ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۲۸- ۱۹

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) با استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی RAPD

Evaluation of genetic diversity in the medicinal plant Kakooti (*Ziziphora tenuior* L.) using morphological characteristics and RAPD markers

زهرا حطری*[۱]، ذبیح اله زمانی[۲]، وحیده ناظری[۳]، لیلا تبریزی[٤]

۳،۲،۱ و۴- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران

Hatari Z*[1], Zamani Z[2], Nazeri V[3], Tabrizi L[4]

1,2,3,4. Graduate Student, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:zhatari@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

گیاه دارویی کاکوتی با نام علمی*Ziziphora tenuior* به طور سنتی در درمان بیماری ها، کاهش درد و درمان عفونت ها استفاده می شود. کاکوتی گیاهی یکساله و معطر بوده و پراکنش وسیعی در ایران دارد. در این تحقیق، با استفاده از ۱۳ صفت مورفولوژیک و ۱۶ آغازگر RAPD به بررسی تنوع ژنتیکی ۳۹ نمونه کاکوتی از ۲۱ منطقه جغرافیایی ایران پرداخته شده است. میزان تشابه ژنتیکی محاسبه شده بین نمونه ها بر اساس نوارهای چند شکل در دامنه‌ای از ۰/۱۹ تا ۰/۷۷ قرار داشت، به طوری که ۱۶ آغازگر به کار رفته میزان چند شکلی۹۰/۳ درصد را نشان دادند. هر دو نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی درجه بالایی از چندشکلی را در بین نمونه ها نشان دادند. میزان همبستگی بدست آمده بین نشانگر RAPD و نشانگر مورفولوژیکی معنی دار نبود (r =۰/۰۱). بر اساس نتایج این مطالعه، این گونه گیاهی در ایران ازتنوع قابل توجهی برخوردار بوده که می تواند منبع ژنتیکی ارزشمندی برای تحقیقات به نژادی گیاه کاکوتی در آینده باشد.

واژه‌های کلیدی

**تشابه ژنتیکی،
چند شکلی،
منبع ژنتیکی،
نشانگر مولکولی،
RAPD**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

مقدمه

کاکوتی با نام علمی *Ziziphora tenuior* گیاهی است علفی و یک ساله با ارتفاع ۵ تا ۱۵ سانتی‌متر و ظاهری کرکینه پوش که دارای گل آذین سنبله ای باریک با برگ های نوک تیز و باریک است (شکل ۱). جنس *Ziziphora* از تیره نعناعیان دارای ۴ گونه *Ziziphora clinopodioides*، *Ziziphora capitata*، *Ziziphora persica* و *Ziziphora tenuior* در ایران است که دو گونه آن شامل گونه چند ساله *Z. clinopoides* و گونه یک ساله *Z. tenuior* دارویی می‌باشند (Mozaffarian 1996). گیاه کاکوتی دارای برگ‌های کوچک، متقابل، کم و بیش نیزه ای شکل و بدون دمبرگ، همچنین دارای گل‌های کوچک، کامل و به رنگ‌های سفید، صورتی و ارغوانی است (Ghahreman 1994) . کاکوتی گیاهی معطر است و مهم ترین اجزای اسانس آن شامل پولگون[1]، لیمونن[2] و سینئول[3] می‌باشد (Babakhanloo et al. 1998). از خواص دارویی آن می‌توان در درمان اختلالات گوارشی نظیر اسهال و دل پیچه نام برد (Naghibi et al. 2005). علاوه بر اینها، گیاه کاکوتی دارای اثرات آنتی اکسیدانی (Salehi et al. 2005; Konyalioglu et al. 2006) و ضد باکتریایی و ضدعفونی‌کنندگی روده می‌باشد (Economou et al.1991; Ozturk and Ercisli 2007). همچنین مطالعاتی در مورد اثرات تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی توسط اسانس کاکوتی انجام گرفته‌است (Naeini et al. 2009). این گیاه معمولا در مناطق سرد و خشک با ۴۰۰-۳۰۰ میلی متر بارندگی سالانه و ارتفاع حدود ۳۰۰۰ -۱۵۰۰ متر از سطح دریا می روید (Ghalichnia 2002). مناطق انتشار جغرافیایی این گیاه شامل آسیای میانه، روسیه، غرب سیبری، اروپای شرقی، افغانستان، پاکستان و ایران است و در استان های مختلف ایران از جمله خراسان، کردستان، کرمان، زنجان، قم، تهران و غیره پراکندگی وسیعی دارد (Ghahreman 1992).

در مطالعات اصلاحی گیاهان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، تفاوت ها و شباهت های بین ژنوتیپ ها و توده های گیاهی و نقاط قوت و ضعف آنها مشخص شده و سپس با شناسایی و طبقه بندی مورد نظر، برنامه‌های اصلاحی و امکان سازمان‌دهی ژرم پلاسم فراهم می‌شود. نشانگرهای مورفولوژیک به دلیل تعداد محدود، وابستگی به مرحله رشدی گیاه و همچنین اثر محیط به تنهایی برای بررسی تنوع کافی نیستند. استفاده از نشانگرهای مولکولی همچون RAPD ارزیابی نسبتا جامع‌تر و دقیق‌تری از تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند. نشانگرهای مولکولی از دقت و قدرت بیشتری در تفکیک نمونه‌ها نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک برخوردارند. نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی بخش بزرگ‌تری از ژنوم را پوشش می-دهند که شامل نواحی کدشونده و نواحی غیرکدشونده است و دیگر اینکه این نشانگرها در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیکی تحت‌تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند (Semagn 2002) .

منابع ژنتیکی، به خصوص گونه های دارویی، در سال های اخیر به دلیل تغییرات اقلیمی و بهره برداری های غیر مسئولانه در معرض خطر فرسایش و نابودی هستند و لازم است در خصوص شناسایی و جمع آوری و حفاظت آنها برنامه‌ریزی‌های لازم صورت گیرد. تاکنون مطالعه ای در زمینه تنوع ژنتیکی، تحقیقات مولکولی و مورفولوژیکی روی کاکوتی انجام نگرفته است اما از نشانگرهای مورفولوژیکی به تنهایی و یا به همراه سایر نشانگرهای مولکولی در ارزیابی بسیاری از گونه های دارویی خانواده نعناعیان استفاده شده است. Labra et al. (2004) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹ رقم ریحان ایتالیایی(*Ocimum basilicum* L.) علاوه بر روغن های فرار از صفات مورفولوژیکی (اندازه، شکل، حاشیه و رنگ برگ، رنگ گل و ارتفاع بوته) نیز استفاده نمودند. Trindade et al. (2008) در ۳۱ تک بوته از گونه آویشن (*Thymus caespititius*) تنوع ژنتیکی را به وسیله نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند Satil et al. (2005) در بررسی صفات مورفولوژیکی دو گونه *T. fedtschenkoli*

شکل ۱- تصویری از گیاه علفی و یکساله کاکوتی

[1] Pulegone
[2] Limonene
[3] Cineole

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

و *T. migricus* موجود در شرق ترکیه، مشاهده نمودند که هر دو گونه از نظر ظاهری شبیه به هم بوده ولی گونه*T. migricus* در تمام اندام های گیاه از دیگری بزرگتر بود. همچنین De Masi et al. (2006) روابط بین ۱۲ ژنوتیپ ریحان (*Ocimum basilicum* L.) متعلق به ۹ رقم مشهور ایتالیایی را با تعدادی صفات مورفولوژیکی (ارتفاع بوته، قطر ساقه، فاصله و تعداد میانگره، رنگ، شکل، اندازه و حاشیه برگ، وجود یا عدم وجود برجستگی روی برگ و رنگ گل) و ترکیب اسانس و کاربرد نشانگر RAPD مورد مطالعه قرار دادند. Hadian et al. (2008) به بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۸ نمونه مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند. در این تحقیق برای اولین بار به بررسی تنوع ژنتیکی گونه یکساله دارویی کاکوتی در ایران با استفاده از نشانگر های موفولوژیک و RAPD پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه تعداد ۳۹ نمونه از ۲۱ جمعیت کاکوتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با مشخصاتی شامل طول وعرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفته‌است.

ارزیابی ویژگی های مورفولوژیکی

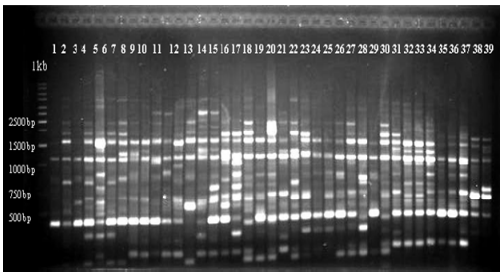
نمونه‌های گیاهی در اردیبهشت ۱۳۸۸ از ۲۱ منطقه مختلف از ۱۲ استان ایران جمع‌آوری شدند. صفات مورد بررسی بر اساس خصوصیات ظاهری طبق کلید شناسایی در فلور ایرانیکا (Rechinger 1982) انتخاب شدند و ۱۳ صفت مورفولوژیکی با استفاده از خط کش میلی‌متری و کد دهی صفات کیفی بررسی شدند.

ارزیابی مولکولی

استخراج DNA (دی ان ای) و ارزیابی مولکولی

استخراج DNA از نمونه‌های برگ با استفاده از روش Sharp et al. (1988) در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران انجام گرفت. تعداد ۱۲۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی RAPD (سری TIB MOLBIOL[1] و OPERON) با استفاده از نمونه‌های DNA از دو ژنوتیپ که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی متمایز بودند (نمونه های سنندج و ابهر)، غربال شدند. تنها آغازگرهایی که تفاوت و تنوع قابل ملاحظه‌ای نشان دادند، برای ارزیابی تمام ژنوتیپ‌ها به کار رفتند و ۱۶ آغازگر بر اساس درصد بالای چند شکلی در دو ژنوتیپ انتخاب شدند. برای تهیه مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمراز، کیت PCR از شرکت سیناژن مورد استفاده قرار گرفت.

هر مخلوط واکنش، شامل سه میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر، دو میکرولیتر آغازگر RAPD با غلظت ۰/۲ میکرومولار، ۷/۵ میکرولیتر از مخلوط کیت و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش در دستگاه ترمو سایکلر[2] قرار داده شد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل یک دوره ۴ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ دوره در دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک‌دقیقه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک‌دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و یک دوره ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. سپس DNA محصولات تکثیری درون چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگیری شد. ژل مورد نظر درون بافر تریس بوریک اسید-EDTA به مدت ۱۶۰ دقیقه و شدت جریان ۷۰ ولت الکتروفورز شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید به منظور رنگ آمیزی قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر نوارهای تولید شده در دستگاه عکس‌برداری از ژل (تحت اشعه ماورای بنفش) مشاهده و عکس‌برداری شد (شکل۲).



شکل ۲- الگوی باندهی نمونه های کاکوتی توسط آغازگر TIBMBA-06 (شماره گذاری ژنوتیپ ها به ترتیب جدول ۱)

[1] www.tib-molbiol.com
[2] Icycler, Bio-Rad

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

جدول۱- مناطق جمع آوری نمونه های کاکوتی و ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی (منبع Google Earth)

شماره ردیف	علامت اختصاری نمونه	منطقه رویشی	استان	طول جغرافیایی(شرقی)	عرض جغرافیایی(شمالی)	ارتفاع از سطح دریا(متر)
۱	MD23	مشهد	خراسان رضوی	۵۹°۳۱′	۳۶°۱۸′	۱۰۳۲
۲	S.YZ5	اسلامیه یزد	یزد	۳۰°۷۵′	۴۵°۳۱′	۱۷۰۰
۳	YJ5	یاسوج	کهکیلویه و بویر احمد	۵۱°۳۳′	۳۰°۴۱′	۱۷۸۳
۴	KN3	کلات نادری	خراسان	۶۰°۲۵′	۳۷°۱۷′	۳۰۵۹
۵	YJ2	یاسوج	کهکیلویه و بویر احمد	۵۱°۳۳′	۳۰°۴۱′	۱۷۸۳
۶	KN6	کلات نادری	خراسان	۶۰°۲۵′	۳۷°۱۷′	۳۰۵۹
۷	MD2	مشهد	خراسان رضوی	۵۹°۳۱′	۳۶°۱۸′	۱۰۳۲
۸	SS15	کامیاران	سنندج	۴۶°۵۶′	۳۴°۴۷′	۱۴۵۳
۹	MD9	مشهد	خراسان رضوی	۵۹°۳۱′	۳۶°۱۸′	۱۰۳۲
۱۰	CH6	چیتگر	تهران	۵۱°۱۲′	۳۵°۴۳′	۱۲۸۱
۱۱	SS4	کامیاران	سنندج	۴۶°۵۶′	۳۴°۴۷′	۱۴۵۳
۱۲	MK7	ماهدشت	البرز	۵۰°۵۷′	۳۵°۴۷′	۱۳۲۱
۱۳	DJ9	دشت ارژن	فارس	۵۲°۱۰′	۲۹°۳۷′	۲۶۲۲
۱۴	ZT4	زیاران طالقان	قزوین(طالقان)	۵۰°۲۸′	۳۶°۱۸′	۱۳۲۳
۱۵	K23	خبر کرمان	کرمان	۵۶°۱۶′	۲۸°۴۹′	۱۸۹۵
۱۶	ZT19	زیاران طالقان	قزوین(طالقان)	۵۰°۲۸′	۳۶° ۰۴′	۱۳۲۳
۱۷	D.YZ17	دیزه یزد	یزد	۵۳°۵۸′	۳۱°۲۷′	۲۳۰۰
۱۸	SR7	سرخه حصار	تهران	۵۱°۳۲′	۳۵°۴۳′	۱۳۸۸
۱۹	AB.ZN3	ابهر	زنجان	۴۹°۱۲′	۳۶° ۸۰′	۱۵۴۳
۲۰	R.QM10	پل رباط کریم	قم	۵۱°۲۵′	۳۵°۴۳′	۱۰۲۴
۲۱	FF7	فراشبند فارس	فارس	۵۲° ۴۰′	۲۸°۵۲′	۷۷۷
۲۲	S.YZ3	اسلامیه یزد	یزد	۳۰°۷۵′	۴۵°۳۱′	۱۷۰۰
۲۳	AB.ZN25	ابهر	زنجان	۴۹°۱۲′	۳۶° ۸۰′	۱۵۴۳
۲۴	FF9	فراشبند فارس	فارس	۵۲° ۴۰′	۲۸°۵۲′	۷۷۷
۲۵	Mt7	محلات	مرکزی	۵۰°۲۶′	۳۳°۵۵′	۱۷۶۹
۲۶	K14	خبر کرمان	کرمان	۵۶°۱۶′	۲۸°۴۹′	۱۸۹۵
۲۷	K25	خبر کرمان	کرمان	۵۶°۱۶′	۲۸°۴۹′	۱۸۹۵
۲۸	Mt10	محلات	مرکزی	۵۰°۲۶′	۳۳°۵۵′	۱۷۶۹
۲۹	AB.ZN17	ابهر	زنجان	۴۹°۱۲′	۳۶° ۸۰′	۱۵۴۳
۳۰	BB25	بی بی شهربانو	تهران	۵۱°۲۷′	۳۵°۳۰′	۱۰۰۷
۳۱	KM.K5	کمال شهر	البرز	۵۰°۵۲′	۳۵° ۵۳′	۱۳۱۵
۳۲	SH.Q5	شینقر	قزوین	۵۰°۰۷′	۳۶° ۱۷′	۱۳۹۵
۳۳	Mt3	محلات	مرکزی	۵۰°۲۶′	۳۳°۵۵′	۱۷۶۹
۳۴	QQ1	گبران قلعه	قزوین	۵۰°۰۷′	۳۶°۱۶′	۱۳۵۵
۳۵	DJ14	دشت ارژن	فارس	۵۲°۱۰′	۲۹°۳۷′	۲۶۲۲
۳۶	H.QM10	حسن آباد قم	قم	۵۰°۵۱′	۳۴°۲۴′	۱۳۸۱
۳۷	SS5	کامیاران	سنندج	۴۶°۵۶′	۳۴°۴۷′	۱۴۵۳
۳۸	YJ12	یاسوج	کهکیلویه و بویر احمد	۵۱°۳۳′	۳۰°۴۱′	۱۷۸۳
۳۹	D.YZ12	دیزه یزد	یزد	۵۳°۵۸′	۳۱°۲۷′	۲۳۰۰

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

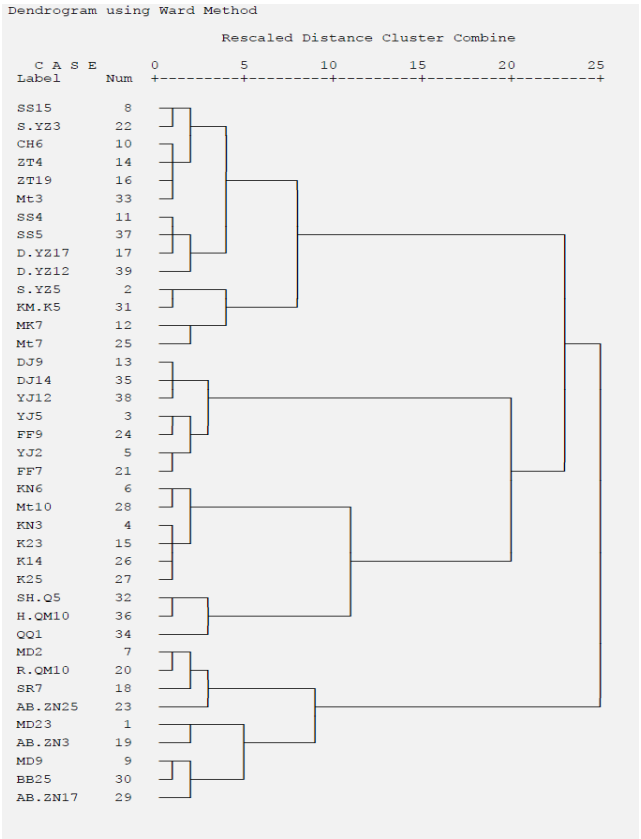
تجزیه های آماری

داده‌های مورفولوژیک با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با کمک روش وارد[1] آنالیز شد. به منظور بررسی تاثیر برخی صفات مورفولوژیک (صفات معنی‌دار) در گروه‌بندی خوشه‌ای از آنالیز تشخیص تابع (تفسیر کلاستر) با نرم افزار SAS 9.1 انجام شد. داده‌های مولکولی نیز برای هر یک از ۱۶ آغازگر به ترتیب با اعداد یک (حضور) و صفر (عدم حضور) نوارها امتیازبندی شده، در نرم افزار Excel وارد شد و سپس داده‌ها به NTedit بخش ورودی نرم افزار NTsys منتقل شد. ماتریس تشابه نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار NTsys-pc, Version 2.1 (Rohalf 2000) و توسط ضریب تشابه جاکارد[2] محاسبه شد (Sneath and Sokal 1963). دندروگرام بر اساس تجزیه خوشه‌ای حاصل از ماتریس تشابه، توسط روش UPGMA[3] ترسیم شد.

نتایج و بحث

تجزیه مورفولوژیکی

اسامی صفات مهم ارزیابی شده در این تحقیق در جدول ۲ آورده شده‌است. بر اساس تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفولوژیکی با استفاده از روش وارد، در فاصله ۲۰ نمونه‌ها به سه گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۳). با کاهش فاصله از ۲۰ به ۱۰، نمونه‌های کاکوتی به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند و از یکدیگر بیشتر تفکیک شدند. گروه اول شامل ۱۴ ژنوتیپ، شامل ۳ نمونه سنندج، ۴ نمونه یزد، دو نمونه زیاران، دو نمونه محلات از مناطق مختلف کشور و نمونه‌های چیتگر، کمال شهر و ماهدشت کرج از منطقه مرکزی بودند. در این گروه صفات مهمی چون تعداد انشعابات ساقه و تعداد گل آذین در بوته بیشترین مقدار و طول گل آذین و جام و رنگ جام کمترین مقدار را داشتند. گروه دوم از دو نمونه دشت ارژن و ۳ نمونه یاسوج و دو نمونه فراشبند تشکیل شد و صفاتی چون عرض برگ، طول جام و عرض کاسبرگ با بیشترین مقدار ونسبت طول به عرض برگ با کمترین مقدار عوامل موثر در این گروه بودند. این نمونه‌ها در استان‌های نزدیک به هم قرار داشته و یک گروه را تشکیل دادند. در گروه سوم صفات طول براکته که دارای بیشترین مقدار بود و طول ساقه و طول و عرض کاسبرگ که کمترین مقدار را داشتند، دو نمونه کلات نادری، نمونه محلات و ۳ نمونه کرمان که از نظر جغرافیایی زیاد ارتباطی با هم نداشتند را در یک گروه قرار دادند. گروه چهارم شامل دو نمونه قزوین و حسن آباد قم بودند و صفاتی چون نسبت طول به عرض برگ، طول کاسبرگ و رنگ جام با بیشترین مقادیر و صفاتی مانند تعداد انشعابات ساقه، طول برگ، طول براکته و تعداد گل آذین در بوته با کمترین مقادیر، موثر ترین صفات در گروه‌بندی این نمونه‌ها بودند. گروه پنجم از ۹ ژنوتیپ تشکیل شد که شامل نمونه‌های مشهد، نمونه‌های ابهر زنجان، نمونه سرخه حصار، رباط کریم قم و بی بی شهر بانو بود و بر اثر صفاتی همچون طول ساقه، طول برگ و طول گل آذین، این گروه از بقیه گروه‌ها تفکیک شد.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده های مورفولوژیکی روی ۳۹ ژنوتیپ کاکوتی با روش وارد (کدها طبق جدول ۱ می باشند)

[1] Ward
[2] Jaccard's similarity coefficient
[3] Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

جدول ۲ – صفات مورفولوژیکی اندازه گیری شده در گیاه کاکوتی، علائم اختصاری به کار برده شده برای صفات، واحد اندازه گیری و میانگین حداقل و حداکثر هر صفت در بین نمونه‌ها

ردیف	صفت	معادل صفات	علامت اختصاری	واحد	میانگین	حداقل	حداکثر
۱	تعداد انشعابات ساقه	Number of branches	NB	-	۲/۹۰	۱/۰۰	۹/۰۰
۲	طول شاخه	Stem length	Sh L	میلی متر	۶۷/۵۳	۲۵/۰۰	۱۴۵/۰۰
۳	طول برگ	Leaf length	LL	میلی متر	۱۳/۹۵	۸/۹۵	۲۳/۲۵
۴	عرض برگ	Leaf width	L W	میلی متر	۲/۰۸	۱/۳۰	۳/۱۰
۵	نسبت طول به عرض برگ	Length/width	L/W	نسبت	۷/۲۱	۴/۸۱	۱۰/۳۸
۶	طول براکته	Bract length	B L	میلی متر	۰/۸۸	۰/۵۰	۱/۶۰
۷	طول کاسبرگ	Calyx length	Ca L	میلی متر	۷/۴۷	۶/۱۵	۹/۲۰
۸	عرض کاسبرگ	Calyx width	Ca W	میلی متر	۱/۴۹	۱/۰۰	۲/۰۰
۹	طول جام گل	Corolla length	Co L	میلی متر	۷/۱۳	۳/۵۰	۱۱/۵۰
۱۰	رنگ کاسبرگ	Calyx color	Ca Cl	کد	۲/۶۹	۱/۰۰	۷/۰۰
۱۱	رنگ جام گل	Corolla color	Co Cl	کد	۱/۸۲	۱/۰۰	۵/۰۰
۱۲	طول گل آذین	Inflorescence length	In L	میلی متر	۴۰/۷۸	۱۸/۰۰	۹۰/۳۰
۱۳	تعداد گل آذین در بوته	Number of inflorescence per plant	NIP	-	۵/۴۱	۲/۲۵	۹/۲۰

تجزیه مولکولی

در ابتدا به انتخاب آغازگرهای مناسب از نظر تولید چند شکلی بیشتر و وضوح نوارها روی دو ژنوتیپ انتخابی پرداخته شد که در این بررسی ۱۶ آغازگر از ۱۲۰ آغازگر آزمون شده انتخاب شدند و روی همه ژنوتیپ‌ها به کار رفتند. پس از تکثیر توسط این آغازگرهای انتخابی، تعداد ۱۰۰ نوار تشکیل شده از ۱۱۰ نوار تکثیری چند شکلی نشان دادند (جدول۳). میانگین نوارهای چند شکل برای هر آغازگر ۶/۳ بود و میانگین درصد چند شکلی ۹۰/۳ درصد محاسبه شد.

بر اساس ماتریس تشابه جهت شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها در بین نمونه‌های مورد بررسی کاکوتی، میزان تشابه در دامنه‌ای از ۰/۱۹ تا ۰/۷۷ بدست آمد. بیشترین همسانی بین دو نمونه یاسوج (۰/۷۷) و کمترین همسانی بین نمونه‌ای از مشهد و نمونه اسلامیه یزد (۰/۱۹) مشاهده شد که به ترتیب حاکی از میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این نمونه‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشند. میانگین تشابه بین نمونه‌های کاکوتی ۰/۴۳ بود که تنوع ژنتیکی بالایی را در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد.

ارزیابی دندروگرام به دست آمده از ماتریس تشابه داده‌های مولکولی (شکل ۴)، گویای تنوع ژنتیکی بالا در نمونه‌های مورد بررسی است. نتایج حاصل از تجزیه دندروگرام نمونه‌های کاکوتی در سطح تشابه ۰/۴۰ تعداد ۶ گروه را از یکدیگر متمایز ساخت. گروه اول، ۳ نمونه مشهد و دو نمونه کلات نادری را تشکیل داد. گروه دوم، ۱۶ نمونه از استان های مرکزی و شمال غرب ایران را از دیگر گروه‌ها جدا نمود، که به دلیل نزدیکی جغرافیایی، قرابت-های ژنتیکی و خویشاوندی‌های احتمالی بین نمونه‌های این گروه قابل توجیه است. گروه سوم شامل دو نمونه قم و دو نمونه زیاران طالقان از استان- های شمال و مرکزی کشور بود. گروه چهارم، ۳ نمونه کرمان و ۴ نمونه یزد را در یک گروه مجزا قرار داد. گروه بعدی، دو نمونه یاسوج و فراشبند را تشکیل داد که از استان‌های نزدیک به هم (شیراز و یاسوج) جمع‌آوری شده بودند. گروه ششم مربوط به دو نمونه دشت ارژن و یاسوج و فراشبند بود که در یک منطقه جغرافیایی و در یک شاخه قرار گرفتند و از دیگر گروه‌ها تفکیک شدند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

جدول۳- اسامی و توالی آغازگر های RAPD مورد استفاده در نمونه های کاکوتی، تعداد کل نوار تکثیر شده، تعداد نوار های چند شکل و درصد چند شکلی حاصله برای هر آغازگر

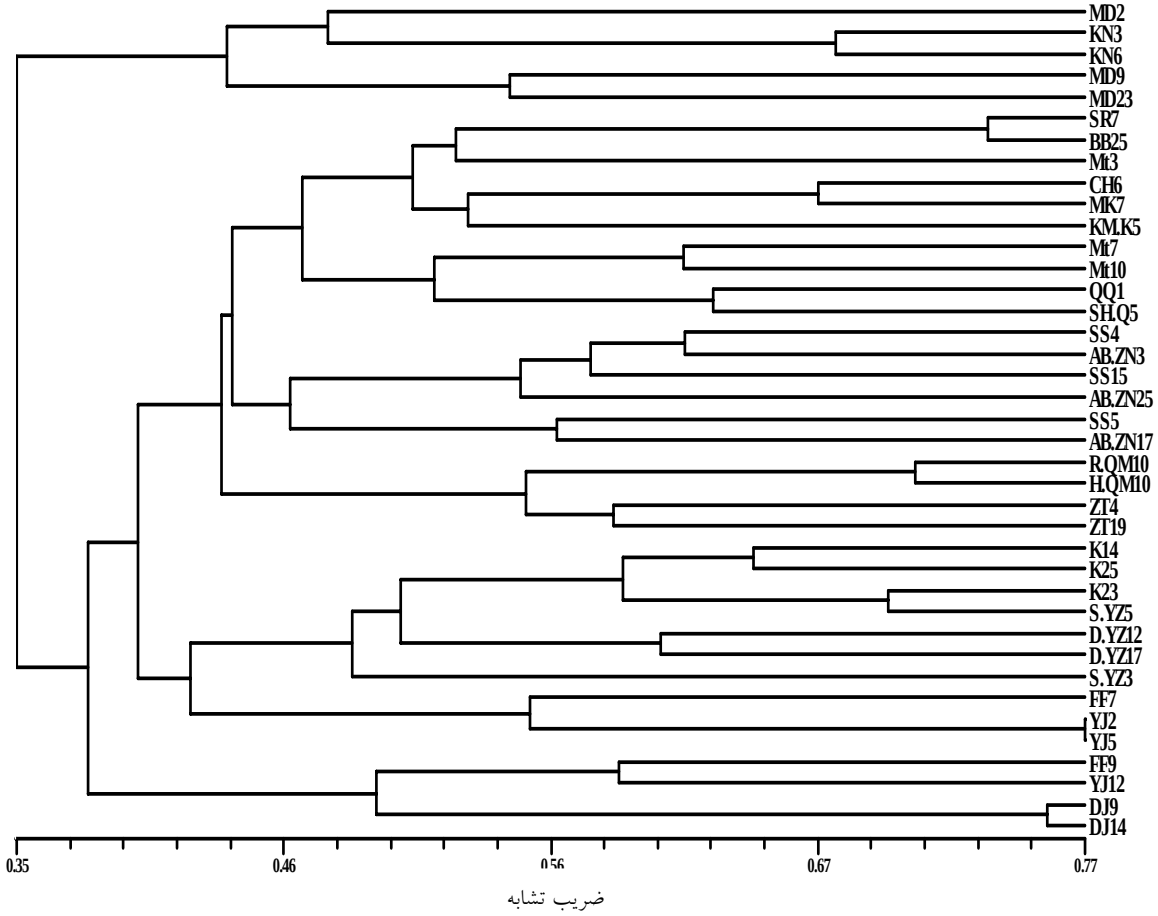
ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر ´۳→´۵	تعداد کل نوار تکثیر شده (a)	تعداد نوار چند شکل (b)	درصد چند شکلی (b/a×۱۰۰)
۱	TIBMBA-06	GGACGACCGT	۱۳	۱۲	۹۲/۳
۲	TIBMBA-18	CTCGGATGTC	۹	۶	۶۶/۷
۳	TIBMBB-07	GAAGGCTGGG	۵	۵	۱۰۰
۴	TIBMBB-12	TTCGGCCGAC	۸	۸	۱۰۰
۵	TIBMBB-13	CTTCGGTGTG	۴	۳	۷۵
۶	TIBMBC-11	TTTTGCCCCC	۴	۴	۱۰۰
۷	TIBMBC-12	CCTCCACCAG	۸	۷	۸۷/۵
۸	TIBMBD-01	TCACTCGCTC	۷	۷	۱۰۰
۹	TIBMBD-05	GTGCGGAGAG	۱۰	۱۰	۱۰۰
۱۰	TIBMBE-16	CTCCACGACT	۸	۸	۱۰۰
۱۱	OPAB-18	CTGGCGTGTC	۶	۶	۱۰۰
۱۲	OPC-07	GTCCCGACGA	۷	۷	۱۰۰
۱۳	OPD-03	GTCGCCGTCA	۵	۴	۸۰
۱۴	OPE-17	CTACTGCCGT	۶	۵	۸۳
۱۵	OPK-10	GTGCAACGTG	۵	۴	۸۰
۱۶	OPN-19	GTCCGTACTG	۵	۴	۸۰
کل	-	-	۱۱۰	۱۰۰	-
میانگین	-	-	۶/۹	۶/۳	۹۰/۳

بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک، همبستگی r=۰/۶۸ بدست آمد که نشان می دهد روش UPGMA در این مورد تا حدی روش مناسبی بوده است.

نتایج حاصل از داده‌های مولکولی نشان داد که بعضی نمونه‌های یک منطقه در کنار هم (مانند گروه پنجم و ششم) و برخی نمونه های یک منطقه جداگانه و دور از هم (مانند گروه دوم) گروه‌بندی شده‌اند، که حاکی از تنوع ژنتیکی بالایی در میان آنها می‌باشد. بخش‌هایی از دندروگرام حاصل، بیانگر آن است که تنوع ملکولی نمونه‌های کاکوتی مورد بررسی با منشا جغرافیایی آنها در برخی موارد مطابقت داشته و در بسیاری موارد مطابقت نداشته است. از دلایل این نوع گروه‌بندی در هر دو کلاستر مورفولوژیکی و مولکولی ممکن است جابجایی فیزیکی ژرم پلاسم به صورت انتقال بذور از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط افراد و یا ناشی از هتروزیگوسیتی بالا در نتیجه دگرگشنی در این گیاه باشد. در مطالعات انجام شده در گیاهان متفاوت، وجود تنوع بالا در جمعیت‌های مختلف و همچنین عدم ارتباط بین تنوع جغرافیایی و مولکولی گزارش شده است (Saber Amoli 1997).

در تجزیه خوشه‌ای بر اساس هر دو نشانگر، برخی از نمونه‌ها که از مناطق جغرافیایی نزدیک به هم جمع‌آوری شده بودند، گاه در کنار نمونه‌های دیگر قرار گرفتند که با توجه به عوامل گرده افشان

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]



شکل۴- دندروگرام مربوط به داده های حاصل از نشانگرهای RAPD مربوط به ۳۹ ژنوتیپ کاکوتی بر اساس گروه بندی UPGMA (کدها نشانگر ژنوتیپ ها طبق جدول ۱ می باشند)

همچون حشرات و تبادلات بذر بین مناطق بخصوص منطقه مرکزی ایران با سایر مناطق، قرارگیری برخی نمونه‌ها در کنار هم قابل توجیه خواهد بود (Gustave and Toderich 2003). در گروه‌بندی بر اساس داده‌های مورفولوژیک ارتباطی میان تنوع ویژگی‌های مورفولوژیکی و منطقه جغرافیایی دیده نشده است (مانند گروه اول). Kiani et al. (2008) در بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف گل محمدی (*Rosa damascena*) ارتباط گروه‌بندی جمعیت‌ها با پراکنش جغرافیایی آنهارا ضعیف گزارش نموده‌اند. همچنین Pezhmanmehr et al. (2010) با مطالعه گروه‌بندی‌های حاصل در بین جمعیت‌های زیره پارسی (*Bunium Persicum*) دریافتند که ارتباط ضعیفی بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی حاصل از مطالعات ژنتیکی وجود دارد. در مطالعه حاضر نیز طبق نتایج بدست آمده، همبستگی بین داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی معنی‌دار نبوده و مقدار آن r=۰/۰۱ شده است.

طبق مشاهدات مشابه، عدم همبستگی معنی‌دار بین داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی در برخی گیاهان علفی و دارویی گزارش شده است. Ebrahimi et al. (2008) با بررسی تنوع ژنتیکی گیاه موسیر (*Allium hirtifolium* Boiss) در مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی RAPD همبستگی معنی‌داری مشاهده

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

نکردند. Yavari et al. (2010) نیز همبستگی بین گروه‌بندی بر اساس داده‌های نشانگر RAPD روی برخی جمعیت‌های آویشن آذربایجانی(*Thymus migricus*) را با گروه‌بندی صورت گرفته بر اساس صفات مورفولوژیک بررسی کرده و عدم معنی‌داری بین آنها را گزارش نمودند. همچنین De Masi et al. (2006) در مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی RAPD روی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) همبستگی معنی‌داری مشاهده نکردند. Huff (1997) نیز عدم تطابق نتایج به دست آمده از دو نوع نشانگر مورفولوژیکی و ژنتیکی را در گونه لولیوم پرنه *Lolium perene* گزارش کرد.

بررسی‌های حاصله نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در کاکوتی وجود دارد که می‌تواند در نتیجه تنوع اقلیمی بسیار متفاوت در ایران و همچنین جریان ژنی در اثر دگرگشن بودن و تکثیر جنسی توسط بذر در این گیاه باشد. درک چنین تنوع بالایی در مدیریت و حفاظت ژرم پلاسم این گیاه مفید می‌باشد و اصلاح‌گر را در تعیین راهبردهای بهره‌برداری، اصلاح و اهلی‌سازی و کشت و کار این گیاه یاری می‌کند.

منابع

Babakhanloo P, Mirza M, Sefidkon F, Ahmadi L, Barazandeh MM, Asgari F (1998) Chemical components of essential oil of *Ziziphora tenuior*. Medical Plants Research Journal 2:115-120 (In Farsi).

De Masi L, SivieroP, Esposito C, Castaldo D, Siano F, Laratta B (2006) Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). European Food Research and Technology 223:273-281.

Ebrahimi R. and Zamani Z, Kashi A (2008) Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. Scientia Horticulturae119:345-351.

Economou KD, Oreopoulou V, Thomopoulos CD (1991) Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. Journal of the American Chemical Society 68: 109-113.

Ghahreman A (1994) Plant Systematic. Center for Academic Publication, Iran pp 238-297 (In Farsi).

Ghahreman A (1992) Colorful Flora of Iran. Publication of Research Institute of Forests and Rangelands and University of Tehran Faculty of Science (In Farsi).

Ghalichnia H (2002) Distribution and ecology of 36 species of oil producing plants in Mazandaran province. Medical Plants Research Journal 13:84-86 (In Farsi).

Gustave Gintzburger KN, Toderich N (2003) Rangelands of the Arid and Semi-arid Zones in Uzbekistan. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, CIRAD (Organization). Published by Editions Quae 206 pp.

Hadian J, Tabatabaei SMF, Naghavi MR, Jamzad Z, RamakMasoumi T (2008) Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. Scientia Horticulturae 115: 196-202.

Huff D (1997) RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Science 37: 557-564.

Kiani M, Zamani Z, Khalighi A, Fatahi R, Byrne DH (2008) Wide genetic diversity of *Rosa damascena* Mill. germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. Scientia Horticulturae 115: 386-392.

Konyalioglu S, Qzturk B, Elgin MG (2006) Comparison of chemical compositions and antioxidant activities of the essential oils of two *Ziziphora* taxa from Anatolia. Pharmaceutical Biology 44: 121-126.

Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F (2004) Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science167:725-731.

Mozaffarian VA (1996) Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Publishers. Tehran 591 pp (In Farsi).

Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H (2009) Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. Comparative Clinical Pathology 580:885-889.

Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S, Ghorbani A (2005) Labiatae family in folk medicine in Iran from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 63-79.

Ozturk S, Ercisli S (2007) Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food Control 18: 535-540.

Rechinger KH (1982) Flora desiranischen hoclandes and der umrahmenden gebirge, Akademische Drucku. Verlags Anstalt Graz Austria 150: 491-493.

Pezhanmehr M, Hassani MS, Fakhre Tabatabaie M, Hadian J (2010) Evaluation of genetic dversity and differentiation of some Bunium Persicum (Boiss) populations using RAPD markers. Environmental Sciences 7:63-76 (In Farsi).

Rohlf FJ (2000) NTsys-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publications Setauket NY.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]

Saber Amoli S (1997) Final report of collection and evaluation of medicinal plants in Kerman province. Agricultural Research Center and Natural Resources. Kerman Iran. 36-39.

Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad Ebrahimi S, Yousefzadi M (2005) Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (Boiss). Iranian Journal of Pharmaceutical Research Bulletin 28: 1892-1896 .

Satil F, Kaya A, Ozatli S, Tumen G (2005) Comparative morphological anatomical and palynological studies on *Thymus migricus* Klokov and Desj-Shost and *T. fedtschenkoi ronniger* var. handel II (Ronniger) Jalas grown in east Anatolia. Pakistan Journal of Botany 37: 531-549.

Semagn K (2002) Genetic relationships among ten endod types as revealed by a combination of morphological, RAPD and AFLP markers. Hereditas 137: 149-156.

Sharp PJ, Kreis M, Shewry PR, Gale MD (1988) Location of B-amylase sequences in wheat and its relatives. Theoretical and Applied Genetics 75: 289-290.

Sneath PHA, Sokal RR (1963) The Principles and Practice of Numerical Classification. WH Freeman, San Francisco.

Trindade H, Costa MM, Sofia BLA, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG (2008) Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, Sao Jorge and Terceira Islands (Azores). Biochemical Systematics and Ecology 36: 790-797.

Yavari A (2009) Evalution of genetic diversity among and within some populations of *Thymus migricus* Klokov and Desj.-Shost using morphological characteristics and RAPD markers. MSc Thesis Department of Horticulture Science University of Tehran Iran (in Farsi).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.3.5]