

## مقایسه نشانگرهای ایترونی و اگزونی در ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن کرک‌آلود (*Thymus pubescens*)

فرزانه مجیری<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۱\*</sup>، فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۱</sup> و رضا مومنی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

<sup>۲</sup> زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه آمار

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۵

### چکیده

آویشن کرک‌آلود (*Thymus pubescens*) یکی از گیاهان دارویی خانواده نعناعیان است. با توجه به مشکلات اصلاحی گیاهان دارویی، استفاده از نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی آنها ابزار قدرتمندی محسوب می‌شود. در این تحقیق جهت تعیین تنوع ژنتیکی آویشنهای کرک‌آلود از ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی از دو گروه آغازگرهای ایترونی و اگزونی استفاده شد. پس از مشاهده محصولهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز و امتیازدهی باندهای DNA، تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار DARwin5 انجام شد. کل آغازگرها ۹۶ درصد چندشکلی نشان داد. بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر در آغازگرهای ایترونی و اگزونی را به ترتیب آغازگرهای IT<sub>18-1</sub> و ET<sub>12-27</sub> تشکیل دادند. در هر دو گروه آغازگرها بیشترین شباهت ژنتیکی را دو توده با منشأ جغرافیایی یکسان تشکیل دادند و گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با گروه‌بندی تجزیه مؤلفه‌های اصلی همخوانی داشت. نتایج نشان داد که آغازگرهای ایترونی بهتر از آغازگرهای اگزونی توانسته توده‌های آویشن کرک‌آلود را از هم تفکیک کنند.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن کرک‌آلود، تنوع ژنتیکی، اگزون، ایترون، چندشکلی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۶۰۵۴۶۱۱، پست الکترونیکی: ahmad\_ismaili@yahoo.com

### مقدمه

آویشن کرک‌آلود با نام علمی *Thymus pubescens* Bioss. & kotschy ex Celak یکی از گونه‌های این جنس است. زمان گلدهی آن بهار و تابستان، رویشگاه آن دامنه‌های کوهستانی، شکاف سنگها در ارتفاعات منطقه خزری و ایرانی تورانی در ارتفاع ۶۹۵ تا ۳۶۰۰ متر است (۴). این گونه از نظر دامنه پراکنش در شمال عراق و نواحی مرکزی، غربی و شمال غربی ایران پراکنش دارد (۲۴).

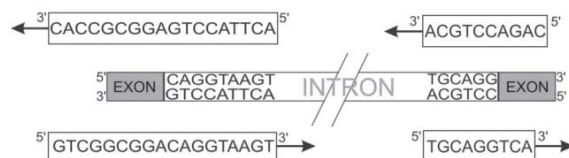
کارایی یک برنامه اصلاحی انتخابی به وسعت تنوع ژنتیکی و قابلیت توارث یک صفت بستگی دارد (۱۲). از آنجا که مبنای همه گزینشها وجود تنوع ژنتیکی است، بنابراین با افزایش تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، حدود انتخاب چه

آویشن (*Thymus spp.*) یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی و از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که به عنوان یک گیاه معطر و دارویی در کشاورزی و اقتصاد مطرح می‌باشد. این گیاه به صورت بومی در مناطق گسترده‌ای از ایران به ویژه در مناطق غربی و شمالی رویش دارد. از نظر رده‌بندی جنس آویشن پیچیده بوده و طبقه‌بندی آن مشکل است که علت این موضوع را می‌توان به فراوانی گونه‌ها و عدم ناسازگاری ژنتیکی بین گونه‌ها نسبت داد. سطوح پلوئیدی متفاوتی حتی در بین گونه‌های مشابه آویشن دیده شده که نمایانگر پلی‌پلوئیدی فراوان در این جنس است (۱۸).

کدکننده (اگزون) و یا غیرکدکننده (اینترون) ژنوم گیاه طراحی شده‌اند که به این نشانگر، نشانگر نیمه‌تصادفی ISJ (Intron exon Splice Junction) گفته می‌شود. این نشانگر توسط وینینگ و لانگریج (۳۰) ابداع گردید و سپس توسط رافالسکی و همکاران (۲۲) گسترش بیشتری یافت. محققین بیان کردند که این آغازگرها بسته به اینکه نواحی کدکننده و یا غیرکدکننده ژنوم را تکثیر کنند به ترتیب آغازگرهای مکان هدف اگزون یا ET و مکان هدف اینترون یا IT نامیده می‌شوند (۲۳). توالی آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ شامل نوکلئوتیدهای حفاظت شده و نوکلئوتیدهای تصادفی است (۱۵ و ۲۲). عده‌ای از محققین بیان نمودند که آغازگرهای ET دارای انتهای ۵' آغازگر اختصاصی است که با نواحی حفاظت شده‌ای از مکان هدف اینترون اتصال می‌یابند و نواحی اگزونی را تکثیر می‌کنند ولی آغازگرهای IT انتهای ۳' آنها اختصاصی است که به نواحی حفاظت شده مرز بین اگزون-اینترون اتصال می‌یابند و اینترونها را تکثیر می‌کنند (۲۰، ۲۱ و ۳۰) (شکل ۱).

طبیعی و چه مصنوعی وسیع تر می‌شود. از دیگر دلایل اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده در مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی با هدف کاهش هزینه‌ها، افزایش دقت و قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. بنابراین یکی از پایه‌های اساسی علم اصلاح نباتات به ویژه برای گیاهان دارویی، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است (۱۰).

امروزه مطالعات اندکی بر روی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی صورت گرفته است، به طوری که در حال حاضر بیشتر گونه‌های گیاهان دارویی در معرض خطر انقراض قرار دارند. از مهم‌ترین کاربردها، بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان است. از بین انواع نشانگرها، نشانگرهای مولکولی به علت مستقل بودن از شرایط محیطی و دارا بودن چندشکلی بیشتر نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. یک نوع از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یا PCR، نشانگری است که توالی آنها بر اساس نواحی



شکل ۱- شمایی از مکان هدف آغازگرهای ISJ بر روی ژنوم (فلش جهت تکثیر در رشته الگو را نشان می‌دهد) (۲۶)

جهت تکثیر را به سمت تکثیر اگزونها نشان می‌دهد پس این آغازگر از نوع ET است. اما آغازگر ISJ<sub>3</sub> (۵'AGGTGACCGACCTGCA۳') که بخش حفاظت شده توالی (سمت چپ شکل ۱) در اگزونها بوده ولی فلش جهت تکثیر را به سمت اینترونها نشان می‌دهد؛ پس این آغازگر از نوع IT است.

محققین (۲۶) در مطالعه‌ای بر روی بریوفیتها گزارش کردند که برای تعیین نوع آغازگرهای ISJ از دو نوع IT و ET می‌بایست بیان نمود که بخشی و یا تمامی توالی آغازگر با کدام توالی شکل ۱ مطابقت دارد و سپس بر اساس آنکه آن توالی مناطق اینترونی یا اگزونی را تکثیر می‌کند مشخص خواهد شد که به ترتیب آغازگر از نوع IT یا ET است. برای مثال آغازگر ISJ<sub>3</sub> (۵'TGCAGGTCA۳') مشابه توالی پایین در سمت راست شکل ۱ می‌باشد که فلش

تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور واقع در کرج تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- منشأ جغرافیایی توده‌های آویشن کرک‌آلود (*Thymus pubescens*)

توده‌ها	منشأ جغرافیایی	توده‌ها	منشأ جغرافیایی
۱	گیلان	۷	زنجان
۲	زنجان	۸	آذربایجان شرقی، مراغه
۳	قزوین	۹	آذربایجان شرقی، قره چمن
۴	آذربایجان غربی	۱۰	کردستان
۵	نامشخص	۱۱	زنجان
۶	نامشخص	۱۲	تهران

از آنجا که معمولاً استخراج DNA در گیاهان دارویی به علت وجود ترکیبات بازدارنده و متابولیت‌های ثانویه با مشکلاتی روبروست، به همین منظور برای به دست آوردن DNA ژنومی با کیفیت مطلوب، چندین روش استخراج DNA از برگهای جوان و شاداب آویشن مورد آزمایش قرار گرفت و سرانجام روش خانوجا و همکاران (۱۷) با اندکی تغییرات انتخاب شد (۹). به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. از آنجا که توالی آغازگرهای ISJ از نظر تعداد نوکلئوتید متفاوت است (۲۱، ۲۲ و ۲۹) واکنش PCR در دو مرحله مطابق با روش جزرتکویچ و همکاران (۲۱) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. سرانجام محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه، زیر نور UV با دستگاه ژل نگار عکسبرداری صورت گرفت. برای تعیین روابط ژنتیکی نمونه‌ها، باندهای تکثیر یافته از نشانگرهای ISJ به کد صفر (عدم وجود باند) و کد یک (وجود باند) تبدیل شدند. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای برای آغازگرهای IT و ET با استفاده از نرم‌افزار DARwin5 ترسیم گردید. تعداد کل باندها، باندهای چندشکل و درصد

در مطالعه‌ای با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی، تنوع ژنتیکی ۲۵ رقم تجاری و ۱۴ رقم محلی لوبیا بررسی شد. از ۵۰ آغازگر به کار رفته، شش آغازگر بر اساس تعداد قطعات تولیدی انتخاب شد. نتایج به دست آمده بیانگر کارایی بالای این نوع آغازگرها در برآورد تنوع ژنتیکی ارقام لوبیا بوده است (۲۰). وهابی و همکاران (۲۸) به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۴ ژنوتیپ نخود علفی که از مکانهای مختلف ایران جمع‌آوری شده بود با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISJ پرداختند. نتایج مبنی بر عدم وجود همبستگی معنی‌داری بین تنوع حاصل از نشانگرهای مورفولوژیکی با نشانگر RAPD بود. در حالی که تنوع ژنتیکی نخودهای علفی با استفاده از نشانگرهای ISJ و RAPD وابستگی معنی‌دار بالایی را با طبقه‌بندی مورفولوژیکی نشان دادند. در این مطالعه دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD با دندروگرام نشانگر ISJ مطابقت چندانی نداشت. سمیعی (۷) در مطالعه خود بر روی توده‌های شیدر ایرانی با نشانگر نیمه‌تصادفی ISJ گزارش کردند که گروه‌بندی حاصل از آغازگرهای ET توانست ارقام بهاره و پاییزه را بهتر از آغازگرهای IT جدا کند که احتمالاً به دلیل تکثیر بخشی از DNA توسط این نوع آغازگرهاست که صفت بهاره‌سازی را کنترل می‌کند.

مطالعات اخیر نشان داد که مطالعات ژنتیکی و اصلاحی محدودی روی گونه آویشن کرک‌آلود در داخل و خارج کشور انجام شده است، به طوری که تاکنون مطالعه‌ای در مورد تنوع ژنتیکی آویشن *T. pubescens* با نشانگرهای ISJ صورت نگرفته است. در این مطالعه برای اولین بار به بررسی روابط خویشاوندی توده‌های آویشن *T. pubescens* با استفاده از نشانگرهای ISJ از دو گروه نشانگرهای ایترونی و اگزونی پرداخته شده است.

## مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۱۲ توده آویشن *T. pubescens* از چند استان مختلف ایران بود که از مزرعه

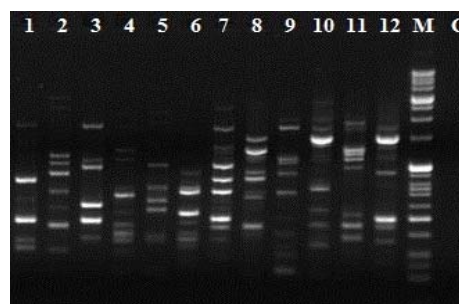
آزمون  $t$  جفت نشده در سطح ۰/۰۵ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه آغازگر IT و ET از نظر متوسط درصد چندشکلی وجود ندارد. بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی در آغازگرهای IT و ET به ترتیب مربوط به آغازگرهای IT<sub>18-1</sub> و ET<sub>12-27</sub> بود. همچنین این دو آغازگر بیشترین شاخص نشانگر را تشکیل دادند. شاخص نشانگر پتانسیل هر آغازگر جهت تولید باند بیشتر را نشان می‌دهد، بنابراین بالا بودن مقدار شاخص نشانگر نشان داد که این دو آغازگر نسبت به سایر آغازگرهای به کار رفته، پتانسیل بالایی در تولید باند بیشتر دارند. از بین آغازگرهای IT، آغازگر IT<sub>18-1</sub> با ۲۳ باند چندشکل بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) و آغازگر ISJ<sub>9</sub> کمترین درصد چندشکلی (۸۸ درصد) را نشان داد. از ۱۴ آغازگر ET، آغازگر ET<sub>12-30</sub> با ۲۵ باند چندشکل بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) و آغازگرهای ET<sub>12-28</sub> و ET<sub>18-6</sub> کمترین درصد چندشکلی (۸۲ درصد) را نشان دادند (جدول ۲).

در این مطالعه توده‌های آویشن *T. pubescens* بر اساس روش میانگین فواصل یا UPGMA و ضریب تشابه دایس در آغازگرهای ایترونی و اگزونی به ترتیب به سه و چهار گروه تقسیم شدند. در گروه اول دندروگرام آغازگرهای ایترونی توده‌های آویشن *T. pubescens* از آذربایجان شرقی، کردستان، زنجان و دو توده با منشأ نامشخص قرار گرفتند. جمعیت‌هایی از زنجان، قزوین، آذربایجان غربی و گیلان در گروه دوم قرار گرفتند. توده آویشن کرک‌آلود از تهران به تنهایی یک گروه جداگانه را تشکیل داد. در گروه اول دندروگرام آغازگرهای اگزونی توده‌هایی از آویشن کرک‌آلود از آذربایجان شرقی، کردستان و زنجان که همگی از مناطق سردسیری کشور بودند مشاهده گردید. در گروه دوم آن جمعیت‌هایی از تهران، گیلان، آذربایجان غربی و قزوین قرار گرفتند. دو توده از آویشن کرک‌آلود زنجان هر کدام به تنهایی یک گروه جداگانه را تشکیل دادند.

چندشکلی برای هر آغازگر محاسبه گردید. همچنین دو شاخص میزان اطلاعات چندشکل یا PIC و شاخص نشانگر یا MI برای هر آغازگر بر اساس فرمول تیمپایه و همکاران (۲۷) محاسبه شد و از بین آنها بهترین آغازگرهای IT و ET از نظر چندشکلی بیشتر و پتانسیل تولید بیشترین باند معرفی شدند. تجزیه مؤلفه‌های اصلی آغازگرهای IT و ET نیز با نرم‌افزار NTSYS انجام شد (۲۵).

## نتایج

در این مطالعه پس از بررسی چندین آغازگر ISJ از نظر کمیت و کیفیت باندها، ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ شامل ۱۶ آغازگر IT و ۱۴ آغازگر ET انتخاب شد. این آغازگرها ۵۵۹ باند چندشکل تولید کردند که ۹۶ درصد چندشکلی را از کل ۵۸۵ باند DNA شامل می‌شد (شکل ۲).



شکل ۲- محصول PCR آغازگر IT<sub>15-36</sub> بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز. M: بیانگر سایز مارکر ۱kb، C: کنترل منفی، شماره چاهکها بیانگر شماره توده‌هاست.

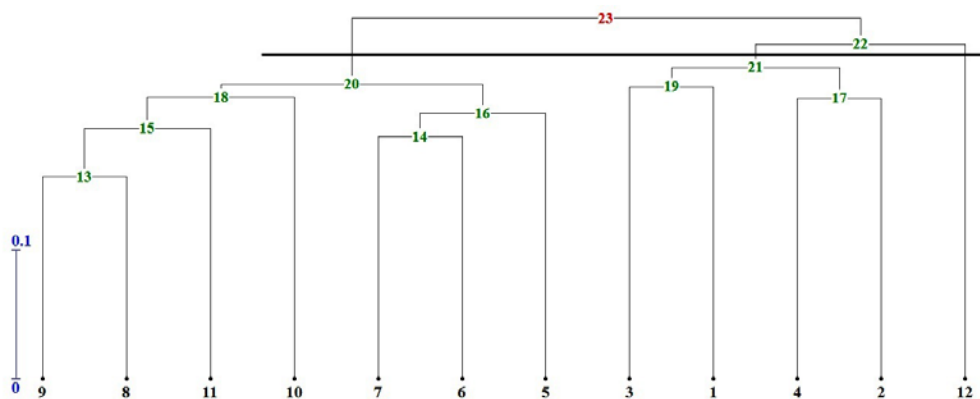
کل آغازگرهای IT ۳۰۲ باند چندشکل تولید کردند که ۹۷ درصد از ۳۱۱ باند تولید شده را شامل گردید. کل آغازگرهای ET ۲۵۷ باند چندشکل تولید نمودند که ۹۴ درصد از کل ۲۷۴ باند تولید شده را نشان داد. متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر IT، ۱۸/۸۷ عدد و برای هر توده ۲۵/۱۷ عدد بود اما متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ET، ۱۸/۳۶ عدد و برای هر توده ۲۱/۴۲ عدد بود. نتایج به دست آمده با استفاده از

جدول ۲- نوع آغازگر، توالی آنها، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی و دیگر شاخصهای تفکیک آغازگرهای ISJ (حروف پررنگ توالیها بیانگر توالیهای حفاظت شده اگزونی و ایترونی است، شماره‌های ۱ تا ۱۶ آغازگرهای IT و شماره‌های ۱۷ تا ۳۰ آغازگرهای ET است)

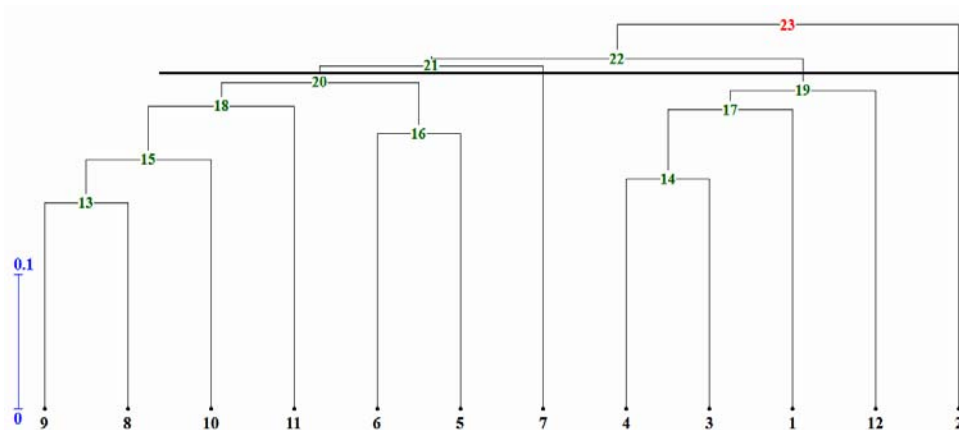
ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگرها (۵'-۳')	کل باندها	باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	میزان اطلاعات چندشکلی	شاخص نشانگر
۱	IT <sub>10-1</sub>	<b>ACGTCCAGAC</b>	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۳۴	۷/۴۸
۲	IT <sub>10-2</sub>	<b>ACGTCCAGGT</b>	۱۷	۱۶	۹۴	۰/۳۷	۵/۹۲
۳	IT <sub>10-3</sub>	<b>ACGTCCAGCA</b>	۲۰	۱۹	۹۵	۰/۳۵	۶/۶۵
۴	IT <sub>10-4</sub>	<b>ACGTCCACCA</b>	۱۷	۱۶	۹۴	۰/۳۶	۵/۷۶
۵	IT <sub>10-5</sub>	<b>ACGTCCAGAG</b>	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۴	۶/۸
۶	IT <sub>10-6</sub>	<b>ACGTCCATCC</b>	۲۴	۲۳	۹۶	۰/۳۸	۸/۷۴
۷	IT <sub>15-31</sub>	<b>GAAGCCGCAGGTAAG</b>	۲۱	۱۹	۹۰	۰/۳۵	۶/۶۵
۸	IT <sub>15-32</sub>	<b>GACTCGCCAGGTAAG</b>	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۲۷	۵/۴
۹	IT <sub>15-34</sub>	<b>GCGGCATCAGGTAAG</b>	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰/۳۵	۷/۳۵
۱۰	IT <sub>15-35</sub>	<b>CGAAGCCCAGGTAAG</b>	۱۷	۱۶	۹۴	۰/۳۶	۵/۷۶
۱۱	IT <sub>15-36</sub>	<b>ACCTACCTGGGGCTC</b>	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰/۳۹	۸/۱۹
۱۲	IT <sub>18-1</sub>	<b>CCGGCAGGTCAGGTAAGT</b>	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۴۱	۹/۴۳
۱۳	IT <sub>18-2</sub>	<b>GCAGAGGGCCAGGTAAGT</b>	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰/۲۶	۲/۸۶
۱۴	ISJ <sub>1</sub> (IT)	<b>CAGACCTGC</b>	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۷	۷/۴
۱۵	ISJ <sub>5</sub> (IT)	<b>CAGGGTCCCACCTGCA</b>	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۸	۷/۶
۱۶	ISJ <sub>9</sub> (IT)	<b>AGGTGACCGACCTGCA</b>	۱۷	۱۵	۸۸	۰/۳۱	۴/۶۵
۱۷	ET <sub>12-25</sub>	<b>AGCAGGTGACTG</b>	۲۱	۲۰	۹۵	۰/۳۲	۶/۴
۱۸	ET <sub>12-26</sub>	<b>AGCAGGTGGACT</b>	۱۶	۱۴	۸۷/۵	۰/۳۶	۵/۱۱
۱۹	ET <sub>12-27</sub>	<b>AGCAGGTCCTAG</b>	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۴۳	۹/۹۰
۲۰	ET <sub>12-28</sub>	<b>AGCAGGTCCAAG</b>	۱۷	۱۴	۸۲	۰/۴۲	۵/۸۸
۲۱	ET <sub>12-29</sub>	<b>AGCAGGTCGTGA</b>	۱۹	۱۸	۹۵	۰/۳۹	۷/۰۲
۲۲	ET <sub>12-30</sub>	<b>AGCAGGTGGTAC</b>	۲۵	۲۵	۱۰۰	۰/۳۵	۸/۷۵
۲۳	ET <sub>15-31</sub>	<b>ACTTACCTGGGCCAG</b>	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰/۳۰	۳/۳
۲۴	ET <sub>15-32</sub>	<b>ACTTACCTGGGCCACG</b>	۲۲	۲۰	۹۱	۰/۳۴	۶/۸
۲۵	ET <sub>15-33</sub>	<b>ACTTACCTGGCCGTG</b>	۲۵	۲۴	۹۶	۰/۳۶	۸/۶۴
۲۶	ET <sub>15-34</sub>	<b>ACTTACCTGGCCGAG</b>	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰/۳۴	۷/۵۶
۲۷	ET <sub>15-35</sub>	<b>ACTTACCTGCCGAG</b>	۱۷	۱۷	۱۰۰	۰/۳۷	۶/۲۹
۲۸	ET <sub>15-36</sub>	<b>ACTTACCTGGGGCTC</b>	۱۹	۱۶	۸۴	۰/۲۷	۴/۳۲
۲۹	ET <sub>18-6</sub>	<b>ACTTACCTGCCTACGCGG</b>	۱۷	۱۴	۸۲	۰/۲۶	۳/۶۴
۳۰	ISJ <sub>3</sub> (ET)	<b>TGCAGGTCA</b>	۲۱	۲۰	۹۵	۰/۳۸	۷/۶
	میانگین		۱۹/۵	۱۸/۶	۹۶	۰/۳۵	۶/۶۰

را تشکیل داد. می‌توان نتیجه گرفت که نتایج حاصل از دندروگرام تجزیه خوشه‌ای آغازگرهای ایترونی با منشأ جغرافیایی توده‌ها مطابقت داشت اما چنین مطابقتی در دندروگرام آغازگرهای اگزونی با منشأ جغرافیایی مشاهده نشد (شکل ۳).

نتایج گروه بندی دندروگرام آغازگرهای اگزونی نشان داد که نمونه‌های آویشن استان زنجان در کل دندروگرام به طور پراکنده قرار گرفته‌اند. نمونه استان تهران با شرایط اقلیمی متفاوت با توده‌های آویشن مناطق سردسیری کشور در یک گروه قرار گرفته است. در حالی که در دندروگرام آغازگرهای ایترونی توده آویشن تهران یک گروه جداگانه



(الف)



(ب)

شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای آویشن کرک‌آلود (*Thymus pubescens*) با آغازگرهای IT (الف) و ET (ب) بر مبنای روش

UPGMA با نرم‌افزار DARwin5

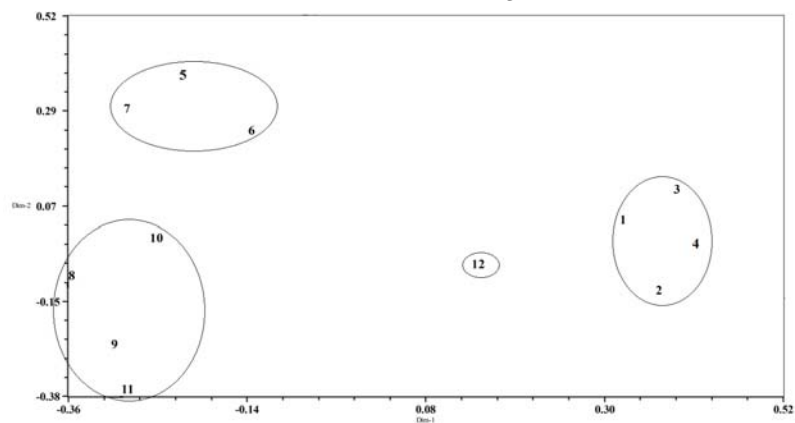
بالایی در این گروه‌بندی قرار دارند. مقادیر پایین bootstrap نشان دهنده بیشترین شباهت توده‌ها به یکدیگر است. اگرچه از نظر متوسط چندشکلی تفاوتی چندانی بین دو نوع آغازگر ایترونی و اگزونی دیده نشد ولی در مجموع نتایج نشان داد که آغازگرهای ایترونی نسبت به

در هر دو دندروگرام بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو توده ۸ و ۹ با کمترین bootstrap از مراغه و قره‌چمن استان آذربایجان شرقی دیده شد. اعداد روی دندروگرام مقادیر bootstrap را نشان می‌دهد که هر چه این مقدار بیشتر باشد بیانگر آن است که نمونه‌های آن گروه با درصد اعتماد

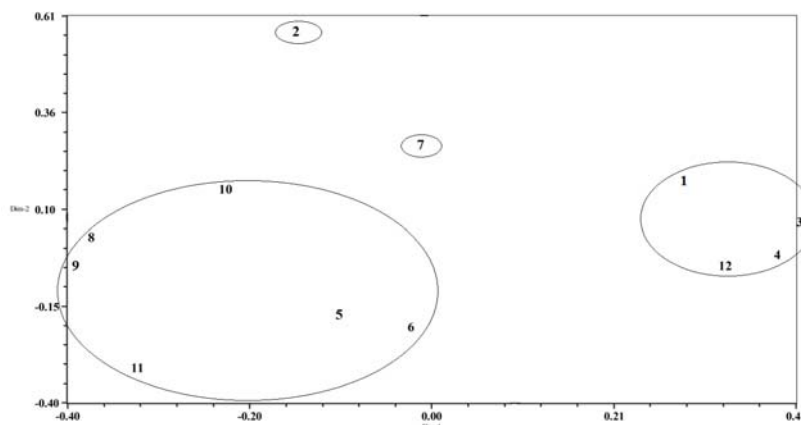
توده‌های آویشن *T. pubescens* را توجیه نموده است. به عبارتی دیگر هر دو نوع آغازگرها توزیع مناسبی در سطح ژنوم گیاه داشته‌اند اما آغازگرهای ایترونی بهتر توانستند ژنوم آویشن کرک‌آلود را پوشش دهند و در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن کرک‌آلود بهتر عمل کرده‌اند (شکل ۴).

آغازگرهای اگزونی بهتر توانسته‌اند توده‌های آویشن کرک-آلود را بر اساس منشأ جغرافیایی تفکیک کنند.

آزمون تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای تعیین نحوه پراکندگی نشانگرهای ایترونی و اگزونی در سطح ژنوم صورت گرفت. نتایج حاصل از آن نشان داد که در نشانگرهای ایترونی، سه مؤلفه اول ۴۱/۷۰ درصد و در نشانگرهای اگزونی، سه مؤلفه اول ۴۰/۱۰ درصد از واریانس کل بین



(الف)



(ب)

شکل ۴- نمودار دو بعدی تجزیه مؤلفه‌های اصلی توده‌های آویشن کرک‌آلود (*Thymus pubescens*) با آغازگرهای IT (الف) و آغازگرهای ET (ب)

بالای آغازگرهای ISJ در ارزیابی تنوع ژنتیکی آنها بوده است. اما از نظر متوسط درصد چندشکلی اختلاف معنی‌داری بین آغازگرهای ایترونی و اگزونی دیده نشد. هاشمی پترویدی و همکاران (۱۶) در مطالعه‌ای برای انگشت‌نگاری

## بحث

تعداد باند تکثیر شده و میزان چندشکلی بالا (۹۶ درصد چندشکلی) در توده‌های آویشن مورد مطالعه بیانگر کارایی

تجزیه خوشه‌ای نیز تنوع بالایی را در بین ژنوتیپها آشکار کرد.

مطالعات نشان داده است که تاکنون مطالعات مورفولوژیکی بر روی گونه *T. pubescens* انجام نشده است. در مورد مطالعات مولکولی نیز فقط در برخی موارد تنوع ژنتیکی این گونه همراه با چند گونه دیگر آویشن مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای نمونه، علمداری و همکاران (۱۱) تنوع ژنتیکی گونه‌های *Thymus daenensis* و *Thymus migricus* را با نشانگر RAPD مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاصل از آن نشان داد که نشانگر RAPD برای تعیین لوکوسهای چندشکل و تخمین فواصل ژنتیکی آویشن مناسب است. همچنین مهرپور و همکاران (۱۹) با بررسی سطوح پلوئیدی سه جمعیت آویشن *T. pubescens* بیان کردند که نمونه‌های منطقه تسوج آذربایجان شرقی دارای سطح پلوئیدی دیپلوئید و مناطق نیکنازده و شمشک در استان تهران سطح پلوئیدی تتراپلوئید دارند. آنها عدد پایه کروموزومی را  $x=5$  گزارش کردند. در مطالعه‌ای ابدالی و همکاران (۱) به ارزیابی تنوع چهار رقم زیتون شمال کشور با صفات مورفولوژیک و نشانگر RAPD پرداختند. از بین ۲۰ آغازگر به کار رفته ۴ آغازگر چندشکلی بالایی را آشکار کرد و نتایج این تحقیق نشان داد که ارقام زیتون با تفاوت ۳۳ تا ۴۵ درصد به عنوان ارقام مجزا تفکیک شده‌اند.

تجزیه مؤلفه‌های اصلی یکی از روشهای چندمتغیره است که کاربرد زیادی در تنوع ژنتیکی دارد. این روش در واقع ابزار دیگری برای نمایش پراکنش توده‌هاست که به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به کار می‌رود. در این مطالعه نتایج آن بیانگر توزیع مناسب آغازگرهای نیمه-تصادفی در سطح ژنوم گیاه آویشن کرک‌آلود بوده است. همچنین نتایج آن با نتایج دندروگرام تجزیه خوشه‌ای هماهنگی کامل داشت.

۸ هیبرید برنج و والدین آنها از ۲۱ آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ از دو گروه آغازگرهای IT و ET استفاده کردند که متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر و هر ژنوتیپ به ترتیب ۱۵/۴۱ و ۱۱/۵۶ بود و بیشترین چندشکلی را آغازگرهای IT، ۱۰ و ۱۵ نوکلئوتیدی داشتند. رضانی و همکاران (۶) در مطالعه تنوع ژنتیکی گلرنگ با نشانگرهای ISJ بیان کردند که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد چندشکلی بین دو گروه آغازگرهای IT و ET مشاهده نشد. در بعضی مطالعات دیده شده که آغازگرهای ET نتایج رضایت بخشی را نسبت به آغازگرهای IT داشته‌اند. فراهانی و ارزانی (۱۴) در مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم همراه با سه هیبرید  $F_1$  و لاینهای پدری آنها با نشانگرهای نیمه‌تصادفی ISJ گزارش کردند که آغازگرهای ET نسبت به آغازگرهای IT قطعات بانندی بیشتر و با وضوح بالاتری تولید کردند.

انصاری (۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ تریبتیکاله و یک رقم گندم دوروم با آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ بیان کردند که متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۱۲/۷ عدد باند و تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر از ۱۰ تا ۱۶ عدد باند متغیر بود. همچنین آغازگرهای ET نسبت به آغازگرهای IT قطعات بانندی بیشتر با وضوح بالاتر و درصد چندشکلی بیشتری تولید کردند. اسماعیلی و همکاران (۲) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ گندم دیم (شامل ۲۳ رقم و لاین گندم نان و ۲ رقم گندم دوروم) با استفاده از نشانگرهای ISJ پرداختند. آنها در این مطالعه از ۳۲ آغازگر نیمه‌تصادفی استفاده نمودند که از بین آنها ۱۷ آغازگر بین ارقام گندم چندشکلی نشان داد. فابریکی اورنگ و همکاران (۸) در مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با ۱۱ آغازگر ISSR بیان کردند که متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۱۰/۵ عدد بود. آغازگرهای به کار رفته شاخص نشانگر (MI) بالاتری نسبت به سایر آغازگرها داشتند. دندروگرام



نمونه‌ها بر اساس مناطق جغرافیایی نبود که علت آن را مربوط به تنوع ژنتیکی زیاد بین نمونه‌ها دانستند و بیان کردند که با استفاده از نشانگر SSR می‌توان شناسنامه مولکولی نمونه‌ها را تهیه نمود. پراکنش نمونه‌ها در تجزیه مختصات اصلی نیز ۱۲ درصد تغییرات را توجیه نمود که ۶/۵ درصد آن مربوط به بعد اول و ۵/۵ درصد آن توسط بعد دوم توجیه گردید.

از نتایج به دست آمده می‌توان برای سایر مطالعات ژنتیکی و اصلاحی توده‌های آویشن استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود هر گاه به دلایلی نیاز به انتخاب یک گروه از آغازگرهای ISJ با دقت و کارایی بالا باشد، جهت کاهش حجم کار و مقدار هزینه‌های تحقیق آغازگرهای ایترونی (IT) به علت گروه بندی بهتر توده‌های آویشن کرک‌آلود مناسب تر به نظر می‌رسد.

#### تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به خصوص جناب آقای دکتر حسن مداح عارفی به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌های آویشن تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. از مسئولین مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان که تأمین مالی این طرح را برعهده داشتند نیز قدردانی می‌گردد.

#### منابع

- ۱- ابدالی، ن.، حسینی مزینانی، م.، عطایی، س.، حسینی، س.م. و نقوی، م.ر. ۱۳۹۰. بررسی میزان تنوع در چهار رقم زیتون ایرانی با مطالعه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۴(۶): ۸۶۸-۸۷۹.
- ۲- اسماعیلی، ا.، سمیعی، ک.، نظریان فیروزآبادی، ف.، دریکوند، ر. و پورطهماسب، ح. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از نشانگر نیمه‌تصادفی. سومین همایش یافته‌های پژوهشی کشاورزی و منابع طبیعی (غرب کشور). ص ۳۸۷.
- ۳- انصاری، س. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی تربیتکاله با استفاده از صفات زراعی و نشانگرهای نیمه‌تصادفی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه صنعتی اصفهان.
- ۴- جمزاد، ز. ۱۳۸۸. آویشن و مرزه‌های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران. ۱۷۱ صفحه.
- ۵- حاجی کرم، م.، نقوی، م.ر.، طالعی، ع.ر. و آقایی، م.ج. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *Aegilops tauschii* نواحی شمالی ایران با استفاده از نشانگرهای SSR. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۴(۲): ۳۹۹-۳۹۰.
- ۶- رمضانی، م.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف. و بخش‌خانیکی، غ.ر. ۱۳۸۸. مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گلرنگ با استفاده از نشانگر مولکولی ISJ. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران.

- ۷- سمیعی، ک. ۱۳۸۳. بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی شبدر ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه صنعتی اصفهان.
- ۸- فابریکی اورنگ، ص.، شمس بخش، م.، جلالی جواران، م. و احمدی، ج. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی بین ریزماهورای (ISSR). مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۲(۲).
- ۹- مجیری، ف.، ضابطی، س.م.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف.، مداح عارفی، ح. و احمدی، ه. ۱۳۸۹. روش استخراج DNA ژنومی از برگ گیاه دارویی آویشن (*Thymus spp.*). چهارمین همایش منطقه‌ای یافته‌های پژوهشی کشاورزی (غرب ایران)، سنندج- دانشگاه کردستان، ۲۳-۲۲ اردیبهشت: صفحه ۱۰۰.
- ۱۰- نقوی، م.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۴ صفحه.
- 11- Alamdary, S.B.L., Safarnejad, A. and Rezaee, M. 2011. Evaluation of Genetic Variation between *Thymus* Accessions Using Molecular Markers. Journal of Basic and Applied Scientific Research. 1(12): 2552-2556.
- 12- Amini, F., Saeidi, G. and Arzani, A. 2008. study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. Euphytica. 163: 21-30.
- 13- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: Principle and application for DNA amplification. Mostockton press. USA. 1989.
- 14- Frahani, E. and Arzani, A. 2004. The use of semi-random marker for evaluation of genetic diversity among cultivars and F<sub>1</sub> hybrids of durum wheat. Proc. of 4<sup>th</sup> International Iran & Russia Conference. Russia. 81-86.
- 15- Gawel, M., Wisniewska, I. and Rafalski, A. 2000. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cellular and Molecular Biology Letters. 7: 577-582.
- 16- Hashemi-petroudi, S.H.R., Mirmohammadi maibody, S.A.M., Nematzadeh, G.A. and Arzani, A. 2010. Semi-random PCR markers for DNA fingerprinting of rice hybrids and their corresponding parents. African Journal of Biotechnology. 9 (7): 979-985.
- 17- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P. and Kumar, S. 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.
- 18- Lopez-Pujol, J., Bosch, M., Simon, J. and Blanche, C. 2004. Allozyme Diversity in the Tetraploid Endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). Annals of Botany. 93: 323-332.
- 19- Mehrpur, Sh., Mirzaie-Nodoushan, H., Majd, A. and Sefidkon, F. 2002. Karyotypic studies of two *Thymus* species. Cytologia. 67(4): 343-346.
- 20- Nowosielski, J., Podyma, W. and Nowosielska, D. 2002. Molecular research on the genetic diversity of polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. Cellular and Molecular Biology Letters. 7: 753-762.
- 21- Przetakiewicz, J., Nadolska-Orczyk, A. and Orczyk, W. 2002. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. Cellular and Molecular Biology Letters. 7: 671-676.
- 22- Rafalski, A., Gidzinska, M. and Wisniewska, I. 1997. PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds In: Saftaris AS (eds.) Genetic and biotechnology breeding maize and sorghum. Royal Society Chemistry Cambridge. UK. pp: 106-111.
- 23- Rafalski, A., Madej, L., Wisniewska, I. and Gawel, M. 2002. The genetic diversity of components of rye hybrids. Cellular and Molecular Biology Letters. 7: 471-475.
- 24- Rechinger, K.H. 1982. Flora Iranica. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt. 152: 543-544.
- 25- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Varsion 2.02. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- 26- Sawicki, J. and Szczecinska, M. 2007. Semi-specific intron-exon splice junction markers in bryophyte studies. Biodiversity Research Conservation. 5-8: 25-30.
- 27- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae. 118: 1-7.
- 28- Vahabi, A.A., Solooki, M., Arzani, A., Ghorbani, A., Lotfi, A., Imamjomeh, A.A. and Bahrami, Sh. 2008. Comparative Analysis of Genetic Diversity among Grass pea Landraces as

- Detected Random, Semi Random and Morphological Markers. Asian Journal of Plant Sciences. ISSN 1682-3974.
- 29- Weining, S. and Henry, v. 1995. Molecular analysis of DNA polymorphism of barley (*Hordeum spontaneum* L.) germplasm using the polymerase chain reaction. Genetic Research Crop Evolution. 42: 273-281.
- 30- Weining, S. and Langridge, P. 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. Theoretical and Applied Genetic. 82: 209-216.

## Comparison of intron and exon markers in assessment of genetic diversity between *Thymus pubescens*

Mojiri F.<sup>1</sup>, Ismaili A.<sup>1</sup>, Nazarian-Firouzabadi F.<sup>1</sup> and Momeni R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Statistics Dept., Faculty of Basic sciences, Zabol University, Zabol, I.R. of Iran

### Abstract

*Thymus pubescens* is one of the medicinal plants of Lamiaceae, growing endemically in most regions (especially in north and west) of Iran. Molecular markers were used in genetic diversity studies of medicinal plants for breeding applications. In this study, 30 semi-random primers, including IT (intron targeting) and ET (exon targeting), were used for assessment of genetic diversity among *Thymus pubescens* accessions. DNA extracted from fresh leaves of Thyme and polymerase chain reaction products were separated on 1.5% agarose gel by electrophoresis. All of primers produced 559 bands which 96% of them were polymorphic. 302 and 257 polymorphic bands belong to IT and ET primers, respectively. The highest polymorphic information content (PIC) and marker index (MI) among IT and ET primers belonged to IT<sub>18-1</sub> and ET<sub>12-27</sub>, respectively. Cluster analysis of IT and ET primers, using UPGMA method, Dice's similarity coefficient and DARwin5 software, divided accessions into three and four clusters, respectively. In both dendrogram, the highest genetic similarity showed between two accessions with similar geographical origin. Cluster analysis results were aligned with grouping of principal component analysis. Results of this study revealed that IT primers could discriminate *Thymus pubescens* accessions in compared with ET primers.

**Key words:** Thyme, Exon, Intron, Cluster analysis, Polymorphism.