بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی آویشن با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

ولی اله یوسفی (۱)، عبداله نجفی (۲)، علیرضا زبرجدی (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه رازی کرمانشاه ۲- استادیار، عضو هیئت علمی دانشگاه رازی کرمانشاه

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ١٤ اکوتیپ آویشن دریافت شده از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع و متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی ایران با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد. هفت آغازگر انتخاب شده برای تجزیه، از کل ۸۳ باند ظاهر شده تقریباً ۷۹ باند (۹۵/۱۸٪) چند شکل تولید کردند. بیشترین تعداد باند چند شکل ایجاد شده متعلق به آغازگر UBC-876 با درصد چند شکلی برابر۹۵/۸٪ بود. بر اساس تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد اکوتیپ‌ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند. تجزیه به مولفه‌های اصلی، نتایج تجزیه کلاستر را تائید کرد. کمترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های ١٣٢٠٦ و ٢٧٨١٤ (٠/١٩) و بیشترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های ٢٧٨٠٠ با ٢٧٨١٤ (٠/٨٨) بود .

کلمات کلیدی: آویشن، نشانگرISSR، تجزیه کلاستر، تنوع ژنتیکی، گیاهان دارویی

مقدمه:

آویشن گیاهی خشبی و چندساله از تیره Lamiaceae با نام علمی *Thymus vulgaris* و یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد. آویشن گیاهی آفتاب دوست و مقاوم به خشکی بوده و عموماً گیاهی معطر است که تقریبا در همه جای جهان کاربرد دارویی دارد (۵). از آنجایی که اصلاح نبات بر پایه ایجاد تنوع با گزینش انواع مطلوب تا رسیدن به هدف نهایی استوار است، داشتن تنوع ودامنه وسیعی از ذخایر توارثی در اصلاح نباتات ضروری است (۱). آزمایشات مزرعه‌ای و ارزیابی برخی صفات مثل کیفیت و پایداری عملکرد می‌تواند پرهزینه باشد ولی نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمند در جایگزین کردن مقایسات زیست‌شناختی هستند. استفاده از نشانگرها برای ردیابی مکان‌های ژنی و نواحی ژنومی در گیاهان زراعی در بیشتر برنامه‌های اصلاحی مرسوم شده است (۳).

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۳ نمونه آویشن بومی ایران و ۱ نمونه خارجی مورد مطالعه قرار گرفته است که از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شده‌اند لازم به ذکر است که نمونه‌های بومی ایران از استان‌های اردبیل، آذربایجان‌غربی، یزد، اصفهان، لرستان، کردستان، گیلان و مرکزی جمع‌آوری شده‌اند. به‌دلیل عدم جوانه‌زنی بذور در شرایط مزرعه و گلدان، بعد از کشت بذور در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت MS، در مراحل اولیه رویش گیاه که برگ‌ها جوان و تازه هستند اقدام به نمونه‌برداری از برگ توده‌های مختلف شد. سپس DNA نمونه‌های گیاهی به‌روش مری و تامسون (۱۹۸۰) استخراج گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری وژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شده و غلظت نهایی DNA هر نمونه به 10ng/µl رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس روش ویلیامز و همکاران و با اندکی تغییر انجام شد. جهت بهینه‌سازی مقدار و نسبت اجزای مخلوط واکنش، مخلوط‌ها بر اساس سطوح مختلف $MgCl_2$ و DNA آزمون شدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ µl (10ng/µl) DNA، ١/٤µl کلرید منیزیم۵۰mM، ۲/۵µl آغازگر۱۰µM، ۲/۵ µl PCR (۱۰×)، ۰/٤ µl dNTPs(10mM)، ۱U آنزیم Taq DNA polymerase با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل CORBETT research با شرایط تکثیر زیر صورت گرفت: واسرشت‌سازی اولیه ٩٤°C به مدت ٤ دقیقه، و ٤٠ سیکل واسرشت‌سازی در ٩٢°C به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در ٥٥°C-٤٤ به مدت ٤٠ ثانیه و بسط در۷۲°C به مدت ۹۰ثانیه و بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۷دقیقه. قطعات حاصل برروی ژل آگارز ۱/۲٪ تفکیک و با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. سپس باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیازدهی شده و ماتریس دو طرفه ارقام و متغیرها بر اساس صفر و یک تشکیل شده و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc version 2.02e

انجام گرفت. تجزیه کلاستر و تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت دندروگرام و پلات دو بعدی رسم گردید.

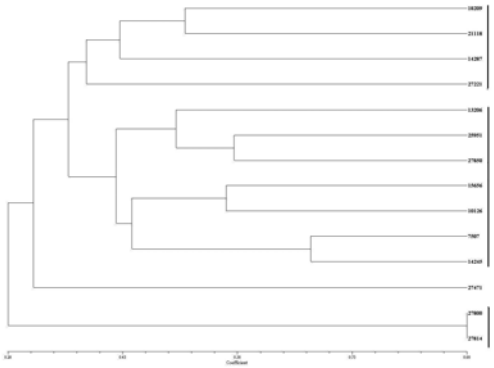
نتایج و بحث:

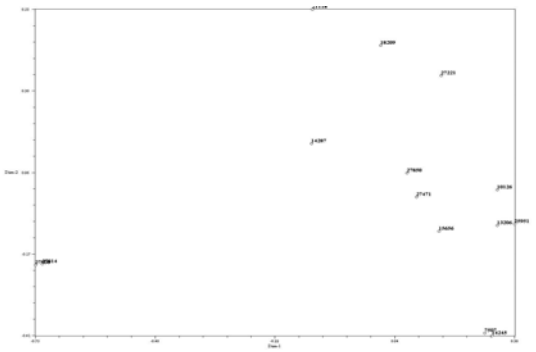
آغازگرهای مورد استفاده، مجموعاً ۸۳ باند در دامنه‌ای بین ۲۰۰ تا ٢٦٠٠bp ظاهر کرده که تقریباً ۷۹ باند (٩٥/١٨٪) چند شکل وجود داشت. بیشترین تعداد باند چند شکل ایجاد شده متعلق به آغازگر UBC-876 با درصد چند شکلی برابر ٩٥/٨٪ بود. بیشترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های ٢٧٨٠٠ با ٢٧٨١٤ (٠/٨٨) و کمترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های ١٣٢٠٦ و ٢٧٨١٤ (٠/١٩) بود لذا اکوتیپ‌های مورد مطالعه از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردارند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و براساس ماتریس تشابه جاکارد انجام شده و محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک ($0/7<r_{coph}=0/712<0/8$) نشان داد الگوریتم UPGMA دارای کارایی بالا در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها بوده و تطابق خوبی با ماتریس تشابه دارد. در نتیجه نشانگر ISSR به عنوان یک روش ارزیابی ساده برای آنالیز تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های آویشن می‌باشد. چند شکلی مشخص شده در میان اکوتیپ‌های آویشن را می‌توان در برنامه‌های اصلاحی برای حداکثر کردن استفاده از منابع ژنتیکی مورد استفاده قرار داد.

جدول۱- اسامی و مشخصات ۷ آغازگر ISSR

نام آغاز گر	توالی '۳-'۵	دمای آغازگر	اتصال	تعداد کل باندها	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی
UBC-822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	۵۵	۸	٦		٪۷۵
UBC-876	GATA GATAGACA GACA	٤٩	٢٤	٢٣		٪٩٥/٨
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۰	۱۰	۱۰		٪۱۰۰
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGTT	۵٤	۱۵	۱۲		٪۸۰
UBC-815	TCTCTCTCTCTCTCTCG	۵۲	۱۱	۱۰		٪٩٠/٩
S3	GAGAGAGAGAGAGAGAT	٤٣	٤	٤		٪۱۰۰
S1	GGGTGGGTG	٤٤	۱۱	۱۱		٪۱۰۰

شکل۱- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد





منابع:

۱) اهدایی،ب. ۱۳۷۳. اصلاح نباتات. نشر دانشگاهی مشهد ٤٥٦ص.
2) Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherchessur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci. Nat: 44:223-270.
3) Lörz, H., Wenzel, G. 2005. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Springer.
4) Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. Volume 8 Number 19 1980.
5)Stahl-Biskup,E. and Sáez,F. 2002. Thyme The genus Thymus. Taylor and Francis Group. 346 Pages

Evaluation of genetic diversity in ecotypes of *Thymus sp.* using ISSR markers

Valiollah Yousefi, Abdollah Najafi, Alireza Zebarjadi

Abstract

We used inter simple sequence repeat (ISSR) markers to detect genetic polymorphism in *Thymus sp.* using 14 accessions belong to different geographic regions in Iran received from gene bank RIFR (Research Institute of Forest and Rangelands). The 7 primers chosen for analysis revealed 83 bands, of which 79 (95.18%) were polymorphic. The most polymorphic primer was UBC-876 with 95.8% polymorphism. Jaccard's similarity indices based on ISSR profiles were subjected to UPGMA cluster analysis. The generated dendrogram revealed 3 major groups. A principal components analysis confirmed the results of clustering. The lowest genetic similarity was observed between 27814 and 13206, with similarity coefficient 0.19. 27800 and 27471 were the most similar accessions genetically, with coefficient 0.88.

Keywords: *Thymus sp.*, ISSR marker, Cluster analysis, Genetic diversity, Medicinal plants