

بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی گیاه دارویی آنغوزه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

Evaluation of structure and genetic diversity of wild populations of *Ferula assa foetida* L. medicinal plant using ISSR molecular marker

ریحانه صادقی^۱، منصور امید^{۲*}، رضا عزیزی نژاد^۱، علیرضا اطمینان^۳، حسنعلی نقدی بادی^۴

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۴- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

Sadeghi R¹, Omidi M^{*2}, Azizinezhad R¹, Etminan A³, Naghdi Badi H⁴

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

4- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸)

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۹۰ ژنوتیپ آنغوزه با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آغازگرهای ISSR در مجموع ۱۸۶ باند چند شکل با متوسط ۱۴/۳۸ باند به ازای هر آغازگر در جمعیت مورد بررسی تکثیر نمودند. میانگین مقادیر شاخص نشانگر (MI) و محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برای آغازگرهای ISSR به ترتیب ۴/۹۸ و ۰/۳۷ به دست آمد و نشان داد که آغازگرهای ISSR از کارایی بالایی در شناسایی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های آنغوزه برخوردارند. در مقایسه بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت کرمان شامل ۳۳ ژنوتیپ بر اساس مقادیر تعداد ال‌های مؤثر (Ne)، مقادیر هتروزیگوسی (H)، شاخص شانون (I) و تعداد کل ال‌های مشاهده شده (Na) که به ترتیب ۱/۶۲، ۰/۳۵، ۰/۵۱ و ۱/۹۳ در این جمعیت از تنوع بیش‌تری برخوردار بود. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که جمعیت کرمان نسبت به سایر جمعیت‌های مورد مطالعه از میزان تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۸ درصد از تغییرات کل مربوط به تنوع بین جمعیتی است در حالی که ۹۲٪ از تغییرات با تنوع درون جمعیتی قابل توجه می‌باشد. به عبارت دیگر می‌توان بیان داشت که آغازگرهای ISSR بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را درون خویشاوندان نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت تمامی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده را به ترتیب به ۵ دسته اصلی تقسیم تفکیک کردند. با توجه به نتایج به دست آمده از این تجزیه مقدار K در حالت ۵ در حد بهینه قرار داشت. این نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشته و نشانگر ISSR ابزار مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این ژرم پلاسما هستند.

واژه‌های کلیدی

پارامترهای تنوع ژنتیکی

تنوع مولکولی

گیاهان دارویی

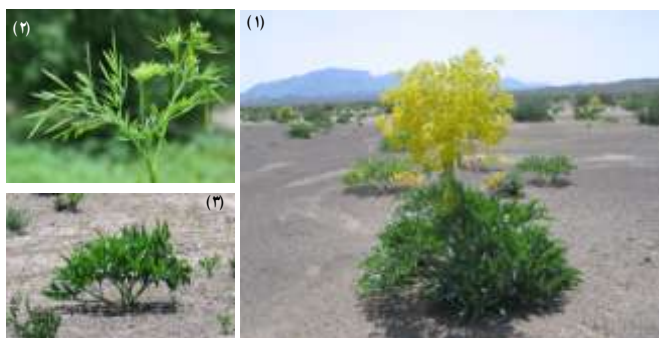
نشانگر مولکولی

مقدمه

آنغوزه با نام علمی *Ferula assa foetida* L. متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) می‌باشد (Dehghani Elmi et al. 2012). جنس *Ferula* از گروه گیاهان علفی چند ساله یا مونوکاریک^۱ می‌باشد، بدین معنی که در تمام طول عمر خود تنها یک بار گل می‌دهد (شکل ۱). این گیاه دارای دو گل نر و ماده می‌باشد که اغلب توسط حشرات گرده افشانی می‌کند و میوه آن نیز شیزوکارب مسطح می‌باشد (Rajabian et al. 2007; Zomorodian et al. 2018).

۱۳۰ گونه یکی از بزرگ‌ترین جنس‌ها در خانواده چتریان بوده که ۵۳ گونه آن در فلور ایرانیکا گزارش شده است (Zare et al. 2010). تنها راه تجدید حیات طبیعی گیاه آنغوزه از طریق بذر است (Iranian Herbal Pharmacopoeia 2002). هر ساقه‌ی گل دهنده انبوهی از بذر را در دستجات چترمانندی تولید می‌نماید. استاندارد قوه نامیه بذر بیش از ۸۰ درصد است و تا ۳ سال قوه نامیه خود را حفظ می‌کند. استاندارد خلوص آن نیز حدود ۸۰ درصد می‌باشد (Raghavan 2007). خاستگاه اصلی آنغوزه استپ‌های ایران و مناطقی از افغانستان می‌باشد (Leaman 2006; Ross 2007). صمغ الثورزینی این گیاه از گذشته‌های دور کاربرد غذایی و دارویی فراوانی دارد (Hassanabadi et al. 2019). در طب سنتی آسیا، صمغ ریشه آنغوزه به‌عنوان تنظیم سیستم هاضمه، پاک‌کننده و تحریک‌کننده پرزهای روده‌ای، کرم‌کش، خلط‌آور، ضدیبوست، داروی مسکن و اشتها آور تجویز می‌شود (Buddrus et al. 1985; Ross 2007; Duke and Ayensu 1985). در افغانستان جوشانده صمغ آنغوزه جهت درمان هیستری، سیاه سرفه و زخم معده مصرف می‌گردد (Mahran et al. 1973). متاسفانه طی سال‌های اخیر برداشت بی‌رویه و غیرعلمی (روش‌های برداشت سنتی) آنغوزه، سبب کاهش میزان رویش این گونه شده است. به‌همین جهت تراکم بوته‌های آنغوزه در مراتع به شدت کاهش یافته و نسل این گیاه مفید در معرض خطر انقراض قرار گرفته است و این موضوع اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه ارزشمند را دوچندان می‌کند (Zare et al. 2010). وضعیت تنوع ذخایر زیستی و روابط فیلولژنی جمعیت‌ها گام اولیه و اساسی در به‌نژادی و مدیریت آن‌ها است.

¹ Monocarpic



شکل ۱- (۱) گیاه گلدار آنغوزه، (۲) گیاه یک‌ساله آنغوزه، (۳) بوته چندساله آنغوزه

با توجه به نقش تنوع ژنتیکی در پیشبرد اهداف برنامه‌های اصلاح نباتات شناسایی این تنوع از طریق روش‌های مولکولی و غیرمولکولی با اهمیت خواهد بود (Kovatcheva et al. 2011). گیاهان دارویی بومی ایران دارای پراکنش قابل توجهی در نقاط مختلف کشور می‌باشند. ارزیابی جمعیت‌های وحشی در نگهداری و به‌کارگیری شایسته از ژرم پلاس‌های مناسب، ضروری به‌نظر می‌رسد. جهت حصول موفقیت در برنامه‌های به‌زراعی، نیاز به سیستمی جهت حفاظت از منابع ژنتیکی است. برآورد یک تخمین واقعی از سطح پراکنش تنوع ژنتیکی در گونه‌های مهم یکی از اهداف اصلی حفاظت ژنتیکی است. ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی روشی مطمئن می‌باشد که اطلاعات پایه‌ای مفیدی راجع به گیاهان فراهم می‌کند (Bhattacharyya et al. 2013). اطلاعات ناقص درباره تنوع ژنتیکی یک عامل محدودکننده جهت تولید انبوه و ایجاد بهترین واریته‌ها محسوب می‌شود. جهت برآورد تنوع ژنتیکی نیاز به داده‌های مولکولی است (Parashar and Malik 2014). نشانگرهای DNA یکی از بنیادی‌ترین نشانگرهایی هستند که در مطالعات مولکولی و ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و ابزاری قدرتمند جهت مطالعات بررسی ژنوم، درک ساختار و تخمین تنوع ژنتیکی به‌شمار می‌روند (Wunsch and Hormaza 2002). در دو دهه گذشته، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به‌طور گسترده‌ای با اهداف مختلف اصلاحی در گیاهان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند و گیاهان دارویی نیز از این روند مستثنی نیستند (Ashraf et al. 2016; DK et al. 2016). جهت تعیین تنوع ژنتیکی در گیاهان از نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود (Melito et al. 2016).

مشخص شد که استفاده از نشانگر ISSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه مناسب بوده است (Jafari et al. 2019). Pradeepreddy et al. (2002) بیان داشتند که ISSRها در آنالیز تنوع ژنتیکی در جنس *Eleusine* از نظر کیفیت و کمیت داده‌های حاصله، نسبت به RFLP و RAPD مفیدتر بوده‌اند. در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گیاه زنیان به‌کمک نشانگر ISSR مشخص شد که این نشانگر کارایی لازم جهت شناسایی چندشکلی در جمعیت‌های مورد بررسی را دارد و می‌تواند در مطالعات ساختار جمعیت مورد استفاده قرار گیرد (Fadaei et al. 2016). در این مطالعه از نشانگرهای ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ جمعیت آنگوزه که شامل ۹۰ ژنوتیپ از ۷ منطقه جغرافیایی مختلف، استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۹۰ ژنوتیپ آنگوزه از ۳۰ جمعیت مختلف جغرافیایی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲). کلیه جمعیت‌های جمع‌آوری شده توسط جهاد کشاورزی استان‌ها صورت گرفته است. در این مطالعه ۳۰ جمعیت جمع‌آوری شده از ۷ منطقه جغرافیایی مختلف منشأ گرفته است.

به‌دلیل وجود چند شکلی گسترده در بین جمعیت‌های آنگوزه نشانگرهای موفولوژیک نمی‌توانند تنوع درون جمعیت‌ها را به شکل مناسب نشان دهند (Pirmoradi 2012). ISSR یکی از نشانگرهای ملکولی کارآمد است. این‌آغازگرها معمولاً بین ۱۶ تا ۲۵ نوکلئوتید طول دارند. در هر واکنش فقط یک آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Reddy et al. 2002; Stevens et al. 2015; Ahmadi et al. 2015; Brito et al. 2016). اطلاعات توالی‌یابی جهت سنتز آغازگر نیست. این روش ساده و سریع است و نشانگرها به‌طور معمول چندشکلی زیادی نشان می‌دهند (Mittal and Dubey 2010; Semagn et al. 2006). از نشانگر ISSR جهت تعیین تنوع ژنتیکی در سطوح بین و درون گونه‌ای جهت تعیین فراوانی و میزان چندشکلی در توالی تکرارهای ریزماهواری در ژنوم و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی استفاده می‌شود از این آغازگرها جهت تخمین توسعه تنوع ژنتیکی در دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی، شامل برنج، گندم، ارزن، سیب زمینی، بارهنگ، به‌کار گرفته شده‌اند (Pradeep Reddy et al. 2002; Mukhtari 2009). از نشانگر ISSR در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی گیاهان تیره چتریان توسط Parashar and Malik (2014)، Salami et al. (2017) انجام شده است. در مطالعات صورت گرفته بر روی دو جمعیت آنگوزه از گونه *Ferula pseudalliacea*



شکل ۲- ۳۰ جمعیت آنگوزه جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف ایران

همانندسازی و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط نهایی تنظیم شد. محصول PCR توسط ژل آگارز ۱/۵٪ با بافر TBE تفکیک و با استفاده از رنگ آمیزی با Safeview انجام و عکس‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. پس از امتیازدهی الگوها، بر اساس وجود و یا عدم وجود باند به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. جهت تعیین کارایی آغازگرهای مورد استفاده معیارهای محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI)، قدرت تمایز (Rp)، به ترتیب بر اساس روابط ارائه شده توسط Powell et al. (1996) محاسبه شد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و همچنین تنوع درون آن‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx انجام شد (Peakall and Smouse 2006). جهت بررسی و مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از جمعیت‌ها پارامترهای ژنتیکی درصد لوکوس‌های چندشکل (PPL)، شاخص شانون (I)، تنوع ژنی نی (H)، تعداد الل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد الل‌های مؤثر (Ne)، ضریب تمایز ژنی (Gst) و جریان ژنی (Nm) با استفاده از نرم‌افزار POPGENE برآورد شدند (Yeh et al. 1997).

به منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا بذور هریک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در گلدان کشت شد و گیاهچه کامل پس از طی دوره دو ماهه جهت استخراج DNA بر اساس دستورالعمل CTAB تغییر یافته، مورد استفاده قرار گرفت (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۰/۸) مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ۱۳ آغازگر ISSR استفاده شد که مشخصات هریک از آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای آغازگرها واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر که شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix 2X PCR، ۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-PCR 100) BIORAD انجام شد. شرایط دمایی واکنش‌های PCR به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۴ چرخه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت‌سازی، دمای بهینه شده برای هریک از آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه جهت

جدول ۱- مشخصات توالی آغازگرهای ISSR و نتایج حاصل از تکثیر PCR در ۹۰ ژنوتیپ آنگوزه مورد مطالعه

آغازگر	توالی (5' 3')	Ta (°C)	TAB	NPB	PPB	PIC	Rp	MI
ISSR-1	DBDACACACACACACA	۵۵	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۳۸	۸/۸۸	۶/۰۸
ISSR-2	ACACACACACACACYG	۵۵	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۳	۶/۹۵	۴/۸
ISSR-3	GACAGACAGACAGACA	۵۵	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۳۸	۸/۳۳	۵/۷
ISSR-4	AGAGAGAGAGAGAGYGT	۵۵	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۴	۹/۱۳	۴
ISSR-5	ACACACACACACACC	۵۳	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۱	۶/۶۲	۴/۳۴
ISSR-6	GAGAGAGAGAGAGARC	۵۳	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۴	۷/۲۴	۴/۳۴
ISSR-7	CTCTCTCTCTTCTTG	۵۲	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۴	۹/۴۸	۴
ISSR-8	CTCTCTCTCTCTCTRC	۵۲	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰/۳۴	۹/۰۶	۶/۱۲
ISSR-9	CACACACACACACAG	۵۲	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۳۸	۷/۶۴	۴/۹۴
ISSR-10	CTCTCTCTCTCTCTRC	۵۵	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۵	۷/۶۲	۴/۹
ISSR-11	ACACACACACACACYA	۵۲	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۴	۷/۶۲	۴/۸
ISSR-12	GTGTGTGTGTGTGTGYG	۵۵	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۴۳	۹/۰۲	۵/۵۹
ISSR-13	GAGAGAGAGAGAGAYC	۵۲	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۴۳	۸/۶	۵/۱۶
	میانگین	۵۳/۵۳	۱۴/۳۸	۱۴/۳۸	۱۰۰	۰/۳۷	۸/۱۷	۴/۹۸

Ta: دمای اتصال آغازگر، TAB: تعداد کل قطعات تکثیری، NPB: تعداد قطعات تکثیری چندشکل، PPB: درصد چندشکلی، PIC: محتوای اطلاعات چند شکل، Rp:

قدرت تمایز، MI: شاخص نشانگر

نشان‌دهنده انتخاب صحیح آغازگرهای مورد استفاده جهت ارزیابی ژرم پلاسم‌های مورد مطالعه می‌باشد و بر این اساس می‌توان آغازگرهای مناسب با حداکثر چند شکلی را برای ژرم پلاسم‌های مشابه در مطالعات آتی توصیه نمود. علاوه بر شاخص‌های ذکر شده، شاخص Rp به‌عنوان معیاری جهت تمایز آغازگرهای به‌کار رفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. می‌توان بیان داشت که این شاخص توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد باندهای قابل امتیازدهی تعیین می‌کند (Prevost and Wilkinson 1999). دو آغازگر ISSR-5 و ISSR-7 به‌ترتیب کم‌ترین (۶/۶۲) و بیشترین (۹/۴۸) مقدار شاخص Rp را تعیین کردند به نحوی که میانگین این شاخص (۸/۱۷) به‌دست آمد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق کارایی لازم جهت انجام سایر تجزیه‌های ژنتیکی را داشته و نتایج به‌دست آمده با یافته‌های برخی محققین همچون Fawad et al. (2019) و Qaderi et al. (2019) در بالا بودن شاخص‌های PIC و Rp مطابقت داشت (جدول ۱).

برآورد تنوع ژنتیکی بین و درون‌گونه‌ای: نتایج حاصل از تجزیه واریانس ملکولی حاصل از ۱۳ آغازگر ISSR نشان داد که ۸ درصد از تغییرات کل مربوط به تنوع بین جمعیتی است در حالی که ۹۲٪ از تغییرات با تنوع درون جمعیتی قابل توجیه می‌باشد (جدول ۲). به‌عبارت دیگر می‌توان بیان داشت که آغازگرهای ISSR تنوع ژنتیکی معنی‌داری را بین و درون خویشاوندان وحشی نشان دادند. افزون بر واریانس بین و درون گروهی مقادیر Gst و Nm برای هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه و در جدول ۲ درج شده است. Gst به‌عنوان یک شاخص مهم در تعیین واریانس ژنتیکی در نظر گرفته می‌شود در واقع این شاخص نسبت تنوع بین جمعیتی را به تنوع کل نشان می‌دهد (Nei 1978). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش مقدار Gst برای ۹۰ ژنوتیپ مورد بررسی ۰/۵۳ بود که این میزان نشان دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های مورد مطالعه گزارش نمود. علاوه بر این آماره Nm به‌عنوان معیاری از تعداد مهاجرت‌های صورت گرفته از هرنسل در نظر گرفته می‌شود. نتایج نشان داد که میزان Nm برابر ۱/۴۴ است و بر اساس تئوری رایت (wright 1951) و براساس مطالعات

علاوه بر این، ضرایب تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف براساس معیار نی محاسبه شد (Nei 1978). گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش Neighbor-Joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin صورت گرفت (Perrier et al. 2003). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx و با هدف ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد. علاوه بر این تجزیه ساختار جمعیت و گروه‌بندی جمعیت‌ها مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE صورت گرفت. سپس به‌منظور یافتن تعداد گروه‌های واقعی از نرم‌افزار STRUCTURE HARVESTER استفاده شد (Earl et al. 2012).

نتایج و بحث

شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی آغازگرها: در جدول ۱ خلاصه‌ای نتایج به‌دست آمده از چند شکلی و کارایی نشان‌گرهای ISSR نشان داده شده است. از مجموع ۱۳ آغازگر بررسی شده در این پژوهش در مجموع تعداد ۱۸۶ قطعه تکثیر شد که تمامی آن‌ها چند شکل بوده‌اند. تعداد کل قطعات تکثیری (TAB) از ۱۲ (مربوط به آغازگرهای ISSR-11 و ISSR-13) تا ۱۸ قطعه (مربوط به آغازگر ISSR-8) با میانگین ۱۴/۳۸ قطعه متغیر بود. درصد قطعات چند شکل (PPB) ۱۰۰٪ بود و از بین ۱۳ آغازگر استفاده شده کلیه آغازگرها چند شکلی کاملی را نشان دادند. در بین پارامترهای مورد مطالعه شاخص‌های PIC و Rp از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا این پارامتر یک سیستم نشانگری را در تعیین اثر بخشی و پتانسیل آغازگرهای استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی و قدرت تمایز نمونه‌های مورد بررسی رانشان می‌دهد (Powell et al. 1999). به‌عبارت دیگر شاخص PIC احتمال تشخیص چند شکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد الل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است (Budak et al. 2004) شاخص PIC دارای میانگین ۰/۳۷ و دامنه تغییراتی بین ۰/۳ (مربوط به آغازگر ISSR-2) و ۰/۴۳ (مربوط به آغازگرهای ISSR-12 و ISSR-13) داشت (جدول ۱). بالا بودن درصد محتوای اطلاعات چند شکل

۱/۹۳ بود که در مقایسه با این مقدار، برای جمعیت خراسان جنوبی (۰/۹۵) بیش‌تر بود. همین برتری در مورد سایر شاخص‌ها مانند، تعداد الل مؤثر (در جمعیت کرمان ۱/۶۲ را در برابر ۱/۲ در جمعیت خراسان جنوبی) و هتروزیگوسی (۰/۳۵) در جمعیت کرمان در برابر ۰/۱۲ (در جمعیت خراسان جنوبی) و شاخص شانون (در جمعیت کرمان ۰/۵۱ در برابر ۰/۱۸ در جمعیت خراسان جنوبی) مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که جمعیت کرمان نسبت به سایر جمعیت‌های مورد مطالعه از میزان تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار است. گروه‌بندی ۹۰ ژنوتیپ مورد مطالعه از ۳۰ جمعیت بر اساس ۷ منطقه جغرافیایی متفاوت، و طبق داده‌های حاصل از ISSR با استفاده از ضریب جاکارد و الگوریتم Neighbour-joining صورت گرفت که دندروگرام حاصل در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به دندروگرام حاصل کلیه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۵ دسته قرار گرفت (دسته اول: شامل جمعیت‌هایی از استان‌های اصفهان، فارس، خراسان رضوی دسته دوم: شامل جمعیت‌های از استان‌های کرمان، فارس، یزد، خراسان جنوبی، اصفهان، دسته سوم: شامل استان‌های هرمزگان، کرمان، اصفهان، فارس، دسته چهارم: جمعیت‌هایی از استان‌های کرمان و هرمزگان و دسته پنجم: شامل جمعیت‌هایی از استان کرمان و هرمزگان بود).

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر نشان داد که ژنوتیپ‌های مربوط به هر جمعیت به شکل کامل از یک دیگر تفکیک نشده است و ژنوتیپ‌های مربوط به مناطق جغرافیایی متفاوت به‌صورت مختلط کنار هم دسته‌بندی شدند و این موضوع نشان‌دهنده آن است که این ژنوتیپ‌ها شباهت ژنتیکی زیادی با یک دیگر داشته و احتمالاً تبدلات ژنتیکی فراوانی بین آن‌ها رخ داده است (شکل ۳).

(2017) Pour-Aboughadareh et al. زمانی که میزان $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی مانع از ایجاد تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها شده و این مقادیر نشان‌دهنده امکان وقوع جریان ژنی بین خویشاوندان وحشی این گیاه بوده است. (1997) Domolim-Lopergue et al. بیان داشتند که توزیع واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها تابعی از میزان جریان ژنی بین آن‌ها می‌باشد و وجود آن وابسته به اندازه و درجه ایزوله بودن جمعیت‌ها و مقدار پراکنش بذرها در بین جمعیت‌ها دارد. بالا بودن سهم واریانس درون جمعیتی نسبت به واریانس بین جمعیتی بر اساس نتایج حاصل از نشانگرهای مختلف مانند ISSR, SCoT, CBDP در بسیاری از مطالعات ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی گزارش شده است (Goodarzi et al. 2015; Etminan et al. 2016; Pour-Aboughadareh et al. 2017; Qaderi et al. 2019). دامنه تغییرات میزان فاصله ژنتیکی در تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR بین دو مقدار ۰/۱۳ تا ۰/۸ با متوسط ۰/۴۴ به‌دست آمد. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی (۰/۸) بین جمعیت‌های فریدون شهر و بوانات مشاهده شد و کمترین میزان فاصله ژنتیکی (۰/۱۳) بین جمعیت‌های هجدک و جیرفت به‌دست آمد. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی، شاخص‌های ژنتیکی جمعیت شامل تعداد الل‌های مؤثر، شاخص اطلاعات شانون، شاخص تنوع ژنی نی، درصد چند شکلی مکان‌های ژنی برای هر جمعیت محاسبه شده که نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است. در مقایسه بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت کرمان شامل ۳۳ ژنوتیپ بر اساس مقادیر تعداد الل‌های مؤثر، مقادیر هتروزیگوسی، شاخص شانون و تعداد کل الل‌ها از تنوع بیش‌تری برخوردار بود. متوسط تعداد کل الل‌ها در جمعیت کرمان برابر با

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های ملکولی (AMOVA) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر ISSR

Nm	Gst	درصد واریانس تبیین شده	واریانس تخمینی	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۱/۴۴	۰/۵۳	۸٪	۲/۸۴	۶۵/۹۱۵	۳۹۵/۴۸۸	۶	بین جمعیت
		۹۲٪	۳۲/۹۷	۳۲/۹۷	۲۷۳۶/۸۱	۸۳	درون جمعیت
		۱۰۰٪	۳۵/۸۱	۰	۳۱/۳۲	۸۹	کل

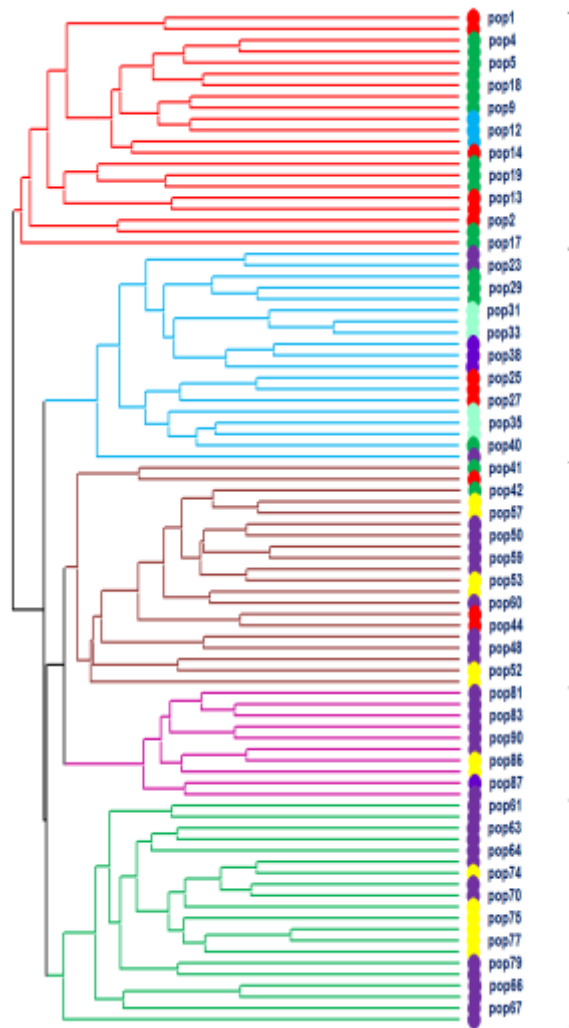
جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی محاسبه شده در جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگر ISSR

جمعیت	شاخص آماری	N	Na	Ne	I	He	PPL
اصفهان	میانگین		۱/۸۲	۱/۵۷	۰/۴۹	۰/۳۳	۸۹/۷۸٪
	خطای استاندارد	۱۲	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	
فارس	میانگین		۱/۸۴	۱/۵۹	۰/۵۰	۰/۳۴	۹۲/۴۷٪
	خطای استاندارد	۱۸	۰/۰۳۹	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	
خراسان رضوی	میانگین		۱/۱۴	۱/۳۳	۰/۲۶	۰/۱۸	۴۴/۰۹٪
	خطای استاندارد	۳	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱	
کرمان	میانگین		۱/۹۳	۱/۶۲	۰/۵۱	۰/۳۵	۹۷/۲۴٪
	خطای استاندارد	۳۳	۰/۰۲۶	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	
یزد	میانگین		۱/۳۳	۱/۳۹	۰/۳۳	۰/۲۲	۶۰/۲۲٪
	خطای استاندارد	۶	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱	
هرمزگان	میانگین		۱/۸۲	۱/۵۶	۰/۴۷	۰/۳۲	۸۹/۲۵٪
	خطای استاندارد	۱۵	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	
خراسان جنوبی	میانگین		۰/۹۵	۱/۲۰	۰/۱۸	۰/۱۲	۳۳/۳۳٪
	خطای استاندارد	۳	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	
		۱۲/۸۵	۱/۴۷	۱/۴۷	۰/۳۹	۰/۲۶	۷۲/۲۰٪
		۰/۲۷	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	

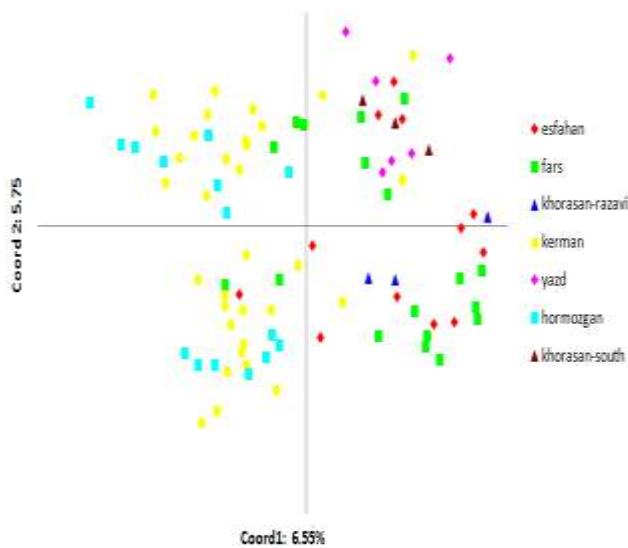
اختلاط در ژرم پلاسم بر مخلوط بودن نمونه‌های مورد مطالعه صحنه می‌گذارد. بدین معنا که هر فرد ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از نسل خود در جمعیت دیگر به ارث برده باشد. مطالعه حاضر نشان داد که جمعیت‌های آنگوزه مورد بررسی بر اساس مکان و یا نام‌گذاری‌های مشابه تفکیک نمی‌شوند و جمعیت‌ها دارای اختلاط می‌باشند به همین منظور می‌توان بیان داشت که به دلیل شکل بذر خانواده چتریان و سبکی آن‌ها سبب می‌شود، به راحتی در محدوده وسیع‌تری جابه‌جا شوند و تبادل ژنی را گسترش دهند (Tajbakht et al. 2018).

به‌طور کلی می‌توان بیان داشت که آغارگرهای مورد استفاده در این پژوهش پتانسیل بالایی در نشان دادن روابط ژنتیکی و گروه‌بندی افراد بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها دارد و در نهایت نتایج این پژوهش نشان داد که این آغازگرها به خوبی قادر به تفکیک جمعیت‌ها از یک‌دیگر بوده‌اند.

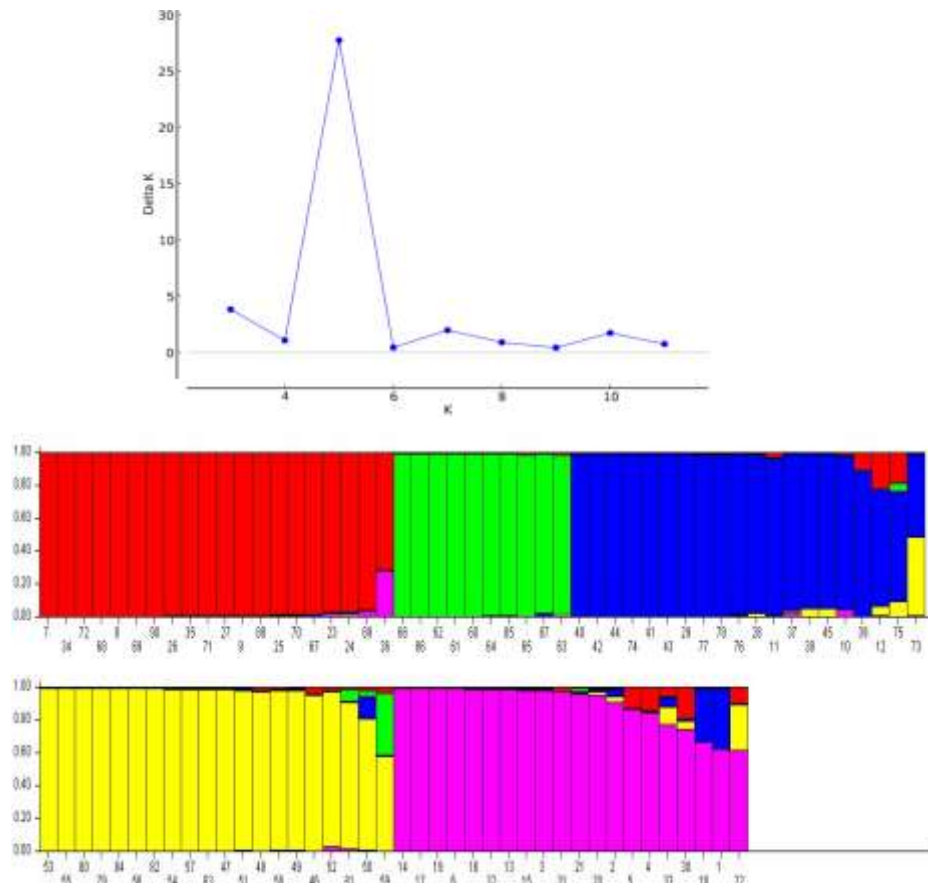
در بای پلات حاصل از تجزیه PCoA سه مؤلفه‌ای نخست به ترتیب با ۶/۵۵ و ۵/۷۵ و ۴/۸۴ درصد و در مجموع ۱۷/۱۴ درصد از کل تغییرات ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های آنگوزه را توجیه نمودند (شکل ۴). نتیجه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی PCoA نیز با نتایج حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای مطابقت داشت. میزان PCoA نشان دهنده پراکندگی خوب نشانگر روی ژنوم است. نتایج به دست آمده با یافته‌های (Tajbakht et al. 2018)، (2019) Jafari et al. مطابقت داشت. نتایج حاصل از بررسی ساختار جمعیت نیز نشان داد، تعداد ۵ زیر جمعیت واقعی در مجموع ۹۰ ژنوتیپ بررسی شده وجود دارد (K=5). با توجه به نتایج به دست آمده از این تجزیه مقدار K در حالت ۵ در حد بهینه قرار داشت (شکل ۵). با توجه به الگوی به دست آمده از تفکیک جمعیت‌ها می‌توان بیان داشت که گاهی طبقه‌بندی ژنوتیپ‌ها مستقل از منشاء جغرافیایی آن‌ها است. نتایج این پژوهش نشان داد که ۳۰ جمعیت جمع‌آوری شده از ۷ منطقه جغرافیایی مختلف به‌طور کامل و بر اساس منشاء هر یک از نمونه‌ها از یک دیگر تفکیک نشده و اختلاط در بین نمونه‌ها در شکل ۴ به خوبی نمایان است. این



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۰ ژنوتیپ آنگوزه براساس ضرایب فاصله جاکارد و الگوریتم Neighbour-Joining



شکل ۴- پراکنش ۹۰ ژنوتیپ آنگوزه بر اساس دو بردار نخست حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از داده‌های ISSR



شکل ۵- ساختار جمعیت ۹۰ ژنوتیپ مورد مطالعه آنغوزه و دسته‌بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های حاصل از آغازگر ISSR

توانستند ژنوتیپ‌های بومی آنغوزه را از هم تفکیک کنند و این روش ابزاری مناسب جهت مطالعه تنوع درون گونه‌ای آنغوزه است. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که جمعیت کرمان نسبت به سایر جمعیت‌های مورد مطالعه از میزان تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار است. نتایج حاصل از بررسی ساختار جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Structure نیز تبادل ژنتیکی فراوان و اختلاط جمعیت‌ها را تأیید می‌نماید. این نتایج حاکی از آن هستند که طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های آنغوزه مستقل از منشأ جغرافیایی آن‌ها است. علاوه بر این، با توجه به شاخص‌های تعیین کننده کارایی سیستم نشانگری مشخص شد، آغازگرهای تعیین شده در این تحقیق به خوبی سطح بالایی از چند شکلی را در درون ژنوتیپ‌های ارزیابی شده نشان داده‌اند که به نوبه خود بیانگر کارایی این سیستم در مطالعات ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت‌های این گیاه دارویی ارزشمند می‌باشد.

به‌طور کلی در ارتباط با جمعیت‌های وحشی فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده تشابه ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. در گونه‌های دگرگشن به‌علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها کم بوده و تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که سطح بالای تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌های آنغوزه وجود دارد که نیاز است از این تنوع به‌عنوان یک فرصت در راستای برنامه‌های اصلاحی و ایجاد جمعیت پایه استفاده نمود.

نتیجه‌گیری کلی

اطلاع از روابط ژنتیکی گونه‌های وحشی جهت بهره‌وری موفق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود آن‌ها امری ضروری است. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله تلافی، پیوستگی (Linkage)، مهاجرت (Migration) و خویشاوندی (Inbreeding) دارای پیچیدگی‌هایی است. به‌طور کلی نتایج به دست آمده از این تحقیق بیانگر تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در درون جمعیت‌های آنغوزه می‌باشد. آغازگرهای ISSR

سپاسگزاری

زحمات جناب آقای مهندس محمد خیاط تهرانچی و جناب آقای دکتر امیررضا زارع کاریزی در راستای جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی هستند.

نویسندگان مقاله سپاسگزار زحمات جناب آقای دکتر علیرضا پورابوقداره به جهت راهنمایی در آنالیزهای مولکولی و سپاسگزار

منابع

- Ahmadi M, Modarres-Sanavy SAM, Kafi M, Sefidkon F, Malekzadeh Shaaroudi S (2015) Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal plant Nowruzak (*Salvia leriifolia*) using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23:1-12. (In Farsi).
- Ashraf J, Malik W, Iqbal MZ, Ali Khan A, Qayyum A, Noor E, Abid MA, Naseer Cheema HM, Ahmad MQ (2016) Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR ISSR and morphological markers. Journal of Agricultural Science and Technology 18:517-531.
- Bhattacharyya PS, Kumaria S, Kumar S, Tandon P (2013) Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl an endangered medicinal orchid species. Gene 529:21-26.
- Budak H, Dweikat P (2004). Application of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for characterization of cool and warm season turf grass species. Hort Science 39:955-958.
- Buddrus J, Bauer H, Abu-Mustafa E, Khattab A, Mishaal S, El-Khrisy EAM, Linscheid Foetid M (1985) A sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assa-foetida*. Phytochem 24:869-70.
- Dehghani Elmi Z, Amiri H, Ahmadvand H, Bagheri Sh (1391) Comparison of antioxidant activity of ethanolic extract of Foetida-Ferula assa in Lorestan province. The Third National Conference on Agricultural Biotechnology of Iran (Plant Livestock and Industry) Ministry of Science Research and Technology - Ferdowsi University of Mashhad (In Farsi).
- DK S, Tewari R, NK S, Singhsh S (2016) Genetic Diversity Cucumber using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Transcriptomics 4:1-4.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.
- Duke JA, Ayensu ES (1985) Medicinal plants of China Reference publications Inc Algonac Michigan pp: 52-361.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics 146:1475-1487.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mohammadi R, Ahmadi-Rad A, Noori A, Mahdavian Z, Moradi Z (2016) Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. Biotechnology and Biotechnological Equipment 30:1075-1081.
- Earl, Dent A, Holdt V, Bridgett M (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4:359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.
- Fadaei Heidari E, Rahimmalek M, Mohammadi S, Ehtemam MH (2016) Genetic structure and diversity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) populations based on molecular morphological markers and volatile oil content. Ind Crops Prod 92:186-196. (In Farsi).
- Goodarzi F, Darvishzadeh R, Hassani A (2015) Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. Journal of Plant Molecular Breeding 3:18-34.
- Hassanabadi M, Ebrahimi M, Farajpour M, Dejahang A (2019) Variation in essential oil components among Iranian *Ferula assa-foetida* L accessions. Industrial crops and products 140:111-598 (In Farsi).
- Iranian Herbal Pharmacopoeia (2002) Ministry of Health and Medical Education Food and Drug Deputy Tehran.
- Jafari H, Adel S, Hassan S, Karimian A (2018) Investigation of morphological characteristics and genetic relationships between two populations of *Ferula pseudalliacea* in Yazd province. Genetic research and breeding of rangeland and forest plants in Iran 26:221-232 (In Farsi).
- Jafari SH, Sepehry A, Soltanloo H, Karimian AA (2019) Genetic differentiation between bitter and sweet asafetida plants using ISSR markers. Molecular biology reports 46:1069-78.
- Kovatcheva N, Zheljzakov VD, Astatkie T (2011) Productivity oil content composition and bioactivity of oil-bearing rose accessions. Hort Science 46:710-714.
- Leaman DJ (2006) Medicinal plant conservation Newsletter of the medicinal plant specialist group of the IUCN species survival commission Silphion 13:24- 6.
- Mahran G, Alfay T, Ansari S (1973) Phytochemical study of volatile oil of Afghanistan asafetida. Bull Fac Pharm Cairo Univ 12:101-7 (In Farsi).
- Melito S, Bella SL, Martinelli F, Cammalleri I, Tuttolomondo T, Leto C, Fadda A, Molinu MG, Mulas M (2016) Morphological chemical and genetic diversity of wild myrtle (*Myrtus communis*L) populations. Sicily Turk J Agric For 40:249-261.

- Mittal N, Dubey AK (2010) Microsatellite markers –A new particle of DNA based markers in molecular genetics. *Phcog Rev* 3:235-246.
- Mukhtari N (1389) Identification and isolation of microsatellite markers in order to study the genetic diversity of safflower genotypes. Master Thesis in Biotechnology Faculty of Agriculture Isfahan University of Technology.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* 89:583-590.
- Parashar M, Malik C (2014) Appraisal of Genetic Diversity in *Cuminum cyminum* L using Molecular Markers. *LS: International Journal of Life Sciences* 3:143-156.
- Peakall R, Smous P (2012) GenAlEx 65: genetic analysis in Excel Population genetic. Yeh FC Yang RC and Boyle T (1999) 'Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis (POPGENE) Version 131' Available from: <http://ftp.microsoft.com/softlib/MSLFILES/HPGLEXE>.
- Pirmoradi MR (2012) Morphological physiological phytochemical and genetical evaluation of Asafoetida in Kerman Province. PhD Thesis Horticulture Science Faculty of Agriculture Tarbiat Modares University Iran. (In Farsi).
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M (2017) Assessment of genetic diversity. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107-112.
- Raghavan S (2007) Handbook of spices seasonings and flavorings 3rd ed CRC press USA 69-70.
- Rajabian T, Sabura b, Hassani O, Falah Hosseini H (2007) Effect of Gibberellic Acid and Cold on Angula Seed Germination (*Ferula assa-foetida* L). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research* 23:391-4 (In Farsi).
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Roa AC, Maya MM, Duque MC, Tohme J, Allem AC, Bonierbale MW (1997) AFLP analysis of relationships among cassava and other Manihot species. *Theoretical and Applied Genetics* 95:741-750.
- Ross IA (2007) Medicinal plants of the world: Chemical Constituents traditional and modern medicinal uses. 3rd ed Humana Press Inc USA pp:223-34.
- Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH (2017) Genetic variability of outcross and selfed fennel based on morphological and ISSR markers.
- Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotech* 5:2540-2568.
- Stevens MI, Clarke AC, Clarkson FM, Goshorn M, Gemmill ChEC (2015). A New Zealand case study using AFLP and ISSR data from mahoe (*Melicactus ramiflorus*). *New Zealand Journal of Ecology* 39:190-197.
- Tajbakht P, Talebi M, Rahimmalek M (2018) Genetic diversity among and within *Ferula asafoetida* populations using molecular and phytochemical markers. *Phytochemistry*. Nov 1:155:19-29.
- Wünsch A, Hormaza JI (2002) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125:59-67.
- Zare AR, Solouki M, Omid M, Irvani N, Nezhad NM, - Rezazadeh S (2010) Callus Induction and Plant Regeneration in *Ferula assafoetida* L (Asafoetida) an Endangered Medicinal Plant. *Trakia Journal of Sciences* 8:11-18 (In Farsi).
- Zomorodian K, Saharkhiz J, Pakshir K, Immeripour Z, Sadatsharifi A (2018) The composition antibiofilm and antimicrobial activities of essential oil of *Ferula assafoetida* oleo-gum-resin Biocatal. *Agric Biotechnol* 14 300-304 (In Farsi).