

ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن‌های بومی ایران (*Thymus spp.*) با استفاده از نشانگرهای ملکولی ISSR

بهنام مندک^۱، ولی اله محمدی^{*۲}، جواد هادیان^۳

۱- دانشجوی دکترا و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۷)

چکیده

آویشن یکی از پرمصرف‌ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت از آویشن‌های بومی ایران از چهار گونه *T. Pubescence*, *T. kotschyanus*, *T. deanensis* و *T. lancifolius* به همراه یک جمعیت از گونه *T. vulgaris* با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از آغازگرهای به کار رفته، ۱۰ آغازگر باندهای قابل شناسایی با ۵۷ آلل تولید کردند. بیشترین مقدار PIC در آغازگر P_۹ با مقدار ۰/۹۲ مشاهده شد. آغازگرهایی که دارای موتیف‌های AC و AG بودند، باندهای واضح تری نسبت به سایر آغازگرها تولید نمودند. تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های ISSR، جمعیت‌ها را در دو گروه مستقل قرار داد. فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها از ۰/۰۳۲ تا ۰/۴ متفاوت بود. بررسی تنوع درون جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت‌های داران اصفهان، بیشترین ($I=0.43$ و $h=0.29$) و جمعیت *T. vulgaris* اصفهان، کمترین تنوع درون جمعیتی ($I=0.16$ و $h=0.106$) را دارا هستند. تنوع درون جمعیت‌ها ۷۷ درصد و تنوع بین جمعیت‌ها ۲۳ درصد بود. در بین گونه‌های مورد بررسی نیز *T. deanensis* و *T. lancifolius* با ۹۸/۲۵ و ۷۵/۴۴ درصد بیشترین و گونه *T. vulgaris* با ۳۵/۰۹ درصد کمترین پلی مورفسم را نشان دادند. تغییرات درون گونه‌ها ۹۰ درصد و تغییرات بین گونه‌ها ۱۰ درصد از کل تنوع را تشکیل می‌دادند. به‌طور کلی یافته‌های این پژوهش، تنوع ژنتیکی گسترده‌ای را در آویشن‌های ایرانی آشکار نمود که می‌توان از این پتانسیل در جهت به‌نژادی این گیاه ارزشمند بهره برد.

واژه‌های کلیدی: آویشن، تنوع ژنتیکی، ایران، ISSR.

Genetic variability in Iranian *Thymus* species based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers

Behnam Mondak¹, Valiollah Mohammadi^{*1}, Javad Hadian²

1. Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, 3. Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University
(Received: August 19, 2018- Accepted: April 6, 2019)

ABSTRACT

Thyme is one of the most widely used and valuable medicinal plants in the world. To study the genetic diversity, 22 populations of Iranian thyme from four species, *T. deanensis*, *T. Pubescence*, *T. kotschyanus* and *T. lancifolius* as well as a population of *T. vulgaris* evaluated by 12 ISSR primers. Ten ISSR primers produced detectable bands with 57 alleles. The highest amount of the PIC (Polymorphism Information Content) was detected in P₉ primer with 0.92 PIC. Primers with AC and AG motifs produced sharper bands. Cluster analysis based on molecular data grouped the populations in two separate classes. The range of genetic distance between populations varied from 0.03 to 0.4. Daran-Isfahan population and *T. vulgaris* revealed the highest ($I=0.43$, $h=0.29$) and the lowest ($I=0.16$, $h=0.106$) intra-population variation, respectively. The intra- and inter-population diversities contributed 23% and 77% to total Variation, respectively. *T. deanensis* and *T. lancifolius* indicated the highest polymorphism with 98.25% and 77.44%, respectively while the lowest polymorphism was detected in *T. vulgaris* (35.9%). The intra- and inter-species diversities contributed 10% and 90% to total variation, respectively. Results showed a great genetic variation in Iranian thyme species which could be considered in hybridization and breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Iran, thymus, ISSR.

* Corresponding author E-mail: Vmohammadi@ut.ac.ir

مقدمه

کاشته و تولید می‌شوند، از طریق روش‌های ساده انتخاب در بین جمعیت‌های وحشی یا توده‌های بومی به‌دست آمده‌اند. کارایی انتخاب، به وجود و شناخت دقیق تنوع ژنتیکی بستگی دارد (Bernath, 2002; Nemth, 2000) در کشور ما، تحقیق روی اکثر گیاهان دارویی اندمیک یا بومی، تحت الشعاع گیاهان زراعی قرار گرفته است. بنابراین پیشرفت در زمینه اصلاح و بهره‌برداری از این گیاهان، نیازمند استفاده از تنوع ژنتیکی آن‌ها است (Rahim Malek et al., 2009). تنوع ژنتیکی، اساس اصلاح نباتات و ماده خام ضروری برای آن است. یک به‌هنگامگر در صورتی می‌تواند امید به موفقیت زیادی در برنامه‌های به‌هنگامی خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب برای او فراهم باشد. به‌همین دلیل، منابع خویشاوند وحشی گیاهی، یکی از مهم‌ترین، پرارزشترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شوند (Vejdani, 1993).

مطالعات در سطح جمعیت نشان می‌دهد که نشانگرهای DNA، کارایی زیادی در تشخیص تنوع دارند و اطلاعات زیادی را فراهم می‌آورند. این نشانگرها، گروه‌های ژنتیکی و تشابه بین آن‌ها را مشخص می‌سازند و در تخمین تنوع درون گروه‌ها و مطالعه روابط تکاملی آن‌ها با خویشاوندان وحشی نیز بسیار موثر هستند (Sharma et al., 1996). یکی از تکنیک‌هایی که اخیراً برای بررسی تنوع ژنتیکی، مورد استفاده گسترده پژوهشگران قرار گرفته است، تکنیک ISSR است. این تکنیک، ترکیبی از مزیت‌های تکرارپذیری و دقت AFLP و SSR و فراگیری و عمومیت RAPD را دارا می‌باشد. در واقع این تکنیک، به‌دلیل داشتن آغازگرهایی با توالی ساده تکراری با طول ۱۶-۲۵ جفت باز، همراه با توالی لنگر در سمت 3' و یا 5' خود، تکرارپذیری بالایی دارد. به‌علاوه وجود این تعداد باز، سبب بالا بردن دمای اتصال (۶۰-۴۵) می‌شود که این موضوع، خود سبب افزایش دقت کار^۱ می‌شود. دو مورد از مزیت‌های مهم این نشانگر این

گیاهان منبع اصلی تولید دارو در سالهای دور بوده اند که در پی عوارض داروهای شیمیایی دوباره در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. داروهای گیاهی به ویژه هنگام مصرف طولانی و بیماری‌های مزمن بسیار مناسب‌تر هستند (Omid Beygi, 2009). جنس آویشن، یکی از جنس‌های خانواده نعنا و زیر خانواده نپتودا (Nepetoideae) است. اسانس آویشن، در ردیف ۱۰ اسانس معروف دنیا است که جایگاه اقتصادی خاصی در تجارت جهانی دارد. در بین داروهای گیاهی تولید شده نیز گیاه آویشن در جهان بعد از نعنا، دارای رتبه دوم است (Omid Beygi, 2006). با توجه به درصد بالای اسانس در برخی از آویشن‌های بومی ایران و نیز درصد بالای ترکیبات فنولی در آن‌ها (بوژه تیمول)، می‌توان آن را به عنوان جایگزین مناسبی برای گونه رسمی اروپایی (*T. vulgavis*) جهت مقاصد مختلف، به‌ویژه کاربردهای دارویی در نظر گرفت (Nickavar et al., 2004).

در مورد تعداد گونه‌های آویشن از نظر تاکسونومی، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. تعداد گونه‌های آن در بعضی از گزارش‌ها به ۸۰۰ گونه می‌رسد، اما با در نظر گرفتن کمترین مقدار تنوع مورفولوژیکی، ۲۱۵ گونه از این جنس گزارش شده است (Morales, 2012). دلیل وجود تنوع بالا در بین گونه‌های آویشن، مقدار بالای دورگ‌گیری بین گونه‌ای در این جنس است (Jamzad, 2009). از میان گونه‌های آویشن، ۱۸ گونه در ایران شناسایی شده است که از این تعداد، قبلاً ۱۴ گونه و زیرگونه توسط پروفیسور ریشینگر در فلور ایرانیکا گزارش شده است و چهار گونه، *T. persicus*, *T. carmanicus*, *T. daenensis*, *T. trautvetteri* انحصاری کشورمان است.

اگرچه سابقه کشت و کار گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می‌گردد، اما باید بیان داشت که در زمینه اصلاح این گیاهان ارزشمند، تاکنون اقدام قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است (Bernath., 2002; Nemth., 2000). در حال حاضر، تعداد ارقام اصلاح شده گیاهان دارویی اندک است. حدود ۶۰-۷۵ درصد از گیاهان دارویی که امروزه در کشت و صنعت‌ها،

¹ Stringency

جمع آوری شده از سه منطقه کوروا، فلوریس و گارسیوسا با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR و ۱۷ آغازگر RAPD، به ترتیب ۱۲۷ و ۱۹۹ باند چند شکل تولید شد. اطلاعات به دست آمده، گیاهان جمع آوری شده از مناطق کوروا و فلوریس را در گروه جداگانه‌ای از گیاهان جمع آوری شده از منطقه گارسیوسا قرار داد (Trindade et al., 2009).

هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی در بین و درون جمعیت‌های گونه‌های مختلف آویشن بومی ایران و تعیین فاصله ژنتیکی موجود در بین جمعیت‌های مختلف، برای شناسایی جمعیت‌های دارای بیشترین فاصله از هم بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از ۱۲ آغازگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۳ جمعیت آویشن استفاده شد. بذره‌های ۲۲ جمعیت از چهار گونه آویشن بومی ایران از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، شرکت پاکان بذر اصفهان و پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. همچنین در کنار این نمونه‌ها، بذر نمونه آویشن ولگار (*T. vulgaris*) نیز به عنوان شاهد، برای مقایسه با جمعیت‌های بومی ایران، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد (جدول ۱).

است که نیازی به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم ندارد و هزینه این روش نسبت به روش‌هایی نظیر SSR و AFLP خیلی پائین‌تر و اجرای آن نیز راحت‌تر است (Aga et al., 2005). مطالعه بر روی قابلیت تکرارپذیری ISSR نشان داده است که تنها باندهای ضعیف، قابلیت تکرار را ندارند و حدود ۹۵-۹۲ درصد از قطعات، در ژنوم افراد مختلف یک گونه و همچنین در PCR های مختلف، قابل مشاهده و بررسی است (Fang, 1998).

در بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز جغرافیایی ۱۷ توده آویشن دنیایی با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR، تعداد ۳۵۶ باند تولید شد 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، ارتباطی قوی با مناطق جغرافیایی و رویشگاهی آن‌ها نشان داد (Rahim Malek et al., 2009).

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و برون محیطی گیاه دارویی آویشن کرمانی، از نشانگرهای ملکولی ISSR استفاده شد که از مجموع ۱۲ آغازگر به کار رفته، ۱۲۷ باند با وضوح بالا تولید شد که از این تعداد، ۲۲ باند، یک شکل و ۱۰۵ باند دارای چند شکلی بودند (Bigdello, 2011).

در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ تک بوته *T. caespitius*

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های آویشن مورد بررسی در این پژوهش.
Table 1. Characteristics of 23 thyme population used in this study.

Population NO.	Species	Origin	Population NO.	Species	Origin
1	<i>Deanensis</i>	Daran	12	<i>Deanensis</i>	Kordestan
2	<i>Deanensis</i>	Markazi- Baneh	13	<i>Deanensis</i>	Elam
3	<i>Deanensis</i>	Lorestan- cheghelvandi	14	<i>Vulgaris</i>	Esfahan
4	<i>Deanensis</i>	Markazi- Varcheh	15	<i>Pubescence</i>	Oromeyeh
5	<i>Deanensis</i>	Markazi- Shazand	16	<i>Lancifolius</i>	Markazi
6	<i>Deanensis</i>	freydoon shahr	17	<i>Kotschyanus</i>	Rodbar
7	<i>Deanensis</i>	Lorestan- azgeneh	18	<i>Kotschyanus</i>	Qazvin-Qaqazan
8	<i>Deanensis</i>	Esfahan-semirom	19	<i>Kotschyanus</i>	Qazvin
9	<i>Deanensis</i>	Esfahan. Fereydan	20	<i>Pubescence</i>	Saghez
10	<i>Deanensis</i>	Lorestan	21	<i>Lancifolius</i>	Markazi-
11	<i>Deanensis</i>	Esfahan	22	<i>Pubescence</i>	Azərbayjan.
			23	<i>Lancifolius</i>	Markazi- chepeghli

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران کاشته شدند. پس از جوانه زدن و رشد، گیاهچه‌ها در

بذرها در سینی نشا و در محیط کشت کوکوپیت و پرلیت، در گلخانه‌های گروه زراعت و اصلاح نباتات

آغازز مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، از ۱۲ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲). آغازگرهای به کار رفته در این پژوهش، آغازگرهایی بودند که در سایر مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌های مختلف آویشن و یا سایر گیاهان خانواده نعنا (Bigdelo *et al.*, 2011; Rahim Malek *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009) بیشترین مقدار چند شکلی را نشان داده بودند. توالی آغازگرهای به کار رفته در جدول ۲ آورده شده اند.

مرحله چهار برگی از سینی نشا به گلدان‌های سفالی منتقل شدند. پس از رشد مناسب گیاهچه‌ها، از هر جمعیت، پنج گیاه به صورت تصادفی انتخاب شدند و برای استخراج DNA، از برگ‌های سالم و جوان هر گیاه، نمونه برداری شد. برگ‌های جمع‌آوری شده پس از انجماد در ازت مایع، به فریزری با دمای منفی ۸۰ منتقل شدند. استخراج DNA از گیاه آویشن با روش تغییر یافته CTAB (Murray & Thompson, 1989) و در چندین مرحله انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی نیز با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل

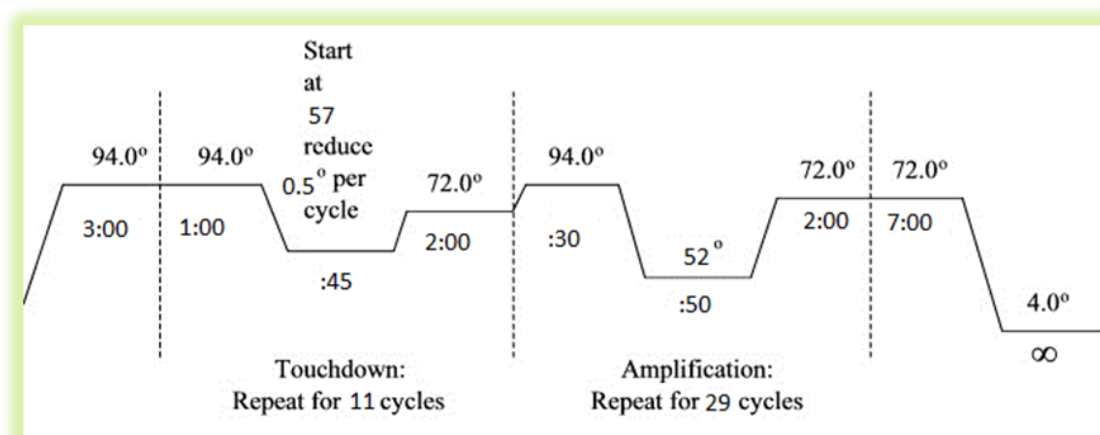
جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده.

Table 2. ISSR primers used for analysis of Iranian thyme.

Name	Sequence	Annealing Temperature (C)
P ₁	5'-CTCTCTCTCTCTCTG -3'	53
P ₂	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGST -3'	51
P ₃	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT -3'	53
P ₄	5'-CACACACACACACAWT -3'	50
P ₅	5'- ACACACACACACACAG -3'	50
P ₆	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAC -3'	51
P ₇	5'-CACACACACACACACAG -3'	51
P ₈	5'- TCGTCGTCGTCGTCGC -3'	50
P ₉	5'-TCTCTCTCTCTCTCTC -3'	48
P ₁₀	5'- ACACACACACACACACC -3'	51
P ₁₁	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGC -3'	51
P ₁₂	5'- AGAGAGAGAGAGAGAG -3'	50

حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از ژل آغازز دو درصد و به مدت دو ساعت، با جریان ۹۰ ولت صورت گرفت. رنگ آمیزی ژل، با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت و در نهایت، عکس برداری از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ژک داک انجام شد.

حجم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۲۰ میکرولیتر (با فر X Primer : dNTP: 0.25 mM ، MgCl₂: 4 mM ، ۱۰ ، 0.5 pM ، ۲٪ Formamide ، DNA: 30 ng/μL) در نظر گرفته شد و برنامه تکثیر به صورت Touch down انجام شد (شکل ۱). الکتروفورز محصولات



شکل ۱- برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای ISSR مورد استفاده.
Figure 1. Polymerase chain reaction timing applied for ISSR primers.

نمره‌دهی باندها، به صورت یک وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام شد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) بر اساس فرمول (Prasad *et al.*, 2000) $PIC = 1 - \sum_{I=1}^N P_I^2$ محاسبه شد. پارامترهای تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آل‌های موثر (Ne)، میزان جریان ژنی (Nm)، مقادیر فاصله ژنتیکی (D)، شباهت ژنتیکی (I)، ماتریس تشابه و تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) با استفاده از نرم افزار GenAEx v. 6.1 (Peakall & Smouse, 2006) مورد محاسبه و بررسی قرار گرفت. ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها (GST) با استفاده از نرم افزار Popgen محاسبه شد و برای رسم دندروگرام بر اساس روش UPGMA و بر اساس ماتریس تشابه، از نرم افزار NTSYS استفاده شد. در این مطالعه، جهت تفکیک و گروه‌بندی نمودار خوشه‌ای، مکان خط برش با استفاده از روش جذرگیری بر روی محور فاصله مشخص شد.

نتایج و بحث

از بین ۱۲ آغازگر به کار رفته در این پژوهش، ۱۰ آغازگر، پلی‌مورفیسم نشان دادند و دو آغازگر P₈ و P₁₀ باند مناسبی جهت ارزیابی و بررسی جمعیت‌های مورد مطالعه نشان ندادند. در مجموع، ۵۷ آل شناسایی شد که در این بین، آغازگرهای P₂، P₄ و P₅ با چهار آل، دارای کمترین تعداد آل و آغازگر P₆ با هشت آل، دارای بیشترین تعداد آل در بین آغازگرهای مورد بررسی بودند. میانگین تعداد آل در کل جایگاه‌ها، ۵/۷ بود (جدول ۳). از آن‌جا که تعداد آل هر نشانگر ریزماهواره، یکی از شاخص‌هایی است که مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Roder *et al.*, 1998)، بنابراین آغازگرهایی که تعداد آل زیادی نشان داده‌اند، برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند. با بررسی آل‌ها مشاهده شد که برخی از آغازگرها در بعضی از ژنوتیپ‌ها، هیچ باندهی را تکثیر نکردند. با توجه به سالم بودن DNA و چند بار تکرار آزمایش، به نظر می‌رسد که وقوع جهش در یک یا دو طرف ناحیه تکرار شونده، مانع چسبیدن آغازگرها و تکثیر ناحیه

بین دو آغازگر شده است.

بیشترین درصد چند شکلی با متوسط ۷۰/۴۳ درصد، به آغازگر P₉ (شکل ۲) و کمترین درصد چندشکلی با متوسط ۳۹/۱۳ درصد، به آغازگر تعلق داشت. متوسط درصد چند شکلی در بین تمامی آغازگرهای مورد استفاده، ۵۲/۲ درصد بود (جدول ۳).

در تحقیقی که بر روی ۲۵ نمونه آرتیمیزیای مربوط به پنج منطقه با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR صورت گرفت، ۷۸ باند به دست آمد که از این تعداد، ۵۴ باند چند شکل بودند؛ در این مطالعه، درصد چند شکلی ۶۶/۶۷ درصد بود (Shafai *et al.*, 2011).

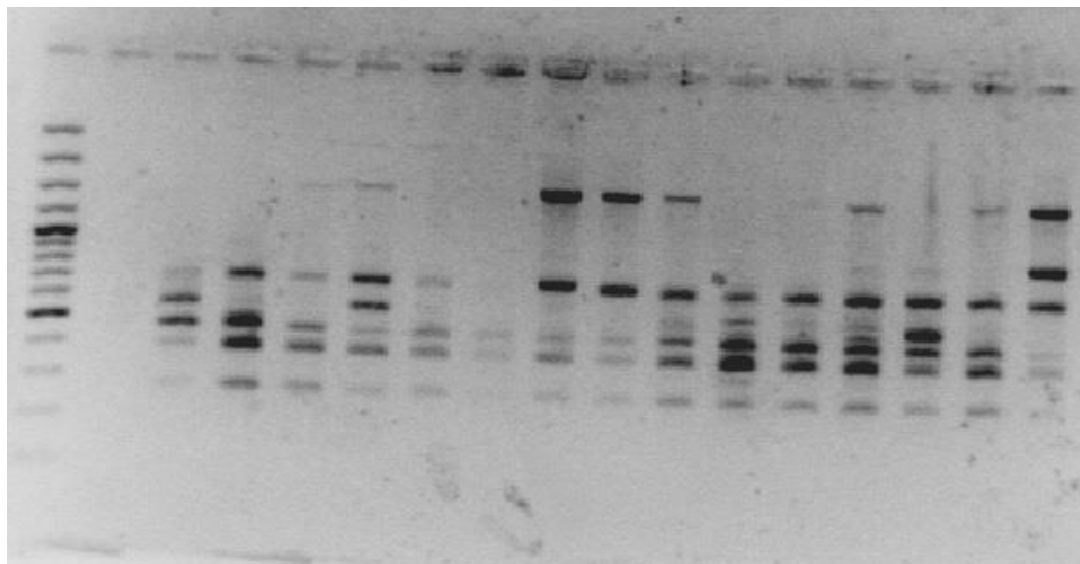
محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده برای ۱۰ آغازگر مورد استفاده با متوسط ۰/۶۸ از ۰/۵۵ برای آغازگر P_{۱۳} تا ۰/۹۲ برای آغازگر P_۹ متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار، نشان دهنده چند شکلی بالا و وجود آل یا آل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد، نقش بسزایی دارد (Agrama & Tuinstra, 2003). بنابراین آغازگر P₉ با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر نشانگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند.

میانگین تعداد آل‌های مشاهده شده، ۱/۱۲ بود که بیشترین آن با متوسط ۱/۴۶ به آغازگرهای P₅ و P₉ و کمترین آن با متوسط ۱/۰۱ به آغازگر P₁ تعلق داشت. تعداد آل‌های موثر نیز با متوسط ۱/۳۴ از دامنه ۱/۴۸ برای آغازگر P₅ تا ۱/۲۹ برای آغازگر P_۴ متغیر بود. شاخص اطلاعاتی شانون (I) با متوسط ۰/۲۹، از ۰/۲۱ برای آغازگر P₇ تا ۰/۳۷ برای آغازگر P₉ متغیر بود. ضریب شانون نیز همانند محتوای اطلاعات چندشکلی، میزان چند شکلی آغازگر را نشان می‌دهد (جدول ۳).

به منظور بررسی روابط بین جمعیت‌ها، شاخص‌های بین جمعیتی برای تک تک آغازگرها به طور جداگانه بررسی شد (جدول ۳). اولین شاخص، تنوع ژنتیکی کل (H_T) بود که با میانگین ۰/۳، از ۰/۲ برای آغازگر

به نتایج، بین شاخص‌های شانون، تنوع ژنتیکی کل، تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی و تعداد آل‌های مشاهده شده و موثر، رابطه مستقیمی وجود داشت (جدول ۳).

P₁₂ تا ۰/۴۵۸ برای آغازگر P₅ متغیر بود. از نظر شاخص تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی (H_s) نیز آغازگر P₁₂ با متوسط ۰/۱۶ کمترین و آغازگرهای P₅ و P₉ با متوسط ۰/۲۵ بیشترین مقدار را نشان دادند. با توجه



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جمعیت‌های مختلف آویشن توسط آغازگر P₉ بر روی ژل آگارز دو درصد.

Figure 2. The bands produced by ISSR primer P₉ in some thymus population of on 2% agarose gel.

جریان ژنی (Nm) برای تمامی آغازگرها برابر با ۰/۹۶۳ محاسبه شد که این مقدار، متأثر از ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها بود و همبستگی منفی با آن داشت. در میان آغازگرهای مورد بررسی نیز بیشترین جریان ژنی در میان جمعیت‌ها، برای آغازگر P₆ و کمترین آن برای آغازگر P₂ مشاهده شد. تشابه ژنتیکی بالا می‌تواند ناشی از ادغام و همپوشانی زیاد جمعیت‌ها باشد که از جریان ژنی بین جمعیت‌ها حاصل شده است.

ضریب تمایز ژنی بین جمعیت (G_{ST}) به‌طور متوسط برابر با ۰/۳۴۱ محاسبه شد که آغازگرهای P₂ و P₁₂ به‌ترتیب با ۰/۴۸۹ و ۰/۲۰۴، بیشترین و کمترین مقدار این شاخص را نشان دادند. آماره G_{ST} نسبت تنوع بین جمعیتی به تنوع کل را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، ۳۴/۱ درصد از تنوع مشاهده شده در کل جمعیت‌ها، تنوع بین جمعیت‌ها بود و ۶۶/۹ درصد تنوع کل، به تنوع درون جمعیت‌ها تعلق داشت. مقدار

جدول ۳- ویژگی‌های نشانگرهای حاصل از ده آغازگر ISSR مورد بررسی در ژنوتیپ‌های آویشن.

Table 3- ISSR primer characteristics in thyme species accessions.

Primer	N	Na±SE	Ne±SE	I±SE	H _T	H _s	G _{st}	Nm	Pol%	PIC
P ₁	7	1.01±0.07	1.32±0.031	0.27±0.024	0.283±0.006	0.184±0.006	0.325	1.17	54.4	0.68
P ₂	4	1.03±0.093	1.32±0.044	0.25±0.033	0.31±0.045	0.177±0.041	0.489	0.64	41.3	0.57
P ₃	5	1.11±0.089	1.33±0.038	0.27±0.028	0.29±0.021	0.188±0.005	0.315	1.24	51.3	0.64
P ₄	4	1.09±0.086	1.29±0.042	0.23±0.031	0.297±0.005	0.160±0.003	0.431	0.913	39.1	0.58
P ₅	4	1.46±0.072	1.48±0.04	0.36±0.033	0.458±0.012	0.250±0.001	0.429	0.937	57.6	□□□□
P ₆	8	1.14±0.073	1.33±0.027	0.29±0.021	0.256±0.024	0.196±0.011	0.234	1.77	56.5	0.70
P ₇	6	1.03±0.083	1.33±0.034	0.28±0.026	0.296±0.030	0.191±0.012	0.340	1.29	48.5	0.71
P ₉	5	1.46±0.080	1.42±0.035	0.37±0.018	0.36±0.003	0.250±0.002	0.310	1.28	70.4	0.92
P ₁₁	7	1.11±0.077	1.38±0.032	0.31±0.017	0.31±0.026	0.213±0.014	0.323	1.11	50.5	0.77
P ₁₂	7	0.98±0.079	1.28±0.028	0.25±0.015	0.206±0.005	0.168±0.004	0.204	1.29	49	0.55
Means	5/7	1.14±0.080	1.34±0.035	0.28±0.024	0.306±0.026	0.197±0.005	0.34	1.16	52.2	0.68

N: تعداد باندها، Na: تعداد آل مشاهده شده، Ne: تعداد آل موثر، I: شاخص اطلاعاتی شانون، H_T: تنوع ژنتیکی کل، H_s: تنوع ژنتیکی داخل

جمعیتی، G_{st}: ضریب تمایز ژنی و Nm: جریان ژنی.

N: Number of bands, Na: Number of observed alleles, Ne: Number of effective alleles, I: Shannon information index, H_T: Total genetic diversity, H_s: Intra- population genetic diversity, G_{st}: Genetic differentiation coefficient and Nm: Gene flow.

میانگین ۱/۷۴ مشاهده شد. از نظر تنوع ژنی نی (H) و شانون (I) نیز جمعیت یک به ترتیب با متوسط ۰/۲۹ و ۰/۴۳ بیشترین مقدار را داشت و جمعیت ۱۴ با مقادیر ۰/۱ و ۰/۱۷۲ کمترین مقدار این دو شاخص تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص داد. از نظر تعداد باندهای چندشکل نیز جمعیت‌های یک و دو به ترتیب با ۷۰/۱۸ و ۶۶/۶۷، بیشترین درصد و جمعیت ۱۴ با ۳۵/۰۹، کمترین مقدار پلی مورفیسم را به خود اختصاص دادند.

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها، میانگین شاخص‌های درون جمعیتی شامل آل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آل‌های موثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H) و شاخص شانون (I) برای جمعیت‌های مورد بررسی محاسبه شد (جدول ۴). از نظر تعداد آل‌های مشاهده شده، جمعیت یک با متوسط ۱/۷۷ بیشترین مقدار را نشان داد. میانگین تعداد آل‌های موثر در کل جمعیت‌های مورد بررسی، ۱/۳۴ بود و بیشترین تعداد آل موثر در جمعیت شماره ۱۴ با

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های آویشن مورد بررسی.

Table 4. Genetic diversity indices in thyme populations.

Pop	Na	Ne	I	H	No. Poly. bond	Poly. %
1	1.77±0.42	1.51±0.37	0.43±0.126	0.29±0.19	44	77.18
2	1.66±0.47	1.38±0.36	0.34±0.27	0.22±0.19	38	66.67
3	1.63±0.49	1.33±0.35	0.30±0.26	0.20±0.18	33	63.16
4	1.61±0.43	1.37±0.37	0.33±0.28	0.22±0.19	35	61.40
5	1.61±0.50	1.40±0.39	0.34±0.29	0.23±0.20	29	61.40
6	1.50±0.49	1.39±0.43	0.30±0.31	0.21±0.22	35	50.88
7	1.61±0.50	1.46±0.41	0.37±0.30	0.25±0.21	25	61.40
8	1.43±0.52	1.21±0.31	0.20±0.25	0.13±0.17	31	43.86
9	1.54±0.50	1.38±0.42	0.31±0.30	0.21±0.21	31	54.39
10	1.47±0.50	1.35±0.42	0.27±0.31	0.19±0.22	27	47.3
11	1.49±0.50	1.35±0.41	0.28±0.30	0.19±0.21	28	49.12
12	1.52±0.50	1.32±0.38	0.28±0.28	0.18±0.20	30	52.93
13	1.38±0.49	1.27±0.39	0.22±0.29	0.15±0.21	22	38.60
14	1.35±0.48	1.47±0.30	0.165±0.24	0.106±0.166	20	35.09
15	1.47±0.50	1.39±0.42	0.29±0.31	0.20±0.22	27	47.3
16	1.42±0.50	1.32±0.41	0.25±0.30	0.17±0.21	24	49.11
17	1.50±0.50	1.21±0.25	0.23±0.24	0.14±0.15	29	50.88
18	1.43±0.48	1.29±0.39	0.24±0.29	0.16±0.20	25	43.86
19	1.63±0.50	1.51±0.44	0.39±0.31	0.27±0.22	36	63.16
20	1.54±0.48	1.33±0.38	0.28±0.28	0.19±0.20	31	54.39
21	1.35±0.52	1.24±0.36	0.20±0.28	0.13±0.19	20	35.09
22	1.45±0.50	1.38±0.44	0.29±0.32	0.20±0.23	26	45.61
23	1.49±0.50	1.38±0.42	0.30±0.31	0.21±0.22	28	49.12

به‌طوری‌که گیاهان درون جمعیت‌ها تنوع بالایی داشتند و جمعیت‌ها ناهمگن بودند. واریانس بین و درون جمعیت‌ها جمعیت‌ها، به ترتیب ۲۷ و ۷۳ درصد بود (جدول ۵). به‌طورکلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. در گونه‌های دگرگشن، به‌علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است. در مورد این گونه‌ها، در صورتی‌که جریان ژنی بین 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

اعضای جمعیت ۱۴، مربوط به گونه اصلاح شده ولگار هستند و همان‌گونه که انتظار می‌رفت، درصد پلی مورفیسم زیادی در آن مشاهده نشد. بر اساس نظر شرکت پاکان بذر، بذره‌های تهیه شده از این جمعیت، مربوط به نسل F₂ بودند و با در نظر گرفتن درصد بالای دگرگشنی در این گیاه، می‌توان پلی مورفیسم موجود در این جمعیت را توجیه کرد. به‌طورکلی، در بین جمعیت‌های مورد بررسی، تنوع زیادی وجود داشت، اما تنوع درون جمعیتی بیشتر بود که این موضوع سبب ممانعت از بروز کامل تنوع بین جمعیتی شد.

تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که واریانس درون جمعیت‌ها نسبت به واریانس بین جمعیتی بیشتر بود،

شد که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، حدود ۶۷ درصد و تنوع بین جمعیتی، حدود ۳۳ بود (Bigdello *et al.*, 2011).

به علت افزایش هموزی و افتراق بین جمعیت‌ها، فرسایش ژنتیکی رخ خواهد داد (Hamrick & Godt, 1989). در مطالعه بر روی ۷۰ ژنوتیپ از هفت جمعیت آویشن کرمانی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR گزارش

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تنوع بین و درون جمعیت‌های آویشن.

Table 5. Analysis of molecular variance between and within the populations of thyme.

S.O.V	df	MS	Estimated variance	%poly.	PhiPT Value	PhiPT Prob
Between group	22	20.88	2.71	27	0.270	0.010
Within group	92	7.32	7.32	73		
Total	114		10.034	100		

شانون (I) برای جمعیت‌های مورد بررسی محاسبه شد (جدول ۶). از نظر تعداد آلل‌های مشاهده شده، گونه دنیایی با متوسط ۱/۹۶ بیشترین و گونه ولگار با متوسط ۰/۷۱ کمترین مقدار را نشان داد. میانگین تعداد آلل‌های موثر در کل جمعیت‌های مورد بررسی، برابر با ۱/۳۸ بود و بیشترین تعداد آلل موثر در گونه‌های دنیایی و *T. Lancifolius* با میانگین ۱/۴۵ مشاهده شد. از نظر تنوع ژنی نی (H) و شانون (I) نیز گونه دنیایی به ترتیب با متوسط ۰/۲۸ و ۰/۴۴ بیشترین مقدار را داشتند و گونه ولگار با مقادیر ۰/۱۱۲ و ۰/۱۷۲ کمترین مقدار این دو شاخص تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دادند. از نظر تعداد باند‌های چندشکل نیز گونه‌های دنیایی و *T. lancifolius* به ترتیب با درصد پلی‌مورفیسم ۹۸/۲۵ و ۷۵/۴۴ بیشترین و گونه ولگار با درصد پلی‌مورفیسم ۳۵/۰۹ کمترین مقدار را از لحاظ این صفت به خود اختصاص دادند (جدول ۶).

مقدار ارزش pht (۰/۲۷)، نشان دهنده تمایز بین جمعیت‌ها است که با توجه به این که جمعیت ۱۴ آویشن ولگار، نسل F_۲ بوده است و بذریه جمعیت شماره هشت هم از دانشگاه شهید بهشتی فراهم شده بود که چند نسل انتخاب بر روی آن صورت گرفته بود، می‌توان گفت که این دو جمعیت تا حدودی تثبیت شده‌اند. در واقع نشان دهنده این است که این جمعیت‌ها تنوع خود را از دست داده‌اند و به یکنواختی رسیده‌اند. علاوه بر این، بذریه سایر جمعیت‌ها که از مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شده بود نیز ممکن است متعلق به یک بوته و یا چند بوته مجاور هم بوده است که این موضوع هم می‌تواند در متمایز شدن جمعیت‌ها نقش داشته باشد (جدول ۵). به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون هر گونه، جمعیت‌های مختلف مربوط به هر گونه به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند و میانگین شاخص‌های درون جمعیتی شامل آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H) و شاخص

جدول ۶- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در گونه‌های آویشن مورد بررسی.

Table 6. Genetic diversity indices in thyme species.

Species	Na	Ne	I	He	UHe	Pol%
<i>T. deanensis</i>	1.96	1.45	0.44	0.28	0.28	98.25
<i>T. vulgaris</i>	0.71	1.18	0.17	0.11	0.12	35.09
<i>T. pubescence</i>	1.49	1.44	0.37	0.25	0.26	71.93
<i>T. kotschyanus</i>	1.29	1.38	0.34	0.22	0.23	64.91
<i>T. lancifolius</i>	1.50	1.45	0.39	0.26	0.27	75.44

N: تعداد باند، Na: تعداد آلل مشاهده شده، Ne: تعداد آلل موثر، I: شاخص اطلاعاتی شانون، H_T: تنوع ژنتیکی کل، H_S: تنوع ژنتیکی داخلی جمعیتی، G_{ST}: ضریب تمایز ژنی و Nm: جریان ژنی.

N: Number of bands, Na: Number of observed alleles, Ne: Number of effective alleles, I: Shannon information index, H_T: Total genetic diversity, H_S: Intra-population genetic diversity, G_{ST}: Genetic differentiation coefficient and Nm: Gene flow.

که واریانس درون و بین گونه، به ترتیب ۹۰ و ۱۰ درصد بود (جدول ۷).

تجزیه واریانس داده‌های ملکولی مربوط به گونه‌ها نشان داد که در بین گونه‌ها، تفاوت چندانی وجود نداشت و بیشتر تفاوت در درون گونه‌ها بود، به گونه‌ای

جدول ۷ - تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تنوع بین و درون گونه‌های مختلف آویشن.

Table 7. Analysis of molecular variance between and within the species of thyme.

S.O.V	df	MS	Estimated variance	%poly	PhiPT Value	PhiPT Prob
Between group	4	28.20	1.04	10	0.102	0.010
Within group	110	9.27	9.27	90		
Total	114		10.32	100		

کلاستر مربوط به گونه‌ها نیز انجام (شکل ۴) و مشاهده شد که گونه‌های مورد بررسی، در دو کلاس کلی قرار گرفتند، به شکلی که گونه دو که گونه ولگار بود، در یک کلاستر و گونه‌های آویشن بومی ایران در یک کلاستر دیگر قرار گرفتند. با توجه به این که منشا این گونه کشور آلمان و دارای ماهیت ژنتیکی متفاوتی با آویشن‌های بومی ایران می‌باشد، این امر می‌تواند گواهی بر مناسب بودن نشانگر ISSR در تفکیک گونه-های مورد بررسی باشد. در بین گونه‌های بومی ایران نیز گونه سه که آویشن *T. pubescence* است، به طور کامل از سایر گونه‌ها جدا شد و در یک زیر کلاستر جداگانه قرار گرفت که شاید بتوان عامل جغرافیایی را دلیل مهم این تمایز دانست، به طوری که اکثر جمعیت‌های مربوط به سایر گونه‌ها، متعلق به استان‌های مرکزی و غربی کشور مثل استان‌های اصفهان، مرکزی و خرم‌آباد و... هستند، در حالی که جمعیت‌های مربوط به گونه *T. pubescence* متعلق به مناطق ارومیه، سقز و آذربایجان شرقی هستند که این بعد مسافت، سبب رانش ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به این گونه و در نهایت متمایز شدن این گونه نسبت به سایر گونه‌ها شده است (شکل ۳).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج مربوط به تجزیه داده‌های ملکولی نشان داد که بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر P_۹ با ۰/۹۲ بود. میانگین PIC در کل آغازگرهای مورد بررسی، ۰/۶۸ بود که نشان دهنده کارایی مناسب آغازگرهای به کار برده شده است. علاوه بر این، بیشترین مقدار پلی مورفیسم در جمعیت‌های یک و دو، با درصد پلی مورفیسم ۷۷/۱۸ و ۶۶/۶۷ درصد

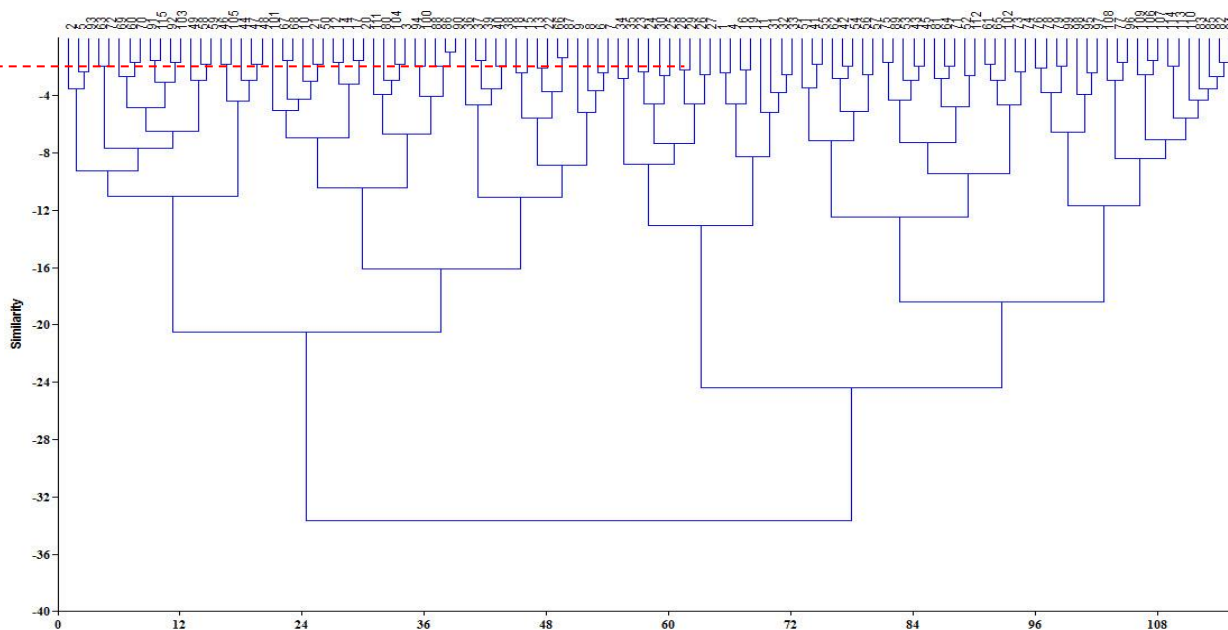
نتایج حاصل از تجزیه کلاستر، جمعیت‌های مورد بررسی را به دو کلاستر اصلی تقسیم بندی نمود که کلاستر اول به دو زیرمجموعه و کلاستر دوم به سه زیرمجموعه تقسیم شد. کلاستر اول بیشتر شامل جمعیت‌های متعلق به گونه‌های دناپی و برخی از جمعیت‌های مربوط به *T. lancifolius* بود. از آن جا که گفته می‌شود این گونه از زیرگونه‌های آویشن دناپی است، این نکته قابل توجیه می‌باشد. زیر مجموعه‌های یک و دو گروه دوم را هم بیشتر جمعیت‌های متعلق به آویشن دناپی تشکیل دادند. زیر مجموعه سوم از گروه دوم را نیز بیشتر جمعیت‌های متعلق به گونه‌های *T. pubescence* و *T. kotschyanus* تشکیل دادند (شکل ۳).

نتایج تجزیه کلاستر حاصل با پراکنندگی جغرافیایی جمعیت‌ها نیز همخوانی دارد؛ مثلاً جمعیت‌های شش (نمونه‌های ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹ و ۳۰) و هشت (۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰) که هر دو متعلق به استان اصفهان هستند، در فاصله نزدیکی نسبت به هم قرار گرفتند. همچنین جمعیت‌های مربوط به اصفهان و ارومیه (هشت و ۱۵) که از لحاظ جغرافیایی در حدود ۱۰۷۴ کیلومتر با یکدیگر فاصله دارند، از لحاظ ژنتیکی هم در فاصله نسبتاً زیادی از یکدیگر قرار گرفتند که این خود نشان دهنده مناسب بودن نشانگر ملکولی ISSR در تفکیک جمعیت‌های مورد بررسی است. به طور کلی، برخی از ژنوتیپ‌ها به طور کامل به گروه‌های مشخص مطابق با جمعیت‌های مختلف تقسیم نشدند و این ژنوتیپ‌ها به طور مساوی در طول دندروگرام توزیع شدند که توزیع ژنوتیپ‌ها به این صورت، وجود تنوع ژنتیکی زیاد درون توده‌ای را تایید کرد (شکل ۳).

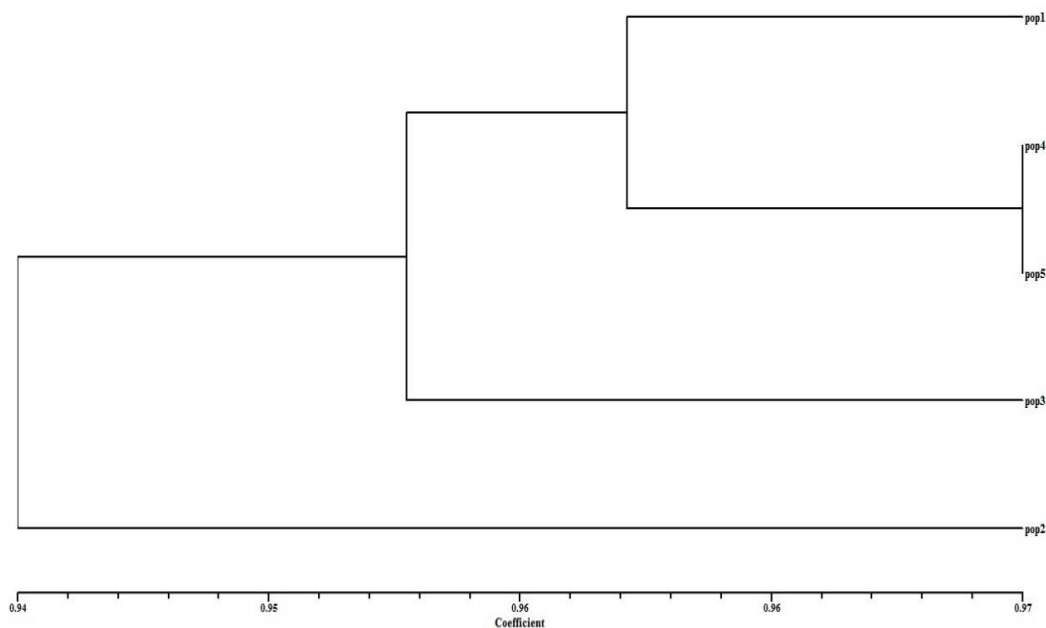
به منظور تعیین ارتباط و فاصله بین گونه‌ها، تجزیه

بررسی نیز گونه دنایی و *T. lancifolius* با ۹۸/۲۵ و ۷۵/۴۴ بیشترین درصد پلی‌مورفیسم و گونه ولگار با ۳۵/۰۹ کمترین درصد پلی‌مورفیسم را داشتند و تنوع درون و بین گونه‌ها، به ترتیب ۹۰ و ۱۰ درصد بود.

مشاهده شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس ملکولی، درصد واریانس ملکولی بین جمعیت‌ها برابر با ۲۷ درصد و واریانس ملکولی درون جمعیتی ۷۳ درصد بود که نشان دهنده تنوع بسیار بالا در درون جمعیت‌های مختلف مورد بررسی است. در بین گونه‌های مورد



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های آویشن، بر اساس الگوریتم UPGMA با روش جاکارد.
Figure 3. UPGMA dendrogram based on Jaccard's similarity coefficient among thyme genotypes.



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر گونه‌های مختلف آویشن، بر اساس الگوریتم UPGMA با روش جاکارد.
Figure 4. UPGMA dendrogram based on Jaccard's similarity coefficient among thyme species.

REFERENCES

- Aga, E., Bekele, E. & Bryngelsson, T. (2005). Inter-simple sequences repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica*, 124, 213–22.
- Agrama, J. & Tuinstra, M. R. (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghuaccessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology*, 2, 334-340.
- Bernath, J. (2002). Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae*, 576, 115-128.
- Bigdeloo, M. (2012). *Evaluation of morphological, genetical and phitochemical of Thymus cermanicus*, MSc Thesis. Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. (1989). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Biological science*, 35(1345), 1291-1298.
- Jamzad, Z. (2009). *Thymus and Satureja species of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. (In Persian).
- Roder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K. & Ganal, M. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 19, 4321–4325.
- Nemeth, K., Furesz, J., Csikor, K., Schweitzer, K. & Lakatos, S. (2002). Luminoldependent chemiluminescence is related to extracellularly released reactive oxygen intermediates in the case of rat neutrophils activated by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. *Haematologia*, 31, 277–285.
- Nickavar, B., Mojab, F. & Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem*, 90, 609–611. (In Persian).
- Omid Baigi, R. (2009). *Product and processing of medicinal plant*. Astan Ghods Razavi Press. Mashhad, Iran. (In Persian).
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006). GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Prasad, M., Varsheny, R. K., Roy, J. K., Balyan, H. S. & Gupta, P. K. (2000). The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 584-592.
- Rahim Malek, M., Bahreininejad, A., Khorrami, M., Ebrahim, B. & Tabatabaei, S. (2009). Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* sub sp. daenensis, an endangered medicinal plant, as revealed by Inter Simple Sequence. *Biochem Genet*, 47, 831–842.
- Sharma, S. (1996). *Applied multivariate techniques*. John Wiley and Sons, Inc.
- Trindade, H., Costa, M. M., Lima, S. B., Pedro, L. G., Barroso, G. & Figueiredo, A. C. (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.
- Vejdani, P. (1997). Importance of methods of conservation of plant genetic resources. In: Proceeding of 4th National Congress on Crop and Plant Breeding Science, Isfahan University, Isfahan, Iran, pp. 544-577.