

## مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از نشانگر ISSR

آرش زین‌الدینی<sup>۱\*</sup>، محسن فرشادفر<sup>۲</sup>، هوشمند صفری<sup>۳</sup>، فرزاد مرادی<sup>۴</sup> و هومن شیروانی<sup>۵</sup>

۱، مدرس مدعو گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، کرمانشاه ۲، استادیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ۳، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی

و منابع طبیعی استان کرمانشاه، ۴ و ۵ گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور،

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۰/۴)

## Study of Genetic Relationships of some Mint Species Using ISSR Markers

A. ZINODINI<sup>1\*</sup>, M. FARSHADFAR<sup>2</sup>, H. SAFARI<sup>3</sup>, F. MORADI<sup>1</sup> AND H. SHIRVANI<sup>1</sup>

1, Department of Agriculture, Payame Noor University, Kermanshah, Iran. 2, Assistant Professor, Department Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran. 3, Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Centre of Kermanshah, Iran.

(Received: Aug. 23, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

## Abstract

*Mentha* species is a genus of family Lamiaceae, and is well known for its great medicinal and economic values. In order to evaluate the genetic variation of 15 genotypes belonging to three species *M. longifolia*, *M. pulegium* and *M. sp.*, used were from 10 ISSR primer. The average percent of polymorphism in all accessions was 94.70. The primers of IS<sub>11</sub> & IS<sub>9</sub>, having the best primers parameters were introduced in this study. Low coefficient of similarity based on Jaccard (0.17-0.56) have showed a high genetic diversity of Studied genotypes. Cluster analysis based on Jaccard coefficient and UPGMA method classified the genotypes in tree major groups and the PCoA analysis confirmed the results of clustering. Analysis of molecular variance (AMOVA) among and within species showed more intra-specific variation (98.00%) in comparison with inter-species variation (2.00%). Evaluation of genetic diversity within species with an average of Nei's gen diversity analysis and Shannon's information index, showed that diversity within species of *M. longifolia* ( $H=0.165$ ,  $I=0.460$ ) was more than other populations while genetic diversity within species of *M. sp.* ( $H=0.102$ ,  $I=0.194$ ) was less than other species. The results showed that the overall addition to geographic distance, gene flow between populations in the wild populations, ecological conditions is determining genetic distance and genetic diversity. Also because hybridization between species during evolution of mint, is similarity between species than within species similarities.

**Keywords:** Genetic diversity, Mint, ISSR marker, AMOVA

## چکیده

گونه‌های جنس نعناع از خانواده (Lamiaceae) به‌عنوان گیاهانی با ارزش دارویی و اقتصادی محسوب می‌شوند. به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ متعلق به سه گونه *M. longifolia*، *M. pulegium* و *M. sp.* از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد. میانگین درصد چندشکلی تعیین‌شده در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی شده ۹۴/۷۰ بود. آغازگر IS<sub>11</sub> و IS<sub>9</sub> با دارا بودن بهترین پارامترهای نشانگری به‌عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند. پایین بودن میزان تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد (۰/۱۷ تا ۰/۵۶) نشان از بالابودن تنوع در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در ۳ گروه که تجزیه به مختصات اصلی نیز آن را تأیید کرد، گروه‌بندی نمود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد تنوع درون گونه‌ای بیشتر (۹۸٪) در مقایسه با تنوع بین‌گونه‌ای (۲٪) بود. میانگین تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) نشان دادند که بیشترین تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های *M. longifolia* ( $H=0.165$  و  $I=0.460$ ) و کمترین تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های *M. sp.* ( $H=0.102$  و  $I=0.194$ ) دیده می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که به‌طور کلی در جمعیت‌های وحشی، علاوه بر فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها، شرایط اکولوژیکی نیز تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. همچنین به‌دلیل وجود دورگ‌گیری بین گونه‌ای در دوران تکامل نعناع، شباهت بین گونه‌ای بیشتر از شباهت درون گونه‌ای می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** نعناع، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، تجزیه واریانس مولکولی

### مقدمه

نعناع و پونه متعلق به جنس *Mentha* L. و خانواده Lamiaceae می‌باشند که از گونه‌های مختلف و تعداد بسیار زیادی وارپته تشکیل شده، که هرکدام دارای خواص داروئی فراوانی هستند. نعناع به‌دلیل دارا بودن برگ‌های خوش عطر و طعم، جزء سبزی‌های خوردنی به‌شمار می‌آید. برگ‌های خشک‌شده و خردشده نعناع چاشنی برخی از غذاهای ایرانی است. این گیاه دارای خواص بهداشتی، داروئی و غذایی فراوان است (Zargari, 1992). از نظر داروئی اساس نعناع مقوی معده و دارای خاصیت بادشکن، ضد تشنج، نیروبخش، کاهش‌دهنده تراوش‌های معده، تسکین‌دهنده زخم معده و سوزش آن است (Arnold, 1997; Zeinal-badi, 2004). جنس نعناع به‌دلیل بالا بودن سطح پلوئیدی متفاوت و دوره‌سازی بین گونه‌ها، دارای تنوع ژنتیکی بالایی است که این تنوع امکان انتخاب ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ خصوصیات مختلف از جمله اساس را فراهم می‌نماید (El-zaher et al., 2005). از طرفی تعیین میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف در گونه نعناع دیدگاه‌های جدید برای انتخاب، به‌نژادی و توسعه ذخائر ژنتیکی این گیاه ایجاد کرده است. ارزیابی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی یکی از شاخص‌های مهم برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی است. فاصله ژنتیکی براساس ترکیب ژنتیکی جمعیت‌های بیولوژیکی می‌تواند به‌وسیله فراوانی ژنوتیپی (فاصله ژنوتیپی) و یا فراوانی آلل‌های مختلف در مکان ژنی موردنظر (فاصله ژنی) ارائه شود. فاصله ژنی ارتباط مثبتی با پدیده هتروزیس دارد و با یک روش آماری چندمتغیره که براساس تعدادی صفت قابل اندازه‌گیری، محاسبه می‌گردد و روشی کارآمد در ارزیابی تنوع ژنتیکی است (Farshadfar and Farshadfar, 2004). والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند هیبریدهایی با هتروزیس بیشتر تولید می‌کنند و احتمال به‌دست‌آوردن نتایج نوترکیب متجاوز را افزایش می‌دهند. از طرفی تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسِم به‌اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا از دوباره‌کاری در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها خودداری نمایند (Sharma et al., 1993). به‌منظور تخمین این تنوع انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاح‌گران گیاهی استفاده می‌شوند (Ray Chadhury et al., 2007)، که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد (Solouki et al., 2008).

در جنس *Mentha* مطالعات ژنتیکی انجام‌شده در کشور ایران اغلب در زمینه سیتوژنتیک، مورفولوژیک و عناصر غذایی

آن‌ها بوده است (Zeinal-badi, 2004; Vali, 2010). تنها دو مورد مطالعه مولکولی در ایران انجام شده است. که عبارتست از بررسی روابط ژنتیکی نعناع‌های ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD (Mommeni et al., 2006) که گزارش نمودند دامنه شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بین ۰/۱۶ تا ۰/۹۶ بوده و نشانگر RAPD را به‌عنوان نشانگری مفید در بررسی تنوع ژنتیکی نعناع معرفی کردند. در دومین مطالعه، روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مختلف نعناع با استفاده از نشانگر R-ISSR توسط (Rahim malek, 2011) مورد ارزیابی قرار گرفت و گزارش نمود که R-ISSR علاوه بر بررسی روابط ژنتیکی، کارایی مناسبی در بررسی روابط ژنتیکی گیاهان دارد. Vining et al. (2005) گونه *M. longifolia* یا پونه را با توجه به خصوصیات ژنتیکی و وحشی بودن، به‌عنوان یک مدل مناسب برای مطالعات ژنتیکی در جنس *Mentha* معرفی نمودند. از سایر مطالعات در این زمینه می‌توان به استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP در بررسی روابط ژنتیکی گونه‌های نعناع در هند (Khanuja et al., 2000; Shasany et al., 2005) بررسی هیبریدهای بین‌گونه‌ای با استفاده از نشانگر AFLP (Gobert et al., 2002)، بررسی روابط ژنتیکی ۱۷ نمونه جمعیتی متعلق به آمریکا توسط نشانگر RAPD (Fenwick and Ward, 2001)، ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مصری با استفاده از نشانگر آیزوزایم (El-zahra et al., 2005)، مطالعه روابط ژنتیکی ۱۵ جمعیت از گونه *M. pulegium* در کشور تونس (Fadhel and Boussaid, 2004)، بررسی تنوع ژنتیکی ۳۸ نمونه از هشت گونه *Mentha* با استفاده از نشانگر RAPD در کشور چین (Fang et al., 2010) و مطالعه تنوع ژنتیکی دو گونه در کشور پاکستان با استفاده از نشانگر RAPD اشاره نمود (Shinwari et al., 2010).

با توجه به اینکه سیستم نشانگری RAPD از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، تکرارپذیری کمی دارد و سیستم نشانگری AFLP گران و هزینه‌بر است و سیستم نشانگری SSR نیاز به اطلاعات اولیه از توالی مورد هدف دو طرف نواحی تکراری جهت طراحی آغازگر دارد، لذا سیستم نشانگری ISSR می‌تواند بر این محدودیت‌ها غلبه کند و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به نشانگرهای مولکولی دیگر داشته باشد (Terzopoulos et

1. Simple sequence Repeat
2. Inter simple sequence repeat

کارایی این نشانگر در یک گیاه اقتصادی بررسی می‌شود.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۵ ژنوتیپ نعناع شامل ۹ ژنوتیپ از گونه *Mentha longifolia*، ۴ ژنوتیپ از گونه *Mentha pulegium* و دو ژنوتیپ از گونه *Mentha sp.* که از بانک ژن مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شد، مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱). پس از کشت بذور در گلدان و تولید گیاهچه DNA ژنومی از برگ‌های جوان استخراج گردید. جهت استخراج DNA از روش<sup>۱</sup> CTAB استفاده شد (Khanuja et al., 1999). و کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی شد. اجزای واکنش<sup>۲</sup> PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل آب دوبار تقطیر ۱۲/۶ میکرولیتر، بافر PCR(10X) ۲ میکرولیتر، (۵۰mM)  $MgCl_2$  ۱/۵ میکرولیتر، (۱۰mM)  $dNTP_s$  ۰/۴ میکرولیتر، آغازگر ۱/۲ میکرولیتر، آنزیم Taq (5unit) ۰/۳ میکرولیتر، DNA (۱۰ng) ۲ میکرولیتر بود. مشخصات ۱۰ آغازگر مورد استفاده در جدول ۲ درج گردیده است.

1. Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide

2. Polymerase Chain Reaction

(al., 2008). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به آن تکثیرپذیری و تنوع‌پذیری بالایی داشته، سریع بوده و روشی آسان است. نشانگر ISSR الگوی نشانگری پیچیده‌تری نسبت به RAPD تولید می‌کند، که برای تعیین خصوصیات نژادهای بانک ژن و تشخیص ارقام نسبتاً خویشاوند استفاده می‌شود (Archak et al., 2003). با توجه به این مشخصات استفاده از نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگرهای دیگر، در مطالعات ژنتیکی بین افراد بسیار نزدیک و ارقام تجاری، برتری دارد. با توجه به پیچیدگی روابط ژنتیکی نعناع گزارش‌های جامع‌تر با نشانگر ISSR این امکان را فراهم می‌نماید که روابط ژنتیکی، مطالعات تکاملی و مقایسه وضعیت ژنتیکی گونه‌های مهم به‌طور دقیق‌تر و جامع‌تر بررسی گردد. بنابراین هدف این پژوهش، بررسی قرابت ژنتیکی بین و درون نمونه‌های جمعیتی متعلق به سه گونه جمع‌آوری شده در ایران به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و خویشاوندی آن‌ها با استفاده از نشانگر ISSR در راستای بهبود ذخایر ژنتیکی کشور می‌باشد. این اطلاعات می‌تواند دیدگاه‌های جدیدی به‌منظور کارآمد نمودن انتخاب، پیشبرد اهداف اصلاحی فراهم نماید و در پایان، نتایج تجزیه و تحلیل‌های مولکولی با سایر گزارش‌های مربوط به بررسی تنوع مولکولی در جهت رد یا تأیید آن‌ها مقایسه می‌شود و

جدول ۱- اسامی و منشاء مواد گیاهی مورد مطالعه

منشاء	نام علمی	کد بانک ژن	ردیف
اصفهان - نجف آباد	<i>Mentha longifolia</i>	28286	1
کرمان - کرمان	<i>Mentha longifolia</i>	23031	2
مرکزی	<i>Mentha pulegium</i>	22347	3
آذربایجان غربی - ارومیه	<i>Mentha longifolia</i>	14161	4
مرکزی	<i>Mentha pulegium</i>	22345	5
مرکزی	<i>Mentha pulegium</i>	22391	6
یزد - مهریز	<i>Mentha longifolia</i>	24127	7
کرمان - کرمان	<i>Mentha longifolia</i>	26421	8
کردستان - مریوان	<i>Mentha longifolia</i>	22607	9
مازندران	<i>Mentha longifolia</i>	3123	10
کردستان - قروه	<i>Mentha longifolia</i>	29852	11
آذربایجان غربی - سلماس	<i>Mentha longifolia</i>	14158	12
مرکزی	<i>Mentha pulegium</i>	22233	13
اردبیل	<i>Mentha sp.</i>	10851	14
زنجان	<i>Mentha sp.</i>	19248	15

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

شماره پرایمر	کد پرایمر	توالی پرایمر
P <sub>1</sub>	Is1	5'-ACACACACACACACACYA-3'
P <sub>2</sub>	Is3	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3'
P <sub>3</sub>	Is9	5'-CTCTCTCTCTCTCTG-3'
P <sub>4</sub>	Is10	5'-GAGAGAGAGAGAGARC-3'
P <sub>5</sub>	Is11	5'-ACACACACACACACC-3'
P <sub>6</sub>	Is12	5'-TGTGTGTGTGTGTGG-3'
P <sub>7</sub>	Is13	5'-AGAGAGAGAGAGAGYT-3'
P <sub>8</sub>	Is14	5'-GACAGACAGACAGACA-3'
P <sub>9</sub>	Is15	5'-GGATGGATGGATGGAT-3'
P <sub>10</sub>	Is16	5'-DBDACACACACACACA-3'

در توالی آغازگرها حروف (R=اغلب پورین‌ها، Y=اغلب پیریمیدین‌ها، D=نوکلئوتیدهای A، G و T، C=B و G) و T

محاسبه این شاخص تعداد نوارهای چندشکل بر تعداد کل نوارها تقسیم شد، ۲- شاخص محتوای چندشکلی PIC: این شاخص با استفاده از رابطه  $PIC=1-\sum p_i^2$  محاسبه شد (Powell *et al.*, 1996). در اینجا p برابر با آلل نام هر جایگاه ژنی برای کلیه ژنوتیپ‌ها است، ۳- شاخص نشانگر (MI): تعداد نوارهای چندشکل ضرب در شاخص محتوای چندشکلی، ۴- شاخص EMR: این شاخص از درصد چندشکلی ضربدر تعداد نوارهای چندشکل به دست آمد، ۵- قدرت تفکیک RP:  $RP=\sum IB$  در رابطه  $IB=1-[2 \times (0.5 - Pi)]$  و نسبت افراد دارای نوار است (Powell *et al.*, 1996).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) روی سه گونه مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Arlequin ver 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006) انجام شد. همچنین پارامترهای ژنتیک جمعیت مانند تعداد آلل‌ها (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، (Kimura and crow, 1973)، شاخص تنوع ژنی نی (H) (Nei, 1973) و شاخص اطلاعاتی شانون<sup>۲</sup> (I) (Lowontin, 1972) با استفاده از نرم‌افزار POPGEN 1.31 محاسبه شد (Yeh *et al.*, 1997).

همچنین فاصله گونه‌ها (جمعیت‌ها) توسط روش نی انجام شد (Nei, 1972).

در توالی آغازگرها حروف (R=اغلب پورین‌ها، Y=اغلب پیریمیدین‌ها، D=نوکلئوتیدهای A، G و T، C=B و G) است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio Rad و چرخه PCR به این شرح انجام شد: یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشته‌سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹-۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله بسط به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز Bio Rad و ژل آگارز ۱/۵٪ با فافر واکنش TBE استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز ژل‌ها جهت رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) رنگ‌آمیزی شدند. به منظور عکس‌برداری از دستگاه Gel Document (شرکت کیاژن) استفاده شد.

### آنالیزهای آماری

عکس‌های به دست آمده براساس حضور باند عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر، امتیاز بندی شدند. برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، ستون‌ها به ژنوتیپ‌ها و سطرها به باندها یا آلل‌ها اختصاص یافت. سپس با استفاده از ماتریس صفر و یک تشابه ژنتیکی (با استفاده از ضریب تشابه جاگارد)، رسم دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی با نرم‌افزار NTSYS 2.02 (Rohlfj, 1998) محاسبه گردید. برای بررسی محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها، شاخص‌های مولکولی ذیل محاسبه گردید. ۱- درصد چندشکلی: برای

1. Effective multiplex ratio  
2. Shannon's Information index

## نتایج و بحث

### محاسبه شاخص‌های مولکولی

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نعناع مورد مطالعه با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نمونه الگوی باندهی DNA ژنومی در شکل ۱ قابل ملاحظه است. از ۱۴ آغازگر مورد استفاده، تنها ۱۰ آغازگر دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۱ مکان ژنی را شناسایی کنند که از این تعداد، تنها ۴ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چندشکل بودند، که آغازگر IS<sub>9</sub> بیشترین تعداد باند (۱۲) و آغازگرهای IS<sub>1</sub>، IS<sub>12</sub> کمترین تعداد باند (۶) را نشان دادند، بنابراین آغازگر IS<sub>9</sub> مکان‌های ژنی بیشتری را نسبت به سایر آغازگرها شناسایی کرده است. کمترین میزان درصد چندشکلی را آغازگر IS<sub>1</sub> (۸۳/۳۳٪) داشت و آغازگرهای IS<sub>9</sub>، IS<sub>10</sub>، IS<sub>11</sub>، IS<sub>12</sub>، IS<sub>13</sub> و IS<sub>14</sub> دارای درصد چندشکلی ۱۰۰٪ می‌باشند، همچنین میانگین درصد چندشکلی برابر ۹۴/۷۰٪ بود. با توجه به نتیجه فوق می‌توان اظهار نمود که آغازگرها جایگاه‌های مختلفی را در سطح ژنوم شناسایی نموده‌اند. متوسط تعداد باندهای تولیدشده توسط هر آغازگر برای ۱۵ ژنوتیپ برابر ۹/۱ به‌دست آمد. در مطالعه تنوع ژنتیکی نعناع با استفاده از مارکر RAPD، دامنه تعداد باندهای چندشکل را بین ۱۹ تا ۳۷ و درصد چندشکلی را بین ۱۶ تا ۲۹ درصد گزارش نمودند، با توجه به این نتیجه می‌توان چنین اظهار نمود که نشانگر ISSR دارای قدرت بیشتر در شناسایی جایگاه‌های چندشکل و درصد چندشکلی بالاتری در مقایسه با نشانگر RAPD دارد (Al-Rawashdeh, 2011). یکی از دلایل مهم آن را می‌توان اختصاصی‌تر بودن آغازگر ISSR نسبت به آغازگر RAPD دانست. محدوده شاخص محتوای چندشکلی (PIC) بین ۰/۳۲۵ تا ۰/۴۸ متغیر بود که کمترین این مقدار مربوط به آغازگر IS<sub>1</sub> با ۰/۳۲۵ و بیشترین آن مربوط به آغازگر IS<sub>11</sub> با ۰/۴۸ بود، بنابراین آغازگر IS<sub>11</sub>، بهتر از سایر آغازگرها

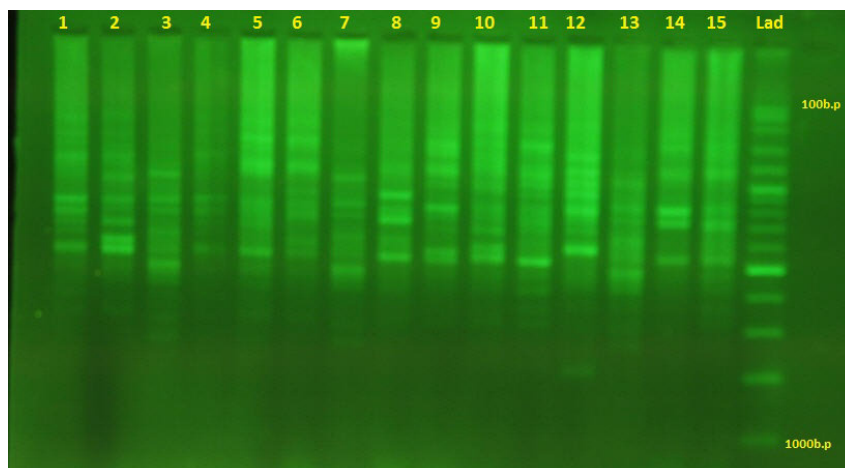
توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کند. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آن‌ها به‌شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Thimmappaiah *et al.*, 2008). در نتیجه از آغازگر IS<sub>11</sub> می‌توان برای تجزیه مجموعه ژرم‌پلاسم دیگر ژنوتیپ‌های نعناع در تحقیقات بعدی استفاده کرد. آغازگر IS<sub>1</sub> با کمترین میزان شاخص PIC توانایی قابل قبولی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. با توجه به اینکه مقادیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپ‌های تحت بررسی می‌باشد (Wei *et al.*, 2005).

در بین شاخص‌های مولکولی مورد بررسی محدوده شاخص نشانگر (MI) بین ۱/۳۵ تا ۵/۲۶ قرار داشت که کمترین و بیشترین MI به ترتیب متعلق به آغازگرهای IS<sub>1</sub> و IS<sub>11</sub> بودند، محدوده شاخص EMR بین ۴/۱۵ تا ۱۲ متغیر بود که بیشترین و کمترین این مقدار را آغازگرهای IS<sub>9</sub> و IS<sub>1</sub> داشتند و محدوده شاخص RP بین ۲/۷۳ تا ۸/۳۳ بود که بیشترین و کمترین شاخص RP، به ترتیب متعلق به آغازگر IS<sub>9</sub> و IS<sub>3</sub> بودند. میانگین شاخص‌های MI، EMR و RP به ترتیب برابر ۳/۴۰، ۸/۳۵ و ۴/۷۴ بود. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیرپذیری دارد. در حالت کلی دو آغازگر IS<sub>11</sub> و IS<sub>9</sub> با دارا بودن بیشترین پارامترهای نشانگری به‌عنوان آغازگرهای مناسب‌تری جهت بررسی تنوع ژنتیکی نعناع در این تحقیق معرفی می‌شوند (جدول ۳).

جدول ۳- شاخص‌های مولکولی اندازه‌گیری شده در آغازگرهای ISSR

ردیف	کدپرایمر	مکان تکثیرشده	مکان چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI	EMR	RP
1	IS <sub>1</sub>	6	5	83.33	0.325	1.35	4.15	3.27
2	IS <sub>3</sub>	7	6	85.71	0.470	2.09	5.14	2.73
3	IS <sub>9</sub>	12	12	100	0.400	4.8	12	8.33
4	IS <sub>10</sub>	10	10	100	0.430	4.33	10	6.40
5	IS <sub>11</sub>	11	11	100	0.480	5.26	11	5.93
6	IS <sub>12</sub>	6	6	100	0.400	2.40	6	2.87
7	IS <sub>13</sub>	11	11	100	0.420	4.42	11	6.93
8	IS <sub>14</sub>	10	10	100	0.452	4.52	10	4.00
9	IS <sub>15</sub>	7	6	85.70	0.325	1.67	5.14	3.47
10	IS <sub>16</sub>	11	10	90.90	0.349	3.17	9.09	3.47
11	میانگین	9.10	8.7	94.70	0.397	3.40	8.35	4.74

PIC: شاخص محتوای چند شکلی، MI: شاخص نشانگر، EMR: شاخص نسبت چندشکلی، RP: شاخص قدرت تفکیک



شکل ۱-؟؟؟؟

است.

بیشترین فاصله ژنتیکی درون جمعیت *M. longifolia* مشاهده شد. این نتیجه را می‌توان به این صورت توجیه کرد که در جمعیت‌های دگرگرده‌افشان مانند نعنای هتروزگوسیتی بالایی وجود دارد و این امر فرصتی برای سازگاری و تکامل در آن جمعیت ایجاد می‌کند. بنابراین وجود تنوع ژنتیکی بالا در درون چنین جمعیت‌هایی امری بدیهی است. همچنین ژنوتیپ‌هایی که فاصله ژنتیکی بیشتری با هم دارند در برنامه‌های به‌نژادی مفیدتر می‌باشند (جدول ۴). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد در شکل ۲ آمده است. خط برش دندروگرام از محل فاصله ژنتیکی ۰/۳۷۵ باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، در ۳ گروه گردید. که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های (۲۸۲۸۶، ۲۲۳۹۱، ۲۲۶۰۷، ۲۲۳۴۵، ۲۹۸۵۲، ۲۴۱۲۷، ۱۹۲۴۸، ۱۰۸۵۱ و ۲۶۴۲۱) می‌باشد. این گروه شامل دو گونه *M. sp* سه گونه *M. pulegiom* و ۴ گونه *M. longifolia* شد. در گروه دوم ژنوتیپ‌های (۲۳۰۳۱، ۲۲۳۴۷، ۱۴۱۵۸ و ۲۲۲۳۳) قرار گرفتند. گروه دوم شامل دو گونه *M. pulegiom* و ۲ گونه *M. longifolia* شد. گروه سوم شامل ژنوتیپ ۱۴۱۶۱ می‌باشد.

گزارش Rahim Malek در سال ۲۰۱۱، در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف نعنای، نشان داد که گونه *M. spicata* در گروه *M. longifolia* قرار گرفت به عبارت دیگر گروه‌بندی مشبک در ژنوتیپ‌های نعنای مشاهده گردید، که در این مطالعه با وجود تفاوت در دو گونه اما نتایج مشابهی به‌دست آمد. اما برخلاف این نتایج، در مطالعه مولکولی بین *Ziziphora* و *M. spicata* *M. longifolia* سه گونه *tenuior* در تجزیه خوشه‌ای، گونه *M. spicata* در گروه

### محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر

تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۱۷ تا ۰/۵۷ متغیر بود، میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۵۰ بود که پایین‌بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان‌دهنده تنوع بالای ژنوتیپ‌های نعنای در ایران می‌باشد. بیشترین تشابه را ژنوتیپ‌های ۱۹۲۴۸ (*M. sp*، زنجان) با ۲۴۱۲۷ (*M. longifolia*، مهریز) و کمترین تشابه را ژنوتیپ‌های ۲۴۱۲۷ (*M. longifolia*، مهریز) با ۱۴۱۶۱ (*M. longifolia*، ارومیه) و ۲۲۲۳۳ (*M. longifolia*، مرکزی) با ۱۴۱۶۱ (*M. longifolia*، ارومیه) داشتند. هرچند سیستم گرده‌افشانی نقش برجسته‌ای در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی دارد. عوامل محیطی متعدد دیگر بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه گیاهی اثر دارند (Bussell, 1999; Hamrich and Godt, 1996). عواملی مانند فرم رویشی مثل یک‌ساله و چندساله بودن، شرایط اکولوژیک، به طریق مختلف بر روی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یک گونه گیاهی تأثیر می‌گذارند (Naybom and Bartish, 2000). همچنین تنش‌های محیطی مانند، تنش‌های غیرزیستی مثل خاک و اقلیم می‌تواند بر روی تنوع و شباهت ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی اثر بگذارند (Van valen, 1995). بر اثر انتخاب طبیعی جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک مشابه، ولی در نقاط مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند، در مقایسه با جمعیت‌های گیاهی که در شرایط اکولوژیک متفاوت رشد می‌کنند شباهت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (Volis et al., 2001). با توجه با این مطالب به نظر می‌رسد که دلیل شباهت دو گونه متفاوت، از دو منطقه جغرافیایی، شرایط اکولوژیک مشابه در طول دوران زندگی

جدول ۴- ماتریس تشابه بر اساس ضریب جاکارد برای ژنوتیپ‌های متعلق به گونه‌های مختلف نعناع

Genotype	28286	23031	22347	14161	22345	22391	24127	26421	22607	3123	29852	14158	22233	10851
230.31	0.36													
22347	0.23	0.47												
14161	0.29	0.18	0.19											
22345	0.37	0.40	0.38	0.38										
22391	0.48	0.26	0.21	0.20	0.47									
24127	0.38	0.29	0.39	0.17	0.52	0.42								
26421	0.41	0.32	0.26	0.27	0.35	0.38	0.36							
22607	0.41	0.28	0.27	0.24	0.4	0.56	0.35	0.49						
3123	0.43	0.39	0.28	0.20	0.54	0.45	0.45	0.52	0.4					
29852	0.42	0.38	0.44	0.23	0.52	0.45	0.48	0.4	0.5	0.5				
14158	0.32	0.42	0.40	0.19	0.34	0.23	0.31	0.32	0.33	0.32	0.4			
22233	0.18	0.29	0.42	0.17	0.26	0.22	0.29	0.2	0.29	0.2	0.29	0.45		
10851	0.43	0.36	0.36	0.21	0.48	0.42	0.44	0.43	0.5	0.43	0.44	0.33	0.21	
19248	0.48	0.28	0.28	0.21	0.51	0.53	0.57	0.46	0.5	0.49	0.43	0.3	0.21	0.53

منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود. با توجه به نتیجه شکل ۳، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس داده‌های مولکولی تا حد زیادی مؤید گروه‌بندی انجام شده توسط روش تحلیل خوشه‌ای بوده و تطابق زیادی با نتایج حاصل از آن داشت. با دقت در نمودار دوبعدی می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های مورد مطالعه در سه گروه جای گرفته‌اند که با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای و پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها تقریباً مطابقت داشت. به‌عنوان مثال در گروه دوم تمام ژنوتیپ‌ها جزء ۱۴۱۵۸- آذربایجان مربوط به نواحی مرکزی ایران می‌باشد، دلیل این امر هم همان‌طور که پیشتر بیان شد احتمالاً این گونه در شرایط اکولوژیکی مشابهی نسبت به سه گونه دیگر تکامل پیدا کرده‌اند. در پلات مختصات اصلی (شکل ۲)، ژنوتیپ ۱۴۱۶۱ (*M. longifolia* = ارومیه) بیشترین فاصله را با ژنوتیپ‌های ۲۲۳۴۵ و ۲۲۳۴۷ (*M. pulegium* = مرکزی) دارد که از نظر پراکنش جغرافیایی نیز فاصله زیادی با یکدیگر دارند.

در این مطالعه الگوی طبقه‌بندی مشبک<sup>۲</sup> در گونه‌های *M. longifolia* و *M. pulegium* مشاهده شد. وجود چنین الگویی در بعضی از گزارشات به چشم می‌خورد (Shasany et al., 2005; Rahim Malek, 2011). وجود تلاقی‌های بین‌گونه‌ای طبیعی در گیاه نعناع می‌تواند یک دلیل احتمالی برای این پدیده باشد (Arnold, 1997; Gobert et al., 2005). در این مطالعه این‌طور نتیجه‌گیری می‌شود که گونه‌های (*M. pulegium*) و

اول، گروه دوم شامل گونه *Ziziphora tenuior* و گونه *M. longifolia* در گروه سوم قرار گرفتند و گروه‌بندی مشبک در این مطالعه وجود نداشت به عبارت دیگر گونه‌های متفاوت در یک گروه قرار نگرفتند (Al-Rawashdeh, 2011).

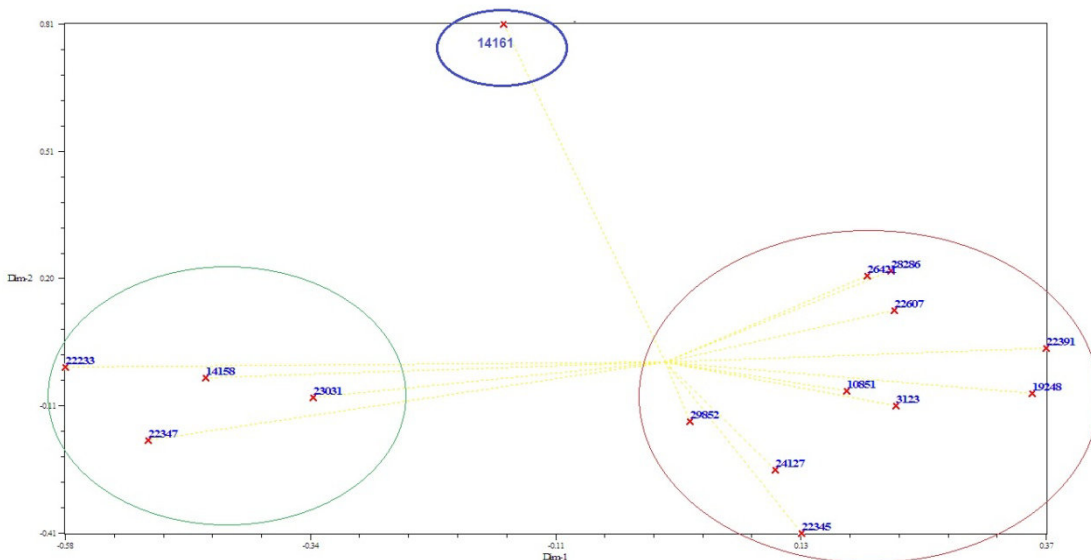
بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف نعناع توسط Shinvari et al. (2011) با استفاده از مارکر RAPD ۹۳/۶٪ پلی‌مورفیسم را گزارش کردند، و نشان دادند که گونه *M. royleana* با گونه *M. spicata* بیشترین شباهت را دارد. همچنین در تجزیه خوشه‌ای گونه‌های متفاوت *M. royleana* با گونه *M. spicata* در یک گروه قرار گرفتند.

### تجزیه به مختصات اصلی (PCOA<sup>۱</sup>)

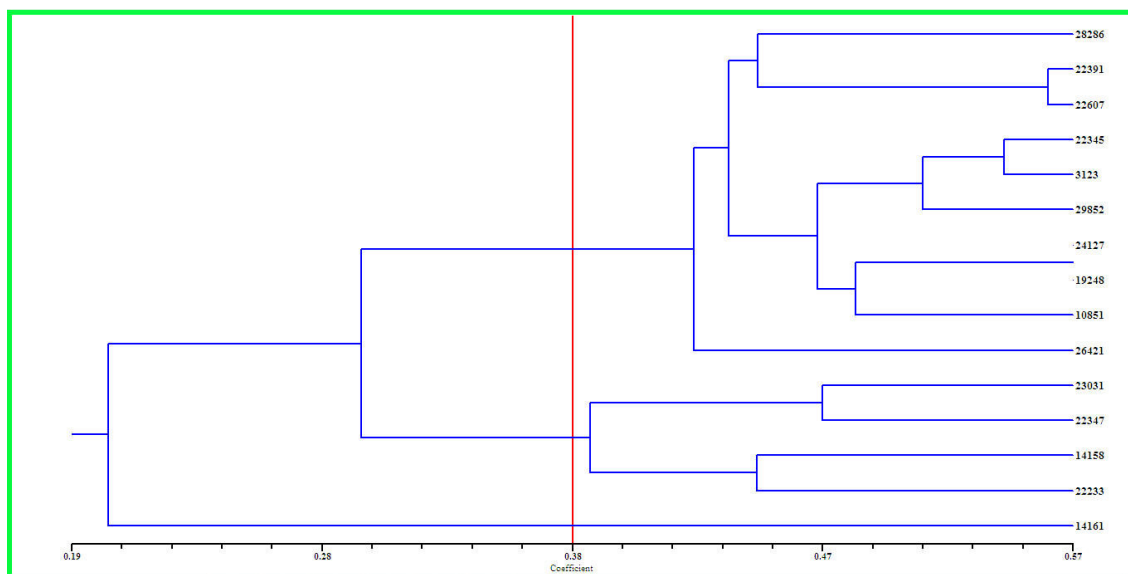
بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس و آزمون تجزیه به مختصات اصلی انجام شد (شکل ۳). نمودار دوبعدی براساس مؤلفه‌های اول و دوم، نشان داد که ژنوتیپ‌ها در سه ناحیه از پلات پراکنده شده‌اند. همچنین فاصله ژنتیکی، ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی می‌توان در پلات مشاهده کرد. سه مؤلفه اول در مجموع ۳۷/۴۰٪ از تغییرات را توجیه نمودند، عدد پائین حاصل‌شده، نشان‌دهنده توزیع بسیار مناسب نشانگرهای ISSR در طول ژنوم است. این نتیجه برخلاف نتایج به‌دست‌آمده برای نشانگرهای ISSR و RAPD در مطالعات دیگر است (Koochi et al., 2000; Sayed-Tabatabaie et al., 2007). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای

تکامل جنس نعناع مرتبط دانستند.

*(M. longifolia)* احتمال تلاقی‌های بین‌گونه‌ای بیشتری با یکدیگر دارند. *Khanuja et al.* (2000) نیز در پژوهش خود طبقه‌بندی مشبک و مخلوط‌شدن گروه‌بندی گونه‌ها در جنس‌های مختلف نعناع را با تلاقی‌های بین‌گونه‌ای در طول



شکل ۲-؟؟؟؟



شکل ۳-؟؟؟؟

*(M. sp.)* ۳۳٪ است، به عبارت دیگر تشابه این دو گونه ۶۷٪ می‌باشد به‌طورکلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد. در گونه‌های دگرگشن به‌علت جریان ژنی بالا فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است (Hamrick and Godt, 1996). شباهت بیشتر گونه *M. piperita* را با

**نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)**

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در جدول ۵ آمده است. این نتایج نشان داد که ۲٪ از تغییرات مربوط به بین‌گونه‌ها و ۹۸٪ مربوط به درون‌گونه‌ها است. نتایج حاصل از ماتریس فاصله گونه‌ها (جدول ۶) نشان می‌دهد که اختلاف بین‌گونه‌ها بالا نیست و حداکثر تفاوت براساس ضریب فاصله نی بین جمعیت‌های گونه ۲ (*M. pulegium*) با گونه ۳



گونه *M. longifolia* (۱/۸۳۵) و گونه *M. sp.* (۱/۲۲۵) به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار بود. تعداد آل‌های مشاهده شده به شدت تحت تأثیر اندازه نمونه است. تعداد آل‌های مؤثر (Ne)، یعنی آل‌هایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع مطلوبی می‌باشند. این شاخص عکس هموزیگوتی مورد انتظار است، این شاخص بدین دلیل مورد استفاده قرار می‌گیرد که کمتر به اندازه نمونه حساس است (Kimura and Crow, 1973). گونه‌های *M. longifolia* و *M. sp.* به ترتیب بیشترین (۱/۵۲۷) و کمترین (۱) مقدار را داشتند. با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هریک از گونه‌ها از طریق محاسبه نسبت تعداد آل‌های مؤثر به تعداد آل‌های مشاهده شده تعیین گردید. هرچه این نسبت به یک نزدیکتر باشد نشان‌دهنده یکنواختی گونه موردنظر است (Kimura and Crow, 1973). در این پژوهش گونه *M. pulegium* با بیشترین شاخص (۰/۹۰۲) یکنواخت‌ترین گونه شناخته شد. تنوع ژنتیکی براساس جایگاه‌های ژنی پلی‌مورف از ۳۱/۸۷٪ تا ۹۰/۱۱٪ بین سه گونه متغیر بود، که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون گونه‌ها می‌باشد. تنوع ژنی نی (H) در سه جمعیت به ترتیب ۰/۱۶۵، ۰/۱۲۴، ۰/۱۰۲ و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۴۶۵، ۰/۴۲۳، ۰/۱۹۳ محاسبه شد. این نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون در دو گونه *M. longifolia* و *M. pulegium* وجود داشته و هر دو گونه با وجود تنوع درون گونه‌ای، ساختار ژنتیکی یکسانی داشتند (جدول ۷).

گونه *M. aquatica* با استفاده از نشانگر RAPD توسط Momeni و همکاران ۲۰۰۶ گزارش شد، همچنین در این گزارش اشاره شده است با وجود اختلاف معنی‌دار بین گونه‌ها تنوع درون گونه‌ها (۷۳/۰۱٪) بیش از تنوع بین گونه‌ها (۲۶/۹۹٪) است. نتایج Rodrigues et al. (2013) در مطالعه تنوع ژنتیکی نعناع (*M. cervina*) براساس صفات مورفولوژی، اسانس و مارکر ISSR حاکی از وجود بیشترین تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد، که نتایج این تحقیق را تأیید نمود.

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

P.O.V	E.Ms	M.S	S.S	d.f	S.O.V
2%	0.391	20.11	40.22	2	بین گونه‌ها
98%	18.49	18.49	221.92	12	درون گونه‌ها
100%	18.88		263.13	14	کل

S.O.V: منابع تغییرات، d.f: درجه آزادی، S.S: مجموع مربعات، M.S: میانگین مربعات، E.Ms: امید ریاضی میانگین مربعات، P.O.V: درصد تغییرات

جدول ۶- ماتریس فاصله گونه‌ها براساس ضریب نی

گونه	<i>M. sp.</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. longifolia</i>
<i>M. longifolia</i>			0
<i>M. pulegium</i>		0	0.099
<i>M. sp.</i>	0	0.330	0.241

#### محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت

شاخص تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)، در گونه

جدول ۷- پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای گونه‌های مختلف نعناع

I	H	Ne	Na	PPL%	حجم	جمعیت	
0.460	0.165	0.832	1.527	1.835	90.11	9	<i>Mentha longifolia</i>
0.423	0.124	0.902	1.477	1.637	78.02	4	<i>Mentha pulegium</i>
0.193	0.102	0.816	1.00	1.225	31.87	2	<i>Mentha sp.</i>
0.360			1.47	1.490	66.67		میانگین کل
0.017		0.022	0.047		17.75		انحراف از معیار (S.E)

PPL%: درصد جایگاه ژنی پلی‌مورف، Na: تعداد آل‌ها، Ne: تعداد آل‌های مؤثر،  $\frac{Ne}{Na}$ : نسبت تعداد آل‌ها به تعداد آل‌های مؤثر، H: تنوع ژنی نی، I: شاخص اطلاعاتی شانون

## REFERENCES

- Arnold ML (1997) Natural Hybridization and Evolution, Oxford University Press, New York. 2: 251-255.
- Al-Rawashdeh IM (2011) Molecular taxonomy among *Mentha spicata*, *Mentha longifolia* and *Ziziphora tenuior* populations using the RAPD technique. Jordan Journal of Biological Sciences. 12: 63-70.
- Archak S, Gaikwad AB, Gautam D, Rao EV, Swamy KRM, Karihaloo JL (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew. 46: 362-369.
- Bussell JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma*

- petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* 8: 775-789
- El-Zaher A, Mustafa MA, Badr A, El-Galabi M, Mobarak AA, Hassan MG (2005) Genetic diversity among *Mentha* populations in Egypt as reflected by Isozyme polymorphism. *International Journal of Botany*. 1: 188-195.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin ver 3.1: software for population genetic data analysis, Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Fadhel NB, Boussaid M (2004) Genetic diversity in wild Tunisian populations of *Mentha pulegium* L. (*Lamiaceae*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 309-321.
- Fang HL, Li WL, Liang CY, Guo QS (2010) Relationship analysis of *Mentha species* based on RAPD marker. *Journal of Plant Resources and Environment*, 19: 14-19.
- Farshadfar M, Farshadfar E (2004) Evaluation of genetic diversity in *Agropyron* based on morphological and chemical indices. *Agricultural and Natural resource Journal of Science and Technology*, 8: 243-250.
- Fenwick AL, Ward SM (2001) Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. *Hort. Science*, 36: 761-764.
- Gobert V, Moja S, Colson M, Taberlet P (2002) Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany*, 89: 2017-2023.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B Series: Biological Science* 351: 1292-1298.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Srivastava A, Kumar S (2000) Assessment of genetic relationships in *Mentha species*. *Euphytica*, 111: 121-125.
- Kimura, M. and Crow, J.F., (1963). The measurement of effective population number. *Evolution*, 17(3): 279-288.
- Lewontin RC (1972). The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology Journal*, 6(38): 381-398.
- Momeni S, Shiran B, Razmjoo K (2006) Genetic variation in Iranian mints on the bases of RAPD analysis. *Pakistan Journal of Biological Science* 9: 1898-1904.
- Momenzadeh Shushtari SM, Nabati Ahmadi D, Rajabi Memari H, Siahpoosh A (2011) Study of genetic diversity of twelve ecotypes of basil based on RAPD marker. 12<sup>th</sup> Congress of Iranian Genetics.
- Nie M (1972) Genetic distance between populations *American Naturalist*, 106 (949): 283-293.
- Nie M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences of USA*, 70(12): 3321-3323.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematic* 3: 293-114.
- Thimmappaiah W, Santhosh G, Shobha D, Melwyn GS (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*. 118: 1-7.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Rahim Malek M (2011) Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers. *Agricultural biotechnology*. 10: 11-17.
- Rodrigues L, Póvoa O, Den C, Ana B, Figueiredo C, Moldão M, Monteiro A (2013) Genetic diversity in *Mentha cervina* based on morphological traits, essential oils profile and ISSRs markers. *Biochemical Systematic and Ecology*, 50-59.
- Rohlf FJ (1998) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 Exeter Software, Setauket, NY.
- Ray Chadhury P, Tanveer H, Dixit GP (2007) Identification and detection of genetic relatedness among important varieties of pea (*Pisum sativum* L.) grown in India. *Genetica* 130: 183-191.
- Sayed-Tabatabaie BE, Rahimmalek M, Talebi-Bedaf M, Yamchi A, Etemadi N,

- Mobli M. (2007) Assessment of genetic diversity of Isfahan Elms (*Ulmus L. sp.*) using RAPD and ISSR markers. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 4: 213-224.
- Sharma BD, Hore DK (1993) Multivariate analysis of divergence in upland rice Indian. *Journal of Agricultural Science* 63: 515-517.
- Shasany AK, Darokar MP, Dhawan S, Gupta AK, Gupta S, Shukla AK, Patra NK, Khanuja S PS (2005) Use of RAPD and AFLP markers to identify inter-and intra-specific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*, 96(5): 542-549.
- Shinwari ZK, Sultan S, Mahmood T (2011) Molecular and morphological characterization of selected *Mentha* species. *Pakistan Journal of Botany* 43(3): 1433-1436.
- Solouki M, Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh AA (2008) Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia horticulturae* 117(3): 281-287.
- Terzopoulos PJ, Bebel PJ (2008) Genetic diversity analysis of Mediterranean Faba bean (*Vicia faba L.*) with ISSR markers. *Field Crops Research* 108: 39-44.
- Vali E (2010) Assessment of variation in morphological, seed and reproductive biology in different mint species. M.Sc. thesis of Biology, Payame Noor University of Najaf Abad, Iran.
- Van Valen L. (1965) Morphological variation and width of ecological niche. *American Naturalist*, 99: 377-390.
- Volis S, Yakubov B, Shulgina I, Ward D, Zur V, Nedlinge S (2001) Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of Linnaean Society*, 74: 289-303.
- Vining KJ, Zhang Q, Tucker AO, Smith C, Davis TM (2005) *Mentha longifolia* L. A model species for mint genetic research. *Hort. Science*, 40(5): 1225-1229.
- Wei YM, Hou YC, Yan ZH, Wu W, Zhang ZQ, Liu DC, Zhang YL (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 46: 3-9.
- Zeinali Badi H (2004) Assessment of variation in agronomic, cytogenetics and photochemical characteristics of Iranian mints. Ph.D thesis of Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Iran.