

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گونه مریم نخودی (*Teucrium polium* L.) در غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT

محسن فرشادفر^{۱*}، هومن شیروانی^۱، مصطفی امجدیان^۱ و عبدالمهدی نوریان^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۱۹

چکیده

مریم نخودی (*Teucrium polium* L.) از قدیمی ترین گیاهان دارویی می باشد که در طب سنتی کاربرد فراوان دارد. جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپهای مختلف مریم نخودی ۱۷ ژنوتیپ از این گونه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت که ۱۱ آغازگر دارای باندهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۴۸ باند چند شکل تولید کنند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۷ ژنوتیپ برابر ۲/۸۲ بود. آغازگرهای SC20، SC21 و SC59 با ۶ باند بیشترین تعداد و آغازگر SC15 با ۲ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمود. میانگین درصد چند شکلی (PPB%)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص تفکیک (RP) در بین آغازگرهای مورد بررسی به ترتیب برابر ۹۸/۴۸۵، ۰/۳۶۱، ۱/۵۲۵ و ۴/۱۹۷ بود. در حالت کلی و بر اساس تمام شاخصها، مناسب ترین آغازگرها برای بررسی گونه مریم نخودی، آغازگرهای SC59 و SC11 تعیین شد. بیشترین تشابه را ژنوتیپهای (گیلان غرب ۲) با (ثلاث ۲) (۰/۷۳۲) و کمترین تشابه را ژنوتیپ (نفت شهر) با ژنوتیپهای (گیلان غرب ۱) و (گیلان غرب ۲) (۰/۱۰) داشت. گروه بندی حاصل از تجزیه کلاستر نشان داد که ژنوتیپها در ۲ گروه قرار گرفته که نتایج حاصل از گروه بندی با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCoA) تایید گردید.

واژه های کلیدی: مریم نخودی، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، SCoT

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۱۲۳۳۱، پست الکترونیکی: Farshadfarmohsen@yahoo.com

مقدمه

گونه است و در کشور ایران ۱۲ گونه از این جنس رویش دارد که گونه های مختلف آن در طب سنتی به عنوان گیاه دارویی استفاده می شوند. در استان کرمانشاه چهار گونه (*T. polium* L., *T.oriental* L., *T.oliverianum* Ging. ex Benth, *T.parvifolium* Schreb) از این جنس در اکثر مناطق استان (دالاهو، اسلام آبادغرب، گیلانغرب، صحنه، سرپل ذهاب و روانسر) رویش دارد (۲۲). از ۲۰۰۰ سال پیش تا کنون، گونه های مختلف *Teucrium* L. گیاه دارویی شناخته شده و از آن به عنوان ضد تشنج، ضد التهاب، ضد

براساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه سلامتی خود را به طور مستقیم یا غیرمستقیم، مدیون گیاهان دارویی هستند و در کشورهای پیشرفته نیز استفاده از ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی رو به افزایش است (۴). به دلیل عوارض فراوان ناشی از استفاده از داروهای شیمیایی مصنوعی، استقبال چشمگیری از داروهای طبیعی با منشاء گیاهی شده است (۱۰). جنس مریم نخودی (*Teucrium* L.) متعلق به تیره نعناع، شامل بیش از ۳۴۰

مولکولی SCoT در راستای بهبود ذخایر ژنتیکی کشور می- باشد.

مواد و روشها

در تحقیق انجام شده بذره‌های ۱۷ ژنوتیپ از گیاه دارویی مریم نخودی (*T. polium* L.) پس از شناسایی توسط کارشناسان بخش تحقیقات منابع طبیعی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، جمع‌آوری و پس از ثبت در هرباریوم این مرکز به منظور استخراج DNA گل‌دان کشت گردید (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱- محل جمع‌آوری ژنوتیپهای مورد بررسی

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۶) برای هر ژنوتیپ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. بعد از انتقال ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده با ازن مایع به تیوب، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۴ گرم CTAB، ۳۶/۱۶ گرم NaCl، ۳/۱۵ گرم Tris-HCl، ۱/۴۸ گرم EDTA، ۴۰۰ میکرولیتر β -mercaptoethanol در pH=۸ به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) به تیوبها اضافه شد و به مدت یک ساعت نمونه‌ها در حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزواکیل الکل (۱:۲۴) اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه خوب به هم زده شد تا محلول داخل تیوب یکنواخت شود. پس از آن نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک تیوب تمیز منتقل گردید و

در، تب بر و التیام دهندگی زخم استفاده می‌گردد (۲۲). آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسما گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های اصلاحی تعیین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیتها و روابط خویشاوندی بین آنها، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسما و تهیه جمعیتهای مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژنها را فراهم می‌سازد (۲۸). بیشتر به‌نژادگران معتقدند که کمبود تنوع ژنتیکی پیشرفتهای اصلاحی را در آینده مختل می‌کند (۲۰). ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی، حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گونه گیاهی برای انتخاب والدین جهت رسیدن به هیبرید مناسب از اهمیت زیادی بر خوردار است (۲۳). تنوع ژنتیکی می‌تواند به وسیله تخمین فاصله ژنتیکی با استفاده از اطلاعات شجره یا با استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی شود (۲۵). به منظور تخمین این تنوع انواع مختلفی از سیستمهای نشانگری توسط به‌نژادگران گیاهی استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی شامل بیوشیمیایی و DNA اشاره کرد. نشانگرهای DNA امکان شناسایی مستقیم تنوع توالی ژنومی را در بین گیاهان فراهم می‌کنند که می‌تواند در تکمیل اطلاعات شجره‌نامه مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). نشانگر مولکولی SCoT یا کدونهای آغاز هدف واقع شده، روشی است که در آن پرایمرها بر اساس توالیهای آغازگر (ATG) طراحی شده و نواحی بین کدونهای آغازگر طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر می‌شود و تفاوتها آشکار می‌شود (۹). از نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مانند جاتروفا (*Jatropha curcas* L.) و کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) استفاده شده است که در مقایسه با نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع بیشتری را نشان داده است (۱۳ و ۳۰). هدف از این تحقیق شناسایی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپهای مریم نخودی با استفاده از نشانگر

شوند و بعد به هر تیوب میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه گردید. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۰۵ میلی مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار ۱x) انجام شد.

به هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک ساعت در فریزر در دمای ۲۰- درجه قرارداده شدند. سپس تیوبها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتیفریوژ گردید و بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد سرد اضافه و یک سانتیفریوژ کوتاه صورت گرفت و به آرامی فاز مایع خالی شد (این مرحله دو بار تکرار شد) در پایان نیز تیوبها در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپهای مورد استفاده در تحقیق

ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	منطقه جمع آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع سطح دریا (متر)
G _۱	Te.p Ksh-Sah1	صحنه ۱	۶۴	۲۹	۳۴
G _۲	Te.p Ksh-Sar1	سرپل ۱	۶۰	۱۵	۳۴
G _۳	Te.p Ksh-Som	سومار	۱۸	۵۷	۳۳
G _۴	Te.p Ksh-Rav1	روانسر ۱	۱۲	۳۱	۳۴
G _۵	Te.p Ksh-Sar2	سرپل ۲	۶۳	۳۶	۳۴
G _۶	Te.p Ksh-Sar3	سرپل ۳	۰۸	۲۵	۳۴
G _۷	Te.p Ksh-Gil1	گیلان غرب ۱	۵۸	۵۷	۳۳
G _۸	Te.p Ksh-Dal1	دالاهو ۱	۴۹	۱۱	۳۴
G _۹	Te.p Ksh-Dal2	دالاهو ۲	۴۹	۱۱	۳۴
G _{۱۰}	Te.p Ksh-Naf	نفت شهر	۴۹	۲۱	۳۴
G _{۱۱}	Te.p Ksh-Dal3	دالاهو ۳	۶۷	۱۷	۳۴
G _{۱۲}	Te.p Ksh-Sah2	صحنه ۲	۲۹	۴۷	۳۴
G _{۱۳}	Te.p Ksh-Sal1	ثلاث ۱	۳۶	۴۵	۳۴
G _{۱۴}	Te.p Ksh-Gil2	گیلان غرب ۲	۰۱	۲۳	۳۴
G _{۱۵}	Te.p Ksh-Esl	اسلام آباد	۳۱	۲۱	۳۴
G _{۱۶}	Te.p Ksh-Rav2	روانسر ۲	۳۳	۴۷	۳۴
G _{۱۷}	Te.p Ksh-Sal2	ثلاث ۲	۲۹	۴۵	۳۴

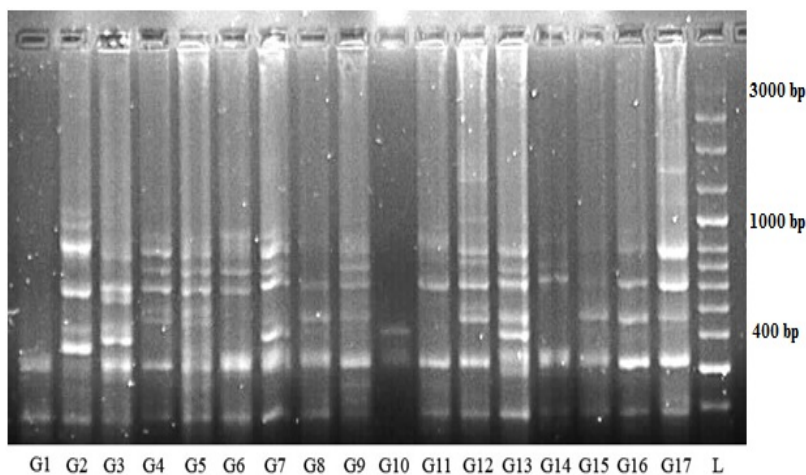
شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز بارگزاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار

چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت-سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود (۵۲ تا ۶۰ درجه). همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام

آزمون مانتل (۲۱)، DARwin 6 جهت تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (۱۶) و GenAlEx 6.2 برای تجزیه واریانس مولکولی (۱۵) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

بررسی پلی مورفسم: تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای مورد مطالعه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت که تنها ۱۱ آغازگر دارای باندهای قابل امتیاز بودند. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۴۸ باند تولید کنند که تنها یک باند همشکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۷ ژنوتیپ برابر ۲/۸۲ به دست آمد. آغازگرهای SC20، SC21 و SC59 با ۶ باند بیشترین تعداد و آغازگر SC15 با ۲ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمود. ژنوتیپ دالاهو ۳ بیشترین باند (۳۰ باند) و ژنوتیپهای روانسرا ۱ و دالاهو ۱ کمترین باند (۱۱ باند) را در بین ژنوتیپهای مورد بررسی داشتند. شکل ۲ الگوی باندی ۱۷ ژنوتیپ مورد بررسی با استفاده از آغازگر SC21 را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورزی ۱۷ ژنوتیپ مورد بررسی برای آغازگر SC21

آغازگرها میزان چند شکلی برابر ۱۰۰ درصد بود. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۶۱ بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای SC59 (۰/۴۴)، SC11 (۰/۴۴) و SC36 (۰/۴۲) بود که این آغازگرها بهتر

داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده نوارها استفاده شد.

محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC= Polymorphic information content) از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ محاسبه شد، در اینجا p برابر با مجموع نوارهای هر لوکوس برای کلیه ژنوتیپها است (۸). همچنین شاخص نشانگری (MI= Marker Index) از رابطه $MI = PIC \times N \times B$ به دست آمد که N تعداد کل باندها و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر بود (۱۸). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR= Effective multiplex ratio) از رابطه $EMR = NPB \times \beta$ که از درصد چندشکلی (β) ضربدر تعداد نوارهای چندشکل (NPB) به دست آمد (۱۱) و قدرت تفکیک (RP= Resolving power) از رابطه $RP = \sum IB$ محاسبه گردید. $IB = 1 - [2 \times (0.5 - P_i)]$ و P_i نسبت افراد دارای نوار است (۱). در پایان نیز داده‌های حاصل، با استفاده از نرم افزارهای NTSYSpc 2.02e برای محاسبه ماتریس تشابه و

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکلی در بین آغازگرهای مورد بررسی برابر ۹۸/۴۸ بود که درصد چند شکلی برای SC20 (۸۳/۳۳ درصد) و برای سایر

از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپها را مشخص کند. آغازگر SC10 (۰/۲۹) با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپها نداشت. میانگین شاخص RP برابر ۲/۸۳۷ بود که آغازگرهای SC59 (۵/۴۱) و SC11 (۴/۷۱) بیشترین میزان و آغازگر SC15 دارای کمترین میزان بود. همچنین میانگین

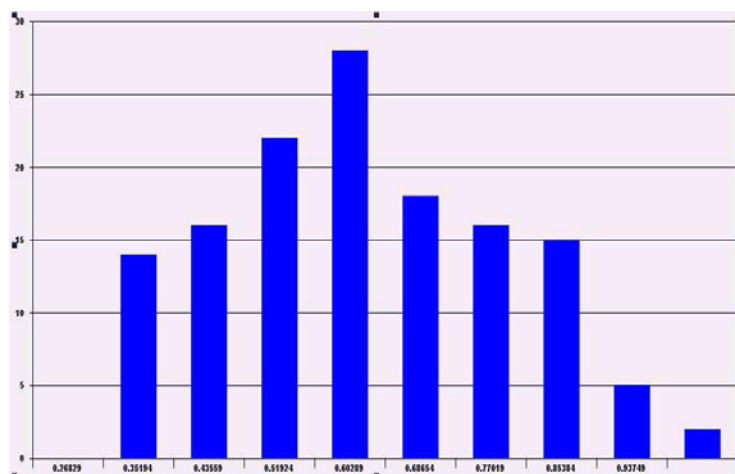
آغازگرهای مورد بررسی

موقع	قدرت تلفاتیک	نسبت چندگانہ	شاخص نشانگری	محتری اطلاعات	درصد چند شکلی	تعداد مکان‌های چند شکل	تعداد مکان‌های تکثیر شده	درصد C و G	دما	توالی آغازگر	نام آغازگر
Collard and Mackill (2009) (c)	1/88	4	1/36	0/33	3/100	4	4	7/10/58	58	5'-CCATGGCTACCACCGCC-3'	SC28
	3/41	4/17	1/45	0/35	78/133	5	6	1/64/100	54	5'-ACCATGGCTACCACCGC-3'	SC 20
	5/41	6	2/44	0/33	3/100	6	6	7/50	54	5'-ACAATGGCTACCACCAT-3'	SC 59
	2/59	3	1/17	0/22	3/100	3	3	5/52/94	52	5'-GCAACAATGGCTACCAC-3'	SC 36
	4/59	4	1/36	0/33	3/100	4	4	7/50	54	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	SC 5
	4/71	5	2/22	0/22	3/100	5	5	7/50	54	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	SC 11
	0/97	4	0/33	0/27	3/100	4	4	7/10/58	58	5'-CCATGGCTACCACCGGC-3'	SC 15
	4/22	5	0/33	0/23	3/100	5	5	7/50	54	5'-CAATGGCTACCATTAGCC-3'	SC 44
	4/71	3	0/87	0/29	3/100	3	3	5/52/94	52	5'-CAACAATGGCTACCAGC-3'	SC 10
	1/56	4	1/17	0/22	3/100	4	4	7/10/58	58	5'-ACGACATGGCGACCATC-3'	SC 13
	4/94	6	1/90	0/22	3/100	6	6	1/64/100	54	5'-AACCATGGCTACCACCG-3'	SC 21
	4/83	4/19	1/54	0/36	98/18	4/17	4/36	میانگین			

بررسی میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپها: تشابه ژنتیکی ژنوتیپهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۱۰ تا ۰/۷۳۲ متغیر بود (جدول ۳). بیشترین تشابه را ژنوتیپهای (گیلان غرب ۲) با (ثلاث ۲) (۰/۷۳۲) و کمترین

جدول ۳- ماتریس مشابه ژنوتیپ ها برای پرایمرهای SCoT استفاده شده بر اساس ضریب دایس

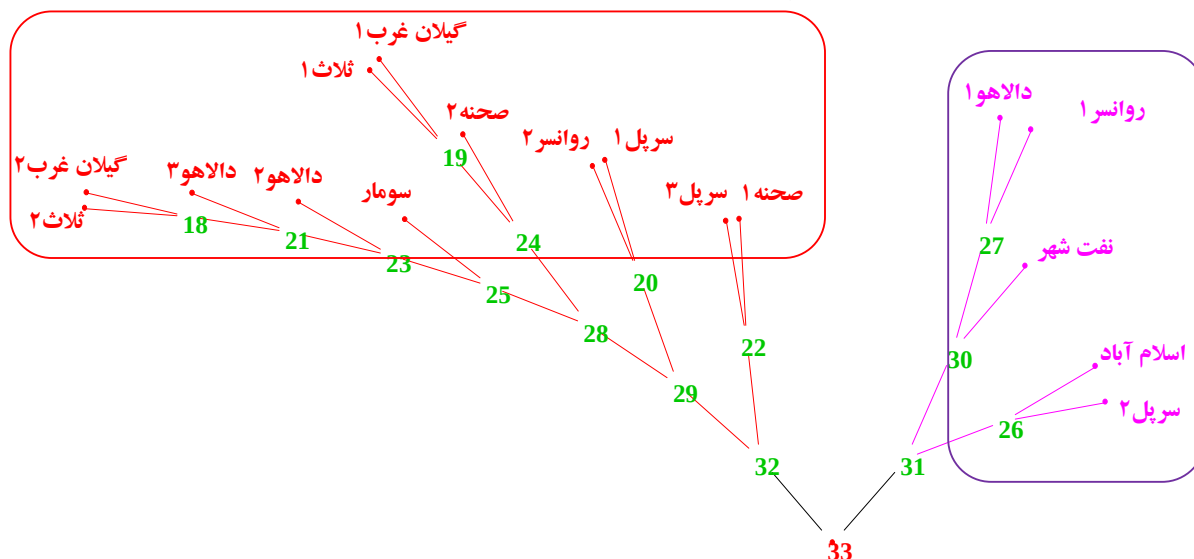
[illegible]



شکل ۳- نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپهای مورد بررسی

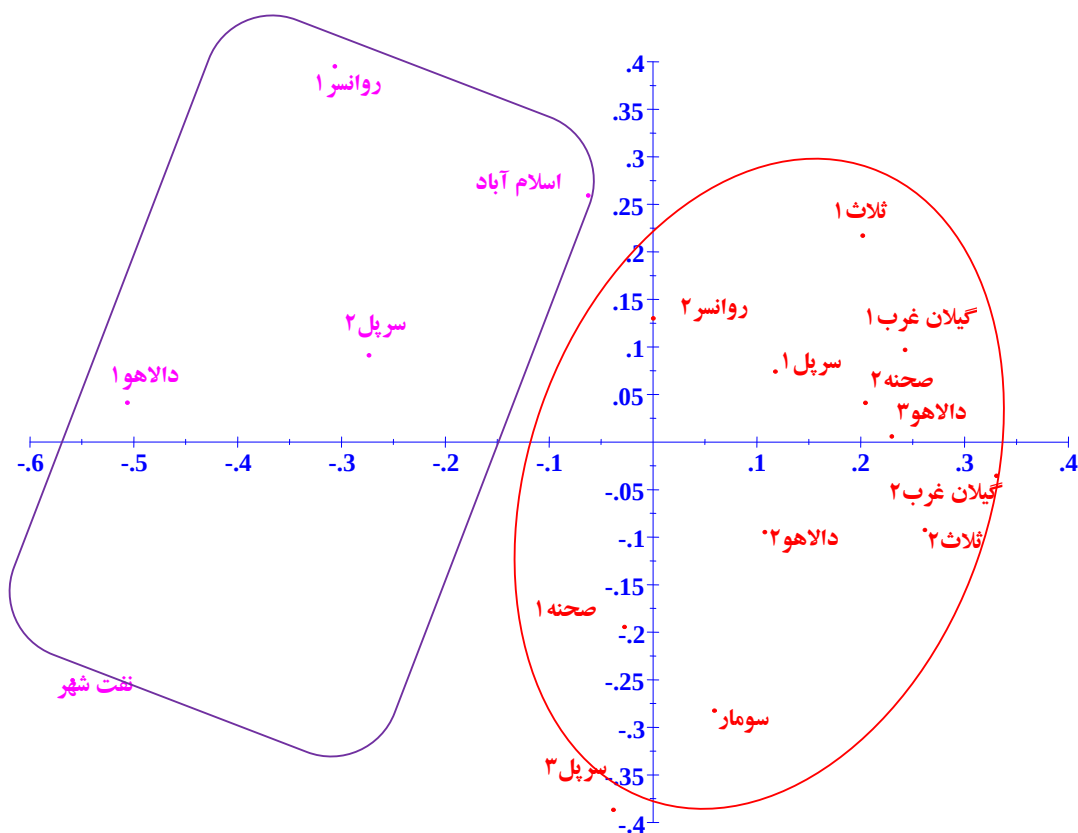
گروه داشتند. در گروه دوم شامل ۱۲ ژنوتیپ (صحنه ۱)، (سرپل ۱)، (سومار)، (سرپل ۳)، (گیلان غرب ۱)، (دالاهو ۲)، (دالاهو ۳)، (صحنه ۲)، (ثلاث ۱)، (گیلان غرب ۲) و (ثلاث ۲) قرار گرفتند. میانگین تشابه در این گروه برابر ۰/۴۰۹، که بیشترین تشابه را ژنوتیپ (صحنه ۱) با (سرپل ۱) و کمترین تشابه را ژنوتیپ (گیلان غرب ۲) با (ثلاث ۲) در این گروه داشتند.

تجزیه خوشه‌ای: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس برای ژنوتیپها در شکل ۴ ارائه شده است. همچنان که ملاحظه می‌گردد ژنوتیپها در ۲ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپهای (روانسر ۱)، (سرپل ۲)، (دالاهو ۱)، (نفت شهر) و (اسلام آباد) بود. میانگین تشابه در این گروه برابر ۰/۴۲۰، که بیشترین تشابه را ژنوتیپ سرپل ۲ با اسلام آباد و کمترین تشابه را ژنوتیپ نفت شهر با اسلام آباد در این



شکل ۴- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر SCoT برای ژنوتیپهای مریم نخودی، اعداد روی شکل نشان دهنده روابط و تشابه ژنتیکی ژنوتیپهای مورد بررسی با یکدیگر می‌باشد

اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپها رسم گردید (شکل ۵)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای و ماتریس تشابه کاملاً مطابقت داشت و ژنوتیپها به دو گروه تقسیم شدند به نحوی که ژنوتیپهایی که دارای بیشترین تشابه در ماتریس تشابه بودند و در تجزیه خوشه‌ای نیز در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند، در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز در کنار یکدیگر قرار گرفتند.



شکل ۵- بای پلات ژنوتیپها برای نشانگر SCoT بر اساس محور مؤلفه‌های اصلی اول و دوم

وجود داشت به عبارت دیگر گروه‌بندی به صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد که در درون گروهها تنوع بیشتر از بین گروهها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروهها برابر ۷۶ درصد و در بین گروهها تنوع برابر ۲۴ درصد مشاهده گردید.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal components analysis): بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ژنوتیپها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۲۳/۵۵ و ۱۹/۲۰ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۴۲/۷۵ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مؤلفه‌های

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA= Molecular variance analysis): تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای انجام شد (جدول ۴)، که ژنوتیپها در داخل ۲ گروه قرار گرفتند بر اساس آماره PhiPT در بین گروهها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر SCoT

PhiPT	درصد از واریانس	واریانس برآورد شده	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
	Var%	Est. Var.	MS	SS	Df	S.O.V
۰/۲۴*	٪۲۴	۲/۵۶۲	۲۶/۲۱۹	۲۶/۲۱۹	۱	بین گروه‌های کلاستر
	٪۷۶	۸/۱۳۴	۸/۱۳۴	۱۲۲/۰۱۷	۱۵	درون گروه‌های کلاستر
	٪۱۰۰	۱۰/۶۹۶		۱۴۸/۲۳۵	۱۶	کل

* اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار

بحث و نتیجه گیری

متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر بالا بودن قابلیت پرایمر یا مارکر مورد استفاده در غربال نمودن ژنوتیپهاست. بهترین شاخص برای انتخاب پرایمر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیر پذیری دارد (۱). در حالت کلی و بر اساس کلیه شاخصهای مورد بررسی در این مطالعه مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی گونه مریم نخودی (*T. polium* L.)، آغازگرهای SC59 و SC11 تعیین شد، که پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپهای این گونه در تحقیقات بعدی استفاده گردند. Esfandiary و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از اکوتیپهای مختلف مریم نخودی (*T. polium* L.) با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس شاخصهای درصد چندشکلی، قدرت تفکیک (RP) و محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) آغازگرهای برتر را جهت آنالیز ژرم‌پلاسما این گونه معرفی نمودند (۷).

میانگین تشابه بین ژنوتیپها در این مطالعه برابر ۰/۴۲۰ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان‌دهنده تنوع-ژنتیکی خوب و قابل قبولی در بین ژنوتیپهای مریم نخودی (*T. polium* L.) بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. که این موضوع می‌تواند به سبب طول بلند آغازگرهای SCoT و تکثیر انتخابی‌تر باشد. هیبریداسیون بین ژنوتیپها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در این گیاه دارویی باشد. از آنجایی که نشانگر مولکولی SCoT تنوع را براساس مناطق ژنی نشان می‌دهد (تکثیر نواحی با کدون آغاز)،

همانطور که در قسمت نتایج نشان داده شد، با استفاده از آغازگرهای SCoT تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپهای مریم نخودی (*T. polium* L.) وجود داشته و چند شکلی مطلوبی بر اساس مارکر SCoT در بین ژنوتیپها مشاهده شد. Noruzi Gharatape و همکاران (۲۰۱۲) به منظور بررسی ساختار و مقایسه تنوع ژنتیکی ۷۷ فرد از ۸ توده مختلف گیاه دارویی مریم نخودی (*T. polium* L.) از نشانگرهای ISSR استفاده کردند، ۱۸ آغازگر مورد استفاده در آن مطالعه ۱۹۸ مکان قابل امتیاز تولید نمودند که از این تعداد ۱۸۴ مکان چند شکل بودند (۱۴). میانگین درصد چند شکلی در بین آغازگرهای مورد بررسی برابر ۹۸/۴۸ بود. براساس نتایج این مطالعه با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT درصد چندشکلی بالایی مشاهده گردید، این نتایج با مطالعات دیگری که با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT بر روی نخود (*Cicer. Sp*)، انبه (*Mangifera indica* L.) و رمی (*Boehmeria nivea* L.) انجام گردیده مطابقت داشت (۲، ۱۲ و ۱۹). محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، یکی از شاخصهای مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری داشته که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) بالا برای تمایز ژنوتیپهای خویشاوندی نزدیک مفید هستند (۲۷). این شاخص از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب

استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی در جهت هتروزیس به منظور اصلاح و افزایش ترکیبات می‌تواند بسیار مؤثر باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای درون ژنوتیپهای مریم نخودی (*T. polium* L.) غرب کشور، حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسما و استفاده از روشهای تکثیر مناسب این گیاه توصیه می‌شود.

در این تحقیق برای مشخص کردن بهترین شاخص تشابه و تشخیص بهترین الگوریتم برای ترسیم مناسب‌ترین دندروگرام برای گزارش نتایج، شاخصهای تشابه شامل دایس و جاکارد با روشهای اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) محاسبه و بر اساس ضرایب کوفتیک حاصل از آزمون مانتل مقایسه شدند. با توجه به نتایج به دست آمده الگوریتم UPGMA و شاخص دایس در آزمون مانتل ضریب کوفتیک بالاتری نشان داد (۹۱ درصد). همچنان که ملاحظه می‌گردد ژنوتیپها در ۲ گروه قرار گرفتند. Pesaraklu و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های مریم نخودی (*T. polium* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD تنوع مطلوبی را در بین جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده و گزارش نمودند که این نشانگر کارایی بالایی در تفکیک کردن جمعیت‌ها از یکدیگر دارد به صورتی که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تا حدودی تطبیق داشت (۱۷). همچنین Boussaid و همکاران (۲۰۱۰) نیز با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت گیاه مریم نخودی (*T. polium* L.) را در کشور تونس مورد بررسی قرار داده و تنوع ژنتیکی بالایی درون جمعیت این گیاه به دست آوردند (۳).

از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای که منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود استفاده می‌-

گردد. در مجموع ۴۲/۷۵ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید، این موضوع به نوبه خود می‌تواند نشان دهنده پراکنش گسترده آغازگرهای مختلف بر روی سطح ژنوم و همه کروموزوم‌های مریم نخودی (*T. polium* L.) باشد. میزان توجه مؤلفه اول و دوم در این تحقیق با نتایج Zamani و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت (۳۰). در بررسی Tabtib (۲۰۱۴) بر روی ۸ جمعیت گونه *Teucrium polium* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR تنوع بالایی بر اساس آغازگرهای مورد بررسی مشاهده و از تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای گروه بندی جمعیتها استفاده شد (۲۶).

همچنین از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیتها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به عنوان یک جمعیت و جمعیت‌های درون آن به عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام گیرد. نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروهها به وجود آید، به عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در درون گروهها تنوع بیشتر از بین گروهها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروهها برابر ۷۶ درصد و در بین گروهها تنوع برابر ۲۴ درصد مشاهده گردید. در مطالعه Tabtib (۲۰۱۴) بر روی ۸ جمعیت مریم نخودی (*T. polium* L.) نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع در درون جمعیتها بیشتر از بین جمعیتها می‌باشد، به صورتی که تنوع در درون جمعیتها برابر ۷۷ درصد و در بین جمعیتها برابر ۲۳ درصد گزارش گردید (۲۶). در بررسی Zamani و همکاران (۲۰۱۶) بر روی کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT تنوع بین جمعیتها ۱۱ درصد و درون جمعیتها ۸۹ درصد گزارش گردید (۲۹).

سپاسگزاری

می‌شود. در ضمن کلیه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است. که از این بابت از مسئولان مربوطه تشکر و قدردانی

منابع

- Altıntaş, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A., and Zkan, H.O. (2008). Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Amirmoradi, B., Talebi, R., and Karami, E. (2012). Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 298:1679-1688.
- Boussaid, M., Boulia, A., Bejaoui, A., and Messaoud, C. (2010). Genetic diversity and population structure of *Teucrium polium* (*Lamiaceae*) in Tunisia. *Biochemical Genetics*, 48:57-70.
- Canter, P. H., Thomas, H., and Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 23(4):180-185.
- Collard, B.C.Y., and Mackill, D.J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27:86-93.
- Doyle, J.J., and Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19:11-15.
- Esfandiyari, S., Farshadfar, M., Safari, H., Shirvani, H., and Esfandiyari, S. (2017). Genetic variability of *Teucrium polium* ecotypes using ISSR molecular markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25 (1): 135-147. (In Farsi).
- Hou, Y., Yan, Z., and Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. *Genetics Newsletter*, 35:9-22.
- Kalendar, R. (2007). FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm; 2007.
- Kumar, J., and P. Gupta, K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*, 2:93-112.
- Kumar, M., Mishra, G P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P K., and Singh Sh.B. (2009). Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 225-236.
- Luo, C., He, X. H., Chen, H., Hu, Y., and Ou, S.-J. (2012). Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59:1505-1515.
- Mulpuri, S., Muddanuru, T., and Francis, G. (2013). Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. *Plant Science*, 207:117-127.
- Noruzi Gharatape, R., Bernusi, I., Moghadam, A.F., Abdollahi Mandulakani, B., and Jafari, M. (2012). Assessment of genetic diversity in different masses of medicinal plant *Teucrium polium* using ISSR markers. The 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Peakall, R., and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288-295.
- Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, JP. (2006). DARwin soft ware, <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Pesaraklu, A., Mianabadi, M., Bagherieh, Najjar MB., Sattarian, A., and Baghizadeh, A. (2013). Genetic diversity of different populations of Iranian *Teucrium polium* L. using RAPD markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 21 (1): 24-36.(In Farsi).
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP

- and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- 19- Pratik, S., Maya, K., Sourav, J., Sabyasachi, M., Amit, S., Karmakar, P.G., and Ray, D.P. (2015). Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta Gene*, 3:62-70.
 - 20- Rajaram, S. (2010). International wheat breeding. The Proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress: Crop Production, Pp: 225-238.
 - 21- Rohlf, F., and Taxonomy, N. P.N. (1998). *Multivariate Analysis System*, Version 2.02. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc.
 - 22- Sajadi, S.E., and Shokouhinia, Y. (2010). Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. subsp *syspirense* (c. koch) growing wild in Iran. *Journal of essential oil bearing plants*, 13(2):175-180.
 - 23- Singh, S.K. (2003). Cluster analysis for heterosis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Genetics*. 63(3):249-250.
 - 24- Solimani, V.D., Baum, B. R., and Jahason, D.A. (2002). AFLP and pedigree based genetic diversity estimates cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104:350-357.
 - 25- Stachel, M., Lelley, T., Grausgruber, H., and Vollmann, J. (2000). Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:242-248.
 - 26- Tabtib, B. (2014). Assessment of genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium*. *Bulletin of the Georgian national academy of sciences*, 8(1):72-76.
 - 27- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D., and Melwyn, GS. (2008). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sciatica Horticulture*, 118: 1-7.
 - 28- Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jackson, M.T., and Newbury, H. J. (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, 74: 170-179.
 - 29- Zamani, N., Zamani, W., and Mirzaei, K. (2016). Genetic diversity analysis of *Ziziphora tenuior* L. using SCoT markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24 (2): 176-189. (In Farsi).

Genetic variation study of *Teucrium polium* genotypes in the west of Iran using SCoT molecular markers

Farshadfar M.¹, Shirvani H. ¹, Amjadian M.¹ and Noorian A.M.²

¹ Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Teucrium polium L. is one of the well-known medicinal and aromatic plants. In this study, we have used the SCoT marker to determine genetic variation among 17 genotypes of *Teucrium polium* collected from Kermanshah province, Iran. All of the SCoT primers showed 48 polymorphic bands. The primers of Sc20, Sc59 and Sc21 showed the highest number of band (6 bands) and Sc15 showed the lowest number of bands (2 bands). The mean polymorphic information content (PIC=0.361), marker index (MI= 1.525), Effective multiplex ratio (EMR= 4.197), polymorphism percentage (98.485%) and Resolving Power (RP=2.837) indices were calculated for all primers. The greatest similarity was between Gilan-gharb2 and Salas2 stations with 0.732 values. The lowest genetic similarity was between Naft-Shahr with Gilan-gharb1 and Gilan-gharb2 stations with 0.1. The cluster analysis group showed that the genotypes were classified into two groups, and the results of the clustering were confirmed by the use of molecular variance analysis (AMOVA) and principal components analysis (PCoA).

Key words: *Teucrium polium*, Genetic variation, molecular marker, SCoT