

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف *Thymus kotschyanus* توسط نشانگرهای RAPD

احمد اسماعیلی^{۱*}، سید محمود ضابطی^۱ و سیده زهرا حسینی^۲
^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

چکیده

آنالیز تنوع ژنتیکی برای فهم فرآیند تکامل و استفاده‌های به نژادی حایز اهمیت فراوان است. پیشرفت‌های اخیر در کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان بررسی افراد یک جمعیت را در تعداد مکان‌های ژنی بیشتری از ژنوم فراهم ساخته است و از نشانگر RAPD به طور موفقیت‌آمیزی در مطالعات مختلف تنوع ژنتیکی و تاکسونومیک استفاده شده است. تنوع ژنتیکی ۱۸ توده *Thymus kotschyanus* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران که در پژوهش حاضر گزارش شده است، توسط ۳۰ آغازگر DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی بررسی شد. تحلیل‌های چندمتغیره شامل تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های حاصل به منظور گروه‌بندی توده‌ها انجام گرفت. در کل، ۳۸۵ باند قابل امتیازدهی از ۲۹ آغازگر به دست آمد که در نتیجه میانگین باند تولیدی توسط هر آغازگر معادل ۱۳/۲۷ بود. همچنین از کل باندهای قابل امتیازدهی، تعداد ۲۹۸ باند (معادل ۷۷/۴۰ درصد) چند شکلی نشان دادند. دندوگرام بر اساس روش خوشه بندی UPGMA ترسیم گردید و چهار گروه اصلی به دست آمد. نتایج به دست آمده از گروه‌بندی با دو روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای نشان داد که در بیشتر موارد گروه‌بندی ارایه شده توسط دو روش مزبور با یکدیگر هماهنگ بوده، گروه‌بندی یکسانی بین توده‌ها ایجاد کرده‌اند. مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی زیادی را در میان توده‌های مطالعه شده نشان داد. نتایج نشان داد که نشانگر RAPD برای مطالعات تنوع ژنتیکی در *T. kotschyanus* مفید است، همچنین این نشانگر توانست تفاوت‌های جغرافیایی را نیز نمایان سازد.

واژه‌های کلیدی: *Thymus kotschyanus*، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

ارزش دارویی است که در مناطق کوهستانی می‌روید. هر چند این گیاه در سرتاسر دنیا یافت می‌شود، اما بیشترین تراکم را در نواحی مدیترانه دارد. در بین تمام

آویشن با نام علمی *Thymus kotschyanus* Boiss. Hohen. & از تیره نعنائیان (Lamiaceae) گیاهی با

RAPD به راحتی چندشکلی مناسب را با مقدار اندکی از DNA نشان می‌دهد (Talebi Bedaf *et al.*, 2011) و می‌تواند در آنالیز تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌ها استفاده شود. این نشانگر در آنالیز روابط بین نژادهای متعلق به جنس‌های مشابه و تنوع ژنتیکی در تعدادی از گیاهان، به ویژه گیاهان دارویی استفاده شده است (Lanying *et al.*, 2009). اگرچه نشانگر RAPD طبیعتاً غالب است اما راهکارهای مختلفی برای کم کردن اثر غالبیت بر آنالیز تنوع ژنتیکی وجود دارد (Stewart and Lynch and Milligan, 1994)؛ Excoffier, 1996). نشانگر RAPD تکرارپذیری اندکی دارد که این مشکل را نیز می‌توان با بهینه کردن شرایط واکنش تاحدودی برطرف کرد (Weising *et al.*, 1995؛ Szmidi *et al.*, 1996). آنالیز RAPD نیازمند تنها مقدار اندکی از DNA ژنومیک است و می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را تولید کند که این موضوع می‌تواند آنالیز تنوع در گیاهان را راحت‌تر کند (Arya *et al.*, 2011) و اطلاعاتی را فراهم کند که تمایز گونه‌ها و روابط فیلوژنتیک در سطح مولکولی را بتوان تشخیص داد. استفاده از چنین روش‌هایی برای توصیف ژرم پلاسما می‌تواند محافظت و کاربرد منابع ژنتیکی گیاهی را تسهیل کند.

پژوهش‌هایی پیرامون اسانس گونه *T. kotschyanus* انجام گرفته است و از آن به عنوان یک نشانگر مورفولوژیکی استفاده شده است (Amiri, 2012؛ Mehrpur *et al.*, 2004). در پژوهشی دیگر اسانس چند جمعیت از گونه *T. kotschyanus* که در شرایط مختلف گلخانه و مزرعه کشت شده بودند آزمایش شد که ترکیبات عمده موجود در اسانس آن شامل: تیمول، کارواکرول و پاراسایمن بود

آویشن‌های موجود در ایران، این گونه بیشترین پراکندگی را دارد (Jamshidi *et al.*, 2006). در ارتفاعات جنوبی البرز در منطقه طالقان با افزایش ارتفاع، جمعیت و تراکم این گونه آویشن افزایش می‌یابد، به حدی که در ارتفاع ۲۸۰۰ متری گیاه غالب است (Habibi *et al.*, 2006). این گونه گیاهی پایا با بوته‌های کوچک در ریشه چوبی، پُر شاخه و منشعب است (Mehrpur *et al.*, 2004). بهترین دما برای جوانه‌زنی این گیاه محدوده ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است (Bannayan *et al.*, 2006).

مهم‌ترین مسأله در اصلاح گیاهان دارویی، به دست آوردن گیاهی با متابولیت‌های ثانویه مورد نظر است و از آنجا که تفاوت‌های فیتوشیمیایی به طور مستقیم یا غیر مستقیم با تنوع ژنتیکی پیوستگی دارد (Arya *et al.*, 2011)، بنابراین، آنالیز تنوع ژنتیکی می‌تواند مبنای گزینش‌های بعدی باشد. گیاه آویشن را می‌توان به راحتی از طریق روش‌های اصلاحی متداول از جمله انتخاب، اصلاح نمود که این امر به دلیل تنوع ژنتیکی وسیع و هیبریداسیون موفق بین گونه‌های مختلف این گیاه است (Ismaili *et al.*, 2013). نشانگرهای DNA بر پایه انگشت‌نگاری می‌تواند گونه‌ها را با میزان کمی از DNA تمیز دهد و بنابراین می‌تواند در استنباط صحیح از روابط فیلوژنتیکی بین آنها کمک کند.

راهکارهای مختلفی برای انگشت‌نگاری DNA نظیر: چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)، توالی تکراری ساده (Simple Sequence Repeat; SSR) و چندشکلی DNA تکثیر یافته تصادفی (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) در دسترس است (Lanying *et al.*, 2009). نشانگر

(به ویژه نشانگرهای تصادفی RAPD) روی آن انجام نشده است، بنابراین در مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی توده‌های مختلف *T. kotschyanus* با استفاده از نشانگر تصادفی محاسبه و روابط ژنتیکی آنها بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۸ جمعیت از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور واقع در کرج جمع آوری شد. این نمونه‌ها از شش استان مختلف بودند و به صورت کدهای C1 تا C18 نام‌گذاری شدند. کدهای C1، C2، C9 و C11 مربوط به استان قزوین، کدهای C5، C7، C15 و C18 مربوط به استان آذربایجان غربی، کدهای C3، C4، C6 و C13 مربوط به استان زنجان، کدهای C8، C10 و C17 مربوط به استان کردستان، کد C14 مربوط به تهران و کد C16 متعلق به استان کرمان و کد C12 با مکان جمع آوری نامعلوم است (شکل ۱).

DNA ژنومیک از برگ‌های پودر شده در ازت مایع با روش Khanuja و همکاران (۱۹۹۹) با اندکی تغییر انجام گرفت. سپس RNase به آن اضافه شد و روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. در تحقیق حاضر، ۳۰ آغازگر RAPD که در مطالعات قبلی Dababneh, (2007؛ Trindade et al., 2008؛ Sunar et al., 2009) روی گیاه آویشن چندشکلی بالایی نشان داده بودند، انتخاب شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر بر اساس روش Williams و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد. شرایط تکثیر PCR برای RAPD شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت یک دقیقه،

(Mehrpur et al., 2004). در تحقیقی دیگر میزان محتوای اسانس‌های سه گونه *T. daenensis*، *T. kotschyanus* و *T. eriocalyx* بررسی شد و مقادیر مختلفی از اسانس در این سه گونه یافت شد که این تنوع می‌تواند به چندین علت از جمله آب و هوا و ژنوتیپ نمونه‌ها باشد (Amiri, 2012). برای بالا بردن تنوع ژنتیکی و شناسایی والدین هیبریدهای درون گونه‌ای، مطالعه‌ای در مورد تنوع پلوئیدی سه جمعیت از گونه *T. kotschyanus* که در شمال و شمال غرب ایران رشد یافته بودند انجام شد؛ در این تحقیق نمونه‌هایی با تعداد کروموزوم برابر و دامنه تغییرات طول کروموزوم یکسان برای ایجاد هیبرید معرفی شد (Mehrpur et al., 2002). همچنین، بررسی تنوع کاریوتیپی سه گونه: *T. kotschyanus*، *T. daenensis* و *T. vulgaris* بررسی شده است که نتایج آن نشان داد که گونه *T. kotschyanus* دارای دو سطح پلوئیدی $2x$ و $4x$ است (Javadi et al., 2009). در تحقیقی دیگر، تنوع سیتوژنتیکی بین ۱۶ توده مختلف از *T. daenensis* و *T. kotschyanus* تحلیل شد که تمام نمونه‌هایی که از لحاظ کاریوتیپی کمترین تفاوت را داشتند در یک خوشه قرار گرفتند (Ziaei Nasab et al., 2012).

در گونه *T. kotschyanus* تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مولکولی نیز بررسی شده است که از آن جمله تحقیقی است که در آن تنوع ژنتیکی گونه *T. kotschyanus* به همراه ۱۴ گونه دیگر آویشن مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج نشان داد که این گونه تشابه ژنتیکی بیشتری با گونه *T. brachychilus* دارد (Sunar et al., 2009).

با توجه به پراکندگی وسیع این گیاه در ایران متأسفانه تاکنون تحقیقات بر پایه نشانگرهای مولکولی

سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در انتها، محصولات PCR برای مشاهده روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

اتصال آغازگر در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه بود و در پایان چرخه‌ها بسط نهایی در ۷۲ درجه



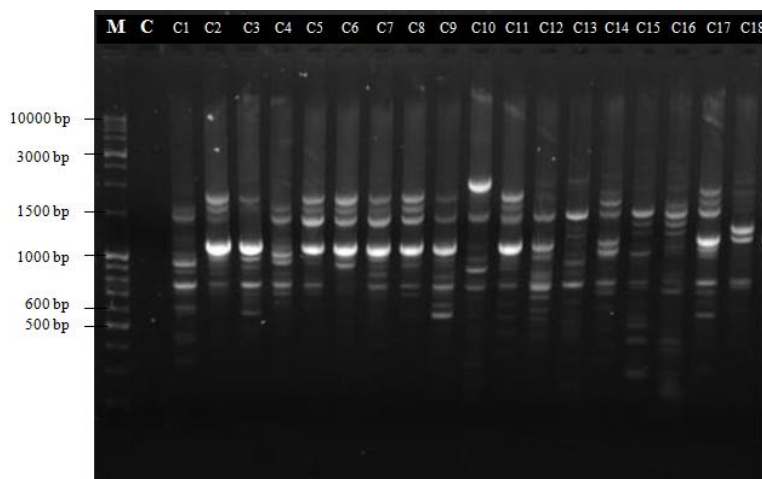
شکل ۱- مکان‌های جمع‌آوری ۱۸ جمعیت آویشن در ایران

جدول ۱- آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی برای نشانگر RAPD

ردیف	کد مشخصه آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	ردیف	کد مشخصه آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')
۱	A05	AGGGGTCTTG	۱۶	E19	ACGGCGTATG
۲	A10	GTGATCGCAG	۱۷	E20	AACGGTGACC
۳	B04	GGACTGGAGT	۱۸	OPA-2	TGCCGAGCTG
۴	B06	TGCTCTGCCC	۱۹	OPA-13	CAGCACCCAC
۵	B06*	GTCCACACGG	۲۰	OPB-1	GTTTCGCTCC
۶	B11	GTAGACCCGT	۲۱	OPB-5	TGCGCCCTTC
۷	B15	GGAGGGTGTT	۲۲	OPB-7	GGTGACGCAG
۸	D03	GTCGCCGTCA	۲۳	OPB-8	GTCCACACGG
۹	D05	TGAGCGGACA	۲۴	OPB-10	CTGCTGGGAC
۱۰	D10	GGTCTACACC	۲۵	OPH-16	TCTCAGCTGG
۱۱	D13	GGGGTGACGA	۲۶	OPH-17	CACTCTCCTC
۱۲	D15	CATCCGTGCT	۲۷	OPH-18	GAATCGGCCA
۱۳	E02	GGTGCGGGAA	۲۸	OPI13	CTGGGGCTGA
۱۴	E16	GGTGACTGTG	۲۹	OPY-7	AGAGCCGTCA
۱۵	E18	GGACTGCAGA	۳۰	OPZ-10	CCGACAAACC

روش UPGMA با واحد SAHN توسط نرم‌افزار Darwin ترسیم گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی بر اساس فرمول Anderson و همکاران (۱۹۹۳) و شاخص نشانگر بر اساس فرمول Powell و همکاران (۱۹۹۶) محاسبه گردید.

باندهای RAPD بر اساس حضور (۱) یا عدم حضور (۰) امتیازدهی شدند و هر باند به عنوان یک جایگاه ژنی در نظر گرفته شد (شکل ۲). محاسبات با نرم‌افزارهای NTSys PC نسخه ۲/۰۲ (Rohlf, 1998) و Darwin نسخه ۵/۰/۱۴۶ انجام شد. دندروگرام با



شکل ۲- محصول آغازگر b06 روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. M: نشانگر اندازه مخلوط ۱kb و ۱۰۰bp؛ C: شاهد منفی؛ شماره‌ها بیانگر توده‌ها است.

میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر B06 (۷/۴۸) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر OPY18 (۰/۸) بود. این شاخص نشان داد که آغازگر B06 نسبت به سایر آغازگرها پتانسیل بالاتری در تولید باند بیشتر دارد (Powell *et al.*, 1996؛ Anderson *et al.*, 1993).

دندوگرام توسط نرم‌افزار داروین با ۱۰۰ بار نمونه‌برداری راه‌انداز (bootstrap samples) برای تعیین کارایی روش‌های مورد استفاده، ترسیم شد (شکل ۳) و توده‌ها را به چهار گروه اصلی تقسیم نمود. گروه یک شامل ۸ توده C1، C2، C9، C10، C12، C13، C14 و C17؛ گروه دو شامل تک توده C16؛ گروه سه شامل هفت توده C3، C4، C5، C6، C7، C8 و C11 و گروه چهارم شامل دو توده C15 و C18 است. بررسی روابط ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از آزمون تجزیه به مؤلفه‌های

نتایج

از ۳۰ آغازگر استفاده شده، ۲۹ آغازگر چندشکلی قابل توجهی نشان دادند. این ۲۹ آغازگر از ۸ تا ۲۰ قطعه را تولید کردند. تعداد باندهای چندشکل از ۴ تا ۲۰ عدد باند متغیر بود و محدوده درصد چندشکلی از ۵۰ درصد (آغازگرهای d13، opb10 و opy18) تا ۱۰۰ درصد (آغازگرهای opa2، d05، b06 و opb5 و opz10) محاسبه گردید (جدول ۲). میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها برابر با ۰/۳۲ برآورد شد که بین ۰/۱۷ (آغازگر E16) و ۰/۴۵ (آغازگر B11) قرار دارد. بنابراین، آغازگر B11 بهتر از سایر آغازگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده نشان داد که بیشترین

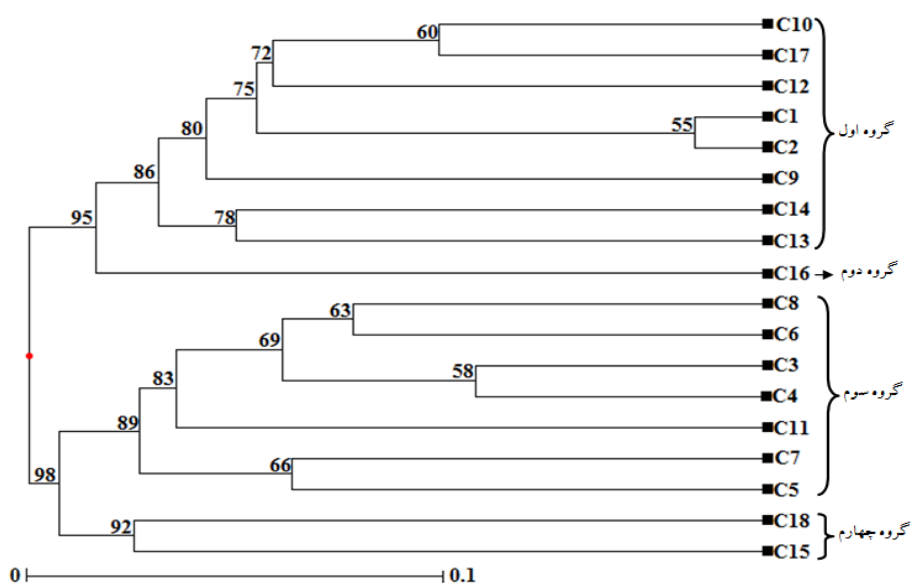
هر آغازگر در جدول ۳ آورده شده است. چهار مؤلفه اول در کل ۵۳/۵۸ درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند، که سهم مؤلفه اول ۱۹/۴۱ درصد و سهم سه مؤلفه بعدی به ترتیب ۱۳/۸۶ درصد، ۱۱/۰۸ درصد و ۹/۲۳ درصد بود.

اصلی انجام شد (شکل ۴). با استفاده از این فضای مختصاتی می توان موقعیت توده ها را نسبت به یکدیگر شناسایی کرد.

نتایج تجزیه مؤلفه های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار توسط چهار مؤلفه اول برای

جدول ۲- مشخصات چندشکلی آغازگرهای استفاده شده

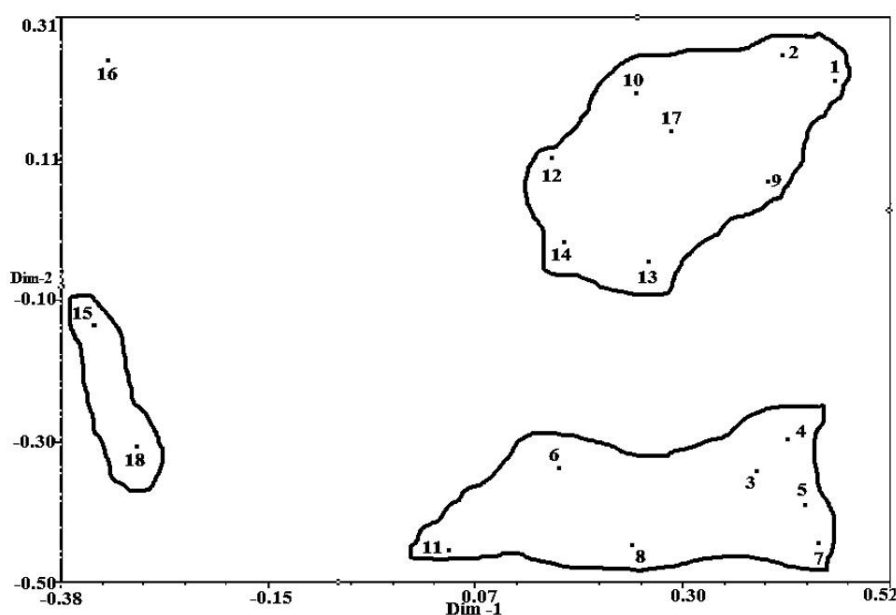
ردیف	نام آغازگر	میزان اطلاعات چندشکلی	درصد چندشکلی	شاخص نشانگر	ردیف	نام آغازگر	میزان اطلاعات چندشکلی	درصد چندشکلی	شاخص نشانگر
۱	Bo4	۰/۲۳	۸۳	۳/۴۳	۱۶	OPA2	۰/۳۵	۱۰۰	۴/۲۰
۲	B06*	۰/۳۷	۸۳	۵/۵۲	۱۷	OPA8	۰/۲۶	۹۰	۲/۵۷
۳	B06	۰/۴۴	۱۰۰	۷/۴۸	۱۸	OPA13	۰/۲۲	۷۰	۱/۵۴
۴	B11	۰/۴۵	۶۹	۴/۰۳	۱۹	OPB1	۰/۲۷	۶۶	۲/۶۷
۵	B15	۰/۳۴	۸۳	۵/۳۶	۲۰	OPB5	۰/۳۶	۱۰۰	۵/۷۶
۶	D03	۰/۳۶	۵۲	۳/۱۸	۲۱	OPB7	۰/۳۱	۹۰	۲/۷۹
۷	D05	۰/۳۱	۱۰۰	۶/۲۰	۲۲	OPB10	۰/۲۹	۵۰	۲/۰۳
۸	D10	۰/۳۰	۶۶	۱/۷۸	۲۳	OPH16	۰/۳۴	۸۸	۵/۳۸
۹	D13	۰/۴۳	۵۰	۱/۷۲	۲۴	OPH17	۰/۴۰	۸۰	۴/۸
۱۰	D15	۰/۲۹	۸۱	۲/۵۸	۲۵	OPH18	۰/۳۴	۶۰	۲/۰۴
۱۱	E02	۰/۳۸	۸۱	۳/۳۸	۲۶	OPI13	۰/۴۰	۸۱	۳/۵۶
۱۲	E16	۰/۱۷	۶۰	۱/۰۲	۲۷	OPY7	۰/۴۰	۵۰	۲/۴
۱۳	E18	۰/۲۷	۶۶	۲/۱۳	۲۸	OPY18	۰/۲۲	۵۰	۰/۸۸
۱۴	E19	۰/۲۹	۷۸	۳/۱۶	۲۹	OPZ10	۰/۳۷	۱۰۰	۵/۹۲
۱۵	E20	۰/۲۶	۵۸	۱/۸۰					



شکل ۳- دندوگرام UPGMA، ۱۸ توده *T. kotschyanus* بر اساس ۲۹ آغازگر RAPD. اعداد روی شاخه ها (بوت استرپ) با ۱۰۰ تکرار هستند.

جدول ۳- تجزیه مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و واریانس مورد انتظار

مؤلفه اصلی	مقادیر ویژه	واریانس مورد انتظار
اول	۱/۶۲	۱۹/۴۱
دوم	۰/۹۷	۱۳/۸۶
سوم	۰/۹۵	۱۱/۰۸
چهارم	۰/۹۳	۹/۲۳
سهم تجمعی	-----	۵۳/۵۸

شکل ۴- نمودار دو بعدی مربوط پراکنندگی توده‌های *T. kotschyanus* با استفاده از آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

بحث و نتیجه‌گیری

روش RAPD، روشی معمول و مناسب برای مطالعات ژنتیکی است. همچنین یک فرآیند آسان و راحت برای کشف تنوع ژنتیکی کل، درون و بین جمعیت‌ها است. روش RAPD با موفقیت در مطالعات تنوع ژنتیکی و تفاوت‌های رده‌بندی استفاده شده است (Ahmad *et al.*, 2010؛ Vyas *et al.*, 2009). سادگی روش RAPD کاربرد آن را برای بررسی روابط خویشاوندی بین جنس‌ها آسان می‌کند (Demeke *et al.*, 1992؛ Wilikie *et al.*, 1993). یکی از معایب عمده این روش ایجاد باندهایی با مهاجرت یکسان است

که از نظر منشأ ژنومی یکسان نیستند. با وجود این محدودیت، نشانگرهای RAPD دارای مزایای زیادی هستند از جمله این که سرتاسر ژنوم را کاوش می‌کند؛ از این رو، مطالعات فیلوژنتیک فراوانی در سطح گونه انجام گرفته است (Nair *et al.*, 1993؛ Wilikie *et al.*, 1993). در پژوهش حاضر، گونه *T. kotschyanus* درصد بالایی از چندشکلی ژنتیکی (۷۷/۵۷ درصد) را نشان داد که این درصد کمتر از درصدی بود که در تحقیقی بر *T. caespititius* (۹۷ درصد) به دست آمده بود (Trindade *et al.*, 2008). مطالعه حاضر نشان داد که RAPD اطلاعات مفید و کافی در رابطه با آزمون

سردسیر هستند. برای مثال، نمونه های C3 و C4 هر دو از استان زنجان بوده، از طول و عرض جغرافیایی نسبتاً نزدیک جمع آوری شده بودند؛ ارزش بالای بوت استرپ (۸۹ درصد) این شاخه دلیل قابل قبولی در خصوص صحت گروه بندی این نمونه ها بود. گروه چهارم (با ارزش بوت استرپ ۹۲ درصد) دارای دو نمونه بود که هر دو از اطراف شهر ارومیه در استان آذربایجان غربی جمع آوری شده اند، ارتفاع مکان رشد این دو نمونه ۱۴۸۰ و ۱۵۰۰ متر است و دارای اقلیم مشابه است که می تواند دلیلی برای هم گروه شدن این دو توده باشد.

طی مطالعه تنوع ژنتیکی این گونه، تقسیم نمونه ها به چهار گروه که در شکل ۳ نشان داده شده است، احتمال اندکی را برای جریان ژنی در میان توده هایی که از لحاظ جغرافیایی با هم فاصله دارند قایل می شود؛ اما احتمالاً تلاقی ژنتیکی طبیعی و جریان ژنی در بین نمونه های نزدیک به هم رخ داده است. از پژوهش حاضر می توان چنین استنباط کرد که تنوع ژنتیکی بالا بین توده های مجاور به احتمال قوی ناشی از معرفی مصنوعی مواد ژنتیکی توسط بشر بوده است و ناشی از تفاوت های ژنتیکی ژنوم آنها نیست.

نشانگر RAPD، یک نشانگر چند جایگاهی با تکنولوژی سریع و ساده است که به طور موفقیت آمیزی در تعیین تنوع ژنتیکی درون گونه ای چندین گونه گیاهی به کار رفته است (Gupta et al., 2010; Malviya and Yadav, 2010). محاسبه PIC بر اساس این احتمال که دو ژنوتیپ نامربوط تکثیر شده از جمعیت مورد آزمون در گروه های متفاوتی قرار می گیرند، انجام شد. مقادیر PIC درجه چندشکلی نشانگر است که اساساً نسبت افرادی است که برای

تنوع ژنتیکی توده های طبیعی *T. kotschyanus* فراهم می کند. بنابراین، نشانگرهای RAPD ابزاری سودمند در ارزیابی و حفاظت از ژرم پلاسما هستند. تنوع ژنتیکی ارتباط نزدیکی با پراکنش جغرافیایی آنها دارد. گونه هایی با منطقه جغرافیایی وسیع عموماً تنوع ژنتیکی بیشتری نشان می دهند (Wilikie et al., 1993). آنالیز RAPD تنوع ژنتیکی بالایی را در توده های رشد کرده در محیط های مختلف و تنوع کمتری را در توده های رشد کرده در مناطق مشابه نشان داد.

همان طور که در شکل ۳ دیده می شود، نمونه های موجود در خوشه اول (با ارزش بوت استرپ ۸۶ درصد) دارای قرابت های جغرافیایی نیز هستند به طوری که تمام نمونه های این گروه از ارتفاعات ۱۶۰۰ متر به بالا جمع آوری شده اند؛ بیشترین شباهت مربوط به دو نمونه C1 و C2 است که هر دو از مناطقی با اکولوژی یکسان از استان قزوین هستند. مطابقت تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی در بسیاری از مطالعات روی سایر گیاهان گزارش شده است (Botanga et al.; Alpert et al., 1993; Yang et al., 2007; al., 2002). خوشه دوم تنها شامل تک نمونه ای از استان کرمان بود که دور بودن این نمونه از مرکز تنوع گونه *T. kotschyanus* در ایران که عمدتاً در شمال، شمال غرب و غرب است (Javadi et al., 2009) می تواند دلیلی بر جدا افتادن این نمونه باشد، همچنین دگرگشی بالایی که در جنس آویشن گزارش شده است (تا ۸۰ درصد) (Valdeyron et al., 1977) همراه با نزدیکی به مرکز تنوع گیاه آویشن دناپی (Ghasemi Pirbalouti et al., 2011) می تواند دلیلی بر تفاوت های ژنتیکی نشان داده شده در این نمونه باشد. گروه سوم شامل نمونه هایی بود که بیشترین شباهت اکولوژیکی را با هم داشتند و همگی از مناطق

تنوع را توجیه کرده‌اند، مشخص می‌شود که تنوع در سطح وسیعی از ژنوم نمونه‌ها وجود دارد و تنها به یک بخش ژنوم اختصاص ندارد. این موضوع می‌تواند مزیتی برای نشانگر RAPD باشد، زیرا این نشانگر در سرتاسر ژنوم پخش شده است.

شناسایی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی یک پیش شرط برای آنالیز تنوع ژنتیکی کل است. مشاهدات و تفاسیر تحقیق حاضر می‌تواند به عنوان یک تحلیل اکتشافی اولیه جالب توجه باشد. یافته‌های موجود می‌تواند نقطه قوتی برای توسعه دادن حوزه و اندازه مجموعه مناطق پراکنش *T. kotschyanus* جهت دریافت کمیت تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌ها در سطح مولکولی باشد. پژوهش حاضر نخستین گزارش از توصیف ژنوتیپ‌های *T. kotschyanus* موجود در ایران با آغازگرهای تجاری قابل دسترس است. توانایی روش‌های مولکولی بر پایه الگوهای RAPD به منظور تشریح روابط ژنوتیپ‌ها در این تحقیق نشان داده شد.

سپاسگزاری

از مؤسسه جنگل‌ها و مراتع کشور به خاطر در اختیار گذاردن برخی نمونه‌های گیاهی قدردانی می‌شود.

نشانگر هتروزیگوت هستند. شاخص PIC یک مقیاس مناسب از هتروزیگوتی است و مقدار بالای PIC نشان‌دهنده هتروزیگوتی زیاد است که به نوبه خود بیانگر درجه بالای چندشکلی است (Mba and Tohme, 2005). در بررسی حاضر، محدوده مناسب مقادیر PIC به دست آمد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان توده‌های *T. kotschyanus* است. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه مؤلفه‌های اصلی در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی نشان داده است که در حالت ادغام منابع ژرم پلاسمی الگوی تنوع ژنتیکی حالت طبقه‌ای نداشته و استفاده از الگوریتم‌های تجزیه خوشه‌ای دارای محدودیت در گروه‌بندی این مواد ژنتیکی هستند. بنابراین، در چنین مواردی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و سایر روش‌های مرتبط می‌تواند روشی جایگزین برای گروه‌بندی افراد باشند (Mohammadi and Prasanna, 2003). با مقایسه فواصل فضایی در آزمون تجزیه مؤلفه‌های اصلی و فواصل ژنتیکی در روش تجزیه خوشه‌ای، مشاهده شد که هر دو روش، توده‌ها را به طور مشابهی از هم تفکیک کرده‌اند. با توجه به مقادیر جدول ۳ و این که چهار مؤلفه اول تنها ۳۳/۰۵ درصد از

منابع

- Ahmad, G., Kudesia, R. and Srivastava, M. K. (2010) Evaluation of genetic diversity in pea (*Pisum sativum*) using RAPD analysis. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 16: 34-45.
- Alpert, P., Lumaret, R. and Digiusto, F. (1993) Population structure inferred from allozyme analysis in the clonal herb, *Fragaria chiloensis* (Rosaceae). *American Journal Botanic* 80:1002-1006.
- Amiri, H. (2012) Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 10: 1-8.
- Anderson, J. A., Church, J. E., Autrique, S. D., Thanksley, S. and Sorrells, M. E. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Genome* 36(1): 181-188.
- Arya, V., Yadav, S. and Yadav, J. P. (2011) Intra-specific genetic diversity of different accessions of cassia occidentalis by RAPD markers. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 22: 1-8.

- Bannayan, M., Nadjafi, F., Rastgoo M. and Tabrizi, L. (2006) Germination properties of some wild medicinal plants from Iran. *Journal of Seed Technology* 28: 80-86.
- Botanga, C. J., Kling, J. G., Bemer, D. K. and Timko, M. P. (2002) Genetic variability of *striga asiatica* (L.) Kuntz based on AFLP analysis and host parasite interaction. *Euphytica* 128: 375-388.
- Dababneh, B. F. (2007) Antimicrobial activity and genetic diversity of *Thymus* species on pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5(3): 158-162.
- Demeke, T., Adams, R. P. and Chibber, R. (1992) Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA- a case study in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 990-994.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Karimi, A., Yousefi, M., Enteshari, S. and Golparvar, A. R. (2011) Diversity of *Thymus daenensis* Celak in Central and West of Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(4): 319-323.
- Gupta, R., Verma, K., Joshi, D. C., Yadav, D. and Singh, M. (2010) Assessment of genetic relatedness among three varieties of finger millet with variable seed coat color using RAPD and ISSR markers. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 2: 12-24.
- Habibi, H., Mazaheri, D., Majnoon Hosseini, N., Chaechi, M. R., Fakhr-Tabatabaee, M. and Bigdeli, M. (2006) Effect of altitude on essential oil and components in wild thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss.) Taleghan region. *Journal of Pajouhesh and Sazandegi* 73: 2-10 (in Persian).
- Ismaili, A., Mojiri, F. and Hosseini, S. Z. (2013) Use of intron-exonic marker in assessment of genetic diversity of two subspecies of *Thymus daenensis*. *Taxonomy and Biosystematics* 5(16): 41-54 (in Persian).
- Jamshidi, A. M., Aminzadeh, M., Azarnivand, H. and Abedi, M. (2006) Impact on the quantity and quality of high mountain *Thyme* essential oil (case study Damavand region, Lake sub watershed tar). *Journal of Medicinal Plants* 5(18): 17-22 (in Persian).
- Javadi, H., Hesamzadeh Hejazi, S. M. and Babayev, M. S. H. (2009) Karyotypic studies of three *Thymus* (Lamiaceae) species and populations in Iran. *Caryologia* 62(4): 316-325.
- Khanuja, S. P. S., Ajit, K., Darokar, M. P. S. and Sushilk, K. (1999) Rapid isolation of DNA dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.
- Lanying, Z., Yongqing, W. and Zhang, L. (2009) Genetic diversity and relationship of 43 *Rhododendron* sp. based on RAPD analysis. *Botany Research International* 2(1): 1-6.
- Lynch, M. and Milligan, B. G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Malviya, N. and Yadav, D. (2010) RAPD analysis among pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.] cultivars for their genetic diversity. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 1: 29-45.
- Mehrpur, S. H., Mirzaie-Nodoushan, H., Majd, A. and Sefidkon, F. (2002) Karyotypic studies of two *Thymus* species. *Cytologia* 67: 343-346.
- Mehrpur, S. H., Sefidkon, F., Mirzaie-Nodoushan, H. and Majd, A. (2004) Comparison of essential oils of four *Thymus kotschyanus* populations in greenhouse and field cultivation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research* 20(2): 159-169.
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.
- Nair, N. V., Nair, S., Sreenivasan, T. V. and Mohan, M. (1999) Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop*

- Evolution 46: 73-79.
- Powell, W., Machray, G. C. and Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science 1: 215-222.
- Rohlf, F. J. (1998) NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.02e. EXETER Software, Setauket.
- Stewart, C. N. and Excoffier, L. (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon*. Journal of Evolutionary Biology 9: 153-171.
- Sunar, S., Aksakal, O., Yildirim, N., Agar, G., Gulluce, M. and Sahin, F. (2009) Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. Romanian Biotechnological Letters 14(2): 4313-4318.
- Szmidt, A. E. Wang, X. and Liu, M. (1996) Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* L. using haploid tissue analysis. Heredity 76: 412-1120.
- Talebi Bedaf, M., Bahar, M., Sharifnabi, B. and Yamchi, A. (2011) Evaluation of genetic diversity among Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, using ISSR and RAPD markers. Taxonomy and Biosystematics 3(8): 35-44 (in Persian).
- Trindade, H., Costa, M. M., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C. and Barroso, J. G. (2008) Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, SaoJorage and Terceira islands (Azores). Biochemical Systematics and Ecology 36: 190-197.
- Valdeyron, O., Dommee, B. and Vernet, P. H. (1977) Selffertilization in male fertile plants of a gynodioecious species: *Thymus vulgaris* L. Heredity 2: 243-249.
- Vyas, G. K., Sharma, R., Kumar, V., Sharma, T. B. and Khandelwal, V. (2009) Diversity analysis of *Capparis decidua* (Forssk.) Edgew. using biochemical and molecular parameters. Genetic Resources and Crop Evolution 56: 905-911.
- Weising, K., Nybonn, H., Wolff, K. and Meyer, W. (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. SCR Press, Boca Raton.
- Wilikie, S. E., Issac, P. G. and Slater, R. J. (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theoretical and Applied Genetics 87: 668-672.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
- Yang, J., Qian, Z. Q., Liu, Z. L., Li, S., Sun, G. L. and Zhao, G. F. (2007) Genetic diversity and geographical differentiation of *Dipteronia* Olive. (Aceraseae) endemic to China as revealed by AFLP analysis. Biochemical Systematics and Ecology 35: 593-599.
- Ziaei Nasab, M., Hesamzadeh Hejazi, S. M., Bihamta, M. R., Mirza, M. and Naderi-Shahab, M. A. (2012) Assessment of karyotypical variation among 16 populations of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus kotschyanus* Boiss. species in Iran. African Journal of Biotechnology 11(5):1028-1036.
- Mba, C. and Tohme, J. (2005) Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: Methods in enzymology, molecular evolution- producing the biochemical data (Eds. Zimmer, E. A. and Roalson, E. H.) 395: 177-201. Elsevier Academic Press, New York.

Genetic diversity of different accessions of *Thymus kotschyanus* using RAPD marker

Ahmad Ismaili ^{1*}, Seyed Mahmoud Zabeti ¹ and Seyedeh Zahra Hosseini ²

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

² Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

Abstract

Analysis of genetic diversity is a major step for understanding evolution and breeding applications. Recent advances in the application of the polymerase chain reaction make it possible to score individuals at a large number of loci. The RAPD technique has been successfully used in a variety of taxonomic and genetic diversity studies. The genetic diversity of 18 accessions of *Thymus kotschyanus* collected from different districts of Iran has been reported in this study, using 30 random amplified polymorphic DNA primers. Multivariate statistical analyses including principal coordinate analysis (PCOA) and cluster analysis were used to group the accessions. From 29 primers, 385 bands were scored corresponding to an average of 13.27 bands per primer with 298 bands showing polymorphism (77.40%). A dendrogram constructed based on the UPGMA clustering method revealed three major clusters. The obtained results from grouping 18 accessions of *T. kotschyanus* with two studied methods indicated that in the most cases the applied methods produced similar grouping results. This study revealed nearly rich genetic diversity among *T. kotschyanus* accessions from different regions of Iran. The results showed RAPD marker was a useful marker for genetic diversity studies of *T. kotschyanus* and it was indicative of geographica variations.

Key words: *Thymus kotschyanus*, Cluster analysis, Principal Coordinate Analysis, Genetic diversity

* ismaili.a@lu.ac.ir