مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپهای رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

محسن فرشادفر*، هومن شیروانی، مصطفی امجدیان و مهرانوش قلی پور

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۳

چکیده

یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی رازیانه (*Fueniculum vulgare* Mill.) می‌باشد که در طب سنتی کاربرد فراوان دارد. جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین اکوتیپهای مختلف رازیانه این تحقیق در دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. ۱۶ اکوتیپ با استفاده از ۱۵ آغازگرISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. آغازگرهای IS13 و IS10 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند بیشترین تعداد و آغازگر IS16 با ۳ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمودند. میانگین درصد چند شکلی، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI) و شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) در بین اکوتیپهای مورد بررسی به ترتیب برابر ۹۱/۰۰ درصد، ۰/۳۶، ۱/۸۳ و ۴/۹۸ بود. میانگین شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگرها برابر ۰/۵۶۷ بود. بیشترین تشابه را اکوتیپهای (اردبیل ۱) با (اردبیل ۲) و (تهران ۲) با (لرستان) (۰/۸۵) و کمترین تشابه را ژنوتیپ (بانک ژن ۲) با (کرمانشاه) و (هرمزگان ۳) (۰/۵۵) داشت. نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای اکوتیپها را در۳ گروه قرارداد که این نتیجه توسط تجزیه به مختصات اصلی تأیید گردید.

واژه های کلیدی: رازیانه، تنوع ژنتیکی، مارکر مولکولی، ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۱۳۲۲۱ ، پست الکترونیکی: m.farshadfar@pnu.ac.ir

مقدمه

رازیانه *Foemiculum Vulgare* Mill از مهمترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و متعلق به خانواده چتریان Apiaceae می‌باشد که در تمام فارماکوپه‌های متعدد از آن به عنوان یک گیاه دارویی مهم یاد شده. میوه رازیانه دوکی شکل با دو انتهای باریک رنگ آن سبز یا قهوه‌ای روشن است. تمام پیکر گیاه حاوی اسانس می‌باشد ولی میوه آن بیشترین میزان اسانس را داراست اسانس گیاه در ساختمانهای کانالی شکل که توسط سلولهای غده‌ای ایجاد شده‌اند و در سراسر گیاه پراکنده‌اند وجود دارد بیشترین کانالها در پوسته دانه موجود است (۸). مطالعات بر روی خواص دارویی رازیانه نشان داده است که اسانس این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی و آنتی-اکسیدانی قوی است (۳). آگاهی تنوع ژنتیکی جمعیتها و ساختار جمعیتهای درون یک گونه نه تنها فرآیندهای تکامل و مکانسیم آن را بررسی می‌کند، بلکه اطلاعات مفیدی را در مورد حفاظت بیولوژیکی فراهم می‌نماید (۱۰). یک رویکرد مهم در اصلاح نباتات افزایش تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپهای والدینی برای تلاقی است تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپهای والدینی معمولاً به وسیله تفاوتهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی صفات مهم اقتصادی و کمی ارزیابی می‌شود (۱۵). توجه به این نکته مهم است که تعداد صفات مورفولوژیک اغلب محدود بوده و ممکن است ارتباط ژنتیکی حقیقی بین ژنوتیپها را به خوبی نشان ندهد. علاوه بر این وقتی صفات کمی بررسی می‌شوند مقدار زیادی نمونه برای ارزیابی ژنوتیپ لازم است (۶). انواع مختلفی از نشانگرها در عرصه علوم ژنتیک رده‌بندی و به نژادی بکار رفته‌اند اصولاً کاربرد آنها تفاوت چندانی با یکدیگر ندارد ولی هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند مطالعات در سطح جمعیت نشان می‌دهد که نشانگر DNA کارآیی زیادی در تشخیص تنوع در

این سطح دارند و اطلاعات زیادی در تشخیص تنوع در این سطح را فراهم می‌کنند (۱۳). نشانگر ISSR یک نشانگر مبتنی بر PCR است که می‌تواند تفاوتهای افراد با خویشاوندی را به سرعت از یکدیگر جدا کند و ثابت شده است که نشانگر مولکولی مفیدی در مطالعات انگشت نگاری ژنومی بررسیهای فیلوژنتیکی و نشان‌گذاری ژن است. این تکنیک از یک آغازگر منفرد طراحی شده براساس توالی زیرماهواره که در '۵ یا '۳ با ۲ تا ۴ نوکلئوتید انتخابی اضافه شده است استفاده می‌کند و برای طراحی آغازگر به اطلاع قبلی از ژنوم نیاز ندارد. نشانگر ISSR به‌علت طول نسبتاً بلندتر آغازگرها و دمای اتصال بالاتر قابل اطمینان‌تر از RAPD است و می‌تواند به طور گسترده خصوصاً برای ارزیابی ژرم پلاسم گیاهی و تنوع ژنتیکی استفاده شود (۱۳). نشانگرهای ISSR برای آشکارسازی چند شکلی ژنتیکی بین نژادها از طریق تولید تعداد زیادی نشانگر میکروساتلایتی توزیع شده در سراسر ژنوم مفید هستند (۱). در کشور ایران تحقیقات انجام شده در زمینه اصلاح گیاه رازیانه به نسبت اهمیتی که این گیاه دارویی در صنایع مختلف دارد، محدود می‌باشد. بنابراین انجام تحقیقات بیشتر به منظور دستیابی به ارقام اصلاح شده ضروری به نظر رسیده و تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی در اکوتیپهای مختلف رازیانه از مناطق مختلف ایران، انجام گرفت.

مواد و روشها

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR تعداد ۱۶ اکوتیپ رازیانه (*Foeniculum vulgare*) از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر کد اکوتیپ و محل دریافت یا جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- فهرست ۱۶ اکوتیپ رازیانه انتخاب شده از بانک ژن منابع طبیعی

شماره	منطقه	کد بانک ژن	شماره	منطقه	کد بانک ژن
۱	مازندران	۱۳۶۶۲	۹	تهران ۲	۱۸۸۷۰
۲	کرمانشاه	۱۴۵۸۴	۱۰	سیستان و بلوچستان	۲۲۰۸۴
۳	لرستان	۱۴۶۵۰	۱۱	هرمزگان ۱	۲۴۴۸۲
۴	مرکزی	۱۴۷۲۶	۱۲	بانک ژن ۱	۲۵۱۹۷
۵	یزد	۱۵۵۱۳	۱۳	هرمزگان ۲	۲۶۸۶۰
۶	اردبیل ۱	۱۸۶۱۵	۱۴	هرمزگان ۳	۲۶۸۶۶
۷	اردبیل ۲	۱۸۶۱۸	۱۵	قزوین	۲۹۶۶۷
۸	تهران ۱	۱۸۸۶۹	۱۶	بانک ژن ۲	۳۰۴۰۶

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته برای اکوتیپهای مورد بررسی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت (۱۲). بعد از انتقال ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده با ازت مایع به تیوب، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۴ گرم CTAB، ۳۶/۱۶ گرم NaCl، ۳/۱۵ گرم Tris-HCl، ۱/۴۸ گرم EDTA، ۴۰۰ میکرولیتر β-mercaptoetchanol با pH=۸) به تیوبها اضافه شد و به مدت یک ساعت نمونه‌ها در حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه خوب به هم زده شد تا محلول داخل تیوب یکنواخت شود. پس از آن نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک تیوب تمیز منتقل گردید و به هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک ساعت در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس تیوبها را به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به

هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد سرد اضافه و یک سانتریفیوژ کوتاه صورت گرفت و به آرامی فاز مایع خالی شد (این مرحله دو بار تکرار گردید) در پایان نیز تیوبها را در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شوند و بعد به هر تیوب میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه - گردید. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق جدول ۲ صورت گرفت. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز بارگزاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ-آمیزی در محلول اتیدیوم برماید (یک میکروگرم در میکرو-لیتر) به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده نوارها استفاده شد. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC= Polymorphic information content) از طریق (رابطه ۱: $PIC=1-\sum_{i=1}^{n} PI^{2}$) محاسبه شد در اینجا p برابر با مجموع نوارهای هر لوکوس برای کلیه اکوتیپها است (۵). همچنین شاخص نشانگری (Marker Index = MI) (از رابطه ۲: $MI= PIC \times N\times \beta$) که N تعداد کل باندها و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر بود به دست آمد (۹). شاخص نسبت چندگانه مؤثر (Effective multiplex ratio =EMR) از (رابطه ۳: $EMR= NPB \times \beta$) که از درصد چندشکلی (β) ضربدر تعداد نوارهای چندشکل (NPB) به دست آمد (۷) محاسبه گردید. در پایان نیز با استفاده از نرم افزارهای Ntsys و DARwin 6 ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی (PCo) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۲- اجزا واکنش ISSR بهینه سازی شده

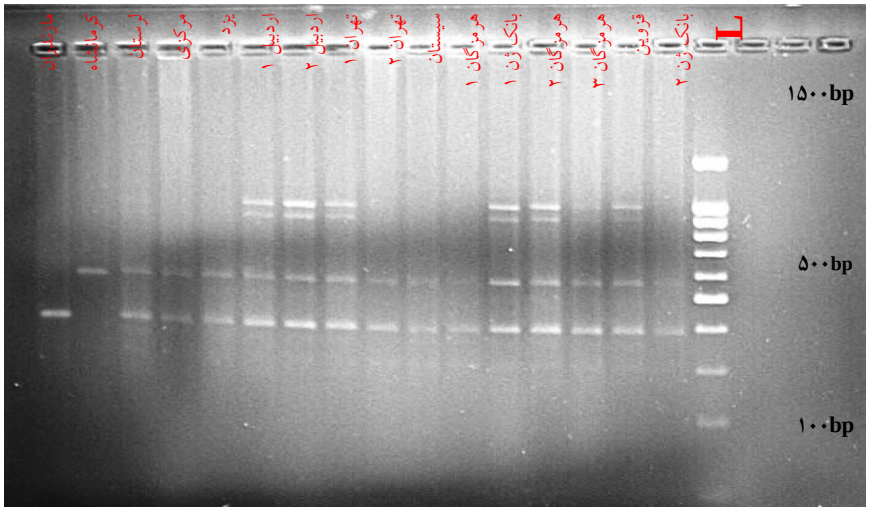
اجزا یک نمونه	جهت تهیه ۲۰ میکرو لیتر
آب دوبار تقطیر	۱۲/۳ میکرو لیتر
بافر PCR (x۱۰)	۲ میکرو لیتر
$MgCl_2$ (۵۰میلی‌مولار)	۱/۵ میکرو لیتر
مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۴ میکرو لیتر
آغازگر (۱۰ میکرومولار)	۱/۵ میکرو لیترهر یک
Taq پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳ میکرو لیتر
DNA	۲ میکرو لیتر
جمع	۲۰ میکرو لیتر

نتایج

تنوع ژنتیکی اکوتیپهای رازیانه با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۸۶ باند تولید کنند که از این تعداد، ۷ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۶ اکوتیپ برابر ۵/۳۷ به دست آمد. آغازگرهای IS13 و IS10 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند بیشترین تعداد و آغازگر IS16 با ۳ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمود. اکوتیپ (بانک ژن ۱) بیشترین باند (۶۸ باند) و اکوتیپ (بانک ژن ۲) کمترین باند (۳۰ باند) را در بین اکوتیپهای مورد بررسی داشتند شکل ۱ الگوی باندی ۱۶ اکوتیپ مورد بررسی به ترتیب با استفاده از آغازگر UBC869 را نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۳ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکلی در بین اکوتیپهای مورد بررسی برابر ۹۰/۰۰ بود که درصد چند شکلی برای آغازگرهای UBC866 (۵۰ درصد)، IS9 (۶۰ درصد)، UBC864 (۷۵ درصد) و IS14 (۸۰ درصد) و برای

سایر آغازگرها میزان چند شکلی برابر ۱۰۰ درصد بود. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۶ بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای UBC807 (۰/۴۸)، UBC844 (۰/۴۲)، IS16 (۴۱ درصد)، UBC848 (۰/۴۰) و IS10 (۰/۴۰) بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی اکوتیپها را مشخص کنند. آغازگر IS9 (۰/۱۵) با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی اکوتیپها نداشت. همچنین میانگین شاخصهای MI و EMR به ترتیب برابر ۱/۸۳ و ۴/۹۸ بود. بیشترین میزان MI و EMR را آغازگرهای IS10 و IS13 و کمترین میزان را آغازگرهای IS9 و UBC866 داشتند.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورزی اکوتیپهای مورد بررسی برای آغازگر UBC869

جدول ۳- تعداد مکان تکثیر شده، تعداد مکان چند شکل، درصد چند شکلی، PIC، MI و EMR در آغازگرهای مورد استفاده

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI	EMR
UBC857	5'-ACACACACACACACACYG-3'	۸/۰۰	۸/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۳	۲/۶۲	۸/۰۰
UBC848	5'-CACACACACACACAARG-3'	۵/۰۰	۵/۰۰	٪۱۰۰	۰/۴۰	۲/۰۰	۵/۰۰
UBC869	5'-GTTGTTGTTGTTGTTGTT-3'	۴/۰۰	۴/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۶	۱/۴۲	۴/۰۰
IS15	5'- GGATGGATGGATGGAT-3'	۵/۰۰	۵/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۷	۱/۸۵	۵/۰۰
UBC866	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'	۶/۰۰	۳/۰۰	٪۵۰	۰/۲۴	۰/۳۶	۱/۵۰
UBC807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	۴/۰۰	۴/۰۰	٪۱۰۰	۰/۴۸	۱/۹۱	۴/۰۰
UBC856	5'-CCGCCGCCGCCGCCGCCG-3'	۶/۰۰	۶/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۴	۲/۰۴	۶/۰۰
IS11	5'-ACACACACACACACACC-3'	۶/۰۰	۶/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۹	۲/۳۳	۶/۰۰
UBC844	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3'	۶/۰۰	۶/۰۰	٪۱۰۰	۰/۴۲	۲/۵۳	۶/۰۰
IS14	5'- GACAGACAGACAGACA-3'	۵/۰۰	۴/۰۰	٪۸۰	۰/۳۶	۱/۱۵	۳/۲۰
IS9	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTG-3'	۵/۰۰	۳/۰۰	٪۶۰	۰/۱۵	۰/۲۸	۱/۸۰
IS16	5'-DBDACACACACACACACA-3'	۳/۰۰	۳/۰۰	٪۱۰۰	۰/۴۱	۱/۲۲	۳/۰۰
IS13	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	٪۱۰۰	۰/۳۳	۳/۳۴	۱۰/۰۰
IS10	5'- GAGAGAGAGAGAGAGARc-3'	۹/۰۰	۹/۰۰	٪۱۰۰	۰/۴۰	۳/۶۴	۹/۰۰
UBC864	5'-CCGCCGCCGCCGCCGCCT-3'	۴/۰۰	۳/۰۰	٪۷۵	۰/۳۶	۰/۸۰	۲/۲۵
میانگین		۵/۷۳	۵/۲۷	٪۹۱	۰/۳۶	۱/۸۳	۴/۹۸

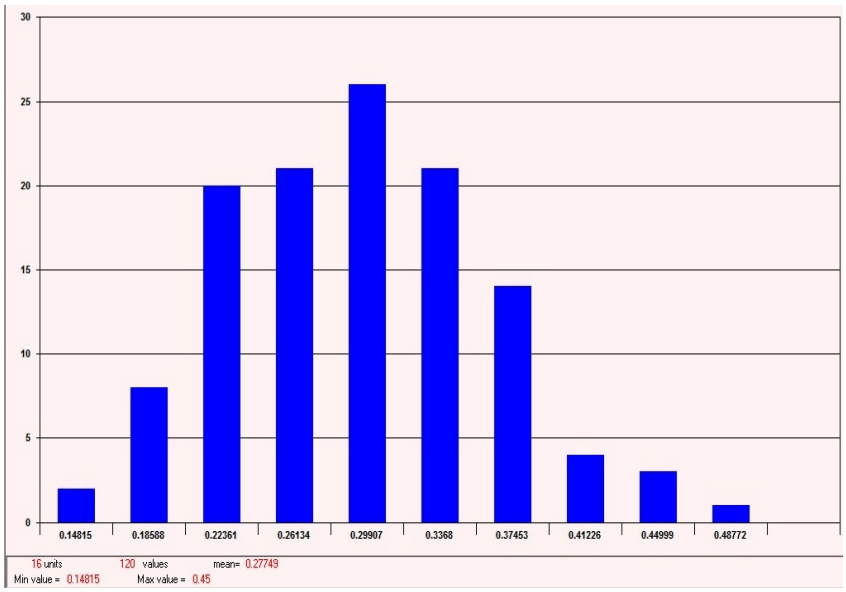
Y=(C,T), V=(A,C,G), D=(A,G,T), B=(C,G,T)

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR)

بررسی میزان تشابه ژنتیکی بین اکوتیپها: تشابه ژنتیکی اکوتیپهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۵۵ تا ۰/۸۵ متغیر بود (جدول ۴)، میانگین تشابه بین اکوتیپها برابر ۰/۵۶ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی یاد شده نشان‌دهنده تنوع‌ژنتیکی خوب و قابل قبولی در بین اکوتیپهای رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را اکوتیپهای (اردبیل ۱) با (اردبیل ۲) و (تهران ۲) با (لرستان) (۰/۸۵) و کمترین تشابه را اکوتیپ (بانک ژن ۲) با (کرمانشاه) و (هرمزگان ۳) (۰/۵۵) داشت. نمودار توزیع فراوانی نشان داد که بیشترین فاصله در بین اکوتیپها در محدوده ۰/۲۹ و کمترین فاصله در ۰/۴۸ می‌باشد (شکل ۲).

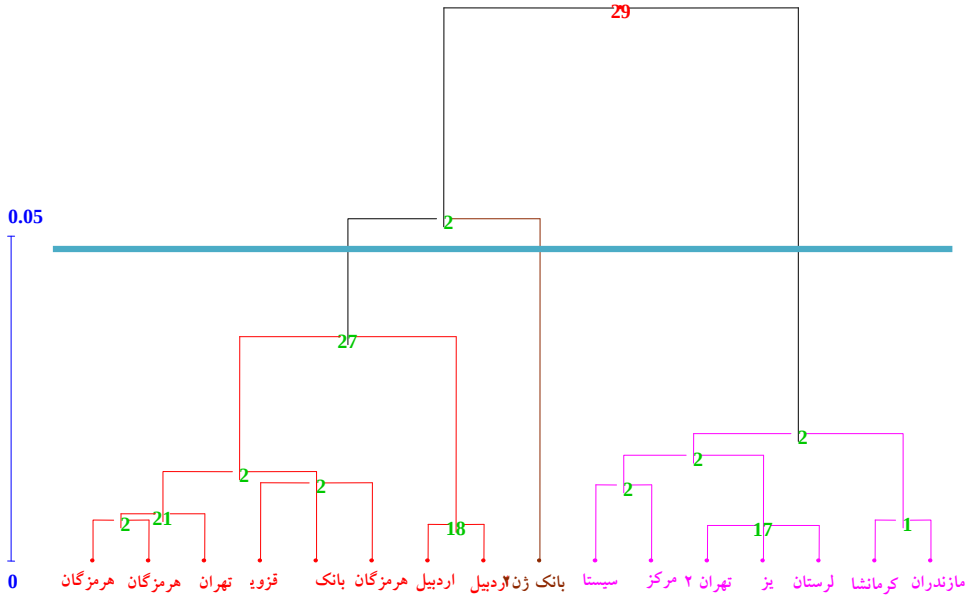
جدول ۴- ماتریس تشابه اکوتیپها برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب دایس

	مازندران	کرمانشاه	لرستان	مرکزی	یزد	اردبیل ۱	اردبیل ۲	تهران ۱	تهران ۲	سیستان	هرمزگان ۱	بانک ژن ۱	هرمزگان ۲	هرمزگان ۳	قزوین	بانک ژن ۲
مازندران	۱															
کرمانشاه	۰/۸۴	۱														
لرستان	۰/۸۲	۰/۸۰	۱													
مرکزی	۰/۸۱	۰/۷۶	۰/۸۰	۱												
یزد	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷۷	۱											
اردبیل ۱	۰/۷۸	۰/۷۱	۰/۷۶	۰/۷۹	۰/۶۷	۱										
اردبیل ۲	۰/۷۴	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۸۵	۱									
تهران ۱	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷۱	۰/۷۷	۰/۷۹	۱								
تهران ۲	۰/۸۱	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۶۶	۰/۶۷	۰/۶۴	۱							
سیستان	۰/۷۰	۰/۸۱	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۴	۰/۶۷	۰/۷۰	۰/۶۴	۰/۷۹	۱						
هرمزگان ۱	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۷۴	۰/۷۵	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۸۲	۰/۷۲	۰/۷۳	۱					
بانک ژن ۱	/۷۱	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۶۷	۰/۷۰	۰/۷۶	۰/۷۳	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۱				
هرمزگان ۲	۰/۷۰	۰/۶۹	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۷۴	۰/۸۰	۰/۸۴	۰/۶۶	۰/۷۰	۰/۷۵	۰/۸۴	۱			
هرمزگان ۳	۰/۷۰	۰/۷۴	۰/۶۶	۰/۶۶	۰/۶۶	۰/۷۵	۰/۷۲	۰/۸۳	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۷۹	۰/۷۶	۰/۸۴	۱		
قزوین	۰/۷۴	۰/۷۳	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۷۹	۰/۶۸	۰/۷۴	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۱	
بانک ژن ۲	۰/۶۳	۰/۵۵	۰/۶۰	۰/۶۴	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۶۱	۰/۶۳	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۵۵	۰/۶۷	۱



شکل ۲- نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی بین اکوتیپهای رازیانه

تجزیه خوشه‌ای: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس برای اکوتیپها در شکل ۳ ارائه شده است. همچنان که ملاحظه می‌گردد اکوتیپها در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل اکوتیپهای (مازندران)، (کرمانشاه)، (لرستان)، (مرکزی)، (یزد)، (تهران ۲) و (سیستان و بلوچستان) بود. اکوتیپ (بانک ژن ۲) به تنهایی در گروه دوم قرار گرفت. گروه سوم شامل ۸ اکوتیپ (بانک ژن ۲)، (اردبیل ۲)، (تهران ۱)، (هرمزگان ۱)، (بانک ژن ۱)، (هرمزگان ۲)، (هرمزگان ۳) و (قزوین) بود.



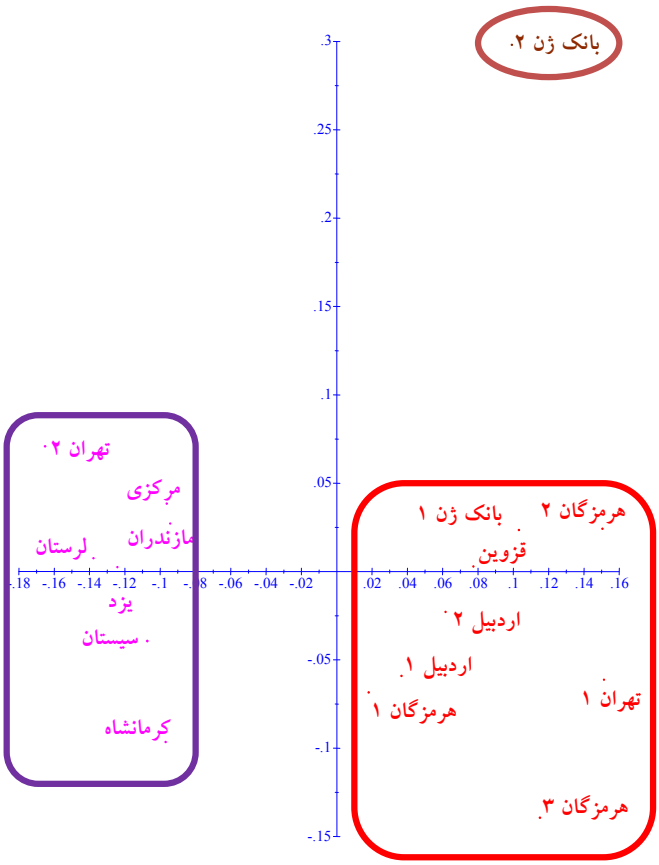
شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده های نشانگر ISSR برای اکوتیپهای مورد مطالعه

تجزیه به مختصات اصلی (PCo): بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای اکوتیپها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۰/۵۱ و ۱۷/۲۷ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۳۷/۸۷ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی اکوتیپها رسم گردید (شکل ۴)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای کاملا مطابقت داشت و اکوتیپها به سه گروه تقسیم شدند.

بحث

با استفاده از آغازگرهای ISSR مشاهده گردید تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین اکوتیپهای رازیانه وجود دارد که این موضوع تایید کننده مطالعات قبلی می‌باشد که در بین ژنوتیپها از نظر مولکولی تنوع وجود دارد. Bahmani و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای بر روی ۲۵ ژنوتیپ رازیانه ایران به منظور بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از ۱۰ نشانگر RAPD انجام دادند گزارش نمودند که رازیانه‌های ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و نشانگر RAPD به خوبی ژنوتیپهای رازیانه را بر اساس توزیع جغرافیایی و تشابهات اقلیمی از هم تفکیک کرده است (۲).

محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، یکی از شاخصهای مهم جهت 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 به سزایی دارد (۱۱).



شکل ۴- بای پلات اکوتیپها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

در حالت کلی و بر اساس شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسیهای رازیانه، آغازگرهای IS10، IS16، UBC844، UBC807 و UBC848 تعیین شد و پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر اکوتیپهای رازیانه در تحقیقات بعدی استفاده گردند. Zahid و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه رازیانه با استفاده از مارکر RAPD انجام دادند نتیجه گرفتند که از ۳۰ پرایمر مورد استفاده ۲۴ پرایمر دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد(۱۴).

Hasani و همکاران (۲۰۱۱) با انجام تحقیقی بر روی ۳۰ نمونه بذر رازیانه جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران و چندین کشور اروپایی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP نتیجه گرفتند از مجموع ۱۱۲۷ نوار مشاهده شده، ۲۵۰ نوار چند شکلی نشان داد (۴).

میانگین تشابه بین اکوتیپها برابر ۰/۵۶۷ بود که پایین بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع‌ژنتیکی بالا در بین اکوتیپهای رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای اکوتیپها در سه گروه قرار گرفتند، که پراکنش اکوتیپها بر اساس تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. شاید علت این موضوع جدایی منشاء جغرافیایی اکوتیپها و ایجاد و تجمع جهشهای ژنتیکی مجزا باشدکه باعث ایجاد تنوع در آنها نسبت به یکدیگر شده است. در حالی که در تعداد دیگری از اکوتیپها چنین تطابقی دیده نشده

که این امر می‌تواند به دلیل منشاء مشترک، مهاجرت و انتقال باشد.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با دیاگرام حاصل از پراکنش اکوتیپها بر اساس مقدار مختصات اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مطابقت نشان داد. تجزیه به مختصات اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده-های مولکولی می‌شود. در مجموع بر اساس آغازگرهای مورد استفاده و با توجه به ماتریس تشابه، تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی پیشنهاد می‌گردد از اکوتیپهایی که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. Hasani و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی بر روی رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP گزارش کردند میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگر برابر ۶۰ درصد بود (۴).

منابع

1- Awasti, A K., Nagaraja, GM., Naik, Gv., Kanginakludru, S., Tangavelu, K. and Nagaraja, J. (2004) Genetic diversity and relationships in mulbert (genus Mours) as revealed by RAPD and ISSR marker assays Bio Medical Gentral. Genetics 5: 1471- 2156.

2- Bahmani, K., Izadi darbandi, A. and Baghchghi, R. (2012) The study of genetic variation Iranian fennel using RAPD molecular marker. Fourteenth Iranian Genetics Congress (in Persian).

3- De Marino, S., Gala, F., Borbone, N., Zollo, F., Vitalini, S., Visioli, F. and Iorizzi, M. (2007) Phenolic glycosides from *Foeniculum Vulgare* Fruit and evaluation of antiocidative activity. Phytochemistry, 68: 1805-1812.

4- Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y. (2005) Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. Genetics Newsletter 35:9-22.

5- Kamoshita, A. and Babu, RC. (2008) phenotypic and Genotypic analysis of drought resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. Field Crops Research J.109:1-23.

6- Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K. and Singh, Sh. B. (2009) Correspondence of ISSR and RAPD Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity among Different Apricot Genotypes from Cold Arid Deserts of Trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology of Plants 15(3): 225-236.

7- Moura, L.S., Carvalho, Jr., Stetanini, M.B., Ming, L.C. and Meireles, M.A.A. (2005) Supercritical Fluid extraction from fennel (*Foeniculum Vulgare*) global yield. Composition and kinetic data. The Journal of supercritical Flouids 35(3): 212-219.

8- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S.and Rafalski, A. (1996) the comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.

9- Schaal, B.A., Lererich, W.J. and Rogstad, S.H. (1991) Comparsion of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk, D.A and Holsinger, K.E> (Eds). Genetics and Conservation of Rare plant.

10- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D and Melwyn, GS. (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Sciatica Horticulture 118: 1-7.

11- Torres, A.M., Weeden, NF. and Martin, A. (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics 85: 935–945.

12- Wang, K., Kang, J., Zhou, H., Sun,Y., Yang, Q., Dong J. and Meng,L., (2009) Genetic diversity of Iris Lactea var. chinesis germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) African Journal of Biotechnology 8: 4856-4863.

13- Zahid, N. Y., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. and Ahmad, Z. (2009) Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare*. Germplasm in Pakistan assessed By RAPD markers. Pakistan Journal of Botany 41(4): 1759-1767.

14- Zheng, B. and Yang, L. (2008) Mapping QTLS for morphological traits undertow water supply conditions at the young seeding stage in rice. Plant science Journal 175: 767-776.

15- Hasani, M.H., S. Torabi, M. Omidi, A.R. Etminan and T. Dastmalchi. 2011. The study of genetic variation *Foeniculum vulgar* Mill. using AFLP molecular marker. Iranian Journal of Field Crop Science 42(3):597-604.

The study of genetic diversity in *Foeniculum vulgare* using ISSR molecular marker

Farshadfar M., shirvani H., Amjadian M. and Gholipour M.

Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is one of the well-known medicinal and aromatic plants. To determine variability between 16 Iranian Fennel ecotypes based on molecular markers, an experiment was carried out based on completely randomized design with three replications at Payame Noor University of Kermanshah, Iran, in 2014. Ecotypes were evaluated based on 15 ISSR primer markers. All of the ISSR primers showed 77 visible bands. The ISSR13 and ISSR10 primers had the most number of bands with 10 and 9 bands respectively. The mean polymorphic information content (PIC=0.36), marker index (MI= 1.83), Effective multiplex ratio (EMR= 4.98) and polymorphism percentage (91%) indices were calculated for all primers. Total genetic similarity based on these primers was 0.567 percent. Cluster analysis classified all ecotypes to three groups. This clustering was confirmed by principal coordinate (PCo) and analysis of molecular variance (AMOVA).

Key words: F*ueniculum vulgare,* Genetic variabilit, ISSR