



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

صفورا طاهری<sup>۱\*</sup>، محمد ضابط<sup>۲</sup>، علی ایزانلو<sup>۳</sup>، علی ایزدی دربندی<sup>۳</sup>

- 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: ۱۳۹۴/۰۱/۲۱

### چکیده

رازیانه بعنوان یک گیاه معطر و دارویی از زمان‌های بسیار دور توسط کشاورزان در مناطق مختلف ایران با اقلیم‌های 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 ۱۰۶ قطعه چند شکل و توسط نشانگر ISSR، ۷۲ قطعه چند شکل تکثیر شد. با توجه به داده‌های آغازگر RAPD و ISSR میانگین تنوع ژنی با استفاده از شاخص نی (h) برابر با ۰/۳۷۳۹ و ۰/۲۹۴۴ و با استفاده از شاخص اطلاعاتی شانون (i) برابر ۰/۵۵۲ و ۰/۴۵۶۳ بدست آمد. میانگین محتوای چندشکلی (PIC) بدست آمده برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۴۲۷۴ و ۰/۴۱۹۲ 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 نشانگرهای RAPD 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 اکوتیپ‌های دور، مطالعات تکاملی و طبقه‌بندی یاری نماید.

واژه‌های کلیدی: آلل‌های موثر، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی.

مقدمه

نمونه‌های ژرم پلاسماست که این موضوع به نوبه خود نمونه‌گیری سیستماتیک از ژرم پلاسما را برای مقاصد اصلاحی و حفاظتی امکانپذیر می‌سازد (Hasani et al., 2011). به منظور حفظ، ارزیابی و استفاده از ژرم پلاسما کارآمد و موثر برای بازده و ایجاد ثبات تولید در هنگام مواجهه 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 مبتنی بر 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. به طوری 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

رازبانه با نام علمی *Foeniculum vulgare*. Mill متعلق به خانواده چتریان<sup>۱</sup> 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). ژرم پلاسما 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). رازبانه 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 ژرم پلاسما و نمونه‌گیری موثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. اولین قدم در اصلاح خصوصیات گیاهی، شناخت خصوصیات ژنتیکی

<sup>1</sup> Apiaceae

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 گزارش 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.

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 به نظر می‌رسد که تفاوت‌هایی از نظر 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 ۲۴ نشانگر باندهای واضحی تولید کردند. نتایج آنها نشان داد که در بین این ۵۰ نمونه از لحاظ ژنتیکی تفاوت‌های زیادی وجود داشت؛ این نشانگرها ۴۸ 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

جدول ۱- منشأ ۳۲ اکوتیپ رازیانه از مناطق مختلف کشور.

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

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

قبلی سانتریفیوژ گردیدند. فاز بالایی تیوپ‌ها به تیوپ‌های جدید حاوی ۶۰ میکرولیتر استات سدیم با pH=8 و ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد منتقل و آن‌ها را به مدت ۲ دقیقه سروته تا کلاف DNA ظاهر شود. نمونه‌ها در ۴۰۰۰ دور به مدت 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 به مدت 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.

از هر نمونه ۲-۳ گرم برگ در حضور ازت مایع پودر و برگ‌های پودر شده به تیوپ‌های ۲ میلی لیتری حاوی ۶۰۰ میکرولیتر 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 (۶۰-۵۰ درجه) انکوبه شد. پس از سرد نمودن نمونه‌ها، ۶۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنول:کلروفرم به تیوپ‌ها اضافه شد. نمونه‌ها مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به تیوپ جدید حاوی ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل (بترتیب به نسبت ۲۴ به ۱) منتقل و به آرامی مخلوط گردیدند و طبق شرایط

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 ۶ آغازگر ISSR (نشانگرها از شرکت دنازیست تهیه گردید) استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲ - مشخصات آغازگرهای ISSR و RAPD

Table 2- ISSR and RAPD primers profile.

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

حرارتی PCR برای نشانگر RAPD شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و در ۴۲ مرحله بعدی واسرشت سازی در ۹۴ 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

چرخه حرارتی PCR برای نشانگر ISSR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و ۴۲ مرحله بعدی واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت، مرحله اتصال در دمای مناسب آغازگر (۵۳-۴۷ درجه سانتیگراد) به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله بسط نهایی جهت تکمیل رشته های دوتایی DNA در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه

محتویات هر لوله ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه گردید و ۱۰ میکرولیتر از محصول حاصله در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۸٪ که حاوی ۴ میکرولیتر اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی بود، ریخته شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت با جریان ۸۰ ولت الکتروفورز شدند و سپس توسط دستگاه ژل داگ 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.

نتایج و بحث

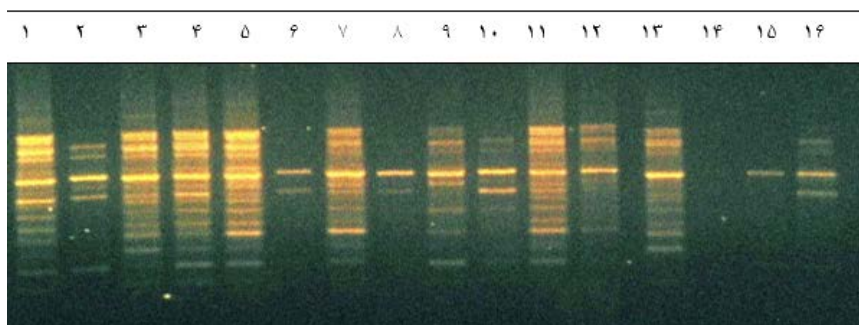
با استفاده از روش استخراج DNA مناسب و شرایط چرخه حرارتی کارآمد باندهای واضحی توسط نشانگر RAPD تکثیر یافت که در شکل ۱ الگوی تکثیر یافته توسط نشانگر شماره ۷ نشان داده شد. نشانگرهای بدست آمده از ۳۲ اکوتیپ

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<sup>۱</sup> (GD) یا شباهت ژنتیکی<sup>۲</sup> (GS) با استفاده از ضریب نی و لی<sup>۳</sup> (GD<sub>NL</sub>) محاسبه شد (Nei, 1987). تعداد آلل‌های 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

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

چند، حاصل از آزمایش آغازگرهای RAPD بر روی تک بوته‌های اکوتیپ‌های رازیانه در این آزمایش، از ۶ تا ۱۷ باند متغیر بود.

رازیانه با استفاده از ۹ نشانگر RAPD چندشکلی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. تعداد باندهای ایجاد شده توسط نشانگرهای RAPD برای ۳۲ اکوتیپ رازیانه ۱۲۶۷ قطعه بود. تعداد باندهای

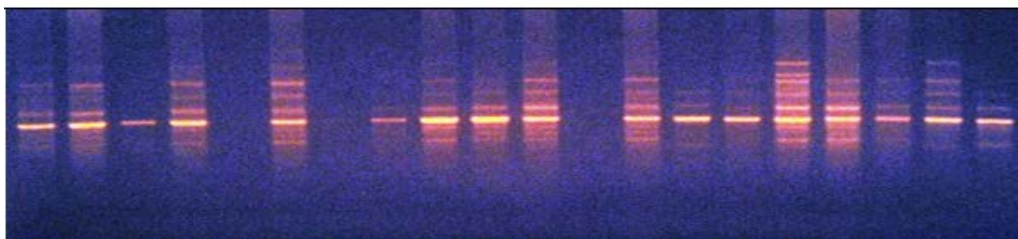


شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده توسط نشانگر RAPD (شماره ۷).

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

هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs) و ضریب تنوع بین جمعیت‌ها (Gst) برای داده‌های بدست آمده از آغازگر RAPD به ترتیب ۰/۳۷۶۴، ۰/۳۶۸ 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 ۶ در شکل ۲ نشان داده شده است. با بررسی انجام شده بیشترین قطعات تکثیر شده توسط نشانگر شماره ۶ (5'-(AG)<sub>8</sub>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.

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 ۱۰۴ قطعه چندشکل در گروه دوم (۸۹/۱۱ درصد) ایجاد شد و در مجموع ۱۰۶ 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، ۴۸ درصد چند شکلی را گزارش دادند. به کمک نشانگر RAPD، Abou El-Nasr et al., (2013) نیز چندشکلی بالایی (۶۸/۴۲ درصد) را در ارقام رازیانه مورد بررسی بدست آوردند. در این مطالعه میزان



شکل ۲- الگوی بانندی تکثیر شده توسط نشانگر ISSR (5'-(AG)<sub>8</sub>T-3').

Figure 2- Banding pattern reproduced by the primer ISSR (5'-(AG)<sub>8</sub>T-3').

ژنتیکی نی (H) توسط نشانگر شماره ۶ ISSR (۲۱/۸۴۳۴، ۰/۳۴۸۳ و ۰/۵۲۸۸) برآورد گردید. نشانگر شماره ۷ RAPD بیشترین تعداد آلل موثر (۲۸/۰۹۹۹) و شماره ۴ این نشانگر بیشترین شاخص اطلاعات شانون و تنوع ژنتیکی نی (۰/۶۸۴۵، ۰/۴۹۱۴) را بدست آورد. میانگین تنوع ژنتیکی نی، شاخص اطلاعات شانون و آلل موثر به ترتیب برای نشانگرهای RAPD ، ۰/۳۷۳۹، ۰/۵۵۲ و ۱/۴۸۸۰ بدست آمد و برای نشانگرهای ISSR پارامترهای ذکر شده به ترتیب ۰/۲۹۴۴، ۰/۴۶۳ و ۱/۴۶۷۲ محاسبه گردید (جدول ۳). در بررسی تنوع و تفرق ژنتیکی برخی از جمعیت‌های زیره پاریسی 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، ۰/۲۱۴ و ۰/۳۰۸ درصد بدست آوردند و برای نشانگر RAPD نیز به ترتیب ۰/۱۷۸ و ۰/۲۶۶ درصد بدست آوردند.

باتوجه به اطلاعات بدست آمده از نشانگر ISSR، گروه یک شامل ۷۰ قطعه چندشکل (۹۷/۲۲ درصد) و گروه دوم ۶۴ 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 ۰/۲۸۷۳، ۰/۲۹۲۸ و ۰/۱۸۷ بدست آمد، همچنین شاخص Fst برای این آغازگر برابر ۰/۰۱۹ برآورد شد. میزان بالای چند شکلی بدست آمده در الگوهای بانندی 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<sub>ST</sub> 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



با پیروی از قانون هاردی-وینبرگ، توزیع آلی درون جمعیت‌های مورد مطالعه نسبتاً برابر است و جمعیت‌ها از نظر فراوانی آلی دارای توزیع متعادل هستند.

میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها و میانگین تشابه ژنتیکی براساس آنالیز تطابق ساده براساس الگوهای RAPD، به ترتیب ۰/۴۲ و ۰/۵۸ بدست آمد. با توجه داده‌های ISSR میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها و میانگین تشابه ژنتیکی براساس آنالیز جاکارد برابر ۰/۳۴ و ۰/۶۶ برآورد شد. در بررسی انجام داده بر روی رازیانه به کمک نشانگر RAPD، Groveri et al., (2011) میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها 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 - ۰/۵۸ درصد برآورد کردند.

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 ۶ (۰/۴۶۸۸۴۹) و (۰/۲۷۶۷۸۹) و برای نشانگر ISSR، ۶ و ۲ (۰/۵۴۷۹۴۶) و (۰/۳۶۲۹۸۲۵) بودند. میانگین محتوای چندشکلی (PIC<sup>1</sup>) بدست آمده برای نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۴۲۷۴ و ۰/۴۱۹۲ برآورد گردید. با بررسی نتایج بدست آمده از هر دو نشانگر RAPD و ISSR بیشترین میزان تعداد آل‌های 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 تغییرآل‌های موثر و آل‌های مشاهده شده نشان دهنده توزیع نسبتاً برابر آل‌ها در بین جمعیت‌ها است و این که جمعیت‌ها تقریباً در سطح یکنواختی از توزیع آلی 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، آل‌های موثر یعنی نسبت آل‌هایی که فراوانی برابر دارند به کل آل‌ها برای نشانگر RAPD بالای ۸۰ درصد و برای نشانگر ISSR بالای ۷۰ درصد می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که

<sup>1</sup> Polymorphic Information Content

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.

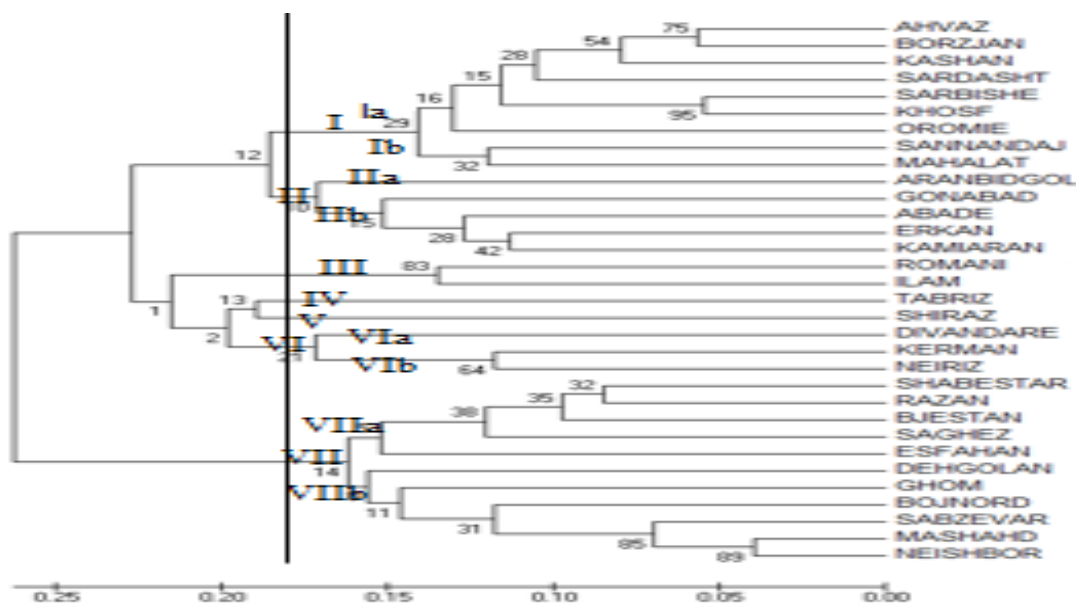
PIC	I	H	Ne	Na	شماره	نشانگر
					Number primer	Primer
0.43532	0.5133	0.3312	21.2751	28	1	RAPD
0.468849	0.5392	0.3542	27.7884	30	2	
0.414923	0.6667	0.4748	19.4539	20	3	
0.43261	0.6845	0.4914	9.4608	12	4	
0.441455	0.3942	0.2323	18.4548	22	5	
0.276789	0.514	0.3318	16.3351	20	6	
0.441404	0.1408	0.0615	28.0999	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	ISSR
0.3629825	0.40278	0.2479	20.4331	30	2	
0.371718	0.4645	0.3108	18.3597	24	3	
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	

بین ۰/۷۳-۰/۷ جای گرفته‌اند. کلاستر شماره سه (III) شامل اکوتیپ‌های رومی و ایلام (ضریب شباهت ۰/۷۳) بود. در کلاستر شماره ۴ (IV) اکوتیپ تبریز و در کلاستر ۵ (V) اکوتیپ شیراز قرار گرفتند. کلاستر ۶ (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، بجنستان، رزن و شبستر) بود که ضریب تشابه بالای بین اکوتیپ‌های موجود در این زیر کلاستر وجود داشت و

در گروه‌بندی انجام شده براساس نشانگرهای RAPD اکوتیپ‌های مورد مطالعه در ۷ گروه قرار گرفتند (شکل ۳). کلاستر یک (I) شامل دو زیر کلاستر (Ia و Ib) می‌باشد که زیر کلاستر 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 زیر کلاستر IIa اکوتیپ آران‌بیدگل قرار گرفته و در زیر کلاستر IIb اکوتیپ‌های گناباد، آباد، اردکان و کامیاران با ضرایب تشابه

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 (شکل ۴). 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.

زیرکلاستر VIIb شامل ۶ اکوتیپ بود. اکوتیپ‌های نیشابور، مشهد، سبزوار، بجنورد، قم و دهگلان با اقلیم مشابه و ضریب تشابه بالا (۰/۷۶-۰/۶۳) 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, 2011; 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



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

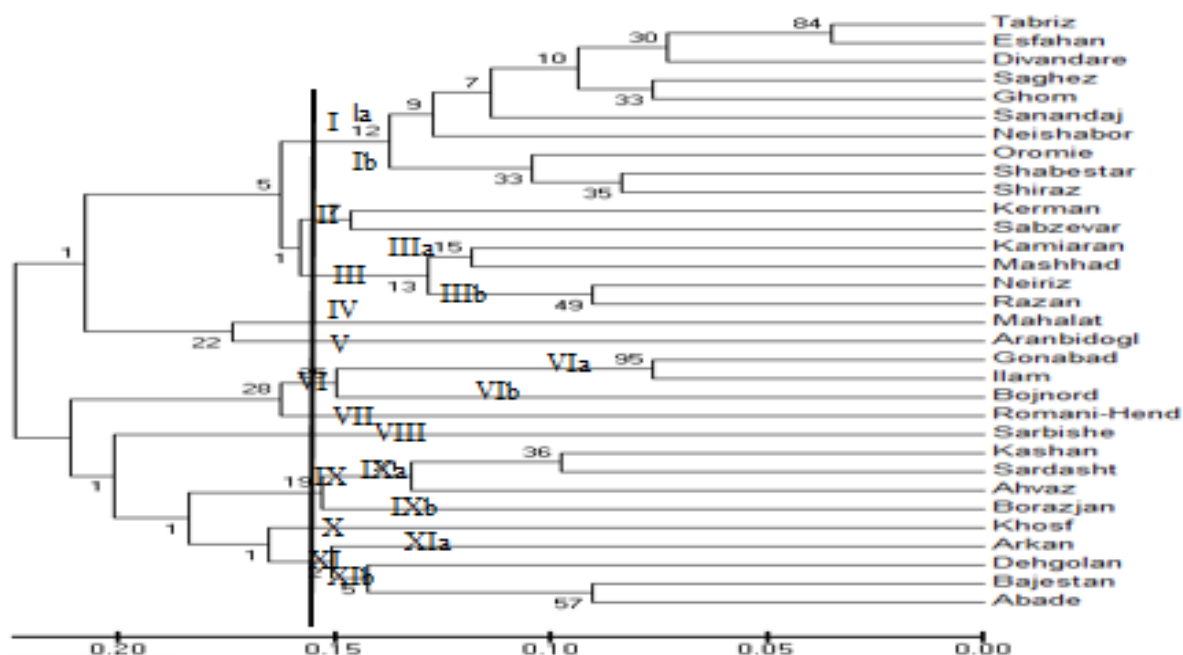
Figure 3- RAPD markers using UPGMA for cluster 32 ecotypes of fennel Iran.

IIIb) می‌باشد. اکوتیپ‌های مشهد و کامیاران با ضریب تشابه ۰/۶ در زیرکلاستر IIIa جای گرفته‌اند. زیرکلاستر IIIb شامل دو اکوتیپ نیریز

اکوتیپ‌های کرمان و سبزوار با ضریب تشابه ۰/۶۳ در کلاستر دو (II) جای گرفته‌اند. کلاستر سه (III) شامل دو زیر کلاستر (IIIa و

تشابه (۰/۷۴) در یک گروه (زیرکلاستر IXa) قرار گرفتند. زیرکلاستر IXb شامل اکوتیپ برازجان بود. اکوتیپ خوسف به تنهایی در کلاستر ۱۰ (X) جای گرفت. کلاستر ۱۱ (XI) شامل دو زیرکلاستر (XIa و XIb) می‌باشد، زیرکلاستر XIb شامل اکوتیپ اردکان بود و اکوتیپ‌های دهگلان، بجستان و آبادیه در زیرکلاستر XIb قرار گرفتند. Abou El-Nasr et al., (2013) در بررسی انجام داده، ارقام رازیانه را در ۲ گروه کلاستر بندی کردند. چنین گروه‌بندی که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا را در رازیانه نشان می‌دهد نیز گزارش شده است (Bahmani et al., 2012; Zahid et al., 2009).

و رزن بود. اکوتیپ محلات در کلاستر ۴ (IV) و آران‌بیدگل در کلاستر ۵ (V) قرار گرفتند. کلاستر ۶ (VI) شامل دو زیرکلاستر (VIa و VIb) بود. در زیرکلاستر VIa تنوع ژنتیکی از فاصله جغرافیایی تبعیت نکرده و اکوتیپ‌هایی با منشاء کاملاً 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 (۰/۶۵) بودند. اکوتیپ بجنورد در زیر کلاستر VIb جای گرفته است. اکوتیپ رومی در کلاستر شماره ۷ (VII) و اکوتیپ سریشه در کلاستر ۸ (VIII) جای گرفتند. کلاستر ۹ (IX) شامل دو زیرکلاستر (IXa و IXb) بود. اکوتیپ‌های کاشان و سردشت با ضریب بالای



شکل ۴- 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.

#### نتیجه گیری

یکنواخت ضروری است. از آنجایی که روش‌های RAPD و ISSR، 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 بهره‌وری ارقام موجود پیشنهاد می‌شود.

همبستگی ماتریس تشابه بدست آمده برای هر دو 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 RAPD و ISSR را برای تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی، فاصله و ارتباط میان ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه تأیید کرد. کسب اطلاعات درمورد شباهت‌های ژنتیکی برای جلوگیری از تبدیل شدن ژرم‌پلاسماهای خوب به ژرم‌پلاسم

- About 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.
- About 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 miniprep: Version ii. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Hasani MH, Torabi S, Omid M, Etmian 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* subsp. *bursensis* using morphological and ISSR markers. Medicinal Plants Research 5: 2413-2423.
- Ghare Yazdi 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, Homae-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.

- Soreni A, Nazeri V, Fatahi Moghdam M.R, Ahadi Dolatsara E (2012). The 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 Indigenous Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Germplasm in Pakistan Assessed by RAPD Markers. Pak. J. Bot 41: 1759-1767.

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

Taheri S.<sup>\*1</sup>, Zabet M.<sup>2</sup>, Izanlo A.<sup>2</sup>, Izadi Darbandi A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.sc student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.

<sup>2</sup>Assistant of professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.

<sup>3</sup>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