



## "مقاله پژوهشی"

### بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های بومی شمال غرب گیاه دارویی پونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

سودا ترکمان<sup>۱</sup>، امید سفالیان<sup>۲</sup>، ناصر زارع<sup>۳</sup> و سمیرا حسینیان<sup>۴</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی (نویسنده مسوول: sevdatorkaman21571@gmail.com)

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

۴- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶

صفحه: ۱ تا ۱۰

#### چکیده

پونه به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم ایران به خانواده نعناعیان متعلق است. با توجه به خواص دارویی متعدد و بسیار مفید پونه، این گیاه مورد توجه بسیاری از مطالعات قرار می‌گیرد. در این بررسی ۱۱ اکوتیپ مختلف پونه از گونه *Mentha longifolia* متعلق به ۱۱ منطقه مختلف ایران شامل آذربایجان غربی، یزد، گیلان، چهارمحال بختیاری، خوزستان، لرستان، کرمان، هرمزگان، خراسان، قزوین و اردبیل جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پونه در دانشگاه محقق اردبیلی، آزمایشی در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در ۱۱ اکوتیپ (تیمار) و ۳ تکرار اجرا شد. DNA استخراج و با استفاده از ۲۳ آغازگر گوناگون ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر وجود پلی-مورفیسم (چندشکلی) کافی در بین این اکوتیپ‌ها است. در مجموع ۶۰ نوار واضح و قابل امتیازدهی تولید گردید، که ۶۰ نوار آن چند شکل هستند. دو نشانگر P9 و P8 بر اساس شاخص‌های تنوع ژنتیکی شانون، تنوع ژنی نی و محتوی اطلاعات چندشکلی به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار تنوع بین ارقام را نشان دادند همچنین این دو نشانگر به ترتیب بالاترین و کمترین میزان تعداد آلل مؤثر را دارا بودند. در ضمن بر اساس شاخص شانون و نی دو جمعیت کرمان و یزد به ترتیب دارای بالاترین و کمترین مقدار این دو صفت بودند. همین‌طور بر اساس فاصله ژنتیکی نی فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها از ۲۸۵/۰+ بین اکوتیپ‌های کرمان و قزوین تا ۶۷۲/۰+ بین اکوتیپ‌های هرمزگان و کرمان تا ۶۵۲/۰+ بین اکوتیپ‌های یزد و قزوین متغیر هست. گروه‌بندی که بر اساس ماتریس تشابه نشانگرهای ISSR صورت می‌پذیرد، اکوتیپ‌ها را به ۳ گروه تقسیم‌بندی می‌کند. در PCA دو مؤلفه اول بیش از ۵۶ درصد واریانس را توجیه کرد. وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پونه امکان انجام مقاصد گزینش را فراهم خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، تنوع ژنتیکی، *Mentha longifolia*، ISSR، PCR

#### مقدمه

تنوع ژنتیکی از ملزومات اصلاح نباتات هست که از تکامل طبیعی ناشی شده و جزء مهمی از پایداری نظام‌های بیولوژیکی که از نظر اکولوژی متعادل است، هست. تنوع باعث تأمین قابلیت سازگاری درازمدت و بقای جمعیت می‌گردد. ثبات عملکرد، یکی از اجزای کشاورزی پایدار بوده است و اگر بتوان سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی مفید را در نظام‌های کشت پر محصول ترکیب کرد، می‌توان به آن دست‌یافت. نشانگرهای مبتنی بر DNA مناسب‌ترین روش برآورد تنوع ژنتیکی به شمار می‌آیند (۲۷). قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین کار با آغازگرهای مولکولی در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها در یک‌گونه خاص غالباً صفات ریخت‌شناسی نقش عمده را ایفا می‌نمودند. اخیراً علم زیست‌فناوری کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی در اصلاح گیاهان نموده است. آغازگرهای مولکولی و صفات ریخت‌شناسی هر دو می‌توانند تکمیل‌کننده یکدیگر باشند و نمی‌توانند به‌تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند (۲۱). در حال حاضر بررسی تنوع و گروه‌بندی گیاهان بر اساس نشانگرهای مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌گردد. به‌طور کلی، با توجه به اینکه اندازه‌گیری صفات مورفولوژی نیاز به صرف وقت، انرژی و همچنین هزینه زیادی دارد و به دلیل اثر محیط بر روند بیان ژن، روش قابل‌اعتمادی

کشت گیاهان دارویی و معطر، از دیرباز از جایگاه ویژه‌ای در نظام‌های سنتی کشاورزی ایران برخوردار بوده است و این نظام‌ها از نظر ایجاد تنوع و پایداری، نقش مهمی ایفا می‌کرده‌اند (۱۶). گیاه دارویی به آن دسته از گیاهانی گفته می‌شود که دارای مقدار معینی ماده مؤثره هست که برای تشخیص، درمان، پیشگیری، کمک به اعمال فیزیولوژیک و حفظ بهداشت بدن استفاده می‌گردد (۶). گیاه دارویی *Mentha longifolia* متعلق به خانواده‌ی Lamiaceae بوده که در زبان فارسی پونه نامیده می‌شود و گیاهی است علفی، چندساله، با ساقه‌های زیرزمینی رونده و دارای ساقه راست، منشعب، به‌ندرت ساده و به ارتفاع ۴۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر، ساقه غالباً چهارگوش و در بخش فوقانی با کرک‌های بلند هست. این گیاه کرکدار، پایا با بویی تند، دارای ریزوم، برگ‌های بیضی‌دوک مانند تا نوک‌تیز دوک مانند است (۳). گونه‌های این جنس دارای منابع غنی از ترکیبات پلی فنلی بوده و لذا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. برای گونه‌های این جنس فعالیت‌های زیستی مختلفی از قبیل: ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره‌کشی نیز گزارش کرده‌اند (۲۰). تنوع ژنتیکی مبنای تمام گزینش‌ها است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود (۱۶).

ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ‌ها متعلق به سه گونه *M. longifolia*، *M. sp* و *M. pulegium* نشان داد که میانگین درصد چندشکلی در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۹۴/۷۰ درصد بود. پایین بودن میزان تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد (۰/۱۷ تا ۰/۵۶) نشان از بالا بودن تنوع در 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 تأیید نمود. همچنین تنوع درون گونه‌ای (۹۸ درصد) در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای (۲ درصد) بیشتر شد. بیشترین تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های *M. longifolia* و کمترین تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *M. sp* مشاهده گردید.

با توجه به این که در علم اصلاح نباتات تنوع ژنتیکی برای اصلاح گیاهان و یا تولید ارقام جدید یک پیش شرط بسیار مهم و غیرقابل انکار هست، ما می‌خواهیم ارقام مهم زراعی ایران را ارزیابی و ارقام متنوع‌تر و متحمل‌تر را معرفی کنیم. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های بومی شمال غرب گیاه دارویی پونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و انتخاب بهترین ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه بذر نمونه‌های گیاهی

بذور پونه مورد استفاده از مرکز تحقیقات مراتع و جنگل‌های کشور، قسمت ذخایر ژن تهیه گردید. مشخصات محل تهیه بذور در جدول شماره ۱ آمده است.

برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نیست، بنابراین امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌گردد (۲۵).

نشانگر بین ریز ماهواره‌ای (ISSR) به علت چندشکلی بالا، عدم احتیاج به توالی یابی DNA برای طراحی آغازگر، گستردگی و پوشش ژنومی بالا، توزیع تصادفی و سهولت استفاده، یکی از پرکاربردترین سیستم‌های نشانگری مورد استفاده در بررسی‌های انگشت‌نگاری ژنومی، تنوع ژنتیکی، نقشه یابی ژنومی و تجزیه‌های فیلوژنتیکی حساب می‌شود (۲۸). ISSR ابزاری مفید و قدرتمندی برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی و همین‌طور نشانگر ISSR برتر از نشانگر RAPD برای مشخص کردن تنوع هست (۵). تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت در ۶۵ نمونه از نواع کره‌ای، بر اساس نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفته است. ۹ آغازگر ISSR برای تعیین الگوی نواری چند شکل انتخاب شدند و در مجموع، ۱۲۶ باند ثبت گردید که ۱۱۹ تا (۹۴/۴٪) چند شکل به دست آمد. تعداد باندهای تولید شده توسط آغازگر از ۷ تا ۱۸ متنوع است. پارامترهای دیگر مثل ارزش کل تنوع ژنی (HT) که در محدوده ۰/۱۱۲-۰/۳۳ هست با میانگین ۰/۲۱۸ پشتیبانی شد. تعداد آل مؤثر (NE) که در محدوده ۱/۱۷۴-۱/۴۶۸ قرار گرفت. با مقدار متوسط ۱/۳۵۱ ثبت گردید. متوسط میانگین تنوع ژنتیکی نی (He) ۰/۲۱۸ و متوسط میانگین شاخص اطلاعات قانون (I) ۰/۳۴۳ به دست آمد. ارزش بالای تنوع کل ژن، تعداد آل مؤثر، تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعات قانون نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در جمعیت می‌باشند (۱۰). در یک مطالعه انجام شده توسط Craig (۴) نتایج حاصل از بررسی تنوع

جدول ۱- کد و مشخصات جغرافیایی بذور مورد بررسی

Table 1. Code and geographical characteristics of the studied seeds

| 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            | رستم‌آباد | ۱۳۴۸   | ۳۶/۵۵/۱۵      | ۴۹/۲۴/۵۸      |
| ۴    | چهارمحال بختیاری | شهرکرد    | ۲۵۳۳   | ۳۲/۳۱/۱۶      | ۰۵/۲۸/۱۴      |
| ۵    | خوزستان          | شوشتر     | ۶۱     | ۳۲/۰۸/۳۸      | ۴۸/۵۰/۳۳      |
| ۶    | لرستان           | خرم‌آباد  | ۱۸۱۲   | ۳۳/۳۴/۶۲      | ۴۸/۳۱/۰       |
| ۷    | هرمزگان          | بندرعباس  | 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           | مشکین‌شهر | ۱۵۵۰   | ۳۸/۱۳/۰۵      | ۴۸/۴۱/۱۱      |

گلدان‌های حاوی خاک منتقل گردیدند. زمانی که بوته‌ها به مرحله گلدهی می‌رسند، از ۷-۶ سانتی‌متری سطح خاک برداشت می‌شود و برخی شاخه‌های رشد گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. اکوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

### تجزیه‌های مولکولی

#### استخراج DNA

پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان گیاه و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات طبق روش سفای معروف و همکاران (۲۲) انجام

### طرح آزمایشی

این تحقیق به صورت آزمایش گلخانه‌ای در گلخانه شماره ۲ دانشگاه محقق اردبیلی با طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار برای ۱۱ اکوتیپ پونه بومی ایران انجام گردید.

#### پرو روش *M. longifolia* در شرایط آزمایشگاهی

ابتدا بذور پونه روی کاغذ صافی درون ظروف پتری دیش کشت گردید و در ژرمیناتور با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد جهت جوانه‌زنی نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به لیوان‌های کاغذی حاوی کوکوبیت منتقل گردیدند. پس از حدود یک ماه که گیاهچه‌ها در لیوان مستقر گردیدند، به

گردید.

### ارزیابی کمیت و کیفیت DNA

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از الکتروفورز ژل، ۱ درصد استفاده گردید. نمونه‌هایی که کیفیت نوارهای DNA خوبی را دارا بودند، انتخاب گردیدند. از روش اسپکتروفتومتری نیز برای تعیین کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده استفاده گردید. برای تکثیر DNA ژنومی از آغازگرهای ISSR ساخت شرکت Meta bion آلمان استفاده گردید. نام و توالی این آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است. برای مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده نیز از نشانگر وزن مولکولی با اندازه قطعات جفت باز ۳۰۰-۱۰۰ استفاده شد.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR طبق دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت TECHNE اجرا گردیده است.

### الکتروفورز محصولات PCR

برای آشکارسازی فرآورده‌های PCR حاصل از تجزیه ISSR، از الکتروفورز ژل ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. اجزای واکنش PCR در جدول ۲ آمده است. به هر لوله حاوی فرآورده PCR، ۲ میکرو لیتر محلول رنگی بارگذاری ۶ (۲۵X) درصد زایلین سیانول، ۰/۲۵ درصد بروموفل‌آبی و ۳۰٪ گلیسرول اضافه گردید. کل فرآورده PCR و رنگ اضافه شده در داخل یک چاهک بارگذاری شد و الکتروفورز به مدت ۲/۵ ساعت با ولتاژ ثابت ۱۰۰ انجام گردید. پس از اتمام الکتروفورز عکس برداری از ژل توسط دستگاه تصویربرداری از ژل انجام گردید.

جدول ۲- اجزای واکنش PCR برای تکثیر نمونه‌های DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR

Table 1. PCR reaction components for amplification of DNA samples using ISSR primers

| محلول پایه                                | حجم در یک واکنش (میکرو لیتر) |
|---|------------------------------|
| آب خالص تزریقی (حاصل از دستگاه Millipore) | ۴/۴                          |
| مستر میکس                                 | ۱۰                           |
| پرایمر                                    | ۱/۶                          |
| DNA (۲۵ نانوگرم در میکرو لیتر)            | ۴                            |
| حجم نهایی                                 | ۲۰                           |

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نشانگرهای بکار رفته در این تحقیق نشانگرهای ISSR یا RAPD می‌باشند. واکنش PCR طبق برنامه زیر توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت TECHNE انجام شد. در مرحله اول، واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مرحله دوم شامل ۴۰ چرخه (الف: واسرشته سازی 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 پلیمر از به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در مرحله سوم، بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول واکنش PCR در ژل یک درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه Gel Doc ساخت شرکت UVP آمریکا عکس برداری شد. تصاویر حاصل از ژل‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. باندها بر اساس حضور و عدم حضور، به کد صفر و یک تبدیل شد. پس از انتقال داده‌ها به نرم‌افزار Excel، ماتریس تشابه توسط نرم‌افزار (۱۹) NTSYSpc2 بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شده و دندوگرام رسم گردید. برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین اکوتیپ‌ها و تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار GenAIEX استفاده شد (۱۷). به منظور استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مارکری، می‌توان همراه با تجزیه کلاستر از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و یا (PCOA) به‌ویژه زمانی که دو یا سه مؤلفه اول بیش از ۲۵ درصد از کل واریانس را توجیه می‌نماید، استفاده کرد (۱۴). لذا گروه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از PCA نیز انجام شد.

### نتایج و بحث

از مجموع ۱۵ نشانگر ISSR، ۶۰ نوار تولید شد که تمامی نوارها در سطح جمعیت چند شکل بودند. تعداد نوارهای چند شکل بین ۳ (برای نشانگرهای P16، P17، P9، P10، P18، P19) تا ۷ (برای نشانگر P23) متغیر بود. درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد محاسبه گردید.

جدول ۳- نشانگرهای ISSR مورد مطالعه و شاخص‌های به دست آمده

Table 3. ISSR indicators studied and indicators obtained

| ردیف    | کد آغازگر | توالی آغازگر ۳-۵        | دمای اتصال (C) | تعداد کل نوار | تعداد نوار چند شکل | درصد چندشکلی |
|---------|-----------|-------------------------|----------------|---------------|--------------------|--------------|
| ۱       | P5        | AGA GAG AGA GAG AGA GC  | 42C            | 4             | 4                  | 100          |
| ۲       | P16       | TCT CTC TCT CTC TCT CC  | 42C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۳       | P12       | TCC TCC TCCTCC TCC      | 42C            | 5             | 5                  | 100          |
| ۴       | P17       | ACA CAC ACA CAC ACA CT  | 43C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۵       | P1        | GAG AGA GAG AGA GAG     | 42C            | 6             | 6                  | 100          |
| ۶       | P6        | AGA GAG AGA GAG AGA GG  | 42C            | 4             | 4                  | 100          |
| ۷       | P9        | AGA GAG AGA GAG AGA CTA | 43C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۸       | P7        | GAG AGA GAG AGA GAG AA  | 42C            | 4             | 4                  | 100          |
| ۹       | P10       | GAG AGA GAG AGA GAG ATT | 43C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۱۰      | P23       | GGA GAG GAG AGG AGA     | 42C            | 7             | 7                  | 100          |
| ۱۱      | P8        | AGA GAG AGA GAG AGA CT  | 42C            | 4             | 4                  | 100          |
| ۱۲      | P13       | AGA GAG AGA GAG AGA GT  | 43C            | 4             | 4                  | 100          |
| ۱۳      | P18       | AGA GAG AGA GAG AGA GCT | 43C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۱۴      | P19       | AGA GAG AGA GAG AGA GCC | 43C            | 3             | 3                  | 100          |
| ۱۵      | P15       | CAC ACA CAC ACA CAC AT  | 43C            | 4             | 4                  | 100          |
| میانگین | -         | -                       | -              | 4             | 4                  | 100          |

ارقام و جمعیت‌ها شاخص تنوع ژنی نی هست (۱۵). بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگر P1 (۰/۲۰۸۷۵۴) هست و کمترین آن مربوط به آغازگر P19 (۰/۱۴۸۱۴۸) است که توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپ‌ها ندارد. به منظور ارزیابی و تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص‌های، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. که در مورد شاخص نشانگر (MI) آغازگرهای P23 و P19 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان شاخص نشانگر بودند. این شاخص (MI) در تحقیق مجرد آشنا و همکاران (۱۲) که بر روی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *Tanacetum polycephalum* انجام گرفت، بین ۱/۶۳ تا ۸/۲۸ با میانگین ۶/۱۳ مشاهده شد. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) هست، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آلل تأثیرپذیری دارد (۱). برخی از گونه‌های مختلف نعنای با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس شاخص‌های قدرت تفکیک (RP) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرهای برتر برای آنالیز ژرم پلاسم نعنای معرفی شده‌اند (۳۰). در شاخص تفکیک (RP)، آغازگر P5 و P23 به ترتیب کمترین و بیشترین میزان شاخص را در این مطالعه داشتند. به منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. میزان (EMR) برای آغازگرها بین ۳ تا ۷ متغیر بود.

میزان شاخص‌های تنوع بین ارقام از قبیل آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون، میزان اطلاعات چندشکلی PIC و دامنه شاخص‌های نشانگر MI، RP، MRP، EMR آمده است، در بین ارقام پونه در کل آغازگرها شاخص شانون (I) (۶۵۹۷۸۶) محاسبه شد. بیشترین میزان این پارامتر مربوط به آغازگر P9 (۰/۶۹۱۵) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر P8 (۰/۵۹۹۹) می‌باشد. همین‌طور میانگین شاخص تنوع ژنی نی (He) (۰/۴۶۸۰۲) است که بیشترین مقدار آن مربوط به آغازگر P9 (۰/۴۹۸۴) می‌باشد و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر P8 (۰/۴۱۰۵) است. بیشترین مقدار سطوح تنوع بر اساس شاخص تنوع ژنی نی در اکوتیپ کرمان (۰/۲۴۰۲) و اکوتیپ گیلان (۰/۲۱۰۸) دیده می‌شود. شاخص تنوع ژنی نی در اکوتیپ یزد (۰/۱۲۸۹) حداقل می‌باشد. همچنین وضعیت تنوع ژنتیکی درون ارقام بر اساس شاخص شانون بیشترین مقدار مربوط به اکوتیپ کرمان (۰/۳۴۴۰) و اکوتیپ گیلان (۰/۳۰۲۰) می‌باشد و کمترین مقدار مربوط به اکوتیپ یزد (۰/۱۸۲۸) است.

بیشترین تعداد آلل مؤثر (Ne) در بین نشانگرهای مطالعه شده مربوط به آغازگرهای P9 (۱/۹۹۳۶) و کمترین آن مربوط به آغازگرهای P8 (۱/۷۱۰۶) در بین کل اکوتیپ‌ها است. یکی دیگر از شاخص‌های تنوع، شاخص شانون می‌باشد. شاخص شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها است (۲۴). یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین

جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ISSR

Table 4. Genetic diversity parameters based on ISSR markers

| ردیف | کد آغازگر | تعداد کل آلل | تعداد آلل مؤثر | تنوع ژنی (He) | شاخص شانون (I) | تنوع ژنتیکی (PIC) | شاخص نشانگر | RP       | MRP      | EMR |
|------|-----------|--------------|----------------|---------------|----------------|-------------------|-------------|----------|----------|-----|
| ۱    | P5        | ۲            | ۱/۸۵۵۶         | ۰/۴۵۵         | ۰/۶۴۶۷         | ۰/۱۷۱۷۱۷          | ۰/۶۸۶۸۶۹    | ۰/۵۷۵۷۵۸ | ۱/۳۹۳۹۳۹ | ۴   |
| ۲    | P16       | ۲            | ۱/۸۶۰۰         | ۰/۴۵۸۰        | ۰/۶۴۹۶         | ۰/۱۸۸۵۵۲          | ۰/۵۶۵۶۵۷    | ۴        | ۱/۲۲۲۲۲۲ | ۳   |
| ۳    | P12       | ۲            | ۱/۷۹۱۰         | ۰/۴۲۸۶        | ۰/۶۱۶۲         | ۰/۲۰۲۰۲           | ۱/۰۱۰۱۰۱    | ۷/۲۱۲۱۲۱ | ۱/۴۴۴۴۴۴ | ۵   |
| ۴    | P7        | ۲            | ۱/۸۰۰۷         | ۰/۴۴۰۰        | ۰/۶۳۰۸         | ۰/۲۰۲۰۲           | ۰/۶۰۶۰۶۱    | ۳/۳۹۳۹۳۹ | ۱/۳۱۳۱۳۱ | ۳   |
| ۵    | P1        | ۲            | ۱/۹۶۴۱         | ۰/۴۹۰۷        | ۰/۶۸۳۸         | ۰/۲۰۸۷۵۴          | ۱/۲۵۲۵۲۵    | ۱/۳۳۳۳۳۳ | ۱/۲۲۲۲۲۲ | ۶   |
| ۶    | P6        | ۲            | ۱/۹۴۱۳         | ۰/۴۸۴۵        | ۰/۶۷۷۵         | ۰/۱۸۱۸۱۸          | ۰/۷۳۷۳۷۳    | ۴/۷۸۷۸۷۹ | ۱/۱۹۶۹۷  | ۴   |
| ۷    | P9        | ۲            | ۱/۹۹۳۶         | ۰/۴۹۸۴        | ۰/۶۹۱۵         | ۰/۲۰۲۰۲           | ۰/۶۰۶۰۶۱    | ۳/۶۹۶۹۷  | ۱/۳۳۳۳۳۳ | ۳   |
| ۸    | P7        | ۲            | ۱/۹۴۲۳         | ۰/۴۸۵۰        | ۰/۶۷۸۰         | ۰/۱۸۱۸۱۸          | ۰/۷۳۷۳۷۳    | ۴/۸۴۸۴۸۵ | ۱/۲۱۲۱۲۱ | ۴   |
| ۹    | P10       | ۲            | ۱/۹۷۹۶         | ۰/۴۹۴۸        | ۰/۶۸۷۹         | ۰/۱۸۸۵۵۲          | ۰/۵۶۵۶۵۷    | ۳/۷۵۷۵۷۶ | ۱/۲۵۲۵۲۵ | ۲   |
| ۱۰   | P23       | ۲            | ۱/۹۵۳۷         | ۰/۴۸۷۱        | ۰/۶۷۹۹         | ۰/۱۹۰۴۷۳          | ۱/۳۳۳۳۳۳    | ۸/۱۸۱۸۱۸ | ۱/۱۶۸۸۳۱ | ۷   |
| ۱۱   | P7        | ۲            | ۱/۷۱۰۶         | ۰/۴۱۰۸        | ۰/۵۹۹۹         | ۰/۱۶۱۶۱۶          | ۰/۶۴۶۴۶۵    | ۵/۰۹۰۹۰۹ | ۱/۲۷۲۷۲۷ | ۴   |
| ۱۲   | P13       | ۲            | ۱/۸۹۶۰         | ۰/۴۷۰۵        | ۰/۶۶۲۰         | ۰/۱۷۱۷۱۷          | ۰/۶۸۶۸۶۹    | ۴/۶۰۶۰۶۱ | ۱/۱۵۱۵۱۵ | ۴   |
| ۱۳   | P18       | ۲            | ۱/۹۶۴۴         | ۰/۴۹۲۲        | ۰/۶۸۵۲         | ۰/۱۸۸۵۵۲          | ۰/۵۶۵۶۵۷    | ۳/۲۷۲۷۲۷ | ۱/۰۹۰۹۰۹ | ۳   |
| ۱۴   | P19       | ۲            | ۱/۷۷۵۹         | ۰/۴۲۸۷        | ۰/۶۱۸۰         | ۰/۱۴۸۱۴۸          | ۰/۴۴۴۴۴۴    | ۳/۸۱۸۱۸۲ | ۱/۲۷۲۷۲۷ | ۳   |
| ۱۵   | P15       | ۲            | ۱/۹۸۲۵         | ۰/۴۹۵۵        | ۰/۶۸۸۷         | ۰/۱۷۱۷۱۷          | ۰/۶۸۶۸۶۹    | ۴/۷۳۷۳۷۳ | ۱/۸۱۸۱۸۱ | ۴   |

جدول ۵- روابط بین ارقام شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت

Table 5. Relationships between cultivars of genetic diversity indices within and between populations

| ردیف | اکوتیپ کل | تنوع کل اکوتیپ (Ht) | تنوع درون اکوتیپ (Hs) | درجه تمایز ژنی (Gst) | تعداد جریان ژنی (Nm*) |
|------|-----------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| ۱    | -         | ۰/۴۶۹۰              | ۰/۱۸۱۴                | ۰/۶۱۳۳               | ۰/۳۱۵۳                |

جدول ۶- تنوع ژنتیکی بر مبنای شاخص‌های تنوع نی و شانون درون اکوتیپ‌های پونه

Table 6. Genetic diversity based on Ni and Shannon diversity indices within *Mentha longifolia* ecotypes

| ردیف | اکوتیپ                 | تعداد کل آلل مشاهده شده | تعداد آلل مؤثر (Ne) | شاخص نی (He) | شاخص شانون (I) | تعداد مکان‌های چند شکل | درصد مکان‌های چند شکل |
|------|------------------------|-------------------------|---------------------|--------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| ۱    | آذربایجان غربی - سلماس | ۱/۴۵۰۰                  | ۱/۳۹۳۹              | ۰/۲۰۷۱       | ۰/۲۹۲۹         | ۲۷                     | ۴۵%/۰۰                |
| ۲    | یزد - نفت              | ۱/۲۸۳۳                  | ۱/۲۴۳۸              | ۰/۱۲۸۹       | ۰/۱۸۲۸         | ۱۷                     | ۲۸%/۳۳                |
| ۳    | گیلان - رستم‌آباد      | ۱/۴۸۳۳                  | ۱/۳۹۰۷              | ۰/۲۱۰۸       | ۰/۳۰۲۰         | ۲۹                     | ۴۸%/۳۳                |
| ۴    | شهرکرد - شهرکرد        | ۱/۴۱۶۷                  | ۱/۳۵۳۴              | ۰/۱۸۷۶       | ۰/۲۶۶۸         | ۲۵                     | ۴۱%/۶۷                |
| ۵    | خوزستان - شوشتر        | ۱/۳۸۲۸                  | ۱/۳۱۲۹              | ۰/۱۶۸۲       | ۰/۲۴۰۷         | ۲۳                     | ۳۸%/۳۳                |
| ۶    | خرم‌آباد - لرستان      | ۱/۴۰۰۰                  | ۱/۲۸۵۰              | ۰/۱۶۰۷       | ۰/۲۳۵۰         | ۲۴                     | ۴۰%/۰۰                |
| ۷    | هرمزگان - بندرعباس     | ۱/۳۵۰۰                  | ۱/۲۸۱۱              | ۰/۱۵۲۰       | ۰/۲۱۷۹         | ۲۱                     | ۳۵%/۰۰                |
| ۸    | کرمان - بردسیر         | ۱/۵۵۰۰                  | ۱/۴۴۵۵              | ۰/۲۴۰۲       | ۰/۳۴۴۰         | ۳۳                     | ۵۵%/۰۰                |
| ۹    | خراسان - اسفراین       | ۱/۳۳۳۳                  | ۱/۲۴۷۷              | ۰/۱۳۷۶       | ۰/۱۹۹۸         | ۲۰                     | ۳۳%/۳۳                |
| ۱۰   | قزوین - قزوین          | ۱/۴۵۰۰                  | ۱/۳۶۷۷              | ۰/۱۹۷۶       | ۰/۲۸۲۷         | ۲۷                     | ۴۵%/۰۰                |
| ۱۱   | اردبیل - مشگین‌شهر     | ۱/۴۸۳۳                  | ۱/۳۷۳۲              | ۰/۲۰۴۵       | ۰/۲۹۵۱         | ۲۹                     | ۴۸%/۳۳                |

جدول ۷- تنوع ژنتیکی بر مبنای شاخص‌های تنوع نی و شانون درون اکوتیپ‌های کل پونه

Table 7. Genetic diversity based on Ni and Shannon diversity indices within whole *Mentha longifolia* ecotypes

| ردیف | اکوتیپ کل | تعداد کل آلل مشاهده شده | تعداد آلل مؤثر | شاخص نی (He) | شاخص شانون (I) |
|------|-----------|-------------------------|----------------|--------------|----------------|
| ۱    | -         | ۳/۰۰۰۰                  | ۱/۸۹۷۸         | ۰/۴۶۹۰       | ۰/۶۶۰۸         |

بر اساس فاصله ژنتیکی نی فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها (۱۵) از ۰/۲۸۵ تا ۰/۶۷۲ بین اکوتیپ‌های هرمزگان و کرمان تا ۰/۶۵۲ بین اکوتیپ‌های یزد و قزوین متغیر هست (جدول ۸).

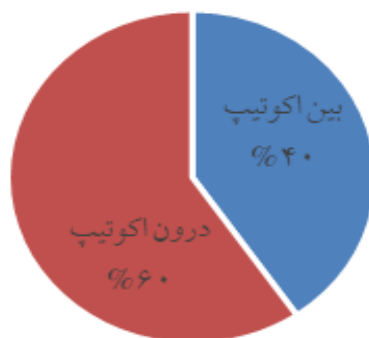
جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پونه با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 8. Genetic distance matrix between *Mentha longifolia* ecotypes using ISSR markers

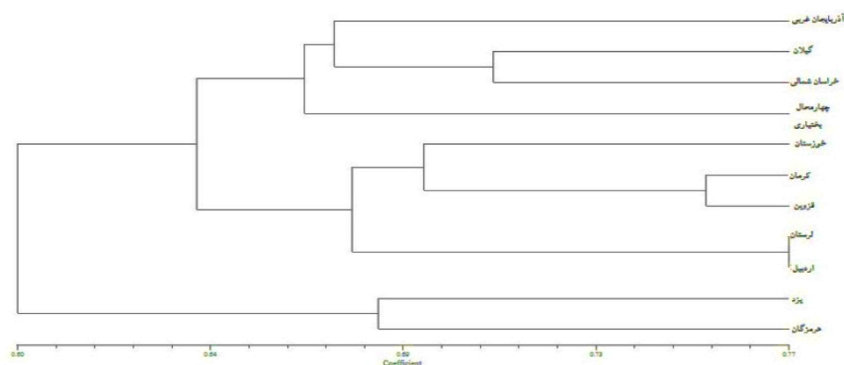
| آذربایجان غربی | یزد   | گیلان | چهارمحال و بختیاری | خوزستان | لرستان | هرمزگان | کرمان | خراسان شمالی | قزوین | اردبیل |
|----------------|-------|-------|--------------------|---------|--------|---------|-------|--------------|-------|--------|
| ۰/۵۲۹          | ۰/۶۱۶ | ۰/۴۶۹ | ۰/۵۳۶              | ۰/۴۴۵   | ۰/۶۱۰  | ۰/۶۷۲   | ۰/۵۷۵ | ۰/۳۴۹        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۳۸          | ۰/۴۵۱ | ۰/۴۶۹ | ۰/۴۶۹              | ۰/۵۰۵   | ۰/۶۳۱  | ۰/۴۶۸   | ۰/۴۷۴ | ۰/۲۸۵        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۰۸          | ۰/۴۵۱ | ۰/۴۶۹ | ۰/۴۶۹              | ۰/۴۴۵   | ۰/۶۳۱  | ۰/۴۶۸   | ۰/۴۷۴ | ۰/۲۸۵        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۰۸          | ۰/۴۵۱ | ۰/۴۶۹ | ۰/۴۶۹              | ۰/۴۴۵   | ۰/۶۳۱  | ۰/۴۶۸   | ۰/۴۷۴ | ۰/۲۸۵        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۵۵۴          | ۰/۵۵۹ | ۰/۳۸۴ | ۰/۴۱۲              | ۰/۴۱۲   | ۰/۴۱۲  | ۰/۳۵۹   | ۰/۳۴۹ | ۰/۳۴۹        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۰۳          | ۰/۳۸۴ | ۰/۴۱۲ | ۰/۴۱۲              | ۰/۴۱۲   | ۰/۴۱۲  | ۰/۳۵۹   | ۰/۳۴۹ | ۰/۳۴۹        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۴۲          | ۰/۴۲۱ | ۰/۴۲۵ | ۰/۴۲۵              | ۰/۴۲۵   | ۰/۴۲۵  | ۰/۳۵۹   | ۰/۳۴۹ | ۰/۳۴۹        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۳۶۰          | ۰/۵۴۹ | ۰/۳۴۸ | ۰/۳۴۸              | ۰/۳۴۸   | ۰/۳۴۸  | ۰/۳۴۸   | ۰/۳۴۸ | ۰/۳۴۸        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۵۲          | ۰/۶۵۲ | ۰/۴۳۴ | ۰/۴۳۴              | ۰/۴۳۴   | ۰/۴۳۴  | ۰/۴۳۴   | ۰/۴۳۴ | ۰/۴۳۴        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |
| ۰/۴۲۸          | ۰/۳۴۴ | ۰/۴۳۰ | ۰/۳۸۹              | ۰/۳۳۷   | ۰/۲۶۱  | ۰/۴۱۳   | ۰/۲۷۶ | ۰/۲۷۶        | ۰/۴۶۴ | ۰/۴۶۴  |

جدول ۹- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس داده‌های ISSR در اکوتیپ‌های مورد مطالعه پونه  
 Table 9. Molecular analysis of variance based on ISSR data in studied *Mentha longifolia* ecotypes

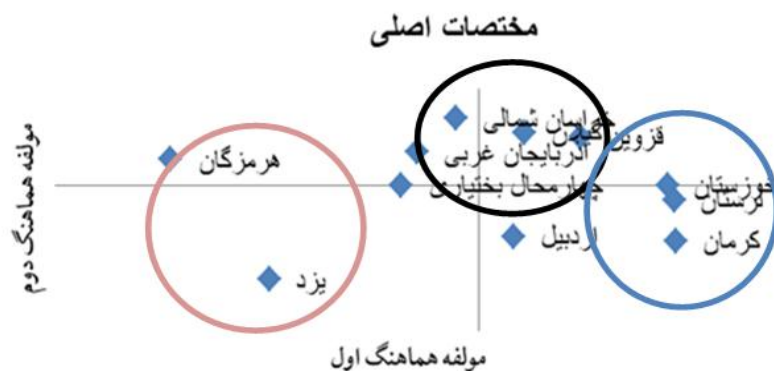
| منبع تغییر     | درجه آزادی (df) | میانگین مربعات (MS) | درصد واریانس | F <sub>ST</sub> | واریانس (Est) |
|----------------|-----------------|---------------------|--------------|-----------------|---------------|
| بین اکوتیپ‌ها  | ۱۰              | ۲۵/۲۹۱              | ۴۰           | -               | ۵/۶۵۳         |
| درون اکوتیپ‌ها | ۲۲              | ۸/۳۳۳               | ۶۰           | ۰/۴۰۴**         | ۸/۳۳۳         |



شکل ۱- درصد واریانس مولکولی بین و درون اکوتیپ‌های پونه بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی  
 Figure 1. Percentage of molecular variance between and within *Mentha longifolia* ecotypes based on the results of molecular analysis of variance



شکل ۲- گروه‌بندی اکوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه نشانگرهای ISSR  
 Figure 2. Grouping of studied ecotypes based on ISSR marker similarity matrix



شکل ۳- تجزیه PCA مربوط به گروه‌بندی ۱۱ اکوتیپ پونه  
 Figure 3. PCA analysis related to grouping of 11 *Mentha longifolia* ecotypes

قبل از اجرای یک برنامه درازمدت اصلاحی، معمولاً مطالعات ژنتیکی انجام می‌گردد تا بدین‌وسیله اطلاعاتی در مورد مقدار و ماهیت تنوع ژنتیکی و همبستگی صفات به دست آید و بر اساس یک برنامه مؤثر اصلاحی نظیر گزینش یا تلاقی برای اصلاح یک رقم به اجرا برسد. در این پژوهش از ۱۵ آغازگر ISSR استفاده شد که چندشکلی قابل‌توجهی نشان دادند. درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. نتایج این مطالعه با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش امیری و همکاران (۲) مشابهت داشت. در تحقیق دیگری که تنوع ژنتیکی سه گونه مرزه با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد گزارش شد (۹). همچنین در این تحقیق بیشترین تعداد نوار چند شکل به ترتیب مربوط به نشانگر P23 بود. بر اساس دو نتیجه چندشکلی و تعداد باندهای چندشکلی تنوع ژنتیکی مناسبی مشاهده گردید. از آنجاکه یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آل‌های مؤثر هست (۲۴). بر اساس این نتایج می‌توان گفت که نشانگر p9 توانسته بیشترین تمایز را بین ارقام نشان دهد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آن‌ها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند و معیار مناسب و دقیق‌تری از میزان تنوع ژن‌ها را ارزیابی می‌کند که به‌طور غیر وابسته از تعداد نمونه عمل می‌کند (۲۸). در پژوهش اسفندیاری و همکاران (۷) میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۳۷۲+ مشاهده شد و دامنه تغییرات آن بین ۰/۳۱۸ تا ۰/۴۵۳+ متغیر بود. در بررسی شاه‌قبادی و همکاران (۲۳) مقدار (PIC) آغازگرها بین ۰/۲۳ تا ۰/۳۲+ با میانگین ۰/۲۸+ به دست آمد که با داده‌های تحقیق حاضر همپوشانی نداشت. برای دانستن روابط بین ارقام، شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها نیز محاسبه گردیدند. نتایج حاکی از آن می‌باشد که سهم بیشتری از تنوع کل به تنوع بین ارقام مربوط می‌شود.

نتایج میانگین تنوع ژنتیکی درون (Hs)، و کل (Ht) حاکی از آن هست که سهم بیشتری از تنوع کل به تنوع بین ارقام مربوط می‌شود. در مطالعه شاه‌قبادی و همکاران (۲۳) که بر روی جمعیت‌های *Pistacia atlantica* D. انجام گرفت، شاخص تمایز بین جمعیت‌ها (Gst) بر اساس ISSR برابر ۰/۲۸+ برآورد شد. همچنین شاخص (Nm) که نمایانگر فراوانی جریان ژنی در بین جمعیت‌ها است برابر با ۱/۴۳ برآورد شد. در این تحقیق برای دانستن روابط بین ارقام، شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها نیز محاسبه گردیدند. میانگین تنوع ژنتیکی درون (Hs)، ۰/۱۸۱۴+ و کل (Ht) ۰/۴۶۹۰+ محاسبه گردید. همچنین میانگین درجه تمایز ژنی (Gst) بین ارقام پونه موردبررسی در تمام مکان‌ها ۰/۶۱۳۳+ محاسبه گردید.

یکی از کاربردهای فاصله ژنتیکی این هست که از آن می‌توان در برنامه‌های دو رگ‌گیری در راستای تولید نتایج برتر از والدین استفاده کرد. به دلیل اینکه هرچه والدین از هم فاصله داشته باشند، امکان تولید هتروزیس بیشتر می‌شود و احتمال موفقیت در به وجود آمدن ژنوتیپ‌های برتر افزایش می‌یابد. همین‌طور تعیین فاصله ژنتیکی ارقام در اصلاح نباتات دارای اهمیت زیادی هست. در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *Dactylus glumerata* با نشانگر ISSR توسط رحمتی و شیروانی (۱۷) میانگین تشابه بین اکوتیپ‌ها برابر با ۰/۵۵+ شد که تنوع متوسط اکوتیپ‌های *D. glumerata* را نمایان می‌کند. بیشترین تشابه را اکوتیپ‌های اردبیل ۲ و تبریز با ۰/۹۷+ و کمترین تشابه را اکوتیپ اردبیل ۱ و کرج ۳ با مقدار ۰/۱+ نشان دادند. که در این تحقیق بر اساس شاخص شانون و نی دو جمعیت کرمان و یزد به ترتیب دارای بالاترین و کمترین مقدار این دو صفت بودند. مشخص شد که وضعیت تنوع ژنتیکی درون ارقام بر اساس شاخص شانون مشابه تنوع ژنی نی بود. تنوع ژنی نی که معمولاً مربوط به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نامیده می‌شود، احتمال تفاوت در دو آل انتخاب‌شده به‌طور تصادفی از دو فرد بیان می‌کند و تفاوت بین دو موجود به‌وسیله فاصله‌ی ژنتیکی است و می‌تواند به با کمک اختلاف آلی بیان شود (۱۵).

در بررسی خدادوست و همکاران (۱۱) نتایج آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون جمعیتی و بین جمعیتی در گونه سیب شرقی (*Malus orientalis*) به ترتیب ۹۴ و ۶ درصد به دست آمد. در این تحقیق نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس مولکولی بر اساس آغازگرهای مورد مطالعه نشان داد که واریانس بین اکوتیپ‌های پونه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۹). بنابه میانگین درجه تمایز ژنی، ۴۰ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین اکوتیپ‌ها تعلق داشت و ۶۰ درصد آن مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها است (شکل ۱).

یکی از متداول‌ترین روش‌های آماری چند متغیره برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها می‌توان تجزیه خوشه‌ای را نام برد. یکی از متداول‌ترین الگوریتم برای تجزیه خوشه‌ای UPGMA است. در مطالعه محمدی‌آگوز (۱۳) گروه‌بندی جمعیت‌های سماق (*Rhus coriaria* L.) با استفاده از الگوریتم UPGMA نشان داد که دو جمعیت آغبراز-هوراند و نیر-ارسباران بافاصله ژنتیکی ۵/۲۷ در یک گروه قرار گرفتند که بیانگر قرابت ژنتیکی بیشتر آن‌ها است. جمعیت نیر دره‌سی و کچله در گروه دوم و جمعیت خان دره‌سی در گروه بعدی قرار گرفت. در بررسی گنج‌خانلو و همکاران (۸) ۷۷ نمونه خار مریم (*Silybum marianum* L.) به ۹ گروه جداسازی شدند که نتایج نشان‌دهنده‌ی وجود تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها بود. که در این تحقیق گروه‌بندی که بر اساس ماتریس تشابه نشانگرهای ISSR صورت می‌پذیرد، اکوتیپ‌ها را به ۳ گروه تقسیم‌بندی می‌کند. اکوتیپ‌های آذربایجان غربی، گیلان، خراسان شمالی، چهارمحال بختیاری در گروه اول قرار دارد، اکوتیپ‌های خوزستان، کرمان، قزوین، لرستان، اردبیل در گروه دوم قرار دارد، و اکوتیپ‌های یزد،

داده‌های به‌دست‌آمده از نشانگرهای مولکولی چنین امکانی وجود ندارد. دلیل این امر را این می‌توان دانست که چون مارکرهای مولکولی از کروموزوم‌های متفاوت انتخاب می‌شوند در نتیجه پیوستگی بین آن‌ها کم شده و نیاز به مؤلفه‌های بیشتری برای توجیه لازم است. در این مطالعه، توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط دو مؤلفه اول، به دلیل پراکندگی آن‌ها در سطح ژنوم می‌باشد. این تجزیه نیز مانند تجزیه خوشه‌ای به‌خوبی می‌توانیم جدا شدن اکوتیپ‌ها نسبت به همدیگر و همین‌طور فاصله ژنتیکی تمام اکوتیپ‌ها با همدیگر مشاهده نماییم. ژنوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار می‌گیرند در این تجزیه نیز در کنار همدیگر قرار می‌گیرند.

هرمزگان در گروه سوم قرار گرفته است (شکل ۲). همچنین PCA دو مؤلفه اول بیش از ۵۶ درصد واریانس را توجیه کرد و از ماتریس فاصله نی استفاده شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یکی از تکنیک‌های چند متغیره برای گروه‌بندی بر پایه ماتریس ضریب تشابه بین ارقام انجام می‌گردد و درباره تمایز گروه اصلی اطلاعات مفیدتری ارائه می‌نماید. این تکنیک به‌عنوان تکنیک مکمل تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی و بررسی روابط ژنتیکی بین ارقام انجام می‌گردد. ماتریس فاصله ژنتیکی نی به‌عنوان ماتریس اولیه در انجام محاسبات و تجزیه‌های مربوطه کاربرد دارد. صفات کمی در بیشتر موارد و به‌ویژه زمانی که صفات دارای همبستگی مناسب و بالایی باشند دو الی سه مؤلفه اول آن‌ها بیش از ۹۰٪ تغییرات بین صفات را توجیه می‌کنند، اما در

### منابع

- Altintas, S., F. Toklu, S. Kafkas, B. Kilian, A. Brandolini and H.O. Zkan. 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Amiri, P., A. Ismaili and J. Hadian. 2017. Investigation of genetic diversity of squash eggplant populations (*Cucurbita pepo* var. *Styriaaca*) using ISSR molecular markers, *Plant Genetics Research*, 2: 17-28 (In Persian).
- Bot, J.L. 2009. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Angiosperm Phylogeny Group*, 161: 105-121.
- Craig, J.W. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal Clinical Nutrition*, 70: 491-499.
- Ebrahimi, M.A., M. Tohidfar, M. Karimi and F. Zawarei. 2015. Determination of genetic uniformity in transgenic cotton plants using DNA markers (RAPD and ISSR) and SDS-PAGE. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3(2): 36-43.
- Ebrahimpour, M. 2015. Fabrication and characterization of bilayer nanoparticles made of non-ionic surfactant containing black cumin essential oil, Master Thesis in Biology, M.Sc Payame Noor University, Taft Center, Yazd, 56 (In Persian).
- Esfandiari, S., M. Farshadfar, H. Safari, H. Shirvani and S. Esfandiari. 2017. Investigation of genetic diversity of (*Teucrium polium*) ecotypes using ISSR molecular marker. *Journal of Genetic Research and Breeding Iranian Range and Forest Plants*, 1: 135-147 (In Persian).
- Ganj Khanlu, A., A. Talei, P. Moradi and M. Yekdast. 2017. Evaluation of Genetic Diversity of (*Silybum marianum* L.) Using ISSR Markers, *Iranian Crop Science*, 4: 1115-1124 (In Persian).
- Kameli, M., S.M. Hesamzadeh Hejazi and M. Ebadi. 2013. Assessment of genetic diversity on populations of three *Satureja* species in Iran using ISSR markers. *Scholars Research Library*, 4: 64-72.
- Kang, M.J., S. Sundan, G.A. Lee, H.C. Ko, J.W. Chung, Y.C. Huh and et al. 2013. Genetic diversity and population structure of Korean mint agastache *rugosa* (Fisch and Meyer) Kuntze (Lamiaceae) Using ISSR Markers. *Korean Journal of Plant Resources*, 26(3): 362-369.
- Khodadoost, A., H. Yousefzadeh, N. Amirchakmaqi, H. Abdollahi and A. Hosseinzadeh Kolagar. 2016. Genetic diversity of eastern apple (*Malus orientalis Uglitz*) Hyrcanian forest of Iran, using ISSR-PCR molecular markers, *Journal of Cellular and Molecular Research*, 4: 359-369 (In Persian).
- Mojarad Ashna Abad, M., S. Hosseini, A. Sanbali and R. Heidari. 2018. Study of genetic diversity of the population of the species (*Tanacetum polycephalum*) of West Azerbaijan using ISSR molecular marker, two journals of genetic research and breeding Range and forest plants of Iran, 2: 268-278 (In Persian).
- Mohammadi Alagoz, R., R. Darvishzadeh, A. Alijanpour, H. Hatami Maleki and R. Heidari. 2018. Investigation of genetic diversity of different populations of Iranian Sumac (*Rhus caritaria* L.) using ISSR marker, two scientific-research quarterly journals of genetic research and breeding of rangeland and forest plants in Iran, 2: 196-206 (In Persian).
- Mohammadi, A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants. *Crop Science*, 43:48-1235.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between population. *The American Naturalist*, 106(646): 283-292.
- Nikkerdar, F., M. Farshadfar, M.A. Ebrahimi and H. SHirvani. 2018. Genetic Diversity among Fennel (*Fueniculum Vulgare Mill.*) Landrace using Scot Markers. *Journal of Crop Breeding*, 9(24): 95-102 (In Persian).



17. Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
18. Rahmati, H. and H. Shirvani. 2018. Investigation of genetic diversity of *Dactylis glomerata* ecotypes using ISSR molecular markers, *Journal of Cellular and Molecular Research*, 1: 67-78 (In Persian).
19. Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 1.8, Exeter Software, Setauket, (Applied Biostatistics Inc., New York).
20. Saeidi, S., K. Hassanpour, M. Ghamgosha, M. Heiat, Taheri and R.A. Mirhosseini. 2014. Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of (*Mentha longifolia* L.) and hydroalcoholic extract of (*Zataria multiflora* Boiss) plants against important human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12): 972-975.
21. Sanam Safaei Chaeikar, S., M. Rahimi and SH. Khaghani. 2019. Identification of ISSR and RAPD Molecular Markers Associated with Agronomic Traits in Lemon Balm (*Melissa Officinalis*). *Journal of Crop Breeding*, 10(28): 64-72 (In Persian).
22. Saghai-Marooif, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 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.
23. Shah Ghobadiyev, H., N. Shabaniyan, A. Khadivi and M. Rahmani. 2018. Study of genetic diversity of pistachio populations (*Pistacia atlantica* Desf) In Zagros forests based on molecular markers ISSR, IRAP and SCoT, *Journal of Genetic Research and Breeding of Range and Forest Plants of Iran*, 2: 177-195 (In Persian).
24. Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *AT and T Technical Journal*, 27: 379-423.
25. Simmons, M.P., L.B. Zhang, C.T. Webb and K. Muller. 2006. A penalty of using anonymous dominant markers (*AFLPs*, *ISSRs*, and *RAPDs*) for phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. In press.
26. Timmappaiah, W., G. Santhosh, D. Shobha and G.S. Melwyn. 2008. Assessment of genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR marker. *Field Crops Research*, 108: 1-7.
27. Virk, P.S., J. Zhu, H.J. Newbury, G.J. Bryan, M.T. Jackson and B.V. Ford-lloyd. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, 112: 284-275.
28. Zhao, W., Y. Wang, T. Chen, G. Jia, X. Wang, J. Qi and et al. 2007. Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in china: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Sientia Horticulturae*, 115(1): 47-55.
29. Zhu, Y., J.E. Strassmann and D.C. Queller. 2002. Insertion, substitution and the origin of microsatellite. *Genetics Research-Cambridge Core*, 76: 236-227.
30. Zinodini, A., M. Farshadfar, H. Safari, F. Moradi and H. Shirvani. 2013. Study of genetic relationships of some mint species using ISSR markers. *Crop Biotechnology*, 5: 11-21.

## Investigation of Genetic Diversity of Native Ecotypes of Northwestern Medicinal Plant *Mentha longifolia* using ISSR Molecular Markers

Sevda Torkaman<sup>1</sup>, Omid Sofalian<sup>2</sup>, Naser Zare<sup>3</sup> and Samira Hasanian<sup>4</sup>

1- Graduated M.Sc. Student, of Agricultural Biotechnology, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohagheh Ardabili University (Corresponding author: sevdatorkaman21571@gmail.com)

2- Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohagheh Ardabili University

3- Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohagheh Ardabili University

4- PhD Student in Plant Breeding, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohagheh Ardabili University

Received: August 13, 2020

Accepted: January 5, 2021

### Abstract

One of the most important medicinal plants of Iran, Poneh belongs to the mint family. Due to the numerous and very useful medicinal properties of oregano, this plant has attracted many studies. In this study 11 different ecotypes of *Mentha longifolia* belonging to 11 different regions of Iran including West Azarbaijan, Yazd, Gilan, Chaharmahal Bakhtiari, Khuzestan, Lorestan, Kerman, Hormozgan, Khorasan, Qazvin and Ardabil were studied. In order to investigation genetics variety between pennyroyal ecotypes in Mohagheh Ardebili University, an experiment was implemented in framework of complete random block in 11 ecotypes (treatments) and 3 repeats. DNA was extracted and evaluated using 23 different ISSR primers to evaluate the genetic diversity among ecotypes. The results indicated sufficient polymorphism among these ecotypes. A total of 60 clear and scalable bands were produced, 60 of which are polymorphic. In p9 and p8 markers based on Shannon's genetics variety, Ni's gene variety and multiple-shaped content had the most highest and lowest values between cases respectively. Also two mentioned markers had most highest and lowest values for effective alleles number. According to Shannon's and Ni's markers, Kerman and Yazd population had most highest and lowest values for mentioned two features. Also, based on Ni's genetic distance; genetics distance between ecotypes is variable from 0.285 in Kerman and Qazvin to 0.672 in Hormozghan and Kerman and 0.625 in Yazd and Qazvin. Grouping is done based on ISSR markers similarity matrix and ecotypes were classified in 3 cases. In PCA, 2 primitive components describe more than 56% of variance. Existence of genetics variety between pennyroyal ecotypes for goals selection possibility.

**Keywords:** Ecotype, Genetic Diversity, ISSR, *Mentha longifolia*, PCR