

## استفاده از نشانگرهای اینترون-اگزون برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در دو زیرگونه آویشن دناپی (*Thymus daenensis*)

احمد اسماعیلی<sup>۱\*</sup>، فرزانه مجیری<sup>۱</sup> و سیده زهرا حسینی<sup>۲</sup>  
<sup>۱</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران  
<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

### چکیده

مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان دارویی از اهداف مهم اصلاحی و تکاملی است. در بررسی حاضر، تنوع ژنتیکی دو زیرگونه آویشن دناپی با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی اینترون-اگزون مطالعه شد. از ۳۰ آغازگر استفاده شده، ۹۸ درصد چندشکلی از ۶۳۳ نوار تکثیر شده، ایجاد شد. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی را آغازگرهای ISJ<sub>5</sub> و ISJ<sub>6</sub> و کمترین مقدار را IT<sub>15-32</sub> به خود اختصاص داد. بیشترین شاخص نشانگر را آغازگر IT<sub>10-6</sub> ایجاد کرد. تجزیه واریانس مولکولی بیانگر تنوع در خور توجه درون دو زیرگونه آویشن دناپی نسبت به تنوع بین آنها بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و ضریب تشابه دایس با نرم‌افزار NTSYS توده‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. بیشترین دامنه تشابه ژنتیکی بین دو توده از زیرگونه آویشن دناپی مشاهده شد. دو توده مربوط به استان‌های فارس و سمنان نیز هر کدام یک گروه جداگانه را تشکیل دادند. نتایج گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی با گروه‌بندی تجزیه مختصات اصلی مطابقت داشت. همچنین، گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای توانست تا حدودی دو زیرگونه آویشن دناپی را از یکدیگر تفکیک نماید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نشانگرهای اینترون-اگزون ابزار مؤثری در بررسی روابط خویشاوندی دو زیرگونه آویشن دناپی بوده است.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن دناپی (*Thymus daenensis*)، تنوع ژنتیکی، چندشکلی

### مقدمه

هستند که اغلب در غدد اپیدرمی اندام‌های هوایی ذخیره می‌شوند. آویشن (*Thymus spp.*) یکی از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده در جهان است. اصلاح آویشن به دلیل تنوع ژنتیکی وسیع، دارا بودن گونه‌های فراوان و نبود موانع ژنتیکی در هیبریداسیون موفق بین

خانواده Lamiaceae (نعناعیان) یکی از مهم‌ترین تیره‌های گیاهی با پراکنش جهانی و نیازهای بوم‌شناختی بسیار متفاوت از اهمیت خاصی برخوردار است. اغلب نعناعیان تولیدکننده‌ترین‌ها و ترکیبات مفید دیگر

نشانگر کاملاً تصادفی (Random Amplified RAPD Polymorphic DNA) یکی از نشانگرهای مبتنی بر PCR است که در بررسی تنوع ژنتیکی بیشتر گونه‌های گیاهی استفاده شده است. اما تحلیل ژنتیکی گیاهان با ژنوم بزرگ و پیچیده با این نشانگر چندان مناسب نیست. به همین دلیل، نوعی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR توسط Weining و Langridge (۱۹۹۱) طراحی شد که به این نوع نشانگرها، نشانگرهای نیمه تصادفی (Intron-exon Splice Junction) ISJ می‌گویند. اطلاعات بیشتر از این نشانگرها توسط Rafalski و همکاران (۱۹۹۷) تکمیل شد. آغازگرهای ISJ دارای توالی‌های ۹ تا ۱۸ نوکلئوتیدی هستند که بر اساس نواحی برش اتصال اگزون-اینترون به دو گروه از آغازگرهای مکان هدف اگزون (ET: exon targeting) و مکان هدف اینترون (IT: intron targeting) تقسیم‌بندی می‌شوند. در آغازگرهای ET انتهای ۵' آغازگر اختصاصی است که با نواحی حفاظت‌شده‌ای از IT اتصال می‌یابد و نواحی اگزونی را تکثیر می‌کنند اما در آغازگرهای IT انتهای ۳' اختصاصی است و به نواحی حفاظت‌شده مرز بین اگزون-اینترون اتصال می‌یابد و اینترون‌ها را تکثیر می‌کنند (Rafalski et al., 1997؛ Gawel et al., 2002). بنابراین، آغازگرهای گروه IT در تکثیر قطعات از دقت و کارایی بیشتری برخوردارند. در آغازگرهای ISJ بخش نخست بیانگر توالی‌های حفاظت‌شده اگزون-اینترون است، اما Przetakiewicz و همکاران (۲۰۰۲) و Nowosielski و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که بخش دوم این آغازگرها به صورت تصادفی طراحی می‌شوند، بدین صورت که آغازگرهای ۹ نوکلئوتیدی دارای یک باز، آغازگرهای ۱۰

آنها، می‌تواند توسط روش‌های اصلاحی متداول مانند انتخاب به سادگی صورت پذیرد. یکی از گونه‌های انحصاری آویشن در ایران آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak. است. این گونه به صورت بوم‌زاد (endemic) در مناطق گسترده‌ای از ایران به ویژه در مناطق غربی و مرکزی رویش دارد. این گیاه دارای برگ‌های نیزه‌ای، تیپ رویشی ایستاده و ساقه چوبی است. دو ترکیب تیمول و کارواکرول از مهم‌ترین ترکیبات موجود در آویشن دنایی است (Alvandi, 1996). در مطالعه‌ای دیگر، میزان تیمول و کارواکرول در ترکیبات آویشن دنایی را به ترتیب ۷۳/۹ و ۶/۷ درصد به دست آمد (Sajjadi and Khatamsaz, 2003). این گیاه به صورت سنتی به عنوان ضد نفخ، هضم کننده غذا، ضد اسپاسم، ضد سرفه و خلط‌آور در درمان سرماخوردگی در ایران مصرف می‌شود (Zargari, 1990).

در علم اصلاح نباتات، آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد، در انتخاب والدین مناسب برای تولید هیبریدهای برتر بسیار با اهمیت است، ضمن اینکه تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب می‌شود (Kumar, 1999؛ Pullman and Sliper, 2001؛ Sharma et al., 2002). بررسی تنوع ژنتیکی با روش‌های متفاوتی امکان‌پذیر است که از میان این روش‌ها، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR, Polymerase Chain Reaction) روشی قدرتمند و مؤثر برای شناسایی چندشکلی DNA و بررسی تنوع ژنتیکی است. این نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و تعدادی از آنها را به راحتی می‌توان در کل ژنوم جستجو کرد (Chawla, 2003).

(Arithmetic Mean Analysis) و ضریب تشابه جاکارد، توده‌ها را در دو گروه قرار داد. گروه اول توده‌های جمع‌آوری شده از زاگرس مرکزی و گروه دوم توده‌های مربوط به دو دامنه شمال غربی و جنوب غربی زاگرس بود که به ترتیب Tc و Te نامیده شدند. نتایج نشان داد که تنوع و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در گروه Tc بیشتر بود، بنابراین، مرکز پیدایش (center of origin) و مرکز تنوع (center of diversity) این گونه در زاگرس مرکزی معرفی شد. در مطالعه‌ای دیگر، Rustaii و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی خصوصیات کمی ژرم پلاسما ۱۰ توده آویشن دنايي از غرب کشور در مرحله گل‌دهی کامل پرداختند. جمعیت‌های مطالعه شده پس از ترسیم دندروگرام به روش تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار آماری SPSS در چهار گروه قرار گرفتند که دو جمعیت اراک و ملایر در یک گروه، جمعیت‌های همدان ۱ و لرستان در گروه دیگر و جمعیت‌های دنا و همدان ۲ به طور مجزا، هر یک در گروه‌های دیگری قرار گرفتند. اما دو جمعیت اراک و ملایر به دلیل شرایط مطلوب‌تر دارای خصوصیات رشدی بارزتری نسبت به سایرین بوده، از این جهت برای کارهای اصلاحی ترجیح داده می‌شوند. در پژوهشی دیگر، Ziaei Nasab و همکاران (۲۰۱۲) تنوع کاریوتیپی ۱۶ جمعیت از *T. daenensis* و *T. kotschyanus* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که جمعیت‌های *T. kotschyanus* دارای سطوح پلوئیدی متفاوت دیپلوئید و تتراپلوئید و کاریوتیپ‌های متقارن اما جمعیت‌های آویشن دنايي فقط سطح پلوئیدی دیپلوئید و کاریوتیپ‌های نامتقارن داشتند. در مطالعه‌ای دیگر Mahdavi و Karimzadeh (۲۰۱۰) به بررسی تنوع کاریوتیپی و محتوای DNA هسته‌ای شش توده بوم‌زاد آویشن در ایران شامل: *T. daenensis*

نوکلئوتیدی دارای سه باز، آغازگرهای ۱۲ نوکلئوتیدی دارای پنج باز، آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی دارای هفت باز، آغازگرهای ۱۶ نوکلئوتیدی دارای ۹ باز و در آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی نیز ۹ باز از توالی آغازگرهای آنها به صورت تصادفی است. به همین دلیل به آنها آغازگرهای نیمه‌تصادفی می‌گویند. آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی ISJ از نظر دمای اتصال مشابه آغازگرهای RAPD بوده، می‌تواند در ترکیب با آنها استفاده شود.

بر اساس بررسی‌های پیشین، آغازگرهای ISJ روی گیاهانی مانند برنج توسط Hashemi-Petroudi و همکاران (۲۰۱۰)، گندم دوروم توسط Frahani و Arzani (۲۰۰۴)، شبدر ایرانی توسط Samiei و همکاران (۲۰۰۸) شده است. اما تاکنون مطالعه‌ای در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های آویشن با نشانگر ISJ در خارج و داخل کشور صورت نگرفته است. تنوع ژنتیکی آویشن گونه دنايي با نشانگرهای RAPD و ISSR شده است (Rahimmalek et al., 2009؛ Rustaii et al., 2009). همچنین، تنوع بوم‌شناختی، ریختاری، فیتوشیمیایی و شیمیوتایپی این گونه به صورت جداگانه و یا همراه با چند گونه دیگر آویشن بررسی شده است که در زیر به چند نمونه از آنها اشاره شده است:

در پژوهشی، Rahimmalek و همکاران (۲۰۰۹) تنوع ژنتیکی و اختلافات جغرافیایی ۱۷ توده آویشن دنايي را که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بود با نشانگر ISSR بررسی کردند. ۱۵ آغازگر انتخاب شده از کل ۲۵۶ نواری، ۲۲۸ نواری چندشکل (۸۸/۹ درصد) تولید کرد. دندروگرام حاصل از روش (Unweighted Pair Group Method with UPGMA

تفکیک زیرگونه‌ای مشخص گردد.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۲۰ توده آویشن دنیایی بود که از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور در کرج تهیه شد. این توده‌ها از دو زیرگونه *T. daenensis* subs *daenensis* و *T. lancifolius* subs *daenensis* بودند که از استان‌های اصفهان، سمنان، فارس، قزوین، کردستان، لرستان و مرکزی جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱).

*T. migricus* و *T. eriocalyx* دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و تتراپلوئید و سه تعداد کروموزوم (۳۰، ۵۶ و ۶۰) را شناسایی کردند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد تنوع ژنتیکی با روش‌های مولکولی DNA در دو زیرگونه آویشن دنیایی انجام نشده است، در این تحقیق به بررسی تنوع ژنتیکی دو زیرگونه آویشن دنیایی با نشانگرهای ایترون-اگزون برای نخستین بار پرداخته شده است تا هم وضعیت این دو زیرگونه نسبت به همدیگر مشخص شود و هم اینکه کارآیی این نشانگر در

جدول ۱- نام توده‌ها همراه با زیرگونه، منشأ جغرافیایی و کد هرباریومی آنها. خط تیره به معنای نامشخص بودن منشأ و کد هرباریومی است.

شماره توده‌ها	نوع زیرگونه	منشأ جغرافیایی	کد هرباریومی	شماره توده‌ها	نوع زیرگونه	منشأ جغرافیایی	کد هرباریومی
۱	<i>subs lancifolius</i>	مرکزی	۱۳۴۹۰	۱۱	<i>subs lancifolius</i>	اصفهان	۱۰۱۲۶
۲	<i>subs lancifolius</i>	مرکزی	۱۳۴۹۸	۱۲	<i>subs lancifolius</i>	لرستان	۷۵۰۷
۳	<i>subs lancifolius</i>	کردستان	۱۷۰۰۹	۱۳	<i>subs daenensis</i>	اصفهان	۱۸۲۰۹
۴	<i>subs lancifolius</i>	-	-	۱۴	<i>subs daenensis</i>	مرکزی	۱۵۶۵۶
۵	<i>subs daenensis</i>	قزوین	۲۰۰۸۸	۱۵	<i>subs daenensis</i>	لرستان	۱۴۲۴۵
۶	<i>subs daenensis</i>	لرستان	۱۱۱۰	۱۶	<i>subs daenensis</i>	لرستان	۱۴۲۶۹
۷	<i>subs lancifolius</i>	فارس	۶۳۷۸	۱۷	<i>subs daenensis</i>	سمنان	۱۳۶۲۵
۸	<i>subs daenensis</i>	اصفهان	۱۰۱۲۲	۱۸	<i>subs daenensis</i>	اصفهان	۱۴۰۷۷
۹	<i>subs lancifolius</i>	لرستان	۹۱۸۲	۱۹	<i>subs lancifolius</i>	مرکزی	۱۳۵۰۰
۱۰	<i>subs lancifolius</i>	کردستان	۴۵۸۵	۲۰	<i>subs daenensis</i>	مرکزی	۱۳۶۱۱

برای بررسی بیشتر کیفیت DNA استخراج شده و بررسی عدم شکستگی (smear) مولکول، نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد با بافر TAE 1X و ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند. در نهایت، غلظت DNAهای مناسب برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رسید. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر برای تمامی نمونه‌ها بهینه شد. مواد واکنش PCR شامل: ۴/۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر، ۰/۷۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۰/۵

در ابتدا، برای استخراج DNA ژنومی، روش‌های مختلف استخراج DNA از برگ‌های جوان آویشن آزمایش شد و سرانجام Mojiri و همکاران (۲۰۱۰) روش استخراج Khanuja و همکاران (۱۹۹۹) با اندکی تغییر را مناسب‌ترین روش استخراج تشخیص دادند. برای تعیین کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده، از روش اسپکتروفتومتری (بیوفتومتر مدل اپندورف) استفاده شد. برای بررسی کیفیت با این روش نمونه‌هایی که جذب آنها بین ۱/۸-۲ بود انتخاب شدند. همچنین،

(جدول ۲). حروف پُر رنگ توالی آغازگرها بیانگر توالی‌های حفاظت شده اگزون-اینترون است اما بخش دوم این آغازگرها تصادفی طراحی می‌شوند. برای تحلیل نوارها، بر مبنای وجود و عدم وجود نوار به ترتیب کد یک و صفر به آنها اختصاص داده شد. برای ترسیم دندروگرام به روش تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYS-pc استفاده شد. تجزیه مختصات اصلی (PCA, Principal Coordinate Analysis) نیز برای برای توصیف بهتر روابط ژنتیکی بین و درون زیرگونه‌های آویشن دناپی با نرم‌افزار GenAlex استفاده شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA: Analysis of Molecular Variance) برتی تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین زیرگونه‌ها با نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۴ انجام شد. با این تحلیل، اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین می‌شود. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC: Polymorphic Index Content) و شاخص نشانگر (MI: Marker Index) با فرمول  $PIC = \sum [2p_i(1-p_i)]$  محاسبه شد که  $p_i$  فراوانی نوار نام است (Thimmappaiah *et al.*, 2008). شاخص نشانگر از حاصل ضرب محتوای اطلاعات چندشکلی برای هر آغازگر در تعداد کل نوارها برای هر آغازگر و درصد چندشکلی هر آغازگر به دست می‌آید. شاخص نشانگر علاوه بر مزایای PIC، تعداد کل نوارها و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته، پتانسیل هر آغازگر برای تولید نوار بیشتر را نشان می‌دهد (Anderson *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996).

### نتایج

در پژوهش حاضر، آغازگرهای به کار رفته درصد چندشکلی بالایی (۹۸ درصد) را نشان دادند.

میکرومولار، ۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۲/۷۵ میکرولیتر کیت PCR بود. برنامه دستگاه PCR به علت اختصاصی بودن قسمتی از توالی آغازگرهای ISJ (Weining and Henry, 1995; Rafalski *et al.*, 1997; Przetakiewicz *et al.*, 2002) در دو چرخه دمایی مطابق با روش Przetakiewicz و همکاران (۲۰۰۲) در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندورف انجام شد. ابتدا، به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد عمل تک رشته‌ای شدن اولیه (denaturation) انجام شد. سپس در هفت چرخه اولیه، دمای اتصال آغازگر دو درجه سانتیگراد و در ۳۳ چرخه بعدی شش درجه سانتیگراد بالاتر از دمای ذوب آغازگر در نظر گرفته شد. در تمامی چرخه‌ها، تک رشته‌ای شدن به مدت ۴۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه و مرحله سنتز به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت. برای اطمینان از سنتز کامل تمامی رشته‌ها پس از انجام ۴۰ چرخه، یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اضافه گردید که باعث تکثیر نهایی رشته‌های DNA گردید. سرانجام، نمونه‌های DNA از دستگاه خارج شد. برای بررسی محصولات تکثیر شده PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر TAE 1X و ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه الکتروفورز بارگذاری شدند. برای تعیین حدود اندازه نوارها روی ژل، از اندازه نشانگر ۱۰۰ جفت باز و یک کیلو باز در هر دو طرف ژل استفاده شد. برای مشاهده نوارها عکس‌برداری زیر نور UV به وسیله دستگاه ژلداک مدل UviTech صورت گرفت.

در این پژوهش، از ۳۰ آغازگر ISJ استفاده شد که آغازگرهای شماره‌های ۱ تا ۱۶ آغازگر IT و آغازگرهای شماره‌های ۱۷ تا ۳۰ آغازگرهای ET بودند

میزان اطلاعات چندشکلی را آغازگرهای ISJ<sub>5</sub> و ISJ<sub>9</sub> و کمترین مقدار را IT<sub>15-32</sub> تشکیل داد. شاخص نشانگر شاخصی است که پتانسیل آغازگر را جهت تولید بیشترین نوار نشان می‌دهد که آغازگرهای IT<sub>10-6</sub> و ET<sub>18-6</sub> به ترتیب بیشترین و کمترین شاخص نشانگر (MI) را به خود اختصاص دادند (جدول ۲).

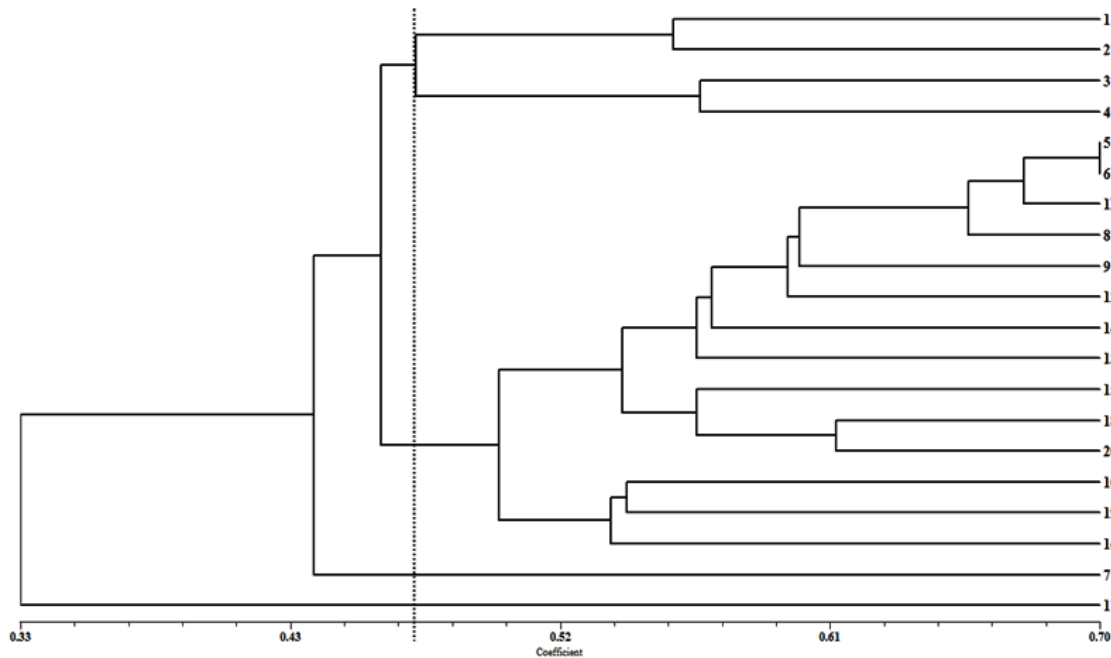
به بیان دیگر، از مجموع نوارهای تولید شده به وسیله ۳۰ آغازگر، ۶۱۹ نوار چندشکل و ۱۴ نوار تک شکل بودند. از بین آغازگرهای استفاده شده، آغازگر ET<sub>12-30</sub> و ET<sub>18-6</sub> به ترتیب بیشترین و کمترین درصد چندشکلی را تشکیل دادند. متوسط تعداد کل نوارها به ازای هر آغازگر ۲۱/۱ عدد و برای هر توده ۳۱/۶۵ عدد بود. همچنین، بیشترین

جدول ۲- مشخصات آغازگرها از نظر توالی، تعداد کل نوارها، نوارهای چندشکل، درصد چندشکلی و دیگر شاخص‌های تفکیک (حروف پُر رنگ توالی‌ها بیانگر توالی‌های حفاظت شده اگزون-اینترون است).

ردیف	نام آغازگرها	توالی آغازگرها (۵'-۳')	کل نوارها	نوارهای چندشکل	درصد چندشکلی	میزان اطلاعات چندشکلی	شاخص نشانگر
۱	ISJ <sub>1</sub> (IT)	CAGACCTGC	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۵	۷/۰
۲	IT <sub>10-1</sub>	ACGTCCAGAC	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۳۴	۷/۴۸
۳	IT <sub>10-2</sub>	ACGTCCAGGT	۲۲	۲۱	۹۵	۰/۳۲	۶/۷۲
۴	IT <sub>10-3</sub>	ACGTCCAGCA	۲۲	۲۱	۹۵	۰/۳۶	۷/۵۶
۵	IT <sub>10-4</sub>	ACGTCCACCA	۱۸	۱۷	۹۴	۰/۳۲	۵/۴۴
۶	IT <sub>10-5</sub>	ACGTCCAGAG	۱۸	۱۷	۹۴	۰/۳۲	۵/۴۴
۷	IT <sub>10-6</sub>	ACGTCCATCC	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۳۹	۹/۰
۸	IT <sub>15-31</sub>	GAAGCCGCAGGTAAG	۱۸	۱۷	۹۴	۰/۳۴	۵/۷۸
۹	IT <sub>15-32</sub>	GACTCGCCAGGTAAG	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۲۴	۵/۲۸
۱۰	IT <sub>15-34</sub>	GCGGCATCAGGTAAG	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۳۲	۷/۳۶
۱۱	IT <sub>15-35</sub>	CGAAGCCCAGGTAAG	۱۷	۱۷	۱۰۰	۰/۳۳	۵/۶۱
۱۲	IT <sub>15-36</sub>	ACCTACCTGGGGCTC	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰/۳۸	۸/۰
۱۳	ISJ <sub>5</sub> (IT)	CAGGGTCCCACCTGCA	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۴۰	۸/۸
۱۴	ISJ <sub>9</sub> (IT)	AGGTGACCGACCTGCA	۱۶	۱۵	۹۴	۰/۴۰	۶/۰
۱۵	IT <sub>18-1</sub>	CCGGCAGGTCAGGTAAGT	۲۴	۲۴	۱۰۰	۰/۳۲	۷/۶۸
۱۶	IT <sub>18-2</sub>	GCAGAGGGCCAGGTAAGT	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۲۸	۵/۶
۱۷	ISJ <sub>3</sub> (ET)	TGCAGGTCA	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰/۳۵	۷/۷
۱۸	ET <sub>12-25</sub>	AGCAGGTGACTG	۲۳	۲۲	۹۶	۰/۲۹	۶/۳۸
۱۹	ET <sub>12-26</sub>	AGCAGGTGGACT	۲۱	۱۹	۹۰	۰/۳۷	۷/۰۳
۲۰	ET <sub>12-27</sub>	AGCAGGTCCTAG	۲۵	۲۵	۱۰۰	۰/۳۴	۸/۵۰
۲۱	ET <sub>12-28</sub>	AGCAGGTCCAAG	۲۱	۱۹	۹۰	۰/۳۶	۶/۸۴
۲۲	ET <sub>12-29</sub>	AGCAGGTCTGTA	۲۱	۲۰	۹۵	۰/۳۵	۷/۰
۲۳	ET <sub>12-30</sub>	AGCAGGTGGTAC	۲۶	۲۶	۱۰۰	۰/۳۴	۸/۸۴
۲۴	ET <sub>15-31</sub>	ACTTACCTGGGCCAG	۱۷	۱۷	۱۰۰	۰/۳۵	۵/۹۵
۲۵	ET <sub>15-32</sub>	ACTTACCTGGGCCACG	۲۶	۲۵	۹۶	۰/۲۹	۷/۲۵
۲۶	ET <sub>15-33</sub>	ACTTACCTGGCCGTG	۲۴	۲۴	۱۰۰	۰/۳۶	۸/۶۴
۲۷	ET <sub>15-34</sub>	ACTTACCTGGCCGAG	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۳۲	۷/۳۶
۲۸	ET <sub>15-35</sub>	ACTTACCTGCCGAG	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۴	۶/۸
۲۹	ET <sub>15-36</sub>	ACTTACCTGGGGCTC	۲۱	۲۱	۱۰۰	۰/۳۲	۶/۷۲
۳۰	ET <sub>18-6</sub>	ACTTACCTGCCTACGCGG	۱۵	۱۴	۹۳	۰/۲۷	۳/۷۸
	میانگین		۲۱/۱	۲۰/۶۳	۹۸	۰/۳۴	۶/۹۱

UPGMA و ماتریس تشابه دایس با نرم‌افزار NTSYS-pc ترسیم شد (شکل ۱).

در این پژوهش، بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر ISJ دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای دو زیرگونه آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) بر اساس روش UPGMA به کمک آغازگرهای نیمه تصادفی ISJ با نرم‌افزار NTSYS-pc.

نتایج حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) است که در آن از شباهت بین افراد استفاده می‌کند. هدف از این تجزیه ساخت پلات‌های گرافیکی با ابعاد کمتر از داده‌ها است. بنابراین، هر ژنوتیپ توسط نقطه‌ای در فضای اقلیدسی نمایش داده می‌شود و ژنوتیپ‌هایی که شباهت بیشتری به یکدیگر دارند نزدیک یکدیگر قرار می‌گیرند (Farshadfar, 1997). نتایج نشان داد که دو مختصات اول ۶۰/۲۴ درصد از واریانس کل را بیان کردند که سهم هر کدام به ترتیب ۳۶/۵۱ و ۲۳/۷۳ درصد بود. آرایش تجمعی توده‌های آویشن دناپی در شکل ۲ نشان داده شده است. در این بررسی، نتایج گروه‌بندی تجزیه مختصات اصلی گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد و به خوبی توانست دو زیرگونه آویشن دناپی را از هم تفکیک نماید (شکل ۲).

نتایج حاصل از گروه‌بندی با روش UPGMA ضریب تشابه دایس، جمعیت‌های آویشن دناپی را به چهار گروه تقسیم کرد. گروه اول بیشترین توده از هر دو زیرگونه آویشن دناپی را به خود اختصاص داد. در گروه دوم چهار توده آویشن دناپی *T. daenensis* قرار داشت. گروه سوم آویشن دناپی *T. daenensis* subs *lancifolius* از استان فارس و گروه چهارم آویشن *T. daenensis* subs *daenensis* از استان سمنان را تشکیل داد. بیشترین شباهت (۷۰ درصد) بین دو توده *T. daenensis* subs *daenensis* (شماره‌های ۵ و ۶) از قزوین و لرستان دیده شد. نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با منشأ جغرافیایی تا حدود قابل توجهی مطابقت داشت.

تجزیه مختصات اصلی (Principal Coordinate



شکل ۲- نمودار دو بعدی تجزیه مختصات اصلی توده‌های آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) بر اساس نشانگرهای ISJ به کمک نرم‌افزار GenAlex. اعداد ۱ تا ۲۰ شماره توده‌های آویشن دناپی مطابق با جدول ۱ است.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی دو زیرگونه آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) با نرم‌افزار GenAlex\*: \* معنی دار در سطح ۵ درصد (P=0.036).

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	اجزای واریانس	درصد واریانس
بین زیرگونه‌ها	۱	۱۴۷/۲۰۰	۴/۰۱۰*	۴
درون زیرگونه‌ها	۱۸	۱۰۷/۱۰۰	۱۰۷/۱۰۰*	۹۶
کل	۱۹	-	۱۱۱/۱۱۰	۱۰۰

### نتیجه‌گیری و بحث

در پژوهش حاضر، برای نخستین بار تنوع ژنتیکی دو زیرگونه آویشن دناپی با نشانگرهای اینترون-اگزون بررسی شد. این نشانگرها به خوبی توانستند ۲۰ توده آویشن دناپی را به دو زیرگونه تقسیم کنند. نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس نشان داد که بیشترین شباهت ژنتیکی (۷۰ درصد تشابه) بین دو توده آویشن از استان‌های قزوین و لرستان

Schaut و همکاران (۱۹۹۷) از تجزیه مختصات اصلی با استفاده از داده‌های به دست آمده از نشانگر AFLP نشان دادند که این تجزیه، اطلاعات حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند و به خوبی می‌تواند ارقام دو ردیفه و شش ردیفه جو را از همدیگر به صورت گرافیکی متمایز نماید.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی بیانگر تنوع قابل توجه درون دو زیرگونه آویشن دناپی نسبت به بین زیرگونه‌ها بود. علت را شاید بتوان به عوامل مؤثر در تغییرات ژنتیکی نظیر جهش، مهاجرت ژن یا ژنوتیپ در اثر عوامل مختلف نسبت داد. نتایج اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین اجزای واریانس نشان داد (جدول ۳).

همچنین، با استفاده از نرم‌افزار GenAlex مشخص شد که بیشترین درصد چندشکلی را *T. daenensis* subs *lancifolius* با ۹۰/۶۳ درصد نسبت به *T. daenensis* subs *daenensis* با ۸۴/۶۵ درصد به خود اختصاص داد.



همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی ارقام لویبا با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی، متوسط تعداد نوار به ازای هر ژنوتیپ را ۱۱/۵ عدد گزارش کردند. Rafalski و همکاران (۲۰۰۲) متوسط تعداد نوار تولید شده به ازای هر یک از ژنوتیپ‌های چاودار را ۸/۹ عدد برآورد نمودند. در مطالعه‌ای دیگر، Gawel و همکاران (۲۰۰۲) نیز میانگین تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر یک از آغازگرهای نیمه تصادفی را ۱۴ عدد گزارش کردند. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز به شمار می‌رود. مقادیر بالای آنها دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک اهمیت بالایی دارند. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که از میان آغازگرهای به کار رفته، آغازگر IT10-6 بیشترین شاخص نشانگر و به بیان دیگر، توان پتانسیل بالا برای تولید حداکثر نوار را داراست. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی نیز ۰/۳۴ برآورد گردید که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی شایان توجهی در توده‌های آویشن دنايي است.

تجزیه مختصات اصلی ابزار دیگری برای نشان دادن نحوه پراکنش توده‌هاست که به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به کار می‌رود. نتایج حاصل از این آزمون به خوبی توانست دو زیرگونه آویشن دنايي را از هم تفکیک کند. Melchinger (۱۹۹۳) گزارش کرد که در تجزیه مختصات اصلی زمانی که سه مؤلفه اول بیش از ۲۵ درصد از کل تغییرات را تبیین نمایند توصیف صحیحی از روابط موجود بین ژنوتیپ‌ها را ارائه می‌دهد. به طور کلی، فاصله جغرافیایی و جریان

بوده است که علت را می‌توان در یکسان بودن نوع زیرگونه (*T. daenensis subs daenensis*) دانست. جدا بودن دو توده آویشن دنايي استان‌های فارس و سمنان هر کدام در یک گروه جداگانه و دور از سایر گروه‌ها را می‌توان به این علت دانست که مرکز پیدایش و تنوع آویشن دنايي بیشتر در مرکز و غرب ایران است که استان‌های فارس و سمنان را در بر نمی‌گیرد. متفاوت بودن شرایط اقلیمی این دو استان نسبت به سایر استان‌ها با شرایط سردسیری (اصفهان، قزوین، کردستان، لرستان و مرکزی) دلیل دیگری می‌تواند باشد. بنابراین، با اینکه همگی توده‌ها از یک گونه آویشن بوده‌اند اما متناسب با شرایط آب و هوایی از هم تفکیک شده‌اند. بیشترین تعداد توده‌های آویشن در یک گروه دندروگرام قرار گرفته‌اند که از هر دو زیرگونه آویشن دنايي هستند و شامل نمونه‌های استان‌های سردسیری هستند. به بیان دیگر، نشانگرهای اینترون-اگزون توانسته‌اند تا حدودی توده‌ها را از نظر منشأ جغرافیایی تفکیک کنند. این مسأله نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن دنايي تا حدودی تابع الگوی پراکنش جغرافیایی است. قرار گرفتن توده‌های آویشن استان مرکزی در دو گروه متفاوت دندروگرام بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در استان محل جمع‌آوری است که می‌توان این طور بیان کرد که در گروه‌بندی آنها اولویت بیشتر بر اساس نوع زیرگونه بوده است تا منشأ جغرافیایی.

در این مطالعه، آغازگرهای استفاده شده چندشکلی بالایی (۹۸ درصد چندشکلی) را در بین توده‌های آویشن دنايي از خود نشان دادند که این از مزایای آغازگرهای ISJ به کار رفته است. تعداد نوار چندشکل به ازای هر آغازگر ۲۰/۶۳ عدد بود. Nowosielski و

RAPD استفاده شد. نتایج حاصل از آن روابط خویشاوندی ارقام گندم با دو منشأ بومی سیستان و غیربومی را به خوبی آشکار کرد (Bandani et al., 2005).

از آنجا که اجرای هر برنامه اصلاحی وابسته به وجود تنوع ژنتیکی بوده است بنابراین، انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیگوسیتی امری ضروری است. وقتی والدین از نظر ژنتیکی فاصله بیشتری از هم داشته باشند، به تعداد کمتری تلاقی برای دستیابی به بهترین جمعیت نیاز است و هتروزیس قویتری در نتایج ظاهر می‌شود. بنابراین، با اجرای تلاقی برای تولید ارقام مناسب با داشتن خصوصیات مورد نظر، از ارقامی که دارای بیشترین فاصله ژنتیکی و صفات مورد نظر باشند می‌توان استفاده نمود. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که می‌توان از آغازگرهای اینترون-اگزون ISJ برای بررسی روابط خویشاوندی و انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی به منظور تولید هتروزیس استفاده نمود. هر چند به علت نیمه تصادفی بودن آغازگرهای ISJ نمی‌توان به طور دقیق از روی دندروگرام و فواصل حاصل از ماتریس تشابه در مورد والدین پیشنهادی برای تلاقی توده‌های آویشن نظر داد اما با توجه به تنوع ژنتیکی موجود و بیشترین فاصله ژنتیکی می‌توان با در نظر گرفتن صفات مطلوب به تلاقی دو توده (شماره‌های ۴ و ۷) که هر دو از زیرگونه *T. daenensis subs lancifolius* اشاره کرد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نشانگرهای اینترونی-اگزون ISJ روشی ارزشمند در ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن دنیایی است به گونه‌ای که آغازگرهای به کار رفته قادر به تفکیک دو زیرگونه آویشن دنیایی از

ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی توده‌هاست. آزمون دیگری به نام تجزیه واریانس مولکولی بر روی داده‌ها انجام شد که نتایج حاصل از آن بیانگر هتروزیگوتی بالایی بین افراد درون یک زیرگونه نسبت به تنوع بین دو زیرگونه بود. علت شباهت ژنتیکی زیاد بین دو زیرگونه آویشن به خاطر این است که هر دو به یک گونه آویشن متعلق هستند. در جمعیت‌های دگرگشن، هتروزیگوسیتی بالایی وجود دارد که این امر فرصتی برای سازگاری و تکامل در آن جمعیت ایجاد می‌کند، بنابراین، وجود تنوع درون چنین جمعیت‌هایی امری طبیعی است. چنین الگوی ساختار ژنتیکی در سایر گیاهان دگرگشن نیز تأیید شده است. Yavari و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های آویشن آذربایجانی با نشانگر RAPD بیان کردند که نتایج تجزیه واریانس مولکولی بیانگر تنوع بالای درون جمعیت‌ها است که علت را می‌توان به دگرگشنی و جریان ژنی بالا نسبت داد.

در پژوهش Dababneh (۲۰۰۷) بر روی تنوع ژنتیکی سه گونه آویشن با سه آغازگر RAPD انجام شد نشان داده شد که ارتباط خویشاوندی نزدیکتری بین دو گونه *T. boveii* Jo 856 و *T. vulgaris* Jo 276 نسبت به گونه *T. broussonetii* وجود دارد. داده‌های حاصل از نشانگر RAPD نشان داد که این سه گونه با هر سه آغازگر نوارهای مشابهی را ایجاد کردند که احتمالاً بیانگر وجود ژن یا ژن‌های مشابهی است. Ramezani و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ گلرنگ با نشانگر ISJ گزارش کردند که تطابق خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. در مطالعه‌ای دیگر، برای تعیین تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم بومی سیستان از نشانگرهای ISJ و-PCR

همچنین، بررسی تنوع ژنتیکی آنها با مطالعات ریخت‌شناسی در کنار نشانگرهای مولکولی می‌تواند اطلاعات جامع‌تری در این زمینه در اختیار پژوهشگران قرار دهد. از آنجا که داده‌های تولید شده در این بررسی بیشترین اهمیت را در نشان دادن میزان چندشکلی خود نشانگر دارد می‌توان از این نوع نشانگر در مطالعاتی که با حجم نمونه بیشتری سر و کار دارند استفاده کرد.

### سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌های آویشن سپاسگزاری می‌شود.

یکدیگر بوده است. بنابراین، از اطلاعات تنوع ژنتیکی حاصل از این نوع نشانگر می‌توان برای انجام تحقیقات کاربردی به منظور اصلاح گیاه آویشن دناپی استفاده نمود.

این مطالعه، شناختی کلی از تنوع ژنتیکی دو زیرگونه آویشن دناپی بود که تحقیقات وسیع‌تر ژنتیکی با به کارگیری سایر نشانگرهای مولکولی نظیر: AFLP (Amplified fragment length polymorphism)، SRAP (Simple Sequence Repeat) SSR (Sequence-Related Amplified Polymorphism) و نشانگرهای آیزوزایمی می‌تواند بسیار سودمند باشد.

### منابع

- Alvandi, M. R. (1996) Investigated morphological and phytochemical plant *Thymus daenensis* Celak. M.Phil. thesis, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (in Persian).
- Anderson, J. A., Church, J. E., Autrique, S. D., Thanksley, S. and Sorrells, M. E. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Genome* 36(1): 181-188.
- Bandani, A. R. Mohhamadi, A. Imamjomeh, A. A. Khalafbaghi, M. R. Ravan, S. and Akbari Moghadam, H. (2005) Estimation of genetic diversity in genotypes of wheat using RAPD-PCR (Random Primers) and ISJ (Semi-Random Primers) markers. 4<sup>th</sup> National Biotechnology Congress of Iran, Kerman, Iran (in Persian).
- Chawla, H. S. (2003) Principles of plant biotechnology. (Trans. Farsi, M. and Zolali, M.) Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad (in Persian).
- Dababneh, B. F. (2007) Antimicrobial activity and genetic diversity of *Thymus* species on pathogenic microorganisms. *Journal of food, Agriculture and Environment* 5 (3,4): 158-162.
- Farshadfar, A. A. (1997) Principles and methods of multivariate statistics. vol. 2., Razi University Press, Kermanshah (in Persian).
- Frahani, E. and Arzani, A. (2004) The use of semi-random marker for evaluation of genetic diversity among cultivars and F1 hybrids of durum wheat. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Iran and Russia Conference, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
- Gawel, M., Wisniewska, I. and Rafalski, A. (2002) Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 577-582.
- Hashemi-Petroudi, S. H., Mirmohammadi Maibody, S. A. M., Nematzadeh, Gh. A. and Arzani, A. (2010) Semi-random PCR markers for DNA fingerprinting of rice hybrids and their corresponding parents. *African Journal of Biotechnology* 9(7): 979-985.
- Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Darokar, M. P. and Kumar, S. (1999) Rapid isolation of DNA dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.

- Kumar, L. S. (1999) DNA marker in plant improvement. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.
- Mahdavi, S. and Karimzadeh, G. (2010) Karyological and nuclear DNA content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae). *Journal of Agricultural Science and Technology* 12: 447-458.
- Melchinger, A. E. (1993) Use of RFLP markers for analyses of genetic relationships among breeding materials and prediction of hybrid performance. In: *Proceeding of the 1st International Crop Science Congress*, Ames, CSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Mojiri, F., Zabeti, S. M., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Madah-Arefi, H. and Ahmadi, H. (2010) Optimization of genomic DNA extraction method in leaf of *Thymus* spp medicinal plant. 4<sup>th</sup> Regional Congress on Advances in Agricultural Research (west of Iran), University of Kordestan, Sanandaj, Iran (in Persian).
- Nowosielski, J., Podyma, W. and Nowosielska, D. (2002) Molecular research on the genetic diversity of polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 753-762.
- Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S. and Rafalaski, V. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Przetakiewicz, J., Nadolska-Orczyk, A. and Orczyk, W. (2002) The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 671-676.
- Pullman, G. M. and Sliper, D. A. (2001) Crop breeding (Trans. Arzani, A.) Isfahan University of Technology, Isfahan (in Persian).
- Rafalski, A., Gidzinska, M. and Wisniewska, I. (1997) PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds, genetics and biotechnology of maize and sorghum. Royal Society Chemistry Cambridge, Cambridge.
- Rafalski, A., Madej, L. Wisniewska, I. and Gawel, M. (2002) The genetic diversity of components of rye hybrids. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 471-475.
- Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrani, M. and Sayed Tabatabaei, B. E. (2009) Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biochemical Genetics* 47: 842-831.
- Ramezani, M., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F. and Bakhshkhaniki, Gh. (2009) Study of genetic diversity among safflower genotypes (*Carthamus tinctorius* L.) using ISJ molecular markers. MSc thesis, Payame Noor University, Tehran, Iran (in Persian).
- Rustaii, A., Fakhre Tabatabaii, S. M., Omidbigi, R., Sefidkon, F. and Hassani, M. A. (2009) valuation of morphological diversity of Danei thyme (*Thymus daenensis* Celak) populations from Iran. 6<sup>th</sup> Congress of Iranian Horticultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran (in Persian).
- Sajjadi, S. E. and Khatamsaz, M. (2003) Composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak. Subsp. *lancifolius* (Cleak.) Jalas. *Journal of Essential Oil Research* 15: 34-35.
- Samiei, K., Arzani, A. and Mirmohammadi Maibodi, S. A. M. (2008) Evaluation of genetic diversity of Iranian indigenous clover populations, using random and semi randoms primers. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 12(45): 157-164 (in Persian).
- Schaut, J. W., Qi, X. and Stam, P. (1997) Association between relationship measures AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetic* 95: 1161-1168.

- Sharma, K. K., Crouch, J. H. and Hash, C. T. (2002) Applications of biotechnology for crop improvement: Prospects and constraints. *Plant Science* 163: 381-395.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G. S. (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118: 1-7.
- Weining, S. and Henry, V. (1995) Molecular analysis of DNA polymorphism of barley (*Hordeum spontaneum* L.) germplasm using the polymerase chain reaction. *Genetics Research Crop Evolution* 42: 273-281.
- Weining, S. and Langridge, P. (1991) Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetic* 82: 209-216.
- Yavari, A. R., Nazeri, V., Sefidkon, F., Zamani, Z. and Hassani, M. H. (2012) Evaluation of genetic diversity among and within some endemic populations of *Thymus migricus* Klokov & Desj.-Shost, using RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(1): 35-47 (in Persian).
- Zargari, A. (1990) Medicinal plants. vol. 4. Tehran University Press, Tehran, Iran (in Persian).
- Ziaei Nasab, M., Hesamzadeh Hejazi, S. M., Bihamta, M. R., Mirza, M. and Naderi-Shahb, M. A. (2012) Assessment of karyotypical variation among 16 populations of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus kotschyanus* Boiss. species in Iran. *African Journal of Biotechnology* 11(5): 1028-1036.



## Use of intron-exonic marker in assessment of genetic diversity of two subspecies of *Thymus daenensis*

Ahmad Ismaili<sup>1\*</sup>, Farzaneh Mojiri<sup>1</sup> and Seyedeh Zahra Hosseini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, KhoramAbad, Iran

<sup>2</sup> Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

### Abstract

Study of genetic diversity in medicinal plant is very important for improvement and evolutionary variations. In this study, assessment of genetic diversity in two subspecies of *Thymus daenensis* was evaluated, using intron-exonic markers. Thirty primers produced 633 polymorphic bands (98% polymorphism). The highest polymorphic information content (PIC) included ISJ<sub>5</sub> and ISJ<sub>9</sub> primers and the lowest PIC also included IT<sub>15-32</sub> primer. The highest marker index (MI) produced by IT<sub>10-6</sub> primer. Results of Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that intra-sub specific variation was more than inter-sub specific variation. Dendrogram obtained from Cluster analysis, using NTSYS-pc software and UPGMA method based on Dice's similarity matrix, divided accessions into 4 groups. The maximum range of genetic similarity was observed between two accessions of sub-species *daenensis*. Two accessions of Fars and Semnan formed a separate group. Results showed that clustering based on molecular data and principal coordinate analysis had a medium alignment. Grouping based on cluster analysis also could separate two subspecies of *Thymus daenensis*. Results obtained from this study showed that intron-exonic markers had an effective potential in assessment of genetic relationships between the two sub-species of *daenensis*.

**Key words:** *Thymus daenensis*, Genetic Diversity, Polymorphism

---

\* ismaili.a@lu.ac.ir