

## بررسی پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی SAMPL و AFLP با ترکیبات اصلی اسانس در گیاه دارویی مرزنجوش *Origanum vulgare*

علی عزیزی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، آزادگان، همدان

مرزنجوش *Origanum vulgare* L. یک گیاه معطر، ادویه ای و دارویی از خانواده نعناع *Lamiaceae* می باشد که به علت دارا بودن خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی، در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوان دارد. امروزه مشخص شده است که استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA مبتنی بر PCR به دلیل متاثر نبودن آنها از شرایط محیط رویش، سن و اندام گیاه، روش مطمئنی جهت مطالعات ژنتیکی و اصلاحی می باشد. در مطالعه پیش رو تعداد چهل و دو مرزنجوش ثبت شده در ژرم پلاسما اروپا واقع در گنرزلین کشور آلمان با استفاده از دو نشانگر مولکولی AFLP و SAMPL مورد بررسی قرار گرفت. تعداد سه آغازگر برای هر کدام از این نشانگرها جهت پیمایش ژنوم انتخاب شد. همچنین اسانس تمام گیاهان استخراج و مورد آنالیز قرار گرفت. در مجموع ۴۷۷ باند چندشکل شامل AFLP ۲۱۴ و SAMPL ۲۶۳ یافت شد. با استفاده از آنالیز GC-MS اسانسها مجموعاً ۱۸ ماده اصلی شناسایی شد که در اکثر اسانسها کارواکرول و تیمول مواد غالب اسانس بودند. به منظور بررسی وجود پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ترکیبات اصلی اسانس از نرم افزار TASSEL با ۵ مدل آماری رگرسیون (۳ مدل خطی عمومی و ۲ مدل خطی ترکیبی) استفاده شد. نتایج نشان داد که از میان تمام ۴۷۷ نشانگر مولکولی بررسی شده AFLP ۳ و SAMPL ۴ با کارواکرول و تیمول موجود در اسانس مرزنجوش پیوستگی دارند. یافته های این پژوهش می تواند در اصلاح به روش انتخاب هدایت شده با مارکرهای مولکولی برای گیاهان دارویی خانواده نعناع کاربرد داشته باشد.

کلمات کلیدی: پیوستگی، مرزنجوش، نشانگر مولکولی، اسانس، SAMPL، AFLP

مقدمه

مرزنجوش *Origanum vulgare* L. از خانواده *Lamiaceae* از جمله معروفترین گیاهان ادویه ای در سراسر دنیا است که به علت داشتن اسانس و ترکیبات دارویی در صنایع مختلف کاربرد فراوانی دارد (Skoula and Harborne 2002). این گیاه در سراسر اروپا، شمال آفریقا و غرب آسیا پراکنش دارد (Kokkini 1997). در میان اهداف به نژادی از دیدگاه دارویی در گیاه مرزنجوش، بالا بردن بازده محصول اسانس و افزودن درصد مونوترپن های کارواکرول و تیمول، همواره مورد توجه اصلاحگران این گیاه بوده است (Franz and Novak 2002). یکی از استراتژی های مهم در برنامه های اصلاحی، شناسایی نشانگرهای مولکولی در گیاه هدف است به طوریکه این نشانگرها با صفات مهم اقتصادی پیوستگی داشته باشند و ما را در انتخاب گیاهان برتر یاری دهند (Moose and Mumm 2008). هدف از پژوهش پیش رو، یافتن هرگونه پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی AFLP و SAMPL و ترکیبات اسانس گیاه مرزنجوش بود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۳۹ جمعیت ثبت شده در ژرم پلاسما مرزنجوش در اروپا به همراه ۳ وارسته *Heracleoticum*، *Creticum* و *Samothrake* بود. جهت آنالیز ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی از سه آغازگر برای هر کدام از نشانگرهای AFLP و SAMPL استفاده شد (جدول ۱). جهت استخراج اسانس، روش تقطیر چرخشی با کلونجر انجام شد و برای گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنج جرمی، تزریق به دستگاه Varian 3900 صورت گرفت. به منظور بررسی پیوستگی های ژنتیکی از نرم افزار TASSEL, v 3.0 و ۵ مدل آماری رگرسیون استفاده شد (جدول ۲)

جدول ۱- ترکیبات پرایمری AFLP and SAMPL به همراه مجموع باند (n) تولید شده و تعداد باند های چند شکل (np)

	Primer combination	n	np
AFLP-1	E-CAT × M-CAT	103	77
AFLP-2	E-ATG × M-CCG	76	65
AFLP-3	E-CAG × M-CTC	106	72
SAMPL-1	G(TG)4(AG)4A × M-ACG	99	92
SAMPL-2	G(TG)4(AG)4A × M-GTG	92	89
SAMPL-3	C(AC)4(AG)4A × M-CAG	96	82
Total		572	477

جدول ۲- مدل های آماری استفاده شده جهت آنالیز پیوستگی نشانگرهای مولکولی AFLP و SAMPL و ترکیبات اسانس

Model	Data sets
1- GLM	(Chemotype) + (AFLP, SAMPL)
2- GLM	(Chemotype) + (AFLP, SAMPL) + (Covariates: PC <sub>1-3</sub> )
3- GLM	(Chemotype) + (AFLP, SAMPL) + (Covariates: Q <sub>1-5</sub> )
4- MLM	(Chemotype) + (AFLP, SAMPL) + (K)
5- MLM	(Chemotype) + (AFLP, SAMPL) + (K) + (Covariates: Q <sub>1-5</sub> )

GLM general linear model, MLM mixed linear model, PC principal components,

'Q' (population structure that results from the existence of subpopulations)

'K', Kinship matrix (general similarity in genetic background arising from shared kinship).

#### نتایج و بحث

با استفاده از شش آغازگر به کار رفته جهت پیمایش ژنوم مرزنجوش، در مجموع ۵۷۲ باند روی ژلهای اکرلامیدی قابل نمره دادن ارزیابی شد که از میان آنها ۴۷۷ باند چندشکل (پلی مورف) شامل AFLP ۲۱۴ و SAMPL ۲۶۳ یافت شد (جدول ۱). همچنین نتایج آنالیز شیمیایی نشان داد که در اسانس تمامی جمعیت ها ۱۸ ترکیب به عنوان ترکیبات اصلی (ترکیباتی که هر کدام بیشتر از ۵ درصد وزن اسانس را تشکیل میدهند) قابل شناسایی می باشند که مهمترین این ترکیبات تیمول (۶۵٪-۲۳) و کارواکرول (۴۳-۸۵٪) هستند. نتایج آنالیز پیوستگی نشان داد که کارواکرول با دو نشانگر AFLP و تیمول با دو نشانگر AFLP و چهار نشانگر SAMPL پیوستگی ضعیف تا متوسط دارند (جدول ۳) که در میان این نشانگرها، SAMPL-3\_60 پیوستگی قابل ملاحظه ای با درصد تیمول در اسانس دارد که می تواند جهت مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد. نشانگر SAMPL-3\_60 در همه پنج مدل آماری به کار رفته پیوستگی معنی داری با واریانس فنوتیپی صفت درصد تیمول در اسانس نشان داد (جدول ۳) بنابراین پیشنهاد میشود این نشانگر در برنامه های اصلاحی گیاهان دارویی خانواده نعناع جهت پیشبرد روشهای هوشمند و استراتژی های انتخاب هدایت شده با نشانگر (marker assisted selection: MAS) مورد استفاده آزمایشی قرار گیرد.

جدول ۳- R<sup>2</sup> بخشی از واریانس فنوتیپی دو صفت درصد کارواکرول و درصد تیمول اسانس که با نشانگرها قابل توجیه هستند

Locus	CAC					THC				
AFLP-2_31	0,13	0,1	0,08	0,09	0,03					
AFLP-2_44	—	0,15	0,1	0,09	0,02	—	0,17	0,17	0,13	0,03
AFLP-3_6						0,19	0,12	—	0,1	0,1
SAMPL-3_43						0,15	0,16	0,14	0,1	0,07
SAMPL-3_49						0,1	0,16	0,12	0,08	0,05
SAMPL-3_55						0,18	0,14	0,13	0,08	0,07
SAMPL-3_60						0,23	0,19	0,19	0,17	0,09

The R<sup>2</sup> values ,, the significance of marker at P < 0.01

DF drug fraction, EOY essential oil yield, CAC carvacrol content THC thymol content

#### منابع مورد استفاده

Kokkini S (1997) Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In: Padulosi S, (ed.) *Oregano*, 14. Proceedings of the IPGRI International Workshop. Italy, Rome, pp 2–1

Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiol* 147: 969–977

Skoula M, Harborne JB (2002) Taxonomy and chemistry. In: Kintzios SE (ed.) *Oregano: The Genera Origanum and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, Volume 25*, Taylor & Francis CRC Press, USA, pp. 67–108

Franz C, Novak J (2002) Breeding of *Oregano*. In: Kintzios SE (ed.) *Oregano: The Genera Origanum and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles 25*. Taylor & Francis/CRC Press, USA, pp 163–175