DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3477

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۰۱-۱۹۲ (۱۳۹۱)

استفاده از نشانگر RAPD برای ارزیابی گوناگونی ژنتیکی برخی از گونه‌های آویشن

سیده بی‌بی لیلا علمداری[۱]، عباس صفرنژاد*[۲] و قربانعلی نعمت‌زاده[۳]

۱- کارشناس‌ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، پست‌الکترونیک: Sebre14@yahoo.com
۳- استاد، اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۲۱

چکیده

سیزده نمونه از گیاه دارویی آویشن، شامل ۱۰ نمونه از گونه بومی *Thymus daenensis* و نمونه‌های دیگر مربوط به گونه‌های *T. migricus*, *T. pubsence* و *T. fedtschenkoi* مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی تنوع مولکولی نمونه‌های آویشن، DNA ژنومی به صورت بالک با استفاده از روش CTAB با کمی تغییرات، استخراج گردید. برای انجام واکنش PCR از ۲۰ آغازگر رپید استفاده گردید که تنها ۸ آغازگر باندهای واضح و تکرارپذیر را نشان دادند. از مجموع ۹۷ باند تولید شده ۶۱٪ باندها چند شکل بودند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده (۱۶عدد) مربوط به آغازگرOPA9 و کمترین تعداد (۸ عدد) مربوط به آغازگر OPP3 بود. نمونه‌های شماره ۸ (*T. daenensis* subs daenensis) و ۱۰ (*T. daenensis* subs daenensis) در کمترین فاصله ژنتیکی (شباهت ۹۲٪) نسبت به هم و نمونه‌های شماره ۲ (*T. migricus*) و ۱۱ (*T. daenensis* subs daenensis) در دورترین فاصله (شباهت ۷۵٪) نسبت به هم قرار داشتند. میانگین تنوع ژنی نی برابر با ۰/۲۰۸۷ به‌دست آمد. دندروگرام ترسیم شده در فاصله ژنتیکی ۸۰٪ دو گروه اصلی را بین ۱۳ نمونه مشخص کرد. در یک گروه نمونه‌هایی از سه گونه *T. migricus*، *T. daenensis* و *T. pubsence* قرار گرفتند و در گروه دوم دو گونه *T.daenensis* subs daenensis و *T. fedtschenkoi* قرار گرفتند. به‌طورکلی بررسی تنوع در ژنوتیپ‌های آویشن با استفاده از نشانگر رپید نشان داد که این نشانگر در شناسایی نواحی چند شکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن، تنوع ژنتیکی، رپید.

مقدمه

افزایش جمعیت و نیاز مبرم به گیاهان دارویی به‌عنوان مواد اولیه تولید دارو، ناتوانی در تولید مصنوعی پاره‌ای از داروهای حیاتی توسط صنایع داروسازی و همچنین اهمیت مواد مؤثر گیاهان دارویی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی باعث شده که توجه و تحقیق پیرامون این دسته گیاهان از نظر کشت، تولید و مصرف از اهمیت خاصی برخوردار باشد (Baghery *et al.*, 2005).

آویشن (*Thymus* spp) یکی از گیاهان دارویی مهم و تجاری می‌باشد. حدود ۳۵۰ گونه تیموس وجود دارد که

در آسیا و اروپای میانه گسترش دارند. بیش از ٦٠ گونه بومی اروپا بوده، اسپانیا و ترکیه با حداکثر تنوع مهمترین صادرکنندگان آویشن به شکل وحشی می‌باشند (Mahdavi, 2006). از محدوده فلور ایرانیکا ۱۷ گونه که ١٤ گونه آن متعلق به کشور ایران است پراکنش دارند. ١٤ گونه گزارش شده ایران، بیشترین پراکندگی را در شمال و غرب کشور داشته و تعداد گونه‌ها به طرف جنوب و شرق کاهش می‌یابند (Jamzad, 2010). آویشن به دلیل وجود مواد مؤثره زیاد در صنایع آرایشی و بهداشتی، به لحاظ داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی در صنایع غذایی و خصوصاً در صنعت داروسازی مدرن استفاده می‌شود (Brown, 2002). بیش از ۲۸ نوع ترکیب در اسانس جنس *Thymus* شناسایی شده، به‌طوری‌که مهمترین ترکیب اسانس آویشن تیمول (٣٦٪ تا ٥٥٪) می‌باشد. در اسانس آویشن ماده دیگری به نام کارواکرول (Carvacrol) و نیز مقادیر فراوانی از سایر اسانس‌ها وجود دارد (Mahdavi, 2006).

تنوع مبنای همه گزینش‌ها در اصلاح نباتات است. انتخاب ژنتیکی نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی دامنهٔ انتخاب وسیع‌تر می‌شود. از طرف دیگر تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم به اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها، از دوباره‌کاری خودداری کنند. هتروزیس یا برتری دورگه‌ها بر میانگین والدین، به فاصله ژنتیکی بین والدین بستگی دارد. البته برای بررسی فاصله ژنتیکی بین والدین، ارقام و واریته‌ها باید دسته‌بندی شوند (Nematzadeh & Kiani, 2004).

با توجه به اهمیت آویشن لزوم تحقیقات بیشتر در جهت شناسایی به‌ویژه از نظر ژنتیکی و اصلاحی احساس می‌شود. از آنجا که شناسایی و به‌کارگیری ریخته‌های ارثی متفاوت در اصلاح یک گیاه دارای اهمیت ویژه‌ای است می‌توان با برخورداری از توان توصیف ژنتیکی ارقام، ضمن حفظ خلوص ژنتیکی، ریخته‌های ارثی را به صورت دقیق شناسایی و روابط ژنتیکی را به نحو قابل توجهی برآورد کرد. همچنین با دانستن روابط ژنتیکی بین ارقام می‌توان از اطلاعات رده‌بندی به‌عنوان راهنمایی برای بهره‌گیری بهتر از منابع ژنتیکی در استفاده از آنها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد.

بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی همواره متداول بوده است.نشانگرهای مورفولوژیکی به دلیل کم بودن تعداد و نیز متأثر شدن از محیط با محدودیت مواجه هستند (Hashemi *et al.*, 2010). نشانگرهای بیوشیمیایی پروتئین‌ها یا آنزیم‌هایی هستند که در نتیجهٔ بیان ژن تولید می‌شوند (Kumer *et al.*, 1999) و به علت تعداد کم، متحمل شدن تغییرات پس از ترجمه، محدود بودن روش‌های رنگ‌آمیزی و احتمال تأثیرگذاری عوامل محیطی روی سطح کمی و کیفی پروتئین‌ها از محدودیت‌هایی برخوردار هستند. امروزه روش‌های مولکولی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

تفاوت‌هایی که در سطح DNA تظاهر می‌یابند، به نشانگرهای DNA معروفند که در طبقه‌بندی موجودات، تعیین تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و غیره کاربردهای بسیار وسیعی پیدا کرده‌اند (Hashemi *et al.*, 2010).

در این راستا نشانگر مولکولی RAPD یکی از عمومی‌ترین نشانگرهای مولکولی بوده‌اند که در زمینه‌های مختلف به‌کار رفته‌اند. این تکنیک در شرایطی مشابه با شرایط PCR با استفاده از DNA ژنومی گونه‌های مورد

نظر و یک الیگونوکلئوتید کوتاه منفرد انجام می‌شود. DNA ژنومی دو فرد متفاوت اغلب الگوهای تکثیر یافته مختلفی تولید می‌کنند. به‌طوری‌که یک قطعه مشخص که برای یک فرد تولید شده است اما برای فرد دیگر تولید نشده است، بیانگر چندشکلی DNA است و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد (Farsi & Zolala, 2003). باید اضافه کرد که Echeverigaray و همکاران (۲۰۰۱) همبستگی بین روابط ژنتیکی و شیمیایی بین ارقام تجاری آویشن *Thymus vulgaris* را با استفاده از نشانگرهای رپید و Gc-Ms بررسی کردند. در مطالعه مذکور برای ارزیابی روابط ژنتیکی از ۱۵ آغازگر رپید استفاده شد. تعداد باندهای بدست‌آمده بوسیله آغازگرها از ۵ تا ۱۸ باند متفاوت بود. از ۱٦۳ قطعه تکثیر شده ۱۰٤ باند چند شکل بودند (٦۳/۸٪). براساس الگوهای رپید کولتیوارها به دو دسته تقسیم شدند که با نتایج بدست‌آمده از تجزیه بر اساس Gs-Ms منطبق بود و ضریب همبستگی آن ۰/۷۷۹ بود. نتایج نشان داد که رپید توانایی تشخیص کولتیوارهای آویشن را دارد.

این پژوهش به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های بومی آویشن ایران و گروه‌بندی آنها با استفاده از نشانگرهای رپید انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این تحقیق ۱۳ نمونه از گیاه دارویی آویشن (جنس*Thymus*) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- نمونه‌های گیاهی آویشن مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر رپید

ردیف	نام علمی گیاه
۱	*Thymus Pubsence*
۲	*T. migricus*
۳	*T. fedtschenkoi*
٤	*T. daenensis* subs lancifolius
٥	*T. daenensis* subs daenensis
٦	*T. daenensis* subs daenensis
۷	*T daenensis* subs daenensis
۸	*T. daenensis* subs daenensis
۹	*T. daenensis* subs daenensis
۱۰	*T. daenensis* subs daenensis
۱۱	*T. daenensis* subs daenensis
۱۲	*T. daenensis* subs daenensis
۱۳	*T. daenensis* subs daenensis

ابتدا بذرها را ضد عفونی کرده، سپس از هر توده ۲٤ بذر در گلدان‌های جیفی کشت گردید (در هر جیفی ۱ بذر). آنگاه گلدان‌ها به مدت تقریبا یک ماه در اتاقک رشد قرار داده شد. بعد از اینکه گیاهان به مرحله ۸ برگی رسیدند جیفی‌ها را داخل گلدان‌های پلاستیکی قرار داده و به گلخانه تحقیقاتی منتقل شدند. بعد از ۲ هفته نمونه‌ها به مزرعه اصلی انتقال یافتند. DNA ژنومی به صورت بالک از بافت برگ نمونه‌ها و با روش CTAB (Khanuja *et al.*, 1999) با کمی تغییرات استخراج شد. برای تعیین کیفیت DNA از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل را به مدت۱۰-۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده، سپس ژل را روی دستگاه ترانس ایلومیناتور (اشعه uv) قرار داده و از آن عکس‌برداری شد.

برای تکثیر DNA ژنومی از ۲۰ آغازگر تصادفی رپید استفاده شد. واکنش پی سی آر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ µl بافر پی سی آر (×۱۰)، MgCl2 2mM، ۰/٤ µM آغازگر، dNTPS ۰/۲ µM، یک واحد آنزیم تک پلیمزار و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر DNA بود.

برای تکثیر از دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر استفاده شد:

دناتوره شدن اولیه (۳ دقیقه در ۹٤ درجه) و سپس ۳۵ چرخه مشتمل بر دناتوره شدن بعدی (۱ دقیقه در ۹٤ درجه)، اتصال آغازگر (۱ دقیقه در ۳٦ درجه)، بسط آغازگر (۲ دقیقه در ۷۲ درجه) و در نهایت یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه به‌منظور بسط بودند. برای مشاهده محصول پی سی آر الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۲٪ و با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. در چاهک اول از مارکر وزنی DNA ۱ Kbp استفاده شد و در چاهک‌های بعدی نمونه‌ها به نسبت ۵ به ۱ نمونه و بافر بارگذاری شدند. رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵- ۱۰ دقیقه انجام شد و با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور و تابش UV از روی ژل عکس‌برداری شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های رپید از نرم‌افزارهای NTSYS و پاپ ژن استفاده شد. حضور یا عدم حضور هر کدام از نوارهای مشاهده شده برای هر آغازگر به‌ترتیب با اعداد ۱ و امتیازدهی شدند و بعد در نرم‌افزار اکسل یک ماتریس از اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاه تهیه شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار NTSYS بر اساس ضریب تشابه دایس، برای ایجاد ضرایب شباهت ژنتیکی میان همه جفت‌های ممکن، تجزیه و تحلیل شده و در یک ماتریس تشابه مرتب شدند. مقدار عددی ضرایب تشابه بین صفر و یک بود که مقدار صفر بیانگر وجود باندهای مشترک (عدم تشابه ژنتیکی) و مقدار یک بیانگر الگوهای باندی یکسان (تشابه ژنتیکی کامل) است. ماتریس تشابه در خوشه‌بندی SAHN با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله UPGMA برای ایجاد یک دندروگرام وارد شد. یکی از پارامترهای اولیه تعیین تنوع، شاخص تنوع ژنی (He) می‌باشد که از طریق فرمول زیر توسط نرم‌افزار پاپ ژن محاسبه شد:

$$He = 1 - \sum(p^2 + q^2)$$

He شاخص تنوع ژنی، P فراوانی باندهای موجود (۱) و q فراوانی باندهای می‌باشد (Nei , 1978).

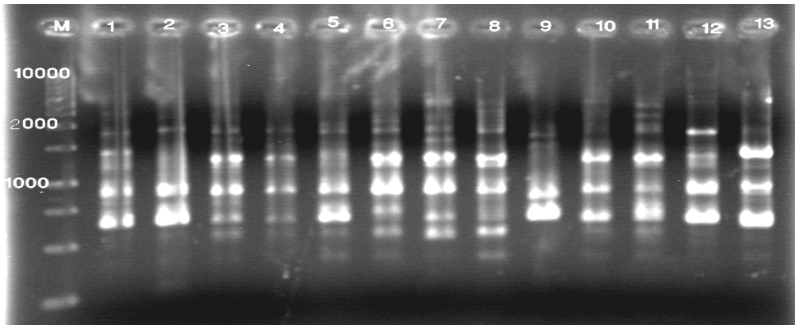
نتایج

از ۲۰ آغازگر آزمون شده تنها ۸ آغازگر باندهای واضح و تکرارپذیر را نشان دادند (جدول ۲). با انجام واکنش پی‌سی‌آر تعداد ۹۷ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی در نمونه‌ها به‌دست آمد که ٦۰ باند، معادل ٦۱/۸٦٪ باندها چند شکل بودند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده (۱٦ عدد) مربوط به آغازگر OPA9 و کمترین تعداد (۸ عدد) مربوط به آغازگر OPP3 بود. نمونه‌هایی از پروفیل‌های تولید شده با آغازگرها در شکل (۱) نشان داده شده است.

به‌منظور محاسبه تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد.

جدول ۲- آغازگرهای رپید مورد استفاده در این تحقیق

ردیف	کد پرایمر	توالی پرایمر	تعداد باند ایجادی	تعداد باند پلی مورف	درصد پلی مورفیسم
۱	OPP 3	CTG ATA CGC C	۸	٤	٥٠
۲	OPS 17	TGG GGA CCA A	۱۱	۳	۲۷/۲۷
۳	OPC 8	TGG ACC GGT G	۱۲	۸	٦٦/٦٦
٤	OPJ 21	ACG AGG GAC T	۱۳	۸	٦۱/٥۳
٥	OPA 9	GGG TAA CGG C	۱٦	۸	٥٠
٦	OPI 14	TGA CGG CGG T	۱٤	۹	٦٤/۲۸
۷	OPF 5	CCG AAT TCC C	۱۰	۹	۹۰
۸	OPU 6	ACC TTT GCG G	۱۳	۱۱	۸٤/٦۱



شکل ۱– الگوی رپید به‌دست آمده با آغازگر OPF5 برای بررسی تنوع ژنتیکی چند گونه آویشن (شماره چاهک نشان‌دهنده شماره نمونه (مطابق جدول ۱) می‌باشد؛ M نشان‌دهنده مارکر وزنی Ladder (۱ kbp) می‌باشد).

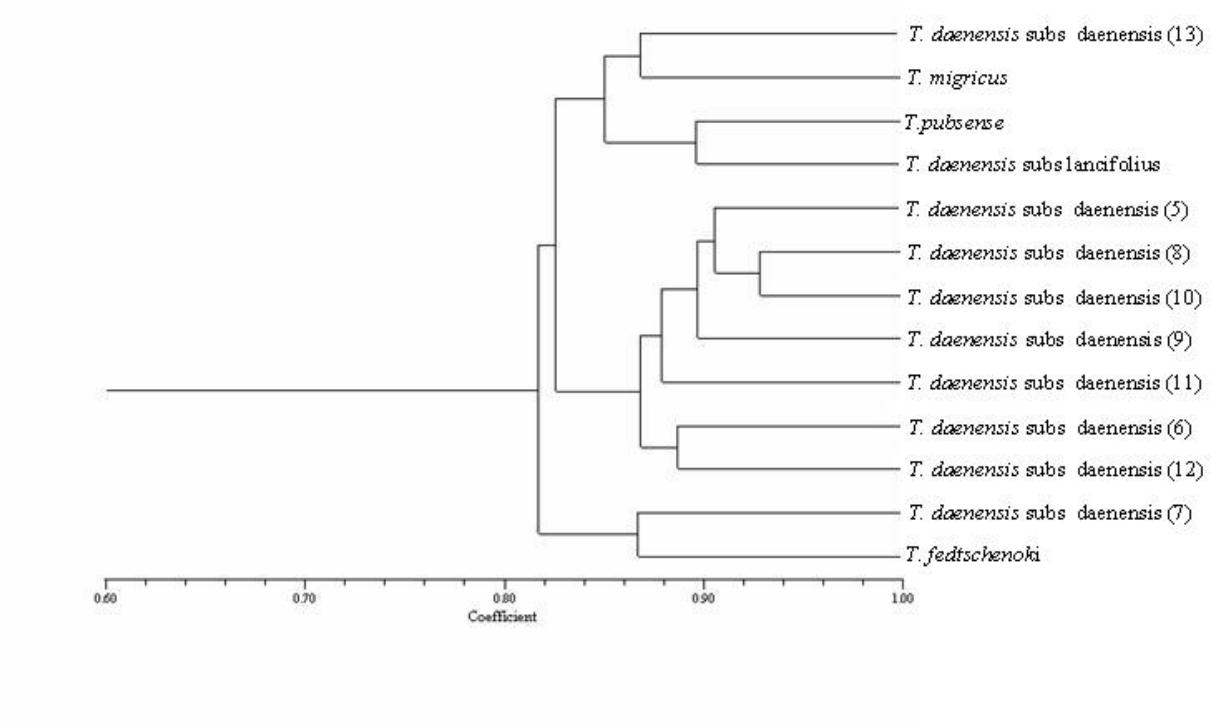
نمونه‌های (۸) *T. daenensis* subs daenensis و (۱۰) *T. daenensis* subs daenensis در کمترین فاصله ژنتیکی (شباهت ۹۲٪) نسبت به هم و نمونه‌های *T. migricus* و (۱۱) *T. daenensis* subs daenensis در دورترین فاصله (شباهت ۷۵٪) نسبت به هم قرار داشتند. میانگین تنوع ژنی نی با استفاده از نرم‌افزار پاپ ژن، ۰/۲۰۸۷ به‌دست آمد.

پس از انتقال داده‌های مولکولی و ساخت ماتریس فاصله ژنتیکی، ماتریس تشابه (جدول ۳) رسم و نهایتا دندروگرام با استفاده از روش UPGMA به‌دست آمد (شکل ۲).

دندروگرام ترسیم شده در فاصله ژنتیکی ۸۰٪ دو گروه اصلی را بین ۱۳ نمونه مشخص کرد.

در یک گروه نمونه‌هایی از سه گونه *T. migricus* و *T. daenensis* , *T. pubsence* قرار گرفتند که نمونه‌های *T. daenensis* آن بالای ۸۳٪ با هم شباهت داشتند و بیشترین شباهت بین نمونه‌های (۸) *T. daenensis* subs daenensis و (۱۰ *T. daenensis*)

subs daenensis بود که ۹۲٪ شباهت داشتند و در گروه دوم دو گونه (۷) *T. daenensis* subs daenensis و *T. fedtschenoki* قرار گرفتند.



شکل ۲- دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA برای ۱۳ نمونه آویشن با استفاده از نشانگر رپید

جدول ۳- محاسبه میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های مختلف آویشن با برنامه NTSYS

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13
N1	۱												
N2	۰/۸٦۱	۱											
N3	۰/۸۳۰	۰/۸۰٦	۱										
N4	۰/۸۹٦	۰/۸۸۲	۰/۸٤٦	۱									
N5	۰/۸۰۲	۰/۸۰۸	۰/۸۲۵	۰/۸٦۱	۱								
N6	۰/۸٤۵	۰/۸۱۹	۰/۷۹۰	۰/۸۱۳	۰/۸۸۲	۱							
N7	۰/۸۰۲	۰/۸۰۸	۰/۸٦۷	۰/۸۱۷	۰/۸۲٦	۰/۷۹٤	۱						
N8	۰/۷۸۷	۰/۷۹۳	۰/۸۱۱	۰/۸۲٤	۰/۸۹٦	۰/۸۸۵	۰/۸٤۱	۱					
N9	۰/۸۲۱	۰/۷۹٦	۰/۷۸۵	۰/۸۳۷	۰/۸۸۷	۰/۸۷۵	۰/۸۰۲	۰/۸۷۹	۱				
N10	۰/۸۳۳	۰/۷۹۳	۰/۸۱۳	۰/۸٦٤	۰/۹۱٤	۰/۸۹۰	۰/۸۵۲	۰/۹۲۸	۰/۹۲۸	۱			
N11	۰/۷۹٦	۰/۷۵۹	۰/۷۹٤	۰/۸۳۰	۰/۸٦۷	۰/۸۳۷	۰/۸۱۱	۰/۸۵۵	۰/۸۸۸	۰/۹۰۳	۱		
N12	۰/۸۹٦	۰/۸۵٤	۰/۸۰۹	۰/۸۷۳	۰/۸۹٦	۰/۸۸۷	۰/۸۱۱	۰/۸٤۲	۰/۸۹۲	۰/۸۸۵	۰/۸۲٤	۱	
N13	۰/۸٦۸	۰/۸۳۰	۰/۸۵۲	۰/۸۵٤	۰/۸۲۵	۰/۸۰٦	۰/۸۳۹	۰/۸٤۰	۰/۸۱٤	۰/۸۵٤	۰/۸۰۸	۰/۸۸۵	۱

گروه اول خود به دو دسته تقسیم شد که در یک دسته تمام نمونه‌های *T. daenensis* subs. daenensis قرار گرفتند و دسته دیگر آن خود به دو گروه تقسیم شد که *T. pubsense* و *T. daenensis* با زیر گونه lancifolius در یک دسته قرار گرفتند. (۱۳) *Thymus daenensis* subs daenensis و *T. migricus* در گروه دیگر قرار گرفتند. در گروه دوم دو نمونه *T. daenensis* subs daenensis و *T. fedtschenoki* قرار گرفتند.

بحث

با توجه به نتایج ۲۰٪ تنوع در نمونه‌ها مشاهده شد. در این خصوص Bagherzadeh (۲۰۰۹) هم ۲۲٪ تنوع در بین نمونه‌های آویشن مورد مطالعه خود مشاهده کرد و اشاره کرد که پایین بودن شاخص تنوع ژنی به نظر می‌رسد به دلیل پراکنش تک استانی بیشتر گونه‌های آویشن در ایران است. کاشت یک گونه در مناطق حفاظت شده خطر کاهش تنوع ژنتیکی را به همراه دارد. یکدست شدن گونه‌ها سبب بروز مشکلاتی مانند کاهش تنوع، امکان بروز بیماری‌ها و کاهش کیفیت اسانس می‌شود. گونه‌هایی که پراکنش تک استانی دارند در زمره گیاهان در معرض خطر محسوب می‌شوند (Jamzad, 2010). نمونه‌های (۸) *T. daenensis* subs daenensis و (۱۰) *T. daenensis* subs daenensis بیشترین شباهت ژنتیکی و *T.migricus* و (۱۱ *T. daenensis* subs daenensis) کمترین شباهت را نشان دادند. بنابراین می‌توان نسبت به بررسی لزوم و امکان دورگه‌گیری بین این نمونه‌ها تأمل بیشتری نمود. زیرا هرچه فاصله ژنتیکی بین دو والد بیشتر باشد هتروزیس در نسل اول بیشتر خواهد بود. اما برای گونه‌هایی که فاصله ژنتیکی کمتری با یکدیگر دارند کارایی بیشتری را از لحاظ انتقال ژن‌های مطلوب دربر خواهند داشت (Bagherzadeh, 2009).

با توجه به دندروگرام *T. daenensis* و *T. pubsense* با زیر گونه lancifolius در یک دسته قرار گرفتند که این نشان‌دهنده قرابت و نزدیکی این دو گونه از نظر مولکولی می‌باشد. *T. migricus* و *T. daenensis*, با زیرگونه daenensis در گروه دیگر قرار گرفتند که نشان‌دهنده قرابت نزدیک مولکولی این دو نمونه می‌باشد.

گزارش‌های کمی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی آویشن با نشانگر رپید موجود است. تنها اچوریگارای و همکاران (Echeverigaray *et al*., 2001) با بررسی تنوع ژنوتیپ‌های آویشن باغی با استفاده از رپید نشان دادند که مارکر رپید در شناسایی ارقام آویشن و تعیین روابط خویشاوندی آنها مفید است. Momeni *et al*., 2006 با بررسی تنوع در ژنوتیپ‌های نعنا با استفاده از نشانگر رپید نشان دادند که این مارکر در شناسایی نواحی چند شکلی می‌تواند مفید باشد. تنوع ژنتیکی چندین گونه جنس *Dracocephilum* از خانواده نعنا توسط Sonboli و همکاران (۲۰۱۱) با نشانگر رپید بررسی شد. از مجموع ۲۶۲ باند ۲۵۲ عدد چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای کارایی نشانگر رپید را برای جداسازی گونه ها در سطح مولکولی تأیید کرد. روابط ژنتیکی بین اکسشن‌های برزیلی و کولیتوارهای تجاری *Salvia officinalis* (مریم گلی) توسط Echeverigaray (۲۰۰۶) با استفاده از نشانگر مولکولی رپید بررسی شد. در این تحقیق ۱۸ پرایمر تصادفی ۱۹۵ باند تولید کردند که ۵۹/۳٪ پلی‌مورف بودند. بعد از تخمین شباهت ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای سه گروه مشخص تعیین شدند. نتایج کارایی نشانگر رپید را تأیید کردند. تنوع ژنتیکی ۲۰ توده محلی زیره پارسی با استفاده

از ۲۱ پرایمر رپید مورد بررسی قرارگرفته است. با انجام واکنش PCR تعداد ۸۲ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی در نمونه‌ها بدست آمد که ۷۰ باند معادل ۸۶٪ باندها چندشکل بودند. نمونه‌ها به دو دسته ایرانی و غیر ایرانی طبقه‌بندی شدند که گروه دوم خود به اروپایی و غیر اروپایی (نمونه‌های هند و افغانستان) تقسیم شد و محققان نشانگر رپید را مفید ارزیابی کردند (Hashemi *et al.*, 2010) تنوع ژنتیکی بین ٦ نمونه از گیاه دارویی گزنه موجود در ارتفاعات مختلف هیمالیا با استفاده از نشانگر رپید مورد بررسی قرارگرفته است. از ۸ پرایمر تصادفی استفاده شد. از مجموع ۱۳٤ باند ۲۷ باند پلی‌مورف و بقیه مونومورف بودند. پلی‌مورفیسم بین ۵۰ - ٤٪ بود. نتایج نشان داد نمونه‌هایی که در ارتفاع کمتری قرار داشتند شباهت ژنتیکی کمی با نمونه‌های موجود در ارتفاعات بالا داشتند و این نتیجه مؤید کارایی این نشانگر بود (Vishal *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد این نشانگر مولکولی را می‌توان به‌عنوان ابزار مفید در بررسی روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی نمونه‌های مختلف آویشن مورد استفاده قرار داد. در این تحقیق از مجموع ۹۷ باند تولید شده ٦۱٪ باندها چند شکل بودند. نمونه‌های (۸) *T. daenensis* subs daenensis و (۱۰) *T. daenensis* subs daenensis در کمترین فاصله ژنتیکی (شباهت ۹۲٪) نسبت به هم و نمونه‌های *T. migricus* و (۱۱) *T. daenensis* subs daenensis در دورترین فاصله (شباهت ۷۵٪) نسبت به هم قرار داشتند. میانگین تنوع ژنی نی ۰/۲۰۸۷ به‌دست آمد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Bagherzadeh, F., 2009. Genetic diversity assessment of thyme and evaluation of relationship using RAPD marker. M.Sc., thesis. Ferdowsy University, Mashhad, Iran.
- Baghery, A., Khalilian, S And Naghdiabadi, H., 2005. Medicinal plants in Iran and the world. National Congress Of Medicinal Plants. 646p.
- Brown, R.G., 2002. Dictionary of medical plants. Sarup and Sons Publishers, Delhi, India.
- Echeverrigaray, S. and Agostini, G., 2006. Genetic relationship between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* based on RAPD markers. Botucatu, 8: 13-17.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G.F. and Atti dos Santos, A.C., 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 49: 4220 -422.
- Farsi, M. and Zolala, G. 2003. Plant Biotechnology. Ferdowsi university of Mashhad, 495 p.
- Hashemi, H., Safarnejad A. and, Baghery, A., 2010. The use of RAPD marker assessing the genetic diversity of *Bunium persicum* B. Fedtsch populations. International Journal of Science and Nature. 1:202-208.
- Jamzad, Z., 2010. *Thymus* and *Satureja* species. Institute Research of Forests and Rangeland, Tehran, Iran, 171p.
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K. and Kumar, S., 1999. RAPD isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter, 17: 1-7.
- Kumer, L.S., 1999. DNA markers in plant development an overview. Biotechnology advance, 17: 143-182.
- Mahdavi, S., 2006. Evaluation of morphological, karyotype and DNA diversity of thyme. M.Sc. Thesis. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.
- Momeni, S., Shiran, B. and Razmjoo, K., 2006. Genetic variation in Iranian Mints on the bases of

RAPD analysis. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 1898-1904.
– Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. Genetics. 89: 583-590.
– Nematzadeh, Gh. A. and Kiani, Gh., 2004. Plant Breeding. Mazandaran University. 546 p.
– Sonboli, A., Gholipour, A., Mirjalili, M.H. and Amini Rad, M., 2011. Molecular characterization of Iranian *dracocephalum* (Lamiaceae) species based on RAPD data. Acta Bialogica Szegediensis, 55:227-230.
– Vishal, B.N. Navjyoti., Vivek V. and Shalini, S., 2009. Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle planet urtica dioica based on RAPD marker. Journal of Medicinal Planets Research. 3.166-170.

Using RAPD marker for genetic diversity assessment of several *Thymus* Species

S.B.L. Alamdary[1], A. Safarnejad*[2] and G. A. Nematzadeh[3]

1- M.Sc., Agricultural Biotechnology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Sari, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assos. Prof., Razavi-Khorasan Agriculture and Natural Resources Center, Mashhad, I.R.Iran, Email: Sebre14@yahoo.com
3- Prof., Plant Breeding Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, I.R.Iran

Received: 05.11.2010 Accepted: 11.11.2012

Abstract

Thirteen accessions of thyme medicinal plant belonging to Iranian endemic species of *Thymus daenensis*, *T. migricus*, *T. pubsence* and *T. fedtschenkoi* were studied to asses genetic variation. Genomic DNA was extracted using modified CTAB protocol. DNA was qualified using electrophoresis. Twenty primers were used for PCR analysis, of which only 8 primers showed clear bands. Out of 97 bands 61% were polymorphic. The number of amplification products per primer varied from 8 (OPP3) to 16 (DPA 9). *T. daenensis* (No. 8 and 10) were in the lowest genetic distance and *T. migricus* and *T. daenensis* (No. 11) were in the most genetic distance and the lowest genetic similarity. Dendrogram showed two major clusters. Group 1 was formed by *T. daenensis*, *T. pubsence* and *T. migricus*. Group 2 was formed by *T. fedtschenkoi* and *T. daenensis* subs daenensis (No.7). Finally investigating the genetic variation of the plant species by RAPD indicated that RAPD marker is suitable to determine the polymorphic loci and to estimate the genetic distance on the species.

Key words: *Thymus*, genetic diversity, RAPD.