

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و روابط ژنتیکی بین دو جمعیت از گونه *Ferula pseudalliacea* در استان یزد

سمیرا حسین جعفری^{۱*}، عادل سپهری^۲، حسن سلطانلو^۳ و علی اکبر کریمیان^۴

*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری، علوم مرتع، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

پست الکترونیک: Samirahosseinjafari@yahoo.com

۲- استاد، گروه مدیریت مرتع، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۴- دانشیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و کوبرشناسی، دانشگاه یزد، یزد

چکیده

گونه *Ferula pseudalliacea* (آغوزه تلخ) گیاهی مرتعی است که شیرابه آن دارای خواص دارویی فراوان می‌باشد. این پژوهش اولین مطالعه در ایران به منظور بررسی روابط ژنتیکی این گونه در رویشگاه‌هایش در استان یزد با استفاده از برخی صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ISSR انجام شد. از میان ۹ صفت تنها صفات تاج پوشش، قطر یقه و وزن هزاردانه دارای اختلاف معنی داری بین دو رویشگاه بود. تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک براساس روش Ward گیاهان را در ۳ گروه اصلی قرار داد. از میان ۲۲ آغازگر مورد مطالعه، ۸ آغازگر DNA الگو را به خوبی تکثیر و در مجموع ۲۲۴ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کردند. براساس تعداد باند، PIC و شاخص نشانگر، پرایمرهای ISSR-16 و ISSR-55 عملکرد بهتری داشتند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA، دو جمعیت مورد مطالعه را در ۱۰ خوشه گروه‌بندی کرد. در تجزیه به مختصات اصلی ۵۷/۹۴٪ از واریانس کل توسط سه مؤلفه بیان شد و جمعیت‌ها را به طور کامل از یکدیگر جدا کرد. نتایج این آنالیز با تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشت. این گروه‌بندی‌ها با محدوده پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها تاحدی انطباق داشت. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۲٪) بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها (۸٪) بود. تطابق دندروگرام‌های مورفولوژیکی و مولکولی نشان داد که تشابه چندانی بین این دو گروه‌بندی وجود ندارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه مناسب بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *Ferula pseudalliacea*، صفات مورفولوژیک، نشانگر ISSR، استان یزد

مقدمه

(Garcia, 2014). امروزه نشانگرهای مولکولی DNA در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ashraf et al., 2016; Dk et al., 2016). نشانگر مولکولی ISSR یک روش مبتنی بر PCR است (Ahmadi et al., 2015; Stevens et al., 2015; Brito et al., 2016). از ویژگی‌های این نشانگر می‌توان به

گیاهان دارویی نقش ویژه‌ای در سلامت، ایجاد اشتغال، توسعه اقتصادی، امنیت غذایی و حفظ ذخایر ژنتیکی دارند (Akbarian et al., 2017). اطلاع از تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی و آنالیز آن می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی کاربرد داشته باشد (Barrandeguy &

ژنتیکی نقش ویژه‌ای دارد (Zhang et al., 2009)، انجام مطالعه در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه آنگوزه تلخ ضرورت پیدا می‌کند. با توجه به نبود گزارشی مبنی بر ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه *Ferula pseudalliacea* در ایران، این پژوهش به‌عنوان اولین مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی گونه مذکور در رویشگاه‌هایش در استان یزد با استفاده از برخی صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ISSR و شناسایی نشانگرهای ISSR مؤثر در تفکیک جمعیت آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه بوروئی در فاصله ۲۲ کیلومتری بخش هرات شهرستان خاتم و در فاصله ۲۹۰ کیلومتری استان یزد قرار دارد. این منطقه در $30^{\circ} 03' 04''$ طول شرقی و $27^{\circ} 00' 27''$ عرض شمالی و متوسط ارتفاع ۲۲۷۴ قرار دارد. منطقه چنارناز هرات در فاصله ۳۳ کیلومتری بخش هرات شهرستان خاتم، در فاصله ۳۰۰ کیلومتری استان یزد و در موقعیت جغرافیایی $30^{\circ} 02' 10''$ طول شرقی و $44^{\circ} 01' 30''$ عرض شمالی قرار گرفته و متوسط ارتفاع آن ۲۳۵۷ می‌باشد.

برای ارزیابی مورفولوژیک، اواسط اردیبهشت ۲۰ نمونه به‌طور کاملاً تصادفی از جمعیت‌های آنگوزه تلخ در هر رویشگاه انتخاب و برخی صفات مورفولوژیک با اهمیت بیشتر اندازه‌گیری شد. همچنین از ۱۰ گیاه در هر رویشگاه نمونه برگ تازه جمع‌آوری شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان آنگوزه تلخ با استفاده از کیت استخراج DNA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Bioflux ژاپن) انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. برنامه PCR با استفاده از برنامه کندشونده (Ramp) بدین صورت انجام شد: واسرشت اول DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ثانیه، کاهش دما تا ۵۲ درجه

چندمکانی بودن، چندشکلی نسبتاً بالا، قابلیت تکثیر بین جایگاه‌های ریزماهواره و عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنومی برای طراحی آغازگر اشاره کرد (Ng & Tan, 2015; Araujo et al., 2016). یک روش سریع، قابل اعتماد و کم‌هزینه برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و نشان دادن روابط خویشاوندی گیاهان می‌باشد (Torabi-Giglou, 2015).

آنگوزه به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم دارویی و تجارتي از تیره Umbeliferae است. آنگوزه گیاهی است چندساله، منوکاریک و بومی منطقه مدیترانه و مرکز آسیا است که دارای ترکیبات اسانسی و رزینی فراوان می‌باشد (Khederzadeh et al., 2017). گیاهان متعلق به تیره چتریان در صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرند و بسیار از لحاظ اقتصادی مهم هستند (Amiri & Joharchi, 2016; Baldemir et al., 2017). به دلیل تنوع زیاد و گستردگی این تیره در جهان، حفاظت از منابع ژنتیکی این تیره عملی چالش‌انگیز است (Baranski et al., 2006). در رابطه با تنوع ژنتیکی گیاهان تیره چتریان با استفاده از نشانگرهای ISSR تحقیقاتی انجام شده است (Modareskia et al., 2012; Parashar et al., 2014; Smith et al., 2015; Salami et al., 2017). در استان یزد دو نوع آنگوزه تلخ و شیرین وجود دارد. البته تا قبل از این تصور بر این بود که نام علمی هر دو نوع آنگوزه تلخ و شیرین در استان یزد *Ferula assa-foetida* می‌باشد، در صورتی که پس از بازدیدهای میدانی و جمع‌آوری این گیاهان از رویشگاه‌هایشان، توسط دکتر مظفریان مورد شناسایی دقیق قرار گرفت و مشخص شد گیاهی که تحت عنوان آنگوزه تلخ در استان یزد مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، *Ferula pseudalliacea* بوده و تنها در دو رویشگاه در شهرستان هرات استان یزد وجود دارد. بنابراین با در نظر گرفتن اهمیت آنگوزه در صادرات و به‌عنوان گونه‌ای ارزآور برای کشور و از آنجا که شناخت تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی، در طراحی موفق برنامه‌های اصلاحی، به‌نژادی و حفاظت از ذخایر

Version 1.31 داده‌های حاصل بررسی شدند.

نتایج

نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک نشان داد که از میان ۹ صفت مورد بررسی (طول و عرض برگ، سطح تاج پوشش، ارتفاع ساقه گل‌دهنده، تعداد چتر، قطر چتر، تعداد چترک در هر چتر، قطر یقه و وزن هزاردانه) تنها صفات سطح تاج پوشش، قطر یقه ($p < 0/01$) و وزن هزاردانه ($p < 0/05$) دارای اختلاف معنی‌داری بین دو منطقه چنارناز و بوروئیه بودند. مقادیر این سه صفت در سایت چنارناز به‌طور معنی‌داری بیشتر از منطقه بوروئیه بود (جدول ۱). نتایج محاسبه همبستگی بین صفات مورفولوژیک در دو جمعیت آنغوزه تلخ در مناطق مورد بررسی نشان داد که عرض برگ با طول برگ در سطح ۱٪ همبستگی مثبت معنی‌دار دارد (بالا‌ترین همبستگی). سطح تاج پوشش با طول و عرض برگ دارای همبستگی مثبت بود ($p < 0/01$). به طوری که بین ارتفاع ساقه گل‌دهنده با طول و عرض برگ و سطح تاج پوشش گیاه در سطح ۱ درصد همبستگی مثبت وجود داشت. همچنین قطر یقه گیاه با طول و عرض برگ، سطح تاج-پوشش و ارتفاع ساقه گل‌دهنده همبستگی مثبت داشت ($p < 0/01$) (جدول ۲).

سانتی‌گراد با سرعت ۰/۵ درجه در ثانیه، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای در دمای اتصال بهینه آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و تکمیل بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس ۳ میکرولیتر محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی TAE IX با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. برای رنگ‌آمیزی ژل بعد از الکتروفورز از حمام رنگ شامل سایبرگلد و آب مقطر استفاده شد. با استفاده از ژل داک از ژل‌ها عکس‌برداری شد. به منظور مشاهده و تفکیک دقیق‌تر باندها از ژل پلی-اکریل‌آمید و دستگاه ژل‌اسکن فلورسنت مدل ۲۰۰۰ با سیستم زمان واقعی استفاده شد. در این تحقیق از ۲۲ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت سیناکلون استفاده گردید که مشخصات مربوط به پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

برای آنالیز صفات مورفولوژیک از نرم‌افزار SPSS16 استفاده شد. باندهای واضح و دقیق حاصل از هر آغازگر برحسب وجود (۱) یا عدم وجود باندها (۰) امتیازدهی شده و با استفاده از نرم‌افزار NTedit v1.1b به ماتریس تبدیل شد. در پایان با استفاده از نرم‌افزارهای Pop Gene و GenALEX V.6.2، NTSYSpc v2.02i

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی در مناطق مورد مطالعه با استفاده از آزمون t مستقل

t	درجه آزادی	انحراف معیار	میانگین	منطقه	صفت مورفولوژیکی
۱/۶۹۷ ^{ns}	۳۸	۴/۲۱	۴۰/۹۵	چنارناز	طول برگ (cm)
		۲/۱۸	۳۹/۱۵	بوروئییه	
۰/۶۳۳ ^{ns}	۳۸	۴/۳۱	۲۴/۲۰	چنارناز	عرض برگ (cm)
		۲/۴۲	۲۳/۵۰	بوروئییه	
۳/۳۳۴ ^{**}	۳۸	۲۵۲/۵۳	۱۰۸۰۹/۷	چنارناز	سطح تاج پوشش (cm ²)
		۱۱۷/۱۰	۱۰۶۰۲/۲	بوروئییه	
۰/۸۴۰ ^{ns}	۳۸	۲۳/۸۰	۱۶۲/۶۰	چنارناز	ارتفاع ساقه گل دهنده (cm)
		۱۸/۴۲	۱۵۶/۹۵	بوروئییه	
۰/۵۹۹ ^{ns}	۳۸	۴/۴۵	۳۱/۵۵	چنارناز	تعداد چتر
		۳/۴۰	۳۰/۸۰	بوروئییه	
۳/۳۲ ^{**}	۳۸	۰/۳۲	۷/۰۵	چنارناز	قطر یقه (cm)
		۰/۴۳	۶/۶۵	بوروئییه	
۰/۹۶۴ ^{ns}	۳۸	۲/۱۲	۱۳/۱۰	چنارناز	تعداد چترک در هر چتر
		۲/۱۴	۱۲/۴۵	بوروئییه	
۰/۸۳۷ ^{ns}	۳۸	۱/۵۰	۱۵/۴۰	چنارناز	قطر چتر (cm)
		۱/۵۲	۱۵	بوروئییه	
۲/۷۲۶ [*]	۳۸	۰/۲۵	۱۵/۷۲	چنارناز	وزن هزاردانه (gr)
		۰/۲۴	۱۵/۵۱	بوروئییه	

(**): معنی داری در سطح ۱٪، (*): معنی داری در سطح ۵٪، (ns): عدم معنی داری)

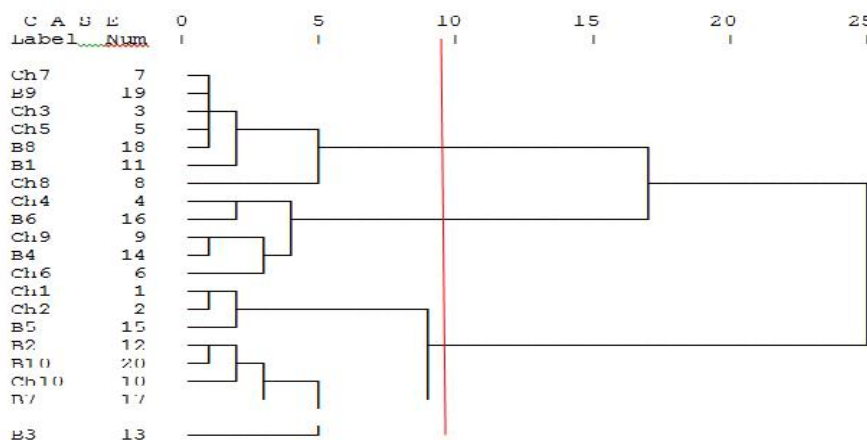
بوروئییه می باشد که از خصوصیات مهم آنها طول و عرض برگ ها، سطح تاج پوشش، ارتفاع ساقه گل دهنده و قطر یقه بیشتر است. براساس نتایج تجزیه خوشه ای صفات مورفولوژیکی و پراکنده بودن گیاهان مربوط به یک جمعیت در بین پایه های جمعیت دیگر می توان نتیجه گرفت که گروه بندی براساس صفات مورفولوژیکی با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه های طبیعی مطابقت نداشت.

گیاهان موجود در دو منطقه با استفاده از صفات مورفولوژیکی و براساس روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند. با توجه به شکل ۱، گروه اول با ۷ عضو (۴ پایه از منطقه چنارناز و ۳ پایه از بوروئییه) که بیشترین مقدار وزن هزاردانه، قطر چتر و تعداد چترک ها در هر چتر را به خود اختصاص دادند. گروه دوم شامل ۳ گیاه از چنارناز و ۲ گیاه از بوروئییه است که تنها از لحاظ صفت تعداد چتر برتر بودند. گروه سوم شامل ۳ گیاه مربوط به چنارناز و ۵ نمونه منطقه

جدول ۲- ضریب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی در جمعیت‌های آنگوزه تلخ

طول برگ	عرض برگ	سطح تاج پوشش	ارتفاع ساقه گل‌دهنده	تعداد چتر	قطر یقه	تعداد چترک در هر چتر	قطر چتر	وزن هزاردانه
۱	۰/۸۵۳**	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
عرض برگ	۱	۰/۶۵۳**	۱	۱	۱	۱	۱	۱
سطح تاج پوشش	۰/۸۰۸**	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
ارتفاع ساقه گل‌دهنده	۰/۶۴۲**	۰/۵۳۰**	۱	۱	۱	۱	۱	۱
تعداد چتر	۰/۱۹۱	۰/۱۴۷	۰/۱۰۱	۱	۱	۱	۱	۱
قطر یقه	۰/۷۵۸**	۰/۶۰۰**	۰/۷۷۱**	۰/۶۴۷**	۱	۱	۱	۱
تعداد چترک در هر چتر	-۰/۰۵۵	-۰/۰۴۳	-۰/۰۳۳	-۰/۰۱۱	۰/۱۰۰	۱	۱	۱
قطر چتر	۰/۰۳۳	-۰/۰۱۹	-۰/۰۱۷	-۰/۰۹۹	۰/۰۶۸	۰/۰۲۲	۱	۱
وزن هزاردانه	۰/۱۰۰	۰/۰۳۲	۰/۰۲۱۲	-۰/۰۲۲	-۰/۱۷۲	۰/۱۴۶	۰/۱۱۴	۱

(**: معنی‌داری در سطح ۱٪)



شکل ۱- دندروگرام براساس روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی برای ۲ جمعیت آنگوزه تلخ (Ch = منطقه چاراناز، B = منطقه بوروئیه)

54 ((AG)₈A)، 56 ISSR ((CA)₈C)، 58 ISSR ((AC)₈G) و 59 ISSR ((TG)₈G) فاقد باند چند شکل بوده و از ادامه بررسی حذف شدند. به عبارت دیگر از میان ۲۲ آغازگر مورد مطالعه، ۸ آغازگر DNA الگو را به خوبی تکثیر کردند و چندشکلی مطلوبی را نشان دادند (جدول ۳). نمونه‌هایی از الگوی الکتروفورزی به دست آمده از جمعیت‌های آنگوزه تلخ

برای گروه‌بندی نمونه‌ها براساس نشانگر ISSR، پس از آزمون تمام آغازگرها، مشخص شد که تعدادی از آغازگرها شامل 17 ISSR ((CT)₈A)، 18 ISSR ((CT)₈G)، 19 ISSR ((CT)₈T)، 20 ISSR ((CA)₈A)، 21 ISSR ((CA)₈G)، 22 ISSR ((GT)₈A)، 23 ISSR ((GT)₈C)، 24 ISSR ((GT)₈T)، 25 ISSR ((TC)₈A)، 26 ISSR ((GT)₈C) و 27 ISSR ((GT)₈T) را

بالاترین میزان شاخص نشانگر مربوط به پرایمر ISSR-16 بود (۱۵/۵۶). بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به پرایمر ISSR-55 (۰/۳۵) با ۳۷ باند بود. پرایمر ISSR-16 با میزان PIC کل ۰/۳۴ در رتبه دوم قرار داشت (جدول ۳).

و شیرین با استفاده از پرایمرهای ISSR-12 و ISSR-16 در شکل ۲ نشان داده شده است. آغازگرهای برتر در مجموع ۲۲۴ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کردند که اندازه آنها در محدوده ۱۰۰-۱۲۰۰ جفت باز بود. درصد چندشکلی تمام آغازگرها ۱۰۰٪ بود. آغازگر ISSR-16 بیشترین تعداد باند را برای گونه مورد مطالعه ایجاد کرد (۴۶). همچنین

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه *Ferula pseudalliacea*

نام آغازگر	توالی (۵' ۳')	موتیف	دمای اتصال	دامنه اندازه	نسبت باندهای	محتوای	شاخص
		بهینه شده	(°C)	آل‌های مشاهده شده (bp)	چندشکل	اطلاعات	نشانگری
					چندشکلی		
ISSR-12	AGAGAGAGAGAGAGAGT	(AG) ₈ T	۴۹/۹	۱۰۰-۱۰۵۰	۳۴/۳۴ (۱۰۰٪)	۰/۲۹	۹/۷۴
ISSR-13	AGAGAGAGAGAGAGAGG	(AG) ₈ G	۵۲/۴	۱۰۰-۱۰۵۰	۳۶/۳۶ (۱۰۰٪)	۰/۲۶	۹/۴۶
ISSR-14	GAGAGAGAGAGAGAGAT	(GA) ₈ T	۴۹/۹	۱۰۰-۱۲۰۰	۲۵/۲۵ (۱۰۰٪)	۰/۳۲	۷/۹۲
ISSR-15	GAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA) ₈ C	۵۲/۴	۱۵۰-۱۱۰۰	۳۳/۳۳ (۱۰۰٪)	۰/۲۶	۸/۵۴
ISSR-16	GAGAGAGAGAGAGAGAA	(GA) ₈ A	۴۹/۹	۱۵۰-۱۲۰۰	۴۶/۴۶ (۱۰۰٪)	۰/۳۴	۱۵/۵۶
ISSR-53	AGAGAGAGAGAGAGAGC	(AG) ₈ C	۵۲/۴	۳۰۰-۸۵۰	۹/۹ (۱۰۰٪)	۰/۲۵	۲/۲۵
ISSR-55	GAGAGAGAGAGAGAGAG	(GA) ₈ G	۵۲/۴	۱۵۰-۱۲۰۰	۳۷/۳۷ (۱۰۰٪)	۰/۳۵	۱۳/۰۵
ISSR-57	CACACACACACACAT	(CA) ₈ T	۴۹/۹	۲۰۰-۳۵۰	۴/۴ (۱۰۰٪)	۰/۱۶	۰/۶۴

جمعیت برابر بود (۰/۲۸). بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها نشان داد که میانگین GST در کل جمعیت ۰/۰۶ برآورد گردید. تنوع ژنتیکی کل (H_t) 0.2 ± 0.029 برآورد شد. تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها (H_s) برابر با 0.2 ± 0.028 بود. مقدار مثبت H_t در کل جمعیت‌ها نشان‌دهنده وجود تعادل در جمعیت است. میزان شار ژنی در کل جمعیت‌ها ۷/۸۹ برآورد گردید. بررسی شباهت ژنتیکی بین دو جمعیت نشان داد که تشابه ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۹۵ و فاصله ژنتیکی ۰/۰۴۹ محاسبه گردید.

با توجه به جدول ۴، بررسی مقادیر تنوع ژنتیکی نشان داد که منطقه بورویه تعداد جایگاه ژنی (۲۰۷) و درصد چندشکلی (۸۸/۴۶) بیشتری نسبت به چارناز داشت. به طوری که منطقه چارناز ۱۹۵ جایگاه ژنی و درصد چندشکلی ۸۳/۳۳٪ را داشت. البته مقدار شاخص اطلاعات شانون (0.21 ± 0.043) و تعداد آل‌های مشاهده شده (0.32 ± 0.188) در جمعیت بورویه بیشتر بود. تعداد الل مؤثر در جمعیت چارناز (0.34 ± 0.146) بیشتر از جمعیت بورویه (0.32 ± 0.145) بود. میزان تنوع ژنی نئی در هر دو

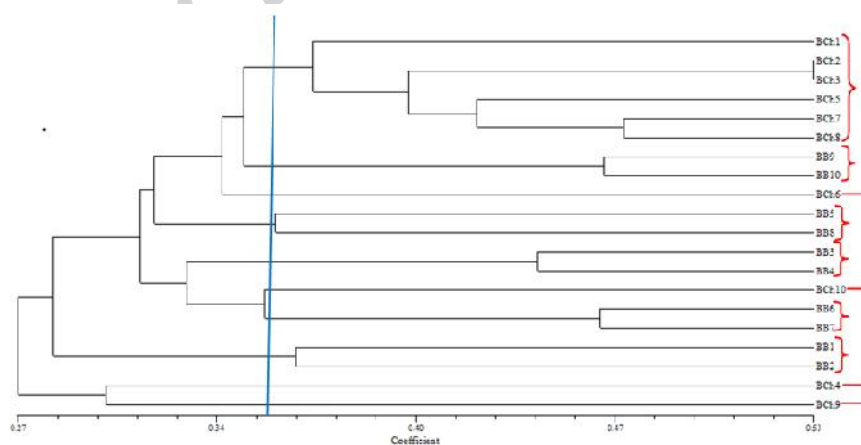
جدول ۴- تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های آنغوزه تلخ (*Ferula pseudalliacea*)

جمعیت	na*	ne*	h*	I*	تعداد مکانهای چندشکلی	درصد مکانهای چندشکل
چنارناز (جمعیت ۱)	۱/۸۶ ± ۰/۳۵	۱/۴۶ ± ۰/۳۴	۰/۲۸ ± ۰/۱۷	۰/۴۲ ± ۰/۲۳	۲۰۱	٪۸۵/۹۰
بورویه (جمعیت ۲)	۱/۸۸ ± ۰/۳۲	۱/۴۵ ± ۰/۳۲	۰/۲۸ ± ۰/۱۶	۰/۴۳ ± ۰/۲۱	۲۰۷	٪۸۸/۴۶
کل	۱/۹۶ ± ۰/۲۰	۱/۴۷ ± ۰/۳۰	۰/۲۹ ± ۰/۱۵	۰/۴۵ ± ۰/۱۹	۲۲۴	٪۹۵/۷۳

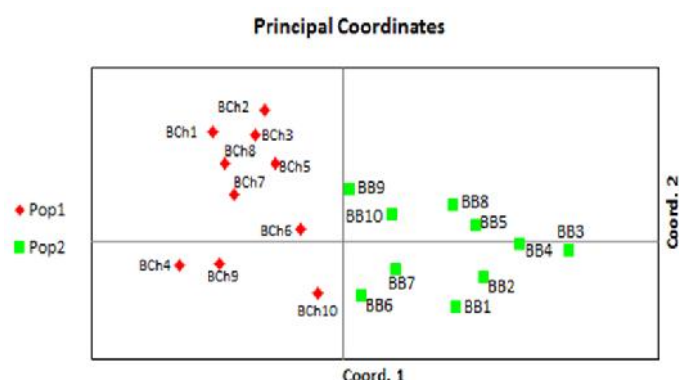
*na = تعداد ال‌های مشاهده شده، *ne = تعداد ال‌های مؤثر، *h = تنوع ژنی تنی، *I = شاخص شانون

های مجزا قرار گرفته‌اند که این گروه‌بندی با محدوده پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها تاحدی انطباق دارد. به‌منظور تجزیه و تحلیل بیشتر اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR، داده‌های به‌دست آمده از نوارهای امتیازدهی شده از طریق تجزیه به مختصات اصلی بررسی شد. نتایج آماری این تجزیه و تحلیل نشان داد که مؤلفه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب ۲۱/۹۱٪، ۱۹/۹۹٪ و ۱۶/۰۴٪ اطلاعات را دربرداشتند (در مجموع ۵۷/۹۴٪). با توجه به شکل ۳، جمعیت‌های منطقه چنارناز (pop1) کاملاً از جمعیت‌های تلخ منطقه بورویه جدا شدند (pop2). نتایج این آنالیز با تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشت.

تجزیه خوشه‌ای برای دو جمعیت مورد استفاده با استفاده از ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد و Dice و سه الگوریتم خوشه‌بندی UPGMA، نزدیک‌ترین همسایه (SLINK) و دورترین همسایه (CLINK) انجام شد و در نهایت با محاسبه ضریب کوفنتیک از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA (به دلیل داشتن بالاترین مقدار $r = ۰/۷۲$) برای گروه‌بندی ۲۰ پایه استفاده شد و دندروگرام مربوط به آن ترسیم گردید (شکل ۳). تجزیه خوشه‌ای، دو جمعیت مورد مطالعه را در ۱۰ خوشه گروه‌بندی کرد که چهار گروه آن تک‌عضو بودند. هر ۴ گروه تک‌عضو همه مربوط به منطقه چنارناز بودند. با توجه به دندروگرام، افراد متعلق به هر جمعیت و در هر منطقه جغرافیایی در خوشه یا خوشه-



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی جمعیت‌های آنغوزه تلخ و شیرین با استفاده از پرایمرهای ISSR-12 و ISSR-16



شکل ۳- دندروگرام UPGMA (شکل بالا) و نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) (شکل پایین) برای ۲ جمعیت آنغوزه تلخ. Ch = منطقه چنارناز (pop1)، B = منطقه بوروئیپه (pop2).

ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۲٪) بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها (۸٪) می‌باشد (جدول ۵). این مطلب مؤید نتایج دندروگرام است.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که براساس آماره pt در بین گروه‌ها در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. نتایج نشان داد که تنوع

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی برای تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها

pt	درصد تنوع	Est. Var	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۷۷**	۸	۳/۵۵۴	۷۸/۱۰۰	۷۸/۱۰۰	۱	بین جمعیت‌ها
	۹۲	۴۲/۵۵۶	۴۲/۵۵۶	۷۶۶/۰۰۰	۱۸	درون جمعیت
	۱۰۰	۴۶/۱۱۰		۸۴۴/۱۰۰	۱۹	کل

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱

نشان دادند که با مطالعات Salami و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد.

از ۲۲ آغازگر، ۸ آغازگر دارای چندشکلی مطلوب بودند و در مجموع ۲۲۴ باند مربوط به ۲۰ نمونه گیاهی ایجاد کردند. میانگین PIC در این مطالعه ۰/۲۸ بود، با توجه به اینکه حداکثر PIC در نشانگرهای غالب ۰/۵ است (Nagy et al., 2012)، حکایت از آن داشت که مجموعه آغازگرهای انتخاب شده پراکندگی نسبتاً مناسبی در ژنوم جمعیت‌های مورد بررسی داشتند. تعداد آلل‌های هر مکان ژنی هم، مناسب بودن آن را برای تخمین تنوع و پراکندگی ژنتیکی یک جمعیت نشان می‌دهد (Haji et al., 2011).

بحث

ارزیابی تنوع ژنتیکی برای حفاظت منابع ژنتیک گیاهان دارویی در رویشگاه‌های طبیعی بسیار مهم است. از میان ۹ صفت مورفولوژیک تنها سطح تاج پوشش، قطر یقه و وزن هزاردانه دارای اختلاف معنی‌داری بین دو منطقه بودند. در گیاهان مرتعی عوامل محیطی تأثیر بسیار زیادی بر خصوصیات مورفولوژی گیاه دارند، به طوری که ممکن است تأثیر عوامل ژنتیکی را به طور کامل پوشش دهند (Pirmoradi, 2012). گروه‌بندی براساس صفات مورفولوژیک با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه‌های طبیعی مطابقت نداشت. این صفات سطح بالایی از تنوع را

داده‌های مولکولی با نتایج تجزیه به مختصات اصلی همخوانی داشت. همچنین در بررسی تنوع ژنتیکی رازیانه و باریجه، Farshadfar و همکاران (۲۰۱۷) و Khoonani و همکاران (۲۰۱۷) به نتایج مشابه دست یافتند.

تطابق گروه‌بندی براساس صفات مورفولوژیک (شکل ۱) و مولکولی (شکل ۳) نشان داد که تشابه چندانی بین این دو گروه‌بندی وجود ندارد. از سوی دیگر محاسبه همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های عدم تشابه حاصل از داده‌های مورفولوژیک و مولکولی ($r=0/14$)، عدم وجود همبستگی معنی‌دار را بین آنها نشان داد ($p=0/92$). با توجه به اینکه صفات ریخت‌شناسی مربوط به بخش‌های رمزکننده ژنوم است، اما قطعات DNA تکثیرشده در نشانگر ISSR، مربوط به بخش‌های رمزکننده و غیررمزکننده ژنوم است و از جهت دیگر نشانگرهای مولکولی در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیک در انتخاب مصنوعی قرار نمی‌گیرند (Semagan, 2002). پس عدم وجود همبستگی دور از انتظار نیست. در بررسی تنوع ژنتیکی در رازیانه خودگشن و دگرگشن با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر ISSR، مشخص گردید که طبقه‌بندی براساس داده‌های مورفولوژیک، خوشه‌بندی براساس داده‌های مولکولی را تأیید نمی‌کند (Salami et al., 2017). به طوری که چندین مطالعه نتایج نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیک را با هم مقایسه کرده و روابط بین این دو روش را پایین ارزیابی کرده‌اند (Legave et al., 2006).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده توانایی نشانگرهای مولکولی ISSR مورد استفاده در جداسازی جمعیت‌های آنگوزه تلخ بود. با توجه به اینکه این تحقیق اولین گزارش از کاربرد نشانگر ISSR و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آنگوزه تلخ در استان یزد است، می‌توان با ادامه بررسی تنوع ژنتیکی تمام جمعیت‌های *Ferula pseudalliacea* در ایران و با استفاده از آغازگرهای بیشتر و قوی‌تر، به الگوی نشانگری کامل‌تری دست یافت و با

نشانگرهای ISSR-16 و ISSR-55 بالاترین میزان PIC، شاخص نشانگر و تعداد باند را برای گیاه آنگوزه تلخ داشتند. بنابراین می‌توان این آغازگرها را به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگرهای ISSR برای مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی و تکاملی جمعیت‌های *Ferula pseudalliacea* پیشنهاد کرد. با توجه به اینکه G_{ST} به مقادیر کم ($G_{ST} < 0/05$)، متوسط ($0/05 < G_{ST} < 0/15$) و زیاد ($G_{ST} > 0/15$) طبقه‌بندی می‌شود (Nei, 1978)، در این مطالعه ضریب G_{ST} (۰/۰۶) در طبقه متوسط قرار گرفت. همچنین مقدار جریان ژنی در جمعیت‌ها بیش از ۱ بود (۷/۸۹). نمودار خوشه‌ای در این تحقیق، دارای ضریب کوفنتیک $r = 0/72^*$ بود که نشان‌دهنده برازش خوب می‌باشد (Khoonani et al., 2017). نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی تا حدی همخوانی دارد. نتایج مشابه در این زمینه توسط برخی محققان دیگر نیز گزارش شده است (Mohseni et al., 2015; Baldemir et al., 2017). در پژوهشی Khoonani و همکاران (۲۰۱۷) به عدم ارتباط تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های باریجه اشاره کردند. در تجزیه خوشه‌ای و در بیشتر موارد افراد متعلق به هر جمعیت و هر منطقه جغرافیایی در خوشه‌های مجزا قرار گرفته‌اند. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون جمعیت‌ها و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها را اثبات کرد. در بررسی جمعیت‌های *Harperella nodosa* و کنار (*Ziziphus spina-christi*) نیز افزایش تنوع در داخل جمعیت‌ها نسبت به بین جمعیت‌ها گزارش شد (Smith et al., 2016). در مطالعه‌ای Messmer و همکاران (۱۹۹۲) پیشنهاد کردند که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد. در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای براساس

- Junior, I. and Blank, A.F., 2016. Genetic diversity analysis of *Varronia curassavica* Jacq. Accessions using ISSR markers. *Genetic and Molecular Research*, 15 (3): 1-10.
- DK, S., Tewari, R., NK, S. and Singh, Sh.S., 2016. Genetic Diversity Cucumber using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *Transcriptomics*, 4 (1): 1-4.
- Farshadfar, M., Moradzade, N., Farshadfar, E. and Shirvani, H., 2017. Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25 (2): 212-231.
- Haji, K., Naghavi, M.R., Taleii, A.R. and Aghaii, M.J., 2011. Evaluation of genetic diversity of *Aegilops tauschii* from Northern area of Iran using SSR markers. *Iranian Journal of Biology*, 24: 390-399.
- Khederzadeh, S., Samiei, M., Mobaraki, A., Ezeddinloo, L. and Haghi, H.A., 2017. Genetic Comparison of Iranian Asafetida (*Ferula assafoetida* L.) Populations Based on cpDNA Ribosomal Protein L16 Intron. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 5 (4): 577-583.
- Khoonani, Z., Naghavi, M.R., OMidi, M., Sabokdast, M., Talebi Kooyakhi, E., 2012. Investigating genetic diversity of *Ferula gummosa* ecotypes in different regions of Iran using AFLP Marker. *Journal of Medicinal Plants*, 38 (2): 117-126.
- Legave, J.M., Segura, V., Fournier, D. and Costes, E., 2006. The effect of genotype, location and their interaction on early growth and branching in apricot trees. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81 (2): 189-198.
- Messmer, M.M., Melchinger, A.A., Boppenmair, J., Hermann, R.G. and Brunklaus-Jung, E., 1992. AFLP analysis of genetic relationships in the *tribe Datureae* (solanaceae). *Theoretical and Applied Genetic*, 99: 634-41.
- Mohseni, Z., Bernousi, I., Mandoulakani, B.A. and Darvishzadeh, R., 2015. Genetic Diversity in *Papaver Bracteatum* and *Papaver Somniferum* Populations Revealed by ISSR Markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (3): 485-493.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernak, I., Mousapour Gorji, A., Hegedus, G. and Taller, J., 2012. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50: 670-672.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Ng, W.L. and Tan, S.G., 2015. Inter-Simple Sequence
- استفاده از آنها برای ایجاد بانک ژنتیکی به منظور حفظ این گیاه ارزشمند و در معرض انقراض اقدام به جمع‌آوری جمعیت‌های این گیاه کرد.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Kafi, M., Sefidkon, F. and Malekzadeh Shaaroudi, S., 2015. Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal plant Nowruzak (*Salvia leriifolia*) using ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23 (1): 1-12.
- Akbarian, A., Rahimmalek, M. and Sabzalian, M.R., 2017. Variation in fruit morphological traits and bioactive compounds in different populations of *Ferula assa-foetida*, *F. gummosa* and *F. ovina* Collected from Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19: 425-438.
- Amiri, M.S. and Joharchi, M.R., 2016. Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: a review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6 (6): 621-635.
- Araujo, F.S., Pacheco, M.V., Vieira, F.A., Ferrari, C.S., Felix, F.C. and Chagas, K.P.T., 2016. ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Indesia (Chile) Volumen*, 34 (3): 47-52.
- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M.Z., Ali Khan, A., Qayyum, A., Noor, E., Abid, M.A., Naseer Cheema, H.M. and Ahmad, M.Q., 2016. Comparative Analysis of Genetic Diversity among Bt Cotton Genotypes using EST-SSR, ISSR and Morphological Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18: 517-531.
- Baldemir, A., Topcu, H., Paksoy, M.Y., Motalebipour, E.Z. and Kafkas, S., 2017. First microsatellite markers for *Scaligeria lazica* Boiss. (Apiaceae) by next generation sequencing: population structure and genetic diversity analysis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 1-10.
- Baranski, R., Barsnska, M., Schulz, H., Simon, P.W. and Nothnagel, T., 2006. Single Seed Raman Measurements Allow Taxonomical Discrimination of Apiaceae Accessions Collected in Gene Bank. *Biopolymers*, 81: 497-505.
- Barrandeguy, M.E. and Garcia, M.V., 2014. Quantifying genetic diversity: the starting point for population genetic studies using molecular markers. *Journal of Genetics*, 93 (2): 587-589.
- Brito, F.A., Nizio, D.A.C., Silva, A.V.C., Diniz, L.E.C., Rabbani, A.R.C., Arrigoni-Blank, M.F., Alves-Carvalho, S.V., Figueira, G.M., Montanari

- Smith, W.B., Frye, Ch.T., Veliz, E., Hiebler, Sh., Taylor, R.C. and Hunter, K.L., 2015. Genetic variability of Maryland and West Virginia population of the federally endangered plant *Harperella nodosa* (Rose) (Apiaceae). *Northeastern Naturalist*, 22 (1): 106-119.
- Stevens, M.L., Clarke, A.C., Clarkson, F.M., Goshorn, M. and Gemmill, Ch.E.C., 2015. Are current ecological restoration practices capturing natural levels of genetic diversity? A New Zealand case study using AFLP and ISSR data from mahoe (*Melicytus ramiflorus*). *New Zealand Journal of Ecology*, 39 (2): 190-197.
- Torabi-Giglou, M., Panahandeh, J., Mohammadi, S.A., Zaree Nahandi, F., Motallebi Azar, A. and Sliwka, J., 2015. DNA and morphological diversity and relationship analysis of selected cultivated, wild potatoes and some promising hybrids. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 6 (2): 175-186.
- Zhang, H.Y., Tian, K., Yu, Y., Li, L.Y. and Yang, Y.M., 2009. Genetic diversity among natural populations of *Ottelia acuminata* (Gaghep.) Dandy revealed by ISSR. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22): 6089-6093.
- Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. *ASM Science Journal*, 9 (1): 30-39.
- Modareskia, M., Darvishzadeh, R., Hassani, A. and Kholghi, M., 2012. Molecular diversity within and between Ajowan (*Carum copticum* L.) populations based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1 (1): 51-62.
- Parashar, M., Jakhar, M.L. and Malik, C.P., 2014. A Review on Biotechnology, Genetic Diversity in Cumin (*Cuminum cyminum*). *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 4 (4): 17-34.
- Pirmoradi, M.R., 2012. Morphological, physiological, phytochemical and genetical evaluation of Asafoetida in Kerman province. Ph.D. thesis, Department of Horticultural Science, Tarbiat Modares University.
- Salami, M., Rahimmalek, M. and Ehtemam, M.H., 2017. Genetic variability of outcross and selfed fennel based on morphological and ISSR markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19: 157-172.
- Semagn, K., 2002. Genetic relationships among 10 endod types as revealed by a combination of morphological, RAPD and AFLP markers. *Hereditas*, 137: 149-156.

Archive

Investigating morphological characteristics and genetic relationships between two populations of *Ferula pseudalliacea* in Yazd Province

S. Hossein Jafari^{1*}, A. Sepehry², H. Soltanloo³, A.A. Karimian⁴

1*- Corresponding author, PhD Student, Rangeland Science, Department of Natural Resources, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran. Email: Samirahosseinjafari@yahoo.com

2- Prof., Department of Range Management, Faculty of Natural Resources, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran.

3- Associ. Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran.

4- Associ. Prof., Department of Range and Water Management, Faculty of Natural Resources and Desert Study, Yazd University, Yazd, I. R. Iran.

Abstract

Ferula pseudalliacea (bitter assafoetida) is a rangeland plant which its gum has a lot of medicinal properties. Since there is no report about evaluating genetic diversity of the valuable species in Iran, this is the first study to investigate genetic diversity of the species in its habitats in Yazd province using several morphological traits and ISSR markers. Among 9 traits, there was significant differences between habitats in terms of canopy cover, stem diameter and weight of 1000 seed. Cluster analysis by morphological traits on the basis of Ward's method classified the samples into three main groups. Among 22 primers, 8 primers reproduced the pattern DNA well and revealed 224 sharp bands. ISSR-16 and ISSR-55 primers had better performance according to the number of bands, PIC and Marker Index. Cluster analysis using Jacquard's coefficient and UPGMA method, grouped two populations into 10 clusters. Principal coordinates analysis showed three components explained 57.94 percent of total variance and separated the populations from each other. These grouping matched relatively with the geographical regions. AMOVA showed that within group genetic diversity (92%) was more than between group diversity (8%). Comparing morphological and molecular dendrograms revealed that there was no similarity between them. The results showed that ISSR marker was suitable to investigate genetic diversity among the studied populations of the species.

Key words: *Ferula pseudallicea*, genetic diversity, ISSR marker, morphological traits, Yazd province