مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۰ (۶۰۴-۵۹۷)

# ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) با استفاده از نشانگرهای ملکولی AFLP

**محمدحسین حسنی[1]*، سپیده ترابی[2]، منصور امیدی[3]، علیرضا اطمینان[4] و ترانه دستمالچی[5]**
۱، ۲، ۴، ۵، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشجوی دکتری و دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۳، استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۴/۲۹)

## چکیده

**در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه بذور رازیانه که از مناطق مختلف ایران و چندین کشور اروپایی جمع‌آوری شده است با استفاده از ۲۰ ترکیب آغازگر انتخابی AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع از ۱۱۲۷ نوار مشاهده شده، ۲۵۰ نوار چندشکلی نشان داده شدند. آغازگر E11-M20 با تعداد ۲۰ باند و آغازگرهای E46-M35 و ETG-M20 با تعداد ۸ باند به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوار چندشکلی را به خود اختصاص دادند. میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده بر اساس اطلاعات این نشانگرها برابر ۶۰٪ بود. بیشترین تشابه ژنتیکی مشاهده شده بین دو ژنوتیپ از کشور مجارستان برابر ۹۷٪ و در نمونه‌های ایرانی مربوط به دو ژنوتیپ از شهرهای کرج و کاشان برابر ۸۹٪ بوده است. یک ژنوتیپ از تبریز با ۴۰٪ تنوع ژنتیکی، بیشترین میزان تنوع را با سایر نمونه‌ها نشان داد. نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای تا حدی ارتباط بین تنوع ملکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داده است به طوریکه نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق نزدیک‌تر به هم، در برخی موارد در گروه‌ها و یا زیرگروه‌های یکسان قرار گرفتند. از طرف دیگر برخی از نمونه‌هایی که در یک زیرگروه قرار گرفته بودند نیز از مناطق جغرافیایی متفاوتی بودند که می‌تواند به دلیل تشابه شرایط اقلیمی یا تبادل فیزیکی مواد بین این مناطق بوده باشد. نتایج این بررسی بیانگر مناسب بودن نشانگرهای AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف رازیانه است.**

**واژه‌های کلیدی:** نشانگرهای ملکولی AFLP، تنوع ژنتیکی، بذر رازیانه.

### مقدمه

گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)، یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی مورد استفاده انسان است. به طوری که مردم یونان و روم باستان خواص دارویی آن را می‌دانستند و از آن برای درمان برخی بیماری‌ها استفاده می‌کردند. رازیانه از گیاهان دارویی مهم در کشت و صنعت اکثر کشورهای توسعه یافته است. این گیاه در زراعت و صنایع دارویی کشور ما نیز جایگاه مهمی دارد. رازیانه از خانواده چتریان (Apiaceae)، گیاهی افراشته و دائمی است که بومی مدیترانه بوده و در بیشتر مناطق ایران نیز سازگار شده است. رازیانه دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی است که در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی کاربرد وسیعی دارد. رازیانه دارای حدود ۱۰ درصد روغن، مواد قندی، موسیلاژ و حدود ۴ درصد اسانس می‌باشد. روغن رازیانه دارای ۴ درصد اسید پالمیتیک، ۲۲ درصد اسید اولئیک، ۱۴

* نویسنده مسئول: محمدحسین حسنی تلفن: ۰۹۱۲-۱۳۸۲۲۰۲ E-mail: mh_hassani99@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

درصد اسید لینولئیک، ۶۰ درصد اسید پتروسلنیک و نیز مواد معدنی از قبیل فسفر، پتاسیم، منیزیم، منگنز، مواد قندی، موسیلاژ، صمغ، مواد روغنی، و ویتامین‌های A، B، C، آهک و هیدرات کربن می‌باشد. اسانس یا روغن فرار رازیانه مایع زرد رنگی است که از تقطیر دانه یا میوه آن با بخار آب به دست می‌آید که مهمترین ترکیبات آن آنتول، فنکن، استراگول و مواد قلیایی می‌باشد (Yazdani et al., 2004). رازیانه دو واریته مشخص و مهم دارد که متعلق به زیر گونه *Capillaceum* می‌باشد. واریته *Vulgare* (Bitter fennel oil) که عمدتا در کشورهای روسیه، مجارستان، آلمان، فرانسه، ایتالیا، هند، ژاپن، آرژانتین و آمریکا و واریته *dulce* (Sweet fennel oil) که در فرانسه، ایتالیا و جنوب اروپا کشت می‌شود (Bruneton, 1987). رازیانه تلخ بومی مناطق مدیترانه‌ای است و در فرانسه، اسپانیا، پرتقال، و شمال آفریقا به حالت خودرو رشد می‌کند. در ایران این گونه از شمال (گرگان، دره هراز)، آذربایجان (تبریز)، کردستان، کرمان (ده بکری) و خراسان جمع‌آوری گردیده است (Rechinger & Hedge, 1986) رازیانه به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده در طب سنتی و نیز گیاه دارویی مؤثر در فارماکوپه‌های معتبر جهان به ثبت رسیده است (Safayi et al., 2008). میوه و اسانس رازیانه به دلیل دارا بودن آنتول موجب کاهش یا توقف اسپاسم‌های دستگاه گوارش و تشدید ترشح شیرابه‌های گوارشی و در نتیجه بالا رفتن کیفیت هضم می‌گردد. مجموعه این اعمال سبب رفع سوء هاضمه شده و به تبع آن برخی از بی‌خوابی‌ها که در اثر اختلالات فیزیکی دستگاه گوارش حادث شده‌اند، درمان می‌یابند (Lawless, 1992; Yazdani et al., 2004).

این گیاه دارای خواص متعددی از جمله کاهش اسپاسم دستگاه گوارش و بر طرف کردن دل درد، کاهش آسم و سرفه و تنگی نفس و کمک به هضم غذا و رفع سوء هاضمه است. همچنین با تسکین درد مفاصل، در درمان برخی بیماری‌ها نیز نقش دارد. عصاره آبی به دست آمده از برگ‌های رازیانه می‌تواند فشار خون سرخرگی را بدون آنکه بر تعداد ضربان قلب یا تنفس تأثیر داشته باشد، به طرز چشمگیری کاهش دهد (Abdul Dhani & Amin, 1988).

کشت گیاهان دارویی و معطر، از دیرباز از جایگاه ویژه‌ای در نظام‌های سنتی کشاورزی ایران برخوردار بوده است و این نظام‌ها از نظر ایجاد تنوع و پایداری، نقش مهمی ایفا می‌کرده‌اند. متأسفانه در سالهای اخیر، به دلیل جایگزین شدن گونه‌های زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از این گونه‌ها و ارقام بومی و محلی به فراموشی سپرده شده و از سیستم‌های زراعی ایران حذف شده‌اند. بنابراین بررسی وضعیت تولید گیاهان دارویی و معطر و نقش این گیاهان در ایجاد تنوع در بوم نظام‌های زراعی ایران بسیار مورد اهمیت می‌باشد (Kochaki et al, 2004).

کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی میان افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. قدم اول در اصلاح خصوصیات گیاهی، شناخت خصوصیات ژنتیکی نمونه‌های ژرم‌پلاسم است که این موضوع به نوبه خود نمونه‌گیری سیستماتیک ژرم‌پلاسم را برای مقاصد اصلاحی و حفاظتی امکانپذیر می‌سازد. برای بهره‌برداری از نمونه‌های ژنتیکی با حداکثر کارایی، شناخت مواد ژنتیکی نگهداری شده ضرورت دارد. ارزیابی نمونه‌ها می‌تواند با توجه به هدف استفاده از ژرم‌پلاسم صورت گیرد که جنبه‌های زراعی، مقاومت به بیماری، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی از جمله این اهداف است. در راستای این ارزیابی نقاط قوت و ضعف ژنوتیپ‌ها و پتانسیل‌های موجود در آنها شناخته می‌شود. به عبارت دیگر در این ارزیابی‌ها وسعت پایه ژنتیکی هر صفت معلوم می‌گردد (Nybom & Hilde, 2004).

نشانگر AFLP یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR است که ترکیبی از RFLP و RAPD بوده و شامل هضم DNA ژنومی با آنزیم‌های برشی خاص و اتصال آداپتورهای چند نوکلئوتیدی به انتهای قطعات برش یافته و سپس تکثیر قطعات ایجاد شده با کمک PCR می‌باشد. این تکنیک تفاوت در مکان‌های برشی را آشکار کرده و از این نظر شبیه RFLP است؛ با این تفاوت که برای آشکارسازی قطعات بجای ساترن بلاتینگ از تکثیر به وسیله PCR استفاده می‌شود. AFLP حساسیت بسیار زیادی در آشکارسازی چندشکلی در سراسر ژنوم دارد و

Archive of SID

www.SID.ir

به دلیل قابلیت تکرار پذیری بالا بر RAPD برتری دارد. همچنین به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد مطالعه و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا، این روش امروزه به طور وسیعی برای تهیه نشانگرهای چندشکل استفاده می‌شود (Chawla et al., 2003).

به طور کلی فعالیت‌های انجام شده در مورد تنوع ژنتیکی رازیانه بسیار محدود می‌باشد. Zahid et al. (2009) برای بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم رازیانه بومی (*Foeniculum volgare*) از مارکر ملکولی RAPD استفاده کردند. این بررسی به همراه ثبت و ارزیابی صفات مورفولوژیکی زیادی روی ۵۰ رقم مختلف رازیانه از کشور پاکستان انجام شد. DNA نمونه‌ها استخراج شد و با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. از پرایمرهای مورد استفاده، ۱۴۵ باند چندشکلی مشاهده شد که حدود ۶۶٪ از پرایمرهای چندشکلی، شاخص مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در تعداد کمی از نمونه‌ها بودند. در نهایت هفت عدد از نمونه‌ها با خصوصیات امیدوار کننده و مورد انتظاری همراه بودند.

در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای ملکولی AFLP، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه شهرهای مختلفی از ایران و چندین نمونه از سایر کشورها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**تهیه مواد گیاهی:** به منظور این تحقیق، بذور مختلفی از شهرها و مناطق مختلف ایران به همراه تعدادی نمونه از بذور چندین کشور اروپایی، برای کشت و ارزیابی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند. تهیه برخی از نمونه‌های خارجی به صورت مستقیم و برخی دیگر از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه شدند. بررسی و انتخاب نمونه‌ها به نحوی انجام پذیرفت که دارای پراکندگی مطلوبی از محتمل ترین ارقام تنوع یافته باشند (جدول ۱).

برای استریل کردن، بذور به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت ۷٪ قرار گرفت و سپس ۴ بار شستشو با آب مقطر انجام شد (Anzidei et al, 2000). یک ماه پس از کشت نمونه‌ها در گلخانه، برگ‌های تازه از هر گیاهچه برداشته شد و به طور مستقیم مورد استخراج DNA قرار گرفت.

**استخراج DNA**: استخراج DNA به روش Dellaporta et al. (1983) با اندکی تغییرات و خالص‌سازی بیشتر از طریق مراحل مختلفی بهینه شد. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده نیز با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام پذیرفت.

مراحل AFLP با استفاده از روش Vos et al. (1995) با اندکی تغییرات بر اساس روش بهینه شده‌ای انجام پذیرفت.

جدول ۱- نمونه بذور رازیانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و برخی کشورهای جهان

| نمونه بذور رازیانه | زمان جمع‌آوری |
|---|---|
| ۱- همدان | سال ۸۸ |
| ۲- کرج (هشتگرد) | سال ۸۸ |
| ۳- اردبیل | سال ۸۸ |
| ۴- کاشان | سال ۸۸ |
| ۵- یزد (اردکان) | سال ۸۸ |
| ۶- کرمان | سال ۸۸ |
| ۷- بم | سال ۸۸ |
| ۸- مشهد | سال ۸۸ |
| ۹- دماوند (آبسرد) | سال ۸۸ |
| ۱۰- گناباد | سال ۸۸ |
| ۱۱- تبریز | سال ۸۸ |
| ۱۲- اصفهان | سال ۸۸ |
| ۱۳- نطنز | سال ۸۶ |
| ۱۴- بابل | سال ۸۸ |
| ۱۵- ساوه | سال ۸۷ |
| ۱۶- شیراز | سال ۸۸ |
| ۱۷- تهران ۱ (روستای کن) | سال ۸۸ |
| ۱۸- تهران ۲ (ورامین) | سال ۸۸ |
| ۱۹- البرز مرکزی ۱ (کرج) | سال ۸۸ |
| ۲۰- البرز مرکزی ۲ (تهران) | سال ۸۸ |
| ۲۱- ژاپن | سال ۸۷ |
| ۲۲- سوئیس | سال ۸۷ |
| ۲۳- هلند ۱ | سال ۷۸ |
| ۲۴- هلند ۲ | سال ۸۵ |
| ۲۵- آلمان ۱ | سال ۸۶ |
| ۲۶- آلمان ۲ | سال ۸۸ |
| ۲۷- ترکیه ۱ | سال ۸۶ |
| ۲۸- ترکیه ۲ | سال ۸۸ |
| ۲۹- مجارستان ۱ | سال ۸۳ |
| ۳۰- مجارستان ۲ | سال ۸۷ |

Archive of SID

www.SID.ir

**مراحل اجرای AFLP**: در ابتدا DNA ژنومی (۵۰۰ نانوگرم) با ۵ واحد از هر کدام آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *TruI* از شرکت Fermentase مورد برش قرار گرفتند. در مرحله بعد دو نوع سازگارساز متناظر به انتهای قطعات برش یافته متصل گردید. سازگارساز *EcoRI* از ترکیب دو سازگارساز Ead-1 و Ead-2 و سازگارساز *TruI* نیز از ترکیب دو سازگارساز Mad-1 و Mad-2 تشکیل شده است (جدول ۲). اتصال آغازگرها به قطعات برش یافته توسط آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Fermentase صورت پذیرفت. سپس قطعات حاصله با استفاده از دستگاه PCR مورد تکثیر مقدماتی قرار گرفتند. این مرحله با استفاده از آغازگرهای E-000 و M-000 انجام پذیرفت (جدول ۲). آغازگرها و سازگارسازهای مورد استفاده از شرکت BIONEER تهیه شدند.

تکثیر انتخابی و انگشت نگاری AFLP نیز با استفاده از ۲۰ ترکیب آغازگری از ۵ آغازگر E-2 و E-8 و E-11 و E-46 و E-TG و ۴ آغازگر M-17 و M-20 و M-22 و M-35 صورت گرفت (جدول ۲).

برای این منظور تمامی ۲۰ ترکیب ممکن مورد آزمون قرار گرفت که نتایج حاصل موجب گزینش و کاربرد همه ترکیبات آغازگری شد. قطعات DNA تکثیر شده به منظور واسرشته‌سازی در دستگاه الکتروفورز عمودی TVS بر روی ژل اکریلامید ۶٪ از هم تفکیک شدند. این مرحله با اضافه کردن بافر TBE 1X و اختلاف پتانسیل ۱۲۰۰ ولت و توان ۶۵ وات به مدت ۹۰ دقیقه صورت گرفت و برای رنگ آمیزی از روش روش نیترات نقره استفاده شد (Sanguinetti et al., 1994).

تجزیه داده‌های AFLP: هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور باندها به روش دستی با اعداد یک و صفر منظور گردید. داده‌ها با ورود به نرم‌افزار Excel برای محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYS-pc فراخوانی شد. بر اساس آنالیزهای ملکولی به منظور محاسبه تشابه ژنتیکی، روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد به دلیل بازیابی بهتر اطلاعات ژنتیکی به عنوان بهترین روش انتخاب شد. بنابراین توجیه نتایج به دست آمده بر اساس دندروگرام حاصل از ضریب تشابه جاکارد انجام پذیرفت و میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌ها تعیین گردید.

## نتایج و بحث

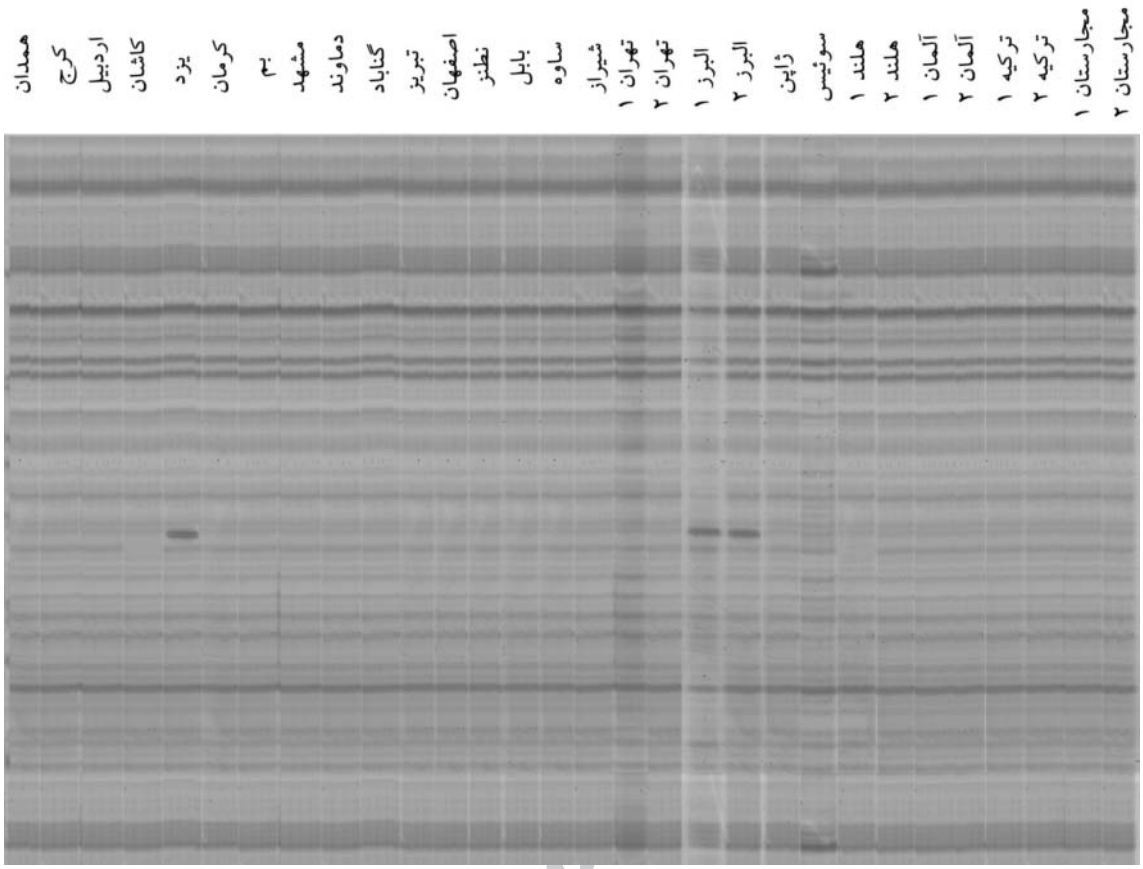
ترکیب آغازگرهای به کار رفته در مجموع ۱۱۲۷ باند قابل امتیاز دهی در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز ایجاد کردند که از میان آنها ۲۵۰ باند چندشکل بودند (شکل ۲). میانگین تعداد باندهای تکثیر یافته به ازای هر جفت ترکیب آغازگر برابر ۴۸/۵٪ و میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر جفت آغازگر برابر ۲۲/۵٪ بود.

جدول ۲- توالی آغازگرها و سازگارسازهای مورد استفاده

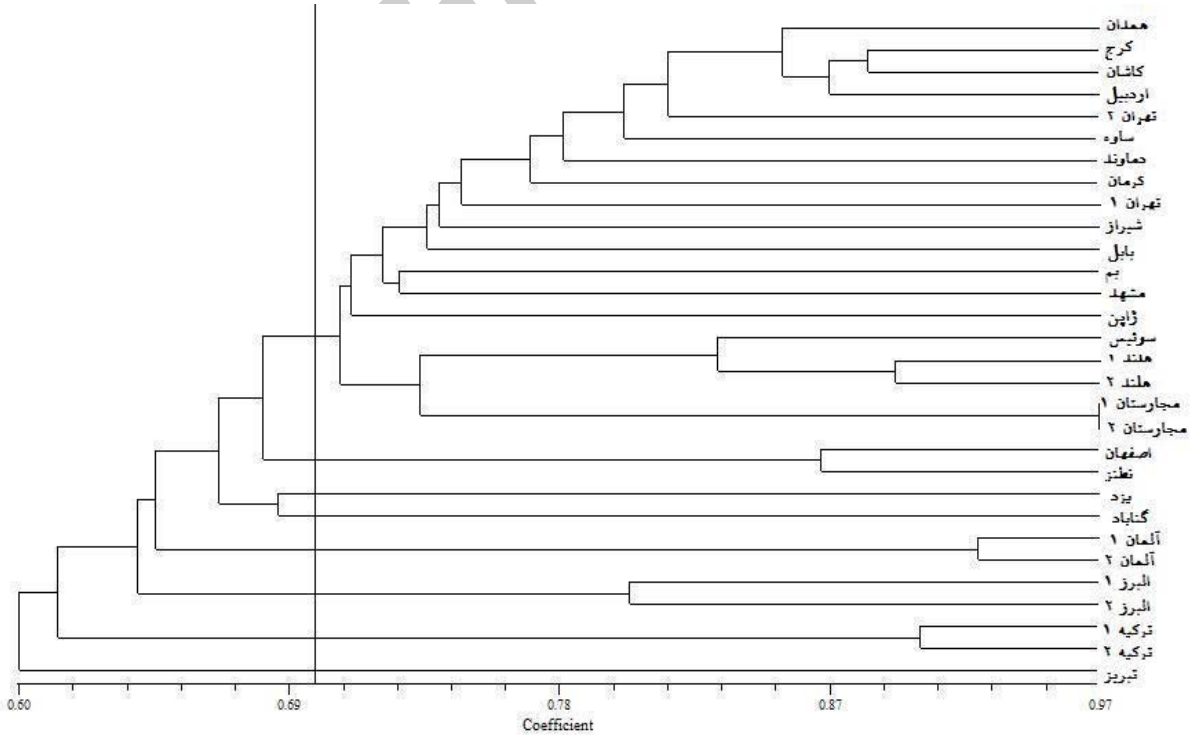
| آغازگر و سازگارساز | توالی آغازگر |
|---|---|
| Ead-1 | 5′-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3′ |
| Ead-2 | 5′-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3′ |
| Mad-1 | 5′-GAC GAT GAG TCC TGA G-3′ |
| Mad-2 | 5′-TAC TCA GGA CTC AT-3′ |
| E-000 | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT C-3′ |
| M-000 | 5′-GAT GAG TCC TGA GTA A-3′ |
| E-46 | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT CGT C-3′ |
| E-11 | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAG G-3′ |
| E-8 | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3′ |
| E-2 | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3′ |
| E-TG | 5′-GAC TGC GTA CCA ATT CTG-3′ |
| M-35 | 5′-GAT GAG TCC TGA GTA AGA G-3′ |
| M-22 | 5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACC C-3′ |
| M-20 | 5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3′ |
| M-17 | 5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3′ |

Archive of SID

www.SID.ir




شکل ۲- الگوی نواری حاصل از ترکیب آغازگری E46-M35 در بین ۳۰ نمونه رازیانه مورد بررسی از مناطق مختلف با استفاده از نشانگرهای AFLP




شکل ۳- گروه‌بندی نمونه‌های مختلف رازیانه با روش AFLP و با استفاده از ۲۰ ترکیب آغازگری مورد استفاده، با استفاده از روش جاکارد و الگوریتم UPGMA

www.SID.ir

بر اساس نتایج حاصل از آغازگرهای مختلف، میانگین تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف ۰/۴۰ برآورد شد (شکل ۳). میزان چندشکلی در این مطالعه در حد قابل قبولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بود و تفاوت در تعداد نشانگرهای مشاهده شده در آغازگرهای مختلف بین ۱۶ تا ۳۹ درصد کل نوارهای قابل امتیاز را شامل می شد. تفاوت در تعداد نشانگرهای مشاهده شده می‌تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد استفاده و نیز ماهیت تفاوت در نشانگرهای AFLP مورد مطالعه باشد.

بیشترین تعداد نشانگر مشاهده شده در آغازگر E11-M20 با مجموع ۲۰ نوار چندشکل و آغازگر E2-M17 و ETG-M35 با ۱۹ نوار چندشکل و کمترین آنها مربوط به آغازگرE46-M35 و ETG-M22 و E8-M22 به ترتیب با ۸ و ۸ و ۹ نوار چندشکل بوده است. از آنجایی که میانگین تعداد نشانگرهای مشاهده شده در هر ترکیب آغازگری مناسب بودن مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد، بنابراین آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی این تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند. بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای، میزان ارتباط میان تنوع جغرافیایی و ملکولی نمونه‌ها مشخص می‌شود. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس شباهت ژنتیکی، تمامی نمونه‌ها را به هشت گروه اصلی تفکیک کرده است. در نهایت مطابق دندروگرام که بر اساس تمامی ۲۰ آغازگر رسم شده است، نمونه‌های بیشتر شهرهای ایران به همراه چندین کشور خارجی همگی در گروه اول قرار گرفتند. سایر نمونه‌ها نیز با تنوعی متفاوت در گروه‌های بعدی می‌باشند. در این گروه‌بندی، نمونه‌های شهرهای یزد، گناباد و تبریز هر کدام به تنهایی در یک گروه جداگانه‌ای قرار دارند.

بیشترین شباهت مشاهده میان گروه‌ها برابر ۰/۹۷ و به یک زیرگروه از گروه اول شامل نمونه‌های کشور مجارستان و کمترین شباهت مشاهده شده درون گروه‌ها نیز متعلق به گروه اول و برابر ۰/۷۱ می‌باشد. در این میان اکثر نمونه‌های ایرانی در یک گروه یکسان قرار گرفتند که تشابه ژنتیکی بالاتر میان این نمونه‌ها می‌تواند به دلیل شباهت بیشتر شرایط مناطق جغرافیایی تهیه بذور آنها باشد. تمام بذور خارجی با تنوع کمتری نسبت به بذور ایرانی در گروه‌های یکسانی قرار گرفتند که نشان از تشابه بیشتر نمونه‌های هر یک از کشورهاست. از طرف دیگر نمونه هر یک از کشورها نسبت به نمونه کشور دیگر نیز تنوع قابل توجهی را نشان می‌دهد.

نمونه‌های البرز ۱ و ۲ که از رشته کوه‌های البرز در دو منطقه تهران و کرج جمع‌آوری شده است نیز با وجود تنوع در یک گروه قرارگرفته است. شرایط جغرافیایی این دو نمونه تا حدود زیادی یکسان بوده و فقط فاصله نسبی جغرافیایی میان آنها وجود داشته است. نمونه کرج و کاشان با ۰/۸۸ تشابه، نمونه‌های کشور هلند با ۰/۹۰ تشابه، نمونه‌های کشور مجارستان با ۰/۹۷ تشابه، نمونه اصفهان و نطنز با ۰/۸۷ تشابه، نمونه‌های کشور آلمان با ۰/۹۳ تشابه، نمونه‌های رشته کوه‌های البرز با ۰/۸۰ تشابه و نمونه‌های کشور ترکیه با ۰/۹۰ تشابه، دو به دو در یک گروه یکسان قرار گرفتند. نمونه تبریز و نمونه‌های ترکیه ۱ و ۲ و نمونه‌های کوه‌های البرز ۱ و ۲، به ترتیب با ۰/۴۰، ۰/۳۹ و ۰/۳۶ تنوع، بیشترین تنوع ژنتیکی را با سایر نمونه‌ها نشان دادند.

ژنوتیپ‌های شهر بم و کرمان و تهران ۱ و ۲ نیز در گروه اول قرار گرفته اند. احتمالاً شباهت بیشتر بین ژنوتیپ‌های بم و کرمان و نیز میان تهران ۱و ۲ به دلیل فاصله جغرافیایی کمتر و شباهت بیشتر منطقه اقلیمی آنها بوده است ولی در ژنوتیپ‌های مشهد و گناباد به دلیل تفاوت زیاد شرایط اقلیمی محل رویش آنها، تنوع ژنتیکی زیادی مشاهده می‌شود بطوریکه ژنوتیپ مشهد به همراه ژنوتیپ شهرهای زیادی در گروه اول قرار گرفته است در حالیکه نمونه گناباد با تنوع ژنتیکی بسیار بیشتر نسبت به ژنوتیپ‌های گروه اول، به تنهایی در گروه جداگانه چهارم می‌باشد. نمونه شهر یزد با وجود تنوع ژنتیکی زیادی که دارد، دارای شباهت بیشتری با نمونه گناباد نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. چنانچه این نمونه در گروه مستقل سوم قرار دارد.

نمونه تبریز با ۰/۴۰ تنوع، واجد بیشترین تنوع ژنتیکی با سایر نمونه‌ها می‌باشد. قرار گرفتن نمونه‌های شماره ۱۲ و ۱۳ به ترتیب از اصفهان و نطنز در گروه یکسان، بیانگر شباهت ژنتیکی بیشتر این نمونه‌ها با

Archive of SID

www.SID.ir

یکدیگر می‌باشد که از لحاظ جغرافیایی نیز از مناطق نزدیکی بهم جمع‌آوری شده‌اند. اما برخی نمونه‌ها که در این گروه‌بندی در زیرگروه‌های نزدیک‌تری به هم قرار دارند، از مناطق با فاصله جغرافیایی بیشتری تهیه شده‌اند که این مورد نیز می‌تواند به دلیل تشابه شرایط اقلیمی یا تبادل مواد بین این شهرها بوده باشد. چنانچه قرار گرفتن نمونه شهرهای همدان، کرج، اردبیل و کاشان در چنین زیرگروه‌های نزدیک بهم می‌تواند در اثر چنین عواملی بوده باشد. همچنین قرار گرفتن ژنوتیپ‌های استان های مختلف در گروه‌ها و زیرگروه‌های یکسان و یا قرار گرفتن نمونه‌های مربوط به یک شهر یا استان در گروه‌های مختلف می‌تواند به دلیل رخ دادن پدیده جریان ژنی نیز اتفاق افتاده باشد. کم بودن فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های مختلف نیز در برخی از حالات منجر به ایجاد تشابه ژنتیکی بیشتر بین برخی از جمعیت‌ها بوده است. به عنوان مثال نمونه رشته کوه‌های البرز ۱ و ۲ از منطقه کرج و تهران با وجود تنوع ژنتیکی با سایرین، در یک گروه مستقل قرار گرفته‌اند که حاکی از تشابه ژنتیکی بیشتر این دو نمونه با یکدیگر می‌باشد.

در میان نمونه‌های خارجی، نمونه‌های آلمان ۱ و ۲ و نمونه‌های ترکیه ۱ و ۲ در گروه جداگانه‌ای قرار دارند. نمونه‌های مجارستان ۱ و ۲ و هلند ۱ و ۲ نیز هر دو در گروه اول و در یک زیرگروه مشترک قرار دارند. در میان نمونه‌های این دو کشور، دو نمونه هلند دارای تنوع بیشتری نسبت به یکدیگر می‌باشد. نمونه کشور ژاپن و سوئیس نیز با اینکه هر دو در گروه اول قرار دارند، اما نمونه سوئیس به همراه هلند و مجارستان در زیرگروه مشترکی واقع شده‌اند ولی نمونه ژاپن با تنوع بیشتری نسبت به آنها در زیرگروه دیگری قرار گرفته است. نمونه آلمان ۱ و ۲ و ترکیه ۱ و ۲ نیز به دلیل داشتن تنوع بیشتر با سایرین در گروه‌های جداگانه قرار دارند؛ در حایکه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ترکیه از آلمان نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیشتر می‌باشد.

از آنجایی که تنوع ژنتیکی به موجودات زنده کمک می‌کند تا مقابله بهتری با تغییرات محیطی داشته باشند، بعلت وجود تنوع بیشتر و سهولت امکان جمع‌آوری نمونه‌های ایرانی می‌توان نسبت به گزینش و انتخاب از میان آنها برای اهداف آینده نیز اقدام کرد. این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود تنوع نمونه‌های هر کشور با سایر کشورها، به دلیل تعداد محدود نمونه‌های خارجی نسبت به نمونه‌های ایرانی، در این بررسی نمی‌توان بطور دقیق میزان تنوع ژنتیکی درون هر کشور خارجی را نیز برآورد کرد.

نظر به اینکه نمونه‌های مورد مطالعه از مناطقی با شرایط اقلیمی و جغرافیایی متفاوتی تهیه و بررسی شده‌اند، می‌توان نقش اقلیم و جغرافیا را بسیار چشمگیر ارزیابی کرد. این بررسی نشان می‌دهد که در بیشتر موارد تنوع ژنتیکی نمونه‌های داخل هر شهر کمتر و محدود می‌باشد و این اطلاعات می‌تواند به عنوان گام مؤثری برای گزینش و انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

مطالعه بر روی تعیین تنوع ژنتیکی با نشانگرهای AFLP در گیاهان دارویی زیادی انجام پذیرفته است. Shokrpour et al. (2008) ارتباط بین نشانگرهای مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی AFLP در گیاه ماریتیغال را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که می‌توان بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و نیز داده‌های مولکولی به خوبی برخی از خصوصیات کیفی و کمی مواد مؤثره را در گیاه ماریتیغال پیش‌بینی کرد.

Kermani et al. (2009) به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین دو گونه از جنس *Cuminum* با استفاده از ۶ ترکیب آغازگری AFLP به این نتیجه رسیدند که نشانگرهای AFLP می‌تواند به طور مؤثری دو گونه مورد نظر آنها را به طور کامل از هم تفکیک کند.

در بررسی Heydari et al. (2008) بر روی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی و زراعی زرشک استانهای خراسان با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP با استفاده از دقت و کارایی این نشانگرها توانستند تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی نمونه‌های زیادی از زرشک وحشی و زراعی را ارزیابی کنند.

همانطوری که در بررسی تنوع ژنتیکی که توسط Zahid et al. (2009) با استفاده از نشانگرهای RAPD روی ارقام رازیانه کشور پاکستان نیز صورت پذیرفت و مشخص شد که می‌توان در برخی از نمونه‌ها خصوصیات

Archive of SID

www.SID.ir

امیدوار کننده‌ای را انتظار داشت، این تحقیقات نشان می‌دهد که گیاه رازیانه می‌تواند از پتانسیل تنوع مطلوبی در برنامه‌های اصلاحی آینده برخوردار باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نشانگر AFLP می‌تواند به عنوان ابزار مناسبی برای آشکارسازی تنوع ژنتیکی نمونه‌های متفاوت رازیانه باشد و این بررسی ژنتیکی علاوه بر کمک به دسته‌بندی و شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف رازیانه، به اصلاح‌کنندگان نیز این امکان را می‌دهد تا بتوانند بیشترین فاصله ژنتیکی بین والدین آنها را تعیین نمایند.

## REFERENCES


1. Abdul Dhani, A. S. & Amin, R. (1988). Vescolar action of equeos extrancts of *Foeniculum vulgare* leaves. *J Ethonopharmacology*, 24, 213-8 from IPA.
2. Anzidei, M., Bennici, A., Schiff, S., Tani, C. & Mory, B. (2000). Organigenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*. Histological observation of developing embryogenesis callus. Plant cell tissue. *Org Cult*, 61, 69-79.
3. Bruneton, J. (1987). *Elements de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Paris: Technique et Documentation, 234-49.
4. Chawla, H. S., Farsi, M. & Zolali, G. (2003). *Introduction to plant biotechnology*. Ferdowsi university of Mashhad.
5. Heydari, S., Marashi, H., Farsi, M. & Mirshamsi, A. (2008). Assessment of genetic structure and variation of cultured and wild Berberis populations of Khorasan provinces located in Iran using AFLP markers. *Iranian Journal of horticultural Siences*, 22(2), 66-74. (In Farsi).
6. Kermani, M., Marashi, H. & Safarnejad, A. (2009). Investigation of genetic vatiation within and among two species of *Cuminum spp*. using AFLP maekers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 16(2), 198-206. (In Farsi).
7. Kochaki, A., Nasiri, M. & Najafi, F. (2004). *The agrobiodiversity of medical and aromatic plants in Iran*. 2(2), 209-214. (In Farsi).
8. Lawless, J. (1992). *The Encyclopedia of Essential oils*. Dorest: Element Book Ltd, 96-7.
9. Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant. *Molecular Ecology*, 13, 1143-1155.
10. Rechinger, K. H. & Hedge, I. C. (1986). Umbilliferae. In: K. H. Rechinger (Ed.), *Flora Iranica*. Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstatit, (Vol 162).
11. Safayi, M., Jafarnia, S. & Khosroshahi, S. (2008). *The most important medical plants of the world*. 222-223. (In Farsi).
12. Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. & Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 915-919.
13. Shokrpour, M., Moghadam, S. A., Moghadam, M., Ziai, S. A. & Javanshir, A. (2008). Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.) *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 24(3), 278-292. (In Farsi).
14. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
15. Yazdani, D., Shahnazi, S. & Seifi, H. (2004). *Cultivation of Medical Plants*. Applied guide for cultivation of 40 important medical plants in Iran. 1, 73-75. (In Farsi).
16. Zahid, N. Y., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. & Ahmad, Z. (2009). Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare* Mill). Germplasm in Pakistan assessed. By RAPD markers. *Pak J Bot*, 41(4), 1759-1767.


Archive of SID

www.SID.ir