

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های آویشن شیرازی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR

حسین بی‌باک^{۱*} و کیان آقاعباسی^۲

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، مربی بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه جیرفت

پست الکترونیک: Hbibak@ujiroft.ac.ir

۲- دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۷

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی از فعالیت‌های مهم در به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخائر ژنتیکی گیاهان به‌شمار می‌آید. با توجه به مشاهده گوناگونی صفات در بین آویشن شیرازی، در این تحقیق از نشانگر RAPD و ISSR به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیتی آویشن شیرازی در ایران استفاده شد. برگ‌های آویشن از ۱۵ مناطق مختلف کشوری از استان‌های کرمان، سیستان و بلوچستان، بوشهر، فارس و خوزستان جمع‌آوری شدند. استخراج DNA از برگ به‌کمک روش CTAB با کمی تغییر انجام گردید. ده نشانگر RAPD و ده نشانگر ISSR که باندهای واضح‌تری در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تولید کرده بودند برای تجزیه و تحلیل استفاده شدند. با کمک نرم-افزار NTSYS-pc با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) دندروگرام مربوطه رسم شد. ضریب کوفنتیک محاسبه شد و پلات دو بعدی بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شکل گرفت. با توجه به نتایج حاصل، دامنه اندازه باندهای تولید شده در آغازگرها بین ۱۲۰ تا ۳۱۰۰ جفت باز متغیر بود. پانزده منطقه انتخاب شده در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند. خوشه ایجاد شده با شرایط جغرافیایی همخوانی داشت. آغازگرها در مجموع ۲۰۷ نوار چندشکل با درصد چندشکلی ۸۶/۹ تولید کردند. نتایج حاصل از ضریب تشابه دایس نرم‌افزار NTYSIS حکایت از این مطلب داشت که تشابه ژنتیکی توده آویشن شیرازی بین ۰/۸۴۶۰-۰/۴۳۹۰ متغیر است. کمترین تشابه بین توده‌های جیرفت با ایرانشهر و بیشترین تشابه بین نمونه‌های اندیمشک و ایزده مشاهده شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با یکدیگر مشابه بودند و ضریب کوفنتیک ۷۴/۶ درصد به‌دست آمد. نتایج نشان داد که نشانگرهای RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیتی این توده مناسب هستند.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

می‌کند (Judy & Mahdavi, 2011). اندام‌های دارویی این گیاه برگ و گل‌های آن است و از ترکیبات موجود در اسانس می‌توان تیمول و لینالول را نام برد (Eftekhar et al., 2011). جوشانده برگ آن در درمان آسم مصرف می‌شود و به‌عنوان

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Bosis.) از تیره نعناع (*Lamiaceae*)، یک گیاه درختچه‌ای-بوته‌ای است که در افغانستان، پاکستان و مناطق جنوبی ایران رشد

تعداد زیادی از جایگاه‌های ژنی، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین و سهولت از ویژگی‌های نشانگر مولکولی ISSR هستند که باعث شده است از آن به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان استفاده شود (Souframanien & Gopalkrishna, 2004). از زمانی که RAPD و ISSR به‌عنوان نشانگر مولکولی شناخته شدند در تخمین تنوع ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از جمله آنها می‌توان به مطالعه زعفران (Hasandokht *et al.*, 2015)، گیاه دارویی نوروزک (Modarres-Sanavy *et al.*, 2015) و آویشن (Sarkhosh *et al.*, 2012) اشاره کرد. همچنین (Sarkhosh *et al.*, 2012) و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از نشانگر RAPD به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم انار در ایران پرداختند و از ۲۷ آغازگر استفاده شده ۲۵۶ قطعه تولید شد که ۱۵۸ مورد از آنها چند شکلی بودند. این آزمایش نشان داد که RAPD در شناسایی ارقام انار نشانگر کارایی است. در پژوهشی که با استفاده از نشانگرهای RAPD به بررسی تنوع ژنتیکی نارون (*Ulmus americana* L.) پرداخته شد گزارش شده است که میزان چندشکلی در جمعیت‌های مختلف این گونه بسیار بالاست (Seid Tabatabaie *et al.*, 2007). در تحقیق Farsani و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ ژنوتیپ نمونه-های گیاه چمنی *Cynodon dactylon* و ۴ رقم دو رگه با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و ۱۴ نشانگر ISSR پرداخته شد. در مجموع ۳۳۶ نوار تولید شد که ۳۰۵ مورد از آنها چندشکل بودند. ژنوتیپ‌ها در چهار گروه طبقه‌بندی شدند، به‌طوری‌که ارقام تریپلوئید و دیپلوئید متعلق به یک گروه بودند و از جمعیت تتراپلوئید جدا شدند. در پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۰۶ بین ۶۹ ژنوتیپ پسته از هفت کشور با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR و AFLP انجام شد نتایج نشان‌دهنده این مطلب بود که سه نشانگر توانستند تنوع در بین توده‌های مذکور را نشان دهند. دندروگرام حاصل از ترکیب سه نشانگر دو گروه اصلی ایجاد کرد که یکی شامل نمونه‌های ایران و گروه دوم شامل نمونه‌های مدیترانه بودند (Kafkas *et al.*, 2006). تنوع ژنتیکی ۴۴ توده کاهو با استفاده از

یک ضدعفونی‌کننده معده، دستگاه ادراری، داروی مدر و ضد التهاب (Ghasemi, 2004) و همچنین درمان دردهای روماتیسمی، گزیدگی حشرات، ضدعفونی کردن زخم‌ها و امراض جلدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sefidkon & Bidgoli, 2003). تنوع مبانی همه‌گزینش‌های اصلاحی است و انتخاب نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود. از سوی دیگر تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم به اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها از دوباره کاری خودداری کنند (Nematzadeh & Kiani, 2004). بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی بین واریته‌ها و زیر گونه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این رو وجود سیستم‌های رده‌بندی مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در بین واریته‌ها مفید هستند (Diederichen & Fu, 2006). با توجه به اینکه مطالعه صفات مورفولوژیک به دلیل تأثیر عوامل محیطی بر این صفات به‌تنهایی از دقت بالایی برخوردار نیستند، امروزه ارزیابی‌ها و مطالعات مولکولی از جمله روش‌های معتبری هستند که در تعیین روابط ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Landry *et al.*, 1987). بنابراین به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی در بین ارقام مختلف از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR استفاده می‌شود. از جمله نشانگرهای مذکور می‌توان به ISSR و RAPD اشاره کرد، این نشانگرها برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته و کارآمد گزارش شده‌اند (Sicard *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 2005). نشانگر مولکولی RAPD دارای مزایایی مانند نیاز به مقدار DNA ژنومی کم در هر ارزیابی، عدم نیاز به اطلاعات قبلی توالی‌ها، سهولت ارزیابی و اندازه‌گیری و قابلیت تعمیم نتایج به بررسی‌های دیگر می‌باشد (Sarkhosh *et al.*, 2007). همچنین به تجهیزات گران‌قیمت و مواد رادیواکتیو هم نیاز ندارد (Justus *et al.*, 2004). بر اساس مقایسه انجام شده بین نشانگرهای ISSR و RAPD مشخص شد که ISSR نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارد. دقت بالا، تکرارپذیری، تجزیه و تحلیل همزمان

ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

اکوتیپ‌های مختلف آویشن شیرازی از ۱۵ رویشگاه مختلف جنوب کشور ایران شامل ۸ منطقه استان کرمان (ارزوئیه، قلعه گنج، جیرفت، رودبار، فاریاب، کهنوج، بلوک، منوجان) و ۷ منطقه دیگر از استان‌های جنوبی ایران شامل سیستان و بلوچستان (ایران شهر)، بوشهر (کاکي)، فارس (داراب، لامرد و فیروزآباد) و خوزستان (اندیمشک و ایذه) جمع‌آوری شدند (جدول ۱). نمونه‌های هر منطقه از سه نقطه متفاوت جمع‌آوری و بعد از آنکه با هم ترکیب شدند برای مراحل بعدی آزمایش آماده شدند؛ نمونه‌ها در فصل بهار جمع‌آوری و از لحاظ صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با یکدیگر تفاوت نشان دادند.

نشانگرهای AFLP، ISSR، RAPD و AFLP بررسی شد. نتایج نشان داد که در مجموع ۲۱۶ نوار از ۷ آغازگر RAPD و ۴ آغازگر ISSR و ۵ تا AFLP به دست آمد و از این تعداد، ۱۹۶ نوار چند شکل بودند و بین توده‌ها بیش از ۹۰ درصد چند شکلی دیده شد (Jang *et al.*, 2007). در پژوهشی Karimi Shahri و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تنوع ژنتیکی چند رقم انگور استان خراسان رضوی بر اساس نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD، به این نتیجه رسیدند که ۱۵ رقم انگور در دو گروه بزرگ از یکدیگر جدا شدند که ارقام ترکمن و بومی خراسان در دو گروه متفاوت قرار گرفتند. با توجه به آنکه آویشن شیرازی یک گیاه دارویی با ارزش است و حفظ ژرمپلاسم آن اهمیت زیادی دارد و بررسی تنوع ژنتیکی آن می‌تواند برای ساماندهی ژرمپلاسم و گزینش والدین مناسب برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق مفید باشد، بنابراین در این تحقیق تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های آویشن شیرازی در جنوب ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD و

جدول ۱- مناطق جغرافیایی توده‌های جمع‌آوری شده آویشن شیرازی

شماره نمونه	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض)	محل جمع‌آوری نمونه
۱	۲۸° ۲۷' ۴۲" - ۵۶° ۰۷' ۴۵"	ارزوئیه
۲	۲۸° ۴۰' ۳۳" - ۵۷° ۴۴' ۹۲"	جیرفت
۶	۲۷° ۵۶' ۶۱" - ۵۷° ۴۱' ۶۱"	کهنوج
۸	۲۷° ۲۶' ۰۴" - ۵۷° ۳۰' ۳۲"	قلعه گنج
۹	۲۷° ۱۱' ۳۴" - ۵۷° ۲۲' ۴۳"	منوجان
۱۰	۲۸° ۱۳' ۵۲" - ۵۷° ۳۰' ۴۵"	بلوک
۱۳	۲۸° ۱۳' ۵۲" - ۵۷° ۳۰' ۴۵"	رودبار
۱۴	۲۸° ۰۵' ۰۳" - ۵۷° ۱۳' ۱۳"	فاریاب
۴	۲۷° ۲۰' ۷۲" - ۵۳° ۱۰' ۷۴"	لامرد
۵	۲۸° ۵۰' ۰۷" - ۵۲° ۳۴' ۸۵"	فیروزآباد
۱۱	۲۸° ۴۵' ۹۲" - ۵۴° ۳۳' ۸۵"	داراب
۳	۳۲° ۲۸' ۴۸" - ۴۸° ۲۰' ۱۲"	اندیمشک
۷	۳۱° ۵۰' ۴۹" - ۴۹° ۵۲' ۲۶"	ایذه
۱۲	۲۷° ۴۱' ۰۸" - ۶۰° ۴۱' ۰۸"	ایران شهر
۱۵	۲۸° ۲۰' ۲۱" - ۵۱° ۳۱' ۲۵"	کاکي

از آغازگرهای RAPD و ISSR بر روی ژل آگارز برده شدند. محصولات PCR برای هر آغازگر RAPD بر روی ژل ۱ درصد آگارز و بافر TBE با ولتاژ ۷۵ به مدت ۹۰ دقیقه و محصولات زنجیره واکنشی پلی‌مراس مربوط به آغازگر ISSR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TBE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه برده شد. در چاهک‌های ابتدایی از خط‌کش ژنی به منظور تخمین اندازه باندهای تشکیل شده استفاده شد. پس از مشاهده نوارها، از ژل با الگوهای نوادهی مختلف توسط نرم‌افزار Genesnap (Ver 6.08.09) عکس تهیه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از ۱۵ آغازگر RAPD تصادفی تعداد ۱۰ آغازگر و از ۱۳ آغازگر ISSR تعداد ۱۰ آغازگر که باندهای واضح‌تری داشتند (جدول ۲) برای تجزیه و تحلیل انتخاب شدند. برای تجزیه آماری داده‌ها، ابتدا در تمام ژل‌ها نوارهای واضح را مشخص کرده و با توجه به اندازه نشانگر استاندارد 100 bp اندازه هر یک از نوارهای واضح در هر چاهک براساس وزن مولکولی استاندارد توسط نرم‌افزار Genetools تعیین شد. حضور یا عدم حضور هر یک از نوارهای مشاهده شده برای هر ۲۰ آغازگر به ترتیب با اعداد صفر و ۱ امتیازدهی شد، مکان‌هایی که دارای مجموعه‌ای از صفر و یک بودند به عنوان مکان‌های چندشکل معرفی شدند. سپس داده‌ها به NTEdit، بخش ورودی نرم‌افزار NTSYS-انتقال داده شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) و ضریب تشابه دایس به کمک نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) حاصل شد و دندروگرام مربوطه رسم شد. علاوه بر تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار-NTSYS ابزارک Eigen گروه‌بندی شدند. ضریب همبستگی کوفنتیک برای آزمایش وابستگی داده‌های ورودی به خوشه و خروجی از خوشه محاسبه شد، همچنین پلات دوبعدی حاصل از آن توسط نرم‌افزار NTSYS به کمک تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ترسیم شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با توجه به اینکه برگ آویشن دارای مقادیر زیادی اسانس و متابولیت‌های ثانویه از جمله تیمول و کارواکرول است، از این روش CTAB به منظور استخراج مطلوب DNA ژنومی با تغییراتی در مراحل شست‌وشوی DNA انتخاب شد. میزان ۰/۴ گرم از برگ‌های تازه مربوط به هر منطقه جداگانه با هم مخلوط شده و به منظور استخراج آماده شد. از دستگاه الکتروفورس به منظور سنجش کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. ژل آگارز ۱٪ با سایبرگرین (Syber green) به مقدار ۲ میکرولیتر آماده شد و نمونه‌های DNA روی ژل آگارز یک درصد برده شدند. همچنین از اسپکتوفتومتری (دستگاه Perkin-Elmer، مدل EZ-201) به منظور کیفی‌سنجی نمونه‌های استخراجی استفاده شد. به طوری که نمونه‌هایی که دارای خلوص بالایی نبودند را حذف کرده و پروتکل استخراج DNA برای این نمونه‌ها یکبار دیگر انجام شد. با توجه به آنکه چرخه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس به مقدار معینی از غلظت DNA نیاز دارد رقیق‌سازی DNA انجام شد (مدل Peggab، Mastercycler) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس به روش Wanntorp با اندکی تغییرات انجام شد (Wanntorp *et al.*, 2006). تعداد ۱۵ آغازگر تصادفی RAPD و ۱۳ آغازگر ISSR از شرکت پاسارگاد سنتز شرکت ماکرو ژن کره برای انجام PCR تهیه شد. میزان ترکیبات مورد استفاده در PCR برای هر دو آغازگر در حجم ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۵ نانوگرم)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر آغازگر تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۱۳/۲۵ آب دیونیزه شده بود که از شرکت ندای فن تهیه شده بودند. پس از انجام PCR نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه ترمال سایکلر خارج و در دمای ۲۰- تا زمان انجام الکتروفورس نگه‌داری شدند. برای بررسی تکرارپذیری نوارهای RAPD عمل PCR در برخی از آغازگرها که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند دوباره انجام شد. محصولات تکثیر ژنوتیپ‌های مختلف آویشن برای هر یک

جدول ۲- نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مورد استفاده

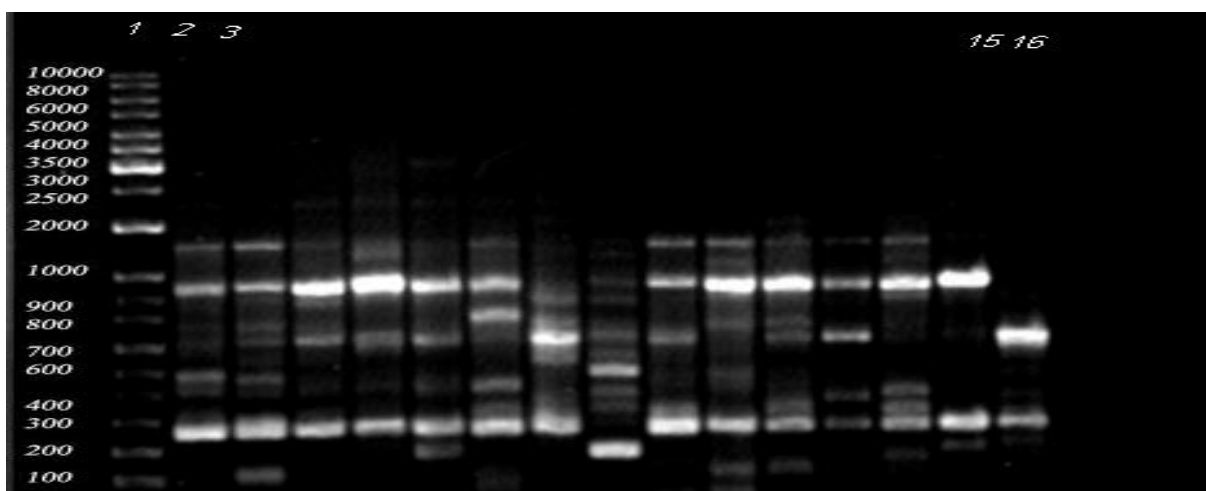
دمای ذوب	توالی آغازگر (۵'-۳')	ISSR	دمای ذوب	توالی آغازگر (۵'-۳')	RAPD
۵۲/۴	CTC TCT CTC TCT CTC TG	ISSR-8	۳۲	CAG GCC CTT C	OPA01
۶۰	AGC AGC GC AGC AGC AGC	UBC862	۳۲	AGG TGA CCG T	OPA18
۵۲/۴	ACA CAC ACA CAC ACA CC	UBC 826	۳۲	AGC GCC ATT G	OPD11
۵۰	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC 807	۳۲	CAG GAC ATC G	376
۵۰	ACA CAC ACA CAC ACA CT	ISSR-7	۳۲	CCT CAC CTG T	J
۵۹/۴	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	ISSR-25	۳۲	TAG CCC GCT T	UBC110
۴۸/۲	CTA GCT AGC TAG CTA G	ISSR-19	۳۴	CCT GGG CTT C	UBC1
۵۰	TGT GTG TGT GTG TGT GA	UBC828	۳۴	TGC CGA GCT G	A02
۴۷	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	UBC864	۳۲	GAG AGC CAA C	D18
۵۲/۴	ACA CAC ACA CAC ACA CG	P8-ISSR	۳۰	TCA CGC AGT T	394

نتایج

چندشکلی و ۲۸ نوار تک‌شکلی نشان دادند (جدول ۳). آغازگرهای مختلف بین ۳ تا ۲۰ نوار تولید کردند. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر P8-ISSR بود که در مجموع ۲۰ نوار شامل ۱۶ نوار چندشکل و ۴ نوار تک‌شکل تولید کرد و کمترین تعداد نوار مربوط به آغازگر RAPD - D18 بود که در مجموع ۳ نوار چند شکل تولید کرد. در میان آغازگرهای انتخاب شده، آغازگر ISSR-828 بیشترین نوار تک‌شکل (۵ نوار) را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان داد (شکل ۱).

از میان نشانگرهای RAPD تعداد زیادی از آنها ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند که می‌توان به نشانگر OPD11 و J اشاره کرد و در میان نشانگرهای ISSR، آغازگرهای ISSR-7، ISSR-19 و 807 با ۸۷/۵ درصد چند شکلی، بالاترین درصد چندشکلی را داشتند (جدول ۳).

در این پژوهش از مجموع ۲۸ آغازگر ابتدایی ۲۰ آغازگر شامل ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD و ۱۰ آغازگر ISSR که نوار دادند، انتخاب شدند. در مجموع ۲۳۸ نوار حاصل شد که به‌طور میانگین سهم هریک از آغازگرها ۱۱/۹ به‌دست آمد. تعداد ۲۰۷ نوار دارای چندشکلی بودند که به‌طور میانگین سهم هریک از آغازگرها ۱۰/۳۵ شد و از کل نوارهای شمارش شده، تعداد ۳۱ عدد تک باند بودند. بنابراین درصد بالای چندشکلی ۸۶/۹ در بین جمعیت‌های مختلف آویشن شیرازی نشان داده شد. از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD در مجموع تعداد ۹۱ نوار (محدوده ۱۲۰ تا ۲۵۰ جفت باز) به‌دست آمد که در این میان ۸۸ نوار چندشکلی و ۳ نوار تک‌شکلی نشان دادند. از ۱۰ آغازگر تصادفی ISSR در مجموع تعداد ۱۴۷ نوار (محدوده ۱۵۰ تا ۳۱۰۰ جفت باز) به‌دست آمد که در این میان ۱۱۹ نوار



شکل ۱- نوارهای چند شکلی ایجاد شده با نشانگر 394-RAPD در توده آویشن شیرازی پس از الکتروفورز. چاهک ۱: خط کش ژنی و چاهک‌های ۲ تا ۱۶ (شماره ۱ تا ۱۵) مربوط به نمونه‌ها بر اساس جدول ۱

جدول ۳- تعداد نوارهای تک شکل و چندشکل و درصد چندشکلی در ۱۵ نمونه آویشن شیرازی با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR

ردیف	آغازگر	تعداد نوار تک شکل	تعداد نوار چندشکل	تعداد کل نوارها	درصد چند شکلی
۱	OPA01	۰	۹	۹	٪۱۰۰
۲	OPA18	۲	۶	۸	٪۷۵
۳	OPD11	۰	۱۱	۱۱	٪۱۰۰
۴	394-RAPD	۰	۱۳	۱۳	٪۱۰۰
۵	J-RAPD	۰	۹	۹	٪۱۰۰
۶	UBC1	۰	۱۱	۱۱	٪۱۰۰
۷	A02	۱	۶	۷	٪۸۵/۷
۸	D18-RAPD	۰	۳	۳	٪۱۰۰
۹	UBC110	۱	۱۰	۱۱	٪۹۰/۹
۱۰	376-RAPD	۰	۹	۹	٪۱۰۰
۱۱	ISSR-8	۲	۱۲	۱۴	٪۸۵/۷
۱۲	UBC862	۲	۱۳	۱۵	٪۸۶/۶۷
۱۳	UBC 826	۴	۶	۱۰	٪۶۰
۱۴	UBC 807	۲	۱۴	۱۶	٪۸۷/۵
۱۵	ISSR-7	۲	۱۰	۱۲	٪۸۳/۳
۱۶	ISSR-25	۲	۱۳	۱۵	٪۸۶/۷
۱۷	ISSR-19	۲	۱۴	۱۶	٪۸۷/۵
۱۸	UBC 828	۵	۸	۱۳	٪۶۱/۳۵
۱۹	UBC864	۲	۱۴	۱۶	٪۸۷/۵
۲۰	P8-ISSR	۴	۱۶	۲۰	٪۸۰
	کل	۳۱	۲۰۷	۲۳۸	-----
	میانگین	-----	۱۰/۳۵	۱۱/۹	٪۸۶/۹

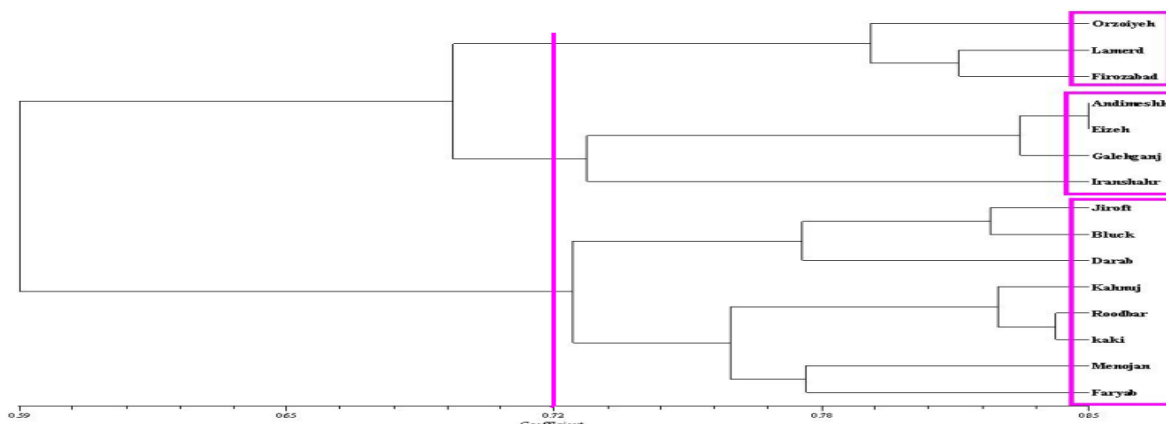
جدول ۴- میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های مختلف حاصل از ضریب تشابه دایس

ارزوئیه	جیرفت	اندیمشک	لامرد	فیروزآباد	کهنوج	ایذه	قلعه گنج	منوجان	بلوک	داراب	ایرانشهر	رودبار	فاریاب	کاکي
ارزوئیه	۰/۶۳۱	۰/۷۶۴	۰/۷۹۵	۰/۷۹۱	۰/۶۶۷	۰/۷۳۶	۰/۷۱۷	۰/۶۸۷	۰/۶۲۴	۰/۶۵۲	۰/۷۲۹	۰/۶۱۸	۰/۶۳۰	۰/۷۵۵
جیرفت	۰/۶۳۱	۰/۴۸۸	۰/۵۸۸	۰/۵۹۰	۰/۷۰۷	۰/۵۴۸	۰/۶۰۷	۰/۶۸۸	۰/۸۲۲	۰/۷۴۴	۰/۴۳۹	۰/۷۲۳	۰/۷۴۱	۰/۷۷۷
اندیمشک	۰/۷۶۴	۰/۴۸۸	۰/۶۵۸	۰/۶۵۸	۰/۵۸۱	۰/۸۴۶	۰/۸۱۹	۰/۵۹۸	۰/۵۲۴	۰/۵۵۰	۰/۷۸۹	۰/۵۲۳	۰/۵۵۴	۰/۶۸۰
لامرد	۰/۷۹۵	۰/۵۸۸	۰/۶۵۸	۱	۰/۵۸۷	۰/۶۲۳	۰/۶۸۳	۰/۵۸۱	۰/۵۷۸	۰/۵۳۲	۰/۶۹۳	۰/۵۵۲	۰/۵۸۵	۰/۶۲۵
فیروزآباد	۰/۷۹۱	۰/۵۹۰	۰/۶۵۸	۱	۰/۵۸۹	۰/۶۷۵	۰/۷۲۹	۰/۶۲۹	۰/۵۵۸	۰/۵۳۶	۰/۶۴۱	۰/۵۷۸	۰/۶۱۲	۰/۶۶۷
کهنوج	۰/۶۶۷	۰/۷۰۷	۰/۵۸۷	۰/۵۸۹	۱	۰/۵۲۷	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۷۴۲	۰/۶۸۸	۰/۶۰۷	۰/۸۱۲	۰/۷۵۰	۰/۸۳۶
ایذه	۰/۷۳۶	۰/۵۴۸	۰/۶۲۳	۰/۶۷۵	۰/۵۲۷	۱	۰/۸۳۹	۰/۵۶۵	۰/۴۸۸	۰/۵۳۸	۰/۶۷۶	۰/۵۵۸	۰/۵۶۸	۰/۶۷۴
قلعه گنج	۰/۷۱۷	۰/۶۰۷	۰/۶۸۳	۰/۶۲۹	۰/۶۲۵	۰/۸۳۹	۱	۰/۶۰۰	۰/۵۵۲	۰/۵۷۸	۰/۷۰۹	۰/۶۱۵	۰/۶۲۸	۰/۷۲۰
منوجان	۰/۶۸۷	۰/۵۹۸	۰/۵۸۱	۰/۶۲۹	۰/۶۲۵	۰/۵۶۵	۰/۶۰۰	۱	۰/۶۳۷	۰/۷۱۳	۰/۶۰۲	۰/۷۵۸	۰/۷۷۸	۰/۸۰۸
بلوک	۰/۶۲۴	۰/۸۲۲	۰/۵۷۸	۰/۵۵۸	۰/۷۴۲	۰/۴۸۸	۰/۵۵۲	۰/۶۳۷	۱	۰/۸۰۹	۰/۵۰۰	۰/۶۵۲	۰/۷۳۶	۰/۷۵۲
داراب	۰/۶۵۲	۰/۷۴۴	۰/۵۵۰	۰/۵۳۲	۰/۶۸۸	۰/۵۳۸	۰/۵۷۸	۰/۷۱۳	۰/۸۰۹	۱	۰/۵۰۰	۰/۷۰۵	۰/۷۷۱	۰/۷۸۳
ایرانشهر	۰/۷۲۹	۰/۴۳۹	۰/۷۸۹	۰/۶۹۳	۰/۶۰۷	۰/۶۷۶	۰/۷۰۹	۰/۶۰۲	۰/۵۰۰	۰/۷۱۳	۱	۰/۵۴۸	۰/۵۳۲	۰/۷۲۹
رودبار	۰/۶۱۸	۰/۷۲۳	۰/۵۲۳	۰/۵۵۲	۰/۸۱۲	۰/۵۵۸	۰/۶۱۵	۰/۷۵۸	۰/۶۵۲	۰/۷۰۵	۰/۵۴۸	۱	۰/۶۸۱	۰/۸۲۰
فاریاب	۰/۶۳۰	۰/۷۴۱	۰/۵۵۴	۰/۵۸۵	۰/۶۱۲	۰/۷۵۰	۰/۶۲۸	۰/۷۷۸	۰/۷۳۶	۰/۷۷۱	۰/۵۳۲	۰/۶۸۱	۱	۰/۸۲۰
کاکي	۰/۷۵۵	۰/۷۷۷	۰/۶۸۰	۰/۶۲۵	۰/۸۳۶	۰/۶۷۴	۰/۷۲۰	۰/۸۰۸	۰/۷۵۲	۰/۷۸۳	۰/۶۲۴	۰/۸۲۰	۰/۸۲۰	۱

ایده دارای بیشترین تشابه ۰/۸۴۶ با یکدیگر بودند و گروه سوم شامل ۸ عضو: کاکلی، جیرفت، رودبار، فاریاب، کهنوج، بلوک، داراب، منوجان و گروه سوم دارای بیشترین عضو بود و در ضریب تشابه ۰/۷۲۵ به دو زیرگروه تقسیم گردید که زیرگروه اول شامل جیرفت، بلوک و داراب و زیرگروه دوم شامل بقیه اعضای گروه بود. جیرفت و بلوک دارای تشابه ۰/۸۲۲ بودند (شکل ۲). از آنجایی که نمونه‌های جمع‌آوری شده توده‌های بومی همان مناطق بودند، در یک گروه یا گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند، به شکلی که نمونه‌های اندیمشک و ایده در یک منطقه جغرافیایی قرار داشتند و در یک گروه طبقه‌بندی شدند. با این حال مواردی یافت شد که بین گروه‌ها و شرایط جغرافیایی مطابقتی وجود نداشت، به‌عنوان مثال دو توده ایران‌شهر و ایده که از لحاظ جغرافیایی زیاد به هم نزدیک نیستند از لحاظ مولکولی در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج حاصل از ضریب تشابه دایس نرم‌افزار NTYSIS حکایت از این مطلب داشت که تشابه ژنتیکی توده آویشن بین ۰/۴۳۹۰-۰/۸۴۶۰ متغیر بود (جدول ۴) که کمترین تشابه یا دورترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های جیرفت با ایران‌شهر و بیشترین تشابه ژنتیکی یا کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های اندیمشک و ایده بود.

با استفاده از دندروگرام ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده در ضریب تشابه ۰/۷۲ به سه گروه تقسیم‌بندی شدند که گروه اول شامل سه عضو: ارزوئیه، لامرد و فیروزآباد بود، این گروه در ضریب تشابه ۰/۷۹ به دو زیرگروه تقسیم شد. یک زیرگروه اول شامل لامرد و فیروزآباد و زیرگروه دوم شامل ارزوئیه بود. لامرد و فیروزآباد دارای تشابه ۰/۸۱۵ بودند. گروه دوم شامل ۴ عضو: اندیمشک، ایده، قلعه‌گنج و ایران‌شهر بود، این گروه در ضریب تشابه ۰/۷۳ به دو زیرگروه تقسیم گردید که زیرگروه اول شامل اندیمشک، ایده و قلعه‌گنج و زیرگروه دوم شامل ایران‌شهر بود، اندیمشک و

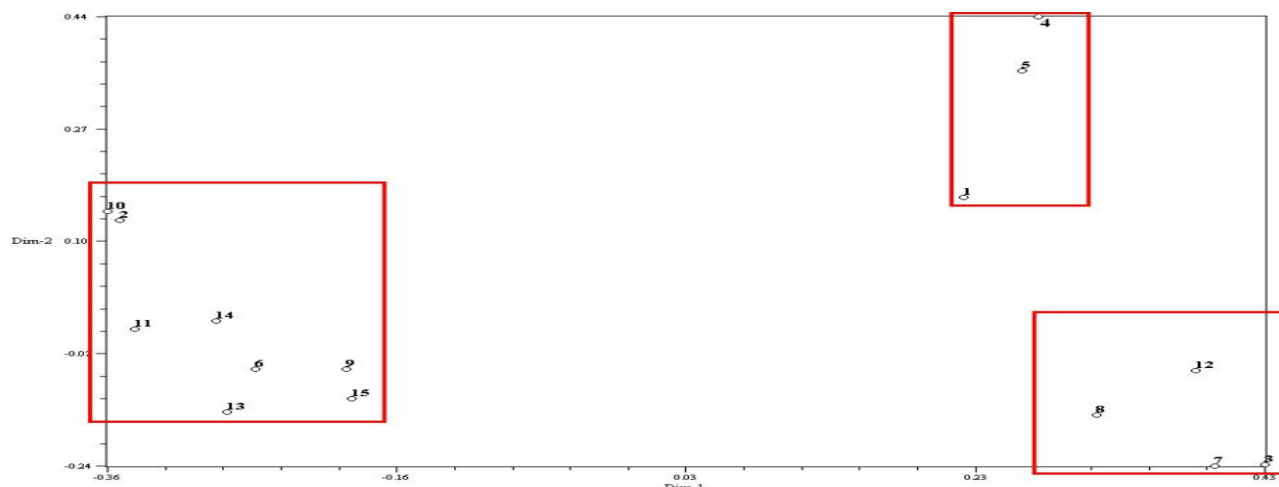


شکل ۲- دندروگرام (UPGMA) بر اساس ضریب تشابه Dice در بین اکوتیپ‌های آویشن شیرازی بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR (از بالا به پایین: ارزوئیه، لامرد، فیروزآباد، اندیمشک، ایده، قلعه‌گنج، ایران‌شهر، جیرفت، بلوک، داراب، کهنوج، رودبار، کاکلی، منوجان، فاریاب)

ها در ۳ گروه متفاوت گروه‌بندی شدند. گروه اول شامل ارزوئیه، لامرد و فیروزآباد، گروه دوم اندیمشک، ایران‌شهر، ایده و قلعه‌گنج و گروه سوم فاریاب، کهنوج، کاکلی، جیرفت، رودبار، بلوک، داراب و منوجان بودند. این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از دندروگرام مطابقت داشت. ضریب

از نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر روی داده‌های حاصل از RAPD و ISSR یک پلات دویبعی (شکل ۳) و یک پلات سه‌بعی ترسیم شد. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم از میزان کل تنوع را ایجاد کردند با استفاده از اطلاعات به دست آمده از پلات دویبعی و سه‌بعی ژنوتیپ-

همبستگی کوفتیک برای آزمایش وابستگی داده‌های ورودی به خوشه و خروجی از خوشه ۷۴/۶۰ درصد برآورد شد.



شکل ۳- پلات دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

(شماره ۱ تا ۱۵ مربوط به نمونه‌ها بر اساس جدول ۱)

بحث

شمال ایران با نشانگرهای ISSR به این نتیجه رسیدند که براساس ضریب تشابه Nei، شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی (۸۸ درصد-۷۴ درصد) بین جمعیت‌ها وجود داشت. کمترین فاصله ژنتیکی (۱۳/۲ درصد) بین جمعیت بندرگز و گرگان و بیشترین فاصله ژنتیکی (۳۰/۱ درصد) بین جمعیت گرگان و نوشهر مشاهده شد. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی شمشاد قابل اعتماد و کاراست (Ahmadikhah, 2008).

گزارش‌های مشابهی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی آویشن شیرازی با نشانگر RAPD و ISSR وجود ندارد و گزارش‌های کمی در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف آویشن موجود است. در مطالعه Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۱) بر روی کولتیوارهای آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) نشان داده شد که همبستگی بالایی بین ماتریس فواصل ژنتیکی حاصل از نشانگرهای RAPD و ماتریس فواصل نشانگرهای فیتوشیمیایی وجود دارد.

در این تحقیق ۲۰ آغازگر شامل ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD و ۱۰ آغازگر ISSR استفاده گردید. از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD در مجموع تعداد ۹۱ نوار به دست آمد که در این میان ۸۸ نوار چندشکلی و ۳ نوار تک‌شکلی نشان

در این تحقیق از نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های مختلف آویشن شیرازی در ایران استفاده شد. همان طور که در شکل ۳ مشخص است آویشن شیرازی پراکندگی بیشتری را بر روی پلات PCA نشان می‌دهد که این نشان‌دهنده یک پایه ژنتیکی وسیع است. نتایج حاصل از دندروگرام و نتایج حاصل از PCA با یکدیگر مطابقت داشتند. این موضوع مشخص کننده روابط ژنتیکی مشخص شده در تجزیه خوشه‌ای است (Shashidhara, 2002). گیاهان دگرگشن قادرند تنوع مناسبی را با کمک نشانگرهای مولکولی ایجاد کنند (Hamrick & Godt, 1989). در این تحقیق همه ۱۵ ژرم پلاسما جمع‌آوری شده دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند که می‌تواند ناشی از سطح بالای دگرگشتی در این جنس باشد (MirzaeiNodoushan et al., 2007; Lopez-Pujol et al., 2004). نشانگر مولکولی ISSR به‌طور گسترده و موفقیت‌آمیز در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیک، نقشه‌های ژنتیکی و بیولوژی تکاملی در دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Cheghamirza et al., 2004). محققان با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شمشاد در

میان جمعیت‌های آویشن شیرازی نشان داد. به‌طور کلی باتوجه به تحقیقات انجام شده و گروه‌بندی خوب شکل گرفته توده‌های آویشن شیرازی و همچنین نشان دادن دامنه خوب تنوع در این توده‌ها نتایج این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی ابزار بسیار مفیدی برای بررسی خصوصیات ژنتیکی و شناسایی دقیق‌تر اکوتیپ‌های آویشن شیرازی هستند و همچنین توانایی بالایی در تفکیک، گروه‌بندی و جداسازی درون گونه‌ها دارند. با این نشانگرها می‌توان تنوع اکوتیپ‌ها و مطابقت آنها با الگوهای جغرافیایی را به‌خوبی مشخص کرد، به‌طوری که اطلاعات حاصل از تحقیقات مولکولی می‌تواند مکملی برای اطلاعات به‌دست آمده از مطالعات مورفولوژیکی باشد و همچنین تنوع نسبتاً خوبی در بین توده‌های مختلف آویشن مورد مطالعه وجود دارد، بنابراین می‌توان از این تنوع در جهت اصلاح ارقام و تولید ارقام بهتر و همچنین حفظ در کتابخانه ژنی و بانک بذری بهره جست.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی با عنوان «بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم توده‌های آویشن شیرازی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR در ایران» (دانشگاه جیرفت) است. بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از مسئولان دانشگاه جیرفت نهایت سپاس و تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده:

- Ahmadi, M., Modarres Sanavy, A.M., Kafi, M., Sefidkon, F., Malekzadeh Shafaroudi, S., 2015. Evaluation genetic diversity in several Populations of Medicinal plant nowruzak (*salvia leriifolia*) using ISSR Markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1):1-12.
- Ahmadikhah, A., 2008. Advanced Genetics. Publication of Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources. Gorgan, 348p.
- Alamdary, B.L., Safarnejad, A. and Nematzadeh, G.A., 2012. Using RAPD marker for genetic diversity assessment of several *Thymus* Species.

دادند و با استفاده از دندروگرام ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. بررسی نتایج به‌صورت دندروگرام روش بسیار سودمندی است که تجزیه و تحلیل را سریع و آسان می‌کند. در تحقیق Ismaeili و همکاران (۲۰۱۳) که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ توده آویشن گونه *Thymus pubescens* بر اساس ۲۷ نشانگر RAPD انجام شد، ۳۶۰ نوار تولید شد که از این تعداد ۲۷۳ نوار چند شکل بود و از نتایج به‌دست آمده به این نتیجه رسیدند که توده‌های مختلف جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سه گروه عمده تقسیم‌بندی می‌شوند و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی این دوازده توده را در سه گروه تقسیم نمودند، همچنین نشان دادند که نشانگر RAPD ابزار بسیار مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی آویشن گونه *T. pubescens* است. در تحقیق Ghouth و همکاران (۲۰۱۴) بر روی عناب، به‌منظور گروه‌بندی عناب‌های ایران بر اساس صفات کمی و نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات کمی این اکوتیپ‌ها را در سه تا شش گروه اصلی دسته‌بندی کرد، به‌طور کلی تنوع عناب ایران در سه استان مازندران، اصفهان و خراسان جنوبی دیده شد و خراسان جنوبی تقریباً کل تنوع موجود در ایران را به‌عنوان یک هسته مرکزی تنوع دربرمی‌گیرد (Ghouth, 2014). در تحقیق Ven Katachalam و همکاران (۲۰۰۸) به‌منظور آشکارسازی چندشکلی DNA، تشخیص ژنوتیپ و روابط فیلوژنتیک بین ۲۱ رقم تجاری موز هند از ۵۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD و ۱۲ آغازگر ISSR استفاده کردند. این آغازگرها بین ارقام به‌ترتیب ۶۰/۱۵ و ۵۶/۷۳ درصد باندهای چندشکل را برای ISSR و RAPD آشکار کردند که نشان می‌دهد این دو نشانگر مشابهند و قدرت تشخیص بالایی دارند.

در این تحقیق ۱۵ اکوتیپ از *Zataria multiflora* Boiss از لحاظ تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD و ISSR و دامنه تشابه نسبتاً وسیع توده‌های مذکور، وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در

- Kafkas, S., Ozkan, H., Erol, B., Acer, I., Seeyfettin, H. and Koyuncu, S., 2006. Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide *Pistachio* Germplasm : Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Markers.
- Karimishahri, M.R., Dehvary, V., Hajianshahri, M. and Mokhtareyan, H., 2012. Genetic Diversity of some Grapevine cultivars of Khorasan Razavi Province Based on RAPD and ISSR markers . Race improvement of seed, 28(2):159-172.
- Khansari Nejad, B., Hasandokht M.R., Nazeri, V. and Sorny, A., 2015. Evaluation of Genetic Diversity Some edible species Iranian saffron (*Crocus* sp.) using morphological markers and ISSR markers. Science Gardening of Iran, 46(1):51-61.
- Landry, B. S., Kessel, I R.V., Farrara, B. and Michelmores, R. W., 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics, 116: 331-337.
- 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.
- Mirzaei-Nodoushan, H., Mehrpour, S. and Sefidkon, F., 2007. Path analysis of the characters influencing essential oil in three *Thymus* species. Pajouhesh and Sazandegi, 70: 88-94.
- Nematzadeh, G. A. and Kiani, G.H., 2004. Plant breeding. Mazandaran university, 546p.
- Sarkhosh, A. Zamani, Z. Fatahi R. and Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. Scientia Horticulturae, 111: 24-29.
- Sefidkon, F. and Rahimi Bidgoli, A., 2003. Quantitative and qualitative variation of essential oil of *Thymus kotschyanus* by different methods of distillation and stage of plant growth . Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 15:1-22.
- Seid Tabatabaie, B., Rahim Malek, M., Talebi, M., Yamchi, A., Etemadi, N. and Mobli, M., 2007. Assessment of Genetic diversity of Isfahan elms (*Ulmus spp.*) Populations using RAPD and ISSR markers, Science and Technical Gardening of Iran, 8(4) :213-224.
- Shashidhara, G., 2002. Genetic evaluation of elite sandalwood (*Santalum album* L.) clones using RAPD markers. PhD thesis, University of agriculture sciences, Bangalore, India.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D. and Papa, R., 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L., and *P. coccineus* L. Landraces in central Italy. Plant Breeding, 124(5):464-472.
- Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(2) : 192-201 .
- Cheghamirza, K., Koveza, O.V., Kononov, F.A., Gostimskii, S.A., 2004. Identification and mapping of *chi115* gene and DNA markers linked to it in pea (*Pisum sativum* L.), Genetika, 40: 909-915.
- Diederichsen, A., Fu, Y.B., 2006. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four intra-specific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. sub. *usitatissimum*). Genetic Resources and Crop Evolution, 53:77-90.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G.F., Attidos Santos, A.C., 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial Thyme cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9): 4220-4223.
- Eftekhari, F., Zamani, S., Yusefzadi, M., Hadian, J. and Nejad Ebrahimi, S., 2011. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Benth essential oil against extended spectrum β Lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella Pneumonia*. Jundishapur Journal of Microbiology, 4(5): 43-49.
- Farsani, T., Etemadi, N. and Seid Tabatabaie, B., 2008. Analysis of Genetic in Bermuda grass (*Cynodon Dactylon*) Accessions using Morphological characteristics and ISSR Markers, science and technical gardening of Iran, 9 (2):83-96.
- Ghasemi, N., 2004. Iranian herbal pharmacopeia ministry of hygiene 1st edition, 6-51.
- Ghouth, K., Malekzadeh, S., Rashedmohsel, M.H., Akbari M.R and Razavi, H., 2014. Grouping Jujubes of Iran Based on Quantitative Characteristics and ISSR and RAPD Markers. Race Improvement of Seed, 30(1): 173-190.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1989. Allozymes diversity in plant species In: Brown AHD, editor. Plant Population Genetics. Breeding and Genetic Resources. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 43-63.
- Ismaeili, A., Zabeti, M., Madah Areffie., Nazarian Firooz Abadi, F. and Mojiri, F., 2013. Surveying genetic variety in thyme "*Thymus Pubescens*" species on the basis of RAPD marker. News Cellular and Molecular Biotechnology, 4(13): 27-31.
- Judy, M.H., Mahdavi, M., 2011. Identification applications of pastures, Aizh, First Edition. pp. 333.
- Justus M., Ester, M., Kahangi, W. and Fusao, M., 2004. Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. Scientia Horticulturae, 99: 9-20.

- DNA polymorphism, genotype identification and Phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 47: 974-985.
- Wanntorp, L.A., Kocyan, R., van, D. and Renner, S., 2006. Toward a Monophyletic Hoya (Marsdeniaceae, Apocynaceae) Inferences from the Chloroplast trnL Region and the rbcL-atpB Spacer. *Systematic Botany*, 31(3): 586-589.
 - Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalskiand, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary Primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535.
 - Zamani, Z., Sarkhosh, M. and Fatahimoghadam, H., 2007. Assessment of genetic diversity among races of some pomegranate using RAPD markers. *Journal of Agricultural Sciences*, 37 (5): 865 -873. .
 - Souframanien, J. and Gopalkrishna, T.,2004. A comparative analysis of Genetic Diversity in blackgram Genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(8):1687-1693.
 - Sunar, S., Aksakal, O., Yildirim, N., Agar, G., Gullunce, M. Sahin, F., 2009. Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among Thymus species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Romaian Biotechnological letters*, 14(2): 4313-4318.
 - Tae-jin, T., Sum, J. Y., Jang, W. and Bae kim, W., 2007. Genetic relationships of Lactuca spp. Reveald by RAPD, inter-SSR, AFLP, and PCR-RFLP analysis. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10: 29-34.
 - Ven Katachalam, L., Sreedhar, R V., Bhagyalakshmi, N., 2008. The use of genetic markers for detecting

Assessment of genetic diversity of *Zataria multiflora* ecotypes by RAPD and ISSR

H. Bibak ^{*1}, K. Aghaabbasi ²

1*-Corresponding author, M.Sc., Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, I.R. Iran.

Email: hbibak@ujiroft.ac.ir

2-PhD student, Department of Agriculture Biotechnology, Guilan University, Guilan, I.R. Iran.

Received: 16.10.2016 Accepted: 10.10.2017

Abstract

Assessment of genetic diversity and germplasm classification of plant species are important activities in plant improvement and management of genetic resources. Regarding observed variation on various traits of *Zataria multiflora* Bosis. random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to assess genetic diversity of the species in Iran. Leaves were collected on thyme plants of 15 different regions of Kerman, Sistan and Balochistan, Boushehr, Fars, and Khuzestan provinces. Leaf DNA extraction was carried out by cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method with small modifications. Ten RAPD markers and 10 ISSR markers with sharper bands in polymerase chain reaction (PCR) were used for data analysis. NTSYS-pc software and dice similarity coefficient, as well as Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) were used to draw the related dendrogram. Cophenetic correlation coefficient was calculated and a two-dimensional graph was created based on principle component analysis (PCA) results. Range of the bands produced by the primers varied from 120 to 3100bp. The 15 selected regions were classified into three separate groups. The established clusters were in a good harmony with geographical conditions. Entirely the markers produced 207 bands with polymorphism percentage of 86.9. The results of the dice similarity coefficient produced by NTYSIS suggested that genetic similarity of thyme varied between 0.4390–0.8460. The most genetic similarity was observed between Andimeshk and Eizeh samples and the least similarity was observed between Iranshahr and Jiroft samples. Results of principle components analysis and cluster analysis were similar. Cophenetic correlation coefficient was 74.60%. The results suggested that RAPD & ISSR markers are useful for investigating genetic variability of *Zatraia multiflora* germplasm.

Keywords: Cluster analysis, genetic diversity, molecular markers, *Zataria multiflora*