

## مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از نشان‌گر R-ISSR

### Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers

مهدی رحیم ملک<sup>1</sup>

#### چکیده

در این مطالعه روابط ژنتیکی شانزده نمونه جمعیتی متعلق به سه گونه *M. spicata*، *M. longifolia* و *M. piperata* با استفاده از نشان‌گر جدید و ترکیبی R-ISSR، مورد بررسی قرار گرفت. دوازده ترکیب آغازگری 155 نوار را تکثیر نمودند که 146 نوار آن چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی تعیین شده در مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی شده 94/19 بود. نمودار خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را در دو گروه کلی طبقه بندی نمود و تجزیه به مولفه‌های اصلی هماهنگ شده (PCoA) نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید نمود. ژنوتیپ‌های متعلق به گونه *M. piperata* در تجزیه خوشه‌ای از دو گونه دیگر جدا شدند و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان دهنده تنوع درون گونه‌ای بیشتر (73/01%) در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای (26/99%) بود. *M. piperata* یک هیبرید طبیعی از دو گونه *M. aquatica* و *M. spicata* می‌باشد و نتایج این پژوهش نشان داد که خصوصیات ژنتیکی کمتری از گونه *M. spicata* در گونه *M. piperata* به ارث رسیده است. شباهت بالای دو گونه *M. spicata* و *M. longifolia* را می‌توان به هیبریداسیون طبیعی در طی تکامل جنس نعناع مرتبط دانست.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، هیبریداسیون طبیعی، نعناع، پونه و نعناع فلفلی

نعناع، پونه و نعناع فلفلی متعلق به جنس *Mentha* L. و خانواده Lamiaceae می‌باشند که از گونه‌های مختلف و تعداد بسیار زیادی واریته تشکیل شده‌اند که هر کدام دارای خواص دارویی فراوانی هستند. نعناع به دلیل دارا بودن برگ‌های خوش عطر و طعم، جزء سبزی‌های خوردنی به‌شمار می‌آید. برگ خشک شده و خرد شده آن چاشنی برخی از غذاهای ایرانی است. این گیاه دارای خواص بهداشتی، دارویی و غذایی فراوانی است (Zargari 1992). از نظر دارویی اسانس نعناع مقوی معده و دارای خاصیت بادشکن، ضد تشنج، محرک، نیرو بخش، کاهش دهنده تراوش‌های معده، تسکین دهنده درد زخم معده و سوزش آن است (Arnold 1997; Zeinali Badi 2004). جنس نعناع به دلیل دارا بودن سطوح پلویدی متفاوت و هیبریداسیون بین گونه‌ها، دارای تنوع ژنتیکی بالایی است که این تنوع امکان انتخاب ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ خصوصیات مختلف از جمله اسانس را فراهم می‌نماید (El-zaher et al. 2005). از طرفی تعیین میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف در گونه‌های نعناع دیدگاه‌های جدیدی برای انتخاب، به‌نژادی و توسعه ذخایر ژنتیکی این گیاه ایجاد می‌کند.

در دو دهه اخیر با توجه به پیشرفت‌های زیاد در نشان‌گرهای مختلف مولکولی، استفاده از این روش‌ها برای دسته بندی و تعیین دقیق‌تر شناسه گونه‌ها، مطالعات ژنتیک جمعیت و بررسی گونه‌های در حال انقراض کاربرد فراوانی داشته است. از بین نشان‌گرهای مولکولی جدید، نشان‌گر R- ISSR در سال 2005 توسط یی و همکاران (Ye et al. 2005) ارایه شد. این نشان‌گر تصادفی بوده و از تکرار پذیری و چندشکلی بالایی برخوردار می‌باشد و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد. این نشان‌گر در واقع ترکیبی از دو نشان‌گر RAPD و نشان‌گر ISSR است. با توجه به ماهیت متفاوت دو نشان‌گر مذکور، تلفیق آن‌ها امکان تکثیر مناطق خاصی از ژنوم که توسط هر یک از نشان‌گرها به تنهایی امکان پذیر نبود را فراهم می‌نماید. چنین جنبه کاربردی در مطالعات تنوع ژنتیکی، تکاملی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی امکان پوشش بهتر ژنوم و اطلاعات جامع تر را فراهم می‌نماید (Ye et al. 2005). تنها عیب استفاده از این نشان‌گر بهینه سازی دمای اتصال مناسب در آغازگرهای RAPD و ISSR به‌طور هم‌زمان است. بنابراین در این روش باید آغازگرهای ISSR را انتخاب نمود که دارای تعداد نوکلئوتید کمتری

مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از ...

باشند (در حدود 10 نوکلئوتید) باشند تا با آغازگرهای RAPD در دمای اتصال مناسب تکثیر شوند.

در جنس *Mentha* مطالعات ژنتیکی انجام شده در کشور ایران اغلب در زمینه سیتوژنتیک، مورفولوژیک و عناصر غذایی آن‌ها بوده است (Vali 2010; Zeinal-badi 2004). تنها مطالعه مولکولی در ایران، بررسی روابط ژنتیکی نعناع-های ایرانی با استفاده از نشان‌گر مولکولی RAPD می‌باشد (Momeni et al. 2006). سایر مطالعات در نمونه‌های خارجی انجام شده است. وینینگ و همکاران (Vining et al. 2005) گونه *M. longifolia* یا پونه را با توجه به خصوصیات ژنتیکی و وحشی بودن، به‌عنوان یک مدل مناسب برای مطالعات ژنتیکی در جنس *Mentha* معرفی نمود. از سایر مطالعات در این زمینه می‌توان به استفاده از نشان‌گرهای RAPD و AFLP در بررسی روابط ژنتیکی گونه‌های نعناع در هند (Khanuja et al. 2000; Shasany et al. 2005)، بررسی هیبریدهای بین گونه‌ای با استفاده از نشان‌گر AFLP (Gobert et al. 2002)، بررسی روابط ژنتیکی هفده نمونه جمعیتی متعلق به آمریکا توسط نشان‌گر RAPD (Fenwick & Ward 2001)، ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مصری با استفاده از نشان‌گر آیزوزایم (El-zaher et al. 2005)، مطالعه روابط ژنتیکی 15 جمعیت از گونه *M. pulegium* در کشور تونس (Fadhel & Boussaid, 2004)، بررسی تنوع ژنتیکی 38 نمونه از هشت گونه *Mentha* با استفاده از نشان‌گر RAPD در کشور چین (Fang et al. 2010) و مطالعه تنوع ژنتیکی دو گونه در کشور پاکستان با استفاده از نشان‌گر RAPD (Shinwari et al. 2011) اشاره نمود.

تاکنون گزارشی در رابطه با استفاده از نشان‌گر جدید مولکولی R- ISSR در ایران در هیچ گیاهی گزارش نشده است و گزارش‌های موجود در سطح جهان نیز به ندرت وجود دارد. با توجه به پیچیدگی روابط ژنتیکی نعناع گزارش‌های جامع‌تر با نشان‌گر جدید R-ISSR این امکان را فراهم می‌نماید که روابط ژنتیکی، مطالعات تکاملی و مقایسه وضعیت ژنتیکی گونه‌های مهم به‌طور دقیق‌تر و جامع‌تر بررسی گردد. بنابراین اهداف این پژوهش، بررسی قرابت ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در نمونه‌های جمعیتی متعلق به سه گونه جمع‌آوری شده در ایران به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و خویشاوندی آن‌ها با استفاده از نشان‌گرهای R- ISSR راستای بهبود ذخایر ژنتیکی کشور می‌باشد. این اطلاعات می‌تواند دیدگاه‌های جدیدی به منظور کارآمد نمودن انتخاب،

پیشبرد اهداف اصلاحی فراهم نماید و در پایان، نتایج تجزیه و تحلیل‌های مولکولی با سایر گزارش‌های مورفولوژیک در جهت رد یا تایید آن‌ها مقایسه می‌شوند و کارایی نشان‌گر جدید R-ISSR برای اولین بار در کشور در یک گیاه مهم اقتصادی بررسی می‌گردد.

### مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان شانزده نمونه جمعیتی از سه گونه مختلف جنس نعناع [*M. spicata* (نعناع)، *M. longifolia* (پونه) و *M. piperata* (نعناع فلفلی)] که از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شده بودند برای استخراج DNA به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان انتقال یافتند (جدول 1). نمونه‌ها پس از توزین به مقدار 0/5 گرم در ازت مایع منجمد گردیدند و تا قبل از استخراج DNA در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی مطابق روش پریتیلا و همکاران (Pirtilla et al. 2001) که در واقع روش تغییریافته موری و تامسون (Murry & Thompson 1984) است، انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر کنترل شد. آنزیم *Taq DNA polymerase*، مخلوط نوکلئوتید

(dNTPs) و بافر PCR از شرکت Roche تهیه شد. مقدار 2 میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت 10 نانوگرم در میکرولیتر (20 نانوگرم DNA) به 13 میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل *Taq DNA polymerase* (1 U)، آغازگرهای RAPD و ISSR هر کدام (10 pmol)، کلرید منیزیم (2mM)، dNTPs (0/2mM)، فرمامید (2%)، بافر PCR (1X) و آب دوبار تقطیر استریل اضافه گردید و در نهایت حجم محلول واکنش PCR به 15 میکرولیتر رسید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف Mastercycler gradient با برنامه حرارتی یک سیکل 2 دقیقه‌ای در 94 درجه سانتی‌گراد، 40 سیکل با 45 ثانیه در 94 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه در 39-42 درجه سانتی‌گراد بر حسب نوع آغازگر، دو دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر نهایی با 3 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای ارزیابی افراد جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشان-گرهای R-ISSR در این پژوهش، آغازگرها روی ژنوتیپ‌های مختلف نعناع مورد بررسی قرار گرفت و از این میان، 12 آغازگر ترکیبی با چندشکلی بالا و الگوی نواری مشخص جهت تجزیه داده‌های حاصل از نشان‌گر R-ISSR انتخاب شدند (جدول 2).

جدول 1: شماره، گونه و مکان جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1: Number, species and location of genotypes included in the present study

محل جمع‌آوری	کد نمونه	گونه	شماره ژنوتیپ
Location	Accession code	Species	Genotype number
Kashann	Spk1	<i>M. spicata</i>	1
Kashann	SPk2	<i>M. spicata</i>	2
Kashann	SPk3	<i>M. spicata</i>	3
Isfahan	SPe1	<i>M. spicata</i>	4
Isfahan	SPe2	<i>M. spicata</i>	5
Mahalat	SPm1	<i>M. spicata</i>	6
Isfahan	Le1	<i>M. longifolia</i>	7
Tehran	Pft1	<i>M. piperata</i>	8
Kashann	Pfk1	<i>M. piperata</i>	9
Mahalat	SPm2	<i>M. spicata</i>	10
Kashann	SPk4	<i>M. spicata</i>	11
Kashann	Lk1	<i>M. longifolia</i>	12
Isfahan	SPe3	<i>M. spicata</i>	13
Kashann	SPk5	<i>M. spicata</i>	14
Kashann	SPk6	<i>M. spicata</i>	15
Isfahan	SPe4	<i>M. spicata</i>	16

جدول 2: دمای اتصال و توالی آغازگری ترکیب‌های آغازگری R-ISSR مورد استفاده در این مطالعه  
Table 2: Annealing temperature and primer sequence of primer combinations of R-ISSR used in the present study

توالی ترکیب‌های آغازگری Sequences of primer combinations	دمای اتصال Annealing temperature	ترکیب آغازگری Primer combination	شماره آغازگر Primer Number
5'-TGCTCTGCCC-3' & 5'-(GT)6-Y*R-3'	39	A1 & C2	1
5'-GGTGACGCAG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	39	A2 & C2	2
5'-TCCGCTCTGG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A3 & C2	3
5'-GAAGCCAGCC-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	41	A4 & C2	4
5'-CAGTGCCGGT-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A5 & C2	5
5'-ACCGGCTTGT-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A6 & C2	6
5'-CAGACTGGTC-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A7 & C2	7
5'-AGGCCAGAGG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A8 & C2	8
5'-GGAGCCTCAG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A9 & C2	9
5'-GACTAGGTGG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	40	A10 & C2	10
5'-GGGAATTCGG-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	42	B1 & C2	11
5'-TGCTGCAGGT-3' & 5'-(GT)6-YR-3'	41	B2 & C2	12

\*: type of degenerate nucleotide. Y= G/C

\*: نوع نوکلئوتیدهای هرز Y= G/C

واریانس مولکولی (AMOVA) روی سه گونه مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Arlequin ver.3.1 انجام شد.

#### نتایج و بحث

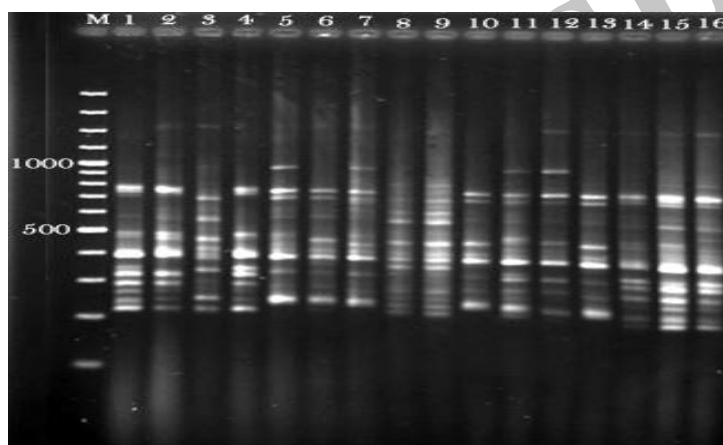
در این پژوهش 12 ترکیب آغازگری در مجموع 146 نوار چندشکل در 16 نمونه جمعیتی نعنای از سه گونه مذکور ایجاد نمودند (جدول 3). میانگین درصد چند شکلی تعیین شده با نشان‌گر R-ISSR در مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی 94/19 بود. نمای ظاهری الگوهای الکتروفورز R-ISSR تفاوت ژنتیکی گونه *M. piperata* را در مقایسه با دو گونه دیگر نشان داد (شکل 1). ترکیب آغازگری A6 & C2 علی‌رغم داشتن کم‌ترین تعداد نوار چندشکل دارای بیش‌ترین درصد چندشکلی (100) و آغازگر A9 & C2 کم‌ترین درصد چندشکلی (69/23) را داشتند. در بین آغازگرهای انتخاب شده آغازگر A2 & C2 بیش‌ترین نوار چندشکل (18 نوار) و آغازگر A6 & C2 کم‌ترین نوار چندشکل (5 نوار) را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان دادند. به‌دست آوردن الگوی نواری واضح برای نشان‌گر ترکیبی R-ISSR بسیار مشکل بود و دلیل آن اساس متفاوت دو آغازگر مورد استفاده و محل تکثیر آن در ژنوم می‌باشد. با توجه به این‌که یکی از آغازگرها ناحیه تکرار شونده در ژنوم و آغازگر دیگر نواحی تصادفی در ژنوم را تکثیر می‌نماید لذا انتظار توزیع مناسب‌تری از نشان‌گرها در ژنوم موجودات وجود داشت (Ye et al. 2005).

در همه ترکیب‌های آغازگری، آغازگر ISSR 10 نوکلئوتیدی (C2) به همراه آغازگرهای متنوع RAPD تکرار می‌شد. قبل از این مرحله لازم بود که بیش‌ترین و با وضوح-ترین الگوی نواری انتخاب شوند. نظر به این‌که تاکنون گزارشی در استفاده از نشان‌گر R-ISSR در جنس نعنای وجود ندارد لذا برای شروع لازم بود آغازگرهای ISSR را انتخاب نمود که دارای تعداد نوکلئوتید کمتری (در حدود 10 نوکلئوتید) باشند تا با آغازگرهای RAPD در دمای اتصال مناسب تکثیر شوند. سپس PCR به حالت گرادیانت در دماهای مختلف اتصال بررسی شد تا بهترین دما گزارش و برای بررسی نهایی استفاده شود (جدول 2). در مرحله بعدی نشان‌گرهای چندشکل با الگوی نواری مناسب روی کل نمونه‌ها بررسی شد. امتیاز بندی نوارها به‌صورت حضور (1) و عدم حضور (صفر) برای هر نوار صورت گرفت و سپس وجود چندشکلی در آغازگرهای مختلف مورد استفاده در تمامی ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انجام واکنش تکثیر با کمک آغازگرهای ISSR، حضور و عدم حضور هر نوار خاص با اعداد 1 و صفر برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشخص شد و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، اعداد ستونی به نوارهای DNA و اعداد سطری به ژنوتیپ‌های نعنای اختصاص یافت. ماتریس مذکور به‌منظور تعیین فاصله ژنتیکی، رسم نمودار خوشه‌ای و تجزیه مولفه‌های هم‌هنگ شده با استفاده از نرم افزارهای NTSYS 2.02 مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، تجزیه به مولفه‌های هم‌هنگ شده (PCoA) بر اساس ماتریس شباهت به دست آمده از ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 انجام گردید. تجزیه

جدول 3: تعداد نوارهای چندشکل، تک شکل و درصد چندشکلی ژنوتیپ‌های نعنای با استفاده از نشان‌گر R-ISSR

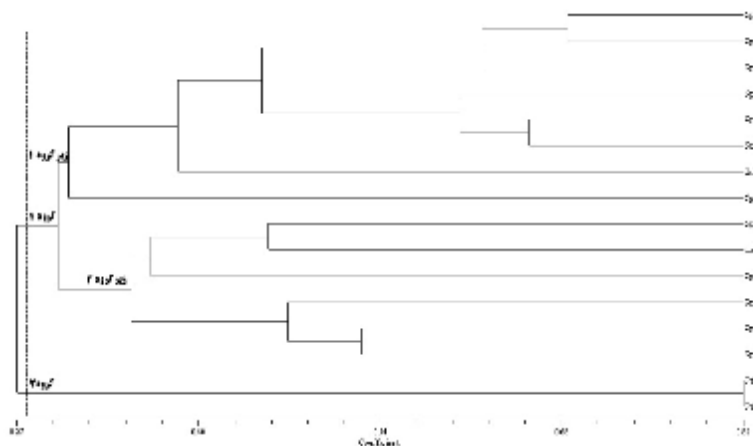
Table 3: Number of polymorphic bands, monomorphic and polymorphism percent of mint

genotypes with R-ISSR markers					
93.33	14	1	15	A1 & C2	1
94.73	18	1	19	A2 & C2	2
94.44	17	1	18	A3 & C2	3
88.88	16	2	18	A4 & C2	4
88.88	8	1	9	A5 & C2	5
100	5	0	5	A6 & C2	6
91.66	11	1	12	A7 & C2	7
91.66	11	1	12	A8 & C2	8
69.23	9	4	13	A9 & C2	9
90.90	10	1	11	A10 & C2	10
78.57	11	3	14	B1 & C2	11
84.21	12	3	19	B2 & C2	12
-	146	19	155	-	جمع
94.19	12.16	1.58	12.91		میانگین



شکل 1: الگوی نواری نشان‌گر ترکیبی A8 & C2 در نمونه‌های جمعیتی نعنای مورد استفاده در این مطالعه. ستون اول نشان‌گر 100 جفت بازی و ستون‌های 1-16 به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس جدول 1.

Fig 1: Banding pattern of A8 & C2 in different mint accessions included in this study. The first lane is 100bp ladder and other 16 lanes belong to 1-16 genotypes in Table 1, respectively



شکل 2: نمودار خوشه‌ای نمونه‌های جمعیتی نعنای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و بر اساس الگوریتم UPGMA

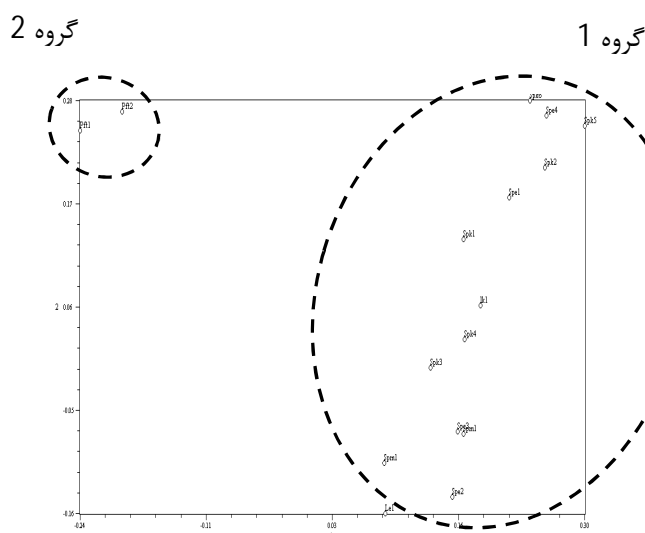
Fig 2: Dendrogram of mint genotypes using Jaccard similarity coefficient based on UPGMA algorithm

مورد مطالعه احتمال هیبریداسیون کمتری دارد؛ در حالی که دو گونه *M. longifolia* و *M. spicata* احتمال هیبریداسیون بیشتری با یکدیگر دارند. شباهت ژنتیکی کمتر گونه *M. piperata* با گونه *M. spicata* در مقایسه با گونه *M. gracilis* در کشور آمریکا در گزارش فنویک و وارد (2001) نیز وجود دارد. خانوجا و همکاران (2000) نیز در پژوهش خود طبقه‌بندی مشبک و مخلوط شدن گروه‌بندی گونه‌ها در جنس‌های مختلف نعناع را به هیبریداسیون در طول تکامل جنس نعناع مرتبط دانستند. الگوی مورفولوژیک و فیتوشیمیایی متفاوت گونه *M. piperata* در مقایسه با دو گونه دیگر به نوعی جدایی این گونه را در مقایسه با دو گونه دیگر را در طول تکامل تقویت می‌کند (Zeinal-badi, 2004; Vali, 2010) نمونه‌های متعلق به گونه *M. spicata* نیز در اغلب موارد بر اساس نواحی جغرافیایی طبقه بندی شدند (شکل 2).

مقایسه نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با نتایج مورفولوژیک ولی (1388) که از همین شانزده ژنوتیپ استفاده شده در این آزمایش و در سه گونه مذکور استفاده شده بود؛ همانند نتایج مولکولی گونه نعناع لفللی *M. piperata* را از دو گونه دیگر جدا نمود. ژنوتیپ‌های پونه *M. longifolia* در مطالعه مورفولوژیک در زیر گروه جدایی قرار گرفتند ولی به‌همراه ژنوتیپ‌های گونه *M. spicata* در یک گروه طبقه‌بندی شدند. به عبارت دیگر نتایج مورفولوژیک الگوی طبقه بندی مشبک کم‌تری را در مقایسه با نتایج مولکولی نشان داد ولی در مجموع داده‌های مولکولی را در اکثر موارد تایید نمود و شباهت بیشتر دو گونه *M. longifolia* و *M. spicata* را نشان داد. نظر به این که گونه *M. piperata* در واقع یک هیبرید طبیعی از دو گونه *M. spicata* و *M. aquatica* می‌باشد (Vali 2010)، بنابراین *M. spicata* یکی از والدین این گونه هیبرید محسوب می‌شود و همان‌طور که در الگوی الکتروفورز انتظار می‌رفت الگوی نواری متفاوتی با گونه *M. spicata* نشان داد (شکل 1) که بالطبع در نمودار خوشه‌ای (شکل 2) و PCoA (شکل 3) کاملاً از گونه *M. spicata* جدا شد. مومنی و همکاران (2006) شباهت بیشتر گونه *M. piperata* را به گونه *M. aquatica* در مقایسه با *M. spicata* با استفاده از نشان‌گر RAPD گزارش نمودند. بنابراین نتایج پژوهش حاضر تفاوت بیشتر دو گونه *M. piperata* و *M. spicata* را با استفاده از نشان‌گر R-ISSR تایید می‌نماید و این فرضیه احتمالی را استحکام می‌بخشد که خصوصیات ژنتیکی کمتری از گونه *M. spicata* در گونه *M. piperata* به ارث رسیده است.

آزمون منتل (Mantel 1967) برای انتخاب بهترین ضریب تشابه انجام شد. از بین ضرایب جاکارد، تطابق ساده و دایس بر اساس روش UPGMA، ضریب تشابه جاکارد دارای بالاترین ضریب همبستگی ( $r=0/92$ ) کوفنیتیکی بود و برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نعناع مورد مطالعه انتخاب گردید. با توجه به این که در این مطالعه از سه گونه استفاده شده بود ولی نمودار خوشه‌ای حاصل ژنوتیپ‌ها را در دو گروه طبقه بندی نمود (شکل 2). ژنوتیپ‌های متعلق به نعناع لفللی *M. piperata* (Pfk1 و Pft1) در تجزیه خوشه‌ای در گروه دوم به خوبی از دو گونه دیگر جدا شدند. گروه اول شامل دو زیر گروه می‌باشد که در زیر گروه اول ژنوتیپ‌های مربوط به گونه *M. spicata* و یک نمونه از گونه *M. longifolia* قرار گرفت که از گونه *M. spicata* در زیر گروه اول جدا شد (شکل 2). در زیر گروه دوم نیز ژنوتیپ‌های گونه *M. spicata* و یک نمونه از گونه *M. longifolia* قرار گرفته بودند ولی در این زیر گروه نمونه متعلق به گونه *M. longifolia* به خوبی جدا نشده بود. در مجموع در گونه *M. spicata* نمونه‌ها در اکثر موارد بر اساس نواحی جغرافیایی در کنار هم قرار گرفتند در حالی که در گونه *M. longifolia* وضعیت ناهماهنگی مشاهده می‌شد. نتایج نشان دهنده شباهت ژنتیکی زیادتر دو گونه *M. spicata* و *M. longifolia* در مقایسه با گونه *M. piperata* است.

تجزیه به مولفه‌های اصلی تعدیل شده (PCoA) برای تفسیر بهتر داده‌ها انجام شد (شکل 3). سه مولفه اصلی اول در مجموع 29/85% از تغییرات را توجیه نمودند. عدد پایین حاصل شده نشان دهنده توزیع بسیار مناسب نشان‌گرهای R-ISSR در طول ژنوم است که این نتیجه بر خلاف نتایج به-دست آمده برای نشان‌گرهای RAPD و ISSR به تنهایی در گیاهان مختلف است (Koochi et al. 2006; Sayed – Tabatabaie et al. 2007). نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی هماهنگ شده در اکثر موارد با هم توافق داشت (شکل 3). در این تجزیه و تحلیل نیز جدا شدن گونه نعناع لفللی *M. piperata* از دو گونه دیگر بدیهی بود. در این مطالعه الگوی طبقه بندی مشبک<sup>1</sup> در گونه‌های *M. longifolia* و *M. spicata* مشاهده شد. وجود چنین الگویی در برخی گزارش‌ها نیز به چشم می‌خورد (Shasany et al. 2005). وجود هیبریداسیون طبیعی در گیاه نعناع می‌تواند یک دلیل احتمالی برای این پدیده باشد (Arnold 1997; Gobert et al. 2002). در این پژوهش این‌طور نتیجه گیری می‌شود که گونه *M. piperata* با سایر گونه‌های



شکل 3: تجزیه به مولفه‌های اصلی هماهنگ شده (PCoA) بر اساس فراوانی داده‌های نشانگر R-ISSR در نمونه‌های نعنای مورد مطالعه  
Fig3: Principle Coordinate analysis based on R-ISSR data in studied mint genotypes

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از نشان‌گر جدید R-ISSR برای طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌ها و هیبریدهای نعنای نشان‌گر مناسبی می‌باشند. این نشان‌گر به دلیل چندشکلی بالا و توزیع بسیار مناسب در ژنوم می‌تواند در آینده‌ای نزدیک علاوه بر بررسی قرابت ژنتیکی گونه‌ها در مطالعات نقشه ژنتیکی کاربرد فراوانی داشته باشد. در مجموع نتایج این مطالعه علاوه بر بررسی روالبیط ژنتیکی سه گونه نعنای، کارایی مناسب یک نشان‌گر جدید را برای بررسی روابط ژنتیکی گیاهان تایید نمود.

#### سپاسگزاری

امکانات مالی و تجهیزات این پژوهش توسط دانشگاه صنعتی اصفهان فراهم گردیده است، که بدین‌وسیله مراتب قدردانی اعلام می‌گردد.

گونه *M. longifolia* یک گونه وحشی است که امکان هیبریداسیون طبیعی در آن با سایر گونه‌ها وجود دارد. برخی گزارش‌ها *M. spicata* را یک گونه آمفی پلوئید از *M. suaveolens* × *M. longifolia* دانسته‌اند (Zeinal-badi, 2004; Vali, 2010) که می‌توان این پدیده را به‌عنوان دلیل شباهت بالای دو گونه *M. longifolia* و *M. spicata* دانست. وینینگ و همکاران (2005) و در نتیجه میزان هیبریداسیون طبیعی در آن با گونه *M. spicata* به دلیل خصوصیات مشابه‌تر گیاهشناسی و ژنتیکی بیشتر از گونه هیبرید *M. piperata* است. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) روی سه گونه مورد مطالعه نشان داد که با وجود اختلاف معنی‌دار بین گونه‌ها، تنوع درون گونه‌ها (73/01 درصد) بیش از تنوع بین گونه‌ها (26/99 درصد) است (جدول 4). این نتیجه می‌تواند از شباهت کمتر گونه هیبرید *M. piperata* به گونه والدی *M. spicata* حاصل شده باشد. تنوع درون بیشتر نیز می‌تواند به دلیل تنوع بالای ژنی در نمونه‌های جمعیتی گونه *M. spicata* نتیجه شده باشد.

جدول 4: تجزیه واریانس مولکولی بین و درون گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از نشان‌گر R-ISSR

Table 4: Analysis of molecular variance (AMOVA) among and within species using R-ISSR marker

سطح احتمال P-value	درصد تغییرات Percentage of variation	اجزاء واریانس Variance components	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییرات Source of variation
< 0.001	26.99	4.26	50.77	2	بین گونه‌ها (Among species)
< 0.001	73.01	11.53	149.91	13	درون گونه‌ها (Within species)
-	-	15.79	200.68	15	کل (Total)

#### منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 3-4 متن انگلیسی مراجعه شود.