد باندهای چند شکل نیز وجود تنوع بالا در جمعیت‌های جوزان و زاغه و تنوع پایین در جمعیت شازند را نشان داد (جدول۵)

جدول ۵- تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بر اساس شاخص‌های تنوع.

Table 5- Genetic diversity within populations based on diversity indices.

% Pol	PA	He	H	Ne	Na	جمعیت Population
44.3	7	± 0.006 0.077	0.13 ± 0.01	1.1 ± 0.009	0.96 ± 0.056	ملایر ۱ Malayer 1
34.8	0	± 0.007 0.078	0.13 ± 0.011	1.1 ± 0.011	0.77 ± 0.055	ملایر ۲ Malayer 2
57.6	10	± 0.007 0.105	0.18 ± 0.011	1.14 ± 0.012	1.22 ± 0.055	جوزان Jowzan
42.6	3	± 0.008 0.094	0.15 ± 0.012	1.13 ± 0.012	0.92 ± 0.056	اراک Arak
36.1	4	± 0.007 0.079	0.13 ± 0.011	1.1 ± 0.01	0.79 ± 0.055	خانه میران بالا Khane miran bala
42.6	12	0.096 ± 0.007	0.16 ± 0.012	1.13 ± 0.011	0.93 ± 0.056	خانه میران پایین Khane miran paien
56.3	19	± 0.007 0.102	0.17 ± 0.011	1.13 ± 0.011	1.2 ± 0.055	زاغه Zaghe
15.7	3	± 0.009 0.065	0.09 ± 0.013	1.11 ± 0.015	0.4 ± 0.044	شازند Shazand
41.3	7.2	± 0.004 0.087	0.147 ± 0.004	1.12 ± 0.004	0.904 ± 0.02	میانگین Mean

Na: تعداد آلل مشاهده شده، **The number of observed alleles**، **Ne**: تعداد آلل موثر، **The number of effective alleles**

H: شاخص شانون، **Shannon's index** **He**: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، **Expected heterozygosity** **PA**: آلل‌های اختصاصی، **Private alleles** **Pol**: چند شکلی، **Polymorphism**.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بدست آمده بر اساس شاخص نی نشان داد که در جمعیت‌های مورد پژوهش، بیشترین تفاوت و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت شازند و خانه میران پایین بود (۰/۰۳۶) و کمترین فاصله ژنتیکی یا به عبارتی دیگر بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت ملایر ۱ و جوزان و نیز ملایر ۱ و خانه میران بالا دیده شد (۰/۰۰۷). بطور کلی جمعیت شازند بر اساس شاخص نی، دارای بیشترین فاصله ژنتیکی با سایر جمعیت‌ها بود (جدول ۶). نتایج خصوصیات ریخت‌شناسی و عملکردی نیز بیانگر این واقعیت بود، چرا که این جمعیت بطور کلی دارای رشد کم و عملکرد پایینتری در مقایسه با سایر جمعیت‌ها بود. در مطالعه Yavari (2009) روی جمعیت‌های مختلف آویشن آذربایجانی، بیشترین فاصله بین جمعیت ها، ۰/۱۳ گزارش شده است. همچنین Bigdeloo (2010) با پژوهش روی چند جمعیت آویشن کرمانی، بیشترین فاصله بین جمعیت‌ها را ۰/۲۳ گزارش کرد. در پژوهشی Mondak (2013) با پژوهش روی جمعیت‌های مختلف از گونه‌های مختلف آویشن گزارش نمود که فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از ۰/۰۳۲ تا ۰/۴۰۶ متغیر بود. یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس در گیاهان دگرگشن، فاصله ژنتیکی می‌باشد. معمولاً هر چه والدین از لحاظ ژنتیکی فاصله بیشتری داشته باشند، تنوع و هتروزیس بیشتری در نتاج مشاهده خواهد شد. بطور کلی بر اساس نتایج پژوهش حاضر و پژوهش‌های سایر پژوهشگران، در گیاه آویشن اختلاف و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها چندان زیاد نبوده ولی تفاوت‌ها در درون جمعیت‌ها به دلیل دگرگشن بودن این گیاه و وقوع هیبریداسیون‌های درون و بین گونه‌ای بالاست. نتایج تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی داده‌های مولکولی جمعیت‌ها نشان داد که سه مولفه هماهنگ اصلی اول در مجموع ۹۶/۰۲ درصد از تغییرات داده‌های مولکولی را توجیه کردند. مولفه اول ۶۷/۰۲، مولفه دوم ۲۰/۲۷ و مولفه سوم ۸/۷۴ درصد از کل تغییرات مولکولی را تبیین نمودند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- فاصله ژنتیکی جمعیت‌های آویشن دنایی بر اساس شاخص نی.

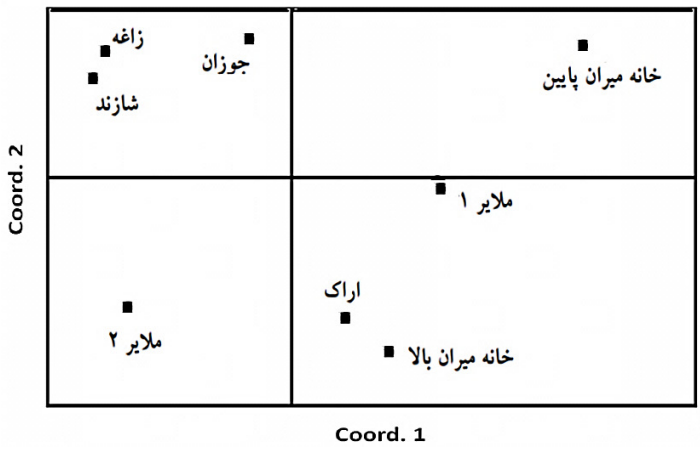
Table 6- Genetic distance of *Thymus daenensis* Celak. Populations based on Nei index.

جمعیت Population	ملایر ۱ Malayer 1	ملایر ۲ Malayer 2	جوزان Jowzan	اراک Arak	بالا Khane miran bala	پایین Khane miran paien	زاغه Zaghe	شازند Shazand
					خانه میران	خانه میران		
ملایر ۱ Malayer 1	0							
ملایر ۲ Malayer 2	0.010	0						
جوزان Jowzan	0.007	0.009	0					
اراک Arak	0.008	0.009	0.008	0				
خانه میران بالا Khane miran bala	0.007	0.011	0.009	0.008	0			
خانه میران پایین Khane miran paien	0.009	0.020	0.012	0.012	0.012	0		
زاغه Zaghe	0.009	0.008	0.008	0.010	0.010	0.015	0	
شازند Shazand	0.029	0.029	0.025	0.031	0.029	0.036	0.026	0

ترسیم جمعیت‌ها بر اساس دو مولفه هماهنگ اول به صورت یک نمودار دو بعدی (بای پلات) نشان داد که جمعیت‌های ملایر ۱، اراک و خانه میران بالا در یک گروه، جوزان، زاغه و شازند در یک گروه و جمعیت‌های خانه میران پایین و ملایر ۲ هر کدام در گروه مجزایی قرار گرفتند (شکل ۱). تجزیه خوشه ای جمعیت‌ها بر اساس داده‌های مولکولی نیز نتایجی نسبتا مشابه با پراکندگی جمعیت‌ها بر اساس تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی داد و پراکندگی جمعیت‌ها در خوشه‌های مختلف ارتباط نزدیکی با فاصله جغرافیایی آنها نداشت (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- گروه بندی جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه به مولفه های اصلی.

Figure 1- Populations grouping using of principal components analysis.

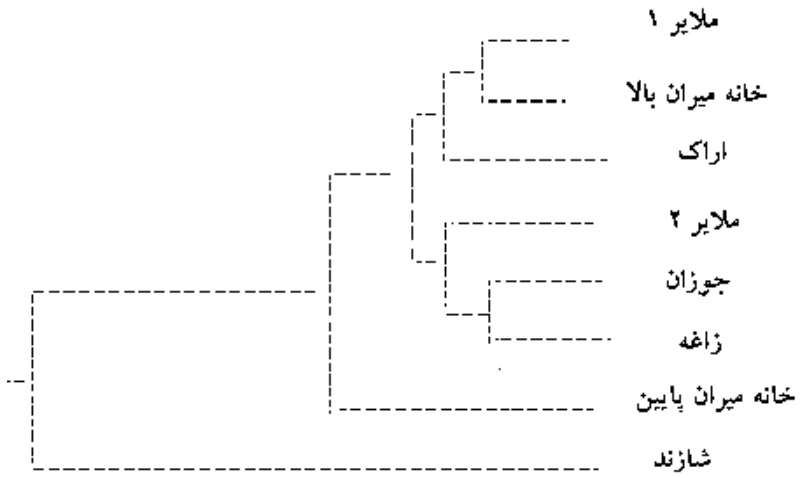
به طور کلی، گروه بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های مولکولی تطابق چندانی با گروه بندی ریخت‌شناسی جمعیت‌ها نداشت. دلایل متعددی می‌تواند در این زمینه مطرح باشد. از جمله اینکه ممکن است نواحی ژنومی مورد بررسی توسط نشانگرهای مولکولی متفاوت از نواحی ژنومی رمزکننده صفات ریخت‌شناسی مورد بررسی باشد. همچنین با توجه به اینکه دو مولفه هماهنگ اصلی اول بیش از ۸۷ درصد تغییرات مولکولی را تبیین کردند، حاکی از پوشش غیر یکنواخت نشانگرهای مورد پژوهش در سطح ژنوم می‌باشد (Mohammadi *et al*., 2002).

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم که از دانشگاه تهران به خاطر حمایت‌های مالی و نیز از آقایان دکتر فواد فاتحی، دکتر رحمت محمدی، دکتر یاور وفایی، دکتر هدیه بدخشان و دکتر عبدالله خدیوی به خاطر کمک‌های علمی در این پژوهش نهایت تشکر و سپاس را داشته باشیم.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از روش UPGMA.

Figure 2- Cluster analysis of molecular data using UPGMA method.

منابع

Aga E, Bekele E (2005). Inter simple sequence repeats (ISSR) variation in forest coffee tree (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. Genetica 124: 213-221.

Alibrahim MT, Sabaghnia N, Ebadi A, Mohebbodini M (2004). Study of drought and salinity stress on germination of common Thyme (*Thymus vulgaris*). Journal of Research in Agricultural Science 1: 13-19.

Barazandeh M, Bagherzadeh K (2007). Evaluation of essential oil chemical components of *Thymus daenensis* Celak. collected from four regions in Esfahan province. Journal of Medicinal Plants 6: 15-19.

Barzan Z, Dehdari M, Amiri Fahliani R (2015). Study of genetic diversity in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes using microsatellite markers. Journal of Agricultural Biotechnology 17:29-41.

Bigdeloo M (2010). Evaluation of morphological, genetic and phytochemical diversity of *Thymus carmanicus*. M.Sc. Thesis. University of Tehran, Iran.

Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Hamrick JL, Godt NJ (1989). Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S., (eds.) Plant Population Genetics; Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates. Sunderland.

Jamzad Z (2009). Thymes and Savorys in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Iran.

Mohammadi SA, Prasanna BM, Sudan C, Singh NN (2002). A microsatellite marker based study of chromosomal regions and gene effects on yield and yield components in maize. Cellular & Molecular Biology Letters 7: 599-606.

www.SID.ir

Archive of SID

Mondak B (2013). Study of hybridization, genetic and phytochemical diversity in native Thyme of Iran. M.Sc. Thesis. University of Tehran, Iran.

Naghavi R, Gharayazi B, Hosseini Gh (2004). Molecular markers. University of Tehran, Tehran. Iran.

Najafi F, Koocheki A, Rezvani Moghaddam P, Rastgoo M (2005). Evaluation of seed germination characteristics in *Nepeta binaludensis*, a highly endangered medicinal plant of Iran. Iranian Journal of Field Crops Research 4: 1-8.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of National Academy of Science USA 70: 3321–3323.

Nemeth E (2000). Needs, problems and achievements of introduction of wild growing medicinal plants in to the agriculture. First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries and VI Meeting "Days of Medicinal Plants". Arandjelovac. Yugoslavia.

Rahimmalek M, Bahreininejad B, Khorrami M, Sayed Tabatabaei BE (2009). Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Biochemical Genetics 47: 831–842.

Saghalli A, Farkhari M, Salavati A, Alamisaeid K, Abdali A (2016). Genetic diversity assessment of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 23: 51-64.

Su YJ, Wang T, Ouyang PY (2009). High genetic differentiation and variation as revealed by ISSR marker in *Pseudotaxus chienii* (Taxaceae), an old rare conifer endemic to China. Biochemical Systematics and Ecology 37: 579 - 588.

Trindade H, Costa MM, Sofia BLA, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG (2009). A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). Biochemical Systematics and Ecology 37: 670–677.

Vicente CD, Metz T, Alercia A (2004). Descriptors for genetic markers technologies. The International Plant Genetic Resources Institute.

Yavari AR (2009). Evaluation of morphological, molecular, ploidy level and phytochemical diversity of *Thymus migricus* Klokov & Des –Shost in Iran. M.Sc. Thesis. University of Tehran, Tehran. Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷)

Assessment of genetic diversity in different populations of *Thymus daenensis* Celak. using ISSR marker

Khorshidi J.[1], Shokrpour M.[2*], Nazeri V. [3]

[1] Former Ph.D. Student of University of Tehran and Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Kurdistan. Iran.
[2] Associate Professor, Department of Horticultural Sciences and Landscape, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Tehran. Iran.
[3]Professor, Department of Horticultural Sciences and Landscape, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Tehran. Iran.

Abstract

Evaluation of diversity among different populations of wild species is one of the first and most important steps in domestication and breeding process. *Thymus daenensis* Celak. is an endemic medicinal plants of Iran with high essential oil percentage and thymol content and therefore, in order to domestication of this plant species, evaluation of different populations is necessary. In this study were used 13 ISSR primers for evaluation of within and among diversity of eight populations of this plant species (Malayer 1, Malayer 2, Arak, Jowzan, Khane e Miran Bala, Khane e Miran Paien, Zaghe and Shazand) that total of 293 bands were generated by these primers. The calculated PIC for primers varied from 0.08 to 0.15. Genetic diversity within populations was higher than between populations. 98% of variance belonged to within populations and only 2% of variance belonged to among the populations. The genetic distance of the populations had no correspondence with geographical distance. The populations of Jowzan and Shazand had the highest and the lowest diversity based on PIC index, respectively. The highest genetic distance based on Nei's index was observed between Shazand and Khane e Miran Paien populations and the highest genetic similarity was observed between Malayer 1 to Jowzan and Khane e Miran Bala populations that could be importance in domestication and breeding of this plant species.

Keywords: *Thymus daenensis Celak., Endemic, Diversity, ISSR.*

* Corresponding Author: Shokrpour M. Tel: 09120650724 Email: shokrpour@ut.ac.ir

www.SID.ir