

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های جاشیر (*Prangos ferulacea L.*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR

منصوره مرادی^۱، علی ایزانلو^{۲*} و محمد ضابط^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی - اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، پست الکترونیک: a.izanloo@birjand.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

چکیده

جاشیر یکی از اعضای خانواده چتریان است. با توجه به اهمیت این گیاه دارویی، صنعتی و علوفه‌ای، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت گونه‌های مختلف آن امری بسیار ضروریست. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۱۹ اکوتیپ جاشیر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد پنج آغازگر ISSR و هشت آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای RAPD در مجموع ۴۴ نوار قابل امتیازدهی نشان دادند که ۴۲ نوار چندشکلی داشتند. هفت آغازگر RAPD، ۱۰۰ درصد چندشکلی را نشان دادند. آغازگرهای ISSR، در مجموع ۲۱ نوار قابل امتیازدهی ایجاد نمودند که ۱۸ نوار تشکیل شده چند شکل بودند. میانگین PIC برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۳۳۰ و ۰/۳۰۴ برآورد گردید. میانگین تنوع ژنتیکی نی (H) برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۳۲۵ و ۰/۳۹۶ بود و شاخص شانون (I) برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۴۸ و ۰/۵۵ محاسبه شد. بر اساس اطلاعات به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA برای داده‌های هر دو سیستم نشانگری، اکوتیپ‌ها به هشت گروه تقسیم‌بندی شدند. اگرچه تنوع ژنتیکی بالایی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه وجود داشت، ولی ارتباطی بین تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی مشاهده نشد. در مجموع مطالعات انجام شده بر روی اکوتیپ‌های جاشیر نشان داد که نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جاشیر مناسب بوده و توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: جاشیر، تنوع، چندشکلی، نشانگر مولکولی

مقدمه

تنوع ژنتیکی این گونه از اهمیت خاصی برخوردار است. شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور دارای اهمیت ویژه‌ای است و قبل از هر نوع اقدام به‌نژادی شناخت تنوع و ظرفیت ژنتیکی هرگونه گیاهی ضروریست. تعیین و تأیید هویت گیاه، اولین گام در مطالعه یا استفاده از آن گیاه است. امروزه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی در تشخیص گیاهان کاربرد فراوانی پیدا کرده است. روش‌های مولکولی امکانات ویژه‌ای را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ارائه می‌دهند و می‌توانند راهکارهای مناسبی را برای ایجاد راهبردهای حفاظتی ژرم‌پلاسم فراهم کنند (Paterson et al., 1991). از سویی، تنوع ژنتیکی پایه و اساس همه برنامه‌های به‌نژادی است و آگاهی از فاصله ژنتیکی گیاهان برای اهداف به‌نژادی گیاهی مهم می‌باشد. نشانگرهای مولکولی امروزه به‌طور گسترده برای تعیین تنوع ژنتیکی بکار می‌روند. استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای بسیار مهم و قوی در این زمینه بوده که در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند. همچنین استفاده از این نشانگرها در مدیریت ژرم‌پلاسم و گزینش بر اساس نشانگر، برای افزایش کارایی به‌نژادی و تکثیر ژرم‌پلاسم مفید می‌باشد (Parveen et al., 2016).

مطالعات انجام شده بر روی گیاه جاشیر چندان متنوع نبوده و بیشتر مطالعات در زمینه داروسازی و ترکیبات فیتوشیمیایی آن است (Amiri, 2007). Emamghoreishi, Sajjadi, Kafash Farkhad et al., 2012, et al., 2012. همچنین به علت برداشت غیرمجاز، بهره‌برداری غیرصحیح و بی‌رویه در گذشته‌های نه چندان دور، چرای مفرط و زودرس و خواب و عدم جوانه‌زنی و یکنواختی بذر، این گیاه را در معرض انقراض قرار داده است. در زمینه بررسی خصوصیات ژنتیکی و به‌نژادی این گیاه تاکنون تحقیقات مدونی انجام نشده است. بنابراین،

جاشیر (*Prangos ferulacea* L.) از خانواده چتریان (Apiaceae) به‌عنوان یکی از گیاهان مرتعی ایران می‌باشد که اغلب به‌عنوان گیاه علوفه‌ای، حفاظتی، دارویی و صنعتی معرفی شده است. جنس *Prangos* حاوی ۳۰ گونه است که ۱۵ گونه آن در ایران یافت شده و پنج گونه از این تعداد بومی ایران است (Mozaffarian, 1996). جاشیر از رویشگاه‌های دامنه‌های البرز، استان‌های آذربایجان، شیراز، مازندران، اراک، کردستان، همدان، سمنان، لرستان و اصفهان جمع‌آوری و شناسایی شده است (Hasani and Shahmoradi, 2007). وجود رویشگاه گیاه جاشیر در کشورهای ترکیه، بالکان، ایتالیا، سوریه و قزاقستان گزارش شده است (Coşkun et al., 2004). از این گیاه دارویی در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده و تحقیقات آزمایشگاهی متعددی خواص درمانی آن را اثبات کرده‌اند (Sajjadi et al., 2012, Emamghoreishi et al., 2012). Kafash-Farkhad et al., 2013). گیاه جاشیر در بسیاری از مناطق ایران نیز یکی از گیاهان اصلی در تأمین علوفه زمستانی دام‌ها می‌باشد (Razavi and Hajiboland, 2009). آزمایشی در کشور ترکیه، پس از تجزیه شیمیایی گیاه جاشیر، نشان داده است که این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک علوفه پرانرژی مورد استفاده دام قرار گیرد (Coşkun et al., 2004).

جاشیر گیاهی دگرگرده‌افشان است که توسط حشرات گرده‌افشانی می‌شود. تکثیر گیاه از طریق بذر انجام می‌شود، ولی به دلیل مشکلات مربوط به شاخص‌های جوانه‌زنی بذر، قابلیت تکثیر پایینی دارد. علاوه بر آن، تغییر شرایط محیطی در طی دهه‌های گذشته، فعالیت انسان در برداشت گیاه از رویشگاه‌های طبیعی و چرای بی‌رویه دام این گیاه را در معرض خطر فرسایش ژنتیکی قرار داده است (Razavi and Hajiboland, 2009). از این رو تدابیر حفاظتی مانند مطالعه جمعیت‌ها از نظر پراکنش، اکولوژی و زیست‌شناسی برای حفظ و نگهداری

















ابتدا گیاهچه‌های برداشت شده در ازت مایع به خوبی پودر شدند، آنگاه برای اکوتیپ‌هایی که موفق به جوانه‌زنی نشده بودند از بذر برای استخراج DNA به روش CTAB (Porebski *et al.*, 1997) استفاده شد. ابتدا پوسته رویی بذرها (۱۰ عدد از هر نمونه) جدا و بذرها در حضور ازت مایع به خوبی پودر شدند و حدود ۲۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم از آن در لوله‌های آزمایش ۲ میلی‌لیتری کدگذاری شده با نام یا شماره اکوتیپ منتقل گردیدند. یک میلی‌لیتر از بافر شستشو (Tris-HCl, 100 mM pH=8; EDTA, 50 mM; NaCl, 1 M; PVP, % 1 اضافه و به مدت ۵ دقیقه در داخل یخ بخوبی مخلوط شدند. سپس تیوپ‌ها در دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. بخش رویی دور ریخته شد و استخراج DNA به روش CTAB از فاز پایینی انجام شد، با این تفاوت که رسوب دوباره DNA انجام گردید. رسوب DNA در هوای اتاق خشک و بعد در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه دوباره حل گردید و ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 0.5 X TBE تعیین شد. پس از بررسی کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده، حداکثر غلظت به دست آمده از نمونه‌های استخراجی تقریباً در محدوده ۱۲۰۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود که به نسبت با غلظتی برابر ۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند.

اطلاع از میزان تنوع یا تشابه توده‌های گوناگون انتشار یافته در مناطق مختلف جغرافیایی ایران مفید و حائز اهمیت است و می‌تواند اطلاعات زیادی را در مورد ژرم‌پلاسم در اختیار دانش به‌نژادی گیاهی قرار دهد. این گیاه تنها به صورت وحشی و خودرو در رویشگاه‌های طبیعی خود رشد می‌کند. در اندک مکان‌هایی که کشت زراعی انجام می‌شود منبع تهیه بذر نیز همان رویشگاه‌های طبیعی گیاه می‌باشد. تعیین تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف جاشیر جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف این گیاه در کشور و گروه‌بندی آنها براساس اطلاعات ژنتیکی، اولین قدم در این راه می‌باشد. بدین منظور، این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های جمع‌آوری شده جاشیر از نقاط مختلف ایران توسط نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، ۱۹ اکوتیپ گیاه جاشیر *P. ferulacea* از نقاط مختلف ایران (جدول ۱) جمع‌آوری شدند. از هر اکوتیپ نمونه ۵۰ بذری تهیه شد. برای شکست خواب و جوانه‌زنی، نمونه‌های بذری در پتری دیش بر روی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۳۰ روز تحت تیمار اسید جیبرلیک ۲۵۰ ppm قرار گرفتند و بعد از جوانه‌زنی به گلدان‌های پلاستیکی منتقل شدند. هنگامی که طول گیاه به ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر رسید، گیاهچه‌ها برای استخراج DNA برداشت و بلافاصله در ازت مایع فریز و در فریزر -20°C تا زمان استخراج نگهداری شدند. استخراج DNA از گیاهچه و بذر جاشیر انجام شد.

جدول ۱- شماره اکوتیپ، منطقه جمع‌آوری، نوع مصرف و شکل بذر گیاه جاشیر

شماره اکوتیپ	استان	منطقه جمع‌آوری	طول		ارتفاع از سطح دریا (متر)	تصویر بذر از نوع مصرف	
			شرقی	عرض شمالی		زرعی	دامی
۲ و ۱	فارس	اقلید، آسپاس	۵۲° ۲۹'	۳۰° ۴۳'	۲۱۲۰		
۳	اصفهان	زرین شهر	۵۱° ۳۹'	۳۲° ۳۸'	۱۵۷۰		
۴	لرستان	الیگودرز	۴۹° ۴۲'	۳۲° ۲۳'	۲۱۰۰		
۵	چهارمحال و بختیاری	بروجن، گندمان	۵۱° ۱۷'	۳۱° ۸۹'	۲۲۰۰		
۶	فارس	اقلید، تیمارگون	۵۲° ۳۲'	۳۰° ۵۲'	۲۲۵۰		
۷	خراسان شمالی	بحنور	۵۶° ۹۳'	۳۷° ۳۷'	۱۰۷۰		
۸	فارس	خرم بید	۵۳° ۱۶'	۳۰° ۵۷'	۱۹۰۰		
۹	فارس	سیمکان	۵۳° ۴۴'	۳۰° ۴۲'	۲۴۲۲		
۱۰	چهارمحال و بختیاری	شهرکرد، فارسان	۵۰° ۴۲'	۳۲° ۲۰'	۲۰۶۰		
۱۱	اصفهان	فریدون شهر	۵۰° ۱۱'	۳۲° ۹۲'	۲۴۹۰		
۱۲	کرمانشاه	کرمانشاه	۴۷° ۱۳'	۳۴° ۴۰'	۱۲۰۰		
۱۳	فارس	اقلید، کوه بل	۵۲° ۷۰'	۳۰° ۸۰'	۴۹۴۳		
۱۵ و ۱۴	چهارمحال و بختیاری	لردگان	۵۰° ۸۷'	۳۱° ۵۲'	۱۷۰۰		
۱۶	لرستان	خرم‌آباد	۴۸° ۴۰'	۳۳° ۵۰'	۱۸۷۰		
۱۷	مرکزی	اراک	۴۹° ۶۲'	۳۴° ۱۰'	۱۷۰۰		
۱۹ و ۱۸	کهگیلویه و بویراحمد	یاسوج	۵۱° ۶۲'	۳۰° ۶۵'	۱۸۷۰		

مراحل PCR

۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه حرارتی PCR برای نشانگر RAPD همانند نشانگرهای ISSR بود، با این تفاوت که دمای اتصال آغازگر ۳۵°C تا ۴۵°C در نظر گرفته شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز دو درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و تصویربرداری از ژل با دستگاه ژل داک انجام شد.

برای انجام آزمایش از هشت آغازگر RAPD و پنج آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲). چرخه حرارتی PCR برای نشانگر ISSR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه در ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه بود، مرحله اتصال در دمای مناسب آغازگر (۴۳°C تا ۵۴°C، طبق جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD و ISSR مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر Primer	توالی (۵'→۳') Sequence (5'→3')	دمای اتصال (°C) Annealing Tm (°C)	GC محتوای (%) GC content (%)
OP1	GCGGGCTGAG	۴۸	۷۰
OP4	GATGACCGCG	۴۸	۷۰
OP5	AGGGGTCTTG	۴۹	۶۰
OP6	GGTCCCTGAC	۴۵	۷۰
OP11	CAATCGCCGT	۳۲	۶۰
OP17	AGGGAACGAG	۴۵	۶۰
OP18	AGGTGACCGT	۳۲	۶۰
OP19	GTCAGGGCAA	۴۸	۷۰
ISSR5	(AG) ₈ YT	۵۱/۶	۵۲
ISSR7	(AG) ₈ RC	۵۳/۹	۵۰
ISSR11	(CT) ₈ T	۴۳/۶	۵۴
ISSR33	(TG) ₈ RT	۵۱/۰	۵۲
ISSR69	(CA) ₈ A	۵۲/۷	۴۴

تجزیه آماری

آن P_i فراوانی آللهای i ام نشانگر می باشد.

شاخص نشانگر (MI) با استفاده از رابطه $MI = PIC.N.\beta$ برای کلیه آغازگرها محاسبه شد که در آن PIC میزان اطلاعات چندشکلی برای هر آغازگر، N تعداد کل نوارها برای هر آغازگر و β درصد چندشکلی برای هر آغازگر می باشد. این

پس از ثبت اطلاعات، با استفاده از نرم افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر در ستون و نام ژنوتیپ در ردیفها قرار گرفت. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) نشانگرها از طریق رابطه $PIC = 1 - \sum P_i^2$ محاسبه گردید که در

RAPD حدود ۰/۳۳ برآورد گردید. محدوده شاخص نسبت چندشکلی (EMR) بین ۰/۳۳ تا ۱۰ بود که کمترین مقدار مربوط به آغازگر OP18 و بیشترین مربوط به آغازگر OP17 بود. کمترین شاخص نشانگر (MI) در بین شاخص‌های مولکولی مورد بررسی متعلق به آغازگر OP18 با ۰/۰۲ بود. بیشترین شاخص نشانگر در بین شاخص‌های مولکولی مورد بررسی متعلق به آغازگر OP17 با ۳/۶ بود. شاخص نشانگر قابلیت هر آغازگر را برای تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد، بنابراین بالا بودن مقدار شاخص نشانگر نشان داد که آغازگر OP17 نسبت به سایر آغازگرهای به‌کار رفته قابلیت بالایی در تولید نوار بیشتر دارد. کمترین شاخص قدرت تفکیک (RP) مربوط به آغازگر OP18 با ۲/۱۸ و بیشترین مقدار مربوط به آغازگر OP17 با ۹/۸۸ بود (جدول ۳).

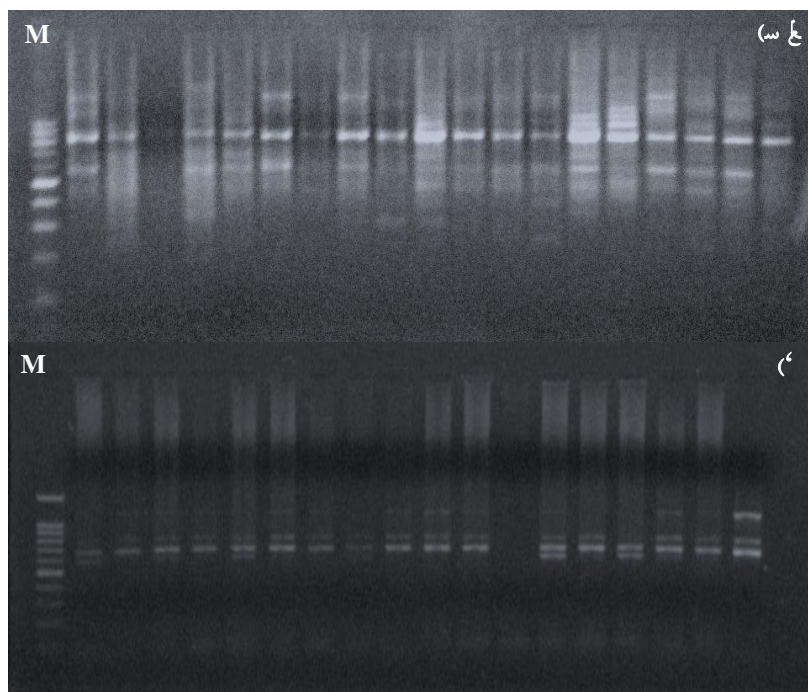
از میان ۵۵ آغازگر ISSR مورد بررسی در مرحله غربال آغازگر چندشکل، تنها پنج آغازگر الگوی نواری مشخصی تولید کردند. این آغازگرها در مجموع ۲۱ نوار قابل امتیازدهی در محدوده ۱۰۰-۱۱۰۰ جفت بازی ایجاد نمودند. تعداد ۱۸ نوار تشکیل شده چندشکلی را نشان دادند. درصد چندشکلی برای همه آغازگرهای استفاده شده، ۱۰۰ درصد بود، به‌جز آغازگر ISSR33 که این مقدار ۶۶/۶۶ درصد بود. میزان PIC از ۰/۲۷-۰/۳۷ به ترتیب برای آغازگرهای ISSR7 و ISSR69 متغیر بود (شکل ۱ ب). میانگین PIC برای آغازگر ISSR ۰/۳۰ بود. میانگین EMR، MI و RP به ترتیب ۲/۳۸، ۰/۷۵ و ۴/۱۷ محاسبه شد. میزان EMR بین ۱/۱۲-۴ متغیر بود که بیشترین مقدار EMR مربوط به آغازگر ISSR69 بود. بیشترین و کمترین مقدار برای MI به ترتیب مربوط به آغازگرهای ISSR69 با ۱/۴۸ و ISSR7 با ۰/۳۰ بودند. بیشترین و کمترین RP به ترتیب مربوط به آغازگرهای ISSR33 (۶/۵۲) و ISSR7 (۲/۴۶) بودند (جدول ۳).

شاخص علاوه بر مزایای شاخص PIC تعداد کل نوار و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته و قابلیت هر آغازگر را برای تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (Powell, et al 1996). شاخص قدرت تفکیک (RP) به‌عنوان بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب محاسبه شد. این شاخص هم از تعداد افراد دارای نوار و هم تعداد آلل تأثیرپذیری دارد.

تجزیه‌های ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای GenALEX، POPGENE32 و NTSYC2.0 انجام شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYC2.02 انجام گردید. پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی بین و درون زیرجمعیت‌ها شامل هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص Fst، جریان ژنی (Nm)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I) با استفاده از نرم‌افزار POPGENE32 (Yeh, 1999) محاسبه شدند.

نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از ۱۹ اکوتیپ جاشیر با استفاده از هشت آغازگر RAPD، چندشکلی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در مجموع تعداد ۴۴ نوار قابل امتیازدهی در محدوده ۱۰۰-۱۲۰۰ جفت بازی ایجاد شد که از این تعداد، ۴۲ نوار چندشکلی را نشان دادند. آغازگرهای OP1، OP4، OP5، OP6، OP11، OP17، OP19 و چندشکلی ۱۰۰ درصدی را نشان دادند (جدول ۳). کمترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر OP18 با ۳۳/۳۳ درصد بود. نمونه‌ای از الگوی نواری تکثیر شده توسط آغازگر OP6 در (شکل ۱ الف) نشان داده شده است. بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر OP19 برابر ۰/۴۳ و کمترین مقدار مربوط به آغازگر OP18 برابر ۰/۰۸ بود. میانگین PIC برای نشانگر



شکل ۱- الگوی نواری تکثیر شده توسط آغازگر ریپد OP6 (الف)، آغازگر ISSR69 (ب) برای ۱۹ اکوتیپ جاشیر مورد مطالعه به ترتیب از چپ به راست شماره اکوتیپ ۱ تا ۱۹، M: نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت بازی (bp).

آغازگر OP5 (۰/۸۲۴) و OP11 (۰/۳۰۴) بود. بیشترین و کمترین میزان جریان ژنی در آغازگرهای OP17 با ۳۳۳/۲۱ و OP5 با ۷/۴۵ مشاهده شد. OP4 با ۰/۳۷۱ بیشترین ضریب تنوع بین جمعیتی و OP18 با ۰/۰۰۵ کمترین مقدار ضریب تنوع بین جمعیتی را به خود اختصاص دادند. بیشترین میزان Fst را آغازگر OP4 با ۰/۰۷۹ و کمترین میزان Fst را آغازگر OP18 با ۰/۰۰۷ داشت (جدول ۳).

برای آغازگرهای RAPD، میانگین هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص Fst و جریان ژنی (Nm) به ترتیب ۰/۳۶۳، ۰/۳۴۱، ۰/۱۲۳، ۰/۰۴۳ و ۹۷/۸۸ بدست آمد. بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگرهای OP18 با ۰/۴۸۵ و OP6 به میزان ۰/۲۵۸ بود. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها به ترتیب مربوط به

جدول ۳- پارامترهای محاسبه شده به کمک تجزیه نی و پارامترهای تنوع ژنتیکی در ۱۹ اکوتیپ جاشیر به کمک نشانگرهای RAPD و ISSR. محتوی اطلاعات چندشکی (PIC)، شاخص نسبت چندشکی (EMR)، شاخص نشانگر (MI)، هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص Fst، جریان ژنی (Nm)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I)

نام آغازگر	تعداد نوار تشکیل شده	محدوده نوارها (جفت باز)	تعداد نوار چندشکل	درصد چندشکی	PIC	EMR	MI	RP	Ht	Hs	Gst	Fst	Nm	Ne	H	I
OP1	۶	۸۰۰-۳۰۰	۶	۱۰۰	۰/۴۲	۶	۲/۵۲	۵/۸۸	۰/۳۸۶	۰/۳۶۵	۰/۰۶۱	۰/۰۵۵	۲۴/۵۹	۱/۶۷	۰/۳۷۶	۰/۵۵۴
OP4	۵	۱۲۰۰-۲۰۰	۵	۱۰۰	۰/۳۸	۵	۱/۹	۴/۶۲	۰/۳۹۳	۰/۳۶۲	۰/۳۷۱	۰/۰۷۹	۲۵/۲۸	۱/۵۱	۰/۳۰۰	۰/۴۰۶
OP5	۳	۱۲۰۰-۵۰۰	۳	۱۰۰	۰/۳۲	۳	۰/۹۶	۲/۵۲	۰/۴۰۶	۰/۳۸۴	۰/۱۸۷	۰/۰۵۴	۷/۴۵	۱/۴۹	۰/۲۷۹	۰/۴۱۲
OP6	۶	۸۰۰-۳۰۰	۶	۱۰۰	۰/۳۲	۶	۱/۹۲	۴/۵۲	۰/۲۵۸	۰/۲۴۴	۰/۰۵۰	۰/۰۵۵	۱۲/۲۵	۱/۲۲	۰/۲۷۰	۰/۴۲۵
OP11	۵	۱۰۰۰-۴۰۰	۵	۱۰۰	۰/۳۵	۵	۱/۷۵	۳/۶۷	۰/۳۱۸	۰/۳۰۴	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۲۳/۶۴	۱/۴۴	۰/۲۶۴	۰/۴۵۵
OP17	۱۰	۸۰۰-۱۰۰	۱۰	۱۰۰	۰/۳۶	۱۰	۳/۶	۹/۸۸	۰/۳۲۷	۰/۳۱۴	۰/۰۴۵	۰/۰۴۰	۳۳۳/۲۱	۱/۵۱	۰/۳۲۳	۰/۴۹۵
OP18	۳	۹۰۰-۱۰۰	۱	۳۳/۳۳	۰/۰۸	۰/۳۳	۰/۰۲	۲/۱۸	۰/۴۸۵	۰/۴۸۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۱۰۰/۵۸	۱/۸۸	۰/۴۷۰	۰/۶۶۳
OP19	۶	۱۱۰۰-۳۰۰	۶	۱۰۰	۰/۴۳	۶	۲/۵۸	۴/۶۲	۰/۳۳۱	۰/۳۲۷	۰/۲۲۳	۰/۰۱۳	۲۵۶/۰۴	۱/۴۱	۰/۳۲۳	۰/۵۰۰
میانگین	-	-	-	۹۵/۸۳	۰/۳۳	۵/۱۶	۱/۹۰	۴/۱۱	۰/۳۶۳	۰/۳۴۱	۰/۱۲۳	۰/۰۴۳	۹۷/۸۸	۱/۵۱	۰/۳۲۵	۰/۴۸۸
ISSR32	۴	۶۰۰-۱۰۰	۳	۷۵	۰/۲۸	۱/۱۲	۰/۳۱	۳/۸۹	۰/۳۹۲	۰/۳۰۹	۰/۲۰۸	۰/۲۱۲	۰/۳۰۷	۱/۷۰	۰/۴۰۳	۰/۵۹۱
ISSR7	۴	۷۰۰-۵۰۰	۳	۷۵	۰/۲۷	۱/۱۲	۰/۳۰	۲/۴۶	۰/۲۰۰	۰/۱۹۱	۰/۰۴۳	۰/۰۴۵	۶۶/۳۵	۱/۳۰	۰/۳۴۹	۰/۳۸۷
ISSR11	۳	۱۱۰۰-۶۰۰	۳	۱۰۰	۰/۳۱	۳	۰/۹۳	۳/۱۵	۰/۳۴۷	۰/۳۱۹	۰/۰۶۸	۰/۰۸۱	۸/۱۸	۱/۶۹	۰/۳۶۴	۰/۵۲۹
ISSR33	۶	۷۰۰-۲۰۰	۴	۶۶/۶۶	۰/۲۹	۲/۶۶	۰/۷۷	۶/۵۲	۰/۴۴۰	۰/۴۱۵	۰/۰۷۲	۰/۰۶۶	۵۰۹/۲۲	۱/۸۴	۰/۴۵۵	۰/۶۴۷
ISSR69	۴	۷۰۰-۲۰۰	۴	۱۰۰	۰/۳۷	۴	۱/۴۸	۴/۸۳	۰/۴۱۰	۰/۳۸۲	۰/۰۷۸	۰/۰۶۹	۲۱/۲۶	۱/۷۱	۰/۴۰۹	۰/۵۹۷
میانگین	-	-	-	۸۳/۳۳	۰/۳۰	۲/۳۸	۰/۷۵	۴/۱۷	۰/۳۷۵	۰/۳۲۳	۰/۰۹۳	۰/۰۹۴	۳۲۱/۰۶	۱/۶۴	۰/۳۹۶	۰/۵۵۰

ISSR7 با ۰/۱۹۱ به خود اختصاص دادند. بیشترین Gst مربوط به آغازگر ISSR32 با ۰/۲۰۸ و کمترین آن مربوط به آغازگر ISSR7 با ۰/۰۴۳ بود. بیشترین و کمترین میزان Fst به ترتیب برای آغازگر ISSR32 با ۰/۲۱۲ و آغازگر ISSR7 با ۰/۰۴۵ بود. بیشترین میزان Nm را آغازگر ISSR33 با ۵۰۲/۲۲ و کمترین میزان Nm را آغازگر ISSR32 با ۰/۳۰۷ داشت (جدول ۳). در بررسی پارامترهای محاسبه شده به کمک تجزیه نی برای نشانگر ISSR میانگین تعداد آللهای مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I) به ترتیب ۱/۶۴، ۰/۳۹۶ و ۰/۵۵۰ محاسبه گردید. بیشترین تعداد آل مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون توسط نشانگر ISSR33 (۱/۸۴، ۰/۴۵۵ و ۰/۶۴۷) محاسبه شد. کمترین مقدار Ne، H و I مربوط به نشانگر ISSR7 و به ترتیب با مقدارهای ۱/۳۰، ۰/۳۴۹ و ۰/۳۸۷ برآورد گردید (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی برای اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR نشان داد که درصد واریانس مربوط به درون گروه‌ها به ترتیب ۹۱ و ۹۴ بود (جدول ۴). نتایج نشان داد که تنوع بین گروه‌ها (دامی و زراعی) از تنوع درون گروهی کمتر است و شباهت زیادی بین گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد.

یکی از مهمترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1973) است. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۲۶۴ تا ۰/۴۷۰ متغیر بود. میانگین تنوع ژنی برای آغازگرهای RAPD حدود ۰/۳۲۵ بود. ضریب شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌هاست (Shannon, 1948). میانگین ضریب شانون نیز ۰/۴۸۸ برآورد گردید. یکی دیگر از شاخص‌های مهم برای تنوع ژنتیکی، تعداد آلل تشخیص داده شده در هر جایگاه برای نمونه‌های مورد بررسی است. میانگین تعداد آللهای مؤثر (Ne) ۱/۵۱ محاسبه گردید. بیشترین تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون توسط آغازگر OP18 (به ترتیب ۱/۸۸، ۰/۴۷۰ و ۰/۶۶۳) محاسبه شد. کمترین مقدار Ne مربوط به آغازگر OP6 با ۱/۲۲، کمترین مقدار H مربوط به آغازگر OP11 با ۰/۲۶۴ و کمترین مقدار I مربوط به آغازگر OP4 با ۰/۴۰۶ برآورد گردید (جدول ۳).

برای آغازگرهای ISSR، مقادیر Ht، Hs، Gst، Fst و Nm به ترتیب برابر ۰/۳۷۵، ۰/۳۲۳، ۰/۰۹۳، ۰/۰۹۴ و ۳۲۱/۰۶ بدست آمد. بیشترین و کمترین میزان Ht بدر آغازگرهای ISSR33 (۰/۴۴) و ISSR7 (۰/۲۰) مشاهده شد. بیشترین و کمترین Hs را به ترتیب آغازگرهای ISSR33 با ۰/۴۱۵ و

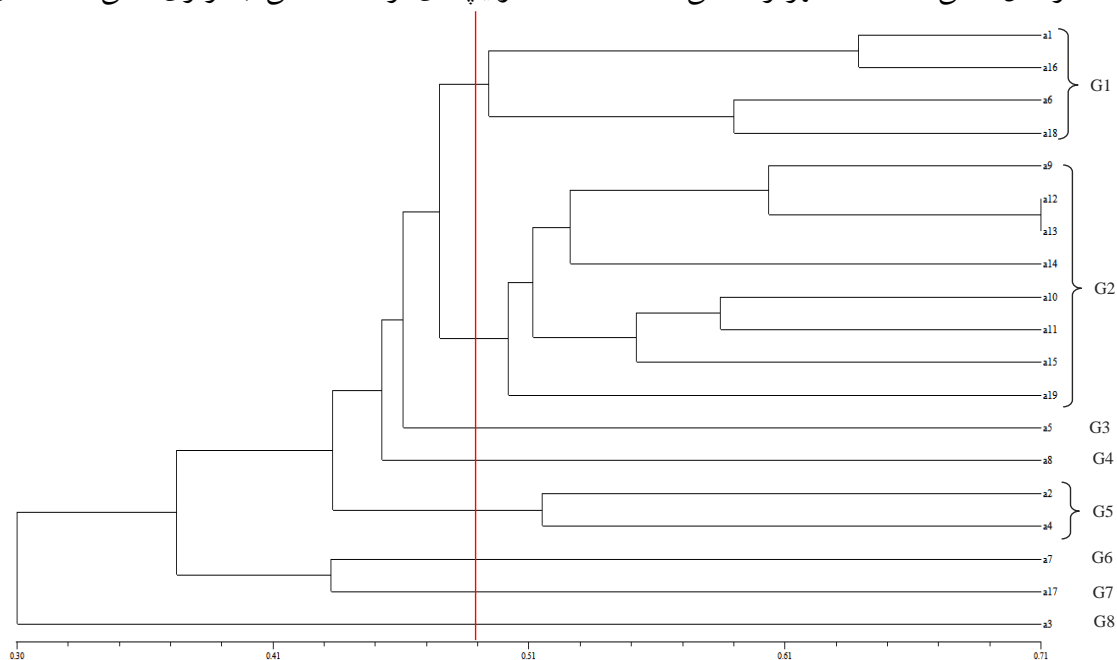
جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای ۱۹ اکوتیپ جاشیر براساس تیپ زراعی و دامی با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	آماره Phi PT	P-Value
RAPD						
بین جمعیت	۱	۱۳/۷۴۷	۱۳/۷۴۷	۹	۰/۰۹۳	۰/۰۱
درون جمعیت	۱۸	۱۳۳/۲۰	۷/۸۳۵	۹۱		
کل	۱۹	۱۴۶/۹۴۷				
ISSR						
بین جمعیت	۱	۴/۹۶۱	۴/۹۶۱	۶	۰/۱۴۰	۰/۰۶۲
درون جمعیت	۱۸	۵۶/۸۲۹	۳/۳۴۳	۹۴		
کل	۱۹	۶۱/۷۸۹				

نتایج تجزیه خوشه‌ای

در این مطالعه، ضریب کوفنتیک بر اساس J , SM , $DICE$ و $UV1$ در دو سیستم نشانگر $RAPD$ و $ISSR$ محاسبه شد. در همه الگوریتم‌های مورد بررسی، ماتریس تشابه مربوط به ضریب جاکارد مطابقت بیشتری با دندروگرام داشت. ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم $UPGMA$ به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک ($r=0/90$) به‌عنوان بهترین الگوی خوشه‌بندی انتخاب شدند که نشان‌دهنده برازش مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های ادغام شده هردو نشانگر، ۱۹ اکتیپ جاشیر را در ۸ گروه تقسیم‌بندی کرد. گروه اول شامل چهار اکتیپ بود که در دو زیرگروه طبقه‌بندی شد. در زیرگروه اول دو اکتیپ $A1$ (آسپاس) و $A16$ (لرستان)، هردو با مصرف دامی و در زیرگروه دوم دو اکتیپ $A6$ (اقلید) و $A18$ (یاسوج) قرار گرفتند. در گروه دوم، هشت اکتیپ شامل $A9$ (فارس-دامی)، $A12$ (کرمانشاه-دامی)، $A13$ (فارس-دامی)، $A14$ (لردگان-دامی)، $A10$ (شهرکرد-دامی)، $A11$

(اصفهان-دامی) در یک زیرگروه و $A15$ (لردگان-زراعی) و $A19$ (یاسوج-زراعی) نیز در زیرگروه‌های دیگر قرار داشتند. اکتیپ $A5$ (بروجن-دامی)، $A8$ (فارس-دامی)، $A7$ (خراسان شمالی-زراعی)، $A17$ (اراک-دامی) و $A3$ (اصفهان-دامی) هر یک جداگانه در یک گروه قرار گرفتند. اکتیپ‌های $A2$ (فارس-زراعی) و $A4$ (الیگودرز-دامی) در گروه پنجم قرار داشتند. با توجه به فاصله جغرافیایی، نوع مصرف (دامی، زراعی) و داده‌های مولکولی، نتایج تجزیه خوشه‌ای حکایت از عدم تطابق الگوی تنوع اکتیپ‌های جاشیر با مکان جغرافیایی و نوع مصرف آنها داشت (شکل ۲). با توجه به نتایج بدست‌آمده از ماتریس تشابه بر اساس آغازگرهای $RAPD$ و $ISSR$ ، دامنه تشابه اکتیپ‌های جاشیر بین $0/92-0/10$ درصد برآورد گردید. بیشترین تشابه مربوط به اکتیپ شهرکرد (دامی) و کوه بل-اقلید (دامی) با $0/92$ درصد بود. کمترین درصد تشابه ($0/10$) را اکتیپ خرم‌بید با مرکزی نشان دادند که هر دو از نوع دامی بودند. همچنین درصد تشابه اکتیپ‌های کرمانشاه (دامی) با مرکزی (دامی) $0/14$ درصد بود.



شکل ۲- دندروگرام بدست‌آمده از ۱۹ اکتیپ جاشیر با استفاده از نشانگر $RAPD$ و $ISSR$

بحث

در این تحقیق، تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD و ISSR در میان اکوتیپ‌های جاشیر، وجود تنوع ژنتیکی بالا را نشان داد. درصد بالای چندشکلی نشانگرهای مورد مطالعه در این آزمایش نشان‌دهنده قدرت بالای نشانگرها و همچنین تنوع زیاد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بررسی‌های مولکولی می‌باشد. از سوی دیگر با شناسایی نقاط چندشکل می‌توان گروه‌بندی افراد را به صورت صحیح‌تری انجام داد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه آغازگرها و نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای آن دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد. از سویی شاخص قدرت تفکیک (RP) بهترین شاخص انتخاب آغازگر مناسب می‌باشد، زیرا هم تعداد افراد دارای نوار و هم تعداد آلل را در نظر می‌گیرد (Altıntas et al., 2008). با در نظر گرفتن این دو شاخص مناسبترین آغازگرها برای بررسی‌های تنوع ژنتیکی گیاه جاشیر، آغازگرهای OP1، OP4، OP17 و OP19 بودند. براساس PIC و RP، در بین این نشانگرهای استفاده شده، آغازگر شماره OP18 حاوی اطلاعات سودمند اندکی بود. آغازگرهای ISSR مورد استفاده، PIC بین ۰/۳۷-۰/۲۷ داشتند که بیانگر این است که این آغازگرها حاوی اطلاعات سودمندی بوده و پراکندگی مناسبی در ژنوم جمعیت مورد بررسی دارند. به عبارت دیگر دارای توالی‌های مکمل مکان‌هایی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند که این توالی‌ها در ژنوتیپ‌ها تغییرات دارند، زیرا پس از تکثیر چندشکلی نشان دادند. مقادیر PIC در نشانگرهای نیز دلالت بر چندشکلی قابل قبول در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز اکوتیپ‌ها مؤثر می‌باشد. همچنین میانگین بالاتر شاخص‌های (۰/۳۳) PIC، (۵/۱۶) EMR و (۱/۹۰) MI در نشانگر RAPD نسبت به نشانگر ISSR نشان‌دهنده قدرت تفکیک خوب این نشانگر می‌باشد.

در این تحقیق میانگین ضریب تشابه (جاکارد) بین اکوتیپ‌ها برابر ۰/۵۲ بود. البته پایین بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های جاشیر مورد بررسی بر اساس آغازگرهای به کار رفته می‌باشد. Esfandyari و همکاران (۲۰۱۷) ضریب تشابه ۰/۵۰۵ را برای اکوتیپ‌های مریم نخودی با استفاده از آغازگرهای ISSR گزارش کردند. در مجموع، با توجه به پارامترهای ژنتیکی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه بر روی اکوتیپ‌های جاشیر، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جاشیر مناسب بوده و توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان دهد. البته گزارش‌های مشابهی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی جاشیر با نشانگرهای مولکولی وجود ندارد و گزارش‌های کمی در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جاشیر موجود است. Nasiri و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی ۱۹ جمعیت از چهار گونه جاشیر *P. asperula*، *P. uloptera*، *P. ferulacea*، *P. acaulic* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شمال غرب ایران را از نظر خصوصیات فیتوشیمیایی مورد مطالعه قرار دادند. آنان براساس نتایج خوشه‌بندی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تنوع فیتوشیمیایی بالایی را در جمعیت‌های مختلف جاشیر جمع‌آوری شده در نقاط مختلف شمال غرب ایران گزارش کردند. Pejman Mehr و همکاران (۲۰۰۹) نیز تنوع بالای ژنتیکی را بین ۲۰ اکوتیپ زیره پاریسی از نواحی مختلف ایران با نشانگرهای RAPD و AFLP گزارش کردند. Bibak و Aghaabbasi (۲۰۱۸) تنوع ژنتیکی اکوتیپ آویشن شیرازی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مورد بررسی قرار دادند. آنان با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA توانستند ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده آویشن شیرازی را به سه گروه تقسیم‌بندی نمایند. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای در این آزمایش، اکوتیپ‌های جاشیر در هشت گروه قرار گرفتند. نتایج تجزیه

دگرگشن باشد (Bohonak, 1999). در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه براساس سه نشانگر مولکولی ISSR، IRAP و SCoT به ترتیب جریان ژنی ۱/۴۳، ۱/۱۲ و ۱/۱۵ گزارش شد که بیانگر تبادل مطلوب ژنها بین جمعیت‌های بنه مورد مطالعه بود (Shah-Ghobadi et al., 2018).

به‌طورکلی، با توجه به تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت جاشیر، حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود. در گیاهان دارویی مانند جاشیر، عامل اصلی تهدیدکننده بقاء و پایداری گونه، دخالت انسان در بهره‌برداری‌های بیش از حد از رویشگاه‌های طبیعی، چرای بی‌رویه دام‌ها و برداشت علوفه، تخریب زیستگاه و درصد پایین جوانه‌زنی بذر و استقرار موفق گیاهچه در این گونه می‌باشد. از این رو حفظ و نگهداری خارج از محل و ایجاد بانک ژرم‌پلاسم و تکثیر این گیاه نیز توصیه می‌شود. علاوه بر آن، اطلاعات حاصل از این مطالعه که اولین گزارش از کاربرد نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه جاشیر در ایران است، می‌تواند مکملی برای مطالعات مورفولوژیکی و برنامه‌های به‌تازدی آینده باشد. بنابراین می‌توان از این تنوع در جهت اصلاح گیاه جاشیر و تولید ارقام زراعی برتر از نظر خصوصیات کمی و کیفی این گیاه با ارزش دارویی، مرتعی و تغذیه‌ای و همچنین حفظ ذخایر ژنتیکی در بانک‌های بذر و کتابخانه‌های ژنی بهره جست.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Kafi, M., Sefidkon, F. and Shafaroudi, S.M., 2015. Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal plant Nowruzak (*Salvia leritifolia*) using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1), 1-12. (In persian).
- Altıntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Zkan, H.O., 2008. Estimating Genetic Diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL markers. Plant

واریانس مولکولی نیز تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها را نشان داد. اگرچه این نشانگرها به خوبی توانستند تفاوت ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها را آشکار کنند، اما پراکنش اکوتیپ‌ها براساس تنوع ژنتیکی با فاصله جغرافیایی و نوع مصرف مطابقت نداشت. Ahmadi و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی نوروژک با استفاده از آغازگرهای ISSR، اگرچه تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند، اما بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و پراکنده بودن ژنوتیپ‌های مختلف یک جمعیت در بین ژنوتیپ‌های سایر جمعیت‌ها، عدم تطابق فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها با فاصله جغرافیایی موجود را در رویشگاه‌های طبیعی نوروژک گزارش کردند. در این مطالعه اکوتیپ‌های A3 (اصفهان-دامی)، A17 (اراک-دامی)، A7 (خراسان شمالی-زراعی)، A8 (خرم‌بید-دامی) و A5 (گندمان-دامی) به صورت تکی در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. به‌طورکلی تنوع بین اکوتیپ‌های مختلف از نوع مصرف دامی و زراعی نیز تبعیت نمی‌کند. این عدم تطابق می‌تواند به دلیل سیستم گرده‌افشانی، جریان ژنی یا جابجایی ژرم‌پلاسم باشد. گیاهان دگرگشن مانند جاشیر در مقایسه با گیاهان خودگشن یا گیاهان با تکثیر رویشی از تنوع بیشتری برخوردار هستند. Rezaie و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی گیاه یونجه را با استفاده از نشانگر ریزوماهواره مطالعه نمودند. آنان تنوع زیاد در جمعیت‌های یونجه را نتیجه دگرگشن بودن گیاه یونجه، فعالیت حشرات گرده‌افشان و انتقال دانه گرده بین ارقام پیشنهاد کردند. جریان ژن بین جوامع با استفاده از تمامی آغازگرهای مورد مطالعه در این تحقیق بالا بود. متوسط میزان جریان ژنی برآورد شده براساس نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۹۷/۸ و ۳۲۱ برآورد شد که نشان‌دهنده میزان بالای مهاجرت در این گیاه است. جریان ژنی از طریق پخش شدن دانه گرده و بذر اتفاق می‌افتد. پایین بودن واگرایی ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از جریان ژنی در گونه‌های گیاهی

- Markers and Their Application in Plant Biotechnology. In: Shahzad, A., Sharma, S., Siddiqui, S.A. (Eds.), *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer International Publishing, Cham, pp. 389-413.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E., 1991. DNA Markers in Plant Improvement. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 39-90.
- Pejman Mehr, M., Hassani, M.E., Fakhr Tabatabaai, S.M., 2009. An evaluation of genetic diversity in some populations of plack Cummin (*Bunium persicum*) using RAPD markers. *Iranian Journal of Horticultural Science* 39, 57-65. (In persian).
- Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter* 15, 8-15.
- Powell, W., Morgante M., Ander C., Hanafey M., Vogel J., Tingy S., Rafalaski A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2, 225-238.
- Razavi, S.M., Hajiboland, R., 2009. Dormancy breaking and germination of *Prangos ferulacea* seeds. *Journal of Biosciences (EurAsian)* 3, 78-83.
- Rezaie, M., Naghavi M. R., and Maali-Amiri R., 2010. Assessment of genetic diversity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 12(4), 520-532. (In persian).
- Sajjadi, S., Shokohinia, Y., Gholamzadeh, S., Behbahani, M., Fattahi, A., 2012. Antiviral evaluation of coumarins from *Prangos ferulacea* L.(Lindl). *Research in Pharmaceutical Sciences* 7(5), 783.
- Shah-Ghobadi, H., Shabani, N., Khadivi, A., Rahmani, M., 2018. Analysis of genetic diversity of *Pistacia atlantica* Desf. populations from Zagros forests using ISSR, IRAP and SCoT molecular markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 26(2), 177-195. (In persian).
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell system technical journal* 27, 379-423.
- Yeh, F. C., Yang R. C., Boyle T., 1999. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, Unersivity of Alberta, Canada*.
- Breeding, 127, 9-14.
- Amiri, H., 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. *Journal of Medicinal Plants* 1, 36-41.
- Bibak, H., Aghaabbasi, K., 2018. Assessment of genetic diversity of *Zataria multiflora* ecotypes by RAPD and ISSR. *Scientific Journal Management System* 26, 101-113.
- Bohonak, A.J., 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74:21-45.
- Coşkun, B., Gülşen, N., Umucalılar, H.D., 2004. The nutritive value of *Prangos ferulacea*. *Grass and Forage Science* 59, 15-19.
- Emamghoreishi, M., Taghavi, A., Javidnia, K., 2012. The effect of aqueous and methanolic extracts of *Prangos ferulacea* on formalin-induced pain in mice. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 9, 2-7. (In persian).
- Esfandyari, S., Farshadfar, M., Safari, H. and Shirvani, H., 2017. Genetic variability of *Teucrium polium* ecotypes using ISSR molecular markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(1), 135-147. (In persian).
- Hasani, J. and Shahmoradi, A., 2007. Autecology of *Prangos ferulacea* in kurdistan province. *Iranian Journal of Range and Desert Research* 14, 171-184.
- Kafash Farkhad, N., Farokhi, F., Tukmacki, A., Soltani band, K., 2012. Hydro-alcoholic extract of the root of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl can improve serum glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2, 179-187.
- Kafash-Farkhad, N., Asadi-Samani, M., Rafieian-Kopaei, M., 2013. A review on phytochemistry and pharmacological effects of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. *Life Science Journal* 10, 360-367.
- Mozaffarian, V., 1996. A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser press 396 p, Tehran, Iran, (In persian).
- Nasiri, Z., Farokhzad, A.R., Fattahi, M., 2018. Evaluation of distribution, phytochemical diversity and essential oil content of different populations of four *Prangos* species in north-west of Iran. *Scientific Journal Management System* 34, 478-491.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 3321-3323.
- Parveen, S., Shahzad, A., Yadav, V., 2016. Molecular

Evaluation of genetic diversity of *Prangos ferulacea* ecotypes using RAPD and ISSR molecular markers

M. Moradi¹, A. Izanloo^{2*} and M. Zabet³

1- M.Sc. Graduated Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R.Iran.

2*- Corresponding author, Assist. Prof., Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran, Email: a.izanloo@birjand.ac.ir

3- Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R.Iran.

Received: 26.06.2019

Accepted: 21.12.2019

Abstract

Prangos ferulacea L. is a member of the Apiaceae family. Considering the importance of this, industrial and forage plant, it is necessary to study the genetic diversity and determine the affinities of its different species. In this study, the genetic diversity of 19 ecotypes of *Prangos ferulacea* collected from different regions of Iran was investigated using ISSR and RAPD markers. Five ISSR and eight RAPD primers were used to investigate the genetic diversity of the ecotypes. The RAPD primers showed a total of 44 scoreable bands from which 42 bands were polymorphic. Seven RAPD primers revealed 100% polymorphism. Out of the 21 scoreable bands produced by the ISSR primers, 18 bands were polymorphic. The mean values of PIC for RAPD and ISSR markers were 0.330 and 0.304, respectively. The mean value of Nei's genetic diversity (H) for RAPD and ISSR markers were 0.332 and 0.396, respectively, and Shannon's index (I) for RAPD and ISSR markers were 0.48 and 0.55, respectively. Based on the information obtained from cluster analysis using UPGMA method, the ecotypes were divided into eight groups for the data obtained from two marker systems. Although there was a high genetic diversity among the studied ecotypes, the results of cluster analysis showed that the genetic diversity did not correspond to the geographical variation among the identified groups. In general, studies on *P. ferulacea* ecotypes showed that the RAPD and ISSR molecular markers were suitable for investigating the genetic diversity of this species, and were able to indicate a wide range of genetic diversity.

Keywords: Prangos, variation, polymorphism, molecular markers