

Study of genetic diversity of some genotypes of Iranian wild mint (*Mentha longifolia* L.) using ISSR marker and its correlation with dry yield and essential oil content

Alireza Moshrefi-Araghi 

* Ph.D., Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, G.C, Mashhad, Iran. Email: moshrefi_alireza@yahoo.com

Hossein Nemati

Assistant Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, G.C, Mashhad, Iran. Email: nemati@um.ac.ir

Majid Azizi 

Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, G.C, Mashhad, Iran. Email: azizi@um.ac.ir

Nasrin Moshtaghi 

Associated Professor, Department of Plant Science and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, G.C, Mashhad, Iran. Email: moshtaghi@um.ac.ir

Mahmood Shoor 

Associated Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, G.C, Mashhad, Iran. Email: shoor@um.ac.ir

Abstract

Objective

This study aimed to investigate the genetic diversity of different genotypes of this valuable medicinal plant under the same culture condition which can be used as an introduction to domestication, germplasm conservation, and possible cross in the future.

Materials and Methods

In this study, after preparing 20 different genotypes from all over Iran, they were cultivated in complete randomized blocks design with three replications under the same

condition. After extraction of DNA, the survey of genetic diversity using 12 ISSR markers from 15 markers was conducted by polymerase chain reaction (PCR). The essential oil for each genotype was extracted by water distillation. The dry yield based on gr/m^2 and essential oil content (w/w, based on dry weight) were measured. Furthermore, the correlation of molecular markers with dry yield and essential oil content from each genotype was determined using stepwise regression.

Results

The mean percentage of polymorphism determined in all the genotypes was 91.97. The number of polymorphic bands for each primer varied from 5 to 9 and a total of 89 replicate bands were scored, of which 82 bands showed polymorphism. The average content of primer information polymorphism (PIC) was estimated to be 0.31 and the IS1 primer showed the highest PIC (0.46). The Ni and Shannon indices for IS1 primers were 0.43 and 0.61, respectively. Cluster analysis using the Jaccard similarity coefficient and UPGMA algorithm divided the studied genotypes into four groups. The highest genetic distance was observed between Khuzestan and Qazvin genotypes with a coefficient of 0.39 and the lowest between Kerman-2 and Kerman-4 genotypes with a similarity coefficient of 0.77. Stepwise regression showed that the IS10 primer has a coefficient of 0.70 with the essential oil percentage and dry matter yield.

Conclusion

The results of this study showed that ISSR markers can be effectively used to study the genetic diversity of wild mint genotypes and will provide the possibility of breeding. So that, IS1 and IS10 primers were introduced as the best markers. Also, Khuzestan and Qazvin genotypes had the highest genetic distance.

Keywords: Breeding, Genetic diversity, Marker, Wild mint.

Citation: Moshrefi-Araghi AR, Nemati H, Azizi M, Moshtaghi N, Shoor M (2020) Study of Genetic Diversity of Some Genotypes of Iranian Wild Mint (*Mentha longifolia* L.) Using ISSR Marker and Its Correlation with Dry Yield and Essential Oil Content. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (3), 117-138.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 117-138.

DOI: 10.22103/jab.2020.15177.1191

Received: July 17, 2020; Accepted: August 26, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Protection, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های پونه وحشی (*Mentha longifolia* L.) ایران با

استفاده از نشانگر ISSR و ارتباط آن با عملکرد ماده خشک و درصد اسانس

علیرضا مشرفی عراقی

* نویسنده مسئول، دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، تلفن: ۰۹۹۱۲۳۱۷۲۰۱، ایمیل: moshrefi_alireza@yahoo.com

حسین نعمتی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ایمیل: nemati@um.ac.ir

مجید عزیزی

استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ایمیل: azizi@um.ac.ir

نسرين مشتاقی

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ایمیل: moshtaghi@um.ac.ir

محمود شُور

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ایمیل: shoor@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف پونه وحشی در شرایط کشت یکسان است که می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای بر اهلی‌سازی، حفظ ژرم‌پلاسما و امکان تلاقی بین ژنوتیپ‌های آن جهت برنامه‌های به‌نژادی آینده باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پس از تهیه ۲۰ ژنوتیپ مختلف از سراسر ایران، کشت آن‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار تحت شرایط یکسان انجام شد. پس از استخراج DNA بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ۱۲ نشانگر ISSR از بین ۱۵ نشانگر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت. استخراج اسانس برای هر ژنوتیپ به روش تقطیر با آب انجام شد. عملکرد ماده خشک برحسب گرم بر متر مربع و میزان اسانس به‌صورت وزنی-وزنی، براساس وزن خشک اندازه‌گیری شد. همچنین، ارتباط نشانگرهای مولکولی با صفات عملکرد ماده خشک و بازده اسانس با استفاده از رگرسیون گام به گام تعیین گردید.

نتایج: میانگین درصد چندشکلی تعیین شده در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۹۱/۹۷ بود. تعداد باندهای چندشکل هر آغازگر از ۵ تا ۹ عدد متغیر بود و در مجموع ۸۹ باند تکثیری امتیازدهی شدند که از این تعداد ۸۲ مکان، چندشکلی نشان دادند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC) ۰/۳۱ برآورد گردید و آغازگر IS1 بالاترین مقدار PIC (۰/۴۶) را نشان داد.

همچنین شاخص نی و شانون برای آغازگر IS1 به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۶۱ بود. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در چهار گروه قرار داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های خوزستان و قزوین با ضریب ۰/۳۹ و کمترین فاصله بین ژنوتیپ‌های کرمان-۲ و کرمان-۴ با ضریب تشابه ۰/۷۷ مشاهده شد. رگرسیون گام به گام نشان داد که نشانگر IS10 با ضریب تبیین حدود ۰/۷۰ بیشترین همبستگی را با صفات درصد اسانس و عملکرد ماده خشک دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR به‌طور مؤثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های پونه وحشی استفاده شوند. آغازگرهای IS1 و IS10 با داشتن بهترین شاخص‌های نشانگری به‌عنوان بهترین آغازگرها معرفی شدند. همچنین دو ژنوتیپ خوزستان و قزوین بیشترین فاصله ژنتیکی را داشتند.

واژه‌های کلیدی: به‌نژادی، تنوع ژنتیکی، پونه‌وحشی، نشانگر.

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار ارزشمند و متنوع در منابع طبیعی ایران هستند که تاکنون در مورد تنوع و پراکنش آن‌ها، ویژگی اکولوژیکی، شناسایی مواد مؤثره، اهلی‌سازی و به‌نژادی جمعیت‌های آن‌ها مطالعات زیادی صورت گرفته است (Heydari et al. 2019). خانواده نعناعیان (Lamiaceae) دارای طیف گسترده‌ای از گیاهان بوده، به‌طوری که چندین گونه از جنس نعناع (*Mentha*) در ایران شناسایی شده است. پونه وحشی با نام علمی *Mentha longifolia* L. یکی از گونه‌های بسیار ارزشمند، چندساله، معطر و پررشد جنس نعناع است. این گونه به‌طور عمده به‌عنوان گیاهی دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tucker & Naczi 2007). پونه وحشی برای قرن‌های متمادی به‌عنوان یک گیاه مفید برای سیستم ایمنی بدن انسان و پیشگیری و درمان عفونت‌های ثانویه در طب سنتی مورد استفاده بوده است (Okut et al. 2017). از آنجایی که گیاهان دارویی منابع گوناگونی از متابولیت‌های ثانویه هستند و برخی از آن‌ها می‌توانند مقاومت بالایی به تنش‌های غیرزنده مثل خشکی، شوری و خاک‌های آهکی داشته باشند، حفاظت از ژرمپلاسم آن‌ها در زیستگاه طبیعی خود اهمیت ویژه‌ای دارد (Moshrefi-Araghi et al. 2018). جمع‌آوری ژرمپلاسم گیاهی و ارزیابی تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند اولین قدم در برنامه‌های به‌نژادی باشد. گزینش ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ عملکرد زیستی و سایر صفات مطلوب نیاز به ابزاری کارآمد جهت استفاده به‌نژادگران گیاهی دارد (Mirzaie-Nodoushan et al. 2001). در این راستا، به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی اهمیت بسزایی را در بررسی تنوع ژنتیکی و انتخاب ژنوتیپ برتر دارد (Shokrpour et al. 2008).

از بین نشانگرهای مولکولی معمول مبتنی بر PCR، نشانگر بین ریزماهورهای (ISSR) به‌طور وسیعی در مطالعات تنوع ژنتیکی به‌کار می‌رود. استفاده از نشانگر ISSR به‌عنوان یک تکنیک حدواسط در بین نشانگرهای مولکولی RAPD، SSR و

AFLP مطرح شده است. این تکنیک جزء نشانگرهای غالب بوده و نیازی به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم ندارد. همچنین قابلیت تکرارپذیری، پایداری و تنوع‌پذیری بالایی دارد که دلیل آن طول‌تر بودن آغازگرها و بالا بودن دمای اتصال است. هزینه این روش نسبت به روش‌هایی نظیر SSR و AFLP پایین‌تر و اجرای آن نیز سریع‌تر و آسان‌تر است (Aga et al. 2005). میزان درصد چندشکلی در نشانگر ISSR بسیار بالا و برای مطالعات تنوع ژنتیکی بسیار کارآمد است (Reddy et al. 2004). رحیم ملک به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، ۱۶ نمونه از سه گونه *M. longifolia*، *M. spicata* و *M. piperita* را با استفاده از ۱۲ نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار داد. در مجموع ۱۵۵ باند تشکیل شد که ۱۴۶ باند آن دارای چندشکلی و میانگین درصد چندشکلی ۹۴/۱۹ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در دو گروه کلی دسته‌بندی کرد (Rahimmalek 2011). همچنین، در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ مربوط به سه گونه *M. longifolia*، *M. spicata* و *M. pulegium* از ۱۰ آغازگر استفاده شد. نتایج نشان داد که میانگین درصد چندشکلی ۹۴/۷۰ درصد و ضریب تشابه جاکارد پایین (۰/۱۷ تا ۰/۵۶) بود. در این مطالعه، ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند و بیشترین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در *M. longifolia* بود (Zinodini et al. 2014). از آنجایی که پونه وحشی پراکنش وسیعی در ایران داشته که نشان از سازگاری بالای آن در اغلب شرایط آب و هوایی ایران می‌باشد، لذا به‌نظر می‌رسد که با شناخت بیشتر تنوع ژنتیکی و نیز به کمک فرآیند اهلی‌سازی آن بتوان از انقراض این گونه دارویی ارزشمند جلوگیری کرده و همچنین زمینه کشت و کار و اشتغال‌زایی را فراهم آورد. تاکنون مطالعات اندکی برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR و شناسایی مناطق پراکنش پونه وحشی در ایران صورت گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی خویشاوندی ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف این گونه دارویی ارزشمند در شرایط کشت یکسان است که می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای بر اهلی‌سازی، حفظ ژرم‌پلاسما و امکان تلاقی بین ژنوتیپ‌های آن جهت برنامه‌های به‌نژادی آینده باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ مختلف پونه وحشی از سراسر ایران در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در طی سال ۹۵-۹۶ انجام گرفت. بذره‌های مورد مطالعه پونه وحشی از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱. مکان جغرافیایی و شرایط اقلیمی فصل تابستان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پونه وحشی

Table 1. Geographic location and summer climatic conditions of the studied *M. longifolia* genotypes

اقلیم Climate	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude	شهرستان County	استان Province	ژنوتیپ Genotype	شماره No.
نیمه خشک Semi-arid	48°07'05"	38°39'21"	1472	رضی Razi	اردبیل Ardabil	Ard	1
نیمه خشک Semi-arid	56°42'44"	29°28'06"	2972	جیرفت Jiroft	کرمان Kerman	Ker-1	2
مرطوب Wet	47°59'00"	33°31'00"	1043	خرم آباد Khoramabad	لرستان Lorestan	Lor	3
خیلی مرطوب Very wet	50°28'14"	32°21'16"	2533	شهرکرد Shahrekord	چهارمحال بختیاری Chaharmahal and bakhtiari	Cha-1	4
خشک Arid	54°13'00"	31°35'00"	1914	مهریز Mehriz	یزد Yazd	Yaz-1	5
نیمه خشک Semi-arid	57°13'07"	29°23'39"	3240	رابر Rabar	کرمان Kerman	Ker-2	6
مرطوب Wet	51°21'15"	35°58'17"	2170	کرج Karaj	البرز Alborz	Alb	7
مدیترانه‌ای Mediterranean	44°34'40"	37°07'08"	1824	سلماس Salmas	آذربایجان غربی W. Azarbaijan	Waz	8
نیمه خشک Semi-wet	50°24'29"	36°28'49"	1650	قزوین Ghazvin	قزوین Ghazvin	Gha	9
نیمه خشک Semi-arid	57°40'38"	37°06'52"	1689	اسفراین Esfaen	خراسان شمالی N. Khorasan	NKh-1	10
خشک Arid	54°07'35"	31°35'32"	2538	تفت Taft	یزد Yazd	Yaz-2	11
نیمه خشک Semi-arid	56°53'58"	37°28'01"	1653	مانه و سملقان Mane and semelghan	خراسان شمالی N. Khorasan	NKh-2	12
خشک Arid	56°01'28"	28°03'05"	1270	بندرعباس Bandarabas	هرمزگان Hormozgan	Hor	13
خیلی مرطوب Very-wet	49°24'58"	36°55'15"	1348	رودبار Rudbar	گیلان Guilan	Gui	14
خشک Arid	56°36'30"	30°29'30"	1900	رفسنجان Rafsanjan	کرمان Kerman	Ker-3	15
خشک Arid	48°50'33"	32°08'38"	61	شوشتر Shoushtar	خوزستان Khuzestan	Khu	16
خشک Arid	58°47'07"	35°89'31"	1959	بیرجند Birjand	خراسان جنوبی S. Khorasan	SKh	17
نیمه خشک Semi-arid	58°10'26"	37°17'03"	1153	فاروج Farouj	خراسان شمالی N. Khorasan	NKh-3	18
خیلی مرطوب Very wet	50°57'57"	31°52'37"	2447	بروجن Broujen	چهارمحال بختیاری Chaharmahal and bakhtiari	Cha-2	19
مدیترانه‌ای Mediterranean	57°14'31"	29°30'06"	3415	بردسیر Bardsir	کرمان Kerman	Ker-4	20

ابتدا بذره‌های مورد مطالعه در نیمه فروردین درون فضای گلخانه در سینی‌های کشت در بستر کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی-حجمی (۱:۵) کاشته شده و تحت شرایط مه‌پاشی ممتد با آب و زیر پوشش پلاستیک در دمای 25 ± 5 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس در نیمه خرداد در مرحله ۴ تا ۶ برگه، ۴۵ نشاء یکنواخت از هر جمعیت با فاصله ۲۰ سانتی‌متر به کرت‌هایی با ابعاد ۱/۵ در ۳ متر و ۵۰ سانتی‌متر فاصله بین ردیف‌ها در سه تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی منتقل شدند. جهت مقایسه این جمعیت‌ها مستقل از عوامل محیطی، تمام گیاهان تا مرحله گلدهی در شرایط اقلیمی و خاکی یکسان در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد (مختصات: عرض جغرافیایی $36^{\circ} 15'$ شمالی و طول جغرافیایی $59^{\circ} 38'$ شرقی و ارتفاع ۹۸۵ متر از سطح دریا) رشد کردند. نمای کلی از پراکندگی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه روی نقشه آورده شده است. جمع‌آوری نمونه گیاهی در نیمه مهر ماه سال دوم کشت پس از حذف ۰/۵ متر از هر طرف کرت انجام گرفت. به‌منظور اندازه‌گیری عملکرد ماده خشک (برحسب گرم بر ماده خشک) و نیز تعیین میزان اسانس (به‌صورت وزنی-وزنی، براساس ماده خشک)، اندام هوایی برداشت شده از هر ژنوتیپ بلافاصله در سایه و در دمای اتاق خشک شد. اسانس هر ژنوتیپ (۳۰ گرم در سه تکرار) به‌مدت سه ساعت با استفاده از دستگاه کلونجر و روش توصیه شده در فارماکوپه بریتانیا (Commission 1993)، استخراج گردید.

استخراج DNA از ۳۰ میلی‌گرم برگ‌های جوان برای هر ژنوتیپ، به روش CTAB تغییر یافته (Doyle & Doyle 1990) در سه تکرار انجام شد. نمونه‌های پودر شده با ازت مایع به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و ۹۵۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB سه درصد (w/v)، Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸، کلرید سدیم ۱/۴ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار با pH=۸، بتامرکاپتواتانول یک درصد (v/v)، pvp ۲ درصد (w/v)) به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به میزان ۱۷۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به آن‌ها اضافه گردید. در ادامه ۵۰۰-۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه شد. پس از حذف مایع رویی و خشک شدن رسوب حاصله، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل به میکروتیوب‌ها افزوده شد. در نهایت، نمونه‌ها به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA بدست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. رقیق‌سازی (۵۰ میکروگرم بر لیتر) لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. در این مطالعه، برای تکثیر DNA ژنومی از تعداد ۱۵ آغازگر ISSR ساخت شرکت دناریست آسیا استفاده شد. پس از بررسی اولیه محصولات آغازگرها از نظر تکرارپذیری و چندشکلی، از بین آن‌ها ۱۲ آغازگر با بهترین وضوح بانندی و قابلیت شماره‌گذاری انتخاب شدند)

جدول ۲. جهت مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر وزنی مولکولی با اندازه قطعات ۱۰۰-۳۰۰۰ جفت‌باز

استفاده شد.

جدول ۲. توالی نوکلئوتیدی و کد آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Nucleotide sequence and coding of ISSR primers used in this study

منبع Source	توالی آغازگر Sequence of primer	دمای اتصال (°C) Annealing temp.	نام آغازگر Primer
(Smolik et al. 2007)	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	52.4	IS1
(Rodrigues et al. 2013)	5'- AGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	53.9	IS2
(Meimberg et al. 2006)	5'-CTCTCT CTCTCTCTCTG-3'	52.4	IS3
(Zinodini et al. 2014)	5'-GAGAGAGAGAGAGAGARC- 3'	53.9	IS4
(Zinodini et al. 2014)	5'-ACACACACACACACACC-3'	52.4	IS5
(Rodrigues et al. 2013)	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'	53.9	IS6
(Rodrigues et al. 2013)	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT- 3'	51.6	IS7
Rostami-Ahmadvandi et al.) (2013)	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	48.2	IS8
(Rodrigues et al. 2013)	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGYC-3'	53.9	IS9
(Zinodini et al. 2014)	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	53.9	IS10
(Rodrigues et al. 2013)	5'-CACACACACACACACARG - 3'	53.9	IS11
(Rodrigues et al. 2013)	5'-GACACGACACGACAC-3'	48.9	IS12
(Meimberg et al. 2006)	5'-ACACACACACACACACG-3'	52.4	IS13
(Rahimmalek et al. 2012)	5'-ACACACACACACACACYG- 3'	53.9	IS14
(Rodrigues et al. 2013)	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	50.0	IS15

در توالی آغازگرها حروف R= بازهای پورینی و Y= بازهای پیریمیدینی

In the primer sequence the letters R = purine bases and Y = pyrimidine bases

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مخلوط ۱۵ میکرولیتری شامل ۷/۵ میکرولیتر کیت آماده آمپلیکون (dNTPs، PCR buffer، Taq DNA Polymerase و MgCl₂)، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر و ۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر آماده شد. سپس نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ کوتاه به خوبی مخلوط شدند. چرخه حرارتی PCR توسط ترموسایکلر مدل بیواستپ آلمان^۱ با برنامه زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه DNAی ژنومی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل ۵۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای

۱. Flex Cycler (Biostep-Germany)

واسرشت‌سازی، ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگر به DNA واسرشت شده (در دمای ۵۴-۴۸ درجه سانتی‌گراد)، ۲/۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش رشته DNA جدید و ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش نهایی بود. محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و با نمایشگر سبز DNA رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از دستگاه Gel Doc عکس‌برداری شد. تصاویر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و باندها براساس همدیفی به صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند) امتیازدهی شدند. برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، اعداد سطر به باندها و اعداد ستون به ژنوتیپ‌ها اختصاص یافت. در پژوهش حاضر، جهت محاسبه درصد چندشکلی تعداد نوارهای چندشکل بر تعداد کل نوارها تقسیم شد. میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC) از طریق معادله نشانگرهای نوع غالب $PIC=1-\sum p_i^2$ (p برابر با فراوانی الل نام هر جایگاه ژنی برای ژنوتیپ‌ها است) محاسبه گردید. شاخص نشانگر (MI) از حاصل ضرب تعداد نوارهای چندشکل در شاخص محتوای چندشکلی و شاخص EMR نیز از ضرب درصد چندشکلی در تعداد نوارهای چندشکل بدست آمد (Powell et al. 1996). جهت محاسبه شاخص تنوع ژنتیکی شانون و نی و تعداد الل‌های مشاهده شده از نرم‌افزار popgene 1.32 استفاده شد. همچنین، فاصله ژنوتیپ‌ها توسط روش نی انجام شد (Nei 1972). همچنین، جهت ارزیابی آغازگرها، میزان تنوع بین ژنوتیپ‌ها، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و رسم نمودار خوشه‌ای و دو بعدی براساس مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCoA) از نرم‌افزار NTSYSpc2.02 استفاده شد. به منظور تشخیص بهترین روش محاسبه ضریب شباهت و خوشه‌بندی نمونه‌ها، ضریب کوفنتیک برای هر روش ترکیبی محاسبه شد. ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها (UPGMA) انجام و دندروگرام رسم شد (Rohlf 2000).

نتایج و بحث

بین آغازگرها ۱۲ آغازگر دارای باندهای واضح و قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای منتخب توانستند در مجموع ۸۹ باند ایجاد نمایند. از این تعداد، ۸۲ باند چندشکل (۹۱/۹۷ درصد) بودند. تعداد باندهای چندشکل هر آغازگر از ۵ تا ۹ متغیر بود. بیشترین تعداد مکان ژنی یا قطعه تکثیر یافته با ۱۰ باند توسط آغازگر IS2 و کمترین تعداد مکان ژنی با ۵ باند توسط آغازگرهای IS15 به دست آمد. همچنین آغازگرهای IS1، IS2 و IS10 بیشترین تعداد مکان ژنی چندشکل با ۹ باند را داشتند و آغازگرهای IS7، IS11 و IS15 کمترین تعداد مکان ژنی با ۵ باند را تولید کردند. بنابراین، میزان باندهای چندشکل در برخی آغازگرها بالا بود. میانگین تعداد کل باندهای مشاهده شده به ازای هر آغازگر ۷/۴۲ و میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر آغازگر ۶/۸۳ بود. باندهای تک‌شکل در آغازگرهای IS2، IS3، IS5، IS6، IS7 و IS11 به دست آمد. بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰ درصد) با استفاده از آغازگرهای IS1، IS8، IS9، IS10، IS13 و IS15 و کمترین درصد چندشکلی (۷۱/۴۳ درصد) توسط آغازگر IS7 به دست آمد.

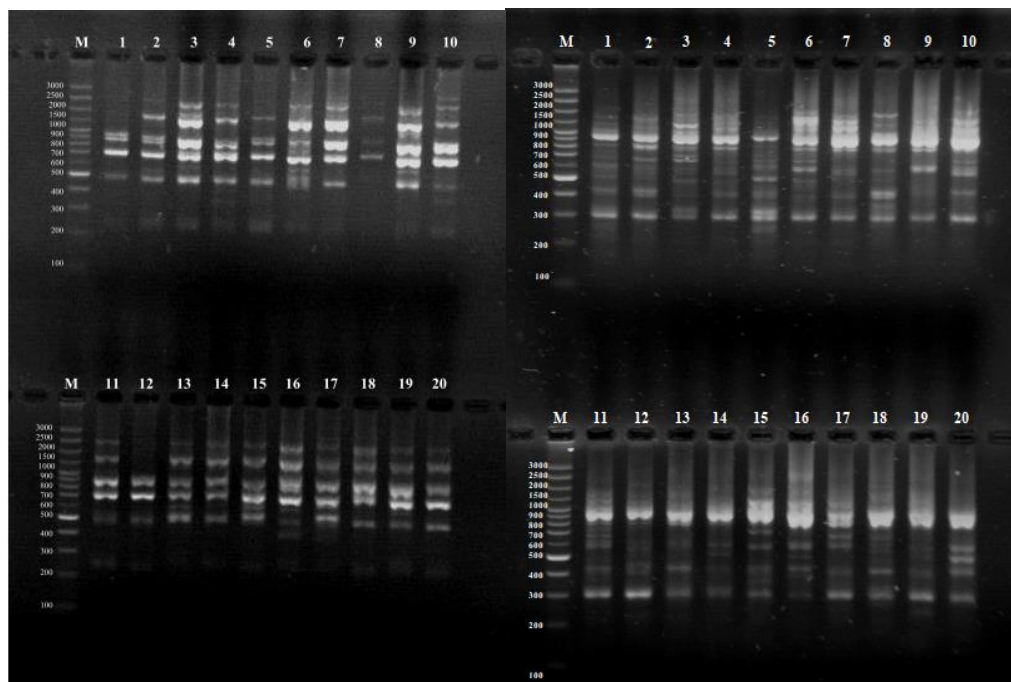
جدول ۳). در بررسی تنوع ژنتیکی نعنای (*Mentha spicata*) با استفاده از نشانگر RAPD، دامنه تعداد باندهای چندشکل را بین ۱۹ تا ۳۷ و درصد چندشکلی را بین ۱۶ تا ۲۹ درصد گزارش نمودند (Al-Rawashdeh 2011). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فراوانی اللی برای هر آغازگر به طور جداگانه محاسبه گردید که با متوسط ۰/۳۱ بین ۰/۱۶ تا ۰/۴۶ متغیر بود. بالاترین مقدار PIC به ترتیب مربوط به آغازگرهای IS1 و IS10 کمترین مقدار PIC به ترتیب متعلق به آغازگرهای IS7 و IS3 بود. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از معیارهای مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از لحاظ قدرت تمایز آنها است. مقدار بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تمایز و تفکیک ژنوتیپها نقش زیادی دارد. از این رو، نشانگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپهای با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Santhosh et al. 2009). بنابراین، آغازگر IS1 با داشتن بالاترین PIC، بهتر از سایر آغازگرها توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپها را مشخص کند و می توان از آن برای تجزیه مجموعه ژرمپلاسم دیگر ژنوتیپهای پونه وحشی در تحقیقات بعدی استفاده نمود.

از طرف دیگر، آغازگر IS7 با کمترین میزان شاخص PIC توانایی قابل قبولی در جداسازی ژنوتیپها نداشت. در پژوهشی به منظور ارزیابی تنوع در اکوتیپهای پونه وحشی از ۱۵ آغازگر RAPD استفاده شد، بیشترین درصد چند شکلی توسط آغازگرهای مورد استفاده ۱۰۰ درصد و کمترین ۸۳/۳۳ درصد گزارش شد. همچنین، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده از ۰/۱۵۸ تا ۰/۲۹۷ متغیر بود (Hassanpor Reihani et al. 2018). در بین سایر شاخصهای مولکولی مورد بررسی در پژوهش حاضر، شاخص نشانگری (MI) به عنوان یک معیار کارایی در تعیین چندشکلی که پتانسیل هر نشانگر را در تولید نوار بیشتر نشان می دهد، محاسبه شد (Powell et al. 1996). در مطالعه حاضر، محدوده شاخص نشانگر (MI) بین ۰/۵۷ تا ۴/۱۴ قرار داشت که کمترین و بیشترین این شاخص به ترتیب متعلق به آغازگرهای IS7 و IS1 بود. محدوده شاخص EMR^۲ نیز بین ۳/۵۷ تا ۹ متغیر بود که کمترین و بیشترین این مقدار را آغازگرهای IS7 و IS1 داشتند. به طور کلی، دو آغازگر IS1 و IS10 با داشتن بیشترین شاخصهای نشانگری به عنوان آغازگرهای مناسبتری جهت بررسی تنوع ژنتیکی پونه وحشی در این تحقیق معرفی می شوند)

جدول ۳). به علاوه، اندازه باندهای تشکیل شده توسط آغازگرهای مورد مطالعه در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. به عنوان نمونه الگوی باندهای DNAهای تکثیر شده از ۲۰ ژنوتیپ پونه وحشی توسط آغازگرهای IS3 و IS7 در شکل ۱ نشان داده شده است.

به منظور ارزیابی آغازگرها، از شاخصهای تعداد الیهای مشاهده شده، تعداد الیهای مؤثر، شاخص تنوع شانون و درصد باندهای چندشکل استفاده گردید. میزان فاصله ژنتیکی و تشابه بین ژنوتیپها با استفاده از شاخص نی و ضریب تشابه جاکارد (Nei 1972) به دست آمد. براساس نتایج به دست آمده، بیشترین تعداد الیهای مشاهده شده و تعداد الی مؤثر به ترتیب با ۱۹ و

۱. Polymorphic Information Content
۲. Marker Index
۳. Effective Multiplex Ration



شکل ۱. الگوی بانندی حاصل از تکثیر نتایج DNA ژنومی ژنوتیپ‌های مختلف پونه وحشی توسط آغازگر IS3 (چپ) و IS7 (راست)

Figure 2. Banding pattern resulting from genomic DNA replication of different wild mint genotypes by IS3 (left) and IS7 (right) primers

جدول ۳. شاخص‌های تنوع مولکولی اندازه‌گیری شده در آغازگرهای ISSR

Table 3. Molecular diversity indexes measured in ISSR primers

نسبت چندگانه مؤثر (EMR)	شاخص نشانگر (MI)	محتوای پلی مورفیک (PIC)	درصد چندشکلی (Polymorphic Percentage)	تعداد باندهای چندشکل (Polymorphic Band Num.)	تعداد کل باندهای مشاهده شده (Total Band Num.)	حداقل اندازه باند (Min Band Size) (bp)	حداکثر اندازه باند (Max Band Size) (bp)	نام آغازگر (Primer Name)	ردیف No.
9	4.14	0.46	100	9	9	250	2500	IS1	1
8.1	2.92	0.36	90	9	10	200	2000	IS2	2
5.14	1.08	0.21	85.71	6	7	250	2000	IS3	3
5.14	1.29	0.25	85.71	6	7	250	2500	IS5	4
6.13	2.02	0.33	87.5	7	8	200	1000	IS6	5
3.57	0.57	0.16	71.43	5	7	300	1500	IS7	6
6	1.5	0.25	100	6	6	500	1500	IS8	7
7	2.24	0.32	100	7	7	400	2000	IS9	8
9	3.96	0.44	100	9	9	400	3000	IS10	9
4.17	1.63	0.39	83.33	5	6	500	2500	IS11	10
8	1.92	0.24	100	8	8	400	2000	IS13	11

5	1.25	0.25	100	5	5	500	2500	IS15	12
6.35	2.04	0.31	91.97	6.83	7.42	345	2083	میانگین Average	

تعداد الل‌های مشاهده شده به شدت تحت تأثیر اندازه نمونه است. در این پژوهش آغازگر IS1 با بیشترین نسبت تعداد الل‌های مؤثر (Ne) به تعداد الل‌های مشاهده شده (Na) برابر با ۰/۸۹ یکنواخت‌ترین نشانگر شناخته شد. کلیه محاسبات نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پونه وحشی در تعادل هاردی-واینبرگ هستند. براساس شاخص شانون و نی به دست آمده، آغازگر IS1 دارای بیشترین تنوع و آغازگر IS3 و IS7 دارای کمترین تنوع بود. بنابراین، آغازگر IS3 و IS7 از لحاظ شاخص شانون و نی سهم کمتری در تمایز ژنوتیپ‌ها از یکدیگر داشتند. سایر آغازگرها از لحاظ این شاخص‌ها دارای مقادیر متوسط و تقریباً برابر بودند. نتایج درصد باندهای چندشکل نیز وجود کمترین تنوع را در آغازگرهای IS3 و IS7 نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴. ارزیابی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پونه وحشی براساس شاخص‌های تنوع

Table 4. Evaluation of wild mint genotypes Variation based on diversity indices

شاخص شانون Shannon's index	شاخص نی Nei's index	Ne/Na	تعداد الل مؤثر (Ne) Number of effective allele	تعداد الل مشاهده شده (Na) Number of observed allele	آغازگر Primer
0.61	0.43	0.89	16.04	18	IS1
0.53	0.36	0.86	16.38	19	IS2
0.42	0.28	0.79	10.32	13	IS3
0.44	0.3	0.81	10.57	13	IS5
0.51	0.36	0.87	13.11	15	IS6
0.36	0.24	0.8	9.6	12	IS7
0.53	0.35	0.8	9.54	12	IS8
0.58	0.4	0.85	11.92	14	IS9
0.61	0.42	0.88	15.84	18	IS10
0.48	0.33	0.85	9.39	11	IS11
0.47	0.31	0.76	12.17	16	IS13
0.48	0.32	0.79	7.86	10	IS15
0.51	0.34	0.83	11.90	14.25	میانگین Mean
0.21	0.16	0.04	2.89	2.95	انحراف معیار Standard Deviation

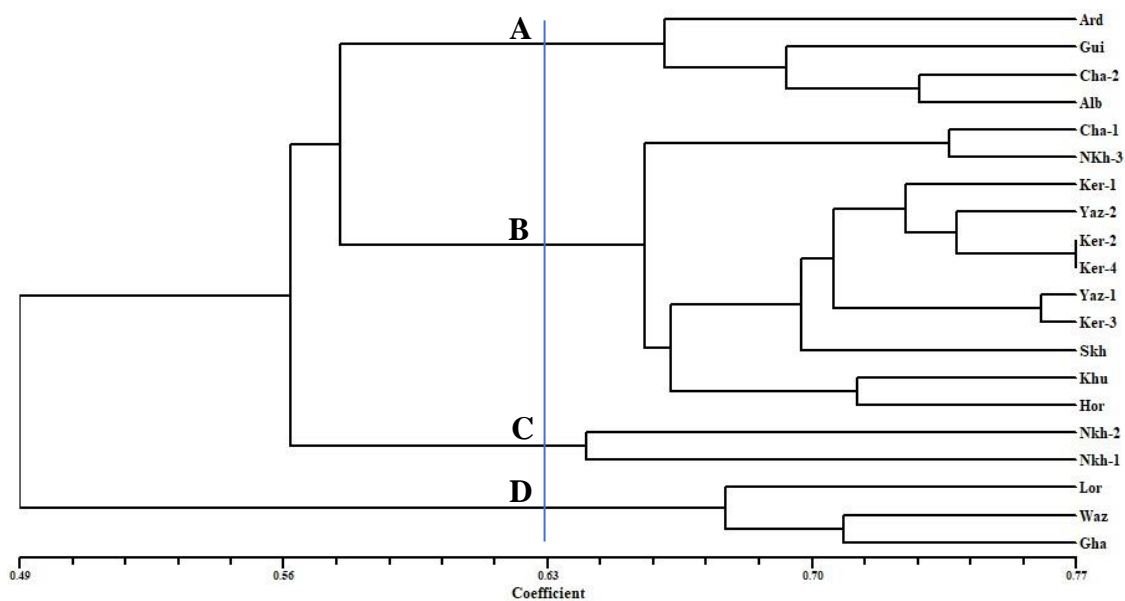
آزمون منتل برای ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس نشان داد که ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA با همبستگی $r=0/89$ به عنوان مناسب‌ترین ضریب تشابه و روش خوشه‌بندی است. با توجه به نتایج به دست آمده براساس ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌های کرمان-۲ و کرمان-۴ با مقدار ۰/۷۷ بیشترین ضریب و ژنوتیپ‌های خوزستان و قزوین با ۰/۳۹ کمترین ضریب تشابه جاکارد را داشتند. میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۵۸ بود. پایین بودن تشابه ژنتیکی و بالا بودن دامنه فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده تنوع بالای ژنوتیپ‌های پونه وحشی ایران می‌باشد. یکی از معیارهای گزینش والدین برای

بهره‌مندی از پدیده هتروزیس در تلاقی گیاهان دگرگشن، فاصله ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. با توجه به مقادیر تشابه بین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین تشابه را دارند، می‌توانند به‌عنوان والدین بالقوه در تولید ارقام هیبرید استفاده شوند (Khorshidi et al. 2018). با در نظر گرفتن خط برش دندروگرام در فاصله ژنتیکی محدوده ۶۳ درصد، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به چهار گروه اصلی تقسیم شدند (

شکل ۲). چهار ژنوتیپ (اردبیل، گیلان، چهارمحال بختیاری-۲ و البرز) با پراکنش شمال و غرب ایران در گروه اول قرار گرفتند. در دسته اول میانگین درصد اسانس ۱/۴ درصد و میانگین عملکرد خشک ۵۷۶/۹۵ گرم بر متر مربع بود. گروه دوم ۱۱ ژنوتیپ (چهارمحال بختیاری-۱، خراسان شمالی-۳، کرمان-۱، یزد-۲، کرمان-۲، کرمان-۴، یزد-۱، کرمان-۳، خراسان جنوبی، خوزستان و هرمزگان) را دربرگرفت. در این گروه میانگین درصد اسانس و عملکرد ماده خشک به ترتیب ۲/۲ درصد و ۶۷۶/۲۵ گرم بر متر مربع اندازه‌گیری شد. گروه دوم به سه زیر گروه تقسیم شد که نشان‌دهنده تنوع بالا در بین ژنوتیپ‌های این گروه بود. گروه سوم شامل دو ژنوتیپ (خراسان شمالی-۱ و خراسان شمالی-۲) بود. میانگین میزان اسانس و عملکرد ماده خشک در گروه دوم به ترتیب ۲/۲۸ درصد و ۶۸۱/۱ گرم بر متر مربع بود. در گروه چهارم نیز سه ژنوتیپ (لرستان، آذربایجان غربی و قزوین) قرار گرفتند. در گروه چهارم میانگین درصد اسانس ۲/۸۸ درصد و میانگین عملکرد ماده خشک ۷۹۴/۱۶ گرم بر متر مربع ارزیابی شد. نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که در برخی موارد بین تنوع مولکولی و پراکنش جغرافیایی مطابقتی وجود نداشت. به‌طوری که، ژنوتیپ‌هایی که در مناطق مجاور هم قرار داشتند، در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند (ژنوتیپ‌های چهارمحال بختیاری-۱ و چهارمحال بختیاری-۲) و با ژنوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی دور با هم در یک گروه دسته‌بندی شده‌اند (هرمزگان و خوزستان). این امر بیانگر تفاوت ژنتیکی بالای این ژنوتیپ‌ها می‌باشد که می‌تواند به دلیل تشابه شرایط اقلیمی زادگاه اصلی یا تبادل فیزیکی مواد گیاهی بین این مناطق باشد (Nybom & Bartish 2000). اگر چه نوع گرده‌افشانی نقش مهمی در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی دارد، شرایط درونی و بیرونی گوناگون دیگری نیز مانند دوره رویشی (یک‌ساله و چندساله بودن)، شرایط اقلیمی و تنش‌های محیطی مانند تنش‌های غیرزیستی، خاک و اقلیم می‌توانند روی ساختار، تنوع و شباهت ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی اثر بگذارند (Moshrefi-Araghi et al. 2019). انتخاب طبیعی سبب می‌شود جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اقلیمی مشابه ولی در نقاط جغرافیایی مختلف رشد می‌کنند در مقایسه با جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اقلیمی متفاوت رشد می‌کنند، شباهت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (Volis et al. 2001).

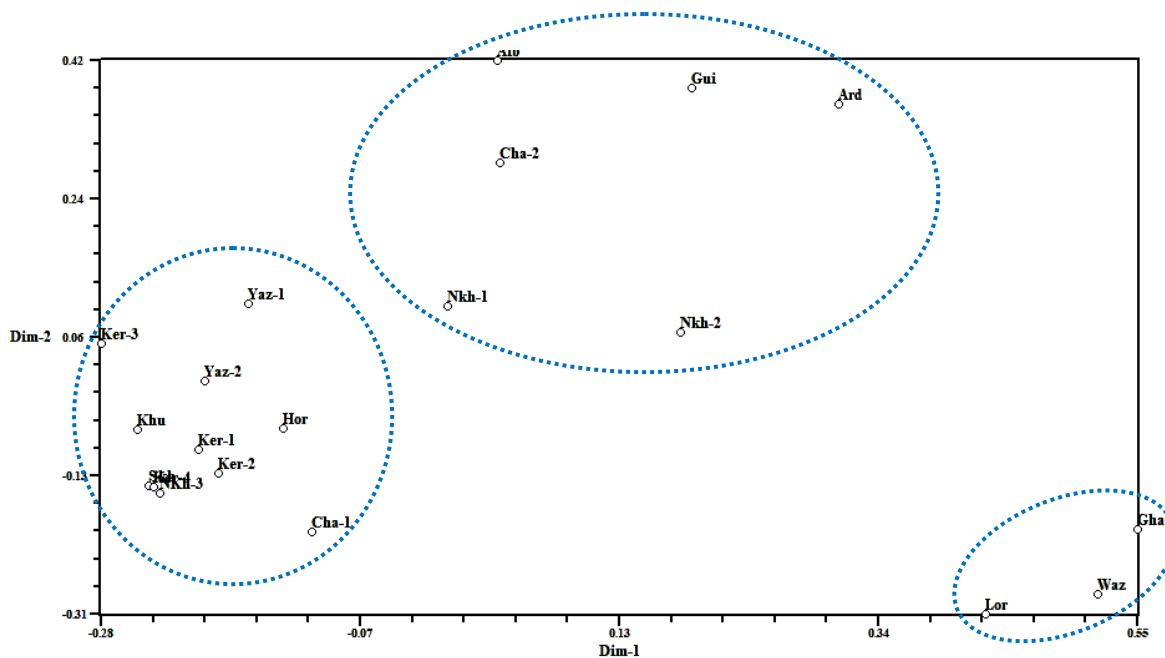
تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) براساس ماتریس تشابه جاکارد انجام شد. بر این اساس سه مؤلفه هماهنگ اصلی اول در مجموع ۳۸/۱۱ درصد از تغییرات داده‌های مولکولی را توجیه کردند. عدد پایین به‌دست آمده نشان‌دهنده توزیع بسیار مناسب و یکنواخت نشانگرهای ISSR در طول ژنوم است. این نتیجه با نتایج به‌دست آمده در مطالعه روابط ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ متعلق به

سه گونه مختلف نعناع به کمک ۱۲ نشانگر ISSR که سه مؤلفه اول در مجموع ۳۷/۴۰ درصد از تغییرات را توجیه نمودند، مطابقت داشت (Zinodini et al. 2014). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود. با توجه به نتایج شکل ۳، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس داده‌های مولکولی در نمودار دو بعدی می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های مورد مطالعه در سه گروه جای گرفته‌اند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های مولکولی نتایجی نسبتاً مشابه برای پراکندگی ژنوتیپ‌ها براساس تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی داشت و پراکندگی ژنوتیپ‌ها در خوشه‌های مختلف در بیشتر موارد با فاصله جغرافیایی آن‌ها ارتباط داشت. در مطالعه‌ای در بررسی تنوع اکوتیپ‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum*) با استفاده از نشانگرهای ISSR بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه و موقعیت جغرافیایی آن‌ها در بیشتر موارد ارتباط وجود داشت (Hossein Jafari et al. 2020).



شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های پونه وحشی به روش UPGMA براساس داده‌های مولکولی حاصل از تجزیه ISSR

Figure 2. Cluster Analysis of Wild mint Genotypes Using UPGMA Method Based on Molecular Data of ISSR Analysis



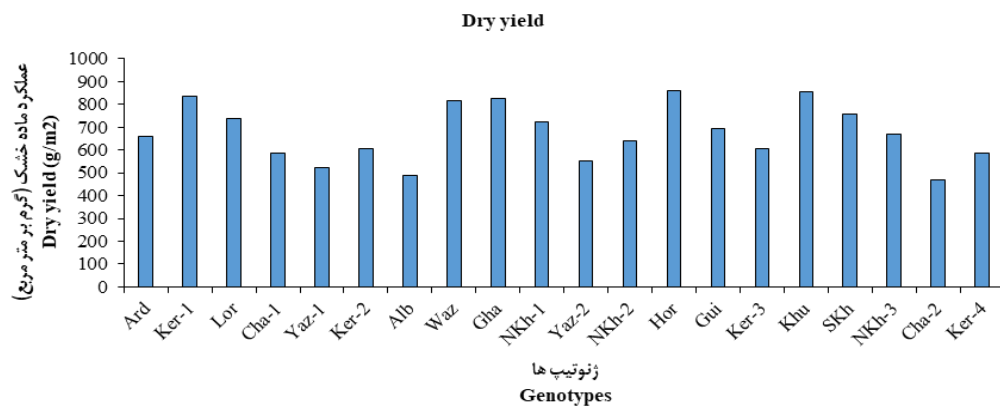
شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCoA)

Figure 3. Population grouping based on principal component analysis (PCoA) and cluster analysis

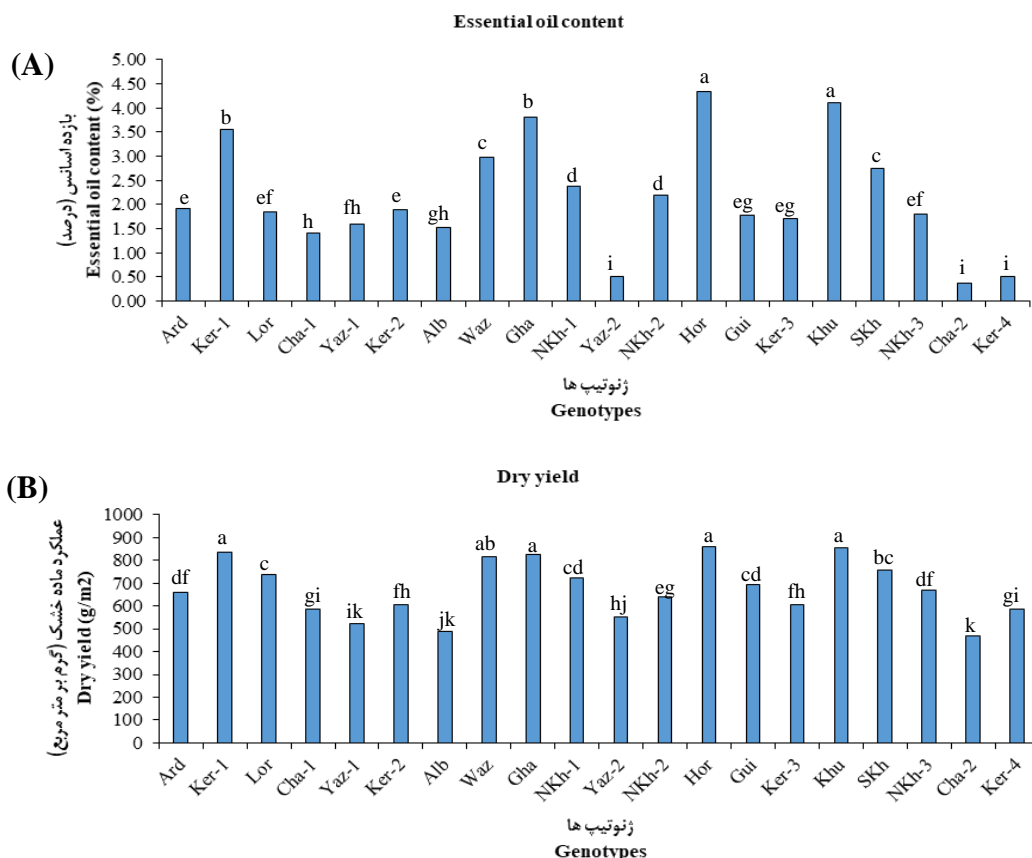
فرض بر این است که گونه‌هایی با جمعیت کوچک، تنوع ژنتیکی کمتری نسبت به جمعیت‌های بزرگتر دارند (Petrova et al. 2017). از این رو، تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق را می‌توان به توزیع گسترده آن در ایران نسبت داد. صفات بیولوژیکی و سیستم تولیدمثل عموماً اصلی‌ترین عوامل مؤثر بر تنوع ژنتیکی در بین گیاهان هستند و گیاهان دگر گرده‌افشان دارای تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به گیاهان خود گرده‌افشان می‌باشند (Selseleh et al. 2019). جنس نعنای (*Mentha*) به دلیل تغییر زیاد سطح پلوئیدی و هیبریدهای موجود بین گونه‌ها از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است و تولید بذر در گونه‌های آن از طریق دگر گرده افشانی، از ۴۰ تا ۶۰ درصد و در موارد نادری تا ۸۰ درصد متغیر است (Nazem et al. 2019). تمایز ژنتیکی مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های پونه وحشی را می‌توان به دلیل سازوکار گرده‌افشانی، فعالیت انسانی، نحوه تکثیر، پستی و بلندی زیستگاه، ارتفاع گیاه، ساختار گل و شیوه انتشار دانه گرده دانست. تنوع ژنتیکی ایجاد شده در طول نسل‌ها، در نتاج حفظ شده و گیاهان را قادر می‌سازد تا با شرایط محیطی تطبیق یابند (Shaw & Etterson 2012).

مقایسه میانگین صفات عملکردی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از جمله تنوع بازده تولید اسانس و عملکرد ماده خشک ژنوتیپ‌های

مختلف نمودارهای پونه وحشی در نمودارهای



شکل ۴ نشان داد که بیشترین میزان اسانس مربوط به ژنوتیپ هرمزگان (۴/۳۳ درصد) و خوزستان (۴/۱ درصد) بود. کمترین میزان اسانس در ژنوتیپ چهارمحال بختیاری-۲ (۰/۳۸ درصد) مشاهده شد که با ژنوتیپ‌های یزد-۲ و کرمان-۴ اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین، حداکثر عملکرد خشک در ژنوتیپ هرمزگان با ۸۶۰ گرم در متر مربع مشاهده شد که با ژنوتیپ‌های کرمان-۱، قزوین و خوزستان اختلاف معنی‌داری نداشت و ژنوتیپ چهارمحال بختیاری-۲ با ۴۷۱ گرم در متر مربع حداقل مقدار ماده خشک را داشت. به‌طور کلی افزایش دما و تنش ملایم خشکی در اغلب گونه‌های گیاهی سبب محدود شدن فتوسنتز و کاهش فعالیت چرخه‌های مربوط به تولید متابولیت‌های اولیه می‌شود که در این حالت گیاه با فعال‌سازی مسیرهای تولید متابولیت ثانوی (اسانس)، با تنش ایجاد شده مقابله می‌کند که این امر موجب افزایش بازده اسانس می‌شود (Figueiredo et al. 2008). در تحقیقات پیشین مقدار اسانس در پونه وحشی ۰/۰۵ تا ۲/۲۸ درصد (Nazem et al. 2019) و در سایر گونه‌های جنس نعنای از جمله *M. spicata* و *M. hapocalyx* بین ۰/۵ تا ۳ درصد گزارش شده است (Zhao et al. 2013). هر چند از طرفی، ژنوتیپ آذربایجان غربی و قزوین که از نظر ارتفاع و شرایط اقلیمی متعلق به مناطق خشک نیستند، اما توانستند بازده اسانس مطلوبی داشته باشند یا ژنوتیپ اردبیل نسبت به ژنوتیپ کرمان-۲ در ارتفاع بسیار کمتری بود، اما بازده اسانس تقریباً یکسانی داشت. این امر می‌تواند بیانگر تأثیر خصوصیات ژنتیکی بر عملکرد اسانس این گونه دارویی ارزشمند باشد.



شکل ۴. تغییرات میزان اسانس (A) و عملکرد ماده خشک (B) در بین ژنوتیپ‌های مختلف پونه وحشی
 Figure 5. Variation of essential oil content (A) and dry yield (B) among different genotypes of wild mint

رگرسیون گام به گام جهت برآورد میزان همبستگی بین بازده اسانس، عملکرد خشک و نشاگرهای ISSR بکار گرفته شد. باندهای ISSR به‌عنوان متغیرهای وابسته به‌طور معنی‌داری همبستگی مثبت یا منفی با صفت درصد بازده اسانس به‌عنوان متغیر مستقل داشتند (جدول ۵). نه باند از شش نشانگر شامل IS1، IS6، IS9، IS10، IS13 و IS15 مرتبط با صفت بازده اسانس تشخیص داده شدند و پانزده باند از هفت نشانگر شامل IS1، IS2، IS3، IS6، IS8، IS10 و IS15 مرتبط با صفت عملکرد ماده خشک شناخته شدند. نشانگر IS10 بیشترین همبستگی معنی‌دار ($t=-14/97, P<0/000$) را برای صفت بازده اسانس با ضریب تبیین $0/71-$ و ضریب بتای استاندارد $0/78-$ نشان داد. همچنین برای صفت عملکرد خشک نیز نشانگر IS10 بیشترین همبستگی معنی‌دار ($t=-27/99, P<0/000$) را با ضریب تبیین $0/69-$ و ضریب بتای استاندارد $0/45-$ دربرداشت. نشانگرهای ISSR در ارتباط با صفت درصد اسانس، می‌توانند برای نقشه‌یابی ارتباطی (QTL) و گزینش به کمک نشانگر استفاده شوند. برنامه‌های به‌نژادی گزینش ژنوتیپ مطلوب اغلب یک فرآیند وقت‌گیر است، بنابراین نشانگرها به‌خصوص وقتی که سایر اطلاعات ژنتیکی مثل نقشه‌های ارتباطی و جایگاه ژنی صفات کمی وجود ندارد، می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ برتر بسیار کاربردی باشد.

جدول ۵. ضرایب استاندارد در ارتباط بین نشانگرهای ISSR و عملکرد و بازده اسانس در رگرسیون گام به گام

Table 5. Standardized coefficients associated with ISSR markers and yield and essential oil content in stepwise regression

مقدار p p value	مقدار t t value	ضریب استاندارد بتا Standardized beta coefficients	ضریب تبیین R ²	نشانگر marker	صفت trait
0.000	-14.974	-0.788	-0.717	IS10 ₅	درصد اسانس
0.000	10.368	0.429	0.554	IS1 ₅	
0.000	11.271	0.557	0.074	IS15 ₁	
0.000	6.173	0.327	0.107	IS15 ₃	
0.001	4.576	0.190	0.143	IS13 ₅	
0.000	-6.983	-0.299	-0.002	IS10 ₁	
0.004	-3.762	-0.146	-0.023	IS6 ₄	
0.009	3.205	0.152	-0.027	IS9 ₆	
0.039	2.377	0.129	0.631	IS1 ₃	
0.000	-27.997	-0.451	-0.693	IS10 ₅	عملکرد خشک
0.000	-23.151	-0.416	-0.463	IS6 ₁	
0.000	-25.335	-0.536	-0.400	IS3 ₃	
0.000	22.906	0.354	0.401	IS2 ₅	
0.000	-9.141	-0.143	-0.245	IS10 ₃	
0.000	10.708	0.197	0.185	IS15 ₃	
0.000	10.863	0.203	-0.031	IS2 ₉	
0.000	5.830	0.106	0.365	IS1 ₇	
0.003	-4.318	-0.085	-0.451	IS8 ₅	
0.003	-4.253	-0.057	-0.273	IS1 ₄	
0.016	3.040	0.052	-0.392	IS2 ₂	

در ستون نشانگرها حروف کوچک چیدمان باندهای هر نشانگر را روی ژل نشان می‌دهد.

In the primer column the lowercase letters indicate the band assortment for each primer on the gel.

نتیجه گیری: به طو کلی نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های پونه وحشی وجود دارد. نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از گروه‌بندی به دو روش تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی، ژنوتیپ‌های پونه‌وحشی را در بیشتر موارد منطبق با فاصله جغرافیایی در چهار گروه از هم تفکیک کردند. با توجه به اینکه نشانگرهای به کار رفته در این پژوهش چندشکلی قابل قبولی را نشان دادند، می‌توان در مطالعات آینده روی این گیاه و حتی سایر گیاهان دارویی از آن‌ها استفاده کرد. آغازگرهای IS1 و IS10 با داشتن بهترین شاخص‌های نشانگری به‌عنوان آغازگرهای برتر جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند. همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی در این پژوهش بین دو ژنوتیپ خوزستان و قزوین بود. نشانگر IS10 بیشترین همبستگی را با صفات بازده اسانس و عملکرد ماده خشک نشان داد. تنوع بالای به‌دست آمده در مدیریت و حفظ ژرمپلاسم این گیاه مفید است و می‌تواند اصلاحگر را در تعیین راهبردهای بهره‌بردار، گزینش ژنوتیپ برتر، برنامه‌های اصلاحی، اهلی‌سازی و تلاقی بین ژنوتیپ‌های این گیاه یاری دهد.

منابع

- خورشیدی جلال؛ شکرپور مجید؛ ناظری وحیده (۱۳۹۷) ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آبشن دنیایی (Thymus daenensis Celak) با استفاده از نشانگر ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰، ۷۴-۵۹.
- زین‌الدینی آرش؛ فرشادفر محسن؛ صفری هوشمند؛ مرادی فرزاد؛ شیروانی هومن (۱۳۹۲) مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از نشانگر ISSR. مجله زیست‌فناوری گیاهان زراعی ۵، ۲۱-۱۱.
- سقلی عزیزه؛ فرخاری محمد؛ صلواتی افشین؛ عالمی سعید خلیل؛ ابدالی مشهدی علیرضا (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum L.*) با استفاده از نشانگر ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸ (۳)، ۶۴-۵۱.
- رحیم‌ملک مهدی؛ خرمی مجتبی؛ غریبی شیما؛ زینلی بادی حسین؛ طالبی مجید (۱۳۹۱) بررسی تنوع ژنتیکی برخی از نمونه‌های جمعیتی *Mentha Spicata L.* و روابط آن با دو گونه *M. longifolia* و *M. piperita L.* با استفاده از نشانگرهای ISSR و مورفولوژیک. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ۱۳، ۱۲۶-۱۱۵.
- حسنپور ریحانی کبری؛ سفالیان امید؛ زارع ناصر؛ اصغری علی؛ اسماعیل‌پور بهروز (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی اکوتیپ‌های پونه *Mentha longifolia* بومی ایران. مجله ژنتیک نوین ۴، ۶۲۵-۶۱۷.
- حسین‌جعفری سمیرا؛ سعادت‌فر امیر؛ محکمی افسانه؛ کریمیان علی‌اکبر (۱۳۹۸) بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی زیره سبز کشت شده در مراتع مختلف استان یزد. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱، ۶۶-۵۱.

References

- Aga E, Bekele E, Bryngelsson T (2005) Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Jordan J Biol Sci* 124, 213-221.
- Al-Rawashdeh IM (2011) Molecular taxonomy among *Mentha spicata*, *Mentha longifolia* and *Ziziphora tenuior* populations using the RAPD technique. *Jordan J Biol Sci* 147, 1-8.
- Commission BP (1993) *British Pharmacopoeia* 1993.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 39-40.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG et al. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag J* 23, 213-226.
- Hassanpor Reihani K, Sofalian O, Zare N et al. (2018) Evaluation of genetic, morpho-physiological diversity in Iranian *Mentha longifolia* ecotypes. *Mod Genet J* 12, 617-625 (In Persian).
- Heydari A, Hadian J, Esmaeili H et al. (2019) Introduction of *Thymus daenensis* into cultivation: Analysis of agro-morphological, phytochemical and genetic diversity of cultivated clones. *Ind Crops Prod* 131, 14-24.
- Hossein Jafari S, Saadatfar A, Mohkami A et al. (2020) Investigating genetic and phytochemical diversity of cumin ecotypes cultivated in different rangelands of yazd province. *Agric Biotechnol J* 11, 51-66 (In Persian).
- Khorshidi J, Shokrpour M, Nazeri V (2018) Assessment of genetic diversity in different populations of *Thymus daenensis* Celak. using ISSR marker. *J Agric Biotechnol* 10, 59-74 (In Persian).
- Meimberg H, Abele T, Bräuchler C et al. (2006) Molecular evidence for adaptive radiation of *Micromeria* Benth. (Lamiaceae) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. *Mol Phylogenet Evol* 41, 566-578.
- Mirzaie-Nodoushan H, Rezaie MB, Jaimand K (2001) Path analysis of the essential oil-related characters in *Mentha* spp. *Flavour Frag J* 16, 340-343.
- Moshrefi-Araghi A, Nemati H, Azizi M et al. (2019) Assessment of phytochemical and agro-morphological variability among different wild accessions of *Mentha longifolia* L. cultivated in field condition. *Ind Crops Prod* 140, 111698.
- Moshrefi-Araghi A, Nemati SH, Shoor M et al. (2018) Influence of Water Stress on Agro-Morphological Traits and Essential Oil Content Among Iranian Genotypes of *Mentha longifolia*. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci*, 1-12.

- Nazem V, Sabzalian MR, Saeidi G et al. (2019) Essential oil yield and composition and secondary metabolites in self-and open-pollinated populations of mint (*Mentha* spp.). *Ind Crops Prod* 130, 332-340.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106, 283-292.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect Plant Ecol* 3, 93-114.
- Okut N, Yagmur M, Selcuk N et al. (2017) Chemical composition of essential oil of *Mentha longifolia* L. Subsp. *Longifolia* growing wild. *Pak J Bot* 49, 525-529.
- Petrova G, Petrov S, Delcheva M et al. (2017) Genetic diversity and conservation of Bulgarian endemic *Verbascum tzar-borisii* (Scrophulariaceae). In: *Ann Bot Fenn. BioOne*. pp. 307-316.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol breeding* 2, 225-238.
- Rahimmalek M (2011) Study of genetic relationships of some mint species using R-ISSR markers. *Agric Biotechnol* 10, (In persian).
- Rahimmalek M, Khorami M, Gharibi S et al. (2012) Assessment of genetic diversity of some *Mentha spicata* L. accessions and their relationships with *M.piperita* L. and *M. longifolia* L. using inter simple sequence repeat (ISSR) and morphological markers. *Int J Hort Sci Tech* 13, 115-126 (In Persian).
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161, 1189-1202.
- Rodrigues L, van den Berg C, Póvoa O et al. (2013) Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications for conservation. *Biochem Syst Ecol* 50, 51-61.
- Rostami-Ahmadvandi H, Cheghamirza K, Kahrizi D et al. (2013) Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L. accessions. *Aust J Crop Sci* 7, 361.
- Santhosh W, Shobha D, Melwyn G (2009) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sci Hortic* 120, 411-417.
- Selseleh M, Hadian J, Ebrahimi SN et al. (2019) Metabolic diversity and genetic association between wild populations of *Verbascum songaricum* (Scrophulariaceae). *Ind Crops Prod* 137, 112-125.

- Shaw RG, Etterson JR (2012) Rapid climate change and the rate of adaptation: insight from experimental quantitative genetics. *New Phytol* 195, 752-765.
- Shokrpour M, Mohammadi SG, Moghadam M et al. (2008) Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). *Iranian J Med and Aroma Plants Res* 24, 278-292 (In Persian).
- Smolik M, Jadcak D, Rzepka-Plevneš D et al. (2007) Morphological and genetic variability of chosen *Mentha* species. *Herba Polonica* 53, 90-97.
- Tucker AO, Naczi RF (2007) *Mentha: an overview of its classification and relationships. Mint: the genus Mentha* CRC Press, Boca Raton, 1-39.
- Volis S, Yakubov B, Shulgina I et al. (2001) Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biol J Linn Soc* 74, 289-303.
- Zhao D, Xu YW, Yang GL et al. (2013) Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China. In: *Ind Crops Prod.* pp. 251-260.
- Zinodini A, Farshad Far M, Safari H et al. (2014) Study of genetic relationships of some mint species using ISSR markers. *Crop Biotech* 3, 11-21 (In Persian).

