بررسی روابط ژنتیکی توده‌های آویشن به‌وسیله نشانگر DNA چندشکل تکثیرشده تصادفی (RAPD)

Survey of Genetic Relationships in *Thymus* Accessions, Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker

سیدمحمود ضابطی[۱]، احمد اسماعیلی[۲*] و هادی احمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۸/۲۵

چکیده

آویشن (*Thymus* sp.)، که معمولاً به‌عنوان گیاه دارویی شناخته می‌شود، در نواحی مختلف ایران یافت می‌گردد. آنالیز روابط ژنتیکی در میان گونه‌ها جهت فهم فرایند تکامل در سطح جمعیت و در سطح ژنوم ضروری است. فن‌آوری‌های نشانگر مولکولی پیشرفت قابل‌توجهی داشته‌اند و تأثیر زیادی در یافتن اساس تنوع ژنتیکی دارند. در این مطالعه ۷۰ توده جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف ایران، به‌وسیله ۳۰ آغازگر RAPD آنالیز شدند. بعد از استخراج DNA و انجام PCR با استفاده از آغازگرهای مختلف در کل ۴۰۷ باند تکثیر شد که ۳۲۰ باند چندشکلی نشان داد. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی در توده‌های مورد بررسی ۰/۳۴ محاسبه شد که آغازگر D13 دارای بیش‌ترین میزان PIC و آغازگر B04 دارای کمترین میزان PIC بود. ماتریس تشابه حاصل از ضریب جاکارد و دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA ترسیم گردید. نتایج به‌دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه به مختصات اصلی با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. فواصل ژنتیکی که به‌وسیله نشانگر RAPD در این تحقیق برآورد گردید، می‌تواند اطلاعات باارزشی برای انجام مطالعات و کارهای اصلاحی روی این گیاه باارزش دارویی به‌دست دهد.

واژه‌های کلیدی: میزان اطلاعات چندشکلی، تجزیه کلاستر، ماتریس تشابه، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گرایش اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲ و ۳. استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

*: نویسنده مسوول Email: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

کشور ایران رویشگاه گونه‌های بی‌شماری از گیاهان خودرو است که با مناطق مختلف این کشور پهناور سازگار شده‌اند و جزء منابع باارزش ژنتیکی در تحقیقات بنیادی و کاربردی اصلاح نباتات به‌شمار می‌آیند و در برطرف‌کردن نیازهای انسان می‌توانند کمک شایانی نمایند. مؤسسات داروسازی نیازمند گیاهان خالص و استاندارد با مواد مؤثره یکنواخت و معینی می‌باشند که این ویژگی‌ها در گیاهان وحشی به جهت وجود تنوع ژنتیکی و متفاوت بودن شرایط محیطی، زمان برداشت و روش‌های خشکانیدن وجود ندارد؛ درصورتی‌که خصوصیات ذکر شده در گیاهان دارویی-زراعی به‌دلیل یکنواخت بودن شرایط فوق قابل‌حصول است. از این رو برای رسیدن به این هدف بایستی در زمینه‌های به‌نژادی و به‌زراعی، تحقیقاتی انجام شود (امیدبیگی، ۱۳۷۹). *پرویت و ویاس* (Pourohit and Vyas, 2004)، پیشنهاد دادند که در زمینه اصلاح گیاهان دارویی اولین حرکت بایستی از طریق انتخاب بهترین و مناسب‌ترین پایه‌ها از توده‌های محلی شروع شود، بنابراین ضروری است ابتدا به جمع‌آوری و ارزیابی مواد ژنتیکی پرداخته، سپس انواع روش‌های اصلاحی را بر آن اعمال کرد. نقوی و همکاران (۱۳۸۶)، بیان داشتند که درک و مدیریت تنوع طبیعی موجود در داخل ارقام اهلی و خویشاوندان وحشی گونه‌های گیاهی نقش مهمی در ایجاد برنامه‌های هدف‌دار برای بهبود محصولات زراعی دارند.

امروزه تقاضای اسانس آویشن به‌خاطر اهمیت دارویی آن رو به افزایش بوده و به‌همین دلیل سطح زیرکشت این گیاه رو به افزایش است. اطلاع از تعداد ارقام آویشن و محلی که سازگار شده‌اند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرف دیگر از دست‌رفتن گیاهان به‌علت تنش‌های زیستی و غیرزیستی و شهرنشینی ازجمله عواملی است که می‌تواند باعث فرسایش ژنتیکی در این گونه شود که خود باعث کاهش تنوع ژنتیکی است. از این‌رو بررسی دقیق مواد ژنتیکی آویشن از لحاظ تنوع ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار است.

جنس آویشن شامل بیش از ۳۰۰ گونه از گیاهان علفی یک‌ساله و درختچه‌های چندساله است. *ساوز* (Saez, 2001) گزارش کرد که خاستگاه این جنس عمدتاً در نواحی مدیترانه، شمال قسمتی از آفریقا و جنوب اروپا می‌باشد. *ازگاون و تنسی* (Ozguven and Tansi, 1998) بیان داشتند که گونه‌های آویشن معمولاً به‌عنوان ادویه، چای دارویی، حشره‌کش و مواد اسانس‌دار استفاد می‌شوند. *رچینگر* (Rechinger, 1982)، ۱۴ گونه آویشن در ایران را شناسایی نمود که بیشترین پراکندگی را در شمال و غرب ایران داشتند. اطلاعات کمی از میزان تنوع آویشن‌های موجود در ایران در دسترس است که احتمالاً به‌دلیل هیبریداسیون شدید بین گونه‌ای این گیاه و انجام نگرفتن تحقیقات جامع و فراگیر در سطح کشور بر روی این گیاه می‌باشد.

اسمولیک و همکاران (Smolik *et al.*, 2009)، تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی را در تعدادی از توده‌های آویشن با استفاده از نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار دادند و پیشنهاد نمودند که با ترکیب اطلاعات مربوط به تنوع مورفولوژیکی و تنوع ملکولی، بهتر می‌توان گیاهان موردنظر را برای برنامه‌های اصلاحی آینده انتخاب کرد. این موضوع به‌ویژه زمانی که انتخاب در گیاهان هدف برای صفت اسانس صورت می‌گیرد حائز اهمیت می‌باشد.

سونار و همکاران (Sunar *et al.*, 2009)، روابط خویشاوندی‌ها در میان ۱۵ گونه‌ی آویشن واقع در آنتالیای‌شرقی ترکیه را به‌وسیله آنالیز RAPD به‌همراه نشانگر بیوشیمیایی FAME (Fatty Acid Metil Esters) بررسی کردند. از ۲۰ آغازگر استفاده شده در این تحقیق، هفت آغازگر الگوهای چندشکلی واضحی نشان دادند و نتایج نشان داد که آنالیز RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و بیوشیمی در بین گونه‌های آویشن مفید است. این اطلاعات یک پایه علمی برای مطالعات آینده روی آویشن را فراهم نمود.

باقرزاده و همکاران (۱۳۸۸)، روابط خویشاوندی ۱۳ توده آویشن که از مناطق شرقی و شمال‌شرقی ایران جمع‌آوری شده بود، را مورد بررسی قرار دادند. تنوع نسبتاً بالایی در میان نمونه‌های این محققین به‌دست آمد و گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی با اطلاعات جغرافیایی این نمونه‌ها هم‌خوانی داشت. آنها نتیجه گرفتند که نشانگر RAPD ابزار قدرتمندی در بررسی ارتباطات ژنتیکی در گیاه آویشن می‌باشد.

در تحقیق‌های مختلف RAPD از آغازگرهای متعددی استفاده شده است. *ترینداد* و همکاران (Trindade *et al.*, 2008)، ۱۷ آغازگر با چندشکلی بالای ۸۰ درصد و *سونار* و همکاران (2009) هفت آغازگر با چندشکلی بالای ۸۷ درصد را معرفی کردند. در تحقیق *دارمار و دبریتو* (Dharmar and De Britto, 2011) آغازگر OPB8 چندشکلی بالای ۷۰٪ را نشان داد. *آگاروال* و همکاران (Agarwal *et al.*, 2013) در تحقیقی از ۱۰ آغازگر RAPD استفاده کردند که بهترین الگوی باندهی مربوط به آغازگر OPZ10 بود. همچنین در تحقیق *گومز* و همکاران (Gomez *et al.*, 2011) آغازگر OPI13 چندشکلی

بالای ۶۵٪ را نشان داد. در تحقیق *دابابنه* (Dababneh, 2007) سه آغازگر OPB1، OPB5 و OPB7 چندشکلی بالای ۵۰ درصد نشان دادند.

در این تحقیق ۷۰ نمونه آویشن که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱)، به‌منظور دست‌یابی به اطلاعات تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی آن‌ها جهت استفاده در برنامه‌ریزی‌های اصلاحی بعدی با استفاده از روش‌های مولکولی DNA مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱: توده‌های آویشن استفاده شده در این مطالعه

Table 1: Accessions of *Thymus* used in the study

گونه Species	محل جمع‌آوری Location of collection
T. daenensis	قزوین، مرکزی، اصفهان، لرستان Qazvin, Markazi, Isfahan, Lorestan
T. transcaspicus	یزد، خراسان Yazd, Khorasan
T. lancifolius	مرکزی،کردستان، فارس، لرستان، اصفهان Markazi, Kordestan, Fars, Lorestan, Isfahan
T. Pubescens	گیلان، زنجان، قزوین، آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌شرقی، کردستان Gilan, Zanjan, Ghazvin, West Azarbaijan, East Azarbaijan, Kordestan
T. transcaucasius	گیلان، زنجان Gilan, Zanjan
T. migricus	آذربایجان‌غربی West Azarbaijan
T. vulgaris	مرکزی Markazi
T. fedtschenkoi	زنجان، آذربایجان‌غربی، سمنان Zanjan, West Azarbaijan, Semnan
T. kotschyanus	تهران، قزوین، کردستان، آذربایجان‌غربی، زنجان، کرمان، سمنان Tehran, Ghazvin, Kordestan, West Azarbaijan, Zanjan, Kerman, Semnan

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق هفتاد توده مختلف آویشن که توسط بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. از هر توده در یک ردیف ۵۰ گیاه کشت شد و جهت نمونه‌برداری به‌طور تصادفی ۲۰ گیاه از هر ردیف و از هر گیاه بین ۱۵ تا ۲۰ برگ انتخاب شد. سپس این برگ‌ها به‌صورت بالک با ازت مایع پودر و تا زمان استخراج در یخچال ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA توسط روش *خانوجا* (Khanuja *et al*., 1999) با اندکی تغییرات که توسط مجیری و همکاران (۱۳۸۹) بهینه‌سازی گردید، انجام شد. برای این منظور ۰/۲ گرم از برگ پودر شده با ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris-Hcl 100Mm با pH=۸؛ EDTA ۲۵mM با pH=۸؛ NaCl ۱/۵M؛ ۰/۰۲٪ V/V از β-mercaptaethanol؛ ۱٪ W/V از PVP و ۲/۵٪ W/V از CTAB) مخلوط شد و به‌مدت یک‌ونیم ساعت در حمام آب گرم با دمای ۶۵°C نگهداری شدند. در ادامه به‌وسیله مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور در دقیقه، نمونه‌ها دو فاز تشکیل دادند، که فاز رویی جدا گردید و هم حجم آن مجدداً کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل اضافه و همانند شرایط قبلی سانتریفیوژ شد؛ محلول رویی جدا گردید و هم حجم آن NaCl ۵ مولار و ایزوپروپانول ۱۰۰٪ سرد اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس محلول به‌دست آمده از بخش قبلی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت دور ریخته و رسوب حاصل با الکل ۸۰٪ شستشو گردید. در ادامه با اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به رسوب حاصل DNA حل شد. غلظت DNA هر نمونه پس از سنجش کیفی و کمی با دستگاه بیوفتومتر (مدل

Biophotometr-eppendorf 6131) محاسبه شد و با آب مقطر استریل به‌میزان ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شد.

تکثیر RAPD

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق براساس مطالعات قبلی که توسط افراد مختلف بر روی گیاه آویشن انجام شده بود و چندشکلی بالایی نشان داده بودند انتخاب گردید *دبابنه* (2007)؛ *ترینداد* و همکاران (2007)؛ *سونار* و همکاران (2009)؛ *دارمار و دبریتو* (2011)؛ *آگاروال* و همکاران (2013) و *گومز* و همکاران (2011). در مجموع ۳۰ آغازگر در این پژوهش استفاده شد.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر براساس روش *ویلیامز* و همکاران (Williams *et al.*, 1990) با کمی تغییرات انجام گرفت. مخلوط PCR حاوی ۱۰ نانوگرم از DNA ژنومی، یک میکرولیتر آغازگر، کلریدمنیزیم ۰/۷۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۲۵ میکرولیتر DNA-Taq پلی‌مراز و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندورف (Master cycle gradient 5331) انجام گرفت. شرایط تکثیر PCR برای RAPD شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و بعد از آن ۴۰ سیکل شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه بود. در پایان چرخه‌ها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در انتها نمونه‌ها تا انجام الکتروفورز در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای مشاهده الگوی باندی از الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز با توان ۹۰ ولت به‌مدت یک ساعت و ۴۵ دقیقه استفاده شد. برای برآورد حدود اندازه قطعات تکثیر شده بر روی ژل، از نشانگر مخلوط یکسان ۱۰۰bp و ۱kb استفاده شد. مشاهده و عکس‌برداری ژل زیر نور UV به کمک دستگاه ژل داک مدل DOC-CF008-XD انجام شد.

آنالیز داده‌ها

برای تجزیه‌وتحلیل اطلاعات DNA، امتیازدهی باندها به‌صورت (۱) و (۰)، به‌ترتیب برای حضور و عدم‌حضور باند انجام شد. برای گروه‌بندی توده‌ها براساس داده‌های هر روش، از ضریب جاکارد و الگوریتم UPGMA استفاده شد. دندوگرام مربوطه توسط نرم‌افزار DARwin 32 ترسیم گردید. میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content) (PIC) براساس فرمول $PIC=\Sigma[2p_i\ (1-p_i)]$ و شاخص نشانگر (MI) (Marker Index) با استفاده از فرمول $MI = PIC.N.\beta$ که توسط *تیماپایاه* و همکاران (Thimmappaiah *et al.*, 2008) ارائه گردید، محاسبه شد. در این معادلات p_i فراوانی باند iام و N تعدادکل باندها برای هر آغازگر و β درصد چندشکلی (تعداد جایگاه‌های چندشکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر آغارگر می‌باشد. از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای رسیدن به اهداف تشریح و توجیه تنوع موجود در جامعه، تعیین سهم هر مؤلفه در تنوع و کاهش تعداد متغیرهای اصلی از طریق محاسبه مؤلفه‌های غیرهمبسته که ترکیبی از متغیرهای اصلی می‌باشد، استفاده گردید.

نتایج

از میان ۳۰ آغازگر، ۲۹ آغازگر چندشکلی قابل‌توجهی را نشان دادند. آغازگرها در کل ۴۰۷ باند تولید کردند که ۳۲۰ باند چندشکل نشان دادند (۷۸٪). تعداد باندهای چندشکل از ۴ تا ۲۱ باند برای هر آغازگر متغیر بود. به‌طور متوسط به ازای هر آغازگر ۱۴/۰۳ باند وجود داشت، که بیش‌ترین تعداد مربوط به آغازگر D05 با ۲۱ عدد باند و کمترین تعداد متعلق به D13 با ۸ عدد باند بود (جدول ۲). از میان آغازگرهای چندشکل، پنج آغازگر (B06، D05، OPA2، OPB5 و PZ10) دارای چندشکلی ۱۰۰٪ بودند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر محاسبه شد. آغازگر D13 دارای بیشترین میزان PIC و آغازگر B04 دارای کمترین میزان PIC بود. بنابراین آغازگر D13 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای به‌کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده (جدول ۲)، نشان داد که بیش‌ترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر B06 و کم‌ترین مقدار مربوط به آغازگر E16 بود و میانگین این شاخص ۳/۷۵ محاسبه شد. بالا بودن میزان شاخص نشانگر آغازگر B06 نشان می‌دهد که این آغازگر نسبت به بقیه آغازگرهای استفاده شده، پتانسیل تولید باند بیشتری داشت.

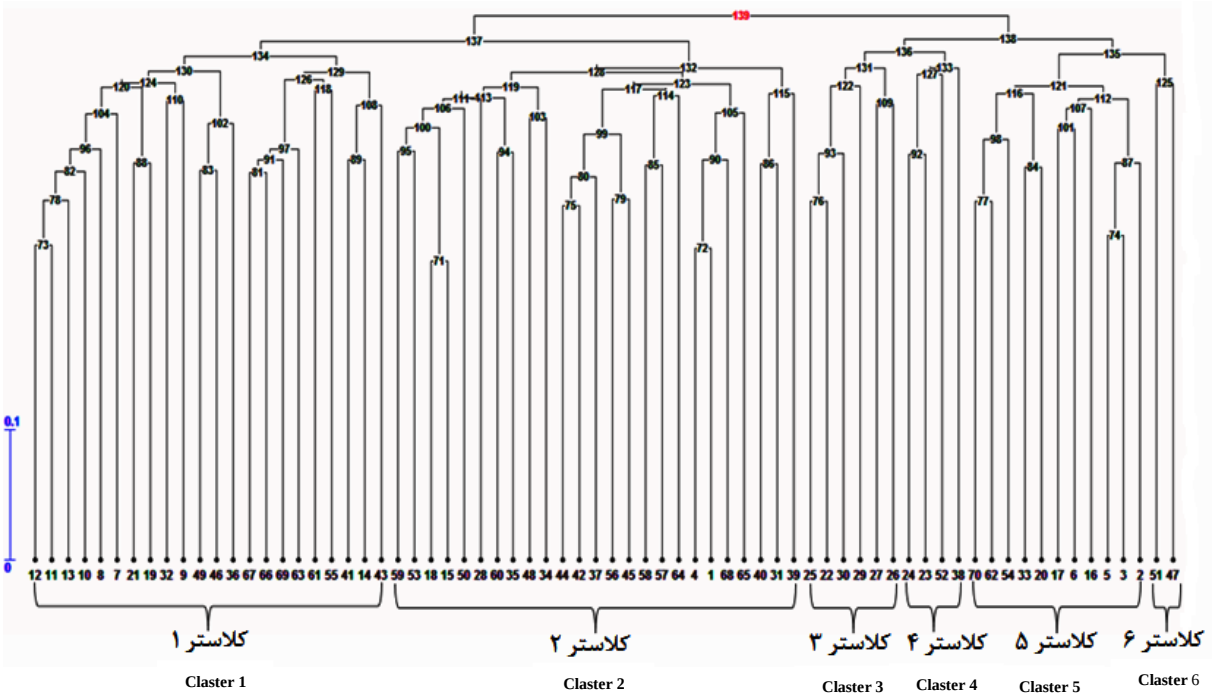
ماتریس تشابه حاصل از ضریب جاکارد و دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA به‌دست آمد. براساس ضرایب تشابه به‌دست آمده، ارزش تشابه ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۰/۴۵ تا ۰/۹۳ نشان داد و ۶ گروه اصلی به‌دست آمد (شکل ۱).

جدول ۲: اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله آنالیز RAPD برای ۷۰ توده آویشن به‌وسیله ۲۹ آغازگر RAPD

Table 2: Data obtained by RAPD analysis for 70 *Thymus* accessions using 29 RAPD primers

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	کل باندها Total bands	باندهای چندشکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Percent of polymorphism	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص نشانگر MI
1	B04	19	16	%84	0.20	3.2
2	B06*	20	17	%85	0.43	7.31
3	B06	17	17	%100	0.45	7.65
4	B11	14	10	%71	0.38	3.8
5	B15	19	16	%84	0.38	6.08
6	D03	17	9	%52	0.44	3.96
7	D05	21	21	%100	0.33	6.93
8	D10	9	6	%66	0.29	1.74
9	D13	8	4	%50	0.47	1.88
10	D15	14	12	%85	0.31	3.72
11	E02	12	10	%83	0.35	3.5
12	E16	10	6	%60	0.25	1.5
13	E18	13	8	%61	0.34	2.72
14	E19	15	12	%80	0.25	3.0
15	E20	12	7	%58	0.30	2.1
16	OPA2	12	12	%100	0.37	4.44
17	OPA8	11	10	%90	0.31	3.1
18	OPA13	11	8	%72	0.26	2.08
19	OPB1	15	10	%66	0.36	3.6
20	OPB5	17	17	%100	0.40	6.8
21	OPB7	10	9	%90	0.32	2.88
22	OPB10	14	7	%50	0.28	1.96
23	OPH16	18	16	%88	0.35	5.6
24	OPH17	15	12	%80	0.43	5.16
25	OPH18	10	6	%60	0.35	2.1
26	OPI13	11	9	%81	0.40	3.6
27	OPY7	12	6	%50	0.40	2.4
28	OPY18	12	8	%66	0.23	1.84
29	OPZ10	19	19	%100	0.30	5.7
میانگین Mean		14.03	11.03	%78	0.34	3.75

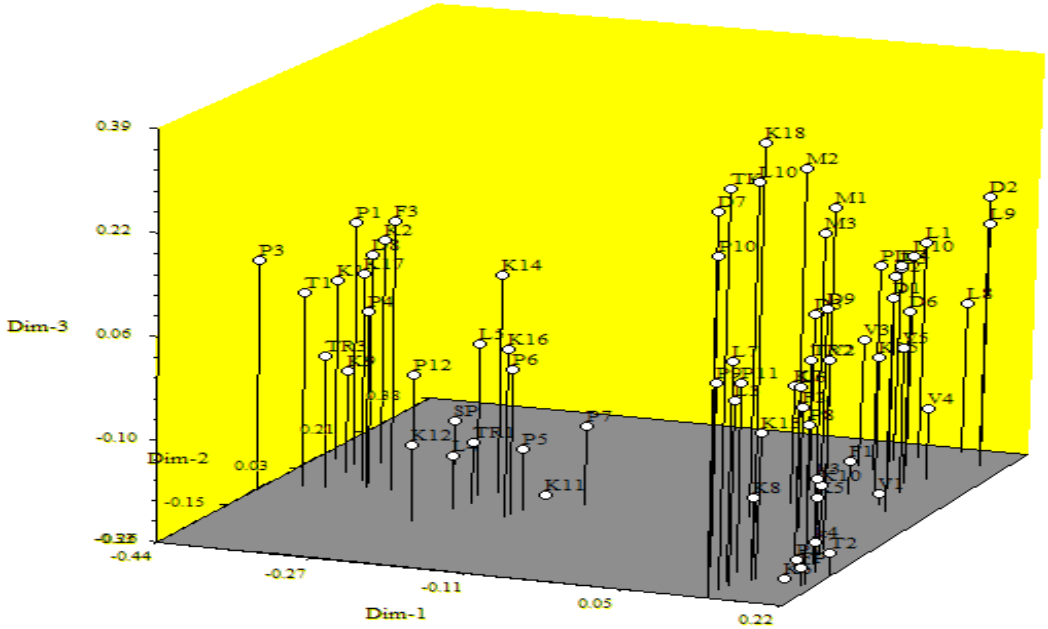
همان‌طور که در دندوگرام دیده می‌شود، در گروه یک هشت توده از گونه‌های مختلف استان زنجان، شش توده از گونه‌های متفاوت استان آذربایجـــان‌غربی، دو تـــوده از گونه *T. kotschyanus* و دو توده از گونه *T. lancifolius* مربوط به استان کردستان، دو توده از گونه *T. Pubescens* و یک توده از گونه *T. Daenensis* مربوط به استان لرستان وجود دارد. در گروه دوم تمام نمونه‌های گونه *T. vulgaris* قرار دارند، همچنین اکثر توده‌های گونه *T. Daenensis* در این توده قرار دارند، شش توده از گونه *T. lancifolius* مربوط به استان‌های مرکزی، لرستان و اصفهان هم در این گروه هستند. در این گروه دو توده از گونه *T. kotschyanus* و یک توده از گونه *T. fedtschenkoi* مربوط به استان آذربایجان‌غربی وجود دارد. همچنین در این گروه یک توده هیبرید از استان مرکزی و یک توده از گونه *T. transcaspicus* از استان خراسان هم وجود دارد. گروه سوم شامل شش توده از گونه‌های مختلف است که دو نمونه مربوط به استان قزوین، یک توده مربوط به استان زنجان و سه توده دیگر با منشأ نامشخص است. در گروه چهارم، چهار توده وجود دارد که شامل دو توده از گونه *T. lancifolius* است، یک توده از استان فارس می‌باشد و یک تـــوده هم محل جمع‌آوری‌اش نامشـــخص است. در این گـــروه یک توده از *T. kotschyanus* از استان کرمان و یک توده *T. Pubescens* با مکان نامعلوم وجود دارد. گروه پنجم شامل ۱۱ توده شامل دو توده از سمنان، پنج توده از قزوین، دو توده از گیلان و یک توده از کردستان است. گروه شش دارای دو توده از استان تهران می‌باشد.



شکل۱: دندروگرام برحسب روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

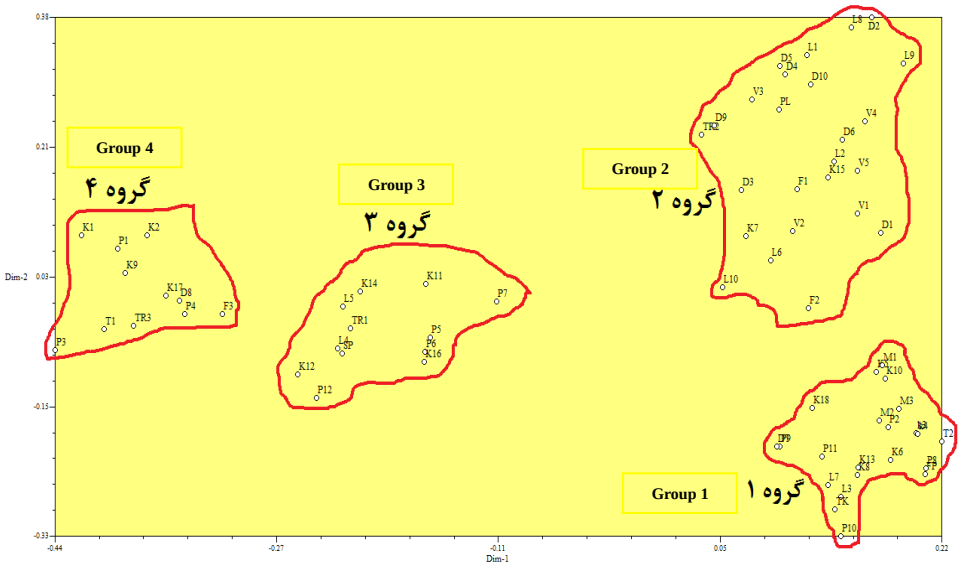
Fig. 1: Dendrogram based on Jackard similarity coefficient and UPGMA method

همان‌طور که محمدی و *پراسانا* (Mohammadi and Prasanna, 2003) بیان کردند نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی نشان داده است که در حالت ادغام منابع ژرم‌پلاسمی الگوی تنوع ژنتیکی حالت طبقه‌ای نداشته و استفاده از الگوریتم‌های تجزیه خوشه‌ای دارای محدودیت در گروه‌بندی این مواد ژنتیکی می‌باشند. بنابراین در چنین مواردی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و سایر تکنیک‌های مرتبط می‌تواند روشی کمکی در تشخیص بهتر گروه‌بندی‌ها باشد. در تحقیق حاضر جهت بررسی توزیع فضایی توده‌ها براساس فاصله آن‌ها از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. نمودار سه‌بعدی و دو بعدی موردنظر در شکل‌های (۲) و (۳) نشان داده شده است.



شکل۲: نمودار سه‌بعدی مربوط به تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس ماتریس تشابه جاکارد

Fig. 2: Plot three dimension for principal component analysis based on Jackard similarity matrix



شکل ۳: نمودار دوبعدی مربوط به تجزیه مؤلفه‌های اصلی براساس ماتریس جاکارد

Fig. 3: Plot two dimension for principal component analysis based on Jackard similarity matrix

با استفاده از این فضای مختصاتی می‌توان موقعیت توده‌ها را نسبت به یکدیگر شناسایی کرد. از آنجایی‌که پنج مؤلفه اول بالاترین ریشه‌های مشخصه را دارا می‌باشند، می‌توان گروه‌بندی ارقام را براساس این چهار مؤلفه انجام داد. بر این مبنا ۷۰ توده مورد مطالعه در چهار گروه متمایز قرار گرفتند. گروه یک، شامل ۲۲ توده می‌باشد؛ این توده‌ها، همان توده‌های کلاستر اول تجزیه خوشه‌ای هستند. گروه دوم، شامل ۲۵ توده است، این توده‌ها هم مشابه توده‌های کلاستر دوم تجزیه کلاستر هستند. گروه سوم شامل تمام نمونه‌های دو کلاستر سوم و چهارم تجزیه کلاستر هستند. گروه چهارم هم تمام نمونه‌های کلاستر پنجم و ششم تجزیه کلاستر را در برمی‌گیرند.

با مقایسه فواصل فضایی و فواصل ژنتیکی، مشاهده شد که هر دو روش، توده‌ها را به‌طور مشابهی از هم تفکیک کرده‌اند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار توسط چهار مؤلفه اول برای هر آغازگر در جدول ۳ آورده شده است. ۱۵ مؤلفه اول ۳۹٪ از کل تغییرات را توجیه نمودند، که سهم مؤلفه اول ۵/۷٪ و سهم سه مؤلفه بعدی به‌ترتیب ۴/۲٪، ۳/۱٪ و ۲/۷٪ بود.

با توجه به مقادیر این جدول و اینکه ۱۵ مؤلفه تنها ۳۹٪ از تنوع را توجیه کرده‌اند، مشخص می‌شود که تنوع در سطح وسیعی از ژنوم نمونه‌ها وجود دارد و تنها به یک بخش ژنوم اختصاص ندارد. این موضوع می‌تواند مزیتی برای نشانگر RAPD باشد، زیرا این نشانگر در سرتاسر ژنوم پخش شده است.

جدول ۳: تجزیه مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس موردانتظار

Table 3: Principal Component Analysis including Eigenvalues and Proportions of expected variance

مؤلفه‌های اصلی Main components	مقادیر ویژه Eigen values	واریانس مورد انتظار Expected variance
مؤلفه اول First component	3.05	6.0
مؤلفه دوم Second component	2.35	5.47
مؤلفه سوم Third component	1.72	4.76
مؤلفه چهارم Fourt component	1.49	4.28
جمع کل Total		21.41

بحث

یک علت بالابودن تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در این گیاه می‌تواند این باشد که تمام نمونه‌ها از جمعیت‌های طبیعی بوده و نمونه‌های اصلاح شده و یکنواخت بین آن‌ها وجود نداشت. نتایج ما با یافته‌های حاصل از گیاهان دگرگشن دیگر که توسط *آپته* و همکاران (Apte *et al*., 2006)، *فیکیرو* و همکاران (Fikiru *et al*., 2007) و *نرزری* و همکاران (Narzary *et al*., 2010) گزارش شده بود، مطابقت داشت.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که اکثر گونه‌های مختلفی که در یک استان قرار گرفته‌اند با اینکه از لحاظ گونه با هم متفاوت هستند ولی در یک کلاستر قرار گرفته‌اند. در گروه اول از تجزیه کلاستر تمام نمونه‌های استان زنجان در یک کلاستر قرار گرفته‌اند، تنها یک توده از این استان در گروه سوم قرار گرفته است که این نمونه براساس طول و عرض جغرافیایی نزدیک به استان قزوین است و در گروه سوم هم کنار نمونه‌های استان قزوین قرار گرفته است؛ بنابراین می‌توان این‌گونه بیان کرد که نمونه‌های استان زنجان که از گونه‌های مختلف هم بودند دارای یک خزانه ژنی مشترک بوده‌اند. همچنین براساس اطلاعات طول و عرض جغرافیایی نمونه‌های استان زنجان، نزدیک بودن مناطق جمع‌آوری نمونه‌ها در این استان کوچک می‌تواند علتی برای به هم نزدیک‌شدن نمونه‌های این استان باشد. نمونه‌های گونه *T. vulgaris* همگی در یک گروه قرار گرفتند. مکان جمع‌آوری چند نمونه از این گونه نامشخص است و نمونه‌هایی که مکان‌شان مشخص است مربوط به استان مرکزی هستند. *روسلو* (Roselo, 1981) سطوح پلوییدی مختلف در جنس آویشن را گزارش کرد که می‌تواند دلیلی بر توانایی ضعیف گونه *T. vulgaris* در تبادل مواد ژنتیکی با گونه‌های دیگر باشد و بنابراین به‌نوعی گونه‌ای بسته به‌شمار می‌رود، البته این یک احتمال است و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. همچنین اکثر نمونه‌های گونه *T. Daenensis* در گروه دوم قرار گرفته است که این نمونه‌ها از سه استان مرکزی، اصفهان و لرستان می‌باشند و تقریباً از یک ناحیه جغرافیایی با ویژگی‌های اقلیمی نسبتاً مشابه هستند. تطابق‌پذیری این گونه در این نواحی باعث ایجاد یک مخزن ژنتیکی گسترده از نمونه‌های آویشن دنایی در نواحی مرکزی زاگرس شده است. این نتایج با یافته‌های *پیربلوتی* و همکاران (Pirbalouti *et al*., 2011) تطابق داشت به‌طوری‌که این محققین نیز بیشترین تنوع گونه دنایی را در مرکز و غرب ایران بیان کردند. پخش شدن نمونه‌های گونه‌های *T. kotschyanus*، *T. Pubescens* و *T. lancifolius* در کلاسترهای مختلف مبین این نکته است که این گونه‌ها قابلیت بالایی در پذیرش مواد ژنتیکی از گونه‌های مختلف را دارا هستند؛ به این معنی که قابلیت هیبریداسیون بین گونه‌ای در این سه گونه بسیار بالا است. در همین رابطه کلوندی و همکاران (۱۳۹۱) بیان داشتند که تنوع زیاد موجود در میان جمعیت‌های آویشن به علت توان جریان ژنی در میان گونه‌ها و وجود پدیده ماده-دوجنسی (gynodioecious) یا پلی‌مورفیسم جنسی بوده است که بنابر نظر *تامپسون* (Thompson, 2002) این موضوع خود ناشی از تلاقی تعداد زیادی از گونه‌های راسته *Lepidoptera* با گونه‌های آویشن است. نکته دیگری که در مورد گروه اول وجود دارد این است که تمام نمونه‌های این گروه از نواحی سردسیری جمع‌آوری شده‌اند و تنها نمونه استان لرستان هم که در این گروه قرار دارد مربوط به شهرستان الشتر است که یک منطقه سردسیری می‌باشد. فاصله جغرافیایی بین استان تهران تا مرکز تنوع آویشن در ایران (شمال‌غربی و غرب) باعث شده که دو گونه *T. kotschyanus* و *T. Pubescens* از این استان به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار بگیرند و تلاقی‌پذیر بالای این دوگونه که در کلاسترهای قبلی مشاهده شد، می‌تواند دلیلی بر تلاقی این گونه‌ها با گونه‌های دیگری از استان تهران باشد که این دو نمونه را از سایر نمونه‌های هم‌گونه خود در این تحقیق جدا کرده است.

با توجه به تطابق نسبتاً بالای اطلاعات جغرافیایی با گروه‌های مشخص شده توسط این نشانگر، نشانگر RAPD می‌تواند جهت انجام تحقیقات کاربردی به‌منظور اصلاح این گیاه مفید واقع گردد. از طرفی به‌علت موجود نبودن اطلاعات جامع، نمی‌توان به‌طور کاملاً دقیق در مورد والدین پیشنهادی جهت تلاقی و به‌دست آوردن هیبرید قوی اظهارنظر کرد؛ اما تا حدودی می‌توان این والدین را از روی دندوگرام حاصل (نمونه‌هایی با فاصله ژنتیکی بیشتر)، حدس زد. در مجموع جهت کاربردی‌تر کردن نتایج این تحقیق در برنامه‌های اصلاحی این گیاه و انتخاب گیاهان و توده‌های مطلوب ضروری است تا اطلاعات مورفولوژیک و اسانس گیاه نیز مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گیرد. این انتخاب زمانی مناسب است که شیوه‌ای مطلوب جهت تشخیص پیوستگی نشانگرهای به‌دست آمده از این تحقیق با صفات مطلوب و موردنظر (مثل تولید اسانس) به‌دست آید. بنا به پیشنهاد *آرندو-آندرس* (Arnedo-Andres *et al*., 2002) این عمل را می‌توان با تبدیل نشانگرهای ویژه RAPD و تبدیل آنها به نشانگر ناحیه تکثیر شونده با ردیف مشخص (SCAR) جهت ردیابی نشانگرهای پیوسته با QTLهای موردنظر انجام داد. از

این طریق می‌توان مکان‌های ژنی دارای اثر کیفی و یا کمی را تعیین کرد. این اطلاعات رابطه‌ی مستقیمی با انتخاب دارند به‌طوری که صفایی و همکاران (۱۳۸۹)، کمک به انتقال آلل‌های مفید به ژنوم گیرنده را ساده‌ترین استفاده‌ای دانسته‌اند که می‌تواند با استفاده از نشانگرهای ژنی صورت گیرد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۸-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.