

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مریم نخودی (*Teucrium polium*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

سعید اسفندیاری^۱، محسن فرشادفر^{۲*}، هوشمند صفری^۳، هومن شیروانی^۴ و صادق اسفندیاری^۵

۱- کارشناس ارشد اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

۲- دانشیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، پست الکترونیک: (farshadfarmohsen@yahoo.com)

۳- عضو هیات علمی بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

۴- مدرس گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور

۵- کارشناس ارشد بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

چکیده

مریم نخودی گیاهی است از خانواده نعنائیان و کاربرد وسیعی در صنعت داروسازی دارد. تنوع ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ مریم نخودی جمع‌آوری شده از سراسر استان کرمانشاه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۵ آغازگر ISSR استفاده شد که از میان آنها ۱۲ عدد دارای نوارهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۸۲ نوار تولید کنند، که ۸۰ باند چند شکل مشاهده شد. میانگین تعداد نوار تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۷ اکوتیپ برابر ۶/۸۳ بود. آغازگر IS₆ بیشترین تعداد نوار (۱۲ نوار) و آغازگر IS₃ کمترین تعداد نوار (۴ نوار) را نشان دادند. نشانگر ISSR در بین اکوتیپ‌ها چندشکلی مطلوبی نشان داد و تمام آغازگرها برای بررسی‌های گونه مریم نخودی مناسب بودند. نتایج نشان داد که اکوتیپ G₁ (صحنه) بیشترین فاصله ژنتیکی را با اکوتیپ‌های G₁₂ (صحنه)، G₇ (گیلان غرب)، G₁₃ (ثلاث) و G₈ (دالاهو) داشت. گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفته و تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. همچنین نتایج حاصل از گروه‌بندی با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و تجزیه به مختصات اصلی (PCo) تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: مریم نخودی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه به مختصات اصلی

مقدمه

در عین حال مواد اولیه در آنها در صنعت داروسازی استفاده می‌شود. توجه به گیاهان دارویی که بخش عمده‌ای از طب سنتی ایران را تشکیل می‌دهد و ارائه اطلاعات

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به‌ویژه گیاهان دارویی، در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شد و

نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به آن تکثیرپذیری و تنوع‌پذیری بالایی داشته، سریع بوده و روشی آسان است. نشانگر ISSR الگوی نشانگری پیچیده‌تری نسبت به RAPD تولید می‌کند، که برای تعیین خصوصیات نژادهای بانک ژن و تشخیص ارقام نسبتاً خویشاوند استفاده می‌شود (Archak et al., 2003). این تکنیک به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (Terzopoulos & Bebeli, 2008). در مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های کلیوره (*Teucrium polium*) ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع مطلوبی در بین جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده شد، همچنین کارایی نشانگر RAPD در تفکیک جمعیت‌ها از یکدیگر زیاد گزارش شد، به‌صورتی که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تا حدودی تطبیق داشت (Pesaraklu et al., 2013). هدف از این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مریم نخودی با استفاده از نشانگر ISSR و تطابق تنوع ژنتیکی به‌دست آمده با پراکنش جغرافیایی اکوتیپ‌ها در راستای بهبود ذخایر ژنتیکی کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در تحقیق انجام شده ۱۷ اکوتیپ از گیاه دارویی مریم نخودی (*Teucrium polium*) جمع‌آوری شده از استان کرمانشاه توسط محققان بخش تحقیقات منابع طبیعی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه به‌منظور استخراج DNA در گلدان کشت شد (جدول ۱). استخراج DNA به‌روش Torres و همکاران (1993) برای هر اکوتیپ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد. بعد از انتقال ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده با ازت مایع به لوله، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۴ گرم CTAB، ۱۶/۳۶ گرم NaCl، ۳/۱۵ گرم Tris-HCl، ۱/۴۸ گرم EDTA، ۴۰۰ میکرولیتر β -mercaptoethanol با pH=۸) به لوله‌ها

درست و علمی درباره پرورش و نگهداری و استفاده از آنها بر پایه یافته‌های جدید روز به روز اهمیت ویژه‌ای می‌یابد. از جنس مریم نخودی تاکنون بیش از ۳۴۰ گونه شناسایی شده است. در ایران ۱۲ گونه و در استان کرمانشاه چهار گونه (*T. polium*, *T. oriental*, *T. oliverianum*, *T. parvifolium*) از این جنس رویش دارد. بیش از ۲۰۰۰ سال است گونه‌های مختلف *Teucrium* گیاه دارویی شناخته شده که از آن به‌عنوان ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب‌بر و التیام‌دهندگی زخم استفاده می‌شود (Pacifico et al., 2012). بررسی و تحلیل تنوع ژنتیکی در ذخائر توارثی موجود از مهمترین مراحل پروژه‌های به‌نژادی است که امکان گروه‌بندی و توصیف دقیق نمونه‌ها را فراهم آورده و به‌نژاد-گرها را در تشخیص زیر مجموعه‌ها و نمونه‌هایی که امکان استفاده مؤثر آنها در برنامه‌های اصلاحی آینده وجود دارد، یاری می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند. نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA کمتر تحت تأثیر شرایط محیط قرار می‌گیرند (Chawla, 2000). نشانگرهای مبتنی بر DNA توانسته است بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی را برطرف کنند (Shokrpour et al., 2008). توالی‌های بین ریزماهوره (ISSR, Inter Simple Sequence Repeat) نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی هستند که نسبت به نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) کارآمدتر می‌باشند (Sicard et al., 2005). تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های ریزماهوره (SSR, Simple Sequence Repeat) هدف انجام می‌شود. از این نشانگر به‌منظور تکثیر قطعه‌ای از DNA بین دو ریزماهوره که در ژنوتیپ یک گونه در حالت عکس یکدیگر قرار گرفته‌اند، استفاده می‌شود (Surve et al., 1995).

آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز دو درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزیق نمونه در ژل، ابتدا میزان پنج میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و بعد میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت انجام گردید و بعد ژل را برای رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document برای نمایان شدن نوارها استفاده شد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)^۱ از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum^n PI^2$ محاسبه شد (Hou et al., 2005).

همچنین شاخص نشانگری (MI)^۲ از رابطه $MI = PIC \times E$ به دست آمد (Powell et al., 1996). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR)^۴ از رابطه $EMR = NPB \times$ (Kumar et al., 2009) و قدرت تفکیک (RP)^۵ از رابطه $RP = IB$ محاسبه شد (Altintas et al., 2008). در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Ntsys، DARwin 6 و GenAIEx 6.2 ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی انجام شد.

اضافه شد و به مدت یک ساعت نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای ۶۵ °C قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه گردید و به مدت دو دقیقه بهم زده شد تا محلول داخل لوله یکنواخت شود. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک لوله تمیز منتقل شد و به هر لوله مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک ساعت در فریزر در دمای ۲۰ °C- قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به هر لوله مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰٪ سرد اضافه و یک سانتریفیوژ کوتاه مدت و به آرامی فاز مایع خالی شد (این مرحله باید دو بار تکرار شود). در پایان نیز لوله‌ها را در دمای اتاق قرار داده تا خشک شوند و بعد به هر لوله میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه شد.

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (جدول ۲) شامل چرخه حرارتی با یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال

1- Polymorphic information content

2- Marker Index

3- Effective multiplex ratio

4 - Resolving power

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

ردیف	منطقه جمع‌آوری	عرض جغرافیایی			طول جغرافیایی			ارتفاع از سطح دریا
G۱	صحنه-مله نمازگاه	۶۴	۲۹	۳۴	۵۱	۴۱	۴۷	۱۷۵۰
G۲	سرپل-گنجوره	۶۰	۱۵	۳۴	۰۰	۳۱	۴۶	۶۰۰
G۳	سومار-سد گنگیر	۱۸	۵۷	۳۳	۳۲	۵۴	۴۵	۵۵۰
G۴	روانسر-ویس	۱۲	۳۱	۳۴	۲۲	۵۱	۴۶	۱۷۵۰
G۵	سرپل-ارتفاعات دالاهو(تازه آباد)	۶۳	۳۶	۳۴	۱۱	۰۲	۴۶	۱۸۰۰
G۶	سرپل-ماراب	۰۸	۲۵	۳۴	۲۷	۰۰	۴۶	۸۷۰
G۷	گیلان غرب-سه راهی ایلام	۵۸	۵۷	۳۳	۲۱	۱۸	۴۶	۱۴۵۰
G۸	دالاهو-هووه رو	۴۹	۱۱	۳۴	۲۶	۱۰	۴۶	۱۷۰۰
G۹	دالاهو-مله گهواره(سه راه)	۴۹	۱۱	۳۴	۲۶	۱۰	۴۶	۱۷۰۰
G۱۰	نفت شهر-گندم بان	۴۹	۲۱	۳۴	۳۱	۳۶	۴۵	۳۶۵
G۱۱	دالاهو-ناوتنگ	۶۷	۱۷	۳۴	۷۰	۱۲	۴۶	۱۵۷۰
G۱۲	صحنه-کلکان نثار	۲۹	۴۷	۳۴	۵۰	۰۸	۴۷	۱۷۲۰
G۱۳	ثلاث-ازگله	۳۶	۴۵	۳۴	۹۵	۰۴	۴۶	۱۲۰۰
G۱۴	گیلان غرب-دشت دیره	۰۱	۲۳	۳۴	۰۸	۵۰	۴۵	۶۵۰
G۱۵	اسلام آباد-هفت آشیان	۳۱	۲۱	۳۴	۳۹	۳۳	۴۶	۱۷۰۰
G۱۶	روانسر-خرابیان	۳۳	۴۷	۳۴	۱۵	۴۳	۴۶	۱۵۵۰
G۱۷	ثلاث-مله سیاه ظاهر	۲۹	۴۵	۳۴	۰۰	۱۲	۴۶	۱۳۶۱

جدول ۲- اجزا واکنش ISSR بهینه سازی شده

اجزا یک نمونه	برای تهیه ۲۰ میکرولیتر
آب دوبار تقطیر	۱۲/۳
بافر PCR (x۱۰)	۲
MgCl ₂ (۵۰ میلی مولار)	۱/۵
مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی مولار)	۰/۴
آغازگر (۱۰ میکرومولار)	۱/۵
Taq پلیمرز (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳
DNA	۲
جمع	۲۰

نتایج

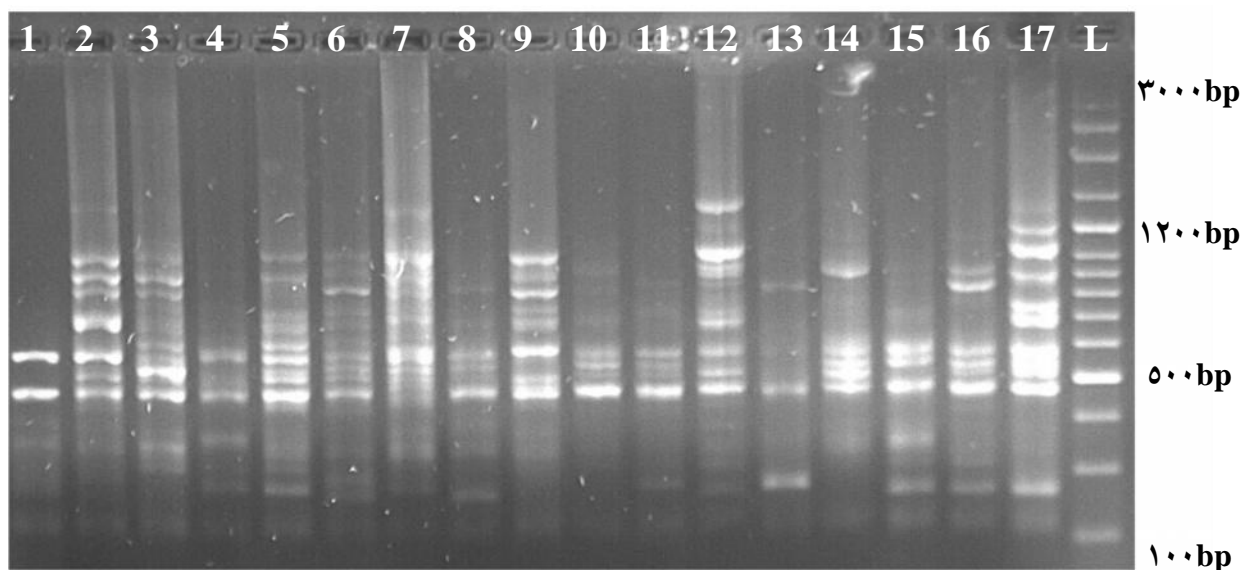
چند شکل بودند. میانگین تعداد نوار تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۷ اکوتیپ برابر ۶/۸۳ بود. آغازگر IS₆ بیشترین تعداد نوار (تعداد ۱۲ نوار) و آغازگر IS₃ کمترین تعداد نوار (تعداد ۴ نوار) را نشان دادند. اکوتیپ G₂

پیرو بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، در مجموع ۸۲ نوار تولید شد که از این تعداد دو نوار یک شکل مشاهده شد و ۸۰ نوار

بهبتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانستند فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها را مشخص کنند. آغازگر IS₁₀، IS₁₁ و IS₅ با کمترین میزان PIC (به ترتیب ۰/۳۳۰، ۰/۳۱۸ و ۰/۳۳۸) توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپ‌ها نداشتند. در مورد شاخص نشانگر (MI) آغازگرهای IS₆ و IS₅ به ترتیب بیشترین میزان و آغازگرهای IS₁₄ و IS₃ دارای کمترین میزان شاخص نشانگر بودند. برای شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) آغازگرهای IS₆ و IS₅ بیشترین و آغازگر IS₃ کمترین میزان را به خود اختصاص دادند. در شاخص تفکیک (RP) نیز آغازگرهای IS₅ و IS₆ بیشترین میزان و آغازگرهای IS₉ و IS₁₄ کمترین میزان شاخص را داشتند. آغازگرهای IS₉، IS₁₀، IS₁₁ و IS₁₄ با کمترین میزان، توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپ‌ها نداشتند. البته دیگر آغازگرها در حد متوسط بودند.

بیشترین نوار (۵۹ نوار) و اکوتیپ G₁ کمترین نوار (۱۴ نوار) را در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. شکل ۱ الگوی نواری ۱۷ اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS₁₃ را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول سه ارائه شده است. میانگین درصد چند شکلی در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۸/۱۲ بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگرهای IS₁₁ (۸۷/۵٪) و IS₅ (۹۱/۹۱٪) داشتند و دیگر آغازگرها با داشتن ۱۰۰٪ چند شکلی دارای بیشترین درصد چند شکلی بودند.

میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۷۲ بود که بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای IS₃، IS₇ و IS₁₂ به ترتیب به میزان ۰/۴۵۳، ۰/۴۲۰ و ۰/۴۰۵ اختصاص داشت، بنابراین این آغازگرها



شکل ۱- الگوی بانوی ۱۷ اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS₁₃

جدول ۳- آغازگرهای ISSR مورد استفاده و شاخص‌های محاسبه شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	محتوای اطلاعات چند شکلی	شاخص نشانگری	نسبت چندگانه مؤثر	قدرت تفکیک
آغازگر	Primer Sequence	NSB	NPB	PPB%	PIC	MI	EMR	RP
IS ₃	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	۴	۴	۱۰۰	۰/۴۵۳	۱/۸۱۳	۴	۴/۸۲۳
IS ₅	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGC-3'	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱	۰/۳۳۸	۳/۳۸۴	۹/۰۹۱	۸/۷۰۵
IS ₆	5'-ACACACACACACACACC-3'	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۷۹	۴/۵۵۱	۱۲	۹/۲۹۴
IS ₇	5' GTGTGTGTGTGTGTGTC 3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۲۱	۲/۱۰۳	۵	۳/۵۲۹
IS ₉	5'- CT CT CT CT CT CT CT CTG-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۴۶	۲/۰۷۶	۶	۲/۹۴۱
IS ₁₀	5'- GA GA GA GA GA GA GA GA Rc-3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۱۸	۲/۲۲۸	۷	۵/۶۴۷
IS ₁₁	5'-ACACACACACACACACC-3'	۸	۷	۸۷/۵	۰/۳۳۰	۲/۳۱۳	۶/۱۲۵	۷/۴۱۱
IS ₁₂	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGG-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۴۰۶	۲/۴۳۵	۶	۳/۵۲۹
IS ₁₃	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGYT-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۸۸	۱/۹۳۷	۵	۵/۵۲۹
IS ₁₄	5'- GACA GACA GACA GACA-3'	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۶۸	۱/۸۴۰	۵	۲/۵۸۸
IS ₁₅	5'- GGATGGATGGATGGAT-3'	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۴۱	۲/۰۴۸	۶	۴
IS ₁₆	5'-DBDACACACACACACA-3'	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۹۰	۲/۷۲۶	۷	۳/۸۸۲
	میانگین	۶/۸۳	۶/۶۷	۹۸/۲۰	۰/۳۷۲	۲/۴۵۵	۶/۵۱۸	۵/۱۵۷

Y=(C,T), V=(A,C,G), D=(A,G,T), B=(C,G,T)

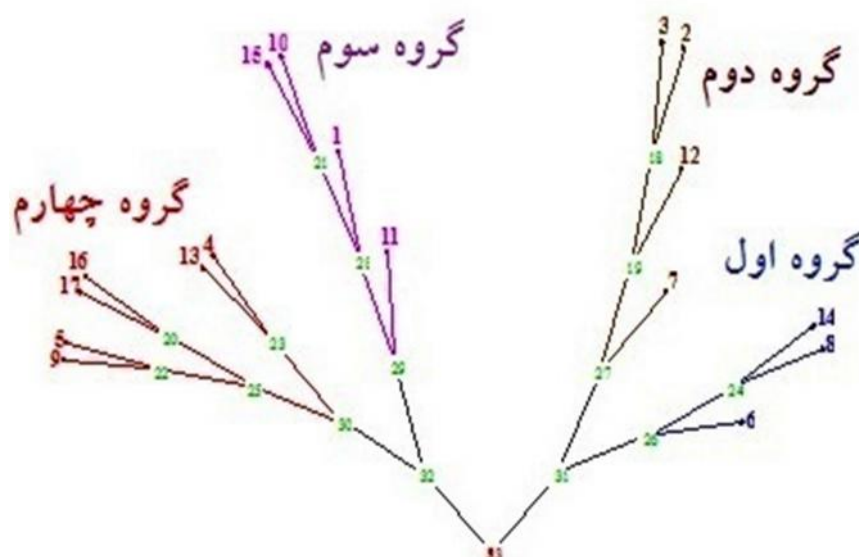
ماتریس تشابه

شکل دو ارائه شده است که در آن اکوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل اکوتیپ‌های G۸ (دالاهو-هووه رو)، G۱۴ (گیلان غرب-دشت دیره) و G۶ (سرپل-ماراب) بود. متوسط ضریب تشابه برای اکوتیپ‌های این گروه ۰/۶۲۶ بود. اکوتیپ‌های G۷ (گیلان غرب-سه راهی ایلام)، G۱۲ (صحنه-کلکان نसार)، G۲ (سرپل-گنجوره) و G۳ (سومار-سد گنگیر) گروه دوم بود، که متوسط ضریب تشابه برای این سه اکوتیپ ۰/۶۸۹ به دست آمد. گروه سوم شامل چهار اکوتیپ G۱۰ (نفت شهر-گندم بان)، G۱۵ (اسلام آباد-هفت آشیان)، G۱ (صحنه-مله نمازگاه) و G۱۱ (دالاهو-ناوتنگ) بود. متوسط ضریب تشابه این گروه ۰/۵۵۵ بود. گروه چهارم شامل اکوتیپ‌های G۴ (روانسر-ویس)، G۱۳ (ثلاث-ازگله)، G۱۶ (روانسر-خراجیان)، G۱۷ (ثلاث-مله سیاه طاهر)، G۵ (سرپل-ارتفاعات دالاهو) تازه آباد) و G۹ (دالاهو-مله گهواره (سه راه)) بود و میانگین تشابه برای این گروه ۰/۵۹۸ بود. بنابراین اکوتیپ‌های گروه دوم دارای بیشترین تشابه و اکوتیپ‌های گروه سوم دارای کمترین تشابه بودند.

تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۱۸۷ تا ۰/۷۷۷ متغیر بود (جدول ۴)، میانگین تشابه بین اکوتیپ‌ها برابر ۰/۵۰۵ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های مریم نخودی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را اکوتیپ G۳ (سومار-سد گنگیر) با اکوتیپ G۲ (سرپل-گنجوره) با ضریب ۰/۷۷۷ و اکوتیپ G۲ (سرپل-گنجوره) با G۱۲ (صحنه-کلکان نसार) با ضریب ۰/۷۷۰ داشتند. کمترین تشابه و بیشترین فاصله مربوط به اکوتیپ G۱ (صحنه-مله نمازگاه) با اکوتیپ‌های G۱۲ (صحنه-کلکان نसार)، G۷ (گیلان غرب-سه راهی ایلام)، G۱۳ (ثلاث-ازگله) و G۸ (دالاهو-هووه رو) به ترتیب با ضرایب تشابه ۰/۱۸۷، ۰/۲۴۵، ۰/۲۷۷ و ۰/۲۸۵ بود.

تجزیه خوشه‌ای

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس برای اکوتیپ‌ها در



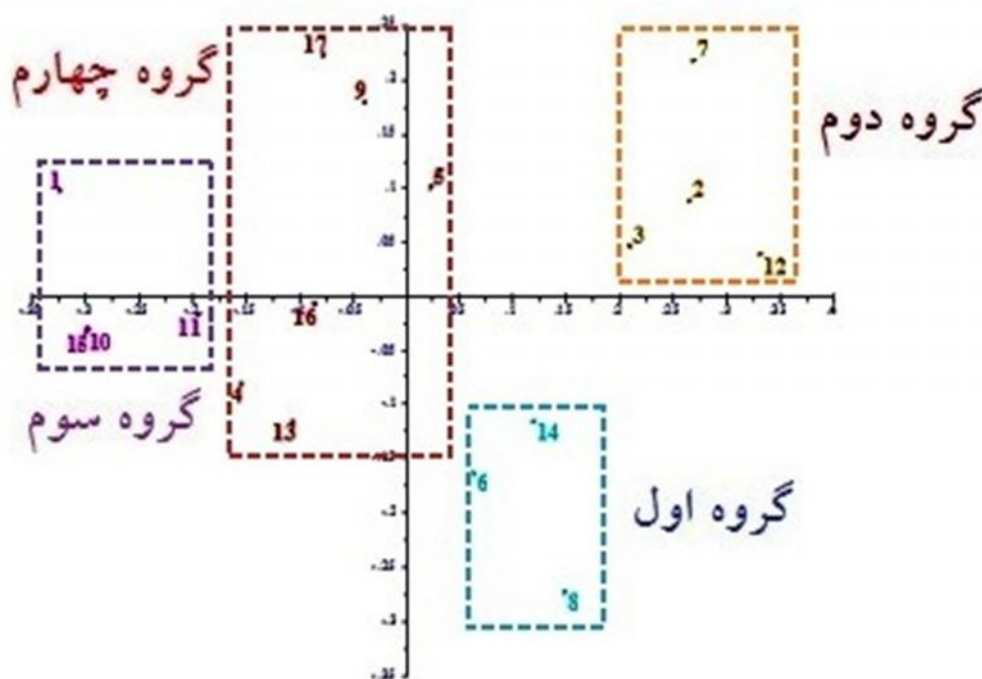
شکل ۲- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های نشانگر ISSR برای اکوتیپ‌های

مورد مطالعه با استفاده از ضریب دایس و روش UPGMA

G(اسلام آباد-هفت آشیان)، G۱ (صحنه-مله نمازگاه) و G۱۱ (دالاهو-ناوتنگ) هم در یک گروه قرار داشتند. همچنین اکوتیپ‌های G۸ (دالاهو-هووه رو)، G۱۴ (گیلان غرب-دشت دیره) و G۶ (سرپل-ماراب) با تشابه بالا در یک گروه قرار داشتند و اکوتیپ‌های G۴ (روانسر-ویس)، G۱۳ (ثلاث-ازگله)، G۱۶ (روانسر-خراجیان)، G۱۷ (ثلاث-مله سیاه طاهر)، G۵ (سرپل-ارتفاعات دالاهو تازه آباد) و G۹ (دالاهو-مله گهواره (سه راه)) در گروه چهارم قرار گرفتند.

تجزیه به مختصات اصلی (PCo)

بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی، تجزیه به مختصات اصلی برای اکوتیپ‌ها انجام شد، که بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی اکوتیپ‌ها رسم گردید (شکل ۳). این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای کاملاً مطابقت داشت و اکوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. با توجه به نمودار، اکوتیپ‌های G۷ (گیلان غرب-سه راهی ایلام)، G۱۲ (صحنه-کلکان نثار)، G۲ (سرپل-گنجوره) و G۳ (سومار-سد گنگیر) با بیشترین تشابه در یک گروه قرار داشتند و اکوتیپ‌های G۱۰ (نفت شهر-گندم بان)، ۱۵



شکل ۳- بای پلات اکوتیپ‌ها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

جدول ۴- ماتریس تشابه اکوتیپ‌ها برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب دایس

اکوتیپ	صحنه	سرپل	سومار	روانسر	سرپل	سرپل	گیلان غرب	دالاهو	دالاهو	نفت شهر	دالاهو	صحنه	ثلاث	گیلان غرب	اسلام آباد	روانسر	
سرپل	۰/۳۲۸																
سومار	۰/۳۸۰	۰/۷۷۷															
روانسر	۰/۴۸۴	۰/۳۸۴	۰/۴۷۰														
سرپل	۰/۳۸۷	۰/۶۳۵	۰/۷۴۲	۰/۵۳۷													
سرپل	۰/۳۷۲	۰/۴۷۷	۰/۵۸۹	۰/۶۲۵	۰/۶۲۳												
گیلان غرب	۰/۲۴۵	۰/۶۲۷	۰/۶۰۸	۰/۴۱۹	۰/۶۳۷	۰/۴۷۲											
دالاهو	۰/۲۸۵	۰/۵۲۸	۰/۵۴۵	۰/۴۲۵	۰/۵۰۰	۰/۶۳۱	۰/۳۰۹										
دالاهو	۰/۴۵۸	۰/۵۳۷	۰/۵۷۸	۰/۵۶۶	۰/۷۰۷	۰/۵۳۹	۰/۵۴۵۴	۰/۳۸۷									
نفت شهر	۰/۵۱۶	۰/۳۶۸	۰/۴۲۴	۰/۵۵۵	۰/۴۹۲	۰/۴۳۴	۰/۳۰۰	۰/۳۵۵	۰/۵۰۹								
دالاهو	۰/۴۱۸	۰/۴۷۷	۰/۴۶۱	۰/۵۰۰	۰/۴۶۷	۰/۴۸۲	۰/۴۱۶	۰/۳۸۵	۰/۴۴۴	۰/۵۲۱							
صحنه	۰/۱۸۷	۰/۷۷۰	۰/۷۲۷	۰/۳۷۶	۰/۶۱۲	۰/۵۳۱	۰/۶۲۳	۰/۶۴۱	۰/۴۲۸	۰/۲۶۸	۰/۴۵۵						
ثلاث	۰/۲۷۷	۰/۳۹۵	۰/۳۹۴	۰/۶۸۲	۰/۴۸۵	۰/۵۴۹	۰/۴۳۰	۰/۴۴۰	۰/۵۰۰	۰/۴۶۱	۰/۴۷۰	۰/۳۶۱					
گیلان غرب	۰/۳۵۷	۰/۶۹۳	۰/۷۰۳	۰/۵۲۴	۰/۶۶۶	۰/۵۹۱	۰/۴۲۳	۰/۶۵۷	۰/۵۷۸	۰/۵۰۸	۰/۵۰۷	۰/۶۵۲	۰/۴۳۷				
اسلام آباد	۰/۶۱۱	۰/۳۹۵	۰/۴۵۰	۰/۶۳۴	۰/۵۴۲	۰/۴۷۰	۰/۳۰۷	۰/۴۰۰	۰/۵۳۵	۰/۷۱۷	۰/۵۴۹	۰/۳۰۵	۰/۵۹۰	۰/۵۰۰			
روانسر	۰/۴۴۴	۰/۴۴۴	۰/۵۰۷	۰/۶۳۴	۰/۶۲۸	۰/۵۰۹	۰/۳۳۸	۰/۴۴۰	۰/۶۰۷	۰/۷۱۷	۰/۵۸۸	۰/۳۸۸	۰/۵۴۵	۰/۵۹۳	۰/۶۸۱		
ثلاث	۰/۴۶۸	۰/۵۴۳	۰/۵۱۲	۰/۴۶۱	۰/۶۶۶	۰/۴۸۳	۰/۴۷۳	۰/۳۲۷	۰/۷۱۶	۰/۴۸۰	۰/۵۱۶	۰/۴۵۷	۰/۵۰۹	۰/۵۰۶	۰/۵۸۱	۰/۷۲۷	

به عبارت دیگر گروه‌بندی به صورت صحیح انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروه‌ها برابر ۷۱٪ و در بین گروه‌ها تنوع برابر ۲۹٪ مشاهده شد.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۵)، به طوری که اکوتیپ‌ها در داخل ۴ گروه قرار گرفتند. بر اساس آماره PhiPT در بین گروه‌ها در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت،

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR

PhiPT	درصد از واریانس	واریانس برآورد شده	میانگین مربعات	مجموع مربعات	DF	منابع تغییر
۰/۲۹۲**	۲۹٪	۵/۰۰۲	۳۲/۹۰	۹۸/۷۰	۳	بین گروه
	۷۱٪	۱۲/۱۰۹	۱۲/۱۰	۱۵۷/۴۲	۱۳	درون گروه
	۱۰۰٪	۱۷/۱۱۱		۲۶۶/۱۲	۱۶	کل

** اختلاف در سطح ۱٪ معنی‌دار

بحث

ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Thimmappaiah et al., 2008). بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آل تأثیرپذیری دارد (Aluntas et al., 2008).

در حالت کلی و بر اساس شاخص‌های محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص قدرت تفکیک (RP) مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی‌های گونه مریم نخودی، آغازگرهای IS₃، IS₅، IS₆، IS₇ و IS₁₂ تعیین شد، و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر اکوتیپ‌های مریم نخودی در تحقیقات بعدی استفاده شوند. در بررسی روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعنای با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس شاخص‌های قدرت تفکیک (RP) و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) آغازگرهای برتر برای آنالیز ژرم پلاسم نعنای معرفی شد (Zinodini et al., 2013).

میانگین تشابه بین اکوتیپ‌ها برابر ۰/۵۰۵ بود. البته پایین بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های مریم نخودی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند، که پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. نتایج حاصل از تجزیه

در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تکنیک ISSR می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی اکوتیپ‌های مریم نخودی را نسبت به همدیگر مشخص کرد. با استفاده از آغازگرهای ISSR تنوع قابل ملاحظه و چند شکلی مطلوبی در بین اکوتیپ‌های مریم نخودی مشاهده شد. در مطالعات بسیاری گزارش شده که نشانگر ISSR به دلیل خصوصیتی مانند تکرارپذیری بالا، عدم نیاز به دانستن توالی برای یافتن آغازگر و عدم نیاز به دانستن اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم یکی از گزینه‌های مناسب به منظور بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد (Zietkiewicz et al., 1994). در بررسی ساختار و مقایسه تنوع ژنتیکی ۷۷ بوته از ۸ توده مختلف گیاه دارویی کلپوره (مریم نخودی) با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR ۱۹۸ مکان قابل امتیازبندی مشاهده شد که از این تعداد ۱۸۴ مکان چند شکل بودند (Noruzi Gharatape et al., 2012). محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) بالا برای تمایز

بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. در بررسی Pesaraklu و همکاران (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های کلیوره (*Teucrium polium*) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD ارزیابی شد که تنوع مطلوبی در بین جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده شد، و گزارش کردند که نشانگر RAPD کارایی بالایی در تفکیک کردن جمعیت‌ها از یکدیگر دارد، به‌صورتی که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تا حدودی تطابق داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است که از این بابت از مسئولان مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

منابع مورد استفاده:

- Altintas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Zkan, H.O. 2008. Estimating Genetic Diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B., Swamy, K.R. M. and Karihaloo, J. L., 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew accession in India. *Genome*, 46: 362-369.
- Chawla, H S., 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. USA.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. and Quattro, J. M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-791.
- Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y., 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis barely. *Genetics Newsletter*, 35:9-22.
- Kumar, M., Mishra, G P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P K. and Singh, Sh. B., 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts

خوشه‌ای با دیاگرام حاصل از پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس مقدار مختصات اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت نشان داد. از تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای استفاده می‌شود و به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی منجر می‌شود. در مطالعه ۸ جمعیت از گونه *Teucrium polium* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR توسط سایر محققان تنوع بالایی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی مشاهده و از تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی جمعیت‌ها استفاده شد (Tabtib, 2014).

بر اساس تجزیه واریانس مولکولی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای، مشاهده شد که واریانس بین گروه‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار بود، اما بر اساس واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروه‌ها تنها ۲۹٪ از تنوع کل بود. از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان به تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به‌عنوان یک جمعیت و ژنوتیپ‌های درون آن به‌عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام می‌شود، البته نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروه‌ها به‌وجود آید، به‌عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد (Excoffier *et al.*, 1992). در مطالعه Tabtib (۲۰۱۴) بر روی ۸ جمعیت مریم‌نخودی نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع در درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها می‌باشد، بصورتی که تنوع در درون جمعیت‌ها برابر ۷۷٪ و در بین جمعیت‌ها برابر ۲۳٪ گزارش شد.

در مجموع بر اساس آغازگرهای مورد استفاده و با توجه به ماتریس تشابه، در تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی کمترین تشابه و بیشترین فاصله مربوط به اکوتیپ G۱ (صحنه- مله نمازگاه) با اکوتیپ‌های G۱۲ (صحنه-کلکان نسار)، G۷ (گیلان غرب-سه راهی ایلام)، G۱۳ (ثلاث-ازگل) و G۸ (دالاهو-هوهو رو) بود؛ که پیشنهاد می‌شود از این اکوتیپ‌ها که حداکثر فاصله ژنتیکی

- marianum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(3): 278-292.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., and Papa, R. 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. Plant Breeding, 124 (5): 464-472.
 - Surve-Iyer, R. S., Adams, G. C., Lezzon, A. F. and Jones, A. L., 1995. Isozyme detection and variation in *Ieucostoma* species from prunus and malus. Mycologia, 87: 471- 482.
 - Tabtib, B., 2014. Assessment of genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium*. Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences, 8(1):72-76.
 - Terzopoulos, P.J. and Bebeli, P.J., 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. Field Crops Research, 108:39-44.
 - Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S., 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Sciatica Horticulture, 118: 1-7.
 - Torres, A.M., Weeden, N.F. and Martin, A., 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics, 85: 935-945.
 - Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.
 - Zinodini, A., Farshadfar, M., Safari, H., Moradi, F. and Shirvani, H., 2013. Study of genetic relationships of some mint species using ISSR markers. Crop Biotechnology, 5: 11-21 (In Persian).
 - of Trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(3): 225-236.
 - Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant: Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
 - Noruzi Gharatape, R., Bernusi, I., Moghadam, A F., Abdollahi Mandulakani. B. and Jafari, M., 2012. Assessment of genetic diversity in different masses of medicinal plant *Teucrium polium* using ISSR markers. The 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran (In Persian).
 - Pacifico, S., D'Abrosca, B., Scognamiglio, M., D'Angelo, G., Gallicchio, M., Galasso, S., Monaco, P. and Fiorentino, A., 2012. NMR-based metabolic profiling and *in vitro* antioxidant and hepatotoxic assessment of partially purified fractions from golden germander (*Teucrium polium* L.) methanolic extract. Food Chem. Dec. 1; 135(3):1957-67.
 - Pesaraklu, A., Mianabadi, M., Bagherieh Najjar, MB., Sattarian, A. and Baghizadeh, A., 2013. Genetic diversity of different populations of Iranian *Teucrium polium* L. using RAPD markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21(1): 24-36 (In Persian).
 - Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.
 - Shokrpour, M., Mohamadi, S.A., Moghadam, M., Ziai S. A. and Javanshir, A., 2008. Analysis if morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum*

Genetic variability of *Teucrium polium* ecotypes using ISSR molecular markers

S. Esfandyari¹, M. Farshadfar^{2*}, H. Safari³, H. Shirvani⁴ and S. Esfandyari⁵

1- M.Sc. Islamic Azad University, Kermanshah, I.R. Iran

2- Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran. Email: farshadfarmohsen@yahoo.com

3,5- Faculty member of Research Department of Forests and Rangelands, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center. I.R. Iran

4- Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R. Iran

Received: 21.05.2016

Accepted: 22.10.2016

Abstract:

Golden germander (*Teucrium polium* L.) is an important medicinal plant of the Labiatae family. Genetic variability was studied on 17 ecotypes of *Teucrium polium* collected from Kermanshah, Iran, based on ISSR molecular markers. Twelve ISSR primers out of 15 primers could be scored. ISSR primers produced 82 bands, of which polymorphism was observed on 80 bands. Average number of bands was 6.83 for each primer. Primer IS₆ showed the highest number of bands (12 bands) and IS₃ showed the lowest number of bands (4 bands). The results indicated that ecotype G1 had the most genetic distance with G12, G7, G13 and G8. Based on cluster analysis the ecotypes were grouped into four clusters. Genetic diversity of ecotypes did not match with the geographical diversity of the ecotypes. Also results of grouping by analysis of molecular variance (AMOVA) and coordinate analysis (PCo) were confirmed.

Key words: Analysis of molecular variance, coordinate analysis, cluster analysis, *Teucrium polium*