مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

بررسي تنوع ژنتيكي جمعيت‌هاي گونه *Thymus eriocalyx* با استفاده از مارکر مولكولي RAPD

رمضان كلوندي[۱،۲]، مرتضي عطري[۳]، سید محسن حسام زاده حجازي[۴] و محسن رجبی[۱*]

چكيده

جنس .*Thymus* L يكي از بزرگترين جنس هاي خانواده نعنا و گياهان آروماتيك است. گياهان اين جنس به دليل دارا بودن اسانس-هاي روغني ارزش تجاري دارند. گونه *Thymus eriocalyx* يكي از گونه هاي اين جنس است كه انحصاري فلات ايران است. به منظور بررسي هاي مولكولي در افراد جمعيت هاي گونه *Thymus eriocalyx* در ايران، ۱۰ رويشگاه در استانهای لرستان، مرکزی، همدان، كرمانشاه و كردستان انتخاب شد (با استفاده از روش DSS) (تعداد ۵۰ نمونه گياهي). تعداد ۱۵ پرايمر ۱۰ نوكلئوتيدي انتخاب گرديد. داده هاي مولكولي بر اساس آزمايشات RAPD، جمعيت ها را در ۵ گروه مجزا قرار داد. آغازگرهاي مورد استفاده ۷۱ باند ايجاد كردند كه ۶۸ باند پلي مورفيسم نشان دادند. آغازگرهای OPA-05، OPA-17، OPD03 و OPE-20 با داشتن بالاترين درصد پليمورفيسمي و شاخص نشانگري، داراي قابليت بسيار خوبي براي بررسي تنوع ژنتيكي در گونه مورد مطالعه بودند. جمعيت هاي p2 و p7 بيشترين آلل مؤثر و جمعيت p9 كمترين آلل مؤثر را دارا بودند. بيشترين و كمترين ميزان ميانگين هتروزيگوسي مورد انتظار به ترتيب متعلق به جمعيت P2 و P9 بود. بيشرين تشابه ژنتيكي بين دو ژنوتيپ P2 و P3 و كمترين تشابه ژنتيكي بين دو ژنوتبپ P2 و P10 مشاهده شد. نتايج حاصل از تجزيه واريانس داده‌ها (AMOVA) نشان داد كه ميزان تنوع در درون جمعيت هاي اين گونه (۶۸%) از ميزان تنوع در بين جمعيت ها (۳۲%) بيشتر است كه اين حقيقت، اهميت گزينش تک بوته و توجه به افراد در برنامه هاي اصلاحي آويشن را ثابت مي كند.

واژه‌های کلیدی: آويشن، تنوع ژنتيكي، مارکر، RAPD

[۱] بخش منابع طبيعي، مركز تحقيقات و آموزش كشاورزي و منابع طبيعي استان همدان، سازمان تحقيقات، آموزش و ترويج وزارت جهاد كشاورزی، همدان، ايران.
*نويسنده مسئول، ايميل: m.rajabi@areeo.ac.ir
[۲] دانش آموخته زيست شناسي گياهي، گروه زيست شناسي، دانشكده علوم، دانشگاه بوعلي سينا، همدان، ايران
[۳] استاد گروه زيست شناسي، دانشكده علوم، دانشگاه بوعلي سينا، همدان، ايران
[۴] عضو هيئت علمی گروه زيست فناوری مؤسسه تحقيقات جنگلها و مراتع كشور، ايران

مقدمه

تأثیر و اهمیت گیاهان دارویی در زندگی روزانه اقوام و ملت‌های مختلف سبب شده تا هر قوم یا هر ملتی بر حسب توان، ادراک، تجربه و حتی حدس و گمان خود، از اثر درمانی گیاهان به روش‌های گوناگون استفاده کند. به تدریج انباشت دانسته‌ها و تجربه‌ها با گذشت زمان موجب پدید آمدن نظرات و مکاتبي در ملل و اقوام جهان برای استفاده هر چه بیشتر از گیاهان دارویی، استخراج مواد شفابخش و یافتن اثر درمانی گوناگون آن‌ها شد (ولاگ، ۱۳۸۲). در این زمینه خانواده نعناع، بعنوان یکی از مهمترین خانواده‌های گیاهی با پراکنش جهانی و نیازهای اکولوژیکی بسیار متفاوت از اهمیت خاصی برخودار است. اغلب نعناعیان تولید کننده ترپن‌ها و ترکیبات مفید دیگر هستند که اغلب در غدد اپیدرمی اندام‌های هوایی ذخیره می‌شوند (هي، ۱۳۷۹). آویشن (Thymus) یکی از مهمترین جنس‌های خانواده نعناع با حدود حداقل ۲۲۰ گونه در جهان می‌باشد. ماده مؤثره آویشن در اسانس می‌باشد که قسمت اعظم آن را فنل‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد) و هیدروکربن‌هاي مونوترپني (مثل پارا-سیمن و گاما-ترپینن) تشکیل مي‌دهند. به طور طبیعي تیمول جزء اصلي فنلي در آویشن است و کارواکرول نیز یک جزء فرعي می‌باشد (Leung, 1996). از آنجا که ژرم‌پلاسم‌های طبیعی بعنوان ذخیره و ثروت ملی هر کشور به حساب می‌آیند، لذا، بررسی، اشاعه و معرفی آنها دارای اهمیت دو چندان می‌باشد. گونه آویشن *Thymus eriocalyx* بعنوان یکی از این ذخائر ژنتیکی با توجه به گستردگی بالا در کشور از این حیث مستثنی نیست. تنوع زیستی گستره‌ای غنی از موجودات است که تمام گونه‌های جهان را شامل می‌شود و واژه‌ای است که به تغییرات بین ژن‌ها، گونه‌ها و اکوسیستم‌ها و تنوع در ساختار، عملکرد و ترکیب در هر یک از سطوح آن‌ها می‌پردازد (Biggs et al., 2006). در پیمان نامه‌ی تنوع زیستی[1]، تنوع زیستی به معنی گوناگونی بین موجودات زنده در کلیه‌ی شکل‌های آن اعم از موجودات خشکی، دریایی و سایر موجودات اکوسیستم‌های آبی و مجموعه‌های اکولوژیکی که این موجودات بخشی از آن سیستم قلمداد می‌شود، تعریف می‌شود و سه سطح تنوع درون گونه‌ای، تنوع بین گونه‌ای و تنوع بوم‌سازگان را شامل می‌شود (اجتهادی و همکاران، ۱۳۸۷).

با توجه به اینکه در سال هاي اخیر از نشانگرهاي مولکولي براي مطالعات پایه‌اي و کاربردي استفاده شده است و فرصت مناسبي را براي بررسي تنوع و تفاوت موجودات در سطح DNA امکان پذیر کرده است و همچنین به دلیل فقدان مطالعات مولکولي در گونه‌هاي جنس *Thymus* در ایران و با توجه به اینکه در جنس آویشن هنوز توالي هاي بازي بسیاري از نقاط ژنوم آن شناسایي نشده است بنابراین براي بررسي تنوع ژنتیکي در این جنس باید از مارکري استفاده شود که نیازي به اطلاعات اولیه در مورد توالي بازي DNA مورد نظر نداشته باشد و بر این اساس چون مارکر مولکولي RAPD داراي این ویژگي بود، بنابراین از این مارکر مولکولي جهت بررسي تنوع ژنتیکي جمعیت هاي این گونه در ایران استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۱۰ جمعیت از گونه Jalas (Ronniger) *Thymus eriocalyx* از مناطق پراکنش این گیاه در ایران انتخاب شد. اطلاعات مربوط به محل‌هاي جمع آوري شده به همراه کد مناطق در جدول شماره ۱ آورده شده است.

[1] Convention of Biological Diversity

مواد گیاهی در این آزمایش در کل با توجه به اینکه گیاه آویشن، گیاهي دگرگشن است شامل پنج فرد از ده جمعیت در مناطق مورد بررسي بود كه در مرحله رويشي از برگ هاي تازه و جوان بوته ها برداشت شدند. نمونه ها پس از بر داشت در محل جمع آوري در داخل ازت مايع قرار داده شدند. يك نمونه آويشن باغی نیز به عنوان شاهد از باغ گیاهشناسی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه های برگی و با استفاده از روش Murray and Thompson (۱۹۸۰) یاروش CTAB با اندکی تغییرات انجام شد. پس از استخراج DNA در جمعیت هاي مختلف، براي بررسي كيفي DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه الكتروفورز استفاده شد. براي بررسي كميت DNA نيز از دستگاه اسپكتروفتومتر استفاده شد. جهت تكثير قطعات DNA با استفاده از واكنش زنجيره اي پليمراز، از ۱۵ آغازگر تصادفي ۱۰ نوكلئوتيدي متعلق به گروههاي A، B، D و E ساخت شركت Operon استفاده گرديد كه در نهايت از بين آنها ۷ آغازگر كه باندهايي با وضوح بالا و قابل رتبه بندي توليد نمودند و پلي مورفيسم بالايي نشان دادند براي بررسي تنوع انتخاب گرديد (جدول ۲). برنامه ريزي حرارتي و زماني دستگاه ترموسايكلر براي تكثير قطعات DNA به شرح ذيل بود:

۱. مرحله پيش واسرشتگي (Pre-Denaturation): در دماي ۹۵ درجه سانتيگراد براي مدت ۵ دقيقه.

۲. مرحله واسرشته سازي (Denaturation): در دماي ۹۵ درجه سانتيگراد براي مدت ۱ دقيقه.

۳. مرحله اتصال آغازگرها (Annealing): دماي اين مرحله بسته به نوع آغازگرهاي مورد استفاده متفاوت بود اما طول مدت اين مرحله ۱ دقيقه در نظر گرفته شد.

۴. مرحله تكثير DNA يا بسط آغازگرها (DNA extension): در دماي ۷۲ درجه ساتيگراد براي مدت ۱/۵ دقيقه.

۵. مرحله بسط نهايي (Final extension): در دماي ۷۲ درجه سانتيگراد براي مدت ۱۰ دقيقه.

واكنش زنجيره اي پليمراز در ۴۰ سيكل انجام گرديد و در نهايت ميكروتيوب ها بهمراه محتويات آنها تا زمان بررسي بر روي ژل آگارز، در دماي ۴ درجه سانتيگراد (در يخچال) نگهداري شد.

لازم بذكر است كه جهت تجزيه آماري داده هاي مولكولي از نرم افزارهاي Popgene, Ver. 1.31 (Yeh et al., 1999) و *Genalex* استفاده شد. همچنين هتروزيگوسيتي كل (Ht: Total Heterozygosity)، هتروزيگوسيتي درون جمعيت‌ها (Hs: Subpopulation Heterozygosity)، ضريب تنوع بين جمعيت ها (Gst: G- statistic) و تخمين جريان ژني از Gst يا Gcs (Nm: Number of migrant) براي هر يك از مكان هاي آللي توسط نرم افزار Popgene محاسبه شد. با كمك Ht وHs به دست آمده شاخص Fst (F-statistic) از طريق فرمول زير محاسبه شد (Lynch & Milligan, 1994):

$$Fst= 1-Hs/Ht$$

تجزيه واريانس داده هاي مولكولي با استفاده از نرم افزار Gene Alex, Ver. 6.1 انجام شد.

نتايج و بحث

فهرست اسامي آغازگرها به همراه توالي، تعداد كل مكان هاي ژني تكثير شده، تعداد مكان هاي ژني پلي مورفيک، درصد پلي مورفيسم، و محدوده اندازه باندهاي توليد شده توسط هر آغازگر، در جمعيت هاي مختلف گونه *T. eriocalyx* در جدول۳ نشان داده شده است. با استفاده از ۱۵ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۷۱ باند يا مكان ژني (بطور متوسط ۱۰/۱۴ مكان ژني براي هر آغازگر) توليد شد

که از لحاظ اندازه در بازه طولي ۳۰۰۰bp-۳۰۰bp بودند که از بین آن‌ها ۳ باند در بین تمام نمونه‌ها یک شکل (مونومورفيك) بودند و ۶۸ باند در بین حداقل دو نمونه چند شکلی(پلي مورفيك) نشان دادند. اندازه باندهای تولید شده در تمام آغازگرها در محدوده ۲۳۷۲-۳۶۵ جفت باز تخمین زده شد. به طور میانگین تعداد ۱۰/۱۴ باند به ازاي هر آغازگر به دست آمد که تعداد ۹/۷۱ باند از آنها پلي‌مورفيك بودند. بیشترین تعداد باندهای تکثیر شده ۱۲ عدد و به وسیله آغازگرهاي OPA05 و OPE19 و کمترین باند تکثیر شده با آغاز گر OPB11 با تعداد ۸ باند حاصل گردید. بیشترین درصد چند شکلی (پلي مورفیسم) مربوط به آغازگرهای OPA05، OPA17، D03، و E-20 با میزان ۱۰۰ درصد و کمترین درصد پلي مورفیسم در آغاز گر OPB11 به میزان ۸۷/۵۰ درصد مشاهده گردید (شکل ۱). با توجه به موارد فوق ۴ آغازگر مذکور، آغازگرهاي مناسبي براي تکثیر نواحي مختلف ژنوم جمعیت هاي آویشن و تفکیک جمعیت هاي این گونه مي باشند. سونار و همکاران (۲۰۰۹) نیز در بررسي تنوع ژنتیکي برخي از گونه هاي جنس آویشن با استفاده از مارکر مولکولي RAPD، آغازگرهاي OPA13, OPB-10, OPH-16, OPH-17, OPH-18 و OPY-7 را بدلیل پلي مورفیسمي بالا بعنوان آغازگرهاي مناسب براي بررسي تنوع در آویشن معرفي نمودند.

میانگین تعداد چند شکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۹/۷۱ باند بود و متوسط درصد چند شکلی در کل ۹۵/۴۴ درصد تخمین زده شد. این میزان دارای تنوعی از ۸۷/۵۰ درصد (B-11) تا ۱۰۰ درصد (OPA05، OPA17، OP،D03 و OPE-20) بود (جدول ۳). احتمالاً اگر تعداد نمونه‌های گونه آویشن مورد بررسي بیشتر بود تعداد چند شکلی نیز افزایش بیشتری می‌یافت. در مطالعات قبلی این درصد چند شکلی در بین گونه‌های دارویی و معطر خانواده نعناع نظیر سالویا (*Salvia fruticosa*)، ریحان (*Ocimum gratissimum*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) نیز گزارش گردیده است (Skoula, 1999; Vieria, 2001; Mewes, 2008). میانگین هریك از عامل هاي هتروزیگوسیتي کل (Ht)، هتروزیگوسیتي درون جمعیت ها (Hs)، ضریب تنوع ژنتیکي بین جمعیت ها (Gst)، تخمین جریان ژني از Gst یاGct (Nm) براي هر یك از مکان هاي آللي در زیر آمده است:

Ht=۰/۲۵ , Hs=۰/۱۲, Gst=۰/۵۲, Nm=۰/۴۴

با توجه به فواصل ژنتیکي در بین جمعیت‌هاي مختلف گونه *T. eriocalyx*، کمترین فاصله ژنتیکي (۰/۰۴۱) و در عین حال بیشترین شباهت (۰/۹۶) بین دو جمعیت p2 (اشتران کوه-لرستان) و p3 (درود-لرستان) مشاهده شد. با توجه به اینکه منشاء هر دو جمعیت از یک استان و مناطق جغرافیایي نزدیک بهم مي باشد بنابراین نتیجه حاصله دور از انتظار نیست. دو جمعیت p2 (اشتران کوه-لرستان) و p10 (سقز-کردستان) نیز بیشترین فاصله ژنتیکي (۰/۲۶۲) و در عین حال کمترین شباهت را در بین جمعیت هاي مختلف گونه *T. eriocalyx* نشان دادند که نتیجه حاصله مي تواند ناشي از فاصله جغرافیایي منشاء دو جمعیت مذکور از یکدیگر باشد.

در مقایسه دو گونه *T. eriocalyx* و *T. vulgaris*، بطور کلي با توجه به متفاوت بودن گونه ها، جمعیت هاي دو گونه فاصله ژنتیکي بالایي را نشان دادند اما با این حال دو جمعیت p9 (سنندج - کردستان) متعلق به گونه *T. eriocalyx* و p11 (تهران) متعلق به گونه *T. vulgaris*، بیشترین فاصله ژنتیکي (۰/۳۶۶) و اختلاف را نشان دادند. دو جمعیت p7 (خان گرمز-همدان) از گونه *T. eriocalyx* و p11 (تهران) از گونه *T. vulgaris* نیز کمترین فاصله ژنتیکي (۰/۲۰۶) را داشتند که این امر بیانگر قرابت ژنتیکي دو جمعیت مذکور است و میتواند در برنامه هاي اصلاحي دو گونه فوق مورد توجه قرار گیرد. بیشرین تشابه ژنتیکي در بین جمعیت هاي *T. eriocalyx* بین دو ژنوتیپ P2 و

P3 (۰/۹۳۳) و کمترين تشابه ژنتيكي بين دو ژنوتيپ P2 و P10 (۰/۷۷۰) مشاهده شد.

در ارزيابي ماتريس فاصله، جمعيت هايP2 و P3 (هردو از استان لرستان) با ميزان فاصله ۰/۰۴۱ بيشترين شباهت را در بين جمعيت هاي مورد مطالعه داشتند كه با توجه به اين كه هر دو در يك استان قرار دارند، نتيجه به دست آمده مي تواند از فاصله جغرافيايي جمعيت ها نشأت گرفته باشد. نتايج ماتريس فاصله نشان مي دهد كه جمعيت هاي P2 (استان لرستان) و P1O (استان كردستان) با ميزان فاصله ۰/۲۶۲ بيشترين تفاوت را نشان دادند كه نتيجه حاصل شده مي تواند متأثر از فاصله جغرافيايي زياد جمعيت ها از يكديگر باشد. ميزان فاصله محاسبه شده در بين جمعيت هاي مورد مطالعه، بر اساس باندهاي پلي مورفيسم در دامنه اي از۰/۰۴۱ تا ۰/۲۶۲ قرار داشت. نتايج ماتريس فاصله همچنين نشان داد كه جمعيت P9 (آويشن مورد مطالعه) وp11 (آويشن باغي) با ميزان ۰/۳۶۶ بيشترين تفاوت را در بين توده هاي مورد بررسي از آن خود كرده اند كه دليل آن را مي‌توان متفاوت بودن گونه‌هاي اين دو جمعيت ذكر كرد. نتايج نشان داد كه از كل ۷۱ لوكوس موجود در جمعيت هاي مورد مطالعه، ۶۸ لوكوس پلي مورفيسم نشان دادند؛ يعني ۹۵/۷۷% پلي مورفيسمي دارند كه نشان دهنده اين است كه پرايمرهاي به كار رفته پرايمرهاي مناسبي بوده اند. با توجه به نتايج بالا و همچنين شكل هاي ۲ و ۳ نكات مهم زير قابل بيان مي باشد:

- بيشترين باندهاي تشكيل شده و همچنين بيشترين تعداد باندهاي متفاوت با فراواني ۵ درصد يا بيشتر، متعلق به جمعيت P1 و كمترين آن ها مربوط به جمعيت هاي P7 وp9 مي‌باشد (در اين مطالعه جمعيتp11 متعلق به گونه *Thymus vulgaris* بوده، كه به عنوان شاهد در نظرگرفته شده است) و در مجموع ۴۰۸ باند توسط جمعيت هاي ده گانه مورد مطالعه تشكيل شد.

در مجموع ۷ باند اختصاصي در بين جمعيت هاي مورد مطالعه تشكيل گرديد كه بالاترين باند اختصاصي ايجاد شده متعلق به جمعيت P1 (با ۳ باند) بود.

- بيشترين و كمترين ميزان ميانگين هتروزيگوسي مورد انتظار و ميانگين هتروزيگوسي مورد انتظار نااريب به ترتيب متعلق به جمعيت P2 و P9 مي باشد.
- با توجه به اينكه شاخص هاي شانون و تنوع ژني **Nei** نشان دهنده ميزان تنوع درون جمعيتي هستند بنابراين در اين گونه، جمعيت هاي P2, P4 و P7 از بيشترين تنوع درون جمعيتي و جمعيت P9 از كمترين تنوع درون جمعيتي برخوردار هستند (شكل ۳).
- در اين تحقيق تجزيه مختصات اصلی توانست ۶ عامل اصلی بين داده‌های ملكولی مشخص نمايد و در مجموع اين عوامل توانستند ۷۹/۴۳ درصد كل تغييرات را توجيه كنند عامل اول درصد بالايی از واريانس با ميزان ۳۴/۷۱ درصد را توجيه نمود. عوامل دوم و سوم به ترتيب با ۲۴/۹۱ و ۱۹/۸۱ درصد در رتبه های بعدی قرار گرفتند. در داده‌های مورفولوژيكی هر قدر عوامل اصلی ميزان واريانس بيشتری را به خود اختصاص دهند مطلوب‌تر بوده و تجزيه تحليل نتايج با استفاده از آن‌ها كارآمدتر و ساده‌تر خواهد بود ولی در داده‌های ملكولی هر قدر درصد واريانس اختصاص يافته به عامل‌های اصلی كمتر باشد توزيع بهتری داشته و نشان دهنده اين امر می‌باشد كه نشانگرهای ملكولی نواحی وسيع‌تری از ژنوم را مورد بررسی قرار داده‌اند و در نتيجه اطلاعات بيشتری از مناطق مختلف ژنوم را كه حاوی ژن‌ها كنترل كننده صفات مختلف می‌باشند را مورد هدف و بررسی قرار داده است (محمدی و پراسانا، ۲۰۰۳). شكل۴ نيز نتايج تجزيه كلاستر را نشان مي دهد، كه با آناليز PCO روي محور هاي ۱و۲ همخواني دارد (شكل ۵).

جدول۱- کد جمعیت، محل های جمع آوری، مختصات جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا ی جمعیت های گونه *Thymus eriocalyx* در ایران

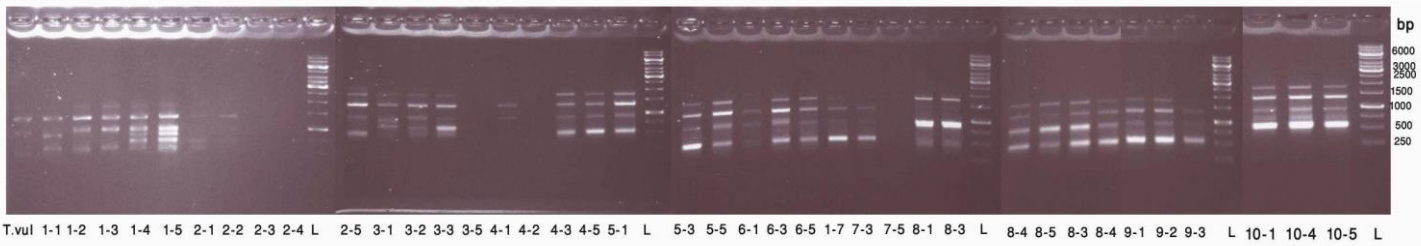
کد جمعیت	محل جمع آوری	مختصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	استان لرستان، ازنا، سفید کوه، منطقه حفاظت شده پناهگاه حیات وحش	N=33o 26' 51/6" E=49 o 22' 13/2"	۲۲۴۵
۲	استان لرستان، ازنا، دره تخت، مهله وک، ارتفاعات اشتران کوه	N=33 o 20' 45/3" E=49o o 22' 02/7"	۲۰۵۳
۳	استان لرستان، دورود، ۲۰ کیلومتری جاده گهر، جاده روستای سرآوند، بعد از امام زاده شاه عبدالله، سمت راست	N=33 o 22' 42/5" E=49 o 09 53/2"	۱۹۰۷
۴	استان مرکزی، اراک، ۳۵ کیلومتری جنوب اراک به طرف شازند، روستای دستجرد، روستای سورانه، کوه راسوند	N=33 o 52' 57/3" E=49 o 25' 59/20"	۲۳۶۲
۵	استان مرکزی، اراک، جاده قم ، روستای لته در، ، کوه آب سر، ارتفاع ۲۵۰۰-۲۲۰۰ متر، شیب شمالي	N=34° 01' 40/1" E=50 o 03' 35/5	۲۵۰۰-۲۲۰۰
۶	استان همدان، ملایر، جوزان، منطقه حفاظت شده لشکر در ،شیب‌هاي شمال و شمال شرقي	N=34 o 14 ' 51/9" E=48 o 54' 51/1"	۱۹۴۲-۱۹۷۰
۷	استان همدان، تویسرکان، روستای تورمیانک، کوه خان گرمز، شیب شمالي	N=34 o 26' 50/5" E=48 o 10' 58/3"	۱۸۶۳
۸	استان کرمانشاه ، کیلومتر ۱۱ جاده سنقر به بیستون، رویروی ایست بازرسی، روستای احمد آباد، کوه دالاخاني، شیب شمال‌غرب064A	N=34 o 40' 19/8" E=47 o 34' 44/1"	۱۹۵۰-۱۹۳۰
۹	استان کردستان، سنندج، جاده قدیم مریوان، گردنه آریز، شیب شمالي و شمال شرقي	N=35 o 24' 55/8" E=46° 50' 46/1"	۲۰۷۰-۲۰۳۵
۱۰	استان کردستان، سقز، جاده روستاي ملقرني، شیب شمالی	N=36 o 15' 15/8" E=46 o 12' 28/5"	۱۸۲۵

جدول ۲- فهرست آغازگرهاي مورد استفاده به همراه توالي و دماي اتصال آنها

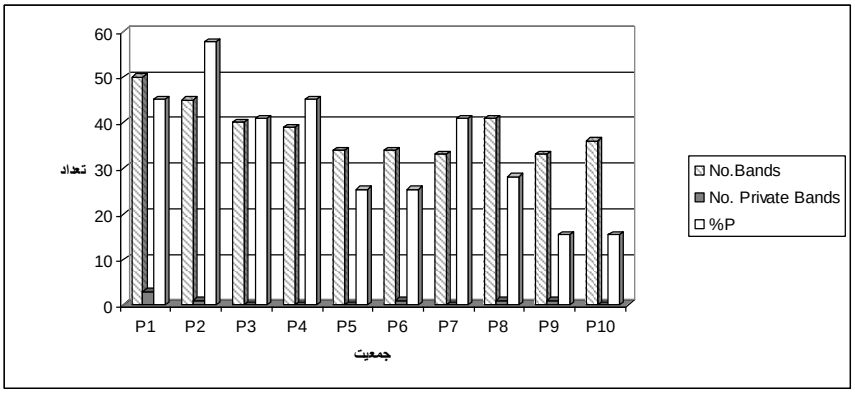
آغازگر	توالي ($5' \rightarrow 3'$)	دماي اتصال (c^o)
OPA-05	5´-AGGGGTCTTG-3´	۲۵
OPA09	5´-GGGTAACGCC-3´	۲۸
OPA17	5´-GACCGCTTGT-3´	۲۷
OPB11	5´-GTAGACCCGT-3´	۲۰
OPD-03	5´-GTCGCCGTCA-3´	۲۷
OPE19	5´-ACGGCGTATG-3´	۲۸
OPE20	5´-AACGGTGACC-3´	۲۶

جدول ۳- مشخصات و نتايج آغازگرهاي مورد استفاده به همراه توالي, تعداد کل مکان هاي ژني تکثير شده, تعداد مکان هاي ژني پلي مورفيک, درصد پليمورفيسم, محتواي اطلاعاتي چند شکلي, شاخص نشانگر و بازه طولي باندهاي توليد شده توسط هر آغازگر در جمعيت هاي مختلف گونه *T.eriocalyx*

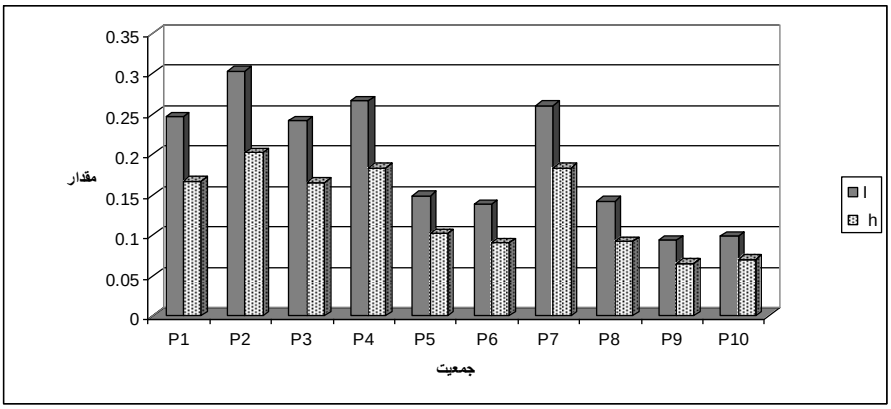
آغازگر	توالی آغاز گر	محتواي اطلاعاتي چند شکلي (PIC)	شاخص نشانگر (MI)	تعداد کل باندهای تکثیر شده (مکان هاي ژني)	تعداد و درصد قطعات چند شکل (پلي مورفيك)		محدوده اندازه طول قطعات DNA تکثیر شده (bp)
					تعداد	%	
OPA05	5´-AGGGGTCTTG-3´	۰/۲۶	۳/۱۲	۱۲	۱۲	۱۰۰/۰۰	۳۰۰-۲۵۰۰
OPA09	5´-GGGTAACGCC-3´	۰/۲۹	۳/۳۲	۹	۸	۸۸/۸۸	۳۰۰-۱۸۰۰
OPA17	5´-GACCGCTTGT-3´	۰/۱۴	۱/۴	۱۰	۱۰	۱۰۰/۰۰	۳۰۰-۲۵۰۰
OPB11	5´-GTAGACCCGT-3´	۰/۲۵	۱/۷۵	۸	۷	۸۷/۵۰	۵۰۰-۱۹۰۰
OPD-03	5´-GTCGCCGTCA-3´	۰/۲۶	۲/۳۴	۹	۹	۱۰۰/۰۰	۳۰۰-۳۰۰۰
OPE19	5´-ACGGCGTATG-3´	۰/۲۸	۳/۰۸	۱۲	۱۱	۹۷/۷۰	۴۵۰-۲۴۰۰
OPE20	5´-AACGGTGACC-3´	۰/۲۵	۲/۷۵	۱۱	۱۱	۱۰۰/۰۰	۴۰۰-۲۵۰۰
				۷۱	۶۸		
میانگین کل				۱۰/۱۴	۹/۷۱	۹۵/۴۴	۳۶۵-۲۳۷۲



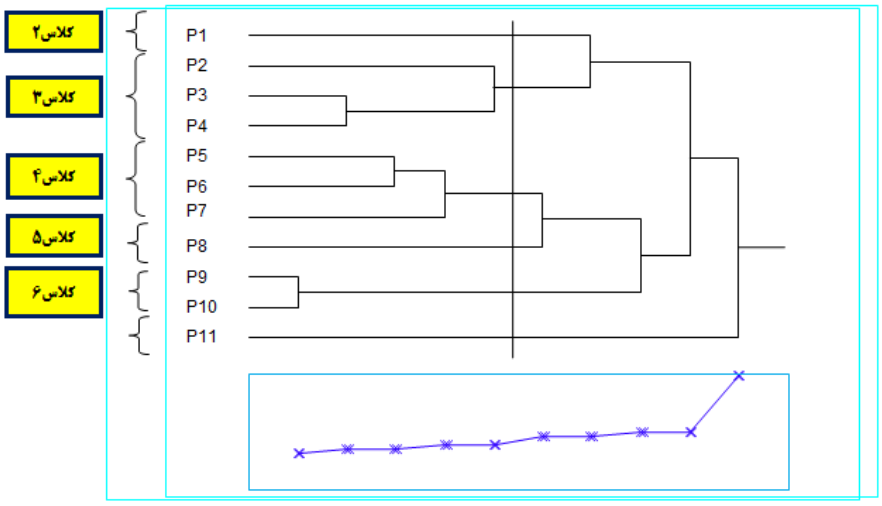
شکل ۱- الگوي باندي حاصل از تکثیر DNA افراد جمعیت هاي مختلف گونه *T. eriocalyx* براساس آغازگر OPB11



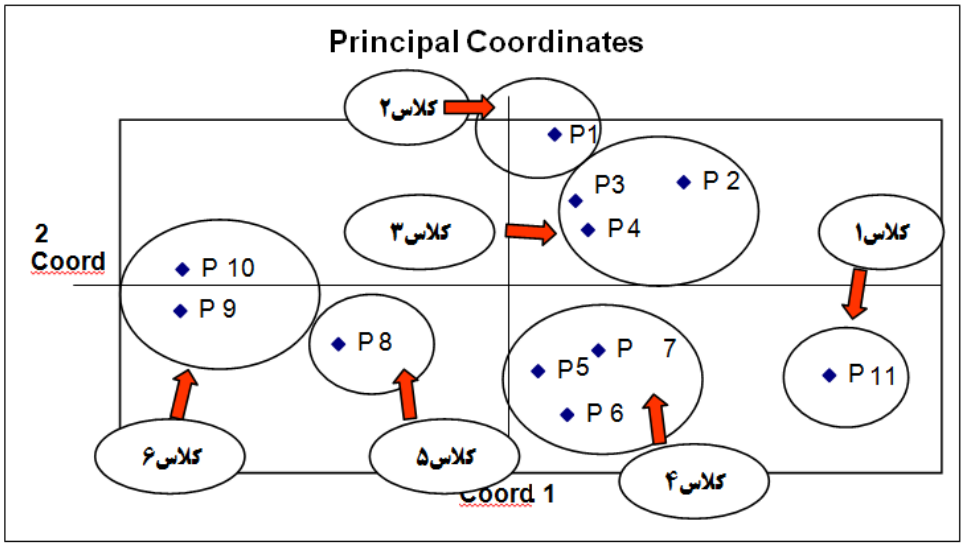
شکل۲- تعداد مکان هاي ژني، تعداد مکان هاي ژني اختصاصي و درصد پلي‌مورفیسم در جمعیت هاي مورد بررسي گونه *Thymus eriocalyx*



شکل۳- مقادیر شاخص اطلاعاتي شانون و تنوع ژني Nei در جمعیت هاي مورد بررسي گونه *Thymus eriocalyx*



شکل ۴- کلاستر حاصل از گروه‌بندی جمعیت هاي *Thymus eriocalyx* بر اساس ماتریس تشابه single linkage حاصل از داده‌های رپید به روش UPGMA



شکل ۵- آنالیز PCO با استفاده از داده‌های رپید روي محور هاي ۱و۲ جمعیت هاي *Thymus eriocalyx*

منابع

اجتهادی، ح.، سپهری، ع. و عکافی، ح. (۱۳۸۷). روش‌های اندازه‌گیری تنوع زیستی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۱، ۱۲۵-۸۵.

هي، روبرت. و واترمن، پيتر. (۱۳۷۹). گياهان اسانس‌دار. ترجمه كامبيز بقاليان و حسنعلي نقدي بادي، نشر اندرز، ۱، ۴۴-۳۳

ولاگ، ژان. (۱۳۸۲). گیاهان دارویی. ترجمه ساعد زمان، انتشارات ققنوس، ۱، ۱۰-۹.

Biggs, R., Reyers, B. and Scholes, R. J. (2006). A biodiversity intactness score for South Africa. South African Journal of Science, 102 (7-8), 277-283.

Leung, A.Y. and Foster, S. (1996). Encyclopedia of common Natural ingredients used in food, Drug, and Cosmetics, Second edition. New York: John Wiley and Sons, Inc.

Lynch, M. and Milligan, B.G. (1994). Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. Molecular Ecology, 3(2), 91-99.

Mewes, S., Kruger, H. and Pank, F. (2008). Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 55, 1303-1311.

Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-Statistical tools and considerations. Crop Science, 43(4), 1235-1248.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research, 8, 4321-4325.

Skoula, M., Hilali, I.E. and Makris, A.M. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. Biochemical Systematics and Ecology, 27(6), 559-568.

Sunar, S., Aksakal, O., Yildirim, N., Agar, G., Gulluce, M. and Sahin, F. (2009). Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. Romanian Biotechnological Letters, 14(2).

Vieria, R.F., Grayer, R.J. and Paton, A. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, Flavonoides and RAPD Markers. Biochemical Systematics and Ecology, 29, 287-304.

Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T. (1999). Popgene, version 1.3 I. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Canada.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology
Vol 4, No 1, Spring & Summer 2018

Genetic diversity of population of *Thymus eriocalyx* by using RAPD molecular marker

Ramezan Kalvandi[1,2], Morteza Atri[3], Seyyed Mohsen Hesamzadeh Hejazi[4] and Mohsen Rajabi[1*]

Abstract

The genus *Thymus* L. is one of the largest genera of the Lamiaceae family and aromatic plants. Plants of these genera have commercial value due to their essential oils. *Thymus eriocalyx* is one of the species that is exclusively on the Iranian plateau. In order to investigate the molecular characteristics of *Thymus eriocalyx* populations in Iran, 10 habitats were selected in Lorestan, Markazi, Hamedan, Kermanshah and Kurdistan provinces (using the DSS method) (50 plant samples). Also, 15 primers with 10 N lengths selected. The molecular data, based on RAPD experiments, divided the populations into five distinct groups. Primers used in this experiment produced 71 bands, which showed 68 polymorphic bands. OPA-05, OPA-17, OPD03 and OPE-20 primers with the highest polymorphism and marker index had excellent ability to study genetic variation in studied species. P2 and P7 populations had the maximum effective allele and p9 population had the minimum value. The highest and lowest mean of expected heterozygosity belonged to P2 and P9 populations, respectively. The highest genetic similarity was observed between P2 and P3 genotypes and the lowest genetic similarity between P2 and P10. The results of analysis of variance (AMOVA) showed that the variation within the populations of these species (68%) is greater than the diversity among populations (32%), which this fact prove the importance of single plant selection and paying attention to individual in *Thymus* breeding programs.

Keywords: Thyme, Genetic Diversity, Marker, RAPD

[1] Natural Resources Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran.* Corresponding author, Email: m.rajabi@areeo.ac.ir
[2] Department of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran
[3] Professor of Biology Department, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[4] Member of the faculty of Biotechnology, Institute of Forestry and Rangelands, Iran