

ارزیابی تنوع ژنتیکی توده های آویشن دنايي، (*Thymus daenensis* subsp) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

مریم ذوقی (۱)، آقافخر میرلوحی (۲)، مهدی رحیم ملک (۲)، بابک بحرینی نژاد (۲)، مجید طالبی (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان ۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

آویشن دنايي گیاهی معطر، دارویی و بومی ایران است. در این پژوهش با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی کشور با ۹ پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۰۴ نوار ایجاد شد و از این تعداد نوار ۹۵ (۹۱٪) نوار چند شکلی نشان دادند. الگوی نواریندی بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به ترتیب با عدد یک و صفر مشخص و داده ها توسط نرم افزار NTSYS (نسخه ۲/۰۲) تجزیه و تحلیل شدند. به منظور ارزیابی تشابه ژنتیکی بین نمونه ها، ضرایب تشابه مختلف مانند دایس، جاکارد و SM محاسبه شدند و سپس آزمون تطابق ماننل با هدف گزینش بهترین ضریب تشابه انجام گرفت. در نهایت دندروگرام بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ترسیم شد. دندوگرام ایجاد شده شامل ۸ گروه که تطابق فراوانی با توزیع جغرافیایی ژنوتیپ ها داشت بود بطوریکه ژنوتیپ های متعلق به یک استان شباهت بیشتری نسبت به یکدیگر داشتند. نتایج این پژوهش نشان می دهد که تنوع ژنتیکی آویشن دنايي در استان هایی که در مرکز زاگرس وجود دارند بیشتر از استان هایی است که در دامنه رشته کوه زاگرس قرار دارند.

واژه های کلیدی: آویشن دنايي، تنوع ژنتیکی، RAPD

مقدمه:

خانواده نعناعیان Lamiaceae یکی از بزرگترین خانواده های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می باشد و دارای حدود ۲۰۰ جنس و دو تا پنج هزار گونه از بوته های معطر و درختچه های کوتاه است (۱). آویشن دنايي با نام علمی *Thymus daenensis* از جمله گیاهان بومی ایران از خانواده نعناع (Lamiaceae) است. اسانس آویشن ماده ای است با نام تیمول به رنگ زرد یا قهوه ای با بوی مطبوع قوی، طعم تند، پایدار و خنک کننده که از تقطیر برگ ها و سر شاخه های گلدار آن استخراج می شود. ژنوتیپ های آویشن در ایران گسترش وسیعی دارند و در دامنه های البرز، دامنه های زاگرس و نواحی جنوبی و غربی ایران می رویند. آویشن دنايي یکی از گونه های بومی ایران می باشد که از اهمیت دارویی بالایی برخوردار است. نظر به اینکه آویشن دنايي فقط در ایران وجود دارد و جمعیت های آن در کشورهای دیگر توسعه نیافته اند، تخریب زیستگاههای آن به دلایل مختلف میتواند باعث حذف یا کوچک شدن جمعیت های طبیعی این گونه در کشور گردد. لذا بررسی جمعیت های کوچک و جمعیت هایی که فاصله ژنتیکی زیاد از یکدیگر دارند، می تواند دیدگاه موثری در حفاظت از ژرم پلاسما این گونه در حال انقراض داشته باشد.

کشف و توسعه نشانگرهای مولکولی و به کارگیری چند شکلی DNA برای تشخیص و ارزیابی تنوع یکی از پیشرفت های بزرگ در ژنتیک مولکولی بوده است. نشانگر مولکولی DNA یا به اختصار RAPD نشانگری مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز یا PCR است که اولین بار توسط ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) ابداع شد (۷). از مزیت های این روش می توان به سهولت استفاده و عدم نیاز به اطلاعات قبلی نسبت به ژنوم را اشاره کرد. این نوع نشانگر غالب بوده و از تکرارپذیری کمی برخوردار است با این وجود به دلیل سهولت و هزینه کم در موجودات مختلف به ویژه در گیاهان به وفور مورد استفاده قرار می گیرد. بیشتر مطالعاتی که روی *T. daenensis* انجام شده است در زمینه روغن و اسانس آن صورت گرفته است. تنها مطالعه مولکولی که بر روی این گیاه صورت گرفته بررسی تنوع ژنتیکی *T. daenensis* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بوده است. در این مطالعه از ۱۵ آغازگر استفاده شده ۲۵۶ نوار چند شکل مشاهده گردید (۴). رحیم ملک و همکاران (۴) تنوع ژنتیکی آویشن دنايي را در ژنوتیپ های متعلق به دو منطقه: در نواحی زاگرس مرکزی (کوه دنا و اطراف آن) و دو حد زاگرس (شمال غربی و جنوب غربی) مورد بررسی قرار دادند. آنها در مطالعه خویش به این نتیجه رسیدند که

تنوع ژنتیکی آویشن دناپی در زاگرس مرکزی بیشتر از دو حد شمال غربی و جنوب غربی می باشد. در این تحقیق با استفاده از جمعیت های بیشتر و استفاده از نشانگرهای چند شکل بیشتر می تواند نتایج مطرح شده در مطالعه قبلی را بهبود بخشید، بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی توده های وحشی آویشن با استفاده از نشانگر RAPD به منظور ارایه راهکارهای حفاظت ژنتیکی در توده های در حال انقراض این گیاه می باشد.

مواد و روش

نمونه های برگ از برگ های جوان ۲۵ نمونه جمعیتی گیاه آویشن دناپی تهیه گردید، پس از نمونه گیری نمونه های برگی به دمای ۸۰- منتقل شده و تا زمان استخراج در این دما نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش موری تامسون (۳) صورت گرفت. در این آزمایش برای تخمین زدن کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ۰/۷٪ استفاده گردید. به دنبال آن واکنش زنجیره ای پلیمرز با تعداد ۹ آغازگر RAPD به صورت زیر انجام شد: ۴ دقیقه شروع باز شدن DNA °C ۹۴ ۴۰ دور (۱ دقیقه تک رشته ای شدن DNA °C ۹۲، ۱ دقیقه اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای °C ۴۰، ۲ دقیقه بسط آغازگر °C ۷۲)، ۵ دقیقه تکمیل بسط °C ۷۲. از طرفی مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمرز به صورت: ۲ μl DNA، از ۸.۷ μl آب دوبار تقطیر، ۰/۷ μl کلرید منیزیم، ۱.۵ μl PCR بافر، ۰/۳ μl dNTPs، ۱.۵ μl آغازگر، ۰/۳ μl آنزیم Taq DNA پلیمرز به منظور تجزیه و تحلیل نتایج نوارهای چند شکل حاصل بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شدند. گروه بندی ژنوتیپ ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPMGA انجام شد.

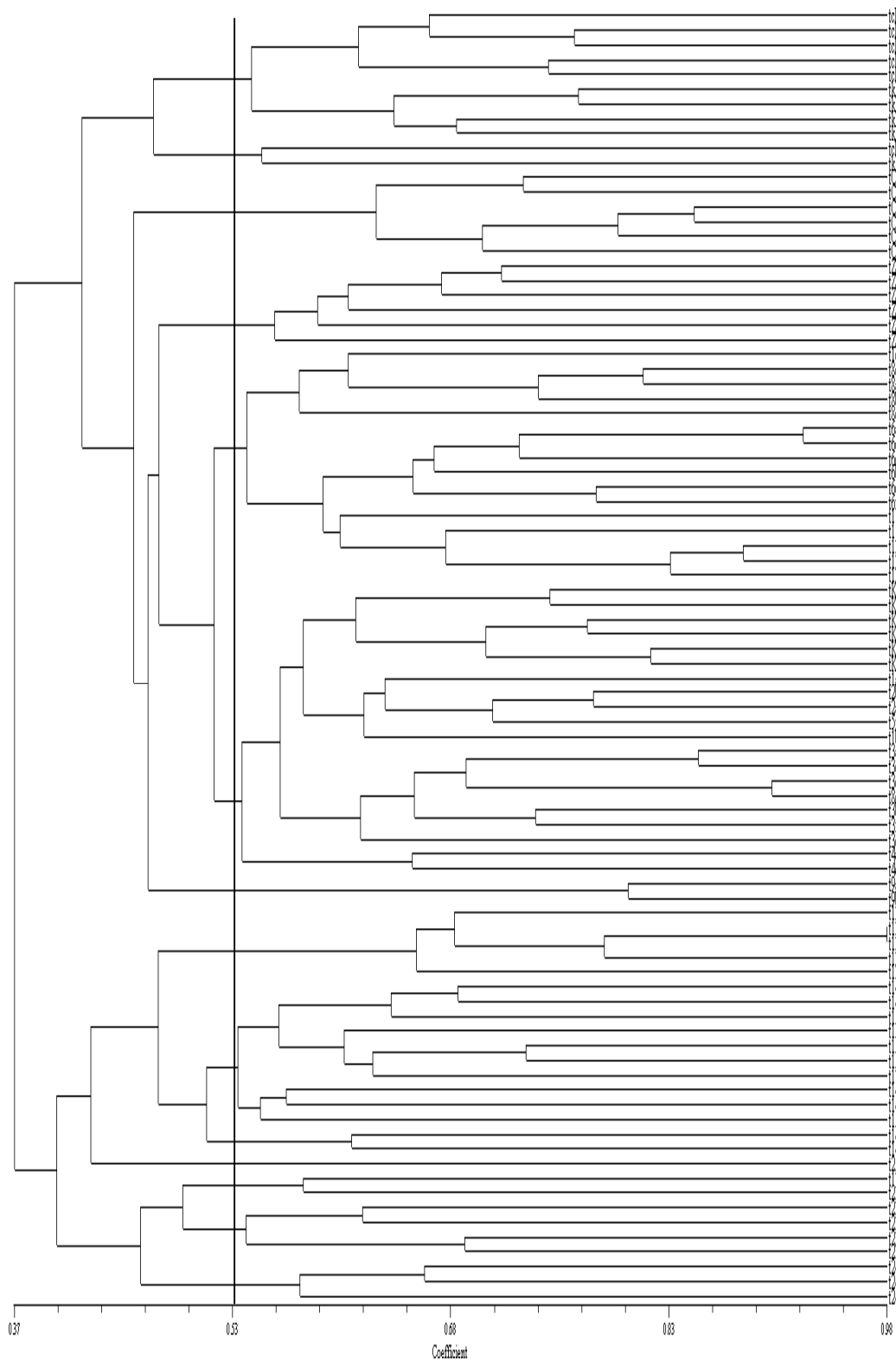
نتایج و بحث

در این پژوهش نمونه های برگ از ۴ استان مختلف تهیه شد به ترتیب اصفهان (خوانسار، قهیز، چادگان، پشتکوه، کهرویه و اورگان)، چهارمحال بختیاری (صمصامی، دوراهان و امام قیس)، لرستان (زاغه، مرادآباد و دروخت)، فارس (مارگون، کمهر و کولیکش). با استفاده از ۹ آغازگر تصادفی RAPD در مجموع ۱۰۴ نوار حاصل شد که از بین آن ۹۵ نوار آن بین نمونه ها چند شکلی نشان دادند. پرایمر CGS-31 با توالی 3'-CAGCACCCA-5' کو پرایمر CGS-23 توالی 5'-CCACCGCCA-3 به ترتیب با تعداد ۱۴ و ۸ نوار دارای بیشترین و کمترین تنوع را دارا بودند. پس از انجام آزمون تطابق مانتل و بررسی ضرایب کوفتیک بیشترین ضریب همبستگی توسط ضریب جاکارد، ۷۵٪ در مقایسه با ضرایب بدست آمد. در این تحقیق ژنوتیپ ها در ۸ گروه جداگانه طبقه بندی شدند، نتایج نشان داد که ژنوتیپ هایی که از شهرهای یک استان جمع آوری شده اند شباهت بیشتری نسبت به یکدیگر دارند و این احتمال می رود که تنوع ژنتیکی گیاه آویشن دناپی در مرکز رشته کوه زاگرس بیشتر از دامنه های کوه زاگرس است. بر اساس نتایج تجزیه به مولفه های اصلی ۳ مولفه اول ۲۲٪ تغییرات را توجیه میکند که نشان دهنده ی پراکندگی نشانگرها در طول ژنوم است. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی نشانگر مناسبی است. با توجه به اینکه برخی از ژنوتیپ ها متعلق به استان های مختلف در یک گروه طبقه بندی شده اند، و همچنین مرز های استانی نمی تواند عاملی برای جدا شدن گونه ها از یکدیگر باشد، لذا این احتمال وجود دارد که نحوه گسترش رشته کوه زاگرس عامل مهمتری در الگوی طبقه بندی نمونه ها باشد.

منابع

1. Akhondzadeh Basti, A. 2002. Iranian Medicinal Plants Encyclopedia. First Ed. Tehran. Arjmand Publication. 64:561-566.

3. Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acid Res* 8:4321-4326
4. Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorami, M., Sayed Tabatabai, BE. 2009. Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subs. *daenensis*, an endangered medicinal Plant, as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Biochem Genet.* 47:831-842
5. Saeidinia, S., Sepehrizade, z. 2009. Determination genetic Relations among four *Salvia* 21.
6. Verna, S., Awtar, k. 2006. Genetic diversity in *Eremostachys supreba* Ryle ex Benth. an endangered Himalyan species as assessed by RAPD. *Biochem Genet.* 54:221-229
7. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and V. Scott . 1990. *DNA Nucleic. Acids. Research.* 22: 6531-6535



Study of genetic variation in populations of *Thymus daenensis* subsp using RAPD marker

M.Zowghi¹, A.F.Mirlohi², M.Rahimmalek², B.Bahreini nejad², M.Talebi²

1.Department of Agronomy and Plant Breeding

2.Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture,
Isfahan University of Technology

Abstract

Thymus daenensis is a medicinal, aromatic plant endemic to Iran. In this study, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to detect genetic polymorphism in 25 *T. daenensis* accessions collected from different geographic regions of Iran. Nine primers used produced 104 bands in which 95 were polymorphic. Banding patterns were transformed into binary data of presence-absence and matrices were processed using NTSYS pc 2.02 software program. Mantel correspondence test was conducted to choose the best similarity coefficient. The dendrogram was constructed using Jaccard coefficient and UPGMA algorithm. A principal coordinate analysis confirmed the results of clustering. The generated dendrogram revealed eight major groups mainly in accordance with geographic distribution of genotypes such that genotypes from one province were genetically more similar to each other than those from other provinces. Accessions collected from central Zagros Mountain showed higher genetic variation than those collected from peripheral provinces.

Key Words: *Thymus daenensis*, Genetic diversity, RAPD