دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه دارویی رازیانه (*Fuenículum vulgare*)

فریبا نیک کردار[۱]، محسن فرشادفر[۲]، محمدعلی ابراهیمی[۳] و هومن شیروانی[٤]

۱، ۳ و ۴- کارشناس ارشد، دانشیار و مدرس، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور
۲- دانشیار، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، (نویسنده مسوول: farshadfarmohsen@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۹

چکیده

یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی رازیانه (*Fuenículum vulgare*) می‌باشد که در طب سنتی کاربرد فراوان دارد. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ١٦ توده ایرانی رازیانه تهیه شده از بانک ژن سازمان جنگل‌ها و مراتع با استفاده از ١٥ آغازگر SCoT (Start codon targeted) مورد ارزیابی قرار گرفت. آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ٧٧ باند تولید کنند که از این تعداد، ٤ باند یک‌شکل مشاهده شد. آغازگرهای SC5 و SC29 به‌ترتیب با ١٠ و ٩ باند بیشترین تعداد و آغازگرهای SC10، SC26 و SC44 با ٢ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. شاخص‌های محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه موثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP) برای کلیه نشانگرها محاسبه گردید که با توجه به شاخص‌های محاسبه شده آغازگرهای SC15 و SC63 به‌عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی رازیانه معرفی گردید. میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگرها برابر ٠/٦٦ بود. بیشترین تشابه ژنتیکی در میان توده ٦ (اردبیل ١) با توده‌های ٧ (اردبیل ٢) و ٨ (تهران ١)، و کمترین تشابه را توده ١٥ (قزوین) با ٥ (یزد) داشت. نتایج حاصل از گروهبندی تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد توده‌ها در ٤ گروه قرار داد که بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCo) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گروه‌های حاصل از تجزیه کلاستر تایید گردید بر طبق این گروه‌بندی واریانس بین گروه‌ها در سطح ٥٪ معنی‌دار بود، اما براساس واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروه‌ها تنها ٢٤ درصد از تنوع کل بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مارکر مولکولی، رازیانه، SCoT

مقدمه

کشت گیاهان دارویی و معطر، از دیرباز از جایگاه ویژه‌ای در نظام‌های سنتی کشاورزی ایران برخوردار بوده است و این نظام‌ها از نظر ایجاد تنوع و پایداری، نقش مهمی ایفا می‌کرده‌اند. متاسفانه در سال‌های اخیر، به‌دلیل جایگزین شدن گونه‌های زراعی اصلاح شده دارای عملکرد و ارزش اقتصادی بالا، بسیاری از این گونه‌ها و ارقام بومی و محلی به فراموشی سپرده شده و از سیستم‌های زراعی ایران حذف شده‌اند. بنابراین بررسی وضعیت تولید گیاهان دارویی و معطر و نقش این گیاهان در ایجاد تنوع در بوم نظام‌های زراعی ایران، بسیار مورد اهمیت می‌باشد (۸). رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) گیاهی دگرگشن و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده انسان است. به‌طوری‌که مردم یونان و روم باستان خواص دارویی آن را می‌دانستند و از آن برای درمان برخی بیماری‌ها استفاده می‌کردند. رازیانه از گیاهان دارویی مهم در کشت و صنعت اکثر کشورهای توسعه یافته است. این گیاه در زراعت و صنایع دارویی کشور ما نیز جایگاه مهمی دارد. رازیانه از خانواده چتریان (Apiaceae)، گیاهی افراشته و دائمی است که بومی مدیترانه بوده و در بیشتر مناطق ایران نیز سازگار شده است (۱۸). رازیانه به‌عنوان گیاه دارویی مورد استفاده درطب سنتی و نیز گیاه دارویی موثر در فارماکوپه‌های معتبر جهان به ثبت رسیده است (۱۴). میوه و اسانس رازیانه به‌دلیل دارا بودن آنتول موجب کاهش یا توقف اسپاسم‌های دستگاه گوارش و تشدید ترشح شیرابه‌های گوارشی و در نتیجه بالا رفتن کیفیت هضم می‌گردد. مجموعه این اعمال سبب رفع سوء هاضمه شده و به تبع آن برخی از بی‌خوابی‌ها که در اثر اختلالات فیزیکی دستگاه گوارش حادث شده‌اند، درمان می‌یابند (۱۸). تنوع ژنتیکی مبنای تمام گزینش‌ها است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود (۱۵). یک به‌نژادگر گیاه، در صورتی می‌تواند موفقیت زیادی در برنامه‌های به‌نژادی خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب و تنوع برای او وجود داشته باشد (۱۱). از این جهت شناسایی منابع ژنتیکی اولیه و تلاش در ایجاد ذخایر ژنتیکی با ارزش جدید می‌تواند رهیافت بسیار مهم اصلاحی باشد. تنوع ژنتیکی به‌عنوان ماده اولیه فعالیت‌های اصلاح نباتات است و به‌طورکلی فعالیت‌های انجام شده در مورد تنوع ژنتیکی رازیانه بسیار محدود می‌باشد (۱۹). نشانگرمولکولی SCoT که در برگردان فارسی، کدون‌های آغاز هدف واقع شده، نامیده می‌شود بر اساس توالی‌های آغاز (ATG) پرایمرها طراحی می‌شوند و نواحی بین کدون‌های آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر می‌شود و تفاوت‌ها آشکار می‌شود. پرایمرهای SCoT معمولاً ۱۸-۲۴ نوکلئوتیدی هستند و محتوای C و G آنها ۵۰٪ تا ۷۲٪ است (۷). سیستم این مارکر غالبیت است. دو پرایمر تک رشته‌ای در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به رشته‌های مخالف DNA الگو، در جهت عکس هم متصل می‌شوند. و فاصله بین آنها توسط آنزیم پلیمراز به‌صورت نمایی در واکنش PCR تکثیر می‌شود. چنانچه جهش‌های حذف یا اضافه در محل اتصال پرایمر رخ دهد شاهد عدم اتصال پرایمر و عدم سنتز قطعه DNA خواهیم بود (۳). طول پرایمرها در تکرارپذیری این نشانگر اثر مستقیم دارد، هو و وییک (۶) به مقایسه پرایمرهای ۱۲ نوکلئوتیدی و ۱۸

نوکلئوتیدی و قابلیت تکرارپذیری آنها پرداختند طی نتایج بدست آمده پرایمرهای ۱۸ نوکلئوتیدی قابلیت تکرارپذیری بالایی داشتند. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های ایرانی گیاه دارویی رازیانه و بررسی میزان فاصله توده‌ها جهت برنامه‌های اصلاحی با توجه به اینکه این اطلاعات در انتخاب تلاقی‌های بین والدین اهمیت زیادی دارد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT تعداد ۱۶ توده ایرانی از رازیانه (*Foeniculum vulgare*) که در بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور موجود بود، تهیه گردید. مشخصات مواد ژنتیکی مورد مطالعه، با ذکر کد توده و محل دریافت یا جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- کد بانک ژن و منشأ توده‌های رازیانه مورد بررسی

Table1. Gene bank code and origin of Fennel landrace

شماره	منطقه	کد بانک ژن	شماره	منطقه	کد بانک ژن
۱	مازندران	۱۳۶۶۲	۹	تهران ۲	۱۸۸۷۰
۲	کرمانشاه	۱۴۵۸۴	۱۰	سیستان و بلوچستان	۲۲۰۸۴
۳	لرستان	۱۴۶۵۰	۱۱	هرمزگان ۱	۲۴۴۸۲
۴	مرکزی	۱۴۷۲۶	۱۲	بانک ژن ۱	۲۵۱۹۷
۵	یزد	۱۵۵۱۳	۱۳	هرمزگان ۲	۲۶۸۶۰
۶	اردبیل ۱	۱۸۶۱۵	۱۴	هرمزگان ۳	۲۶۸۶۶
۷	اردبیل ۲	۱۸۶۱۸	۱۵	قزوین	۲۹۶۶۷
۸	تهران ۱	۱۸۸۶۹	۱۶	بانک ژن ۲	۳۰۴۰۶

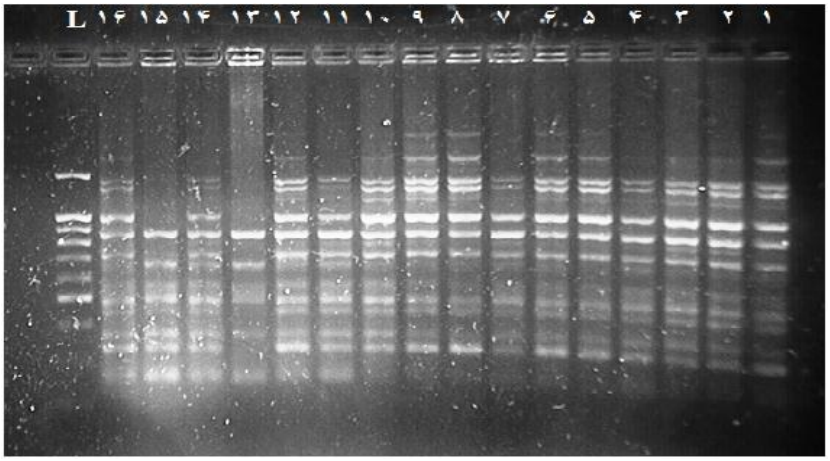
پس از کشت بذور هر توده، استخراج DNA به‌روش (۱۷) و به‌صورت تک بوته برای هر توده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE ۱ درصد استفاده شد. به‌منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به‌DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز لود و با ولتاژ ۱۲۰ و میزان ۲ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برماید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده باندها استفاده شد. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)[1] از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} PI^{2}$ محاسبه شد (۵). همچنین شاخص نشانگری (MI)[2] از رابطه MI= PIC × E بدست آمد (۱۳). شاخص نسبت چندگانه موثر (PMR)[3] از رابطه EMR= NPB × β (۹) و قدرت تفکیک (RP)[4] از رابطه RP=∑IB محاسبه گردید (۱). در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای DARwin 6 و GenAlEx 6.2 داده‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

بررسی چند شکلی نشانگر SCoT

تنوع ژنتیکی توده‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت آغازگرهای SCoT در مجموع توانستند ۷۷ باند تولید کنند که از این تعداد، ۴ باند یک‌شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۶ توده برابر ۴/۸۱ بود. همچنین آغازگرهای SCoT در مجموع تعداد ۷۱۹ مکان را تکثر کردند که میانگین تعداد مکان تکثر شده برای ۱۵ آغازگر برابر ۴۷/۹۳ بود. مهدی‌خانی و همکاران (۱۲) در مطالعه خود روی ۱۶ توده بابونه ایرانی با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی متوسط تعداد نوار برای هر آغازگر نیمه تصادفی را ۱۳/۹۳ نوار گزارش نمودند. در پایان نتیجه گرفتند که آغازگرهای نیمه تصادفی کارآیی بالایی در ایجاد چندشکلی دارند و می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بابونه استفاده شوند. آغازگرهای SC5 و SC29 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند بیشترین تعداد و آغازگرهای SC10، SC26 و SC44 با ۲ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. توده ۳ (لرستان) بیشترین باند (۶۶ باند) و توده‌های ۱۵ (قزوین) و ۱۲ (بانک ژن ۱) کمترین باند (۳۰ باند) را در بین توده‌های مورد بررسی داشتند. شکل ۱، الگوی باندی ۱۶ توده مورد بررسی با استفاده از آغازگر SC5 را نشان می‌دهد. زاهید و همکاران (۱۹) در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه رازیانه با استفاده از مارکر RAPD انجام دادند نتیجه گرفتند که از ۳۰ پرایمر مورد استفاده ۲۴ پرایمر دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد. در این مطالعه مجموعا ۱۴۵ باند واضح تشخیص داده شد که ۷۰ باند (۴۸ درصد) آنها پلی‌مورف بودند.

1- Polymorphic information content
2- Marker Index
3- Effective multiplex ratio
4- Resolving power



شکل ۱- الگوی باندی ۱۶ توده رازیانه با استفاده از آغازگر SCoT5
Figure 1. The band pattern for 16 Fennel landrace using SCoT5 primer

نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چند شکل در بین توده‌های مورد بررسی برابر ۹۶/۰۰ درصد بود که کمترین درصد چند شکلی را آغازگرهای SC36 (۶۰٪)، SC11 (۸۵/۷۱٪) و SC5 (۹۰٪) داشتند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در توده‌های تحت بررسی می‌باشد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۷ بود که بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای SC15، SC44، SC63، SC28 و SC26 بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) توانست فاصله ژنتیکی توده‌ها را مشخص کنند. آغازگرهای SC36 و SC5 با کمترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) توانایی خوبی در جداسازی توده‌ها نداشتند. در مجموع پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهای SC15، SC44، SC63، SC28 و SC26 که شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و درصد چندشکلی بالایی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم دیگر توده‌های رازیانه در تحقیقات بعدی استفاده گردد. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیر پذیری دارد. میانگین شاخص قدرت تفکیک (RP) برابر ۵/۴۷ بود که آغازگرهای SC5، SC15 و SC63 بیشترین میزان و آغازگر SC44، SC10 و SC26 دارای کمترین میزان بودند. همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) به‌ترتیب برابر ۱/۷۵ و ۴/۶۷ بود. بیشترین میزان شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) را آغازگرهای SC5، SC63 و SC15 و کمترین میزان را آغازگرهای SC44، SC10 و SC26 داشتند. در حالت کلی با توجه به کلیه شاخص‌ها آغازگرهای SC15 و SC63 به‌عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی رازیانه معرفی می‌شوند. حسنی و همکاران (۴) با انجام تحقیقی بر روی۳۰ نمونه بذر رازیانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و چندین کشور اروپایی به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم با استفاده از نشانگر مولکولیAFLP نتیجه گرفتند از مجموع ۱۱۲۷ نوار مشاهده شده، ۲۵۰ نوار چند شکلی نشان داده و آغازگر E11-M20 با تعداد ۲۰ باند و آغازگرهای ETG-M20 و E46-M35 با تعداد ۸ باند به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوار چند شکلی را به‌خود اختصاص دادند.

جدول ۲- درصد چند شکلی، تعداد کل باند، محتوای اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه موثر و شاخص قدرت تفکیک در آغازگرهای مورد بررسی

Table 2. Percentage of polymorphism bands, Number of scored bands, polymorphism information content, Marker Index, Effective multiplex ratio, Resolving power in primer this study

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI	EMR	RP
SC36	5'-GCAACAATGGCTACCAC-3'	۵	۳	٪۶۰	۰/۲۴	۰/۴۳	۱/۸۰	۴
SC35	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	۳	۳	٪۱۰۰	۰/۳۰	۰/۹۰	۳	۴/۲۵
SC40	5'-CAATGGCTACCACTACAG-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۴۱	۲/۰۷	۵	۴/۲۵
SC59	5'-ACAATGGCTACCACCATC-3'	۴	۴	٪۱۰۰	۰/۳۹	۱/۵۷	۴	۵
SC44	5'-CAATGGCTACCATTAGCC-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۴۲	۰/۸۵	۲	۲/۷۵
SC63	5'-ACCATGGCTACCACGGG-3'	۹	۹	٪۱۰۰	۰/۴۲	۳/۸۵	۹	۱۰/۶۲
SC28	5'-CCATGGCTACCACCGCC-3'	۳	۳	٪۱۰۰	۰/۴۲	۱/۲۷	۳	۲/۸۷
SC26	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۴۲	۰/۸۴	۲	۲/۷۵
SC20	5'-ACCATGGCTACCACCGC-3'	۷	۷	٪۱۰۰	۰/۴۱	۲/۹۳	۷	۶/۵۰
SC15	5'-CCATGGCTACCACCGGC-3'	۸	۸	٪۱۰۰	۰/۴۴	۳/۵۷	۸	۸/۲۵
SC11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۷	۶	٪۸۵/۷۱	۰/۳۹	۲/۰۱	۵/۱۴	۵/۸۷
SC5	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۱۰	۹	٪۹۰	۰/۲۶	۲/۱۱	۸/۱۰	۱۱/۸۷
SC13	5'-ACGACATGGCGACCATC-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۳۰	۱/۵۲	۵	۵/۵۰
SC21	5'-AACCATGGCTACCACCG-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۳۳	۱/۶۴	۵	۵/۷۵
SC10	5'-CAACAATGGCTACCAGC-3'	۲	۲	٪۱۰۰	۰/۳۶	۰/۷۳	۲	۱/۷۵
میانگین		۵/۱۳	۴/۸۷	٪۹۶	۰/۳۷	۱/۷۵	۴/۶۷	۵/۴۷

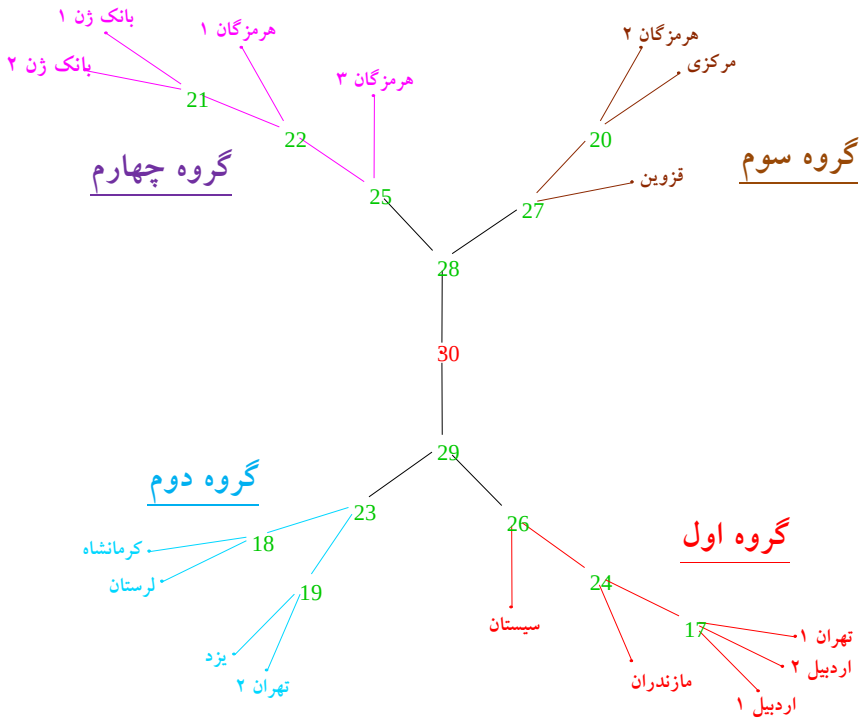
محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه موثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP)

ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی توده‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۳۸ تا ۰/۸۶ متغیر بود، میانگین تشابه بین توده‌ها برابر ۰/۶۶ بود که نشان‌دهنده وجود تنوع قابل قبول در بین توده‌های رازیانه بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد. بیشترین تشابه را توده ۶ (اردبیل ۱) با ۷ (اردبیل ۲) و ۸ (تهران ۱)، و کمترین تشابه را توده ۱۵ (قزوین) با ۵ (یزد) داشت. پیشنهاد می‌گردد از توده‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده را داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. حسنی و همکاران (۴) در تحقیقی روی رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP گزارش کردند میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگر برابر ۶۰ درصد بود. بیشترین شباهت ژنتیکی مشاهده شده بین دو ژنوتیپ از کشور مجارستان برابر ۹۷ درصد و در نمونه‌های ایرانی مربوط به دو ژنوتیپ از شهرهای کرج و کاشان برابر ۸۹ درصد بوده است.

تجزیه خوشه‌ای

نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه کلاستر با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6 برای توده‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی توده‌ها استفاده گردید چون این ضریب نسبت به ضریب‌های تطابق ساده و دایس ضریب کوفنتیک (٪۹۱) بالاتری داشت. محجوب و همکاران (۱۰) در بررسی روابط ژنتیکی بین ۳۶ ژنوتیپ از گونه‌های کلزا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزارش کردند که ضریب جاکارد و روش UPGMA دارای ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتری نسبت به سایر روش‌ها بوده و با استفاده از همین روش ژنوتیپ‌ها را گروه‌بندی کردند. همچنان‌که ملاحظه می‌گردد توده‌ها در ۴ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل توده‌های ۱ (مازندران)، ۶ (اردبیل ۱)، ۷ (اردبیل ۲)، ۸ (تهران ۱) و ۱۰ (سیستان و بلوچستان) بود، متوسط ضریب تشابه برای توده‌های این گروه ۰/۷۵ بود. در گروه دوم توده‌های ۲ (کرمانشاه)، ۳ (لرستان)، ۵ (یزد) و ۹ (تهران ۲) قرار گرفتند که متوسط ضریب تشابه برای توده‌های این گروه ۰/۷۹ بود. گروه سوم شامل ۳ توده ۱۳ (هرمزگان ۲)، ۱۵ (قزوین) و ۴ (مرکزی) که متوسط ضریب تشابه برای توده‌های این گروه ۰/۶۷ بود. در گروه چهارم توده‌های ۱۱ (هرمزگان ۱)، ۱۲ (بانک ژن ۱)، ۱۴ (هرمزگان ۳) و ۱۶ (بانک ژن ۲) قرار گرفتند که متوسط ضریب تشابه برای توده‌های این گروه ۰/۷۴ بود. بهمنی و همکاران (۲) در مطالعه‌ای بر روی ۲۵ ژنوتیپ رازیانه جمع آوری شده از سراسر ایران به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از ۱۰ نشانگر RAPD انجام دادند گزارش نمودند که تعداد ۱۰۴۳ قطعه DNA چند شکل تولید شد. کمترین فاصله ژنتیکی بین ساری و کلیبر و بیشترین آن بین ژنوتیپ‌های همدان و اردبیل مشاهده شد. گروه‌بندی این ژنوتیپ‌ها بر اساس اطلاعات آغازگرهای RAPD و با روش UPGMA انجام شد و ژنوتیپ‌ها به ۱۰ گروه تقسیم شدند. این بررسی نشان داد رازیانه‌های ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و نشانگر RAPD به‌خوبی ژنوتیپ‌های رازیانه را بر اساس توزیع جغرافیایی و تشابه‌هات اقلیمی از هم تفکیک کرده است.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر SCoT برای توده‌های رازیانه مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA
Figure 2. Dendrogram of cluster analysis for Fennel landrace using SCoT marker based jaccard coefficient by UPGMA

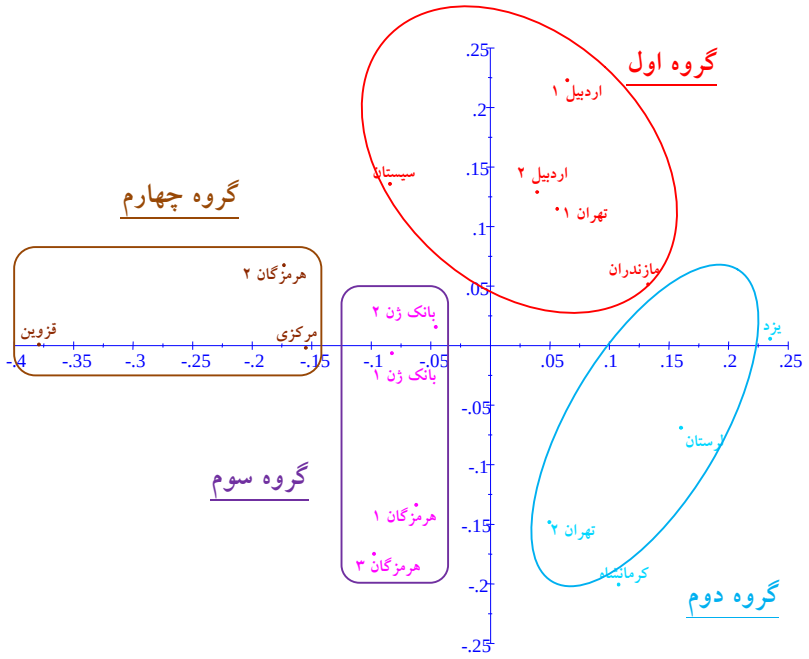
ماتریس تشابه برای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای (جدول ۳) نشان داد که بیشترین تشابه در بین توده‌های گروه ۳ و ۴، و کمترین تشابه در بین توده‌های گروه ۳ و ۲ وجود دارد. که با توجه به نتایج فوق در صورتی‌که هدف از برنامه های اصلاحی استفاده از توده‌هایی با حداکثر فاصله ژنتیکی برای تلاقی باشد می‌توان از توده‌های گروه ۲ و ۳ استفاده کرد.

جدول ۳- تشابه گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای
Table 3. Similar groups from the cluster analysis

	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم
گروه اول	۱			
گروه دوم	۰/۷۰۴	۱		
گروه سوم	۰/۷۹۰	۰/۶۲۱	۱	
گروه چهارم	۰/۷۹۲	۰/۷۳۱	۰/۷۹۳	۱

تجزیه به مختصات اصلی (PCo)

بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای توده‌ها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به‌ترتیب ۱۹/۰۷ و ۱۶/۸۳ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۳۵/۹۰ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی توده‌ها رسم گردید (شکل ۳)، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و توده‌ها به چهار گروه تقسیم شدند.



شکل ۳- بای‌پلات توده‌ها برای نشانگر SCoT بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم
Figure 3. Scatter plot for landrace for SCoT primer based on two first axes from principal coordinate analysis

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.2 انجام شد (جدول ۴)، که توده‌ها در داخل ۴ گروه قرار گرفتند. بر اساس آماره PhiPT در بین گروه‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت به‌عبارت دیگر گروه‌بندی به‌صورت صحیح انجام گرفته است. نتایج بدست آمده نشان داد که در میان گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروه‌ها برابر ۷۶٪ و در بین گروه‌ها تنوع برابر ۲۴٪ مشاهده گردید. از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان در تعیین تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به‌این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به‌عنوان یک جمعیت و توده‌های درون آن به‌عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام گیرد. نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروه‌ها به وجود آید، به‌عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. شعبانیان و همکاران (۱۶) در مطالعه‌ای که به‌منظور تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت‌های بلوط ایرانی در جنگل‌های در حال کاهش زاگرس شمالی با استفاده از ۱۰ آغازگر SCoT انجام دادند گزارش نمودند که از مجموعه ۱۱۳ نوار مشاهده شده ۹۵٪ چند شکل بودند در سطح گونه این آغازگرها تنوع ژنتیکی بالایی را آشکار کردند. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی فقط ۲۳ درصد از تنوع ژنتیکی کل، ناشی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی توده‌ها با استفاده از نشانگر SCoT
Table 4. Molecular variance analysis based on cluster using SCoT marker

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد از واریانس	PhiPT
بین گروه	۳	۸۱/۱۰۴	۲۷/۰۳۵	۳/۷۶۰	٪۲۴	۰/۲۳۶*
درون گروه	۱۲	۱۴۵/۸۳۳	۱۲/۱۵۳	۱۲/۱۵۳	٪۷۶	
کل	۱۵	۲۶۶/۹۳۸		۱۵/۹۱۲	٪۱۰۰	

*: اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار

منابع

1. Altıntas, S., F. Toklu, S. Kafkas, B. Kilian, A. Brandolini and H.O. Zkan. 2008. Estimating Genetic Diversity in Durum and Bread Wheat Cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL Markers. Plant Breeding, 127: 9-14.
2. Bahmani, K., A. Izadi darbandi and R. Baghchghi. 2012. The study of genetic variation Iranian fennel using RAPD molecular marker. Fourteenth Iranian Genetics Congress, 12: 15-20.
3. Davis, TM., H. Yu. Haigis and P.J. McGowan. 1995. Template mixing: a method of enhancingdetection and interpretation of codominant RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 91: 582-8
4. Hasani, M.H., S. Torabi, M. Omidi, A.R. Etminan and T. Dastmalchi. 2011. The study of genetic variation *Foeniculum vulgar* Mill. Using AFLP molecular marker. Iranian Journal of Field Crop Science, 42: 597-604.
5. Hou, Y., Z. Yan and Y. Wei. 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. Genetics Newsletter, 35: 9-22.
6. Hu, J. and BA. Vick. 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique forplant genotyping. Plant Molecular Biology Reporter, 21: 289-94.
7. Kalendar, R. 2007. FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm, Genes, Genomes and Genomics, Special Issue 1: 1-14.
8. Kochaki. A., M. Nasiri and F. Najafi. 2004. The agro biodiversity of medical and aromatic plants in Iran, 2: 209-214.
9. Kumar, M., G.P. Mishra, R. Singh, J. Kumar, P.K. Naik and Sh.B. Singh. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity among Different Apricot Genotypes from Cold Arid Deserts of Trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15: 225-236.
10. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and S.HR. Hashemi. 2014. Assessment of Genetic Relationships among 36 Brassica Genotypes using ISSR Molecular Markers. Journal of Crop Breeding, 6: 96-106.
11. Mardi, M., A. Taleei and M. Omidi. 2003. Study on genetic variation and yield Components Indies type chickpea. Iranian Journal of Agricultural Science, 34: 345-351.
12. Mehdikhani, H., S. Mahmood and H. Zeinali. 2013. Study of Genetic Diversity in Chamomile Landraces (*Matricaria aurea* (Loefl.) Sch. Bip.) Using Random and Semi-Random Primers. Journal of Crop Breeding, 5: 69-82.
13. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.
14. Safayi, M., S. Jafarnia and S. Khosroshahi. 2008. The most important medical plants of the world, 222-223
15. Salehi Jozani, G., S. Abd- Mishani, A.H. Hoseinzadeh and B.E .Seied Tabatabaei. 2003. Genetic diversity analysis of commercial potato cultivars (*solanum tuberosum*) in iran using RAPD-PCR technique. Iranian Journal of Agricultural sciences, 34: 1021-1029.
16. Shabanian, N., L. Alikhani and M.S. Rahmani. 2015. Phenotypic and genotypic diversity in rant oak (*Quercus brantii*) populations of declining north-Zagros forests using biochemical characteristics and molecular SCoT marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 23-29
17. Torres, A.M., NF. Weeden and A. Martin. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics, 85: 935-945.
18. Yazdani, D., S. Shahnazi and H. Seifi. 2004. Cultivation of Medical Plants. Applied guide for cultivation of 40 important medical plants in Iran, 1: 73-75.
19. Zahid, N.Y., N.A. Abbasi, I.A. Hafiz and Z. Ahmad. 2009. Genetic diversity of indigenous fennel, (*Foeniculum vulgare*). Germplasm in Pakistan assessed By RAPD markers. Pakistan Journal of Botany, 41: 1759-1767.

Genetic Diversity among Fennel (F*ueniculum Vulgare* Mill.) Landrace using Scot Markers

Fariba Nikkerdar[1], Mohsen Farshadfar[2], Muhammad Ali Ebrahimi[3] and Hooman Shirvani[4]

1, 3 and 4- M.Sc. Student, Associate Professor and Teacher, Department of Agriculture, Payam Noor University
2- Associate Professor, Department of Agriculture, Payam Noor University,
(Corresponding author: Mohsenfarshadfar@Yahoo.com)
Received: June 14, 2016 Accepted: February 7, 2017

Abstract

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is one of the well-known medicinal and aromatic plants. To determine variability between 16 Iranian Fennel landrace based on molecular markers, this experiment was conducted in the biotechnology laboratory of Payame Noor University of Kermanshah in 2014. In this experiment, 16 landrace of the *Foeniculum vulgare* Mill. were selected from the Natural Resources Gene Bank of Iran of Research Institute of Forest and Rangeland. Landrace were evaluated based on 15 SCoT primers markers. All of the SCot primers showed 77 visible bands in which four bands were similar patterns. The SC5 and SC29 primers had the most number of bands with 10 and 9 bands respectively, while SC10, SC26 and SC44 with two bands showed the least band numbers. The Polymorphic information content (PIC), marker index (MI), EMR and RP indices were calculated for all primers. With this point of view, SC15 and SC63 were the best primers to identify variability among these Fennels. Total genetic similarity based on these primers was 66 percent. The greatest genetic similarity was between Ardabil1 with Ardabil2 and Tehran2 landrace. The lowest genetic distance was between Ghazvin and Yazd fennel landrace. Cluster analysis based Jakard coefficient by UPGMA was classified all genotype to four groups and this clustering was confirmed by principal coordinate (PCo) and analysis of molecular variance (AMOVA). Portion of between group variance was just 24 percent of total variance.

Keywords: F*ueniculum vulgare,* Genetic variability, Molecular marker, SCoT