

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های شوید (*Anethum graveolens* L.) بومی ایران با استفاده از نشانگر ISSR

زینب بهاری^۱، عبدالعلی شجاعیان^{۲*}، سجاد رشیدی منفرد^۳، امین میرشکاری^۴، خدیجه نصیری^۱ و مرضیه امیریان^۱

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵)

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و درک روابط موجود بین گونه‌ها و توده‌های بومی کشور گام مؤثری در راستای حفظ ژرم‌پلاسما گیاهان می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین هفده توده‌ی شوید (*Anethum graveolens* L.) بومی مناطق مختلف ایران با استفاده از پنج نشانگر ISSR بررسی شد. در مجموع ۲۹ باند چند شکل ایجاد شد. میانگین کل چند شکلی ۵۴/۷٪ بود. بیشترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، به ترتیب ۰/۴۶ در آغازگر (CA)₈G و ۰/۴ در آغازگر (AG)₈T و میانگین ۰/۴۳ بود. بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص‌های درصد مکان‌های ژنی چندشکل به ترتیب ۶۲/۰۷ و ۹۳/۱۰، هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب ۰/۲۴۸ و ۰/۳۹۲ و شاخص اطلاعات شانون به ترتیب ۰/۳۶۰ و ۰/۵۶۷ در میان توده‌ی اردبیل و توده‌ی آذرشهر مشاهده شد. ماتریس عدم تشابه نشان داد که توده‌های ساری و کرمان بیشترین و توده‌های اهواز و نهاوند کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. تقسیم‌بندی تغییرات درون و بین توده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۸۸ درصد کل تغییرات ژنتیکی درون توده‌ها وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA ارتباط ضعیف بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی را در بین توده‌ها نشان داد.

واژگان کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی، چندشکلی، شوید، محتوای اطلاعات چندشکل

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: shojaeiyan@modares.ac.ir

مقدمه

شوید (*Anethum graveolens* L.) گیاهی یک‌ساله، دگرگشن، معطر و دارویی متعلق به خانواده‌ی چتریان (*Apiaceae*) می‌باشد. منشأ این گیاه نواحی شرقی مدیترانه گزارش شده است. این گیاه در پاکستان، هندوستان، افغانستان، خاورمیانه، روسیه، ایران و مصر می‌روید (Babri *et al.*, 2012). بر اساس مطالعات فیتوشیمیایی، ترکیبات عمده بذر شوید شامل ۴-۱ درصد روغن فرار در برگ‌برنده ۶۰-۳۰ درصد کارون (Carvone)، ۳۳ درصد لیمونن (Limonen)، ۶۱/۲۰ درصد آلفافلاندیرن (α -phellandrene) شامل پینن (Pinene)، دای‌ترین (Diterpene)، دای‌هایدروکارون (Dihydrocarvone)، سینیول (Cineole)، مرسین (Myrcene)، دیل‌آپیول (Dillapiole) و آپیول (Apiol) می‌باشد (Kaur and Arora., 2010). برگ تازه و بذر شوید پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایع مختلف غذایی، داروسازی، بهداشتی، تهیه ادویه و اسانس دارد. در طب سنتی شوید به‌عنوان یک داروی خانگی در رفع عوارض گوارشی مانند دل‌درد، سوء‌هاضمه و نفخ مورد استفاده بوده است. از گذشته اعتقاد بر این بوده است عصاره شوید اثر آرام‌بخش دارد و برای درمان گریپ، برطرف کردن سسکه و کولیک به کودک داده می‌شود. همچنین شوید برای افزایش شیر مادر مفید است (Kaur and Arora., 2010). بر اساس مطالعات، شوید خواص دارویی مانند اثرات ضد باکتریایی (Hosseinzadeh *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2006)، آنتی‌اکسیدانت (Al-Ismail *et al.*, 2004; 2006)، ضد سرطان (Shyu *et al.*, 2008)، ضد کلسترول و ضد چربی بالای خون (Bahramikia and Yazdanparast., 2009; Hajhashemi and Abbasi., 2008; Yazdanparast and Bahramikia., 2008; Yazdanparast and Alavi., 2001)، ضد زخم معده و فعالیت متوسط بر ضد هلیکوباکترپایلوری (Hosseinzadeh *et al.*, 2002; Rifat-uz-Zaman *et al.*, 2004)، را دارد.

اطلاع از محتوا، ساختار و توزیع تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های گیاهی برای بسیاری از اهداف از جمله طبقه‌بندی، شناسایی منشأ، تکامل، انتخاب از بین محصولات و جمعیت‌های وحشی، جمع‌آوری ژرم‌پلاسما و حفاظت مؤثر از گونه‌های گیاهی ضروری است. کاهش تنوع ژنتیک یک جمعیت گیاهی با کوچک نمودن اندازه آن، زمینه را برای زوال یک گونه فراهم می‌کند. تنوع ژنتیکی به تمام نسخه‌های ژن‌های مختلف که در یک جمعیت حضور دارند اشاره دارد. از بین انواع روش‌هایی که برای تخمین میزان تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی موجود هستند، ثابت شده است که نشانگرهای مولکولی DNA^۱ ابزار قدرتمندی در ارزیابی تنوع و آشکارسازی روابط ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها هستند (Rauf *et al.*, 2010).

نشانگر ISSR^۲ مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۳ و جز انواع تغییر یافته‌ی نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد. ISSR توسط PCR و با استفاده از توالی‌های مرکزی ریزماهواره به‌عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' یا ۵' به‌عنوان لنگرهای داخلی مناطق غیرتکراری مجاور تکثیر می‌شوند (Reddy *et al.*, 2002). نشانگر ISSR یک تکنیک ساده، سریع و مؤثر و بسیار تکرارپذیر است. این تکنیک بر محدودیت‌های مانند تکرارپذیری کم RAPD، هزینه بالای AFLP و نیاز به شناخت توالی‌های پیرامونی برای توسعه آغازگرهای اختصاصی گونه‌ها در چندشکلی SSR را ندارد. مزایای استفاده از ISSR این است که اختصاصی بودن نشانگرهای ریزماهواره را به نمایش می‌گذارد، اما با بهره‌گیری از مزیت‌های نشانگرهای تصادفی نیاز به هیچ‌گونه اطلاعات توالی برای سنتز آغازگر ندارد (Reddy *et al.*, 2002). تجزیه و تحلیل ISSR می‌تواند در مطالعات مربوط به هویت ژنتیک، نسب، کلون، شناسایی سویه و مطالعات تاکسونومیک گونه‌های بسیار نزدیک و همچنین در

1. DNA molecular marker
2. Inter simple sequenc repeat (ISSR)
3. Polymerase chain reaction (PCR)

مواد و روش‌ها

هفته توده‌ی بومی گیاه شوید از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). بذره‌های جمع‌آوری شده در گلدان‌هایی در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کاشته و در مرحله دو برگ حقیقی، از گیاهان مربوط به هر توده ۱۰ گیاه انتخاب و نمونه از برگ گیاه تهیه شد.

DNA به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1982) با کمی تغییرات استخراج گردید. اجزای واکنش زنجیره‌ای

جدول ۱- مشخصات توده‌های شوید

Table 1. Characteristics of dill landraces

شماره No.	مکان جمع‌آوری شماره Collection sites	کد نمونه Code	تعداد نمونه No. of samples	مختصات جغرافیایی Geographical location	
				عرض طول Latitude (N)	عرض طول Longitude (E)
1	تکاب Tekab	TEK	10	47°10'	40°36'
2	آذرشهر Azarshahr	AZA	10	45°96'	76°37'
3	اردبیل Ardabil	ARD	10	48°17'	38°15'
4	زیار Zyar	ZYA	10	51°50'	32°50'
5	اهواز Ahvaz	AHV	10	48°49'	31°24'
6	برازجان Borazjan	BRA	10	50°51'	28°59'
7	خاش Khash	KHS	10	61°15'	28°15'
8	شاهرود Shahroud	SHA	10	54°57'	36°25'
9	خرم‌آباد Khoramabad	KHO	10	48°35'	33°46'
10	شیراز Shiraz	SHI	10	52°54'	29°61'
11	سنندج Sanandaj	KOR	10	47°00'	35°30'
12	کرمان Kerman	KER	10	57°06'	30°28'
13	گرگان Gorgan	GOR	10	54°44'	36°86'
14	شهرکرد Shahrekord	SHK	10	50°82'	32°35'
15	ساری Sari	SAR	10	53°05'	36°56'
16	نهادن Nahavand	NAH	10	48°38'	34°20'
17	یزد Yazd	YAZ	10	54°36'	31°89'

مطالعات نقشه‌برداری ژن مفید مورد استفاده قرار گیرد (Kumar et al., 2009).

مطالعات اندکی در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی شوید در جهان و ایران در منابع موجود است. در پژوهشی چونگ و همکاران (Chung et al., 2012) تنوع ژنتیک ۱۶ توده‌ی شوید مربوط به کشورهای مختلف جهان را با استفاده از ۱۲ نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار دادند.

درصد کلی چندشکلی در این مطالعه ۹۱/۶ درصد تخمین زده شد. نتایج این پژوهش نشان داد در درخت‌واره حاصل از روابط بین توده‌های مورد مطالعه، توده‌های قرار گرفته در یک شاخه از لحاظ موقعیت جغرافیایی نزدیک به هم نبودند. سلوکی و همکاران (Solouki et al., 2012)، در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی ۳۷ توده شوید، جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و یک جمعیت از اروپا را بر اساس صفات مورفولوژیک و ۲۰ نشانگر مولکولی AFLP مورد ارزیابی قرار دادند.

میانگین چندشکلی نشانگرها در این مطالعه ۳۹/۸٪ برآورد شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع ژنتیکی گزارش شده با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی به‌طور قطعی با ناحیه جغرافیایی مطابقت ندارند.

در پژوهشی دیگر سورش و همکاران (Suresh et al., 2012) تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۱۳۵ توده شوید اقلیم‌های مختلف جهان را با استفاده از ۱۰ نشانگر مولکولی RAPD مورد مطالعه قرار دادند. نتایج دسته‌بندی توده‌های مورد مطالعه، تطابق زیادی را بین موقعیت جغرافیایی و تنوع ژنتیکی نشان نداد.

با توجه به پراکندگی شوید در ایران، این تحقیق با هدف بررسی ارتباط ژنتیکی بین و درون هفته توده شوید ایران و دسته‌بندی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی، کمک به مطالعات بعدی برای اهداف به‌نژادی و همچنین بررسی کارایی نشانگرهای مولکولی ISSR در متمایز نمودن توده‌های خویشاوند و ژنوتیپ‌های نزدیک گیاه شوید انجام شد.

انجام شد. سپس ژل توسط دستگاه ژل خشک‌کن، خشک شد. الگوهای باندى پدیدار شده بر روی ژل اکريل‌آميد برای هر آغازگر به روش صفر و یک (وجود باند یک و عدم وجود آن صفر) امتیازدهی شد و ماتریس تشکیل شده توسط نرم‌افزارهای آماری NTSYSpc v2.02 و 6.1 GenALEx آنالیز شد. نمونه‌ای از الگوی باندى حاصل از محصولات ISSR-PCR بر روی ژل اکريل‌آميد ۱۰ درصد در شکل ۱ نمایش داده شده است. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ توسط برنامه Excel محاسبه شد. در این فرمول P بیانگر فراوانی آلل i ام و n بیانگر تعداد آلل است. رسم درخت‌واره بر اساس روش گروه‌های غیر وزنی جفت شده (UPGMA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc و برآورد شاخص‌های کمی تنوع ژنتیک، با استفاده از نرم‌افزار GenALEx انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenALEx برآورد شد. محل برش دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار آرلیکوین (Arlequin Ver3.5)، تعیین شد.

پلیمرز (PCR)، در حجمی معادل ۱۳/۰۵ میکرولیتر تهیه شدند که به ترتیب شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ژنومی (با غلظت ۶۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱ برابر (IX)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۰/۹ میلی‌مول)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs (۰/۱۵ میلی‌مول)؛ ۱ میکرولیتر آغازگر (۰/۸ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۰/۵ واحد) و ۶/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مورد استفاده از شرکت سیناژن تهیه شدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. برنامه حرارتی واکنش PCR، توسط دستگاه ترموسایکلر (BIORAD, C 1000™ Thermal Cycler)، در سه مرحله اعمال گردید (جدول ۳).

الکتروفورز محصولات ISSR-PCR بر روی ژل اکريل‌آميد ۱۰٪، توسط دستگاه الکتروفورز (مدل C.B.S scientific) با ولتاژ مستقیم ۴۰۰ ولت و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت انجام شد. پس از پایان زمان الکتروفورز، ظهور الگوهای باندى توسط رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره (Bassam et al., 1991) نقره

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در ISSR-PCR

Table 2. Characteristics of ISSR primers used for ISSR-PCR analysis

شماره	توالی آغازگرها (۵'→۳')	دمای اتصال
Order	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
1	GAG AGA GAG AGA GAG AC	30.3
2	GT AGA GAG GAG AGA GAG	40.4
3	ACA CAC ACA CAC ACA CT	36.9
4	AGA GAG AGA GAG AGA GC	34.9
5	AGA GAG AGA GAG AGA GT	33.6

جدول ۳- برنامه حرارتی واکنش ISSR-PCR

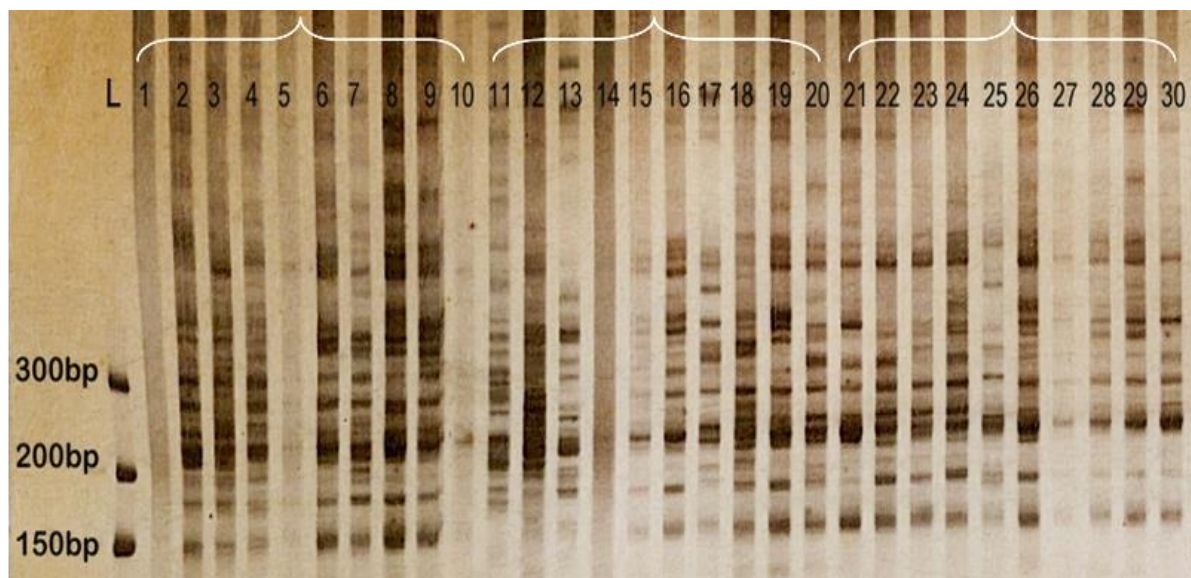
Table 3. ISSR-PCR program temperature

چرخه	مرحله	تعداد تکرار	درجه حرارت	زمان
Cycle	Step	No. of repeats	Temperature (°C)	Time
1	واسرشت سازی اولیه	1	94	5 min
	واسرشت سازی		94	1 min
2	اتصال آغازگر	35	30-41	75 sec
	بسط		72	2 min
3	بسط نهایی	1	72	10 min

نتایج و بحث

(PIC) برای هر نشانگر محاسبه شد. با توجه به PIC، بیشترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر (GA)₈G (PIC = ۰/۴۶)، کمترین در آغازگر (AG)₈T (PIC = ۰/۴۰) و میانگین PIC برای پنج آغازگر مورد استفاده در این پژوهش ۰/۴۳ به دست آمد. اطلاعات مربوط به چندشکلی ایجاد شده در جدول ۴ آمده است. با توجه به اینکه حداکثر PIC برای نشانگرهای غالب کمتر از ۰/۵ ذکر شده است (Nagy *et al.*, 2012) می‌توان گفت که آغازگرهای به کار برده شده پراکندگی مناسبی در ژنوم جمعیت مورد بررسی داشته‌اند.

در پژوهش حاضر، از پنج آغازگر ISSR به کار گرفته شده، در مجموع ۵۲ مکان ژنی امتیازبندی شد که از میان آن‌ها ۲۹ مکان ژنی چندشکلی را نشان دادند (شکل ۱). میانگین کلی چندشکلی ۵۴/۷ درصد برآورد شد. تعداد باندهای امتیاز داده شده برای هر آغازگر از ۹ تا ۱۲ باند متغیر بود. بیشترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگر (GC)₈T با ۷ باند چندشکل و کمترین تعداد، مربوط به دو آغازگر (AG)₈C و (GC)₈C با ۵ باند چندشکل بود. برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها در نمایش چندشکلی در یک جمعیت، محتوای اطلاعات چندشکل



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر (CA)₈G در سه توده شوید بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد؛ نمونه‌های ۱۰-۱ توده تکاب، ۲۰-۱۱ توده اردبیل و ۳۰-۲۱ توده برازجان. L: نشانگر تعیین اندازه

Figure 1. ISSR-PCR band patterns of 3 dill landraces related to (CA)₈G primer on 10% polyacrylamide gel; 1-10: Tekab population, 11-20: Ardabil population and 21-30: Borazjan population; Lane (L): DNA ladder

جدول ۴- اطلاعات چندشکلی هفده توده‌ی شوید ایران با استفاده از نتایج ISSR-PCR

Table 4. Polymorphism information among of 17 Iranian dill landraces, using ISSR-PCR analysis

شماره	توالی آغازگر	چندشکلی (%)	تعداد باند چندشکل	تعداد کل باندها	محتوای اطلاعات چند شکل
No.	Primer Sequence	Polymorphism (%)	No. of polymorphic bands	No. of Scored bands	PIC
1	GA ₈ C	50	5	10	0.41
2	GC ₈ T	58	7	12	0.45
3	CA ₈ G	60	6	10	0.46
4	AG ₈ C	55.5	5	9	0.45
5	AG ₈ T	50	6	12	0.4
	میانگین (Mean)	54.7	5.8	10.4	0.43

به‌منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان توده‌های مورد بررسی، ماتریس عدم تشابه با استفاده از الگوریتم UPGMA توسط نرم‌افزار GenALEX رسم شد. نتایج ارزیابی ماتریس عدم تشابه نشان داد که بیشترین فاصله بین دو توده‌ی ساری و کرمان (۰/۳۷۲) و کمترین فاصله بین دو توده‌ی اهواز و نهاوند (۰/۰۶۷) وجود دارد که به ترتیب نشان دهنده‌ی میزان تفاوت و شباهت ژنتیکی این توده‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که در آن تغییرات مشاهده شده داخل و بین اجزا توده با استفاده از فاصله‌های ژنتیکی دسته‌بندی می‌شود، با استفاده از نرم‌افزار GenALEX برآورد و در جدول ۶ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج این دسته‌بندی، در این مطالعه ۸۸ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده درون توده‌ها و ۱۲ درصد در بین توده‌ها بود. این آزمون در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود. درخت‌واره با استفاده از داده‌های ماتریس عدم تشابه بر اساس الگوریتم UPGMA، ترسیم

برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت، شاخص‌های درصد مکان ژنی چندشکل هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) (شاخص تنوع ژنی)، شاخص اطلاعات شانون (I)، تعداد آل‌های مؤثر (Ne) و تعداد آل مشاهده شده (Na) محاسبه شد که مقادیر آن در جدول ۵ آمده است. میانگین شاخص‌های کمی ژنتیک به ترتیب شامل $P: 0.77/28, He: 0.305, I: 0.445, Ne: 1.542$ و 1.728 بود. درصد مکان ژنی چندشکل، از ۹۳/۱ در توده اردبیل تا ۶۲ در توده آذرشهر متغیر بود. بیشترین میزان شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۹۲ در توده اردبیل و کمترین در توده آذرشهر ۰/۲۴۸ بود. بیشترین میزان شاخص شانون ۰/۵۶۷ در توده اردبیل و کمترین آن، ۰/۳۶ در توده آذرشهر مشاهده شد. بالاترین شاخص تعداد آل‌های مؤثر ۱/۷۰۵ در توده اردبیل و کمترین در کرمان ۱/۴۴۴ مشاهده شد. بیشترین تعداد آل مشاهده شده ۱/۹۳۱ در توده اردبیل و کمترین آن ۱/۵۸۶ در توده آذرشهر و کردستان بود (جدول ۵).

جدول ۵ - شاخص‌های ژنتیکی هدفه توده شوید ایرانی با استفاده از نشانگر ISSR

Table 5. Genetic parameters of 17 Iranian dill landraces, using ISSR markers

منطقه	Region	درصد مکان‌های ژنی چندشکل (PPL%)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He(sd))	شاخص اطلاعات شانون (I(sd))	تعداد آل‌های مؤثر (Ne(sd))	تعداد آل مشاهده شده (Na(sd))
تبریز	Tekab	79.31	0.327(0.035*)	0.476(0.049)	1.584(0.068)	1.793 (0.077)
اردبیل	Ardabil	93.10	0.392(0.025)	0.567(0.034)	1.705(0.053)	1.931(0.048)
برازجان	Borazjan	86.21	0.324(0.034)	0.477(0.046)	1.579(0.071)	1.862(0.065)
زیار	Zyar	75.86	0.305(0.036)	0.446(0.05)	1.537(0.069)	1.690(0.112)
ساری	Sari	89.66	0.302(0.032)	0.456(0.042)	1.515(0.065)	1.793(0.115)
شیراز	Shiraz	79.31	0.320(0.037)	0.464(0.051)	1.580(0.073)	1.690(0.123)
کردستان	Kordestan	68.97	0.290(0.040)	0.419(0.056)	1.531(0.078)	1.586(0.127)
کاشان	Khash	89.66	0.356(0.032)	0.519(0.042)	1.643(0.066)	1.862(0.082)
شاهرود	Shahrood	75.86	0.287(0.038)	0.421(0.052)	1.511(0.074)	1.690(0.112)
شهرکرد	Shahrekord	82.76	0.302(0.035)	0.447(0.047)	1.528(0.070)	1.793(0.091)
کرمان	Kerman	68.97	0.255(0.037)	0.378(0.053)	1.442(0.071)	1.621(0.115)
یزد	Yazd	75.86	0.297(0.036)	0.436(0.050)	1.522(0.071)	1.759(0.081)
نهاوند	Nahavand	72.41	0.287(0.037)	0.420(0.053)	1.503(0.070)	1.690(0.101)
خرم‌آباد	Khoramabal	75.86	0.303(0.036)	0.443(0.051)	1.539(0.072)	1.724(0.098)
اهواز	Ahvaz	72.41	0.312(0.039)	0.448(0.055)	1.574(0.076)	1.690(0.101)
آذرشهر	Azarshahr	62.07	0.248(0.041)	0.360(0.057)	1.444(0.077)	1.586(0.105)
گرگان	Gorgan	65.52	0.269(0.039)	0.392(0.056)	1.478(0.074)	1.621(0.104)
میانگین	Mean	77.28	0.305(0.009)	0.445(0.012)	1.542(0.017)	1.728(0.024)

*: عدد داخل پرانتز مقدار انحراف استاندارد را نشان می‌دهد.

*: The number in parentheses is the numerical value of the standard deviation

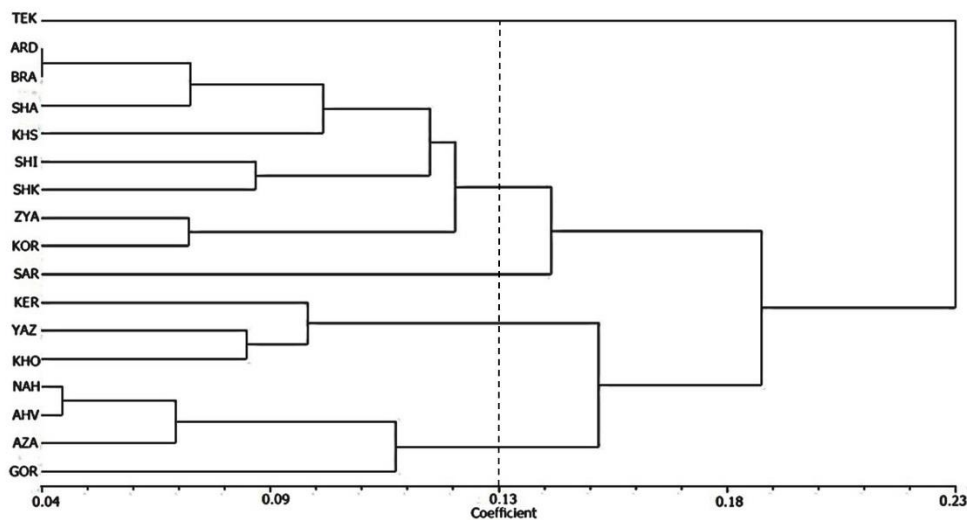
جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی توده‌های شوید با استفاده از نشانگر ISSR

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) related to dill landraces, using ISSR markers

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	درصد واریانس Variance (%)	واریانس کل Total Variance
بین توده‌ها Between landraces	16	16.33**	12	0.91
درون توده‌ها Within landraces	153	6.95	88	6.95
جمع کل Total Sum	169	-	100	7.86

** : Significant at $P \leq 0.01$

** : تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد ($P < 0.01$)



شکل ۲- درخت‌واره حاصل از روابط ژنتیکی ۱۷ توده شوید ایرانی با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس

الگوریتم UPGMA

Figure 2. Constructed dendrogram based on UPGMA method, showing relationships between 17 Iranian dill landraces, using ISSR marker

مشخص می‌کنند که مقدار آن بین ۰ تا ۱ است. مقادیر بالای ۰/۲۵ برای F نشان دهنده تمایز ژنتیکی بسیار زیاد بین زیر جمعیت‌هاست. در مطالعه حاضر بیشترین مقدار F زمانی به دست می‌آید که درخت‌واره در محل ضریب ۰/۱۳ برش داده شد. در این محل درخت‌واره به ۵ گروه تقسیم شد. در گروه اول توده تکاب در شاخه‌ای کاملاً مستقل از سایر توده‌ها جدا شد. گروه دوم شامل توده‌های اردبیل، برازجان، شاهرود، خاش، شیراز، شهرکرد، زیار و کردستان بود. در گروه سوم توده ساری قرار داشت. گروه چهارم کرمان، یزد و خرم‌آباد را شامل شد. در گروه پنجم نهاوند، اهواز، آذرشهر و گرگان قرار گرفتند. به‌طور کلی در درخت‌واره، توده‌های قرار گرفته

شد (شکل ۲). با برش درخت‌واره از نقاط مختلف گروه‌بندی‌های متفاوتی حاصل می‌شود. یکی از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی در مطالعات تنوع ژنتیکی، تعیین محل برش درخت‌واره و تعیین تعداد مطلوب خوشه است. بدین منظور برش درخت‌واره در تمام نقاط ممکن صورت گرفته و گروه‌های به دست آمده در هر نقطه برش به‌عنوان تیمار و ژنوتیپ‌های داخل هر گروه به‌عنوان تکرار به نرم‌افزار داده شده و واریانس کل به واریانس بین و داخل گروه‌ها تفکیک می‌شود. نقطه مناسب برش درخت‌واره محلی است که بیشترین تمایز بین گروه‌ها به دست آید. تمایز بین گروه‌ها را با شاخصی به نام آماره F یا شاخص تثبیت

در یک گروه از لحاظ موقعیت جغرافیایی مشابهتی نداشتند.

بر طبق نتایج این تحقیق آغازگر مبتنی بر تکرار دو نوکلئوتیدی CA (G)CA] بیشترین محتوای اطلاعات چندشکل را نسبت به آغازگرهای دیگر نشان داد (PIC=0/46). طبق گزارش‌های قبلی فابریکی‌اورنگ و همکاران در پژوهش روی خربزه (Fabrikourang et al., 2009)، حسنی و همکاران با مطالعه تنوع ژنتیکی مامیران (Hassani et al., 2012) و موسوی و همکاران با مطالعه تنوع ژنتیکی گل راعی (Mousavi et al., 2012) نیز نشان دادند این آغازگر از قدرت تفکیک و چندشکلی بیشتری نسبت به آغازگرهایی با دیگر تکرارهای دو یا سه نوکلئوتیدی برخوردار بوده است (Reddy et al., 2002).

بر اساس مقادیر شاخص‌های کمی تنوع ژنتیکی مشاهده شده، می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین تنوع درون توده‌ی اردبیل و کمترین تنوع درون توده‌ی آذرشهر در بین کل توده‌های آزمایش شده وجود دارد. نتایج ارزیابی ماتریس عدم تشابه نشان داد که بیشترین فاصله بین دو توده‌ی ساری و کرمان (0/372) و کمترین فاصله بین دو توده‌ی اهواز و نهاوند (0/067) وجود دارد که به ترتیب نشان دهنده‌ی میزان تفاوت و شباهت ژنتیک این توده‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد. فاصله ژنتیکی بیشتر در هنگام تلاقی جمعیت‌ها یا لاین‌ها، سبب افزایش مکان‌های ژنی هتروزیگوت و بالا بردن احتمال اثر هتروزیس می‌شود (Drinic et al., 2002; Olfati et al., 2012).

بنابراین فاصله ژنتیکی ممکن است با صفات مطلوب مرتبط باشد که می‌توان پس از بررسی‌های بیشتر، از آن در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، علی‌رغم تشکیل چندین گروه ارتباط مؤثری در رابطه با موقعیت جغرافیایی در بین توده‌ها مشاهده نشد. قرار گرفتن نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف در خوشه‌های یکسان می‌تواند نشانه‌ای از تشابه ژنتیکی و یا تبادل فیزیکی بذر بین مناطق مختلف

باشد که تفسیر آن بر اساس تبادلات فیزیکی نسبت به تشابهات ژنتیک توجیه‌پذیری بیشتری دارد.

نتایج مبنی بر عدم تطبیق منشأ جغرافیایی با تنوع ژنتیکی در پژوهش سورس و همکاران (Suresh et al., 2012)، در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های شوید با استفاده از نشانگر RAPD. مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های شوید با استفاده از نشانگر AFLP توسط سلوکی و همکاران (Solouki et al., 2012)، گزارش آقای و همکاران (Aghaei et al., 2012) در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های ریحان با استفاده از نشانگر ISSR. مطالعه تشابهات بین توده‌های بابونه شیرازی توسط نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی توسط سلوکی و همکاران (Solouki et al., 2008) و همچنین پژوهش مارتین و همکاران (Martins et al., 2006) در بررسی تنوع ژنتیک توده‌های محلی لویبا با استفاده از نشانگر RAPD به دست آمده است. در گونه‌های دگرگشن به علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم بوده و در عوض تنوع درون جمعیت پراکنده است. تفاوت مشاهده شده ممکن است در اثر انتخاب، سازگاری، مهاجرت، رانش ژنتیکی و روش‌های گرده‌افشانی باشد. فاکتورهای دیگری که مهم هستند مرتبط به محیط و فعالیت انسان در طی زمان می‌باشد (Rauf et al., 2010). همچنین سیستم تولیدمثل گونه‌ها در تعیین تفاوت‌ها بین جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف بسیار مهم است. گیاهان دگرگشن تغییرات تدریجی را بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند.

در عوض گونه‌های خودگشن به دلیل وجود آل‌های متفاوت در جمعیت‌های مختلف تغییرات بیشتری بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند (Rao and Hodgkin., 2002). در نتایج تجزیه واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی درون توده‌های مورد مطالعه، بیشتر از تنوع بین توده‌ای (88 < ۱۲ درصد) بود. وجود تنوع بالا درون توده در گیاهان دیگر با استفاده از نشانگر ISSR مانند مرزه (Kameli et al., 2013)

جغرافیایی، دما و رطوبت متفاوت‌اند. این عوامل فاکتورهای اکوجغرافیایی خوانده می‌شوند و سبب گوناگونی ژنتیک در بین دو جمعیت می‌شوند. با توجه به نتایج، استفاده از توده‌های مناطق جغرافیایی بیشتر برای تأیید الگوی موجود لازم است.

نشانگر ISSR-PCR یک فن ساده، سریع و تکرارپذیر در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های شوید ایران است و با توجه به تولید باندهای قابل امتیازدهی و سطح بالای چندشکلی توسط این نشانگر در این تحقیق، می‌تواند در ارزیابی‌های آینده تنوع ژنتیکی گیاه شوید مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه یک فن نشانگری به تنهایی قادر به انعکاس تمایزات ژنومی بین توده‌های گیاهان نیست، به‌کارگیری سایر نشانگرها همراه با اضافه نمودن توده‌های مناطق جغرافیایی بیشتر در مطالعات آینده برای تأیید و تکمیل الگوی موجود لازم است.

و زنیان (Modareskia *et al.* 2012) و با استفاده از نشانگر RAPD در زیره پارس (Pezhmanmehr *et al.*, 2010) نیز گزارش شده است. از عوامل مؤثر در توجیه تنوع بیشتر درون توده مواردی از جمله دگرگشتن بودن گیاه، یک‌ساله بودن، ازدیاد با بذر همچنین تعداد مکان‌های آللی مورد بررسی، موقعیت آللی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازه جمعیت را می‌توان ذکر نمود (Pezhmanmehr *et al.*, 2010). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها دارای پیچیدگی‌هایی است (Mohammadi and Prassana., 2003). چندین عامل اکولوژیکی سبب انباشته شدن تفاوت ژنتیکی بین دو جمعیت می‌شود. مکان‌های جغرافیایی مختلف از نظر برخی ویژگی‌های اکولوژیکی از جمله عرض و طول

References

- Aghaei, M., Darvishzadeh, R. and Hassani, A. (2012). Molecular characterisation and similarity relationships among iranianbasil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequencerepeat markers. *Revista Ciencia Agronomica*, **432**: 312-320.
- Al-Ismail, K.M. and Aburjai, T. (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**: 173-178.
- Babri, R.A., Khokhar, I., Mahmood, Z., Mahmud, S. (2012). Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Anethum graveolens* L. *Science International*. **24**: 453-455.
- Bahramikia, S. and Yazdanparast, R. (2009). Efficacy of different fractions of (*Anethum graveolens*) leaves on seru lipoproteins and serum and liver oxidative status in experimentally induced hypercholesterolaemic rat models. *American Journal of Chinese Medicine*, **37**: 685-699.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **196**:80-83.
- Chung, J.W., Sundan, S., Park, J.H., Lee, G.A., Sung, J.S., Lee, S.Y., Baek, H. J., Kim, Y.G. and Cho, G. T. (2012). Selection of RAPD marker for investigation genetic diversity in Dill (*Anethum graveolens* L.) gerpmlasm. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, **4**: 463-469.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, **19**: 11-15.
- Drinic, M.S., Trifunovic, S., Drinic, G and Konstantinov, K. (2002). Genetic divergence and its correlation to heterosis in maize as revealed by ssr-based markers. *Maydica*, **47**:1-8.
- Fabrikiourang, S., Shamsbakhsh, M., Jalali, j.M. and Ahmadi, j. (2009). Evaluation of Genetic Diversity of Some Melon Populations (*cucumis melo* L.) Using Inter Simpele Sequens Markers. *Iranian Journal of Biology*, **2**: 271-281 (In Persian).
- Hajhashemi, V. and Abbasi, N. (2008). Hypolipidemic activity of (*Anethum graveolens*) in rats. *International Journal of Phytotherapy Research*, **22**: 372-375.

- Hassani, M.** (2012). *Evaluation of genetic diversity of greater celandine (Chelidonium majuse L.) using ISSR markers*. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran (In Persian).
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G.R. and Ameri, M.** (2002). Effects of (*Anethum graveolens* L.) seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. *BMC Pharmacology*, **2**: 21-21.
- Kameli, M., Hesamzadeh, H.S.M. and Ebadi, M.** (2013). Assessment of genetic diversity on populations of three satreja species in Iran using PCR markers. *Annals of Biological Research*, **4**: 64-72.
- Kaur, G.J. and Arora, D.S.** (2010). Bioactive potential of (*Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*) belonging to the family Umbelliferae-Current status. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **4**: 87-94.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A K., Modi, D.R. and Pandey, B.K.** (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, **2**: 141-162.
- Martins, S.R., Vences, F.J., Saenz de Miera, L.E., Barrosa, M.R. and Carnide, V.** (2006). RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, **108**: 133-142.
- Modareskia, M., Darvishzadeh, R., Hassani, A. and Kholghi, M.** (2012). Molecular diversity within and between Ajowan (*Carum copticum* L.) populations based on inter simple sequencerepeat (PCR) markers. *Journal of Plant Molecular Breeding (JPMB)*, **1**: 51-62.
- Mohammadi, S.A. and Prassana, B.M.** (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, **43**: 1235-1248.
- Mousavi, S., Ahmadi, J. and Sefidkon, F.** (2012). Investigation of genetic diversity of landraces of *Hypericum perforatum* L using ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research*. **20**: 14-24.
- 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.
- Olfati, J.A., Samizade, H., Peyvast, G.A., Rabiei, B. and Khodaparast, S.A.** (2012). Rrelationship between genetic distance and heterosis in cucumber. *International Journal of plant breeding*, **6**: 21-26.
- Pezhmanmehr, M., Hassani, M.E., Fakhre-Tabatabaie, M. and Hadian, J.** (2010). Evaluation of genetic diversity and differentiation of some *Bunium persicum* (Boiss) populations using RAPD markers. *Environmental Sciences*, **7**: 63-76.
- Rao, R.V. and Hodgkin, T.** (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plantgenetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **68**: 1-19.
- Rauf, R., Dasilva J.A.T., Khan A.A. and Naveed A.** (2010). Consequence of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of Plant Breeding*, **4**: 1-21.
- Reddy, P.M., Sarla, N. and Siddiq, E.A.** (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, **128**: 9-17.
- Rifat-uz-Zaman, M.S., Akhtar M.S. and Khan, M.S.** (2004). Preliminary evaluation of (*Anethum graveolens*) fruit in indomethacin-ulcer induced rats. *Journal of Biological Sciences*, **4**: 151-156.
- Shyu, Y.S., Lin, J.T., Chang, Y.T., Chiang, C.J. and Yang, D.J.** (2008). Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry*, **115**: 389-389.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M.P. and Catalan, C.** (2006). Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of (*Anethum graveolens* L.) essential oil and acetone extract: part 52. *Journal of Food Science*, **70**: 208-215.
- Solouki, M., Hoseini, S.B., Siahisar, B.A. and Tavassoli, A.** (2012). Genetic diversity in dill (*Anethum graveolens* L.) populations on the basis of morphological traits and molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, **11**: 3649-3655.
- Solouki, M., Mehdikhani, H., Zeinali, H. and Emamjomeh, A.A.** (2008). Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological and molecular markers. *Scientia Horticulturae*, **117**: 281-287.

- Suresh, S., Chung, J.W., Sung, J. S., Cho, G.T., Park, J.H., Yoon, M.S., Kim, C.K. and Baek, H.J.** (2012). Analysis of genetic diversity and population structure of 135 dill (*Anethum graveolens* L.) accessions using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **60**: 893-903.
- Yazdanparast, R. and Alavi, M.** (2001). Anti hyperlipidaemic and anti hypercholesterolaemic effects of (*Anethum graveolens*) leaves after the removal of furocoumarins. *Cytobios*, **105**: 185-191.
- Yazdanparast, R. and Bahramikia, S.** (2008). Evaluation of the effect of (*Anethum graveolens* L.) crude extracts on serum lipids and lipoproteins profiles in hypercholesterolaemic rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**: 88-94.
- Zheng, G., Kenney, P.M. and Lam, L.K.T.** (1992). Anethofuran, Carvone and Limonene: Potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Planta Medica*, **58**: 339-341.

Investigation of Genetic Diversity Among Some Iranian Dill (*Anethum graveolens* L.) Landraces, Using ISSR Markers

Zeinab Bahari¹, Abdolali Shojaeiyan^{2,*}, Sajad Rashidi Monfared³, Amin Mirshekari⁴,
Khadije Nasiri¹ and Marzieh Amiriyani¹

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

(Received: June 06, 2014 – Accepted: February 04, 2015)

Abstract

Knowledge about the amount of genetic diversity and understanding relationship between species and landraces is an important step in plant germplasm conservation. In this study, within and between genetic diversity of 17 dill landraces (*Anethum graveolens* L.) from different areas of Iran was evaluated using five ISSR markers. In total, 29 polymorphic bands were generated. The average of polymorphism was 54.7%. The highest and the lowest values of Polymorphic Information Contents were 0.46 for ((CA)₈G primer) and 0.40 for ((AG)₈T primer), respectively, and with an average of 0.43. Based on the highest and the lowest indices of Polymorphic Loci (0.392 and 0.248), expected heterozygosity (93.10 and 62.07) and shannon's Information Index (0.567 and 0.360) between all populations, the highest and lowest genetic diversity was detected among Ardebil and Azarshahr genotypes, respectively. The genetic dissimilarity matrix showed that Sari and Kerman populations had the highest genetic distance and Ardabil and Borazjan populations had the lowest ones. Partitioning variations within and between populations, using an analysis of molecular variance (AMOVA), showed that 12% of the total genetic variation existed between growing regions. Cluster analysis based on UPGMA method showed a poor relationship between genetic distance and the geographical grouping of dills.

Keywords: Cluster analysis, Analysis of molecular variance, Polymorphism, Polymorphic information contents, Dill

* Corresponding Author, E-mail: shojaeiyan@modares.ac.ir