

ارزیابی تنوع ژنتیکی آویشن‌های دناهی (*Thymus deanensis*) ایران با استفاده از نشانگر ملکولی ISSR

Evaluation of genetic variability in Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, by use of inter simple sequence repeat (ISSR) markers

بهنام مندک^۱، ولی‌اله محمدی^{۱*}، حسن زینالی^۱، جواد هادیان^۲

۱- به‌ترتیب کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی

Mondak B¹, Mohammadi VA^{*1}, Zeinali H¹, Hadian J²

1. MSc Students, Associate Professor, Professor, College of Agriculture and Natural Resources,
University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Assistant Professor, Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti
University, Tehran, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

گیاه آویشن یکی از پرمصرف‌ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۳ جمعیت آویشن دناهی ایران با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR بررسی شد. از بین ۱۲ آغازگر استفاده شده ۱۰ آغازگر باند با کیفیت مناسب تولید کردند و در نهایت ۵۷ آلل شناسایی شد. اندازه باندها در محدوده ۲۰۰-۲۰۰۰ جفت باز بود. تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های ISSR، جمعیت‌ها را در دو گروه مستقل قرار داد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از ۰/۰۴۱ برای جمعیت‌های لرستان و کردستان تا ۰/۲۸۲ برای جمعیت لرستان و اصفهان متغیر بود. بررسی تنوع درون جمعیت‌ها بر اساس میانگین تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون نشان داد که جمعیت داران اصفهان بیشترین میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ($I=0/43$ و $h=0/29$) و جمعیت سمیرم اصفهان کمترین میزان تنوع درون جمعیتی ($I=0/2$ و $h=0/13$) را دارا هستند. مقدار تنوع درون جمعیت‌ها ۷۵ درصد و تنوع بین جمعیت‌ها ۲۵ درصد بود. آغازگرهایی که دارای موتیف‌های AC و AG بودند باندهای واضح‌تری نسبت به سایر آغازگرها تولید کردند. نتایج نشان داد که آویشن‌های دناهی ایران دارای تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بوده و دورگ‌گیری جمعیت‌هایی مانند اصفهان و لرستان که دورترین فاصله ژنتیکی را دارند ممکن است به ایجاد ارقام مطلوب‌تر منتهی شود.

واژه‌های کلیدی

آویشن

تنوع ژنتیکی

گیاهان دارویی

نشانگر ملکولی ISSR

مقدمه

تنوع ماده خام اصلاح نباتات و بررسی تنوع ژنتیکی نخستین مرحله برنامه‌های به‌نژادی است. موفقیت گذشته حال و آینده به نژادگران به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها بستگی داشته و دارد. موفقیت انتخاب به وجود و شناخت دقیق تنوع بستگی دارد (Nemth 2000; Bernath 2002). آگاهی از تنوع ژنتیکی در گونه‌های زراعی و خویشاوندان وحشی آنها یکی از نیازهای اساسی در جهت بهبود زراعی این گیاهان است (Saeidi et al. 2008). به طور کلی قدم اول در اصلاح خصوصیات گیاهی، درک ساختار ذخایر توارثی است. اطلاع از تنوع ژنتیکی برای انتخاب دقیق والدین مناسب جهت تولید دورگ‌های قوی، دارای اهمیت فراوان است. کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های به‌نژادی، امکان سازمان‌دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد (Abdmishani et al. 1992).

آویشن (Thymus) یکی از جنس‌های مهم تیره نعناع (Lamiaceae) می‌باشد که در تمام فارماکوپه‌های معتبر از پیکر رویشی آن به عنوان دارو یاد شده و خواص دارویی آن مورد تایید قرار گرفته‌است (Jamzad 2009). اسانس این گیاه در ردیف ۱۰ اسانس برتر دنیا قرار دارد (Brown 2002; Omid Baigi 2009) از حدود ۲۵۰ گونه از جنس آویشن، ۱۴ گونه در ایران وجود دارد. که از بین آنها ۴ گونه *Th. daenensis*, *Th. persicus*, *Th. carmanicus* و *Th. trautretteri* شایع هستند (Jamzad 1996). بیشترین پراکندگی این جنس در استان‌های شمالی و غربی کشور است. از گیاهان این جنس به عنوان داروی ضدسرفه، هضم کننده، خلط آور، ضدنفخ و درمان سرماخوردگی در طب سنتی ایران استفاده می‌شود (Zargari 1999). همچنین از آویشن و ترکیبات موجود در آن در صنایع مختلف از جمله در ساخت انواع عطر، ادکلن، مطبوع کننده‌های هوا، بوزدها، طعم‌دهنده‌های ترکیبی، ساخت رزین‌ها، حشره‌کش‌ها، داروهای ضدعفونی‌کننده و... استفاده‌های فراوانی به عمل می‌آید (Stahl-Biskup and Saez 2002). در بین داروهای تولید شده از گیاهان دارویی، این گیاه پس از نعناع در رتبه دوم قرار دارد (Fakhr-e-Tabatabaei

2006). در مطالعه‌ای که بر روی آویشن‌های دنايي ایران صورت گرفته گزارش شد که با توجه به درصد بالای ترکیبات فنولی به ویژه تیمول در گونه دنايي می‌توان این گونه را به عنوان جایگزین مناسبی برای گونه اروپایی مطرح کرد (Nickavar et al. 2004). مطالعات در سطح جمعیت نشان می‌دهد که نشانگرهای DNA کارایی زیادی در بررسی تنوع داشته و اطلاعات زیادی را فراهم می‌آورند. این نشانگرها گروه‌های ژنتیکی و تشابه و تفاوت بین آنها را مشخص می‌سازند و در تخمین تنوع درون گروه‌ها و مطالعه روابط تکاملی آنها با خویشاوندان وحشی نیز بسیار مفیدند (Sharma et al. 1996). در سالهای اخیر استفاده از نشانگرهای ملکولی در ارزیابی تنوع ژنتیکی به یک ابزار مهم در بررسی و مطالعه گونه‌های مختلف گیاهی از قبیل گیاهان دارویی و معطر تبدیل شده است (Sarwat and Srivastava 2008).

یکی از تکنیک‌هایی که اخیراً در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده پژوهشگران قرار گرفته تکنیک ISSR است. این تکنیک ترکیبی از مزیت‌های تکرارپذیری و دقت AFLP و SSR و فراگیری و عمومیت RAPD را دارا می‌باشد. در واقع این تکنیک به دلیل داشتن آغازگرهایی با طول ۲۵-۱۶ جفت باز تکرارپذیری بالایی دارد. به علاوه وجود این تعداد باز سبب بالا بردن دمای اتصال (60°C - 45°C) می‌شود که این موضوع خود سبب افزایش سختی کار (دقت) می‌شود. دو مورد از مزیت‌های مهم این نشانگر این است که اولاً نیازی به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم ندارد و ثانیاً هزینه این روش نسبت به روش‌هایی نظیر SSR و AFLP پایین‌تر و اجرای آن نیز راحت‌تر است (Aga et al. 2005). مطالعه بر روی قابلیت تکرارپذیری ISSR نشان داده که تنها باندهای ضعیف قابلیت تکرار ندارند و حدود ۹۵-۹۲ درصد از قطعات در ژنوم افراد مختلف یک گونه و همچنین در PCRهای مختلف قابل مشاهده و بررسی است (Fang 1998). (Hang et al. 2011) به بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و بین جمعیتی مربوط به نمونه‌های آرتمیزیای شمال شرق چین با استفاده از ۸ آغازگر ISSR پرداختند. (Shafai et al. 2011) ۲۵ نمونه آرتمیزیای

¹ Strigency

مربوط به ۵ ناحیه کشور را با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR مطالعه کردند. تنوع ژنتیکی و تمایز جغرافیایی ۱۷ توده آویشن دناپی توسط (Rahimmalek et al. 2009) مورد بررسی قرار گرفت. آویشن‌های جمع‌آوری شده از نواحی کوروا، فلورس و گارسوسا با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت (Trindade et al. 2009). در این مطالعه جمعیت‌هایی آویشن دناپی مورد بررسی مربوط به استان‌های مختلف کشور مورد مطالعه و بررسی قرار خواهند گرفت.

هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف آویشن دناپی و تعیین فاصله ژنتیکی موجود در بین جمعیت‌های مختلف برای شناسایی جمعیت‌های دارای بیشترین فاصله از هم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۳ جمعیت از آویشن‌های دناپی ایران مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱). بذور این جمعیت‌ها از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، شرکت پاکان بذر اصفهان و دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد. بذرها در سینی نشا و در محیط کشت کوکویت و پرلیت در گلخانه‌های گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران کاشته شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، در تیر ماه ۱۳۹۱ گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگ از سینی نشا به گلدان‌های سفالی منتقل شدند.

پس از رشد مناسب گیاهچه‌ها به منظور عملیات استخراج DNA از هر جمعیت ۵ گیاه به صورت تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و جوان هر گیاه نمونه‌برداری صورت گرفت. برگ‌های جمع‌آوری شده پس از انجماد در ازلت مایع، به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و استخراج DNA از آنها به مرور زمان و در طی چندین مرحله با استفاده از روش (Saghai-Marroof et al. 1984) با اندکی تغییرات صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی نیز با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ۱۲ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

مبنای انتخاب این آغازگرها بر اساس آغازگرهای به کار رفته در سایر مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌های مختلف آویشن و یا سایر گیاهان خانواده نعناع (Rahim Malek et al. 2009; Trindade et al. 2009; Bigdelo et al. 2011) بود. توالی آغازگرهای به کاررفته در جدول ۲ آورده شده‌اند. حجم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۲۰ میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰ نانوگرم در هر میکرولیتر و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و غلظت نهایی ۴ mM برای $MgCl_2$ و ۰.۲۵ mM برای dNTP و ۰.۵ pmol/μl برای هر کدام از آغازگرها و دو درصد فرمامید در نظر گرفته شد و برنامه تکثیر بصورت Touch down انجام شد. به این صورت که ابتدا واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۳ دقیقه انجام شد. سپس تکثیر نمونه‌ها در ۱۰ چرخه انجام گرفت به گونه‌ای که ابتدا در دمای ۹۳ واسرشته شدند در مرحله اتصال دمای اتصال ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال آغازگر در نظر گرفته شد و در هر چرخه نیم درجه از دما کاسته شد پس از اتمام ۱۰ چرخه تکثیر نمونه‌ها در ۳۰ چرخه جداگانه و به صورت یک واکنش زنجیره‌ای استاندارد انجام شد به بدین صورت که ابتدا نمونه‌ها در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه واسرشته شدند. اتصال آغازگرها در دمای ذوب آغازگر و برای مدت ۵۰ ثانیه صورت گرفت. مدت زمان تکثیر نهایی هم دو دقیقه در نظر گرفته شد پس از اتمام ۳۰ چرخه به منظور اطمینان از تکثیر یک چرخه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و برای مدت زمان ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس به منظور خاتمه دادن به فعالیت آنزیم پلیمرز دما به ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا کرد. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز دو درصد و به مدت دو ساعت با جریان ۹۰ ولت صورت گرفت رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت و در نهایت عکس-برداری از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک انجام گرفت. نمره‌دهی باندها، به صورت یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام شد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC^1) بر اساس فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^N P_i^2$ محاسبه شد (Prasad et al. 2000).

¹ polymorphic information index

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های آویشن مورد بررسی

شماره جمعیت	گونه	منشا	محل نگهداری
۱	<i>Th.deanensis</i>	اصفهان-داران	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۲	<i>Th.deanensis</i>	مرکزی -بنه	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۳	<i>Th.deanensis</i>	خرم آباد - چغلوندي	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۴	<i>Th.deanensis</i>	مرکزی -ورچه	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۵	<i>Th.deanensis</i>	مرکزی-شازند - دره سومافلو	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۶	<i>Th.deanensis</i>	اصفهان - فریدونشهر	شرکت پاکان بذر اصفهان
۷	<i>Th.deanensis</i>	لرستان-ازگنه	سازمان جنگل ها و مراتع کشور
۸	<i>Th.deanensis</i>	اصفهان- سمیرم	دانشگاه شهید بهشتی
۹	<i>Th.deanensis</i>	اصفهان- فریدن	شرکت پاکان بذر اصفهان
۱۰	<i>Th.deanensis</i>	لرستان	شرکت پاکان بذر اصفهان
۱۱	<i>Th.deanensis</i>	اصفهان- میدونک	شرکت پاکان بذر اصفهان
۱۲	<i>Th.deanensis</i>	کردستان	شرکت پاکان بذر اصفهان
۱۳	<i>Th.deanensis</i>	ایلام	دانشگاه شهید بهشتی

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

نام آغازگر	توالی (۵'-۳')
P1	CTCTCTCTCTCTCTG
P2	AGAGAGAGAGAGAGST
P3	AGAGAGAGAGAGAGAGT
P4	CACACACACACACAWT
P5	ACACACACACACACACG
P6	GAGAGAGAGAGAGAGAC
P7	CACACACACACACACAG
P8	TCGTCGTCGTCGTCGC
P9	TCTCTCTCTCTCTCTC
P10	ACACACACACACACACC
P11	AGAGAGAGAGAGAGAGC
P12	AGAGAGAGAGAGAGAGT

دندروگرام براساس روش UPGMA و بر اساس ماتریس تشابه از نرم‌افزار NTSYS استفاده شد.

نتایج و بحث

از بین ۱۲ آغازگر به کاررفته در این پژوهش ۱۰ آغازگر پلی مورفسم نشان داده و دو آغازگر P₈ و P₁₀ الگوی مناسبی جهت ارزیابی و بررسی جمعیت‌های مورد مطالعه تولید نکردند. در مجموع ۵۷ آلل شناسایی شد که در این بین آغازگرهای P₄, P₂ و P₅ با ۴ آلل دارای کمترین تعداد آلل و آغازگر P₆ با ۸ آلل دارای بیشترین تعداد آلل در بین آغازگرهای مورد بررسی بود. میانگین

پارامترهای تعداد آلل‌های مشاهده شده^۱ (Na)، میزان جریان ژنی^۲ (Nm)، مقادیر فاصله ژنتیکی^۳ (D)، شباهت ژنتیکی^۴ (I)، ماتریس تشابه، تعداد آلل‌های مؤثر^۵ (Ne) و تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx v. 6. 1 (Peakall and Smouse 2006) محاسبه شد. ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها (GST) با استفاده از نرم‌افزار popgen محاسبه شد و برای رسم

¹ Number of observed allele

² Estimate of gen flow

³ genetic distance

⁴ genetic identity

⁵ Number of effective allele

تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر $5/7$ بود (جدول ۳). اندازه باندهای حاصل از آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش در محدوده ۲۰۰-۲۰۰۰ جفت باز بود. (Rahim malek et al. 2009). نیز در بررسی برخی از جمعیت‌های آویشن دنیایی گزارش کردند که اندازه قطعات به دست آمده با استفاده از آغازگرهای مختلف بین ۲۰۰۰-۱۵۰ جفت باز بود. از آنجا که تعداد آلل هر نشانگر، یکی از شاخص‌هایی است که مناسب بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Roder et al. 1998)، بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل زیادی نشان داده‌اند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند. با بررسی آلل‌ها مشاهده شد که برخی از آغازگرها در بعضی از ژنوتیپ‌ها هیچ باندهای تکثیر نکردند. با توجه به سالم بودن DNA و چند بار تکرار آزمایش، به نظر می‌رسد که وقوع جهش در یک یا دو طرف ناحیه تکرار شونده مانع چسبیدن آغازگرها و تکثیر ناحیه مورد نظر شده است.

بیشترین درصد چندشکلی با متوسط $70/43$ درصد مربوط به آغازگر P_9 و کمترین درصد چندشکلی با متوسط $39/13$ درصد مربوط به آغازگر P_4 بود. متوسط درصد چندشکلی در بین تمامی آغازگرهای مورد استفاده $52/2$ درصد بود (جدول ۳). در تحقیقی که توسط Shafai et al. (2011) بر روی ۲۵ نمونه آرتیمیزیانجام شده متوسط درصد چند شکلی $66/67$ درصد بود. (2009) Trindade et al. نیز در بررسی *T.caespititus* درصد چندشکلی بسیار بالایی را در این نوع آویشن گزارش کردند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده برای ۱۰ آغازگر مورد استفاده با متوسط $0/68$ از $0/55$ برای آغازگر P_{12} تا $0/92$ برای آغازگر P_9 متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکل، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی بالا و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد (Agrama and Tuinstra 2003). بنابراین آغازگر P_9 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر نشانگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند.

میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده برابر $1/12$ بود که بیشترین آن با متوسط $1/46$ مربوط به آغازگرهای P_5 و P_9 و کمترین آن با متوسط $1/01$ مربوط به آغازگر P_1 بود. تعداد آلل‌های مؤثر نیز با متوسط $1/34$ از دامنه $1/48$ برای آغازگر P_5 تا $1/29$ برای آغازگر P_4 متغیر بود. شاخص اطلاعاتی شانون (I) با متوسط $0/29$ ، از $0/21$ برای آغازگر P_7 تا $0/37$ برای آغازگر P_9 متغیر بود. ضریب شانون نیز همانند محتوای اطلاعات چندشکلی میزان چند شکلی آغازگر را نشان می‌دهد (جدول ۳). مشاهده شد که آغازگرهایی که دارای موتیف‌های AC و AG بودند نسبت به سایر آغازگرها باندهایی با وضوح بیشتر تولید کردند (Gregor et al. 2000) و (Rahimmalek et al. 2009) نیز در مطالعه تنوع ملکولی آویشن های دنیایی ایران و گوجه فرنگی با استفاده از آغازگر ISSR این موضوع را گزارش کردند. در مطالعات گزارش شده که در گیاهان، موتیف‌های متفاوت باند مناسب تولید کردند برای مثال در برنج آغازگرهای دارای موتیف GA و AG باندهای با کیفیت بالا تولید می‌کنند (Joshi et al. 2000).

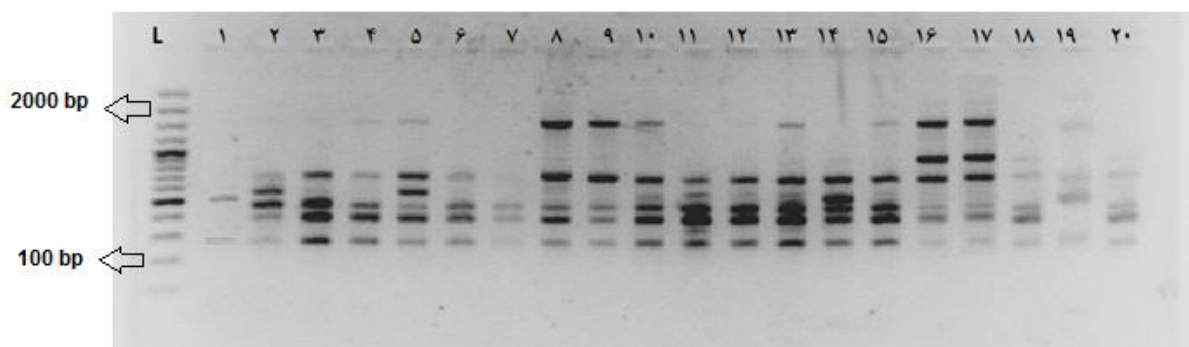
ضریب تمایز ژنی بین جمعیت (G_{ST}) به طور متوسط برابر $0/341$ محاسبه شد که آغازگرهای P_2 و P_{12} به ترتیب با $0/489$ و $0/204$ بیشترین و کمترین مقدار را از نظر این شاخص نشان دادند. آماره G_{ST} نسبت تنوع بین جمعیتی را نسبت به تنوع کل نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود $34/1$ درصد از تنوع مشاهده شده در کل جمعیت‌ها مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها بوده و $66/9$ درصد تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد. میزان جریان ژنی (N_m) برای تمامی آغازگرها برابر $0/963$ محاسبه شد که این مقدار متأثر از ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها بوده و همبستگی منفی با آن دارد. در میان آغازگرهای مورد بررسی نیز بیشترین جریان ژنی در میان جمعیت‌ها برای آغازگر P_6 و کمترین جریان ژنی برای آغازگر P_2 مشاهده شد. شباهت ژنتیکی بالا می‌تواند ناشی از ادغام و هم‌پوشانی زیاد جمعیت‌ها باشد که از جریان ژنی بین جمعیت‌ها حاصل شده‌است.

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها میانگین شاخص‌های درون جمعیتی شامل آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H) و شاخص شانون (I) برای جمعیت‌های مورد بررسی محاسبه شد (جدول ۴).

جدول ۳- ویژگی‌های ۱۰ نشانگر ISSR مورد بررسی در ژنوتیپ‌های آویشن

Primer	N	Na±SE	Ne±SE	I±SE	H _T	H _s	Gst	Nm	Pol%	PIC
P1	۷	۱/۰۱±۰/۰۷	۱/۳۲±۰/۰۳۱	۰/۲۷±۰/۰۲۴	۰/۲۸۳±۰/۰۰۶	۰/۱۸۴±۰/۰۰۶	۰/۳۲۵	۱/۱۷	۵۴/۴	۰/۶۸
P2	۴	۱/۰۳±۰/۰۹۳	۱/۳۲±۰/۰۴۴	۰/۲۵±۰/۰۳۳	۰/۳۱±۰/۰۴۵	۰/۱۷۷±۰/۰۴۱	۰/۴۸۹	۰/۶۴	۴۱/۳	۰/۵۷
P3	۵	۱/۱۱±۰/۰۸۹	۱/۳۳±۰/۰۳۸	۰/۲۷±۰/۰۲۸	۰/۲۹±۰/۰۲۱	۰/۱۸۸±۰/۰۰۵	۰/۳۱۵	۱/۲۴	۵۱/۳	۰/۶۴
P4	۴	۱/۰۹±۰/۰۸۶	۱/۲۹±۰/۰۴۲	۰/۲۳±۰/۰۳۱	۰/۲۹۷±۰/۰۰۵	۰/۱۶۰±۰/۰۰۳	۰/۴۳۱	۰/۹۱۳	۳۹/۱	۰/۵۸
P5	۴	۱/۴۶±۰/۰۷۲	۱/۴۸±۰/۰۰۴	۰/۳۶±۰/۰۳۳	۰/۴۵۸±۰/۰۱۲	۰/۲۵۰±۰/۰۰۱	۰/۴۲۹	۰/۹۳۷	۵۷/۶	۰/۷۷
P6	۸	۱/۱۴±۰/۰۷۳	۱/۳۳±۰/۰۲۷	۰/۲۹±۰/۰۲۱	۰/۲۵۶±۰/۰۲۴	۰/۱۹۶±۰/۰۱۱	۰/۲۳۴	۱/۷۷	۵۶/۵	۰/۷۰
P7	۶	۱/۰۳±۰/۰۸۳	۱/۳۳±۰/۰۳۴	۰/۲۸±۰/۰۲۶	۰/۲۹۶±۰/۰۳۰	۰/۱۹۱±۰/۰۱۲	۰/۳۴۰	۱/۲۹	۴۸/۵	۰/۷۱
P9	۵	۱/۴۶±۰/۰۸۰	۱/۴۲±۰/۰۳۵	۰/۳۷±۰/۰۱۸	۰/۳۶±۰/۰۰۳	۰/۲۵۰±۰/۰۰۲	۰/۳۱۰	۱/۲۸	۷۰/۴	۰/۹۲
P11	۷	۱/۱۱±۰/۰۷۷	۱/۳۸±۰/۰۳۲	۰/۳۱±۰/۰۱۷	۰/۳۱±۰/۰۲۶	۰/۲۱۳±۰/۰۱۴	۰/۳۲۳	۱/۱۱	۵۰/۵	۰/۷۷
P12	۷	۰/۹۸±۰/۰۷۹	۱/۲۸±۰/۰۲۸	۰/۲۵±۰/۰۱۵	۰/۲۰۶±۰/۰۰۵	۰/۱۶۸±۰/۰۰۴	۰/۲۰۴	۱/۲۹	۴۹	۰/۵۵
Means	۵/۷	۱/۱۴±۰/۰۸۰	۱/۳۴±۰/۰۳۵	۰/۲۸±۰/۰۲۴	۰/۳۰۶±۰/۰۲۶	۰/۱۹۷±۰/۰۰۵	۰/۳۴	۱/۱۶	۵۲/۲	۰/۶۸

(N) تعداد باند؛ (Na) تعداد آلل مشاهده شده؛ (Ne) تعداد آلل مؤثر؛ (I) شاخص اطلاعاتی شانون؛ (H) تنوع ژنتیکی کل؛ (HS) تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی؛ (Gst) ضریب تمایز ژنی؛ (Nm) جریان ژنی؛ (PIC) محتوای پلی مورفیسم نسبی.



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جمعیت‌های مختلف آویشن توسط آغازگر P9 بر روی ژل آگارز دو درصد. چاهک‌های ۱-۵) مربوط به جمعیت داران اصفهان؛ چاهک‌های ۶-۱۰) مربوط به جمعیت بنه استان مرکزی؛ چاهک‌های ۱۱-۱۵) مربوط به جمعیت چغلوندی خرم آباد؛ و چاهک‌های ۱۶-۲۰) مربوط به جمعیت ورچه استان مرکزی.

۸ با درصد پلی‌مورفیسم ۳۸/۶ کمترین مقدار را از لحاظ این صفت به خود اختصاص دادند که با توجه به اینکه بذور این جمعیت از دانشگاه شهید بهشتی تهیه شده بود و چند نسل انتخاب بر روی آن صورت گرفته می‌توان پایین بودن پلی‌مورفیسم این جمعیت را توجیه کرد. به طور کلی در بین جمعیت‌های مورد بررسی تنوع زیادی وجود داشت. اما تنوع داخل جمعیتی بیشتر بود که این موضوع سبب ممانعت از بروز کامل تنوع بین جمعیتی شده بود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد (جدول ۵) واریانس داخل جمعیت‌ها نسبت به واریانس بین جمعیتی بیشتر می‌باشد.

از نظر تعداد آلل‌های مشاهده شده جمعیت یک با متوسط ۱/۴ بیشترین مقدار را نشان داد. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در کل جمعیت‌های مورد بررسی برابر با ۱/۳۶ بود و بیشترین تعداد آلل مؤثر در جمعیت شماره ۱۴ با میانگین ۱/۷۴ مشاهده شد. از نظر تنوع ژنی نی (H) و شانون (I) نیز جمعیت یک به ترتیب با متوسط ۰/۲۷ و ۰/۴۰ بیشترین مقدار را داشت و جمعیت شماره ۸ با مقادیر ۰/۱۲ و ۰/۱۹ کمترین مقدار این دو شاخص تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دادند. از نظر تعداد باندهای چندشکل نیز جمعیت‌های یک و دو به ترتیب با درصد پلی‌مورفیسم ۷۰/۱۸ و ۶۶/۶۷ بیشترین درصد پلی‌مورفیسم و جمعیت

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های آویشن مورد بررسی

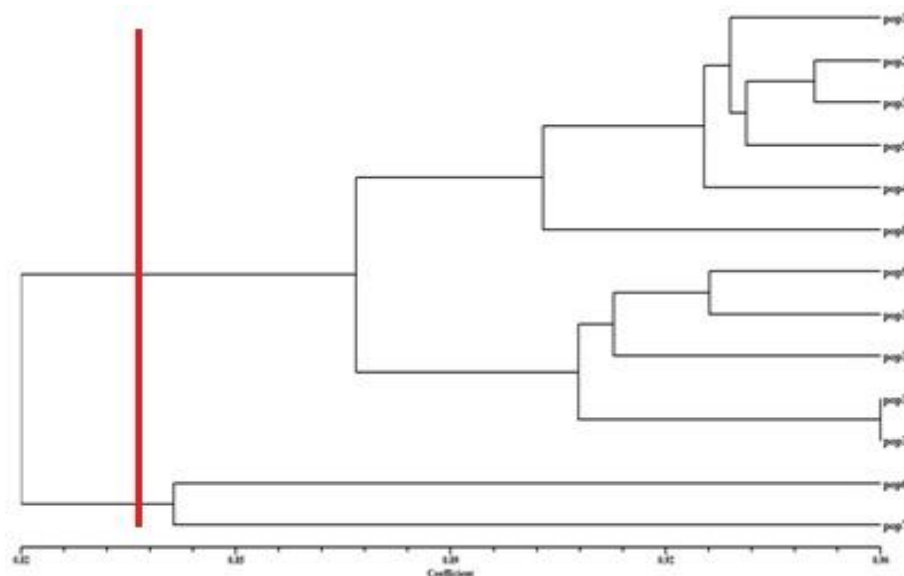
Pol	Poly. band NO	H	I	Ne	Na	
۷۷/۱۸٪	۴۴	۰/۲۹±۰/۱۹	۰/۴۳±۰/۱۲۶	۱/۵۱±۰/۳۷	۱/۷۷±۰/۴۲	جمعیت ۱
۶۶/۶۷٪	۳۸	۰/۲۲±۰/۱۹	۰/۳۴±۰/۲۷	۱/۳۸±۰/۳۶	۱/۶۶±۰/۴۷	جمعیت ۲
۶۳/۱۶٪	۳۶	۰/۲۰±۰/۱۸	۰/۳۰±۰/۲۶	۱/۳۳±۰/۳۵	۱/۶۳±۰/۴۸	جمعیت ۳
۶۱/۴۰٪	۳۵	۰/۲۲±۰/۱۹	۰/۳۳±۰/۲۸	۱/۳۷±۰/۳۷	۱/۶۱±۰/۴۹	جمعیت ۴
۶۱/۴۰٪	۳۵	۰/۲۳±۰/۲۰	۰/۳۴±۰/۲۹	۱/۴۰±۰/۳۹	۱/۶۱±۰/۴۹	جمعیت ۵
۵۰/۸۸٪	۲۹	۰/۲۱±۰/۲۲	۰/۳۰±۰/۳۱	۱/۳۹±۰/۴۳	۱/۵۰±۰/۵۰	جمعیت ۶
۶۱/۴۰٪	۳۵	۰/۲۵±۰/۲۱	۰/۳۷±۰/۳۰	۱/۴۶±۰/۴۱	۱/۶۱±۰/۴۹	جمعیت ۷
۴۳/۸۶٪	۲۵	۰/۱۳±۰/۱۷	۰/۲۰±۰/۲۵	۱/۲۱±۰/۳۱	۱/۴۳±۰/۵۰	جمعیت ۸
۵۴/۳۹٪	۳۱	۰/۲۱±۰/۲۱	۰/۳۱±۰/۳۰	۱/۳۸±۰/۴۲	۱/۵۴±۰/۵۰	جمعیت ۹
۴۷/۳۷٪	۲۷	۰/۱۹±۰/۲۲	۰/۲۷±۰/۳۱	۱/۳۵±۰/۴۲	۱/۴۷±۰/۵۰	جمعیت ۱۰
۴۹/۱۲٪	۲۸	۰/۱۹±۰/۲۱	۰/۲۸±۰/۳۰	۱/۳۵±۰/۴۱	۱/۴۹±۰/۵۰	جمعیت ۱۱
۵۲/۶۳٪	۳۰	۰/۱۸±۰/۲۰	۰/۲۸±۰/۲۸	۱/۳۲±۰/۳۸	۱/۵۲±۰/۵۰	جمعیت ۱۲
۳۸/۶۰٪	۲۲	۰/۱۵±۰/۲۱	۰/۲۲±۰/۲۹	۱/۲۷±۰/۳۹	۱/۳۸±۰/۴۹	جمعیت ۱۳

جدول ۵- تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) برای تنوع بین و درون جمعیت‌های آویشن

PhiPT Prob	PhiPT Value	Polymorphism(%)	Estimated Variance	MS	Df	منابع تغییر
۰/۰۱۰	۰/۲۵	٪۲۵	۲/۶۷	۲۱/۲۰	۱۲	بین جمعیت‌ها
		٪۷۵	۷/۸۳	۷/۸۳	۵۲	درون جمعیت‌ها
		٪۱۰۰	۱۰/۵۰		۶۴	کل

بر اساس نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس روش جاکارد در این تحقیق، داده‌هایی که مقادیر ویژه بالای یک داشتند در ۵ مولفه اصلی قرار گرفتند که در مجموع این مولفه‌ها توانستند ۳۷/۴۷ درصد کل تغییرات را توجیه کنند. در بین این مولفه‌ها، مولفه اول با ۱۰/۳۰ درصد بیشترین مقدار واریانس را توجیه کرد و مولفه‌های دوم و سوم به ترتیب با ۹/۱۵ و ۷/۵۱ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در داده‌های ملکولی هر قدر درصد واریانس اختصاص یافته به مولفه‌های اصلی کمتر باشد توزیع بهتری داشته به طوری که گیاهان درون جمعیت‌ها تنوع بالایی داشته و جمعیت‌ها ناهمگن بودند. مقدار واریانس بین جمعیت‌ها برابر با ۲۵ درصد و مقدار واریانس درون جمعیت‌ها برابر با ۷۵ درصد است (Huan et al. 2011). نیز به بررسی نمونه‌های آرتمیزیای شمال شرق چین پرداخته و تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالایی را

گزارش کردند (Bigdeloo et al. 2011). در مطالعه خود بر روی ۷۰ ژنوتیپ مربوط به ۷ جمعیت آویشن کرمانی با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR گزارش کردند که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی حدود ۶۷ درصد و تنوع بین جمعیتی حدود ۳۳ درصد بود. به طور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. در گونه‌های دگرگشتن به علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است. در مورد این گونه‌ها در صورتی که جریان ژنی بین رویشگاه‌ها تحت تاثیر عوامل غیرطبیعی چون تخریب رویشگاه‌ها در اثر چرای بی‌رویه، چرای مفرط و سایر عوامل قطع شود، فاصله ژنتیکی جمعیت‌های منقطع افزایش می‌یابد و به علت افزایش



شکل ۳ - دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های آویشن براساس الگوریتم UPGMA با روش جاکارد

جدول ۶- مقادیر همسانی ژنتیکی زیر قطر اصلی و فاصله ژنتیکی (بالای قطر اصلی) نی (۱۹۷۸) جمعیت‌های آویشن

جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	***	۰/۰۷۵	۰/۰۵۷	۰/۰۶۸	۰/۰۷۰	۰/۱۷۳	۰/۱۷۲	۰/۰۹۴	۰/۱۴۸	۰/۱۱۷	۰/۱۸۶	۰/۰۹۲	۰/۱۰۵
۲	۰/۹۲۸	***	۰/۰۵۲	۰/۰۷۶	۰/۰۷۰	۰/۱۹۶	۰/۱۹۵	۰/۱۱۳	۰/۱۶۸	۰/۰۹۱	۰/۱۸۹	۰/۰۸۳	۰/۱۲۸
۳	۰/۹۴۴	۰/۹۴۹	***	۰/۰۵۴	۰/۰۵۸	۰/۱۷۸	۰/۱۶۲	۰/۰۸۷	۰/۱۶۱	۰/۱۰۳	۰/۱۸۳	۰/۰۷۹	۰/۱۲۱
۴	۰/۹۳۴	۰/۹۲۷	۰/۹۴۷	***	۰/۰۹۰	۰/۱۳۱	۰/۱۷۰	۰/۱۲۹	۰/۱۸۲	۰/۱۴۲	۰/۱۵۷	۰/۱۱۸	۰/۱۱۰
۵	۰/۹۳۳	۰/۹۳۲	۰/۹۴۳	۰/۹۱۴	***	۰/۱۲۱	۰/۱۵۱	۰/۰۸۳	۰/۱۶۴	۰/۱۳۸	۰/۱۸۱	۰/۱۱۴	۰/۱۱۷
۶	۰/۸۴۱	۰/۸۲۲	۰/۸۳۷	۰/۸۷۷	۰/۸۸۶	***	۰/۱۷۲	۰/۱۸۸	۰/۲۱۰	۰/۲۴۶	۰/۲۴۷	۰/۲۳۱	۰/۲۲۹
۷	۰/۸۴۲	۰/۸۲۳	۰/۸۵۰	۰/۸۴۴	۰/۸۶۰	۰/۸۴۲	***	۰/۱۷۹	۰/۲۴۲	۰/۲۷۳	۰/۲۸۲	۰/۲۲۹	۰/۲۷۹
۸	۰/۹۱۰	۰/۸۹۳	۰/۹۱۶	۰/۸۷۹	۰/۹۲۰	۰/۸۲۹	۰/۸۳۶	***	۰/۱۵۱	۰/۱۲۷	۰/۲۳۵	۰/۰۹۸	۰/۱۳۰
۹	۰/۸۶۲	۰/۸۴۶	۰/۸۵۱	۰/۸۳۴	۰/۸۴۹	۰/۸۱۰	۰/۷۸۵	۰/۸۶۰	***	۰/۰۷۱	۰/۰۷۱	۰/۰۷۹	۰/۰۹۶
۱۰	۰/۸۹۰	۰/۹۱۳	۰/۹۰۳	۰/۸۶۷	۰/۸۷۱	۰/۷۸۲	۰/۷۶۱	۰/۸۸۱	۰/۹۳۲	***	۰/۱۱۷	۰/۰۴۱	۰/۰۹۳
۱۱	۰/۸۳۱	۰/۸۲۸	۰/۸۳۳	۰/۸۵۵	۰/۸۳۴	۰/۷۸۱	۰/۷۵۴	۰/۷۹۰	۰/۹۳۲	۰/۸۸۹	***	۰/۱۱۷	۰/۰۸۰
۱۲	۰/۹۱۲	۰/۹۲۰	۰/۹۲۴	۰/۸۸۸	۰/۸۹۲	۰/۷۹۳	۰/۷۹۵	۰/۹۰۶	۰/۹۲۴	۰/۹۶۰	۰/۸۸۹	***	۰/۰۹۲
۱۳	۰/۹۰۰	۰/۸۷۹	۰/۸۸۶	۰/۸۹۶	۰/۸۸۹	۰/۷۹۶	۰/۷۵۶	۰/۸۷۸	۰/۹۰۸	۰/۹۱۱	۰/۹۲۳	۰/۹۱۲	***

را مورد بررسی قرار داده‌اند و در نتیجه اطلاعات بیشتری از نواحی مختلف ژنوم که حاوی ژن‌های کنترل کننده صفات مختلف می‌باشند را مورد هدف و بررسی قرار داده است (Perasana 2003). در بین این مولفه‌ها، مولفه اول با ۱۰/۳۰ درصد بیشترین مقدار واریانس را توجیه کرد. و مولفه‌های دوم و سوم به ترتیب با ۹/۱۵ و ۷/۵۱ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. بنابراین در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد نشانگرهای ISSR کارایی مناسبی داشته و توانستند سطح وسیعی از ژنوم را پوشش

هموزنی و افتراق بین جمعیت‌ها فرسایش ژنتیکی رخ خواهد داد (Hamrick and Godt 1989). بر اساس نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس روش جاکارد در این تحقیق، داده‌هایی که مقادیر ویژه بالای یک داشتند در ۵ مولفه اصلی قرار گرفتند که در مجموع این مولفه‌ها توانستند ۳۷/۴۷ درصد کل تغییرات را توجیه کنند. در داده‌های ملکولی هر قدر درصد واریانس اختصاص یافته به مولفه‌های اصلی کمتر باشد توزیع بهتری داشته و نشان‌دهنده این امر می‌باشد که نشانگرهای ملکولی نواحی وسیع‌تری از ژنوم

بنابراین ممکن است تلاقی جمعیت‌های ۱۱ و ۷ به ایجاد یک رقم مطلوب و بهتر از والدین منجر شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور به دلیل تامین بذور در این پژوهش سپاسگزاری کنند.

منابع

- Abdmishani S, shahnejat booshehri A, Advance plant breeding , university of Tehran Tehran,iran 1992.Tehran, iran (in Farsi).
- Aga E, Bekele E, Bryngelsson T (2005) Inter-simple sequences repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica* 124:213-22.
- Agrama j, Tuinstra MR (2003) Phylogenetic diversity and relationships among sorghuaccessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 334-340.
- Bigdeloo M (2012) Evaluation of morphological,genetical and phitochemical of *Thymus cermanicus*. Dissertation, University of Tehran, Iran.
- Fang DQ, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (1997) Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical Applied Genetics* 95:211-219.
- Gregor Mc, Lambert CA, Greyling MM, Louw JH, Warnich L (2000) A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum thuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135-144.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Biological Science* 6: 95-124.
- Huang W, Zhao X, Wang S, Lian J (2011) A combined approach using ISSR and ITS analysis for the characterization of *Artemisia halodendron* from Horqin sandy land, northern China. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 346-351.
- Jamzad Z (2009) *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran 1-171 (In Farsi).
- Jamzad Z (1994) *Thymus*, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran 1-345 (In Farsi).
- Marion S, Roder V, Katja W, Jens P, Tixier Philippe Leroy, Martin W, Ganai (1998) A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics Society of America* 34:1-18.
- Murray M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA and Nucleic Acids Research, pp: 4321-4325
- Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R (2005) Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry* 90:609-611 (In Farsi).
- Omid baigi Rproduct and processing of medicinal plant. Astan ghods razavi press (2009) Mashhad, Iran. (In Farsi)

دهند. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر جمعیت‌های مورد بررسی را در دو گروه متمایز قرار داد (شکل ۳). گروه اول خود شامل دو زیر کلاستر بود که زیر کلاستر اول را عمدتاً جمعیت‌های مربوط به استان‌های اصفهان و مرکزی تشکیل دادند. دلیل جدا افتادن جمعیت ۸ که مربوط به شهرستان سمیرم از استان اصفهان بود را از سایر جمعیت‌های مربوط به این استان می‌توان به موقعیت جغرافیایی این شهرستان که در جنوب استان و در مرز بین استان اصفهان و فارس قرار دارد مرتبط داشته در حالی که سایر جمعیت‌ها متعلق به نواحی شمال استان بودند. در زیر کلاستر دوم از کلاستر اول جمعیت‌های اصفهان، ایلام و کردستان قرار گرفتند. با توجه به اینکه جمعیت‌های استان اصفهان در هر دو زیر کلاستر هستند می‌توان گفت که تنوع ملکولی و جغرافیایی هم-خوانی زیادی با هم ندارند که دلیل احتمالی این موضوع هم می-تواند جابه‌جایی نمونه‌ها توسط افراد از یک استان به استان دیگر و یا سطح پلوئیدی متفاوت جمعیت‌ها می‌باشد. دلیل احتمالی قرار گرفتن جمعیت‌های ۶ و ۷ که مربوط به استان‌های اصفهان و لرستان هستند در یک کلاستر جداگانه را می‌توان تفاوت در سطح پلوئیدی این دو جمعیت با سایر جمعیت‌ها در نظر گرفت که بایستی در پژوهش‌های بعدی مورد بحث و بررسی قرار گیرد. ماتریس همسانی^۱ و فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها نیز با استفاده از نرم افزار GenAIEx و بر اساس ضریب همسانی و فاصله ژنتیکی نی تشکیل شد (جدول ۶). فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از ۰/۰۴۱ برای جمعیت ۱۲ و ۱۰ تا ۰/۲۸۲ برای جمعیت ۱۱ و ۷ متغیر بود. به طور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس در گیاهان دگرگشن، فاصله ژنتیکی می‌باشد. معمولاً هر چه والدین از لحاظ صفات فاصله بیشتری داشته باشد تنوع و هتروزیس بیشتری در نتاج مشاهده خواهد شد (Falconer 1997). بنابراین دورگ‌گیری بین توده‌های با فاصله زیاد می‌تواند یک راهبرد مناسب برای برنامه‌های به‌نژادی بین جمعیت‌ها باشد

¹ Matrix of genetic identity

Peakall R, Smouse PE (2006) GenAEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.

Peña RJ, Zarco-Hernandez j, Mujeeb-Kazi A (1995) Glutenin subunit compositions and breadmaking quality characteristics of synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum turgidum* × *Triticum tauschii* (coss.) Schmal Crosses. Journal of Cereal Science 15-23.

Prasad M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan HS, Gupta PK (2000) The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics 100: 584-592.

Rahimmalek M, Bahreininejad A, Khorrami M, Ebrahim B, Tabatabaei S (2009) Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal Plant, as Revealed by Inter Simple Sequence. Biochem Genetics 47:831-842.

Saeidi H, Tabatabaei BE, Rahimmalek M, Talebi-Badaf M, Rahiminejad MR (2008) Genetic diversity and gene-pool subdivisions of diploid D-genome *Aegilops tauschii* Coss. (Poaceae) in Iran as revealed by AFLP. Genet Resour Crop Evolution 55:1231-1238.

Sarwat, M, Srivastava D (2008) Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*. Plant Cell Reports 27:519-28.

Sharma S (1996) Applied multivariate techniques. John Wiley.

Stahl Biskup E, Saez F (2004) Thyme: The genus *Thymus* Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles). Taylor & Francis, New York, 330p.

Trindade H, Costa M, Lima M, Pedro L, Barroso G, Figueiredo A (2009) A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). Biochemical Systematics and Ecology 37:670-677.