

بررسی تنوع ژنتیکی و مورفوفیزیولوژیکی اکوتیپ‌های پونه *Mentha longifolia* بومی ایران

Evaluation of genetic and morpho-physiological diversity in Iranian *Mentha longifolia* ecotypes

کبری حسنپور ریحانی^۱، امید سفالیان^{۱*}، ناصر زارع^۱، علی اصغری^۱، بهروز اسماعیل پور^۲
۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، اردبیل، ایران
۲- دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی، اردبیل، ایران

Hassanpour Reyhani K¹, Sofalian O^{*1}, Zare N¹, Asghari A¹, Esmailpour B²

1- MSc Student, Associate Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sofalian@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

پونه گیاهی از خانواده نعناع می‌باشد. این گیاه، از نظر خواص دارویی در دنیا اهمیت فراوانی دارد. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ۱۱ اکوتیپ پونه از مناطق مختلف کشور می‌باشد. به منظور بررسی تنوع بین اکوتیپ‌های پونه در دانشگاه محقق اردبیلی، آزمایشی در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در ۱۱ اکوتیپ (تیمار) و ۳ تکرار اجرا شد. در این تحقیق، برای تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه پونه *Mentha longifolia* از ۱۵ نشانگر مولکولی RAPD و برای صفات مورفوفیزیولوژیکی صفاتی از قبیل طول برگ، عرض برگ، سطح برگ، تعداد برگ، ارتفاع بوته، عرض بوته، انشعابات بوته، روز تا گلدهی، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، درصد نشت مواد محلول و RWC اندازه‌گیری شد. آغازگرهای RAPD در مجموع ۱۶۷ باند تکثیر کردند که ۱۶۳ باند (۹۷/۲۹ درصد) دارای چند شکلی بودند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در محدوده ۰/۱۴۹ (آغازگر ۸۳) تا ۰/۲۵۶ (آغازگر ۳) بود. اکوتیپ آذربایجان غربی با اکوتیپ یزد بیشترین شباهت ژنتیکی ۰/۹۵۲ را دارا بودند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای اکوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام شد و ۱۱ اکوتیپ مورد بررسی در ۳ گروه دسته‌بندی شدند. نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات برای صفات اندازه‌گیری شده، معنی‌دار بودند. تجزیه خوشه‌ای براساس صفات زراعی نیز اکوتیپ‌ها را به ۳ گروه تقسیم کرد. وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پونه امکان انجام مقاصد گزینش را فراهم خواهد ساخت.

واژه‌های کلیدی

پونه
مورفولوژیکی
خصوصیات فیزیولوژیکی
تنوع ژنتیکی
گیاه دارویی

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در سه گروه اصلی تفکیک نمود به طوری که تجزیه به مختصات اصلی نیز الگوی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را تایید کرد. هم‌چنین تنوع درون گونه‌ای (۹۸ درصد) در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای (دو درصد) بیشتر بود. بیش‌ترین تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های *M. longifolia* و کم‌ترین تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *M. sp* مشاهده شد. (Rahim 2011) روابط ژنتیکی ۱۶ نمونه متعلق به ۳ گونه‌ی *M. longifolia*، *M. spicata* و *M. piperata* با استفاده از ۱۲ نشانگر R-ISSR مورد بررسی قرار داد. در مجموع ۱۵۵ باند تولید شد، که ۱۴۶ باند آن چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی ۹۴/۱۹ درصد به دست آمد. ۷۳/۰۱ درصد تنوع کل مربوط به تنوع درون گونه‌ای و ۲۶/۹۹ درصد آن مربوط به تنوع بین گونه‌ای بود هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۱ اکوتیپ پونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مورفوفیزیولوژیکی بود.

مواد و روش‌ها

بذور پونه متعلق به ۱۱ منطقه مختلف کشور، از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شد و در پتری دیش کشت شدند. بذور برای جوانه‌زنی در دستگاه ژرمیناتور با دما و رطوبت مناسب قرار داده شدند پس از جوانه‌زنی بذور به گلدان‌های کاغذی منتقل و در اتاقک رشد قرار داده شد، پس از اینکه گیاهچه‌ها چند برگه شدند به گلدان منتقل و در شرایط گلخانه قرار گرفتند. مشخصات اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده‌است. تعداد ۱۵ آغازگر RAPD در این بررسی استفاده شد. برای هر اکوتیپ، استخراج DNA از برگ‌های جوان بر اساس روش (Saghai-Marooft et al. 1984) صورت گرفت. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نمونه‌هایی که کیفیت DNA خوبی داشتند، انتخاب شدند. برای تکثیر DNA ژنومی از آغازگرهای RAPD ساخت شرکت Meta bion آلمان استفاده شد. نام و توالی این آغازگرها در جدول ۲ آورده شده‌است. برای

خانواده نعناعیان دارای تنوع گسترده‌ای بوده، به طوری که در ایران شش گونه از جنس نعناع (*M. spicata*، *M. suaveolens*، *M. longifolia*، *M. arvensis*، *M. aquatica*، *mozaffarianii*) گزارش شده است (Mozaffarian 1996). *Mentha longifolia* یکی از شش گونه نعناع است که در ایران وجود دارد و مورد توجه قرار گرفته است. به دلیل اهمیت دارویی، غذایی و بهداشتی پونه امروزه کمتر کسی است که با این گیاه سروکار نداشته باشد، زیرا انواع خواص درمانی اسانس‌ها نسبت به بیماری‌های میکروبی (Arrieta et al. 2001)، غیر میکروبی (Bum et al. 2001)، اثر کشندگی با بازدارندگی روی باکتری‌ها و مخمرها (Khan et al. 2001) و نیز تاثیر ضد قارچی آن‌ها کاملاً مشخص شده‌است. گونه‌های خانواده نعناعیان همانند آویشن و پونه به علت دارا بودن مقادیر بالای مونوترپین‌ها، تیمول و کارواکرول خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (Craig 1999). تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی ممکن است از طریق ساز و کارهای متفاوتی مانند جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژنی و رانده‌شدگی ژنتیکی ایجاد شود. با توجه به نقش تنوع ژنتیکی در پیشبرد اهداف برنامه‌های اصلاح نباتات شناسایی این تنوع از طریق روش‌های مولکولی و غیر مولکولی با اهمیت خواهد بود. امروزه در بررسی تنوع و تعیین قرابت ژنتیکی بین نمونه‌های مختلف گیاهی به وفور از مارکرهای مولکولی استفاده می‌شود. نشانگر RAPD به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف‌های نوکلئوتیدی DNA الگو به عنوان یکی از مؤثرترین نشانگرهای مولکولی در مطالعه ژرم پلاسماهای گیاهی معرفی شده‌است (Strelchenko et al. 2005). Slamati and yusefy (2011) به منظور بررسی تنوع بین ۱۲ جمعیت از گیاه دارویی *Mentha cervina* L تفاوت‌های مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و ژنتیکی را مورد بررسی قرار دادند. در یک مطالعه انجام شده توسط Craig (1999) نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ متعلق به سه گونه *M. longifolia*، *M. pulegium* و *M. sp* نشان داد میانگین درصد چندشکلی در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی شده ۹۴/۷۰ درصد بود. پایین بودن میزان تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد (۰/۱۷ تا ۰/۵۶) نشان از بالا بودن تنوع در

اجزای واکنش PCR برای تکثیر نمونه‌های DNA با استفاده از آغازگرهای RAPD شامل: $0.396 \mu\text{L}$ آغازگر با غلظت پنج

مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده نیز از نشانگر وزنی مولکولی با اندازه قطعات ۳۰۰۰-۱۰۰ جفت‌باز استفاده شد.

جدول ۱- کد و مشخصات جغرافیایی بذور مورد مطالعه

ردیف	استان	شهرستان	ارتفاع	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	آذربایجان غربی	سلماس	۱۸۲۴	۳۸/۰۷/۰۸	۴۴/۳۴/۴۰
۲	یزد	تفت	۲۵۳۸	۳۱/۳۵/۳۲	۵۴/۰۷/۳۵
۳	گیلان	رستم آباد	۱۳۴۸	۳۷/۵۵/۱۵	۴۹/۲۴/۵۸
۴	چهارمحال بختیاری	شهرکرد	۲۵۳۳	۳۲/۳۱/۱۶	۵۰/۲۸/۱۴
۵	خوزستان	شوشتر	۶۱	۳۲/۰۸/۳۸	۴۸/۵۰/۳۳
۶	لرستان	خرم آباد	۱۸۱۲	۳۳/۳۴/۶۲	۴۸/۳۱/۰
۷	هرمزگان	بندر عباس	۱۲۷۰	۲۹/۳۰/۰۶	۵۷/۱۴/۳۱
۸	کرمان	بردسیر	۳۴۱۵	۲۸/۰۳/۰۷	۵۶/۰۱/۲۸
۹	خراسان شمالی	اسفراین	۱۲۱۵	۳۶/۴۱/۲۷	۵۷/۵۵/۴۹
۱۰	قزوین	قزوین	۱۶۵۰	۳۶/۲۸/۴۹	۵۰/۲۴/۹۲
۱۱	اردبیل	مشگین شهر	۱۵۵۰	۳۸/۱۳/۰۵	۴۸/۴۱/۱۱

استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مارکری، می‌توان همراه با تجزیه کلاستر از تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) و یا (PCOA) به‌ویژه زمانی که دو یا سه مولفه اول بیش از ۲۵ درصد از کل واریانس را توجیه می‌نمایند، استفاده کرد (Mohammadi and Prasanna 2003). لذا گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از PCA نیز انجام شد.

صفات فیزیولوژیکی مثل طول برگ، عرض برگ و سطح برگ به‌وسیله دستگاه سطح برگ سنج، ارتفاع بوته به وسیله خط کش و قطر ساقه در زمان گلدهی اندازه‌گیری شد. هم‌چنین اندازه‌گیری رنگی‌های فتوسنتزی براساس روش Lichtenthaler (1987)، محتوای نسبی آب برگ به روش Ritchie et al. (1990)، ثبات غشا به روش Redmann et al. (1986) انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 و SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

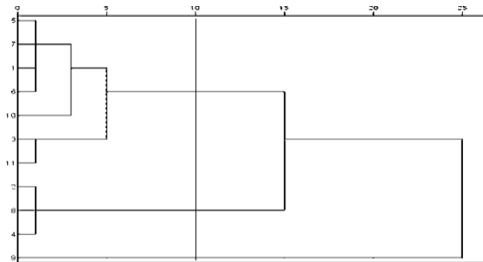
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که بین اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده (طول برگ و عرض برگ، سطح برگ، تعداد برگ، ارتفاع بوته، قطر ساقه، انشعابات بوته و روز تا گلدهی، کلروفیل a، کلروفیل

میکرومول، $2 \mu\text{L}$ DNA با غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر، $5/104 \mu\text{L}$ آب دوبار تقطیر، $7/5 \mu\text{L}$ مستر میکس، حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بود. واکنش PCR طبق برنامه زیر توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت TECHNE انجام شد. در مرحله اول، واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مرحله دوم شامل ۴۰ چرخه (الف): واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد. ب: اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب برای هر آغازگر. ج: بسط رشته DNA توسط پلیمرز به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود و در مرحله سوم، بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه Gel Doc ساخت شرکت UVP آمریکا عکس‌برداری شد. تصاویر حاصل از ژل‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و باندها براساس حضور و عدم حضور، به کد صفر و یک تبدیل شدند و پس از انتقال داده‌ها به نرم‌افزار Excel، ماتریس تشابه توسط نرم‌افزار NTSYSpc2 (Rohlf 2000) بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام و دندوگرام رسم شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین اکوتیپ‌ها و تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار GenAlex (Peakall and Smouse 2006) استفاده شد. به‌منظور

بیش‌ترین طول دوره رشد و کم‌ترین تعداد گل بود در واقع بین افزایش رشد رویشی گیاه با تعداد گل در بوته همبستگی منفی وجود دارد (Slamati and yusefy 2011).

در این تحقیق به منظور تشخیص و ارزیابی تنوع بین اکوتیپ‌های گیاه دارویی پونه از آغازگر مولکولی RAPD استفاده شد که از بین ۸۰ آغازگر اولیه پس از غربالگری، ۱۵ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. توالی پرایمری، تعداد کل باندها، تعداد باندها چندشکل و درصد چند شکلی برای هر آغازگر در جدول ۲ نشان داده شده‌است. در مجموع از بین ۱۶۷ نوار قابل امتیازدهی، ۱۶۳ نوار چند شکل در اکوتیپ‌های مورد مطالعه تولید شدند که نشان از تنوع بین اکوتیپ‌ها و توانایی نسبتاً خوب آغازگرهای RAPD در تفکیک آن‌ها بود. میزان PIC برای آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه RAPD بین ۰/۱۵۸ تا ۰/۲۹۷ در آغازگر P4 تا P31 متغیر بود. شاخص آغازگری^۱ (MI) نیز که به‌عنوان یک معیار کارایی در تعیین چند شکلی استفاده می‌شود، محاسبه شد. این شاخص از ۰/۸۳ برای آغازگر p30 و ۰/۲۶۳ برای آغازگر p1 متغیر بود. شاخص آغازگری^۲ (MI) نیز که به‌عنوان یک معیار کارایی در تعیین چند شکلی استفاده می‌شود، محاسبه شد. شاخص آغازگر (MI) از ۰/۸۳ برای آغازگر p30 و ۰/۲۶۳ برای آغازگر p1 متغیر بود. این شاخص پتانسیل هر آغازگر را در تولید نوار بیش‌تر نشان می‌دهد (Powell et al. 1996) جهت بررسی روابط بین ارقام، شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت نیز محاسبه شدند. میانگین تنوع ژنتیکی درون (Hs) ۰/۱۸۴ و کل (Ht) ۰/۳۰۱ محاسبه شد.



شکل ۱- دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات اندازه‌گیری شده براساس روش وارد. شماره‌های ۱ تا ۱۱ به‌ترتیب مربوط به آذربایجان غربی، یزد، گیلان، شهرکرد، خوزستان، خرم‌آباد، هرمزگان، کرمان، خراسان، قزوین و اردبیل می‌باشند.

b، کلروفیل کل، کارتنوئید، درصد پروتئین، کربوهیدرات کل، درصد نشت مواد محلول و RWC) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. وراثت‌پذیری عمومی در حد ۹۷ درصد در صفت روز تا گلدهی و ۳۸ درصد در صفت عرض برگ محاسبه شد (جدول ۲)، که این نتایج نشان‌دهنده امکان‌پذیری و پاسخ به‌گزینش متوسط به بالا در صفات مورد بررسی می‌باشد، از این رو مقاصد گزینشی می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد. وجود واریانس ژنتیکی بین صفات اندازه‌گیری شده حکایت از وجود تنوع ژنتیکی توارث‌پذیر می‌باشد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفوفیزیولوژیکی با استفاده از روش وارد، اکوتیپ‌ها در سه گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۱). گروه اول شامل اکوتیپ‌های آذربایجان غربی، خوزستان، خرم‌آباد، هرمزگان، قزوین، گیلان و اردبیل بود. در این گروه صفات مهمی هم‌چون ارتفاع بوته، کلروفیل a، کلروفیل b، نشت مواد محلول، کارتنوئید بیش‌ترین مقدار را داشتند. گروه دوم از اکوتیپ‌های یزد، شهرکرد و کرمان تشکیل شد و صفاتی چون تعداد برگ، انشعابات بوته، محتوای رطوبت نسبی بیش‌ترین مقدار و ارتفاع بوته، قطر ساقه با کم‌ترین مقدار عوامل موثر در این گروه بودند. در گروه سوم صفات طول برگ، عرض برگ و سطح برگ بیشترین مقدار را داشتند و اکوتیپ خراسان در این گروه قرار داشت. وجود همبستگی بین زوج صفات، در کارهای اصلاحی به‌خصوص در امر گزینش براساس تعدادی از صفات بسیار ضروری می‌باشد. همبستگی‌های محاسبه شده بر اساس میانگین صفات مورفوفیزیولوژیک نشان داد که برخی از صفات اندازه‌گیری شده دارای همبستگی مثبت و یا منفی با هم بودند. صفات مربوط به برگ مثل طول برگ، عرض برگ و سطح برگ همبستگی مثبتی با تعداد برگ و قطر ساقه داشت. ارتفاع بوته با انشعابات بوته همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت که نتایج به‌دست آمده با مطالعات انجام گرفته مطابقت دارد (Moghaddam et al. 2012). بین درصد پروتئین اندازه‌گیری شده با رنگیزه‌های فتوستتزی و کربوهیدرات کل همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد که با نتایج تحقیقات انجام گرفته مطابقت داشت (Moghaddam et al. 2015). اکوتیپ گیلان علاوه براینکه نسبت به سایر اکوتیپ‌ها زودگل‌تر بود، دارای کم‌ترین طول دوره رشد و بیش‌ترین تعداد گل و اکوتیپ کرمان دارای

¹ Maker index

² Maker index

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفوفیزیولوژیک

میانگین مربعات															
منابع تغییر	درجه آزادی	طول برگ	عرض برگ	سطح برگ	تعداد برگ	ارتفاع بوته	قطر ساقه	انشعابات بوته	روز تا گلدهی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونئید	نشت مواد محلول (%)	محتوای نسبی آب برگ
تکرار	۲	۳۲/۵۸ ^{ns}	۰/۰۲ ^{ns}	۸۳۹۳/۲۶ ^{ns}	۵/۱۸ ^{ns}	۲/۴۴ ^{ns}	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۳۹ ^{ns}	۶/۰۹ ^{ns}	۰/۴۰ ^{ns}	۰/۱۹ ^{ns}	۰/۵۸ ^{ns}	۰/۰۹ ^{**}	۸/۲۳ ^{ns}	۰/۰۰۷ ^{ns}
تیمار	۱۰	۵۶/۶۹*	۱/۱۰*	۱۴۵۴۶/۷۶*	۲۸۰/۶۷ ^{**}	۵۲/۹۱ ^{**}	۰/۱۷ ^{**}	۱/۸۹ ^{**}	۵۵۳/۰۶ ^{**}	۰/۷۵ ^{**}	۰/۴۱ ^{**}	۱/۰۲ ^{**}	۰/۱۶ ^{**}	۱۳/۸۲ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}
خطا	۲۲	۲۱/۰۲	۰/۳۹	۳۶۲۱/۶۷	۶۲/۴۸	۵/۷۹	۰/۰۲	۰/۴۲	۵/۱۵۷	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۲۱	۰/۰۱	۳/۸	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات	-	۳۲/۰۶	۱۳/۴۶	۱۷/۷۹	۲۶/۴۲	۹/۴۵	۹/۱۷	۲۶/۳۰	۱/۶۸	۷/۲۷	۱۱/۶	۸/۲۴	۶/۴۶	۴۱/۱	۹/۵۱
واریانس ژنتیکی	-	۱۶/۱۸	۰/۲۴	۳۶۱۱/۷	۷۲/۷۳	۱۵/۷۱	۰/۰۵	۰/۴۹	۱۸۲/۶۳	۰/۲۱	۰/۱	۰/۲۷	۰/۰۵	۳/۳۴	۰/۰۰۳
وراثت‌پذیری عمومی (%)	-	۴۳	۳۸	۵۰	۵۴	۷۳	۷۱	۵۴	۹۷	۶۴	۴۸	۵۶	۸۳	۴۷	۶۰

جدول ۲- نشانگرهای RAPD مورد مطالعه و شاخص‌های بدست آمده

ردیف	کد آغازگر	توالی آغازگر ۳'→۵'	دمای اتصال (°C)	تعداد کل نوار	تعداد نوار چند شکل	درصد چند شکلی
۱	P _۱	CCTGGGCTTA	۳۴	۱۹	۱۹	۱۰۰
۲	P _۲	CCTGGGCTG	۳۴	۱۳	۱۳	۱۰۰
۳	P _{۳۱}	CCGGGGTTAA	۳۶	۱۴	۱۴	۱۰۰
۴	P _{۷۵}	GAGGTCCAGA	۳۲	۱۱	۱۱	۱۰۰
۵	P _{۳۷}	CCGGGGTTTT	۳۲	۸	۸	۱۰۰
۶	P _۴	CCTGGGCTG	۳۶	۱۲	۱۲	۱۰۰
۷	P _{۷۳}	GGGCACGCGA	۳۶	۱۲	۱۲	۱۰۰
۸	P _{۸۳}	GGGCTCGTGG	۳۶	۱۰	۱۰	۱۰۰
۹	P _{۸۴}	GGGCGCGAGT	۳۶	۹	۸	۸۸/۸۹
۱۰	P _{۴۳}	AAAACCGGGC	۳۲	۱۳	۱۲	۹۲/۳۱
۱۱	P _{۷۰}	GGCACGCGA	۳۲	۱۱	۱۰	۹۰/۹۱
۱۲	P _{۳۵}	CCGGGGTTAA	۳۲	۱۰	۱۰	۱۰۰
۱۳	P _۵	CCTGGGTTCC	۳۴	۱۴	۱۴	۱۰۰
۱۴	P _{۳۰}	CCGGCCTTAG	۳۴	۵	۵	۱۰۰
۱۵	P _۳	CCTGGGCTTA	۳۲	۶	۵	۸۳/۳۳
میانگین	-	-	-	۱۱/۱۳	۱۰/۸۶	۹۷/۰۲۹

نتایج نشان داد که تجزیه کلاستر به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های مورد بررسی است. گروه‌بندی که بر اساس ماتریس تشابه نشانگرهای RAPD صورت گرفت، اکوتیپ‌ها را در ۳ گروه تقسیم‌بندی کرد. با توجه به نمودار تجزیه خوشه‌ای ۱۱ اکوتیپ گیاه پونه، محل برش در حد تشابه ۰/۸۹۲ انجام شد. اکوتیپ‌های آذربایجان غربی، یزد، گیلان و شهرکرد در گروه اول، اکوتیپ‌های خوزستان، خرم‌آباد و هرمزگان در گروه دوم و اکوتیپ‌های کرمان، خراسان، قزوین و اردبیل در گروه سوم قرار گرفتند (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده‌است تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) سه مولفه هماهنگ اصلی اول ۶۵/۷۴ درصد از تغییرات مولکولی بین اکوتیپ‌ها را تبیین کردند. مولفه اول ۲۷/۱۰ درصد از تنوع کل را تبیین نمود. مولفه‌های دوم و سوم به ترتیب ۲۳/۲۴ درصد و ۱۵/۳۹ درصد از تغییرات را تبیین کردند. در این تجزیه نیز همانند تجزیه خوشه‌ای به‌خوبی می‌توان جدا شدن اکوتیپ‌ها نسبت به یکدیگر و هم‌چنین فاصله ژنتیکی تمام اکوتیپ‌ها با یکدیگر را مشاهده نمود (شکل‌های ۲ و ۳). ژنوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفتند در این تجزیه نیز در کنار یکدیگر قرار گرفتند. نتایج مربوط به تجزیه کلاستر در اکوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که بین تنوع مولکولی و پراکنش جغرافیایی مطابقتی وجود ندارد به‌طوری که مناطقی که نزدیک هم قرار دارند در گروه‌های جداگانه جای گرفته‌اند که بیانگر تفاوت ژنتیکی بالای این نمونه‌ها می‌باشد از طرف دیگر مناطقی که در یک گروه جای گرفته‌اند دارای فاصله جغرافیایی زیادی هستند که این امر می‌تواند به‌دلیل تشابه شرایط میکروکلیمایی و یا تبادل فیزیکی مواد بین این مناطق باشد. این عدم ارتباط در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت از گیاه دارویی *Mentha cervina L.* نیز گزارش شده‌است (Rodrigues et al. 2013). هم‌چنین نتایج مشابهی در بابونه آلمانی گزارش شده که اعلام کردند تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه آلمانی از توزیع جغرافیایی آن‌ها تبعیت نمی‌کند (Solouki et al. 2008). به‌طور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد در گونه‌های دگرگشن مثل پونه به‌علت جریان ژنی بالا، فاصله

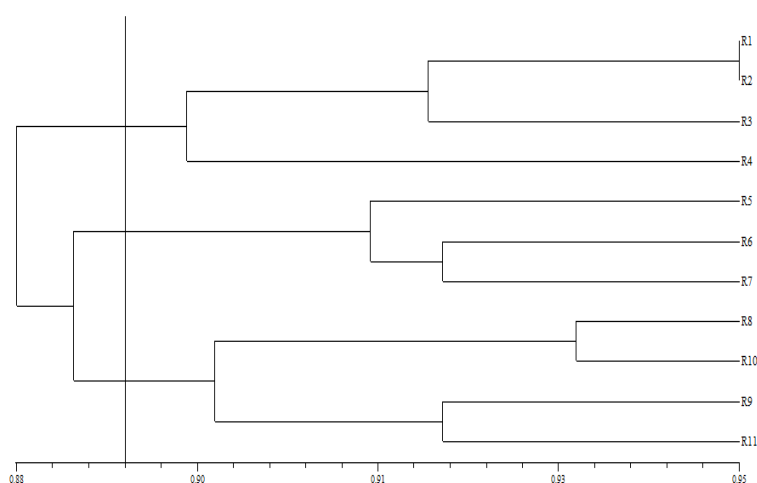
میانگین درجه تمایز ژنی (Gst) بین اکوتیپ‌های پونه مورد مطالعه در تمام مکان‌ها ۰/۳۸۸ برآورد شد. این نتیجه بیانگر آن است که سهم بیشتری از تنوع کل مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، فقط ۴ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین اکوتیپ‌ها و ۹۶ درصد آن مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها بود. این مقادیر نتایج حاصل از برآوردهای تنوع ژنتیکی درون و بین اکوتیپ‌های پونه را تایید کرد و حاکی از آن است که سهم بیشتری از تنوع کل مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها است. فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها براساس فاصله ژنتیکی نی، از ۰/۰۴۹ تا ۰/۱۷۵ متغیر بود. کم‌ترین فاصله یا بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌های آذربایجان غربی و یزد (۰/۰۴۹) و کمترین تشابه بین اکوتیپ‌های خوزستان و اردبیل (۰/۱۷۵) مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های Zeinaddiny et al. (2013) نیز قابل مقایسه است. در این بررسی به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ متعلق به سه گونه *M. longifolia*، *M. pulegium* و *M. sp.* از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد. میانگین درصد چندشکلی در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی شده ۹۴/۷۰ بود. پایین بودن میزان تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد (۰/۱۷ تا ۰/۵۶) نشان از بالا بودن تنوع در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به ۳ گروه که تجزیه به مختصات اصلی نیز آن را تایید کرد، گروه‌بندی نمود. تنوع درون گونه‌ای بیشتر (۹۸ درصد) در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای (دو درصد) بود. بیش‌ترین تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های *M. longifolia* ($H=0/165$ و $I=0/46$) و کم‌ترین تنوع ژنتیکی درون گونه‌های *M. sp.* ($H=0/102$ و $I=0/194$) مشاهده شد. بررسی پتانسیل تنوع ژنتیکی به وسیله نشانگر مولکولی RAPD، نتایج مناسبی جهت تفکیک اکوتیپ‌های پونه ارائه داد به‌طوری که تجزیه‌ای خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم‌های رسم دندوگرام UPGMA، به خوبی توانست اکوتیپ‌های پونه را تفکیک کند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام، ارقامی که کم‌ترین تشابه و بیش‌ترین فاصله ژنتیکی را دارند، می‌توانند به‌عنوان والدین بالقوه در تولید ارقام هیبرید و سایر برنامه‌های اصلاحی در پونه استفاده شوند.

شود، فاصله ژنتیکی جمعیت‌های منقطع افزایش می‌یابد و به علت افزایش هموزیگی و افتراق بین جمعیت‌ها فرسایش ژنتیکی رخ خواهد داد (Hamrick 1996).

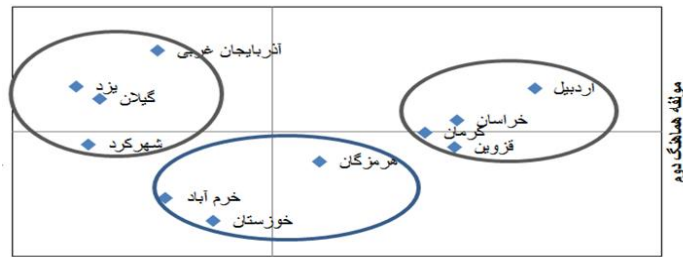
ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است. در این گونه‌ها در صورتی که جریان ژنی بین رویشگاه‌ها تحت تاثیر عوامل غیر طبیعی هم‌چون تخریب رویشگاه‌ها در اثر چرای بی‌رویه، چرای مفرط و سایر عوامل قطع

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های پونه براساس نشانگرهای RAPD

کد آغازگر	میانگین تعداد کل آلل مشاهده شده	تعداد آلل موثر	تنوع ژنی (He)	شاخص شانون (I)	تنوع ژنتیکی PIC	شاخص نشانگر MI
P1	۲	۱/۵۴	۰/۳۲۵	۰/۴۹۲	۰/۲۷۷	۵/۲۶۳
P2	۲	۱/۵۰	۰/۳۰۱	۰/۴۶۶	۰/۲۴۹	۳/۲۳۷
P31	۲	۱/۶۲	۰/۳۶۵	۰/۵۴۴	۰/۲۹۷	۴/۱۵۸
P75	۲	۱/۴۱	۰/۲۶۶	۰/۴۲۳	۰/۲۳۱	۲/۵۴۱
P37	۲	۱/۴۸	۰/۳۰۹	۰/۴۷۸	۰/۲۰۴	۱/۶۳۲
P4	۲	۱/۴۸	۰/۲۹۴	۰/۴۵۳	۰/۱۵۸	۱/۸۹۶
P73	۲	۱/۴۶	۰/۲۸۶	۰/۴۴۲	۰/۱۹۹	۲/۳۸۸
P83	۲	۱/۳۴	۰/۲۲۶	۰/۳۶۸	۰/۱۴۹	۱/۴۹
P84	۱/۸۸	۱/۵۹	۰/۳۵۱	۰/۵۱۷	۰/۲۰۵	۱/۴۵۷
P43	۱/۹۲	۱/۴۴	۰/۲۶۵	۰/۴۰۹	۰/۱۷۷	۱/۹۶۰
P70	۱/۹۰	۱/۴۷	۰/۲۸۵	۰/۴۳۲	۰/۱۸۴	۱/۶۷۲
P35	۲	۱/۵۴	۰/۳۱۸	۰/۴۸۲	۰/۲۱۲	۲/۱۲
P5	۲	۱/۵۰	۰/۳۰۵	۰/۴۶۶	۰/۲۳۴	۳/۲۷۶
P30	۲	۱/۴۰	۰/۲۶۰	۰/۴۱۹	۰/۱۶۶	۰/۸۳
P3	۱/۸۳	۱/۴۸	۰/۲۹۸	۰/۴۴۹	۰/۲۵۶	۱/۰۶



شکل ۲- گروه‌بندی اکوتیپ‌های پونه مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه نشانگرهای RAPD که در آن R1 تا R11 به ترتیب مربوط به مناطق آذربایجان غربی، یزد، گیلان، شهرکرد، خوزستان، خرم‌آباد، هرمزگان، کرمان، خراسان، قزوین و اردبیل می‌باشند.



مولفه هماهنگ اول

شکل ۳- تجزیه PCA مربوط به گروه‌بندی ۱۱ اکوتیپ پونه

آل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم پلاسما، تسهیل مکان‌یابی خیلی دقیق QTLها و تایید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی (Babu et al. 2004). بررسی‌ها نشان داد در مورد نشانگرهایی که توزیع یکنواختی در اطراف صفات زراعی مورد بررسی داشتند، با توالی‌یابی نشانگرهای دارای ضریب تبیین بالا می‌توان به شناسایی ژن‌های رمز کننده صفات زراعی و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط فراوان با آن صفت هستند جهت اشیاع نقشه‌های پیوستگی امیدوار بود.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های حاصله نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در پونه وجود دارد که می‌تواند در نتیجه تنوع اقلیمی بسیار متفاوت در ایران و همچنین جریان ژنی در اثر دگرگشتن بودن و تکثیر جنسی توسط بذر در این گیاه باشد. با توجه به اینکه روش‌های مولکولی، تنوع ژنتیکی را در سطح DNA، یعنی منشا تمام خصوصیات گیاهی مورد ارزیابی قرار می‌دهند، بنابراین گروه‌بندی بر اساس داده‌های حاصل از آن می‌تواند مکمل تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مورفوفیزیولوژیکی باشد. در کل درک چنین تنوع بالایی در مدیریت و حفاظت ژرم پلاسما این گیاه مفید می‌باشد و اصلاح‌گر را در تعیین راهبردهای بهره‌بردار، اصلاح و اهلی‌سازی و کشت و کار این گیاه یاری می‌کند.

بر اساس تجزیه رگرسیون گام به گام که در آن داده‌های نشانگرهای مولکولی به‌عنوان متغیر مستقل و صفات مورفوفیزیولوژیکی به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند، در مجموع ۸۱ نشانگر برای صفات مورفوفیزیولوژیکی شناسایی شدند. مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده نشان داد که برای صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، درصد پروتئین، عرض برگ، تعداد برگ و ارتفاع بوته بیش از ۵۰ درصد تغییرات توسط نشانگرهای مثبت شناسایی شده، توجه گردید. کلروفیل b با (۰/۹۸۳) دارای بیش‌ترین و عرض برگ با (۰/۰۹۳) دارای کم‌ترین میزان تغییرات تبیین شده توسط نشانگر بودند. تمام صفات مورد مطالعه رابطه معنی‌داری را با تعدادی از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه نشان دادند. بیش‌ترین تعداد نشانگر مربوط به درصد پروتئین (۲۲) و کمترین مربوط به عرض برگ (۱) بود. نشانگرهای P_{4L1} ، P_{31L1} ، P_{75L1} ، P_{30L2} ، P_{30L5} ، P_{2L6} و P_{4L4} با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند. استفاده هم‌زمان از نتایج تجزیه‌های مولکولی و مورفوفیزیولوژیکی می‌تواند در انتخاب والدین مناسب جهت برنامه‌های تحقیقاتی با اهداف مختلف مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آن‌ها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی

منابع

Arrieta J, Reyes B, Calzada F, Cedillo-Rivera R, Navarrete A (2001) Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun*. *Fitoterapia* 72:295-7.

Babu R, Nair SK, Prasanna BM, Gupta HS (2004) Integrating marker-assisted selection in crop breeding prospects and challenges. *Current Science* 87:607-19
Bum EN, Schmutz M, Meyer C, Rakotonirina A, Bopélet M, Portet C, Jeker A, Rakotonirina SV, Olpe HR, Herrling P (2001) Anticonvulsant properties of the methanolic

- extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 76:145-50.
- Craig WJ (1999) Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70:491s-9s.
- Hamrick JL, Godt MJ (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351:1291-8.
- Khan MR, Kihara M, Omoloso AD (2001) Antibacterial activity of *Picrasma javanica*. *Fitoterapia*, 72(4):406-8.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-82
- Maroof MS, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 7.91:5466-70.
- Mohammadi A, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants. *Crop Science* 43:1235-48
- Moghaddam M, Alirezaei Naqhandar M, salahvarzy Y, Goldani M (2015) Effect of drought stress levels on morphological and physiological characteristics of three varieties of basil (*Ocimum basilicum*). *Iranian Journal of Horticultural Science* 46:509-521. (In Farsi).
- Moghaddam M, Omidbeigi R, Salimi A, Taghavy MR (2012) An Assessment of Genetic diversity among Iranian Populations of Basil (*Ocimum* spp.) Using Morphological Traits. *Iranian Journal of Horticultural Science* 44:227-244. (In Farsi).
- Mozaffarian V (1996) encyclopedia of Iran plant names. First ed. Contemporary culture publishing. Iran. pp:756. (In Farsi).
- Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding* 2:225-38.
- Rahim Malek (2011) Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers. *Agricultural biotechnology* 1:11-17. (In Farsi).
- Redmann RE, Haraldson J, Gusta LV (1986) Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. *Physiologia Plantarum* 67:87-91.
- Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30:105-11. 1
- Rodrigues L, Póvoa O, van den Berg C, Figueiredo AC, Moldão M, Monteiro A (2013) Genetic diversity in *Mentha cervina* based on morphological traits, essential oils profile and ISSRs markers. *Biochemical Systematics and Ecology* Dec 31:51:50-9.
- Rohlf FJ (2000) NTSys-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publications Setauket NY.
- Saghai-Maroof MA, Soliman K, Jorgensen RA, and Allard RW 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 81: 8014-8018
- Solouki M, Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh AA (2008) Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae* 117:281-7.
- Strelchenko P, Street K, Mitrofanova O, Mackay M, Balfourier F (2005) Genetic diversity among hexaploid wheat landraces with different geographical origins revealed by microsatellites: comparison with AFLP, and RAPD data. In *Proceedings of 4th International Crop Science Congress*.
- Slamati M, yusefy M (2011) evaluation of performance and morphological diversity of *Dracocephalum moldavica* genotypes. *Plant Researches* 27:1-9.
- Zeinaddiny A, Farshadfar M, Safari H, Moradi F, Shirnany H (2013) Study of Genetic relationships of Some Mint Species Using ISSR Markers. *Agricultural Biotechnology* 21-11. (In Farsi).