

بررسی تنوع ژنتیکی کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) با استفاده از نشانگر SCoT

نوید زمانی^{۱*}، وحید زمانی^۲ و خالد میرزایی^۳

^{۱*} - نویسنده مسئول مکاتبات، مربی، دانشکده محیط‌زیست و منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء، بهبهان

پست الکترونیک: zamani@bkatu.ac.ir

^۲ - مربی، دانشگاه ژوزف‌فوریر، دانشکده اکولوژی آلپین، گرونوبل، فرانسه

^۳ - کارشناس ارشد، دانشگاه کردستان، سنندج

چکیده

در این مطالعه از ۲۵ آغازگر SCoT برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۲ نمونه کاکوتی از مناطق مختلف جغرافیایی ایران استفاده شد. در مجموع ۲۰۹ قطعه تکثیر شد و ۶۶٪ از آنها چندشکل بودند. بیشترین قطعات تکثیر شده چندشکل (۱۰) مربوط به آغازگر SCoT-54 بود، و همچنین کمترین تعداد قطعات چندشکل (۲) مربوط به آغازگر SCoT-20 بود. متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۸/۳۶ و متوسط باندهای چندشکل ۵/۵۳ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی و قدرت تفکیک (PIC_D) بین ۰/۲۱۷ تا ۰/۲۱۷ در آغازگر SCoT-31 و ۰/۰۷ در آغازگر SCoT-30 با میانگین ۰/۱۵۶ متغیر بود. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد، تجزیه خوشه‌ای با الگوریتم UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی انجام شد. براساس تجزیه خوشه‌ای، در ضریب تشابه ۰/۷ نمونه‌های کاکوتی به ۷ گروه تقسیم شدند. براساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت (۰/۵۹) مربوط به دو نمونه نائین و یاسوج، و همچنین بیشترین شباهت (۰/۹۸) بین دو نمونه از دامغان و گرمسار از یک منطقه جغرافیایی مشابه بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) حکایت از تنوع زیاد در داخل نمونه‌ها داشت. در واقع ۸۹٪ از واریانس در داخل نمونه‌ها و ۱۱٪ از واریانس در بین نمونه‌های کاکوتی بود. در نهایت نتایج نشان‌دهنده تنوع مناسب در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ژنتیکی، تشابه ژنتیکی، گیاه دارویی، نشانگر مولکولی

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی از ابتدای تمدن انسان تاکنون ادامه دارد. مصرف گیاهان دارویی در کشورهای مختلف روز به روز در حال افزایش است. بیش از ۸۰ درصد از بیماران به‌وسیله ترکیبات دارویی مشتق شده از گیاهان درمان می‌شوند و بیش از ۲۰ درصد داروهای تولید شده، از گیاهان مشتق شده‌اند. این رویداد به دلیل اثربخشی بسیار گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و مقبولیت ترکیبات مهم دارویی در گیاهان به دلیل طبیعی بودن می‌باشد (Aguilar-Støen)

(and Moe, 2007). یکی از گیاهان مهم در زمینه مصارف دارویی و ادویه‌ای در ایران کاکوتی است که گیاهی علفی، یکساله، دیپلوئید ($2n = 2x = 16$) و دگرگشن از تیره نعنائیان است. کاکوتی از طریق بذر تکثیر شده و دارای گل‌های سفید، صورتی یا ارغوانی است (Naeini et al., 2010). رویشگاه‌های این گونه بیشتر در مناطق سرد و خشک با میانگین ۳۰۰-۴۰۰ میلی‌متر بارندگی سالیانه مانند آسیای میانه، خاورمیانه و اروپای شرقی است که در این میان در مناطق مختلف ایران نیز پراکندگی وسیعی دارد.

آزمایشگاه‌هایی که فقط ابزار استفاده از ژل آگارز وجود دارد در تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی، غربال به‌روش بالک و شناسایی QTL نیز استفاده کرد (Collard & Mackill, 2009). از نشانگر SCoT در مطالعاتی که مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مهمی مانند سیاه‌دانه، جاتروفا (*Jatropha curcas*) و گیاهان زراعی مانند برنج، سیب‌زمینی و انبه استفاده شده که در مقایسه با نشانگرهای ISSR و RAPD تنوع بیشتری را نشان داده است (Xiong et al., 2011; Luo et al., 2010; Mulpuri et al., 2013). هدف از این تحقیق، تعیین روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ایرانی گیاه دارویی کاکوتی به‌کمک نشانگر SCoT است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از ۴۲ نمونه کاکوتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران استفاده شد (جدول ۱). استخراج DNA از برگ‌های جوان چند بوته از هر نمونه به‌منظور نشان دادن اطلاعات کامل نمونه‌های هر منطقه، بر اساس روش دوپیل-دویل با کمی تغییرات (Doyle & Doyle, 1987) انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده به‌وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد و غلظت با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. سی و دو آغازگر SCoT در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و تنها آغازگرهایی که دارای قطعات واضح و تکرارپذیر بودند برای ارزیابی استفاده شدند که در نهایت از ۲۵ آغازگر نشانگر SCoT در این مطالعه استفاده شد (جدول ۲). واکنش‌های PCR در حجم‌های ۲۰ میکرولیتری و با ترکیب ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر آغازگر SCoT با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط کیت PCR (ساخت شرکت سیناژن) و ۶ میکرولیتر آب استریل با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت Bio-Rad انجام شد. مراحل PCR شامل یک دوره ۴ دقیقه‌ای در دمای C ۹۴، سپس ۳۵ دوره دمای C ۹۴ به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال با میانگین C ۵۰ (۴۱ تا ۶۰) برای همه آغازگرها یک دقیقه، C ۷۲ دو دقیقه و در نهایت یک دوره ده دقیقه‌ای در C ۷۲ بود.

روغن فرار پولگون عمده‌ترین ترکیب مونوترپنی در کاکوتی است (Naeini et al., 2010; Hatri et al., 2012). از جمله خواص درمانی کاکوتی، می‌توان به درمان اختلالات گوارشی مانند اسهال اشاره کرد، همچنین به‌دلیل وجود خواص ضد میکروبی و خواص ضد قارچی که دارد باعث تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود (Dakah et al., 2014). همچنین مطالعه تنوع ژرم‌پلاسم‌های موجود و شناخت روابط ژنتیکی آنها یک هدف با ارزش برای بهبود راهکارهای حفاظت از گونه‌ها و اصلاح آنهاست (Grime, 2002). مطالعه تنوع ژنتیکی همچنین می‌تواند به‌عنوان کمکی مؤثر در انتخاب افراد برای ورود ژنهای مطلوب از ژرم‌پلاسم‌های متنوع به‌درون پایه ژنتیکی موجود باشد، زیرا با ورود ژنهای مطلوب به‌داخل جمعیت می‌توان مقدار و کیفیت محصولات را افزایش داد (Mohammadi & Prasanna, 2003; Ramanatha & Hodgkin, 2002). به‌عنوان یک جزء بنیادی از تنوع زیستی، تنوع ژنتیکی کلیدی برای بقای طولانی‌مدت و تکامل گونه یا جمعیت در محیط‌های در حال تغییر است. بنابراین، دسترسی به دانش مناسب از سطوح و الگوهای تنوع ژنتیکی در جهت تدوین راهکارهای حفاظت مؤثر و بهره‌برداری پایدار از منابع ژنتیکی ضروریست. بنابراین روش‌های مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان استفاده شده که از جمله این روش‌ها، می‌توان به استفاده از نشانگرهای مولکولی اشاره کرد (Ovesna, 2002). نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی برای مطالعه و تخمین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی، تعیین ارتباط بین تنوع موجود با صفات مورد مطالعه و در نهایت شناسایی نقاط خاصی از ژنوم را در ارتباط با صفات مورد مطالعه فراهم آورده‌اند (Kumar, 2007; Hodkinson et al., 2009). نشانگر SCoT یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR است که براساس تنوع در ناحیه حفظ شده کدون آغاز ATG عمل می‌کند. از مزایای این روش آسان و کم هزینه بودن نسبت به نشانگرهای دیگر است، همچنین تفکیک باندها در این روش بر روی ژل آگارز انجام می‌شود. از این نشانگر می‌توان در

جدول ۱- مناطق جمع‌آوری نمونه‌های کاکوتی

شماره	اسامی نقاط نمونه‌برداری	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	ابهر (D)	زنجان	۴۹° ۲۲'	۳۹° ۰۵'
۲	اراک (B)	مرکزی	۴۹° ۳۴'	۳۴° ۰۴'
۳	اردبیل (A)	اردبیل	۴۸° ۲۴'	۳۸° ۲۲'
۴	ایلام (C)	ایلام	۴۶° ۴۳'	۳۳° ۳۳'
۵	آباده (F)	فارس	۵۲° ۳۹'	۳۱° ۰۸'
۶	بهشهر (D)	مازندران	۵۳° ۵۰'	۳۶° ۴۸'
۷	بیرجند (E)	خراسان جنوبی	۵۹° ۰۳'	۳۲° ۵۳'
۸	پاوه (C)	کرمانشاه	۴۶° ۴۹'	۳۴° ۸۲'
۹	تهران (D)	تهران	۵۱° ۱۲'	۳۵° ۴۳'
۱۰	تیلکو (C)	کردستان	۴۶° ۷۳'	۳۶° ۴۲'
۱۱	خرم‌آباد (C)	لرستان	۴۸° ۲۲'	۳۳° ۲۷'
۱۲	خرمدشت (D)	قزوین	۴۹° ۵۹'	۳۵° ۸۱'
۱۳	دامغان (D)	سمنان	۵۴° ۲۸'	۳۶° ۰۳'
۱۴	دهلران (C)	ایلام	۴۶° ۵۹'	۳۴° ۰۲'
۱۵	زرند (F)	کرمان	۵۶° ۲۹'	۳۰° ۴۸'
۱۶	زنجان (D)	زنجان	۴۸° ۲۰'	۳۶° ۴۰'
۱۷	سلطانیه (D)	زنجان	۴۸° ۸۱'	۳۶° ۶۳'
۱۸	سمیرم (B)	اصفهان	۵۱° ۳۴'	۳۱° ۲۴'
۱۹	شهرضا (B)	اصفهان	۵۱° ۵۴'	۳۲° ۰۳'
۲۰	شیراز (F)	فارس	۵۲° ۳۰'	۲۹° ۶۸'
۲۱	فسا (F)	فارس	۵۳° ۳۹'	۲۹° ۱۰'
۲۲	قائم‌شهر (D)	مازندران	۵۲° ۹۰'	۳۶° ۴۸'
۲۳	قزوین (D)	قزوین	۵۰° ۱۵'	۳۶° ۱۴'
۲۵	قم (B)	قم	۵۱° ۲۲'	۳۴° ۷۱'
۲۴	قوچان (E)	خراسان شمالی	۵۸° ۳۳'	۳۷° ۱۵'
۲۶	کازرون (F)	فارس	۵۱° ۳۹'	۲۹° ۳۶'
۲۷	کرمانشاه (C)	کرمانشاه	۴۷° ۲۲'	۳۴° ۱۵'
۲۸	کلات نادری (E)	خراسان رضوی	۶۰° ۲۳'	۳۷° ۱۹'
۲۹	کلاردشت (D)	مازندران	۵۱° ۱۴'	۳۶° ۴۹'
۳۰	کنگاور (C)	کرمانشاه	۴۸° ۰۰'	۳۴° ۴۰'
۳۱	گرمسار (D)	سمنان	۵۲° ۳۷'	۳۵° ۲۱'
۳۲	محلات (B)	مرکزی	۵۰° ۲۶'	۳۳° ۵۱'

ادامه جدول ۱- مناطق جمع‌آوری ...

شماره	اسامی نقاط نمونه‌برداری	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۳۳	مشهد (E)	خراسان رضوی	۵۹° ۴۳'	۳۶° ۱۰'
۳۴	ملایر (C)	همدان	۴۸° ۸۵'	۳۴° ۲۷'
۳۵	موچش (C)	کردستان	۴۷° ۱۹'	۳۵° ۰۸'
۳۶	مهاباد (A)	آذربایجان غربی	۴۵° ۷۵'	۳۶° ۷۵'
۳۷	مهریز (B)	یزد	۵۴° ۴۶'	۳۱° ۴۷'
۳۸	نائین (B)	اصفهان	۵۳° ۰۵'	۳۲° ۵۰'
۳۹	نورآباد (C)	لرستان	۴۷° ۹۵'	۳۴° ۰۸'
۴۰	نیاسر (B)	اصفهان	۵۱° ۱۷'	۳۳° ۹۰'
۴۱	همدان (C)	همدان	۴۸° ۳۱'	۳۴° ۴۷'
۴۲	یاسوج (F)	کهگیلویه و بویراحمد	۵۱° ۴۷'	۳۰° ۵۹'

جمعیت‌ها و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.1 انجام شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگر با استفاده از رابطه ۱ (Shete *et al.*, 2000) و شاخص تفکیک‌پذیری (D) با استفاده از رابطه ۲ (Simpson, 1949) برآورد گردید. مقدار عددی π فراوانی حضور قطعه و p_j فراوانی عدم حضور قطعه است. همبند k تعداد گروه‌های ایجاد شده، n_j تعداد افراد در هر گروه و N تعداد گروه ممکن در هر جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. شاخص محتوای چندشکلی و تفکیک‌پذیری PIC_D نشانگر با استفاده از رابطه ۳ که از ضرب شاخص تفکیک‌پذیری در شاخص اطلاعات چندشکلی به دست می‌آید برای هر آغازگر با نرم‌افزار Excel برآورد شد (Mirzaei & Mirzaghaderi, 2015).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 - p_j^2 \quad \text{رابطه ۱}$$

$$D = 1 - \frac{\sum_{j=1}^k n_j(n_j - 1)}{N(N - 1)} \quad \text{رابطه ۲}$$

$$PIC_D = PIC \times D \quad \text{رابطه ۳}$$

سپس محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد آگارز برای انجام الکتروفورز بارگیری شدند. الکتروفورز ژل‌ها با جریان ۸۰ ولت و به مدت ۱۶۰ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و بعد از شستن ژل‌ها با آب مقطر از ژل‌ها توسط دستگاه UV عکس‌برداری به عمل آمد.

با توجه به اینکه نشانگر SCoT دارای الگوی غالب است، بنابراین امتیازدهی قطعات حاصل از الکتروفورز ژل‌های آگارز به صورت صفر (عدم وجود قطعه) و یک (وجود قطعه) برای هر یک از آل‌ها انجام شد. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه دایس (Dice)، جاکارد (Jaccard) و Simple matching به دست آمد. خوشه‌بندی با استفاده از ضریب تشابه‌های یادشده و الگوریتم‌های Single, UPGMA, WPGMA انجام شد. سپس ضرایب کوفنتیک آنها محاسبه شد و روش محاسبه ماتریس و دندروگرام مناسب تعیین شد (Mohammadi & Prasanna, 2003). آزمون مانتل، تجزیه به مختصات اصلی برای نمونه‌ها و عملیات تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc-2.02 (Rohlf, 1993) انجام شد. محاسبه ماتریس جغرافیایی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT انجام شد و همبستگی آن با ماتریس تشابه محاسبه شد. شاخص تنوع ژنی، فاصله و شباهت بین

جدول ۲- خصوصیات و نتایج حاصل از تعداد باندهای هر یک از آغازگرهای SCoT

شماره شناسایی نشانگر	توالی بازی آغازگرها ۳-۵	تعداد کل قطعات	تعداد قطعات چند شکل	درصد قطعات چندشکل	شاخص محتوای چندشکلی و تفکیک پذیری PIC _D
۲	CAACA <u>ATG</u> GCTACCACCC	۸	۵	%۶۲/۵	۰/۱۷۵
۷	CAACA <u>ATG</u> GCTACCACGG	۱۰	۸	%۸۰	۰/۱۴
۱۰	CAACA <u>ATG</u> GCTACCAGCC	۱۱	۶	%۵۴/۵	۰/۱۸۸
۱۲	ACGAC <u>ATG</u> GCGACCAACG	۱۴	۸	%۵۷/۱	۰/۱۲۴
۱۴	ACGAC <u>ATG</u> GCGACCACGC	۵	۴	%۸۰	۰/۱۵
۲۰	ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGCG	۶	۲	%۳۳/۳	۰/۰۷۴
۲۲	AACC <u>ATG</u> GCTACCACCAC	۶	۴	%۶۶/۶	۰/۱۳۱
۲۳	CACC <u>ATG</u> GCTACCACCAG	۱۴	۹	%۶۲/۲	۰/۲۰۶
۲۵	ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGGG	۷	۳	%۴۲/۸۵	۰/۱۲۱
۲۹	CC <u>ATG</u> GCTACCACCGGCC	۸	۵	%۶۲/۵	۰/۱۳
۳۱	CC <u>ATG</u> GCTACCACCGCCT	۱۱	۹	%۸۱/۸	۰/۲۱۷
۳۳	CC <u>ATG</u> GCTACCACCGCAG	۱۰	۶	%۶۰	۰/۱۹۵
۳۴	ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGCA	۷	۳	%۴۲/۸۵	۰/۱۷
۳۶	GCAACA <u>ATG</u> GCTACCACC	۶	۶	%۱۰۰	۰/۲
۴۰	CA <u>ATG</u> GCTACC ACTACAG	۷	۵	%۷۱/۴۵	۰/۱۶۱
۴۵	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACTGAC	۶	۴	%۶۶/۶	۰/۱۲
۴۶	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACTGAG	۹	۸	%۸۸/۹	۰/۲۱
۴۷	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACTGCC	۶	۵	%۸۳/۳	۰/۱۴۷
۵۴	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACCAGC	۱۳	۱۰	%۷۶/۹	۰/۱۹۵
۵۵	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACTACC	۸	۵	%۶۲/۵	۰/۱۲۴
۶۱	ACA <u>ATG</u> GCTACC ACTACC	۷	۴	%۵۷/۱	۰/۱۸
۷۳	CC <u>ATG</u> GCTACC ACCGGCT	۷	۶	%۸۵/۷	۰/۱۴
۷۴	CC <u>ATG</u> GCTACC ACCGGCA	۶	۳	%۵۰	۰/۰۹۷
۷۷	CC <u>ATG</u> GCTACC ACTACCC	۸	۵	%۶۲/۵	۰/۱۲۸
۷۸	CC <u>ATG</u> GCTACC ACTAGCA	۹	۷	%۷۷/۷	۰/۱۹
تعداد کل	-	۲۰۹	۱۳۸	-	-
میانگین	-	۸/۳۶	۵/۵۲	%۶۶	۰/۱۵۶

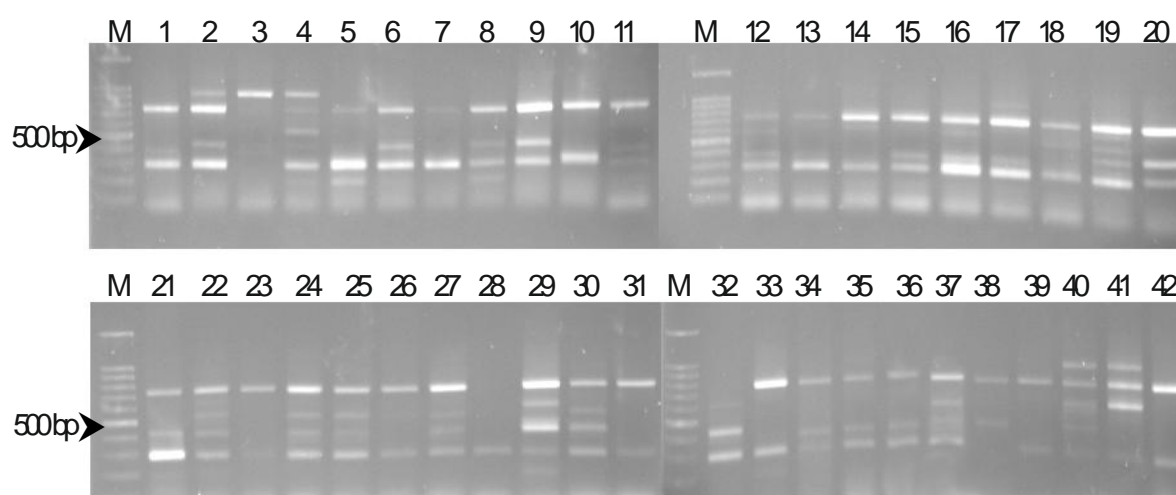
نتایج

به آغازگر ۱۴ با پنج قطعه بود. میانگین شاخص PIC_D در این تحقیق ۰/۱۵۶ بود و بیشترین مقدار شاخص PIC_D مربوط به آغازگر ۳۱ با ۰/۲۱۷ و کمترین مقدار شاخص PIC_D مربوط به آغازگر ۲۰ با ۰/۰۷۴ بود (جدول ۲). ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه به دست آمده از سه روش دایس، جاکارد و Simple matching با دندروگرام‌های حاصل از الگوریتم‌های مختلف محاسبه شد (جدول ۳). این ضریب همبستگی مقدار همبستگی دو ماتریس را نشان می‌دهد، به طوری که هرچه به ۱ نزدیکتر باشد نشان‌دهنده همبستگی زیاد و ارتباط خطی دو ماتریس مورد نظر است و براساس مطالعات گذشته دسته‌بندی این عدد از صفر تا ۱ به صورت سلیقه‌ای و فردی است (Mohammadi & Prasanna, 2003).

در این تحقیق از ۲۵ آغازگر SCoT که قطعات چندشکل و تکرارپذیر تکثیر کردند برای بررسی تنوع ۴۲ نمونه کاکوتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران استفاده شد. تعداد کل قطعات ایجاد شده به وسیله آغازگرها ۲۰۹ عدد بود (۸/۳۶ قطعه نسبت به هر آغازگر) که از میان آنها ۱۳۶ قطعه (۶۶ درصد) چندشکل بودند (جدول ۲). درصد چندشکلی در میان آغازگرها از ۳۳/۳ درصد برای آغازگر ۲۰ تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر ۳۶ (شکل ۱) متغیر بود. همچنین طول قطعات تکثیر شده به وسیله آغازگرها از ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز نیز متغیر بود. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای ۱۲ و ۲۳ با ۱۴ قطعه و کمترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط

جدول ۳- مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک سه روش دایس، جاکارد و Simple matching در الگوریتم‌های مختلف

الگوریتم			روش
WPGMA	Single	UPGMA	
۰/۶۶	۰/۵۴	۰/۶۹	دایس
۰/۶۸	۰/۵۷	۰/۷۱	جاکارد
۰/۶۵	۰/۵۳	۰/۶۷	Simple matching



شکل ۱- نمونه تصویر مربوط به الکتروفورز محصول PCR حاصل از آغازگر ۳۶ مربوط به نشانگر SCoT

نتایج نشان داد که در همه الگوریتم‌های مورد بررسی، ماتریس تشابه مربوط به روش جاکارد مطابقت بیشتری با دندروگرام داشت. به طوری که بیشترین مقدار ضریب کوفنتیک (۰/۷۱۲) مربوط به روش جاکارد و الگوریتم UPGMA بود. بنابراین براساس نتایج به دست آمده بهترین روش محاسبه ماتریس تشابه روش جاکارد و مناسب‌ترین الگوریتم برای رسم دندروگرام، روش UPGMA بود. البته تعیین نقطه برش در نقطه‌ای از دندروگرام انجام شد که مقدار تفاوت بین گروه‌های ایجاد شده نسبت به تفاوت داخل گروه‌ها بیشتر باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003). بر اساس نتایج حاصل از دندروگرام رسم شده، ۴۲ نمونه کاکوتی در ۷ گروه دسته‌بندی شدند و مقایسه ماتریس‌های فواصل جغرافیایی و داده‌های مولکولی حکایت از عدم تطابق الگوی تنوع نمونه‌های کاکوتی با مکان جغرافیایی آنها داشت (شکل ۲).

دامنه ضریب تشابه جاکارد در بین نمونه‌ها از ۶۵ درصد تا ۹۸ درصد با میانگین ۸۱ درصد متغیر بود که بیشترین شباهت در بین نمونه‌های دامغان و گرمسار (۹۸ درصد) مشاهده شد و کمترین شباهت (۵۹٪) براساس داده‌های حاصل از ماتریس بین نمونه‌های نائین و یاسوج مشاهده شد (شکل ۲). به منظور بررسی بهتر، نمونه‌ها بر اساس منشأ منطقه جغرافیایی به شش گروه شمال‌غربی (A)، مرکزی (B)، غرب (C)، شمال (D)، شمال‌شرقی (E) و جنوب (F) تقسیم‌بندی شدند. با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.1 مقدار فاصله ژنتیکی و تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها برآورد شد که کمترین فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌های C و D مشاهده شد و بیشترین فاصله مربوط به جمعیت‌های E و A بود. همچنین شاخص تنوع ژنی (He) در گروه‌ها از ۰/۰۹۳ در گروه A تا ۰/۲۳۶ در گروه C متغیر بود (جدول ۴).

جدول ۴- مقدار شاخص تنوع ژنی (He)، فاصله ژنتیکی (بالای قطر) و همسانی ژنتیکی (پایین قطر) در گروه‌ها (شمال‌غربی (A)،

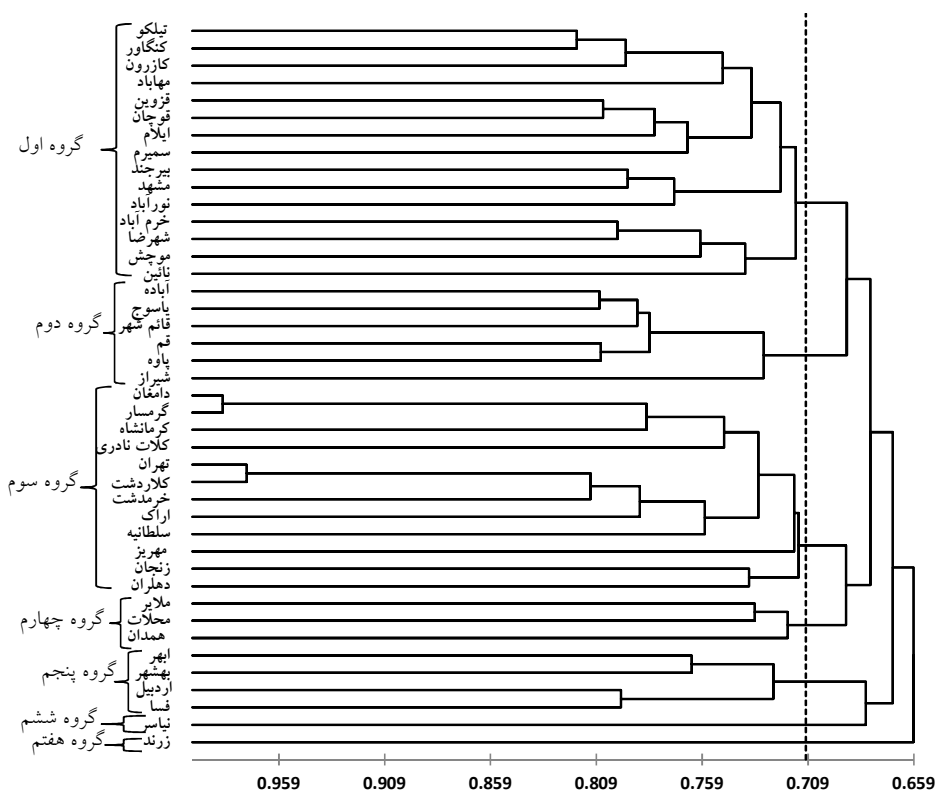
مرکزی (B)، غرب (C)، شمال (D)، شمال‌شرقی (E) و جنوب (F))

شاخص تنوع ژنی (He)		A	B	C	D	E	F
A	۰/۰۹۳ ± ۰/۰۱۲	***	۰/۱۱۳	۰/۱۴	۰/۱۴۱	۰/۱۸۶	۰/۱۹
B	۰/۲۱۳ ± ۰/۰۱۴	۰/۸۹۳	***	۰/۰۳۷	۰/۰۴۳	۰/۰۹۹	۰/۱۳۱
C	۰/۲۳۶ ± ۰/۰۱۳	۰/۸۷۰	۰/۹۶۴	***	۰/۰۳۵	۰/۱۰۱	۰/۱۲۹
D	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۱۵	۰/۸۶۹	۰/۹۵۸	۰/۹۶۵	***	۰/۰۹۰	۰/۰۹۶
E	۰/۱۶۷ ± ۰/۰۱۴	۰/۸۳۱	۰/۹۰۶	۰/۹۰۴	۰/۹۱۴	***	۰/۱۰۲
F	۰/۱۳۱ ± ۰/۰۱۲	۰/۸۲۷	۰/۸۷۷	۰/۸۷۹	۰/۹۰۹	۰/۹۰۳	***

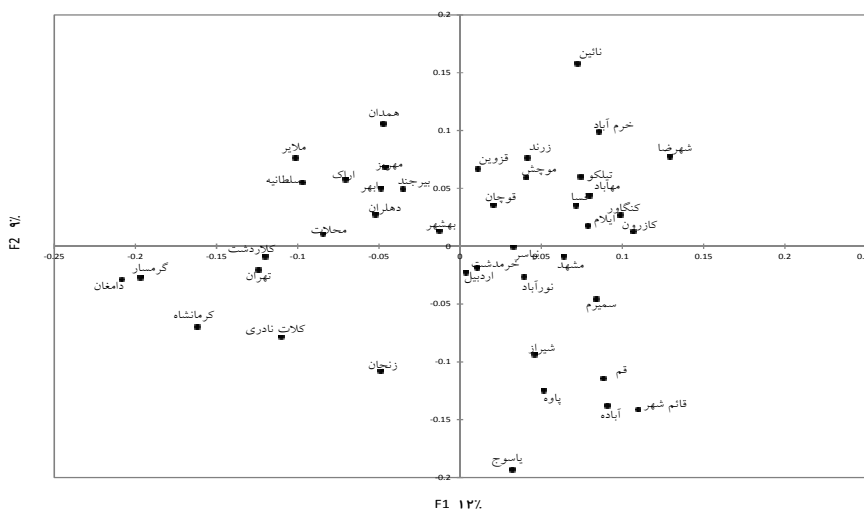
جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی ۴۲ نمونه کاکوتی که به ۶ منطقه مختلف دسته‌بندی شدند

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	سطح معنی‌دار
بین جمعیت‌ها	۵	۲۲۷/۰۴	۴۵/۴	٪۱۱	۰/۰۱**
درون جمعیت‌ها	۳۶	۸۸۸/۲	۲۴/۶۷	٪۸۹	
کل	۴۱	۱۱۱۵		٪۱۰۰	

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه داده‌های مربوط به نمونه‌های کاکوتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد



شکل ۳- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مربوط به نشانگر SCoT در نمونه‌های کاکوتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

درصد قطعات چندشکل و سیب‌زمینی با ۶۱ درصد قطعات چند شکل (Mirzaei & Mirzaghaderi, 2015; Gorji *et al.*, 2011) از مقدار تنوع بیشتری برخوردار بود. علت این تفاوت‌ها در سطح تنوع به شرایط مختلفی مانند نحوه تولید مثل در گیاهان مورد مطالعه و محیط گیاه بستگی دارد. البته گیاهان دگرگشن مانند کاکوتی در مقایسه با گیاه خودگشنی مانند سیاه‌دانه و یا سیب‌زمینی که از طریق روشی تکثیر می‌شود از تنوع بیشتری برخوردار هستند (Grime, 2002). قدرت تفکیک یک مارکر، بر اساس توانایی تفکیک بین افرادی که باهم ارتباطی ندارند تعیین می‌شود و این به وسیله تعداد گروه تفکیک شده و فراوانی نسبی آنها مشخص می‌شود. PIC_D یکی از شاخص‌های جدید است که به‌تازگی معرفی شده و به‌تنهایی هم حاوی اطلاعات آللی، تعداد گروه تفکیک شده و فراوانی نسبی گروه‌هاست. این شاخص از حاصل‌ضرب شاخص تنوع سیمپسون یا شاخص تفکیک‌پذیری (حاوی اطلاعات گروه‌های ایجاد شده و نسبت آنها می‌باشد) در شاخص اطلاعات چندشکلی حاصل می‌شود. میانگین شاخص PIC_D در این تحقیق ۰/۱۵۶ بود که در مقایسه با PIC_D به‌دست آمده در سیاه‌دانه (۰/۰۶۱) بیشتر بود (جدول ۲). مقدار PIC_D یا شاخص محتوای چندشکلی و تفکیک‌پذیری در مارکرهای غالب بین صفر تا ۰/۳۷۵ متغیر است و هرچه PIC_D به‌دست آمده به ۰/۳۷۵ نزدیک‌تر باشد نشانگر هم از محتوای چندشکلی بالا و هم از تفکیک‌پذیری بالایی برخوردار است (Mirzaei & Mirzaghaderi, 2015). با توجه به اینکه آغازگرهای ۳۱، ۲۳ و ۵۴ نسبت به سایر آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه از مقدار PIC_D بالاتری برخوردار بودند، بنابراین می‌توان آنها را به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگرهای SCoT در مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کاکوتی پیشنهاد کرد.

در این تحقیق تجزیه به مختصات اصلی به‌صورت توأم به‌همراه تجزیه خوشه‌ای در گروه‌بندی افراد به‌منظور روشن کردن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه کل تغییرات

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های ایجاد شده نشان داد که تنوع بالایی داخل گروه‌های کاکوتی وجود دارد، همچنین شباهت زیادی بین گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت (جدول ۵). به‌طوری‌که تجزیه به مختصات اصلی براساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضرب تشابه جاکارد انجام گردید و نتایج نشان داد که اولین مؤلفه بیشترین تغییرات را (۱۲ درصد) نسبت به سایر مؤلفه‌ها توجیه می‌کند و مؤلفه دوم حدود ۹/۱ درصد تغییرات را توجیه می‌کند. با ادامه این روال ۲۰ مؤلفه اول ۹۰/۲۳ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند که نمایش اطلاعات در دو مؤلفه اصلی توانست ژنوتیپ‌ها را مطابق شکل ۳ تفکیک کند که نشان‌دهنده توزیع نسبتاً مناسب آغازگرها در ژنوم است.

بحث

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در مجموعه ژرم‌پلاسم می‌تواند دسته‌بندی ارقام را به‌طور واقع‌گرایانه و همچنین شناسایی زیر مجموعه‌های با احتمال سودمندی زیاد را برای اهداف اصلاحی خاص تسهیل کند (Tripathi & Tripathi, 2005). به‌نحوی‌که نسبت درصد قطعات چندشکل که حاصل از تقسیم تعداد قطعات چندشکل به کل قطعات تولید شده است یکی از شاخص‌های نشان‌دادن تنوع ژنتیکی در مطالعه جمعیت‌هاست. مقدار شاخص درصد قطعات چندشکل در این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌های انجام شده با استفاده از آغازگر SCoT در انبه با ۷۶/۱۹ درصد قطعات چندشکل و در گونه‌های جنس *Cicer* با ۹۹/۷۷ درصد قطعات چندشکل از تنوع کمتری برخوردار بود (Amirmoradi *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2012). همچنین در مقایسه با مطالعه انجام شده در بررسی تنوع ژنتیکی کاکوتی ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD با ۹۰ درصد قطعات چند شکل از مقدار تنوع کمتری برخوردار بود (Hatri *et al.*, 2012). اما در مقایسه با مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگر SCoT در سیاه‌دانه با ۳۲/۱۳

بین افراد در هر گروه تنوع زیادتری نسبت به تنوع بین گروه‌ها وجود دارد. به طوری که بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های شمال شرقی و شمال غربی بود که از لحاظ شرایط جوی کاملاً متفاوت بودند. همچنین شاخص تنوع ژنی (He) در گروه‌ها از ۰/۰۹۳ در گروه شمال شرقی که شامل دو نمونه از مهاباد و اردبیل بود و گروه غربی با مقدار ۰/۲۳۶ متغیر بود. همچنین تنوع ژنتیکی نمونه‌های کاکوتی مورد بررسی با منشأ جغرافیایی آنها در برخی از موارد مطابقت داشت و در بسیاری از موارد مطابقت نداشت. علت اصلی این نتایج دگرگرده افشان بودن کاکوتی و جابجایی ژرم پلاسمی است. این جریان‌های ژنی در طبیعت در مناطق دور به دلیل انتقال بذر انجام می‌شود و در مناطق نزدیک به کمک انتقال گرده به دلیل دگرگشتی در کاکوتی انجام می‌پذیرد (Hodkinson *et al.*, 2007). دگرگشتی در کاکوتی باعث افزایش تنوع داخل گروه‌ها شده و جابجایی ژرم پلاسمی باعث کاهش تنوع بین گروه‌ها شده است. در مطالعه‌ای که تنوع ژنتیکی کاکوتی‌های ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD ارزیابی شده بود تنوع زیادی در بین نمونه‌ها مشاهده شد اما تنوع مشاهده شده با مناطق جغرافیایی نمونه‌ها مطابقت نداشت (Hatri *et al.*, 2012). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که بر روی زیره ایرانی انجام شده بود، نتایج حکایت از تنوع ژنتیکی زیاد بین نمونه‌های مورد مطالعه و عدم تطابق این تنوع با منشأ جغرافیایی نمونه‌ها داشت (Jannatdoust *et al.*, 2014).

البته بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت دارای پیچیده‌گی‌هایی است (Belokurova, 2010). درک چنین تنوع زیادی در این مطالعه با توجه به تنوع اقلیمی فراوان در کشور قابل توجیه است. به طوری که میزان تنوع زیاد در نمونه‌های کاکوتی منجر به افزایش کارایی انتخاب برای اصلاح این گیاه به منظور افزایش بهره‌وری بیشتر از کاکوتی در جهت مصارف دارویی و ادویه‌ای است و در نهایت این مطالعه در مدیریت و حفاظت از ژرم پلاسم‌های با

داده‌ها انجام شد. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب داشته باشند تا بتوانند کل ژنوم را نمونه برداری و با مؤلفه‌های کم بتوانند تغییرات زیاد را توجیه کنند (Belokurova, 2010). در این مطالعه نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر روی داده‌های SCoT نشان داد که دو مؤلفه اول ۲۱ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند. همچنین ۲۰ مؤلفه اول ۹۰ درصد از تغییرات را توجیه کردند. مقدار توجیه حاصل از نتایج این تحقیق در مقایسه با مقدار توجیه ۲۰ درصد و ۲۳ درصد از دو مؤلفه اول در مطالعه تنوع درخت *Dalbergia sissoo* با نشانگرهای ISSR و RAPD (Arif *et al.*, 2009) و همچنین مطالعه تنوع ۸۸ ژنوتیپ *Jatropha curcas* با نشانگر AFLP با مقدار توجیه ۲۲ درصد از واریانس کل (Pecina-Quintero *et al.*, 2011) مشابه بود. نتایج این تحقیق همچنین در مقایسه با مطالعه‌ای دیگر بر روی تنوع ژنوتیپ‌های لوبیا با نشانگر AFLP با مقدار توجیه ۱۸ درصدی از دو مؤلفه اول، بیشتر بود (Kumar *et al.*, 2008).

میزان بالای چندشکلی مشاهده شده در قطعات حاصل از آغازگرهای SCoT و مقدار بالای شاخص PIC_D نشانگرها حکایت از توانایی مناسب این تکنیک در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه کاکوتی داشت. به طور کلی نتایج حاصل از خوشه‌بندی حکایت از تنوع نسبتاً مناسب در بین نمونه‌های کاکوتی داشت و این تکنیک قادر به تفکیک نمونه‌های با ناحیه جغرافیایی مشابه و نزدیک به هم بود. البته میزان تنوع ارزیابی شده در این تحقیق در مقایسه با مطالعات انجام شده در ارتباط با کاکوتی ایرانی (Hatri *et al.*, 2012) از تنوع کمتری برخوردار بود که به ماهیت نشانگرهای مورد استفاده مربوط است، چون در نشانگر SCoT به سبب استفاده از آغازگرهای بلندتر نسبت به آغازگرهای نشانگر RAPD، به شکل اختصاصی‌تر در تکثیر مناطق ژنومی عمل کرده و نتایج آن در آزمایشگاه‌های مختلف با دقت بیشتری قابل تکرار است. نتایج حاصل از واریانس مولکولی نشان داد که

- antioxidant activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21: 317-323.
- 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.
- Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J., 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, 88: 226-237.
- Grime, J., 2002. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology*, 86: 902-910.
- Hatri, Z., Zamani, Z., Nazeri, W. and Tabrizi, L., 2012. Genetic diversity evaluation of a medicinal plant (*Ziziphora tenuior* L.) of Iran, using RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Horticulture*, 43:337-334.
- Hodkinson, T., Waldren, S., Parnell, J.N., Kelleher, C., Salamin, K. and Salamin, N., 2007. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation. *Journal of Plant Research*, 120: 17-29.
- Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Ebrahimi M. A., 2014. Studying Genetic Diversity in Confectionery Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Using Microsatellite Markers. *Crop Biotechnology*, 6: 61-72.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D. and Pandey, B., 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2: 141-162.
- Kumar, V., Sharma, S., Kero, S., Sharma, S., Sharma, A.K., Kumar, M. and Bhat, K.V., 2008. Assessment of genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Scientia Horticulturae*, 116:138-143.
- Luo, C., He, X. H., Chen, H., Ou, S. J. and Gao, M. P., 2010. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 1176-1184.
- 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.
- Mirzaei, K. and Mirzaghaderi, G., 2015. Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. landraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. *Plant Genetic Resources*, 1-8.
- Mohammadi, S. and Prasanna, B., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical
- ارزش کاکوتی مفید و مؤثر خواهد بود. هیبریداسیون بین توده‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در کاکوتی باشد. از آنجایی که نشانگر SCoT تنوع را براساس تنوع در مناطق ژنی نشان می‌دهد، استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی مانند نائین و یاسوج در جهت بهره‌وری از خاصیت هتروزیس به‌منظور اصلاح و افزایش ترکیبات دارویی کاکوتی می‌تواند بسیار مؤثر باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت کاکوتی، حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود. همچنین برداشت‌های بی‌رویه از گیاهان دارویی مانند کاکوتی در آینده باعث نابودی این ذخایر باارزش می‌شود، پس حفظ و نگهداری خارج از محل و ایجاد بانک ژرم‌پلاسما و تکثیر این گیاه نیز توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Aguilar-Støen, M. and Moe, S., 2007. Medicinal plant conservation and management: distribution of wild and cultivated species in eight countries. *Biodiversity and Conservation*, 16: 1973-1981.
- 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.
- Arif, M., Zaidi, N. W., Singh, Y. P., Haq, Q. M. R., and Singh, U. S., 2009. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 27: 488-495.
- Belokurova, V.B., 2010. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review). *Cytology and Genetics*, 44: 174-185.
- Collard, B.Y. and Mackill, D., 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.
- Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S. and Wink, M., 2014. *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its

- characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, Mexico through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy*, 35:1897-1905.
- Ramanatha Rao, V. and Hodgkin, T., 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1-19.
- Rohlf, F. and Taxonomy, N.P.N., 1998. *Multivariate Analysis System, Version 2.02*. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2005. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 243-253.
- Xiong, F., Zhong, R., Han, Z., Jiang, J., He, L., Zhuang, W. and Tang, R., 2011. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Molecular Biology Reports*, 38: 3487-3494.
- tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
- 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.
- Naeini, A., Khosravi, A., Tadjbakhsh, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R. and Shokri, H., 2010. Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 459-463.
- Ovesna, J., Polakova, K. and Leisová, L., 2002. DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38: 29-40.
- Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J.L., Colmenero, A.Z., García, N.M., Colín, C.A.N., Bonilla, J.L.S., Aguilar-Rangel, M.R., Langarica, H.R.G. and Bustamante, D.J.M., 2011. *Molecular*

Genetic diversity analysis of *Ziziphora tenuior* L. using SCoT markers

N. Zamani^{*1}, W. Zamani² and K. Mirzaei³

1*- Corresponding author, College of Environment and Natural Resources, Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, I.R. Iran Email: zamani@bkatu.ac.ir

2- Laboratory of Alpine Ecology, Joseph Fourier University, Grenoble, France

3- M.Sc., University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran

Abstract

Twenty five SCoT primers were employed to investigate genetic diversity of 42 samples of *Ziziphora tenuior* from different geographical regions of Iran. A total of 209 fragments were amplified and 66% of them were polymorphic. Most amplified polymorphic fragments (10) were related to a primer named SCoT-54, while another primer named SCoT-20 showed the lowest (2) amplified polymorphic bands. Average number of amplified bands for primers was 8.36, while average number of polymorphic bands was 5.53. Polymorphic information content and discrimination power (PIC_D) varied between 0.217 in SCoT-31 and 0.074 in SCoT-30 with an average of 0.156. Similarity matrix was generated using Jaccard coefficient, Cluster analysis was carried out by UPGMA algorithm and principle coordinate analysis. According to the cluster analysis within the similarity coefficient of 0.7, *Ziziphora* samples were divided into 7 groups. Based upon similarity matrix, the lowest similarity (0.59) was found for two samples from Naein and Yasuj. The highest similarity (0.98) found between two samples from Damghan and Garmsar within the same geographical region. Analysis of molecular variance (AMOVA) suggested significant genetic differences within the samples. In fact, 89% of variation occurred within the species, whereas 11% of the variation was observed among the samples of *Ziziphora tenuior*. The results finally indicated moderate genetic diversity among the studied genotypes.

Keywords: Genetic analysis, genetic similarity, medicinal plant, molecular marker