Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های رازیانه با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD

صفورا طاهری*[1]، محمد ضابط[2]، علی ایزانلو[2]، علی ایزدی دربندی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۱/۲۱

چکیده

رازیانه بعنوان یک گیاه معطر و دارویی از زمان‌های بسیار دور توسط کشاورزان در مناطق مختلف ایران با اقلیم های متفاوت کشت و کار می‌گردد. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۳۲ اکوتیپ رازیانه توسط دو نشانگر RAPD و ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نشانگر RAPD در مجموع ۱۰٦ قطعه چند شکل و توسط نشانگر ISSR ، ۷۲ قطعه چند شکل تکثیر شد. باتوجه به داده‌های آغازگر RAPD و ISSR میانگین تنوع ژنی با استفاده از شاخص نی (h) برابر با ۰/۳۷۳۹ و ۰/۲۹٤٤ و با استفاده از شاخص اطلاعاتی شانون (i) برابر ۰/۵۵۲ و ۰/٤٥٦۳ بدست آمد. میانگین محتوای چندشکلی (PIC) بدست آمده برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/٤۲۷٤ و ۰/٤۱۹۲ برآورد گردید. در گروه‌بندی انجام شده براساس نشانگر RAPD اکوتیپ‌های مورد مطالعه در ۷ و بر اساس نشانگر ISSR در ۱۱ گروه طبقه‌بندی شدند. این نتایج نشان می‌دهد که رازیانه‌های ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و نشانگرهایRAPD و ISSR به خوبی ژنوتیپ‌های رازیانه را براساس توزیع جغرافیایی و تشابهات اقلیمی از هم تفکیک نمود. آگاهی از این تنوع ژنتیکی می‌تواند اصلاحگران را در برنامه‌های اصلاحی به خصوص دورگیری بین اکوتیپ های دور، مطالعات تکاملی و طبقه بندی یاری نماید.

واژه‌های کلیدی: *آلل‌های موثر، تجزیه خوشه ای، تنوع ژنتیکی.*

*نویسنده مسئول: صفورا طاهری تلفن: ۰۹۳۵۹۵۳۷۰۵۷ Email: Sa.taheri524@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare*. Mill متعلق به خانواده چتریان[1] بعنوان یک گیاه معطر و دارویی شناخته شده‌است. یکی از گیاهان دارویی مهم در صنعت بسیاری از کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود. این گیاه نقش مهمی در صنایع کشاورزی و دارویی در ایران دارد، در اکثر مناطق ایران کشت می‌شود و با آب و هوای ایران سازگاری پیدا کرده است (Hasani et al., 2011). ژرم‌پلاسم یک منبع حیاتی برای تولید گیاهان جدید با صفات مطلوب است که به افزایش تولید محصول با کیفیت و در نتیجه بهبود سطح تغذیه انسان منجر می‌شود (Zahid et al., 2009). رازیانه در طبیعت به دلیل برداشت‌های بی‌رویه تحت فشار می‌باشد و به زودی در ردیف گونه‌های در خطر انقراض قرار می‌گیرد و اگر اقدامات حفاظتی در راستای نگهداری آن انجام نشود خطر فرسایش ژنتیکی دور از انتظار نیست. اطلاعات تنوع ژنتیکی برای مدیریت گونه‌های نادر و در حال انقراض مهم می‌باشد (Bhmani et al., 2012).

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 موثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. اولین قدم در اصلاح خصوصیات گیاهی، شناخت خصوصیات ژنتیکی نمونه‌های ژرم‌پلاسم است که این موضوع به نوبه خود نمونه‌گیری سیستماتیک از ژرم‌پلاسم را برای مقاصد اصلاحی و حفاظتی امکانپذیر می‌سازد (Hasani et al., 2011). به منظور حفظ، ارزیابی و استفاده از ژرم پلاسم کارآمد و موثر برای بازده و ایجاد ثبات تولید در هنگام مواجه با استرس‌های محیطی و شیوع بیماریها از بررسی میزان تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی/ ژنتیکی استفاده می‌شود (Gept. 1993).

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بوسیله بررسی صفات مورفولوژی و در سطح مولکولی با استفاده از ابزارهای مبتنی‌بر ژنتیک، تکنیک‌های DNA، روش‌های پیشرفته مولکولی و غیره انجام می‌گردد (Zahid et al., 2009). در سالهای اخیر از نشانگرهای مولکولی در مواردی زیادی مانند مطالعات پایه‌ای و کاربردی موجودات مختلف استفاده شده‌است. به‌طوری که کشف انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی باعث پیشرفت عمده‌ای در مطالعات ژنتیکی گردیده‌است.

از نشانگرهای مولکولی در مواردی مانند ایجاد نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی در موجودات زنده و شناسایی ژن‌های کمی و کیفی و طبقه‌بندی آنها و میزان تنوع ژنتیکی بین موجودات استفاده شده است (GhareYazi. 1996). در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی مطالعات وسیعی در گیاهان مختلف صورت گرفته است (سورنی و همکاران، ۱۳۹۲؛ کیانی و

[1] Apiaceae

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۳۹۲؛ Almdari et al., 2011 ;Yousefi et al., 2011)؛ اما در مورد رازیانه و به خصوص اکوتیپ‌هایی که در ایران وجود دارند، مطالعات اندکی صورت گرفته است. با توجه به وجود توده‌های متفاوت و همچنین نمونه‌های ژنتیکی مختلف در درون یک توده که در اقلیم‌های مختلف کشور می‌رویند به‌نظر می‌رسد که تفاوت‌هایی ازنظر ژنتیکی، خصوصیات فنولوژیکی، مقاومت به تنش‌های خشکی و شوری و برخی از بیماری‌ها و نیز در میزان اسانس و مواد موثره و غیره در بین آنها وجود داشته باشد (Bahmani. 2011).

در پژوهشی Zahid et al., (2009) در پاکستان ۵۰ نمونه رازیانه از نقاط مختلف کشور را جمع‌آوری کردند و تنوع ژنتیکی آنها را با استفاده از ۳۰ نشانگر RAPD بررسی کردند که ۲٤ نشانگر باندهای واضحی تولید کردند. نتایج آنها نشان داد که در بین این ۵۰ نمونه از لحاظ ژنتیکی تفاوت‌های زیادی وجود داشت؛ این نشانگرها ٤۸ درصد چند شکلی تولید کردند. در بررسی تنوع ژنتیکی رازیانه به کمک نشانگر RAPD، Groveri et al., (2011) نشان دادند که تنوع ژنتیکی موجود بین واریته‌های مورد مطالعه طبیعی نبوده و حاصل انتخاب‌های مصنوعی است. در پژوهشی Abou El-Nasr et al., (2013) سه واریته رازیانه را با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که اختلاف قابل توجهی بین واریته‌ها براساس صفات فنوتیپی مورد بررسی و همچنین تنوع ژنتیکی بین آنها وجود دارد. به وسیله نشانگرهای ISSR و RAPD، Bahmani et al., (2012) تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ رازیانه را بررسی و تنوع ژنتیکی بالایی را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده نمودند. در گروه بندی انجام شده ژنوتیپ‌ها در ۱۰ گروه طبقه بندی شد و در هر گروه وجود تشابهات جغرافیایی و اقلیمی میان آنها گزراش گردید. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های رازیانه با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD و مقایسه دو سیستم نشانگری در بررسی تنوع می‌باشد.

مواد و روش

در این تحقیق ۳۲ ژنوتیپ مختلف رازیانه مورد تحقیق قرار گرفتند (جدول ۱). ۳۱ نمونه بذر رازیانه پراکندگی کاملی از تمام مناطق ایران (غرب، شمال، جنوب، شرق و مرکز) داشته و یک نمونه خارجی (رازیانه رومی) بود.

استخراج DNA به روش دلاپورتا (Dellaporta et al., 1993) با کمی تغییر انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- منشاء ۳۲ اکوتیپ رازیانه از مناطق مختلف کشور.

Table1- Fennel 32 ecotypes originating from different regions of the country.

شماره اکوتیپ Ecotype Number	منطقه Region	شماره اکوتیپ Ecotype Number	منطقه Region	شماره اکوتیپ Ecotype Number	منطقه Region
1	اردکان	12	برازجان	23	سبزوار
2	بجستان	13	تبریز	24	آران بیدگل
3	کاشان	14	سنندج	25	سربیشه
4	آباده	15	دیواندره	26	خوسف
5	اهواز	16	شیراز	27	مشهد
6	دهگلان	17	قم	28	نیشابور
7	سردشت	18	ارومیه	29	گناباد
8	سقز	19	اصفهان	30	رومی (هند)
9	کرمان	20	محلات	31	ایلام
10	کامیاران	21	شبستر	32	بجنورد
11	نیریز	22	رزن		

از هر نمونه ۲-۳ گرم برگ در حضور ازت مایع پودر و برگ‌های پودر شده به تیوپ‌های۲ میلی لیتری حاوی ٦۰۰ ماکرولیتر بافر استخراج [Tris-HCL (1mM, pH=8), EDTA(10ml, 0/5 mM, pH=8), (Nacl 10mM, 5 mM)] به همراه ۸۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد اضافه شد. بعد از ورتکس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم (٦۰-۵۰ درجه) انکوبه شد. پس از سرد نمودن نمونه‌ها، ٦۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنول:کلروفورم به تیوپ‌ها اضافه شد. نمونه‌ها مدت ۱۰ دقیقه و با دور ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به تیوپ جدید حاوی ٦۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل (بترتیب به نسبت ۲٤ به ۱) منتقل و به آرامی مخلوط گردیدند و طبق شرایط قبلی سانتریفیوژ گردیدند. فاز بالایی تیوپ‌ها به تیوپ‌های جدید حاوی ٦۰ میکرولیتر استات سدیم با pH=8 و ٦۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد منتقل و آن‌ها را به‌مدت ۲ دقیقه سروته تا کلاف DNA ظاهر شود. نمونه‌ها در ٤۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA در ته تیوپ‌ها رسوب کند. پس از حذف فاز مایع، ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه کرده و سپس به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ و پس از حذف اتانول نمونه‌ها تا حد ممکن خشک شدند. بعد از خشک شدن اتانول، DNA را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل و سپس DNA های استخراج شده در یخچال ۲۰- نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

بعد از سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز و نانودراپ، DNA مجدد رسوب داده شد تا کیفیت آن بهبود یابد. برای انجام PCR از ۹ آغازگر RAPD و ٦ آغازگر ISSR (نشانگرها از شرکت دنازیست تهیه گردید) استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲ - مشخصات آغازگرهای ISSR و RAPD.

Table2- ISSR and RAPD primersprofile.

نشانگر Primer	شماره آغازگر Number primer	توالی آغازگر Sequencing primer	دمای اتصال Junction temperature	محتوای GC Gc content
RAPD	1	5´_TGCGGCTGAG_3´	33	70%
	2	5´_GGCACTGAGG_3´	33	70%
	3	5´_GTGCCTAACC_3´	33	60%
	4	5´_GATGACCGCG_3´	33	70%
	5	5´_CTCTCCGCCA_3´	33	70%
	6	5´-CAGGCCCTTC_3´	33	70%
	7	5´-AGTCAGCCAC_3´	33	60%
	8	5´-AATCGGGCTG_3´	33	60%
	9	5´-CAATCGCCGT_3´	33	60%
ISSR	1	5'-$(AG)_8$YT-3'	51/6	44/44%
	2	5'-$(AG)_8$T-3'	50	47/06%
	3	5'-$(GA)_8$T-3'	50	47/06%
	4	5'-$(CT)_8$RG-3'	53/9	50%
	5	5'-DBD$(AC)_7$-3'	47/6	41/18%
	6	5'-$(AG)_8$RC-3'	53/9	50%

چرخه حرارتی PCR برای نشانگر ISSR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ٤۲ مرحله بعدی واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه صورت گرفت، مرحله اتصال در دمای مناسب آغازگر (۵۳-٤۷ درجه سانتی گراد) به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله بسط نهایی جهت تکمیل رشته‌های دوتایی DNA در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه حرارتی PCR برای نشانگر RAPD شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در ٤۲ مرحله بعدی واسرشت سازی در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت، مرحله اتصال در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه اعمال شد و مرحله بسط نهایی، جهت تکمیل رشته های دوتایی DNA در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR به

www.SID.ir

Archive of SID

محتویات هر لوله ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه گردید و ۱۰ میکرولیتر از محصول حاصله در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۸ ٪ که حاوی ٤ میکرولیتر اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی بود، ریخته شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت با جریان ۸۰ ولت الکتروفورز شدند و سپس توسط دستگاه ژل داک قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV مشاهده و عکسبرداری از ژل صورت گرفت. امتیازدهی باندها بصورت صفر(عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت.

تجزیه‌های آماری: با توجه به اطلاعات جغرافیایی (طول و عرض جغرافیایی)، اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف به کمک نرم افزار SPSS تقسیم بندی شد. پس از ثبت اطلاعات، با استفاده از نرم افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر در ستون و نام ژنوتیپ‌ها در ردیف‌ها قرار گرفت. فاصله ژنتیکی[1] (GD) یا شباهت ژنتیکی[2] (GS) با استفاده از ضریب نی و لی[3] (GD_{NL}) محاسبه شد (Nei. 1987). تعداد آلل های مشاهده شده برای هر نشانگر در داخل جمعیت، تعداد آلل‌های موثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی، شاخص اطلاعاتی شانون با استفاده از نرم افزار POPGENE32, محاسبه گردید. پس از این مرحله دندوگرام به روش UPGMA توسط نرم افزار MEGA5.05 ترسیم شد. همچنین ماتریس تشابه براساس ضریب تطابق ساده (MS) به کمک نرم افزار NTSYC2.02 بر آورد گردید. هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها (Dst)، هتروزیگوسیتی کل (Ht=Hs+Dst)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst= Dst/Ht)، تخمین جریان ژنی از Gst یا Gcs به کمک نرم افزار POPGEN محاسبه گردید با کمک Ht و Hs بدست آمده شاخص Fst (همبستگی ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت) با استفاده از فرمول Fst = 1 – Hs/Ht محاسبه شد. این شاخص ساختار، دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملا مشابه باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملا متفاوت باشند این مقدار برابر با یک می‌شود (Weir. 1996). شاخص F_{ST} برای مطالعه تفاوت بین جمعیت‌ها نیز بکار می‌رود. در مطالعه جمعیت‌ها اگر میزان F_{ST} بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ بدست بیاید F_{ST} بالایی دارند که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند.

نتایج و بحث

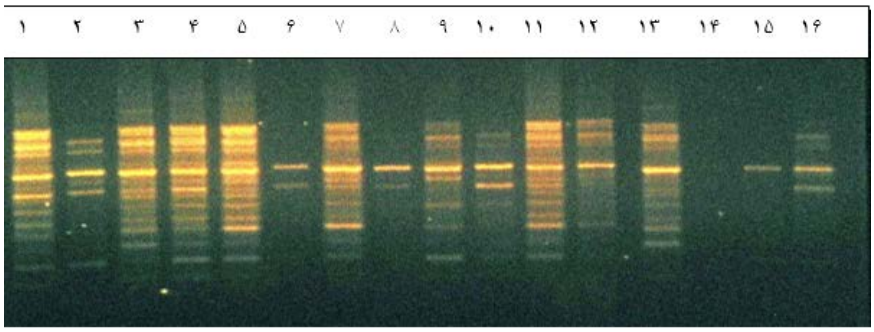
با استفاده از روش استخراج DNA مناسب و شرایط چرخه حرارتی کارآمد باندهای واضحی توسط نشانگر RAPD تکثیر یافت که در شکل ۱ الگوی تکثیر یافته توسط نشانگر شماره ۷ نشان داده شد. نشانگرهای بدست آمده از ۳۲ اکوتیپ

1. Genetic Distance
2. Genetic Similarity
3 Nei and Li

www.SID.ir

Archive of SID

رازیانه با استفاده از ۹ نشانگر RAPD چندشکلی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. تعداد باندهای ایجاد شده توسط نشانگرهای RAPD برای ۳۲ اکوتیپ رازیانه ۱۲٦۷ قطعه بود. تعداد باندهای چند، حاصل از آزمایش آغازگرهای RAPD بر روی تک بوته‌های اکوتیپ‌های رازیانه در این آزمایش، از ٦ تا ۱۷ باند متغیر بود.



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده توسط نشانگر RAPD (شماره ۷).

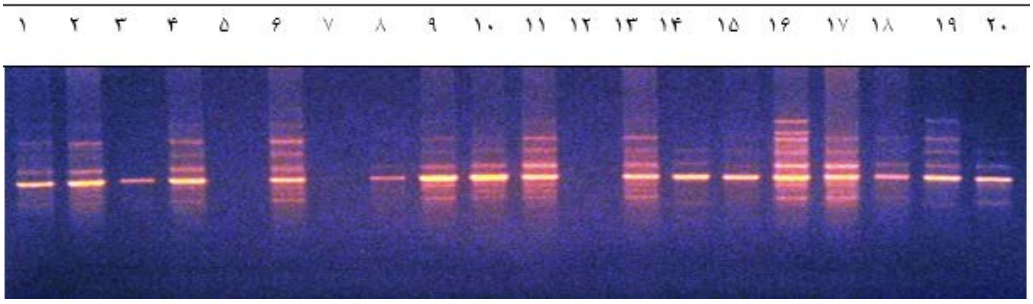
Figure 1- Banding pattern reproduced by the primer RAPD (Number 7)

با توجه به اطلاعات جغرافیایی، اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، به دو گروه تقسیم بندی شد، که براساس این گروه‌بندی توسط آغازگر رپید ۱۰۳ قطعه چند شکل در گروه یک (۹۷/۱۷ درصد) و ۱۰٤ قطعه چندشکل در گروه دوم (۸۹/۱۱ درصد) ایجاد شد و در مجموع ۱۰٦ قطعه چند شکل (۱۰۰٪) ایجاد گردید. در پژوهشی Zahid et al., (2009) با بررسی تنوع ژنتیکی انجام داده بر روی ۵۰ اکوتیپ رازیانه با استفاده از ۳۰ نشانگر RAPD ، ٤۸ درصد چند شکلی را گزارش دادند. به کمک نشانگر RAPD، Abou El-Nasr et al., (2013) نیز چندشکلی بالایی (٦۸/٤۲ درصد) را در ارقام رازیانه مورد بررسی بدست آوردند. در این مطالعه میزان هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)و ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst) برای داده‌های بدست آمده از آغازگر RAPD به ترتیب ۰/۳۷٦٤، ۰/۳٦۸ و ۰/۰۲۲۵ بود و شاخص Fst برابر با ۰/۰۲۲ برآورد شد.

نتایج حاصل از تکثیر PCR ،۳۲ اکوتیپ رازیانه با استفاده از نشانگر ISSR شماره ٦ در شکل ۲ نشان داده شده است. با بررسی انجام شده بیشترین قطعات تکثیر شده توسط نشانگر شماره ٦ ($5'$-$(AG)_8$RC-$3'$) مشاهده شد و در مجموع ۸۱۳ قطعه تکثیر شد. تعداد باندهای چند، حاصل از آزمایش آغازگرهای ISSR بر روی تک بوته‌های اکوتیپ‌های رازیانه در این آزمایش، از ۷ تا ۱۵ باند متغیر بود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- الگوی باندی تکثیر شده توسط نشانگر ISSR ($5'$-$(AG)_8$T-$3'$).

Figure 2- Banding pattern reproduced by the primer ISSR ($5'$-$(AG)_8$T-$3'$).

باتوجه به اطلاعات بدست آمده از نشانگر ISSR، گروه یک شامل ۷۰ قطعه چندشکل (۹۷/۲۲ درصد) و گروه دوم ٦٤ قطعه چندشکل (۸۸/۸۹ درصد) و در مجموع ۷۲ قطعه چندشکل (۱۰۰ درصد) تکثیر یافت. برای نشانگر ISSR به ترتیب Ht، Hs و Gst برابر ۰/۲۹۲۸، ۰/۲۸۷۳ و ۰/۰۱۸۷ بدست آمد، همچنین شاخص Fst برای این آغازگر برابر ۰/۰۱۹ برآورد شد. میزان بالای چند شکلی بدست آمده در الگوهای باندی نشانگرهای ISSR و RAPD نشان داد که این دو نشانگر تکنیک‌های مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه هستند. نشانگرهای مختلف ISSR و RAPD قدرت متفاوتی در شناسایی چندشکلی در نمونه‌های مورد بررسی داشتند. F_{ST} که همبستگی بین ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت را نشان می‌دهد، در این بررسی به دلیل بالا بودن هتروزیگوسیتی کل، نزدیک به صفر بوده که بیانگر شباهت فراوانی آللی افراد مورد مطالعه است.

بیشترین آلل موثر (Ne، یعنی آلل هایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع خوبی می‌باشند) ، شاخص اطلاعات شانون (I) و تنوع ژنتیکی نی (H) توسط نشانگر شماره ٦ ISSR (۲۱/۸٤۳٤، ۰/۳٤۸۳ و ۰/۵۲۸۸) برآورد گردید. نشانگر شماره ۷ RAPD بیشترین تعداد آلل موثر(۲۸/۰۹۹۹) و شماره ٤ این نشانگر بیشترین شاخص اطلاعات شانون و تنوع ژنتیکی نی (۰/٦۸٤۵، ۰/٤۹۱٤) را بدست آورد. میانگین تنوع ژنتیکی نی، شاخص اطلاعات شانون و آلل موثر به ترتیب برای نشانگرهای RAPD ، ۰/۳۷۳۹، ۰/۵۵۲ و ۱/٤۸۸۰ بدست آمد و برای نشانگرهای ISSR پارامترهای ذکر شده به ترتیب ۰/۲۹٤٤، ۰/٤٦۳ و ۱/٤٦۷۲ محاسبه گردید (جدول ۳). در بررسی تنوع و تفرق ژنتیکی برخی از جمعیت‌های زیره پارسی به کمک نشانگر RAPD، Hashemi et al., (2008) میانگین تنوع ژنی نی را ۰/۱۸ و شاخص اطلاعات شانون را ۰/۲۷۳ بدست آوردند. در بررسی گونه‌های بومی انار ایران Noormohammadi et al., (2012) به کمک نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD میانگین تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون را به ترتیب برای نشانگر ISSR، ۰/۲۱٤ و ۰/۳۰۸ درصد بدست آوردند و برای نشانگر RAPD نیز به ترتیب ۰/۱۷۸ و ۰/۲٦٦ درصد بدست آوردند.

www.SID.ir

Archive of SID

باتوجه به جدول ۳ بیشترین و کمترین PIC (معیاری برای قدرت تمایز هر جفت آغازگر می-باشد) بدست آمده برای نشانگر RAPD به ترتیب نشانگرهای شماره ۲ و ٦ (۰/٤٦٨٨٤٩ و ۰/۲۷٦۷۸۹) و برای نشانگر ISSR، ٦ و ۲ (۰/٥٤۷۹٤٦ و ۰/۳٦۲۹۸۲٥) بودند. میانگین محتوای چندشکلی (PIC[1]) بدست آمده برای نشانگرهای RPAD و ISSR به ترتیب ۰/٤۲۷٤ و ۰/٤۱۹۲ برآورد گردید. با بررسی نتایج بدست آمده از هر دو نشانگر RAPD و ISSR بیشترین میزان تعداد آلل‌های موثر، شاخص نی و شانون را نشانگر RAPD بدست آورده است و بیشترین میزان PIC را نشانگر ISSR به خود اختصاص داده است. دامنه کوچک تغییرآلل‌های موثر و آلل‌های مشاهده شده نشان دهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها در بین جمعیت‌ها است و این که جمعیت‌ها تقریباً در سطح یکنواختی از توزیع آللی قرار دارند. بنا به قانون هاردی - وینبرگ در جمعیت‌های دگرگرده افشان متعادل فراوانی ژنی و ژنوتیپی در غیاب گزینش، موتاسیون و مهاجرت از نسلی به نسل دیگر تغییر نمی‌کند و رابطه بین آنها ثابت بوده و همواره از توزیع دو جمله‌ای $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ پیروی می‌نمایند (Kimura and Crow, 1963). در هر ۳۲ اکوتیپ مورد مطالعه، آلل‌های موثر یعنی نسبت آلل‌هایی که فراوانی برابر دارند به کل آلل‌ها برای نشانگر RAPD بالای ۸۰ درصد و برای نشانگر ISSR بالای ۷۰ درصد می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که با پیروی از قانون هاردی- وینبرگ، توزیع آللی درون جمعیت‌های مورد مطالعه نسبتاً برابر است و جمعیت‌ها از نظر فراوانی آللی دارای توزیع متعادل هستند.

میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها و میانگین تشابه ژنتیکی براساس آنالیز تطابق ساده براساس الگوهای RAPD، به ترتیب ۰/٤۲ و ۰/٥۸ بدست آمد. با توجه داده‌های ISSR میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها و میانگین تشابه ژنتیکی براساس آنالیز جاکارد برابر ۰/۳٤ و ۰/٦٦ برآورد شد. در بررسی انجام داده بر روی رازیانه به کمک نشانگر RAPD، Groveri et al., (2011) میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها را ۰/۷۱ بدست آوردند.

در پژوهشی Abou El-Nasr et al., (2013) با توجه به داده‌های بدست آمده از اکوتیپ‌های رازیانه به کمک نشانگر ISSR، ضریب تشابه ژنتیکی را ۰/۷۷- ۰/٥۸ درصد برآورد کردند.

[1] Polymorphic Information Content

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های رازیانه با کمک نشانگر ISSR و RAPD.

Table3- Parameters of genetic diversity in populations of ISSR and RAPD markers with Fennel.

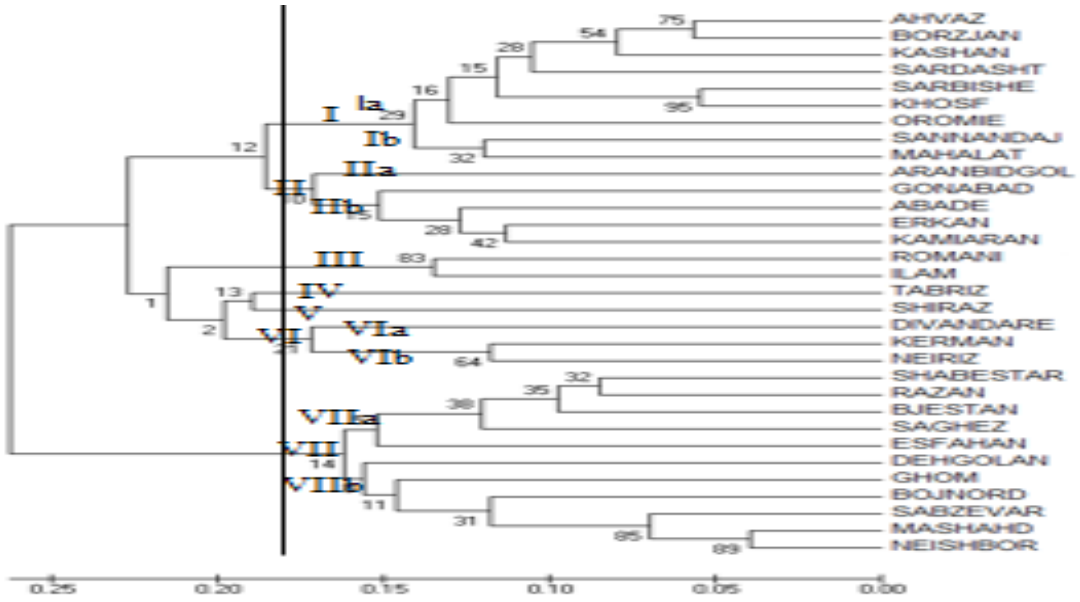
PIC	I	H	Ne	Na	شماره نشانگر Number primer	نشانگر Primer
0.43532	0.5133	0.3312	21.2751	28	1	
0.468849	0.5392	0.3542	27.7884	30	2	
0.414923	0.6667	0.4748	19.4539	20	3	
0.43261	0.6845	0.4914	9.4608	12	4	
0.441455	0.3942	0.2323	18.4548	22	5	RAPD
0.276789	0.514	0.3318	16.3351	20	6	
0.441404	0.1408	0.0615	28.0999	34	7	
0.467045	0.514	0.3318	17.0607	22	8	
0.468183	0.1432	0.0628	17.1792	24	9	
0.384494	0.4616	0.3051	18.1216	24	1	
0.3629825	0.40278	0.2479	20.4331	30	2	
0.371718	0.4645	0.3108	18.3597	24	3	ISSR
0.399234	0.4386	0.2780	17.1866	24	4	
0.449218	0.4330	0.2678	9.6926	14	5	
0.547946	0.5288	0.3483	21.8434	28	6	

در گروه‌بندی انجام شده براساس نشانگرهای RAPD اکوتیپ‌های مورد مطالعه در ۷ گروه قرار گرفتند (شکل۳). کلاستر یک (I) شامل دو زیر کلاستر (Ia و Ib) می‌باشد که زیرکلاستر Ia شامل ۷ اکوتیپ بوده و با نگاهی دقیق‌تر به اکوتیپ‌های موجود در این زیر کلاستر، به بالا بودن ضریب شباهت بین اکوتیپ‌ها پی می‌بریم. به طور مثال اکوتیپ‌های خوسف و سربیشه با ضریب شباهت (۰/۸۹)، اهواز و کاشان (۰/۸۵) در یک گروه قرار گرفته‌اند. کلاستر شماره دو (II) شامل دو زیر کلاستر (IIa و IIb) می‌باشد که در زیرکلاستر IIa اکوتیپ آران‌بیدگل قرار گرفته و در زیر کلاستر IIb اکوتیپ‌های گناباد، آباده، اردکان و کامیاران با ضرایب تشابه بین ۰/۷۳–۰/۷ جای گرفته‌اند. کلاستر شماره سه (III) شامل اکوتیپ‌های رومی و ایلام (ضریب شباهت ۰/۷۳) بود. در کلاستر شماره ٤ (IV) اکوتیپ تبریز و در کلاستر ۵ (V) اکوتیپ شیراز قرار گرفتند. کلاستر ٦ (VI) خود شامل دو زیر کلاستر (VIa و VIb) بود. اکوتیپ دیوان‌دره در زیر کلاستر VIa و اکوتیپ‌های کرمان و نیریز با داشتن اقلیم‌های مشابه و ضریب شباهت بالا (۰/۷۵) در زیر کلاستر VIb قرار گرفتند. کلاستر شماره ۷ (VII) شامل دو زیر کلاستر (VIIa و VIIb) است که زیر کلاستر VIIa شامل ۵ اکوتیپ (اصفهان، سقز، بجستان، رزن و شبستر) بود که ضریب تشابه بالای بین اکوتیپ‌های موجود در این زیر کلاستر وجود داشت و

www.SID.ir

Archive of SID

زیرکلاستر VIIb شامل ٦ اکوتیپ بود. اکوتیپ‌های نیشابور، مشهد، سبزوار، بجنورد، قم و دهگلان با اقلیم مشابه و ضریب تشابه بالا (۰/٦۳-۰/۷٦) در یک گروه (VIIb) قرار گرفتند. نتایج بدست آمده رابطه بین تنوع ژنتیکی را با موقعیت جغرافیایی و یا تشابهات اقلیمی نشان می‌دهد. نتایج مشابه مربوط به ارتباط موقعیت جغرافیایی و اقلیمی با تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاهی توسط دیگر محققان گزارش شده‌است (Bahmani et al., 2012 ;Rahimi malek et al., 2009; Garib et al., 2011) و این معقول به نظر می‌رسد چون که در مورد تغییرات ژنتیکی از مهمترین عوامل خارجی دما، رطوبت و غیره می‌باشد. اکوتیپ‌های رازیانه براساس اطلاعات آغازگر ISSR با روش UPGMA در ۱۱ گروه قرار گرفتند که این نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی وسیع در میان رازیانه‌ها می‌باشد (شکل٤). با نگاهی دقیق‌تر به اکوتیپ‌های موجود در هر گروه می‌توان به وضوح وجود تشابهات جغرافیایی و اقلیمی میان آن‌ها را مشاهده کرد. کلاستر یک (I) شامل دو زیر کلاستر (Ia و Ib) بود، زیرکلاستر Ia شامل ۷ اکوتیپ (تبریز، اصفهان، دیوان‌دره، سقز، قم، سنندج و نیشابور) و زیرکلاستر Ib شامل اکوتیپ‌های ارومیه، شبستر و شیراز بود.



شکل ۳-گروه بندی ۳۲ اکوتیپ رازیانه ایران با روش UPGMA برای نشانگر RADP.

Figure 3- RAPD markers using UPGMA for cluster 32 ecotypes of fennel Iran.

اکوتیپ‌های کرمان و سبزوار با ضریب تشابه ۰/٦۳ در کلاستر دو (II) جای گرفته‌اند. کلاستر سه (III) شامل دو زیر کلاستر (IIIa و IIIb) می‌باشد. اکوتیپ‌های مشهد و کامیاران با ضریب تشابه ۰/٦ در زیرکلاستر IIIa جای گرفته‌اند. زیرکلاستر IIIb شامل دو اکوتیپ نیریز

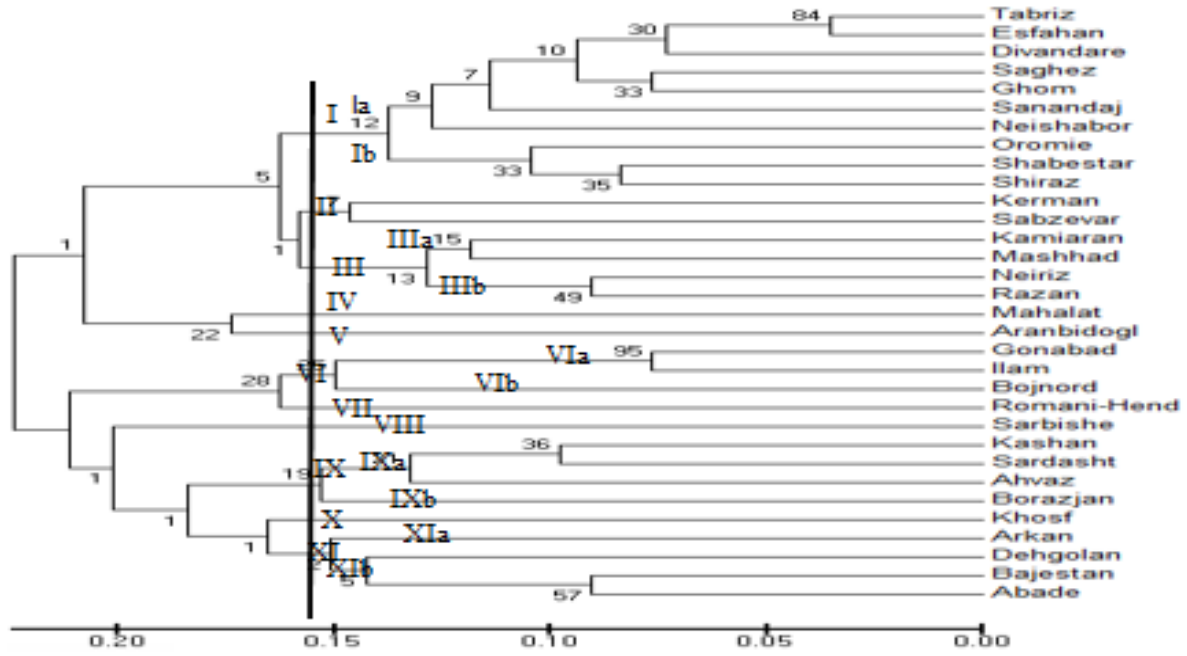
www.SID.ir

Archive of SID

و رزن بود. اکوتیپ محلات در کلاستر ٤ (IV) و آران‌بیدگل در کلاستر ٥ (V) قرار گرفتند. کلاستر ٦ (VI) شامل دو زیرکلاستر (VIa و VIb) بود. در زیرکلاستر VIa تنوع ژنتیکی از فاصله جغرافیایی تبعیت نکرده و اکوتیپ‌هایی با منشاء کاملا متفاوت (گناباد و ایلام) از نظر اقلیم و فاصله جغرافیایی در یک گروه قرار گرفتند، اما با نگاهی دقیق‌تر این دو اکوتیپ دارای ضریب تشابه بالای (٠/٦٥) بودند. اکوتیپ بجنورد در زیر کلاستر VIb جای گرفته است. اکوتیپ رومی در کلاستر شماره ٧ (VII) و اکوتیپ سربیشه در کلاستر ٨ (VIII) جای گرفتند. کلاستر ٩ (IX) شامل دو زیرکلاستر (IXa و IXb) بود. اکوتیپ‌های کاشان و سردشت با ضریب بالای تشابه (٠/٧٤) در یک گروه (زیرکلاستر IXa) قرار گرفتند. زیرکلاستر IXb شامل اکوتیپ برازجان بود. اکوتیپ خوسف به تنهایی در کلاستر ١٠ (X) جای گرفت. کلاستر ١١ (XI) شامل دو زیرکلاستر (XIa و XIb) می‌باشد، زیرکلاستر XIb شامل اکوتیپ اردکان بود و اکوتیپ‌های دهگلان، بجستان و آباده در زیرکلاستر XIb قرار گرفتند. Abou El-Nasr et al., (2013) در بررسی انجام داده، ارقام رازیانه را در ٢ گروه کلاستر بندی کردند. چنین گروه‌بندی که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا را در رازیانه نشان می‌دهد نیز گزارش شده‌است (Bahmani et al., 2012; Zahid et al., 2009).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤-گروه بندی ۳۲ اکوتیپ رازیانه ایران با روش UPGMA برای نشانگر ISSR.

Figure 4- ISSR markers using UPGMA for cluster 32 ecotypes of fennel Iran.

نتیجه‌گیری

همبستگی ماتریس تشابه بدست آمده برای هردو نشانگر براساس ضریب تشابه تطابق ساده برابر با ۰/۸۳ بود که بیانگر تطابق کلاسترهای بدست آمده از هر دو نشانگر است. اطلاعات بدست آمده در این آزمایش کارایی نشانگرهای ISSR و RAPD را برای تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی، فاصله و ارتباط میان ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه تائید کرد. کسب اطلاعات درمورد شباهت‌های ژنتیکی برای جلوگیری از تبدیل شدن ژرم‌پلاسم‌های خوب به ژرم‌پلاسم یکنواخت ضروری است. از آنجایی که روش‌های ISSR و RAPD، روش‌هایی ساده‌ای هستند و نیاز به DNA کمی دارند، استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی سریع و بهبود روش‌های اصلاحی مفید می‌باشند. باتوجه به اطلاعاتی که درباره روابط ژنتیکی نزدیک در اختیار بهنژادگر قرار می‌گیرد، استفاده از تکنیک‌های انگشت نگاری DNA برای انجام برنامه‌های اصلاحی هدف‌دار مانند تولید ارقام متمایز، ژنوتیپ‌هایی با تنوع ژنتیکی پایه‌ای و بهبود بهره وری ارقام موجود پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Abou El-Nasr THS, Sherin A, Mahfouze, Al-Kordy MAA (2013). Assessing Phenotypic and Molecular Variability in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Varieties. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 7: 715-722.

Abou El-Nasr THS, Ibrahim MM, Aboud KA, Al-Kordy MAA (2013). Genetic variation among three fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) varieties on the basis of morphological characters, essential oil composition and ISSR markers. Applied Sciences Research 9: 1594-1603.

Almdari SBL, Safarnejad A, Nemat Zade GH. A (2012). RAPD markers to assess the genetic diversity of some species of thyme. Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Iran. 20:192-201.

Bahmani K, Izadi Darbandi A (2012). Assessment of the genetic diversity in Iranian Fennels based on ISSR markers. Special Twelfth Iranian Genetics Congress 12: 94-99.

Bahmani K, Izadi Darbandi A, Baghcheghi R (2012). Assessment of genetic diversity of Iranian fennel Rapid marker. Special Twelfth Iranian Genetics Congress 12: 99-105.

Bahmani K (2011). The Study of morphological and genetic variation in Iranian fennel populations (Foeniculum vulgare Mill.). Thesis. College of Abouraihan. Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences.

Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983). A plant DNA minipreparation: Version ii. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

Hasani MH, Torabi S, Omidi M, Etminan AR, Dstmalch T (1390). Assessment of genetic diversity in germplasm of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Using AFLP markers. Iranian Crop Sciences 42:597-604.

Hashemi H, Safar Negad, Bagheri AR (2008). Study of genetic diversity in native Persian cumin (Bunium persicum Boiss) in Iran using RAPD markers. Quarterly Scientific - Plant Breeding and Genetic Research of pasture and forest 16: 238-246.

Gept P (1993). The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. In:Evolutionary Biology. (Eds.): M.K. Hecht. Plenum Press, New York. 534.

Gharibi S, Rahimmalek M, Mirlohi A, Majidi MM, Sayed Tabatabaei BE (2011). Assessment of genetic diversity in Achillea millefolium subsp. millefolium and Achillea millefolium subspelbursensis using morphological and ISSR markers. Medicinal Plants Research 5: 2413-2423.

Ghare Yazi B (1996). DNA marker application in breeding. Proceeding of key Iranian crop science congress 368-380.

Groveri S, Jakhar ML, Malik CP (2011). Genetic Diversity of Different Varieties of Foeniculum vulgare Miller by RAPD Markers. Archives of Applied Science Research 3:17 25.

Kiani GH (2012) Assessment of genetic distances with markers RAPD rice,

Kimura, M. and J.F. Crow (1963). The measurement of effective population number. Evolution 17:279-288.

Nei M (1987). Molecular Evolutionary Genetics.New York: Columbia University press.

Noormohammadi Z, Fasihee A, Homaee-Rashidpoor S, Sheidai M, Ghasemzadeh Baraki S, Mazooji A, Tabatabaee-Ardakani SZ (2012). Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. AJCS 6:268-275.

Rahimmalek M, Sayed TBE, Arzani A, Etemadi N (2009). Assessment of genetic diversity among and within Achillea species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Biochem. Syst. Ecol 37: 354- 361.

www.SID.ir

Archive of SID

Soreni A, Nazeri V, Fatahi Moghdam M.R, Ahadi Dolatsara E (2012). he genetic diversity of plant populations of motherwort in Iran with markers RAPD, Journal of Agricultural Biotechnology

Torabi S, Hasani MH, Omidi M, Etminan A, Dasmalchi T, Gharakhanlou, H (2012). Evaluation of genetic diversity in Fennel accessions using AFLP markers. Advances in Environmental Biology 6: 2821-2828.

Yousefi, V, Najafi A, Zebarjadi, A (2011). Evaluation of genetic diversity in ecotypes of Thymus sp. using ISSR markers. Seven Iranian Horticulture Science Congress. 70-72.

Weir BS (1996). Intraspecific differentiation. In: D.M. Hillis et al. (Ed). Molecular systematics, 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates Pub 385- 403.

Zahid NY, Abbasi NA, Hafiz IA, Ahmad Z (2009). Genetic Diversity of Indigenus Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Germplasm in Pakistan Assessed by RAPD Markers. Pak. J. Bot 41: 1759-1767.

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of genetic diversity of fennel ecotypes using RAPD and ISSR markers

Taheri, S.[*1], Zabet, M.[2], Izanlo A.[2], Izadi Darbandi A.[3]

[1]M.sc student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.
[2]Assistant of professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.
[3]Assistant of professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Abouraihan, Tehran University.

Abstract

Fennels have long been cultivated as an aromatic and medicinal plant in different regions with different climate in Iran. In this study, the genetic diversity of 32 ecotypes of fennel was assessed by RAPD and ISSR markers. A total of 106 and 72 polymorphic fragments were amplified by RAPD and ISSR markers, respectively. Based on RAPD data, mean genetic diversity were 0.3739 and 0.552 by Nei (h) and Shannon's information index (I), respectively. Moreover, mean genetic diversity for ISSR marker were accordingly 0.2944 and 0.4563. The obtained average polymorphism content (PIC) by RAPD and ISSR markers were 0.4274 and 0.2192, respectively. Based on cluster analysis of RAPD and ISSR markers, the ecotypes were grouped in 7 and 11 clusters. These results indicate that the Iranian fennels have high genetic diversity, and RAPD and ISSR markers very well differentiated fennel genotypes based on the geographical distribution and climatic similarities. Understanding the genetic diversity can further help breeders in their breeding programs, especially in hybridization breeding, evolutionary and classifications studies.

Keywords: *Effective alleles, Cluster analysis, Genetic variation.*

[*] Corresponding Author: Taheri, S. Tel: 09359537057 Email: Sa.taheri524@gmail.com

www.SID.ir