مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال دوم، شماره چهارم، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ هایی از گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

کیانوش زنگنه[۱*]، براتعلی فاخری[۲]، فاطمه اروجی[۳]، امین افضلی فر[۴]، محمد امین مخدومی[۵]

چکیده

گیاه دارویی رازیانه از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده است که در مناطق گسترده ای از ایران و جهان بصورت خودرو رشد و بصورت تجاری نیز کشت می‌گردد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ رازیانه ایرانی با استفاده از۵ نشانگر ISSR بررسی گردید. نشانگرهای ISSR در کل تعداد ۵۱ قطعه DNA ژنومی تکثیر کردند که ۴۵ باندچند شکل را آشکار نمودند. میانگین تکثیر هر باند چند شکل به ازای هر پرایمر ، میانگین محتوای چند شکلی (PIC) و شاخص مارکری (MI)به ترتیب ۹، ۰/۴۷۸ و ۵/۹۲ محاسبه گردید. دندروگرام بر اساس نتایج UPGMA و ماتریس جاکارد رسم گردید. در گروه بندی حاصل از نشانگر ISSR، اکوتیپ‌های مورد بررسی به سه گروه اصلی طبقه بندی شدند. نمایش اکوتیپ ها بر روی نمودار دو بعدی و سه بعدی براساس سه مؤلفهٔ اصلی اول حاصل تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ (PCoA)، به میزان قابل قبولی، اکوتیپ‌ها را تفکیک نموده و گروه بندی حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای را تأیید کرد. نتایج این بررسی نشان داد که اکوتیپ‌های مورد بررسی دارای تنوع ژنتیکی معنادار بوده و طبقه بندی ژنتیکی آنها با پراکنش جغرافیایی مطابقت دارد.

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

۱*- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه زابل، ایران. kiyanoush.zangane@uoz.ac.ir
۲- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، ایران.
۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه کردستان، ایران.
۴- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه زابل، ایران.
۵- مربی گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

مقدمه

رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) از خانواده چتریان (*Apiaceae*) گیاهی معطر و دارویی علفی و چندساله با عدد پایه کروموزومی 2n=22 (صفایی و همکاران ۱۳۸۷) است. رازیانه بومی جنوب اروپا و منطقه مدیترانه می‌باشد. این گیاه از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی ایران است که از دیرباز بصورت سنتی و امروزه در صنایع مختلف غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود (امیدبیگی ۱۳۷۶). گیاه رازیانه در مناطق مختلفی از جهان مانند اروپا، هند، آرژانتین، آمریکا، برخی کشورهای آفریقایی و کشورهای خاورمیانه کشت می‌گردد (مظفریان، ۱۳۶۲و امیدبیگی، ۱۳۷۶). این گیاه به دلیل سازگاری در مناطق جغرافیایی متعدد، تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ، مقاومت به خشکی و نیاز آبی کم مورد توجه بوده است (Charles et al., 1993). رازیانه به خوبی با آب و هوای گرم و خشک ایران سازگاری یافته و در بسیاری از مناطق ایران کشت می‌گردد.

تنوع ژنتیکی یک ابزار بقا برای سازگاری با شرایط متغیر اقلیمی در بین گونه‌های جانوری و گیاهی می‌باشد. جمعیت هایی که دارای تنوع ژنتیکی بالاتری در درون خود هستند به احتمال بیشتر دارای الل‌های منحصربه فردی در بین افراد هستند که می تواند به آنها در بقا گونه در گلوگاه های انتخاب طبیعی کمک کند (Barr et al., 1999). از اینرو وجود تنوع ژنتیکی مناسب بین گونه‌های گیاهی دارای ارزش اقتصادی مانند گیاهان دارویی، حایز اهمیت می‌باشد. در این راستا بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌های اهلی شده و ژنوتیپ‌های وحشی آنها از نظر حفظ منابع ژنتیکی هر منطقه و همچنین کمک به برنامه‌های اصلاحی مرسوم یا تکنیک‌های پیشرفته مولکولی و بیوتکنولوژیک دارای اهمیت ویژه است (El-Kassaby and Ritland, 1996). بررسی تنوع بین گونه‌ها را می‌توان با توجه به تغییرات در صفات تظاهر یافته ناشی از بیان ژنها بصورت مورفولوژیک شناسایی نمود. اما با توجه به اثر متقابل محیط بر مکانیسم های بیان ژن، بهترین روش بررسی تنوع بین گونه‌ها، استفاده مستقیم از ماده ژنتیکی می‌باشد. تنوع ژنتیکی را می توان بطور قابل اعتماد بر اساس تغییرات موجود در توالی‌های نوکلئوتیدی بر روی رشته DNA شناسایی نمود. به دلیل تکرار پذیری و دقت نشانگرهای مولکولی از آنها در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و شناسایی ژن‌ها و طبقه بندی صفات در جانداران استفاده می‌شود (Bernardo, 2008). انواع تکنیک‌های نشانگر مولکولی بر حسب نوع کاربرد، نیازهای اجرایی، حساسیت و میزان صحت با یکدیگر تفاوت دارند (Saunders et al., 2001). نشانگر مولکولی ISSR از انواع نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR می‌باشد که در آن از پرایمرهای حاوی یک توالی ریزماهواره ای در یک انتهای 3' یا 5' به همراه ۲-۴ نوکلئوتید دلخواه استفاده می‌شود. نشان داده شده است که نشانگر ISSR ابزار مولکولی سریع، ساده و مقرون به صرفه برای ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و روابط ژنتیکی بین آنها می‌باشد (Culley et al., 2007).

نشانگرهای مولکولی در نقاط مختلف جهان به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از انواع گیاهان زراعی، باغی و دارویی مورد استفاده گسترده قرار گرفته‌اند. گیاه رازیانه نیز با تنوع گستره جغرافیایی وسیع در بسیاری از کشورهای دنیا مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفته است. از نشانگر ISSR برای شناسایی و تعیین روابط ژنتیکی بسیاری از گیاهان دارویی در سطح گونه، جمعیت و ژنوتیپ با موفقیت استفاده شده است. زاهد و همکاران (۲۰۰۹) ۵۰ ژنوتیپ رازیانه در کشور پاکستان را مورد بررسی قرار داده و تنوع آنها را با استفاده از ۳۰ نشانگر RAPD ارزیابی نمودند. نتایج مطالعه وی نشان داد که در بین ۵۰ ژنوتیپ مورد بررسی، تنوع ژنتیکی قابل توجهی وجود داشت. از مجموع نشانگرهای مورد استفاده ۲۴ نشانگر باندهای مشخص و متنوعی را آشکار کردند که ۴۸ درصد چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌ها نشان داد (Zahid et al., 2009). تنوع فنوتیپی و ژنتیکی بین سه واریته رازیانه با استفاده از دو نشانگر مولکولی ISSR و PAPD مورد بررسی قرار گرفت و تنوع قابل توجهی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر ژنتیکی با استفاده از نشانگرها و از نظر فنوتیپی با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیک مشاهده شد (Abou et al., 2013). بررسی

تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ رازیانه با استفاده از دو نشانگرRAPD و ISSR تنوع معنی داری بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد. این پژوهش نشان داد که تنوع نشان داده شده توسط نشانگرهای مولکولی مورد استفاده با تنوع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها همخوانی دارد (Bahmani et al., 2013). طاهری و همکاران (۱۳۹۴) تنوع ژنتیکی ۳۲ اکوتیپ رازیانه ایرانی را با استفاده از دو نشانگر مولکولی ISSR و RAPD بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود داشته و هر دو نشانگر مولکولی تنوع مشابه‌ی را گزارش نمودند که با پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها همخوانی داشت.

در این پژوهش به منظور بررسی بیشتر تنوع ژنتیکی بین گونه‌های وحشی رازیانه ایرانی، تعداد ۱۷ اکوتیپ این گیاه از مناطق مختلف جغرافیایی توسط نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۷ اکوتیپ گیاه رازیانه متعلق به مناطق مورد مطالعه از بانک ژرم پلاسم گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان دریافت شد (جدول۱). استخراج DNA به روش CTAB (Saunders et al., 2001) با اندکی تغییر انجام شد. بطور خلاصه، حدود ۱ گرم بذر با استفاده از نیتروژن مایع در هاون بخوبی پودر شد. یک میلی لیتر بافر استخراج 100 mM Tris-HCl (1 M, pH 8.0), 2% (w/v) CTAB, 50 mM Na2EDTA (0.5 M, pH(8.0),700 mM NaCl ، حاوی 1% (v/v) بتامرکاپتواتانول و ۰/۷ گرم پلی وینیل پرولیدین (PVP) به بافت گیاهی اضافه شد. این ترکیب در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت به آرامی مخلوط شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. مایع رویی برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ سرد شد. حجم برابری از مایع سوپرناتانت حاوی کلروفرم/ اینروآمیل الکل (24:1) به هر تیوب اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۳۰۰۰ دور دقیقه (RPM) سانتریفیوژ شدند. لایه رویی سوپرناتانت حذف شد. به منظور رسوب DNA، 1/10 حجمی از استات سدیم سرد (-20 C) با غلظت (3M, pH 8.0) و حجم معادل آن از ایزوپروپانول سرد به نمونه‌ها اضافه شد و به آرامی میکس گردید. محتوای DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در زمان ۳۰ دقیقه رسوب نمود. سپس در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و جداسازی شد. محتوای DNA استخراج شد با اتانول 70%(v/v) شسته شد و در محیط آزمایشگاه خشک شد. DNA استخراج شده نهایی در 50 µL آب دیونیزه استریل به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حل شد. سپس 1µL RNaseA (10 mg/ml) به هر تیوب اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری (NanoDrop nt-1000, Thermo Fisher Scientific) ارزیابی شد. محصول نهایی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد جهت استفاده در مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد.

یازده پرایمر ISSR در مرحله نخست بر روی نمونه‌ها تست شد و از این میان تعداد ۵ پرایمر به دلیل تولید الگوهای باندی تکرار پذیر، بیشتر و شفاف تر انتخاب شدند (جدول۲). مراحل مختلف PCR برای این روش با استفاده از غلظت های مختلف DNA، dNTP ، آنزیم Taq و دمای اتصل PCR بهینه سازی شد. تکثیر PCR برای هر نمونه در حجم نهایی 25 µL هر واکنش حاوی بافر PCR (1x)، dNTP (0.8 mM)، 1µL از هر پرایمر، MgCl2 (2 mM) ، آنزیم Taq (0.75U) و آب دوبار تقطیر انجام شد. عملیات PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ABI feniti 96 well با شرایط زیر

جدول ۱- کد و محل جمع‌آوری ۱۷ اکوتیپ رازیانه

محل جمع‌آوری	نام اکوتیپ	کد	محل جمع‌آوری	نام اکوتیپ	کد
دماوند	Damvnd	۱۰	بانه	Bane	۱
بابل	Babol	۱۱	گرگان	Gorgan	۲
رامسر	Ramsr	۱۲	همدان	Hamedn	۳
آستارا	Astara	۱۳	ساری	Sari	۴
بندرعباس	BandrAbs	۱۴	کردستان	Kordstn	۵
اصفهان	Esf	۱۵	رشت	Rasht	۶
یزد	Yazd	۱۶	سنندج	Sanndj	۷
کرمان	Kerman	۱۷	قزوین رویشگاه ۱	Ghazvin1	۸
			قزوین رویشگاه ۲	Ghazvin2	۹

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

دمای اتصال	توالی آغازگر ('۳-'۵)	نام آغازگر	ردیف
۴۸	5´GAGAGAGAGAGAGAGAT3´	۳	۱
۵۲	5′GAGAGAGAGAGAGAGATC3´	۵	۲
۵۲	5´AGAGAGAGAGAGAGAGGTT3´	۶	۳
۳۶	5´AGAGAGAGAGAGT3´	۱۰	۴
۳۹	5´CACACACACACAAC3´	۱۱	۵

انجام شد: واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه یک دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در دمای بهینه اتصال، ۱ درقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، و مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد. محصول نهایی PCR در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

محصول PCR در مرحله نهایی بر روی ژل الکتروفورز اگارز 2% (w/v) در 1x TBE buffer (pH 8.0) با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت. از Gel Red برای رنگ آمیز ژل و مشاهده تحت نور UV استفاده شد. وزن مولکولی باندها با استفاده از لدر 100bp DNA تخمین زده شد.

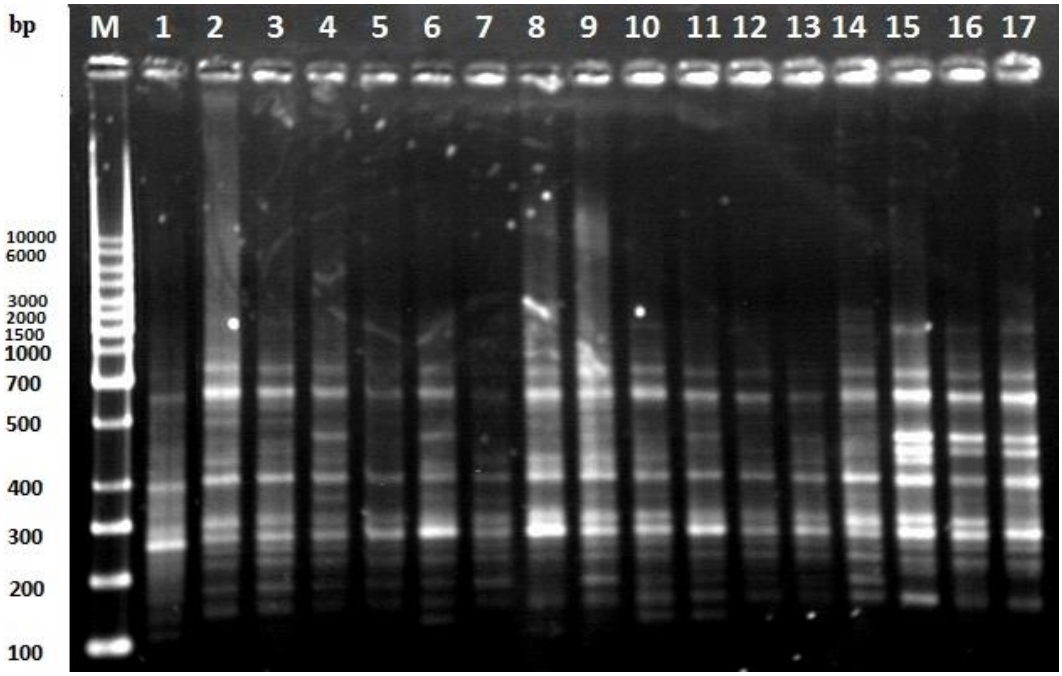
آنالیز داده ها

باندهای چند شکل مشخص و تکرارپذیر برای هر پرایمر ISSR برحسب وجود باند (۱) یا عدم وجود باند (۰) امتیاز دهی شدند. داده‌ها در جداول باینری ذخیره سازی شد. تنوع ژنتیکی، ساختار روابط ژنتیکی، ضریب همبستگی کوفنیتیک، ضرایب تشابه، تجزیه خوشه‌ای شاخص همبستگی و PCoA با استفاده از نرم افزار NTSYSpcv.2.10e محاسبه گردید (جدول ۴ و ۵).

نتایج و بحث

نتایج بررسی نشانگر مولکولی ISSR بر روی ۱۷ اکوتیپ رازیانه ایرانی با استفاده از ۵ آغازگر منتخب، تنوع ژنتیکی معناداری را بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آشکار ساخت. تعداد ۵ آغازگر ISSR در مجموع ۵۱ قطعه تکثیر نمودند، که از این میزان ۴۵ باند چندشکلی نشان دادند (شکل ۱). میانگین تعداد کل قطعه تولید شده و تعداد باند چند شکل به ازای هر آغازگر به ترتیب ۱۰/۲ و ۹ عدد بود. بالاترین تعداد باند توسط آغازگرهای ۶ و ۱۱ (هر یک ۱۲ باند) و کمترین تعداد باند(۸ باند) توسط آغازگر ۱۰ تولید گردید. اندازه باندهای تولید شده مورد سنجش در محدوده 100- 1000 bp بود. بیشتر سطح چند شکلی به ترتیب توسط آغازگر های ۱۱و ۳ بدست آمد. آغازگر ۶ کمترین درصد و تعداد باند چندشکل را در تکثیر نمود. همچنین درصد چندشکلی در بالاترین و پایین‌ترین میزان بین ۱۰۰% (آغازگرهای ۳،۱۰، ۱۱) و ۵۸% (آغازگر۶)، با میانگین کل ۸۸% محاسبه گردید (جدول ۳).

معیار میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) شاخصی برای تعیین قدرت تمایز هر جفت آغازگر از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی نسبی آلل ها می باشد و حداکثر میزان میانگین PIC در جایگاه های دو آللی برابر ۰/۵ می‌باشد و تنها در شرایطی رخ میدهد که فراوانی آلل‌ها در جمعیت مساوی باشد (Mateescu et al., 2005). بر این اساس این میزان با توجه به میانگین PIC کل (۰/۴۸) برای همه نشانگرها، مقدار معنی دار و قابل توجهی می‌باشد (جدول۳). شاخص نشانگر (MI^2) معیاری دیگر از قدرت تفکیک و کارایی یک آغازگر در مقایسه با دیگر آغازگرها بر اساس تعداد مکان ژنی چندشکل تکثیر شده است (Powell et al., 1996). آغازگر ۶ دارای کمترین مقدار MI (۱/۸۲) و آغازگر ۱۱ با بیشترین مقدار MI (۸/۸۸) ثبت شدند. بر این اساس، آغازگر ۱۱ بالاترین قدرت تفکیک چندشکلی و تنوع را دارد. در مجموع با توجه به میانگین شاخص نشانگر (MI) و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) به خوبی نشان داد که نشانگر ISSR مورد استفاده کارایی خوبی در بررسی روابط ژنتیکی گیاه رازیانه داراست. در پژوهشی ، نادری و همکاران (۱۳۹۳) از نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۶ لاین نخود استفاده نمودند و نشان دادند که با توجه میانگین شاخص‌های نشانگر و میزان اطلاعات چندشکل، تفکیک خوبی بین لاین مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۳).



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده توسط نشانگر ISSR- آغازگر ۱۱

جدول ۳- تعداد باندها و میزان اطلاعات چندشکلی هر کدام از آغازگرهای ISSR

ردیف	نام آغازگر	کل باندها	باندهای چندشکل	درصد چند شکلی	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر(MI)
۱	۳	۱۰	۱۰	۱۰۰%	۰/۶۵	۶/۵
۲	۵	۹	۸	% ۸۹	۰/۶۵	۵/۲
۳	۶	۱۲	۷	% ۵۸	۰/۲۶	۱/۸۲
۴	۱۰	۸	۸	۱۰۰%	۰/۹۰	۷/۲
۵	۱۱	۱۲	۱۲	۱۰۰%	۰/۷۴	۸/۸۸
	مجموع	۵۱	۴۵	% ۸۸	-	-
	میانگین	۱۰/۲	۹	-	۰/۴۷۸	۵/۹۲

جدول ۴- نتایج محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیك بین ضرایب تشابه و سه روش تجزیه خوشه‌ای

	ضریب دایس	ضریب جاکارد
UPGMA	۰/۸۴۵۵	۰/۸۴۹۸
UPGMC	۰/۲۹۹۸۶	۰/۳۷۱۶۸

جدول ۵- تجزیه مولفه‌های اصلی بر اساس نشانگرهای ISSR در ۱۷ اکوتیپ رازیانه

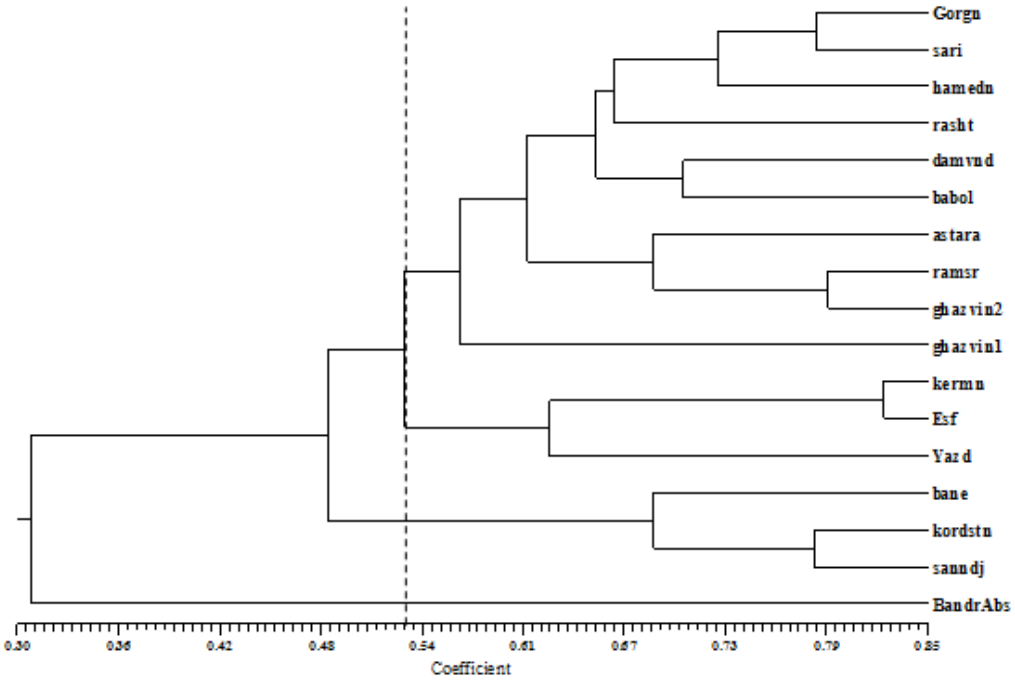
مولفه اصلی	مقادیر ویژه	درصد واریانس	واریانس تجمعی
مولفه اول	۱/۴۷	۱۹/۷۶	۱۹/۷۶
مولفه دوم	۰/۹۷	۱۲/۹۵	۳۲/۷۲
مولفه سوم	۰/۸۰	۱۰/۷۷	۴۳/۴۹

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA[1] و UPGMC و با استفاده از دو ماتریس شباهت جاکارد و دایس انجام شد. با توجه به بالاتر بودن ضریب همبستگی در ماتریس جاکارد نسبت به دایس، این ماتریس به عنوان مرجع انتخاب گردید. (جدول۴). دندروگرام رسم شده حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد (J) و الگوریتم UPGMA ژنوتیپ های مورد مطالعه را به سه گروه اصلی و یک گروه فرعی شامل تنها رقم بندرعباس طبقه بندی نمود (شکل۲). به این ترتیب، ژنوتیپ های گرگان، ساری، همدان، رشت، دماوند، بابل، آستارا، رامسر، قزوین۱ و قزوین ۲ در گروه اول قرار گرفتند. ژنوتیپ های گروه دوم شامل کرمان، اصفهان و یزد بودند. ژنوتیپ‌های بانه، کردستان و سنندج نیز در گروه سوم قرارگرفتند. براساس این نتایج مشاهده میشود که آنالیز حاصل از تنوع محتوای ژنتیکی براساس نشانگر مورد استفاده در پژوهش، به میزان قابل توجهی با طبقه بندی ژنوتیپ‌ها برحسب موقعیت جغرافیایی و اقلیمی جمع آوری نمونه‌های گیاهی (بذر) همخوانی دارد. این امر ناشی از اثر متقابل محیط و ژنوتیپ برای محتوای ژنتیکی گیاه بوده و قابل انتظار می‌باشد. بر این اساس ژنوتیپ‌هایی که در نقاط مختلف آب و هوایی و تحت شرایط تنش‌های زیستی و غیر

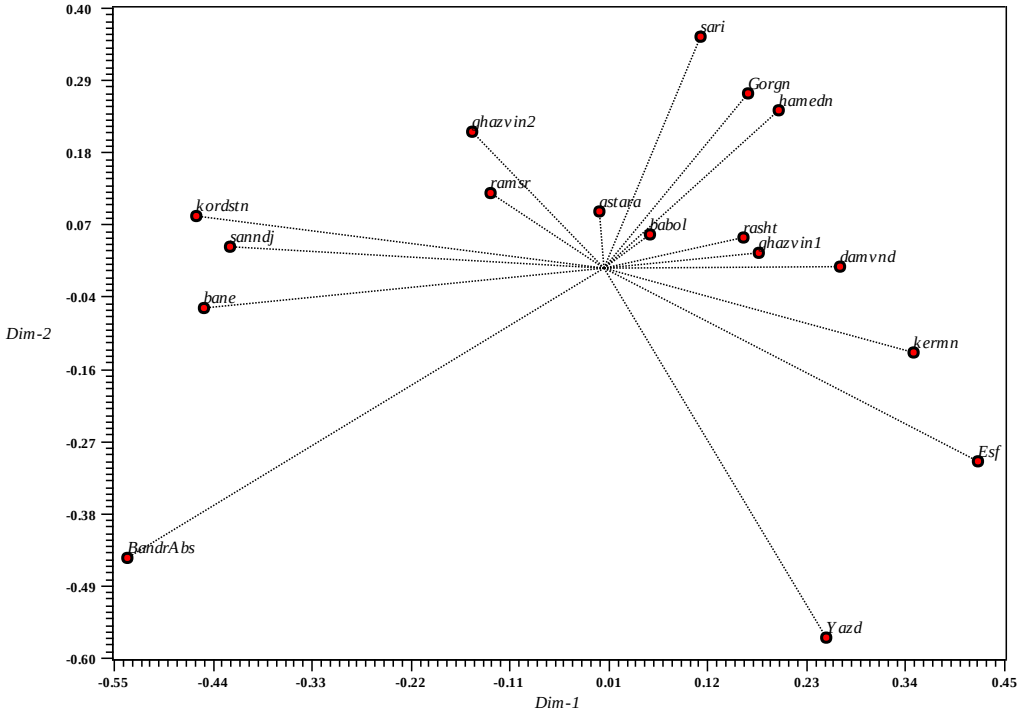
1- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

زیستی متفاوت سازگار شوند، مکانیسم‌های سازگاری خود را در محتوای ژنتیکی خود تثبیت نموده و به نسل‌های بعد انتقال می‌دهند. در ژنوتیپ‌های گروه اول بطور عمومی می‌توان دید که همگی متعلق به مناطق شمال و شمال غرب کشور هستند. با این حال، آغازگرهای مورد استفاده توانستند به دقت مناسبی ژنوتیپ‌هایی که در مناطق جغرافیایی نزدیک تر و شرایط اقلیمی مشابه سازگار شده‌اند را با فاصله ژنتیکی کمتری طبقه بندی کنند. به عنوان مثال، ژنوتیپ‌های ساری، گرگان، رشت، دماوند، بابل، آستارا، رامسر و قزوین۲؛ کرمان، یزد و اصفهان؛ کردستان و سنندج، در کلاسترهای فرعی مشترکی قرار گرفته‌اند (شکل ۲). کمترین فاصله ژنتیکی یا پایین‌ترین تنوع ژنتیکی به ترتیب بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های کرمان و اصفهان؛ رامسر و قزوین ۲؛ گرگان و ساری؛ و نهایتا کردستان و سنندج ثبت شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین زیرگروه‌های گرگان-ساری با کردستان-سنندج مشاهده شد. بررسی تشابه یا فاصله ژنتیکی در مطالعات نشانگر مولکولی می تواند شاخصی از فاصله جغرافیایی گونه‌های مورد بررسی تلقی شود. چنین دانشی از روند تکامل گونه و توارث پذیری صفات منتخب در طول دوره تکاملی در هر منطقه ابزار مفیدی برای پیش بینی تقریبی یا برنامه ریزی برنامه‌های اصلاحی بلند مدت می‌باشد (Burton and Devane, 1953). وجود رابطه بین تنوع ژنتیکی و فاصله جغرافیایی و اقلیمی همچنین در مطالعات دیگر بر روی گیاهان دارویی مانند بومادران ایرانی (Farajpour et al., 2012)، رازیانه ایرانی(Bahmani et al., 2013) و گیاه درمنه مالزیایی (Shafie et al., 2009) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزارش شده است. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ژنوتیپ بندرعباس با اختلاف بسیار زیادی (در حدود ۷۰% اختلاف) از دیگر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در یک زیرگروه فرعی قرار گرفت. آغازگرهای ISSR با دقت مناسبی ارتباط ژنتیکی اکثر ژنوتیپ‌های مورد بررسی را مشخص و آنها را تفکیک نمودند. از این رو، این نتیجه در مورد ژنوتیپ بندرعباس احتمالا به دلیل اشتباه در نمونه برداری یا نامگذاری نمونه گیاهی متفاوت جمع آوری شده از منطقه رخ داده است. بنابراین، لازم است اصالت نمونه بذر تهیه شده از منطقه بندرعباس مجددا مورد بررسی قرارگیرد. این چنین یافته‌ها در بررسی‌های تنوع را می‌توان از مزیت‌های استفاده از نشانگرهای مولکولی در بانک‌های ژرم پلاسم دانست.

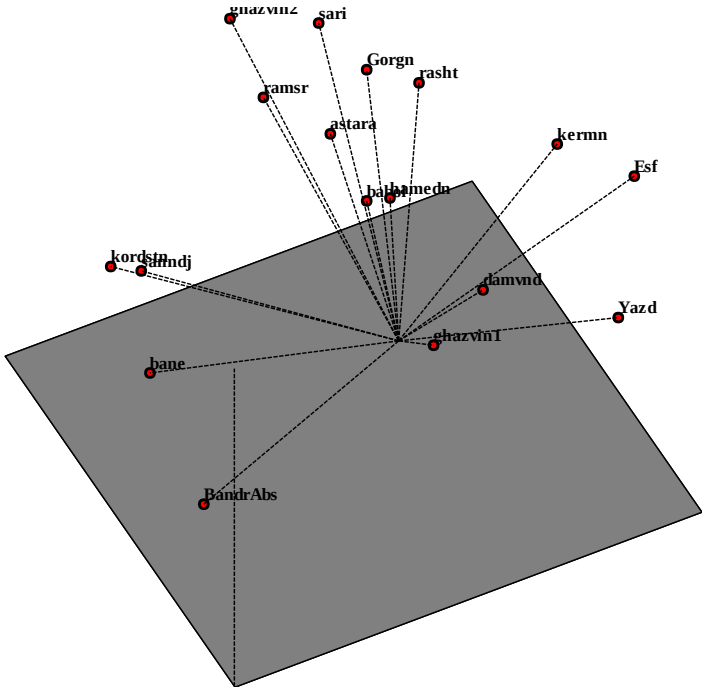
تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی(PCoA) نشان داد که سه مولفه اول ۴۳/۴۹% درصد از کل تغییرات مولکولی بین ژنوتیپ‌ها را توجیه نمودند (جدول۵). رسم نمودار دو بعدی (شکل۳) و سه بعدی (شکل۴) بر اساس نتایج PCoA برای سه مولفه اصلی اول، به میزان مناسبی ضمن همخوانی با نتایج دندروگرام، نتایج حاصل از تفکیک ژنوتیپ‌ها در تجزیه خوشه‌ای را تایید نمود. با این حال، عدم تطابق کامل نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه براساس مولفه‌های هماهنگ اصلی در تجزیه‌های چند متغییره مانند تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی محتمل بوده و ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در گستره ژنوم است. از اینرو عدم کفایت سه مولفه برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی نشان داده می‌شود. با این حال، توزیع مناسب نشانگر در سراسر ژنوم به معنای بررسی کارآمدتر و دقیق‌تر تنوع به دلیل پراکندگی مناسب نمونه برداری از ماده ژنتیکی جاندار می باشد (Mahmood et al., 2011).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از الگوی چندشکلی ۱۷ اکوتیپ رازیانه با آغازگرهای ISSR با نرم‌افزار NTSYS



شکل ۳- نمودار دو بعدی تجزیه مولفه‌های اصلی ۱۷ اکوتیپ رازیانه با نرم‌افزار NTSYS



شکل ۴- نمودار سه بعدی تجزیه مولفه‌های اصلی ۱۷ اکوتیپ رازیانه با نرم افزار NTSY

از نظر کاربردی، باوجود شناخت جهانی از ارزش و کاربرد گیاه دارویی رازیانه، تاکنون اقدامات اصلاحی محدودی با استفاده از تکنیک های مرسوم اصلاح نباتات اجرا شده است. اما با توجه به انکه در چنین شیوه هایی، درصد بالایی از صفات مشاهده شده بصورت کمی به وراثت می رسند و مستقیما تحت تاثیر شرایط محیطی می‌باشند، به سختی می‌توان در مورد پایداری صفات انتقال یافته در صورت تغییر شرایط اقلیمی یا جغرافیایی اطمینان داشت. از اینرو، استفاده از تکنیک های پیشرفته مولکولی و بیوتکنولوژیک می‌تواند در بازه زمانی و هزینه‌های مطلوب‌تر نتایج مطمئن‌تری در اختیار قرار دهد. بر این اساس، آگاهی از میزان اثر تنوع محیط و ژنتیکی بر گیاهان برای شناخت بهتر مکانیسم تکامل صفات مختلف در شرایط مختلف مفید و لازم می‌باشد (Patel et al., 2011). در این راستا، نتایج این بررسی نشان داد که نشانگر مولکولی ISSR ابزار قابل اعتماد و مفیدی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاه رازیانه می‌باشد. این نتیجه با یافته‌های پژوهش‌های قبلی در استفاده از این نشانگر بر روی گیاه رازیانه همسو می‌باشد (Abou et al., 2013; Bahmani et al., 2013).

نتیجه‌گیری

بررسی اطلاعات ژنتیکی از ارقام و گونه‌های گیاهی به منظور حفظ تنوع و انتخاب منابع ژنتیکی غنی و دارای بالاترین تنوع همواره مورد توجه بوده است. نشانگرهای مولکولی مانند ISSR با توجه قدرت تفکیک مناسب، قابلیت تکرارپذیری بالا، و سادگی ، سرعت و هزینه مناسب اجرا از ابزارهای مطلوب برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند. نشانگر مولکولی ISSR در این پژوهش توانست تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به خوبی آشکار سازد که با توجه به پراکنش جغرافیایی و اقلیمی نمونه‌ها، همخوانی داشت. این امر نشان دهنده پدیده اپیژنیک یا تعامل ژنتیکی گیاه و اثر شرایط اقلیمی و جغرافیایی بر خصوصات نسل‌های گیاهی در مناطق جغرافیایی می‌باشد. شناخت چنین تنوعی و همچنین بررسی دلایل طبیعی و یا ناشی از دخالت‌های انسان در طبیعت می‌تواند در حفظ منابع طبیعی کشور و همچنین فراهم نمودن اطلاعات مناسب و کاربردی به منظور اجرای طرح‌های اصلاحی حایز اهمیت باشد.

منابع

امید بیگی، ا.، صدرایی منجیلی، ر.ک.، و سفیدکن، ف.، (۱۳۷۶). اثر تاریخ کاشت بر عملکردهای کمی و کیفی گیاه *Foeniculum vulgare*. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲: ۴۶۵-۴۷۹.

صفایی، ل.، زینلی، ح.و جابرالانصار، ز.، (۱۳۸۷). مطالعه کاریوتیپی ۵ جمعیت رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) بومی ایران. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۶: ۱۲۵-۱۱۷

طاهری ص, ضابط م, ایزانلو ع, ایزدی دربندی ع.، (۱۳۹۴). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ های رازیانه با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۷: ۱۱۳-۱۲۸.

مظفریان، و.، (۱۳۶۲). گیاهان خانواده چتریان در ایران، کلید شناسایی و پراکنش. موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، نشریه ۳۵، ۳۸۸ صفحه.

نادری ح, حیدر, شکرپور, اصغری, کانونی, همایون, اسفندیاری, عزت‌اله, (۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های نخود با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. علوم گیاهان زراعی ایران ۴۵: ۵۰۹-۵۱۹.

Abou E-NT, Ibrahim M, Aboud K, Al-Kordy M, (2013). Genetic variation among three fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) varieties on the basis of morphological characters, essential oil composition and ISSR markers. Journal of Applied Science Research 9, 1594-16.

Bahmani K, Izadi Darbandi A, Sadat Noori SA, Jafari AA, (2013). Assessment of the genetic diversity in Iranian fennels by RAPD markers. Journal of herbs, spices & medicinal plants 19, 275-285.

Barr H, Hammick M, Koppel I, Reeves S, (1999). Evaluating interprofessional education: two systematic reviews for health and social care. British Educational Research Journal 25, 533-544.

Bernardo R, (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. Crop science 48.۱۶۴۹-۱۶۶۴ ,

Burton GW, Devane E, (1953). Estimating heritability in tall fescue (*Festuca arundinacea*) from replicated clonal material. Agronomy Journal 45, 478-481.

Charles DJ, Morales MR, Simon JE, (1993). Essential oil content and chemical composition of *finocchio fennel*. Journal New crops. Wiley, New York 570-573.

Culley TM, Sbita SJ, Wick A, (2007). Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the perennial herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR markers. Annals of botany 100, 91-100.

El-Kassaby YA, Ritland K, (1996). Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. Biodiversity & Conservation 5, 779-794.

Farajpour M, Ebrahimi M, Amiri R, Golzari R, Sanjari S, (2012). Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker. Biochemical Systematics and Ecology 43, 73-79.

Mahmood Z, Athar M, Khan MA, Ali M, Saima S, Dasti AA, (2011). Analysis of genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Biotechnology 10, 140-145.

Mateescu R, Zhang Z, Tsai K, Phavaphutanon J, Burton-Wurster N, Lust G, Quaas R, Murphy K, Acland G, Todhunter R, (2005). Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. Journal of Heredity 96, 847-853.

Patel D, Patel P, Patel I, (2011). Studies on variability of some morphological characters in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) 1. Journal of Spices and Aromatic Crops 17,

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.

Saunders JA, Pedroni MJ, Penrose LD, Fist AJ, (2001). AFLP analysis of *Opium poppy*. Crop Science 41, 1596-1601.

Shafie MSB, Hasan SZ, Shah RM, (2009). Study of genetic variability of Wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia. Plant Omics J 2, 127-134.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 2, No 4, Autumn & Winter 2016

Study of genetic diversity in Fennel (*Foeniculum vulgare*) ecotypes using ISSR marker

Kiyanoush Zanganeh[1], Baratali Fakheri[2], Fateme Orooji[3], Amin Afzalifar[1], Mohammad Amin Makhdoomi[4]

Abstract

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is one the oldest known medicinal plants, which is naturally and commercially grown in Iran and many parts of the world. In this study, the genetic variation of 17 Iranian fennel ecotypes were investigated by ISSR molecular marker. The ISSR markers produced a total of 51 genomic DNA segments, of which 45 bands were polymorphic. The mean polymorphism per primer, mean Polymorphic Index Content (PIC), and Marker Index (MI) were 9, 0.478 and 5.92, respectively. The dendrogram was constructed using UPGMA method and Jaccard's similarity matrix. The ecotypes were grouped under three main groups. The 2D and 3D PCoA analysis confirmed the results of the cluster analysis. The results indicated that the studied ecotypes had meaningful genetic diversity, and the genetic grouping using ISSR markers was correlated with the geographical distribution of the genotypes. This study could improve the knowledge about the Iranian fennel genetic pool, and contribute to breeding and germplasm protection programs of medicinal plants.

Key word: Genetic diversity, Fennel, ISSR molecular marker.

1. Ph.D Student of Plant Breeding, University of Zabol, Iran. Kiyanoush.Zangane@uoz.ac.ir – 09158832477.
2. Prof. of Plant Breeding and Biotechnology Department, University of Zabol, Iran.
3. Ph.D Student of Biotechnology, University of Kurdestan, Iran.
4. Agronomy Group, Payam Noor University, Tehran, Iran.