

## بررسی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های رازیانه (*Foeniculum* *Vulgare Mill.*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

### Genetic Diversity assessment of some Fennel (*Foeniculum* *Vulgare Mill.*) Populations Using ISSR Molecular Markers

بابک کریمی ترکی<sup>۱\*</sup>، جلال صبا<sup>۲</sup>، احسان محسنی فرد<sup>۳</sup>، مجید پوریوسف<sup>۳</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
- ۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
- ۳- دانشیاران، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

Karimi Tarki B<sup>\*1</sup>, Saba J<sup>2</sup>, Mohsenifard E<sup>3</sup>, Pouryosef M<sup>3</sup>

- 1- PhD Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
- 2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
- 3- Associate Professors, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: babakkarimi@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۳)

#### چکیده

رازیانه (*Foeniculum Vulgare Mill.*) یک گیاه دارویی مهم با مصارف بسیار متنوع می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی رازیانه جهت حفظ ذخایر ژنتیکی و برنامه‌های به‌نژادی این گیاه حائز اهمیت است. این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاه رازیانه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR صورت گرفت. این جمعیت‌ها شامل ۳ جمعیت از کشور ترکیه و ۱۵ جمعیت بومی مناطق مختلف ایران بودند که تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR بررسی شد. نتایج تجزیه با نشانگر ISSR تمایز و تنوع موجود بین جمعیت‌های رازیانه را آشکار کرد. از تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی مجموعاً ۱۰۸ باند امتیازدهی شد که از این تعداد ۶۴ باند چندشکل بودند. تعداد باندها از سه باند برای آغازگر UBC894 تا ۱۰ باند برای آغازگر UBC876 متغیر بود. بیشترین و کمترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC812 با ۰/۳۷ و UBC848 با ۰/۰۶ بود که بیانگر آن است که آغازگر UBC812 نسبت به سایر آغازگرهای مورد بررسی دارای اطلاعات مفید بیشتر و پراکندگی مناسب در کل ژنوم جمعیت‌های مورد بررسی بوده است. میانگین شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) معادل ۰/۱۸، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) ۲/۲۸، شاخص نشانگر (MI) ۰/۵۰ و توان تفکیک (RP) ۱/۶۷ به‌دست آمد. با توجه به الگوی گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به روش WARD بر اساس ضریب تشابه دایس اغلب جمعیت‌های مختلف رازیانه با منشأ جغرافیایی نزدیک، در یک گروه قرار گرفتند که این امر می‌تواند نشان‌دهنده مطابقت فاصله ژنتیکی به دست آمده از داده‌های ISSR با منشأ جغرافیایی جمعیت‌های مختلف رازیانه باشد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جمعیت‌های ترکیه (آکدنیز، مرسین و قونیه) کمترین شباهت را با سایر جمعیت‌ها دارند، که این امر می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های ژنتیکی یا محیطی خاص این مناطق باشد. نتایج آزمایش نشان می‌دهد نشانگرهای به‌کاررفته در این آزمایش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی رازیانه مناسب بوده و پیشنهاد می‌شود برای رسیدن به هتروزیس بالا در برنامه‌های به‌نژادی، از جمعیت‌هایی که در گروه‌های دور از هم قرار دارند به‌عنوان والدین تلاقی‌ها استفاده شود.

#### واژه‌های کلیدی

تجزیه خوشه‌ای

چندشکلی

رازیانه

نشانگر مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

داده‌هایی که از روش آنالیز مولکولی و ارتباط آن با داده‌های حاصل از صفات فنولوژیکی و شیمیایی به دست می‌آید، می‌تواند کار ما را در تعیین دقیق تنوع ژنتیکی تسهیل کند (Abdel-Sattar et al. 2024).

انتخاب نشانگر مولکولی کارآمد برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بسیار مهم است (Nam et al. 2020). در میان نشانگرهای مولکولی، نشانگر<sup>1</sup> ISSR که یک نشانگر مبتنی بر PCR<sup>2</sup> است، پتانسیل بالایی برای تشخیص تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی دارد (hussain et al. 2020). نشانگرهای ISSR به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تعیین روابط در هر دو سطح جمعیت و گونه در میان طیف متنوعی از گونه‌های گیاهی، از جمله انواع مختلف گیاهان معطر و دارویی استفاده شده است. برای مثال، Akçali (2020) در بادیان رومی، (Farajpour et al. 2012) در بومادران، (Mahgoub et al. 2025) در درمنه، (Elsherbeny et al. 2019) در آویشن و (Anabat et al. 2007) در زعفران برای مطالعه تنوع ژنتیکی از این نشانگرها استفاده کرده‌اند؛ همچنین (Salami et al. 2018، Choudhary et al. 2018، Yadav et al. 2017، Gehan and Alhamd 2015، Grover and malik 2017) و (Bahmani et al. 2012) در گیاه رازیانه نشانگرهای ISSR را به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌کاربرده‌اند.

تخمین و ارزیابی چندشکلی مولکولی می‌تواند ما را برای درک درست تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی و تفاوت‌های افراد هدایت کند. همچنین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) حاصل از آنالیز داده‌های نشانگر ISSR، اغلب برای اندازه‌گیری میزان اطلاعات یک نشانگر ژنتیکی برای مطالعات مرتبط استفاده می‌شود (bidyananda et al. 2024).

نشانگر ISSR کاربردهای زیادی در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری، شناسایی رقم، تجزیه فیلوژنتیکی داشته و انتخاب دقیق و مناسب والدین برای تولید هیبریدهای قوی ضروری است (Akçali Giachino et al. 2025). مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف رازیانه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR انجام شده است و هم‌زمان بررسی

رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) با نام انگلیسی Fennel یک گیاه معطر و دارویی متعلق به خانواده Apiaceae است. در مناطق مدیترانه‌ای تیپ‌های رشدی یک‌ساله، دوساله تا چندساله از این گیاه وجود دارند (khammassi et al. 2022; Gundesli et al. 2021). گیاه رازیانه دگرگشن و نسبت به خودگشنی بسیار حساس بوده و خودگشنی در آن موجب کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش پس‌روی ژنتیکی می‌شود (Shojaifar et al. 2021). این گیاه در ایران پراکندگی وسیعی داشته و تا ارتفاع ۲۱۰۰ متر از سطح دریا به‌صورت خودرو رشد می‌کند (Salami et al. 2016). گیاه رازیانه به‌دلیل سازگاری به شرایط مختلف آب و هوایی، سمیت فلزات، مقاومت به خشکی و نیاز آبی کم مورد توجه است (Hosseini et al. 2022). تمامی قسمت‌های این گیاه خوراکی است و همچنین به‌طور سنتی این گیاه به‌عنوان ضد نفخ، درمان سوءهاضمه و ادرارآور شهرت داشته و همچنین برای معالجه بیماری‌های تنفسی و گوارشی استفاده می‌شود (Diao et al. 2023; Noreen et al. 2014). علاوه بر این، خواص ضد میکروبی در مقابل تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها، خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است (Khan et al. 2022). اثرات ضد پیری کرم‌های ساخته‌شده از عصاره میوه رازیانه در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (Misra et al. 2025).

گیاهان در درون یک گونه از نظر ریخت‌شناسی، ترکیبات بیوشیمیایی، سیتولوژی و ژنتیکی با یکدیگر تفاوت دارند (Bhanu 2017). بررسی تنوع ژنتیکی به لحاظ علمی ارزشمند بوده و در راستای مدیریت و حفظ منابع ژنتیکی گونه‌ها نیز اهمیت دارد (Magon et al. 2025). در دهه‌های اخیر، روش‌های مختلفی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان توسعه پیدا کرده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به روش‌های مولکولی اشاره کرد. تکنیک‌های مولکولی روشی نسبتاً ساده و کارآمد برای آشکارسازی تنوع ژنتیکی، چندشکلی ژنتیکی، بررسی شباهت‌ها و فواصل فیلوژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی هستند. نشانگرهای مولکولی از نظر کاربرد، امکانات مورد نیاز، حساسیت و دقت تفاوت داشته و به دو گروه نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی DNA تقسیم می‌شوند (Akçali Giachino et al. 2025; Chukwu et al. 2019).

<sup>1</sup> Inter-Simple Sequence Repeat

<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

کارایی این نشانگرها در تعیین تنوع ژنتیکی در گیاه رازیانه نیز

مدنظر بوده است.

و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد.

جدول ۱- محل‌های جمع‌آوری جمعیت‌های رازیانه

| ردیف | نام محل جمع‌آوری جمعیت‌های رازیانه | ردیف | نام محل جمع‌آوری جمعیت‌های رازیانه |
|------|------------------------------------|------|------------------------------------|
| ۱    | آذربایجان غربی، ارومیه             | ۱۰   | زنجان، ابهر                        |
| ۲    | اراک                               | ۱۱   | زنجان                              |
| ۳    | اصفهان                             | ۱۲   | فارس، شیراز                        |
| ۴    | اصفهان، نجف‌آباد                   | ۱۳   | کاشان، تمشک                        |
| ۵    | ترکیه، آکدیز                       | ۱۴   | کرمانشاه، صحنه                     |
| ۶    | ترکیه، قونیه                       | ۱۵   | یزد                                |
| ۷    | ترکیه، مرسین                       | ۱۶   | همدان، مؤسسه ابن سینا              |
| ۸    | خراسان، مشهد                       | ۱۷   | همدان، ملایر                       |
| ۹    | خراسان شمالی، شیروان               | ۱۸   | همدان، رزن                         |

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل ۱۵ جمعیت جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و ۳ جمعیت از کشور ترکیه بود که به صورت بذر جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱). نمونه گیری از برگ گیاهان انجام و نمونه‌ها بلافاصله با ازت مایع فریز شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی با روش (doyle and doyle 1990) با اندکی تغییر (استفاده از PVP ۳ درصد در بافر اولیه برای حذف پلی‌فنول‌ها و  $\beta$  مرکاپتواتانول ۲ درصد برای جلوگیری از اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها و نوکلئازها و افزودن CTAB/NaCl برای رسوب‌دهی چند مرحله‌ای و دقیق‌تر در گیاهان دارای ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی بالا) از مقدار حدوداً ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه گیاه انجام شد. کیفیت و غلظت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر نانودراپ

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR به کار برده شده در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه

| شماره آغازگر<br>Number of primer | نام آغازگر<br>Primer's name | توالی آغازگر<br>Primer's sequence 5'→3' | دمای اتصال (C°)<br>Annealing temperature |
|----------------------------------|-----------------------------|---|--|
| ISSR1                            | UBC826                      | ACA CAC ACA CAC ACA CC                  | 52                                       |
| ISSR2                            | UBC835                      | AGA GAG AGA GAG AGA GYC                 | 55                                       |
| ISSR3                            | UBC899                      | CAC ACA CAC ACA CAC AA                  | 50                                       |
| ISSR4                            | UBC894                      | CTC TCT CTC TCT CTC TA                  | 50                                       |
| ISSR5                            | UBC811                      | GAG AGA GAG AGA GAG AC                  | 52                                       |
| ISSR6                            | UBC812                      | GAG AGA GAG AGA GAG AA                  | 50                                       |
| ISSR7                            | UBC876                      | GAA GAA GAA GAA GAA GAA                 | 47                                       |
| ISSR8                            | UBC815                      | CTC TCT CTC TCT CTC TG                  | 52                                       |
| ISSR9                            | UBC848                      | CAC ACA CAC ACA CAC AG                  | 52                                       |
| ISSR10                           | UBC827                      | ACA CAC ACA CAC ACA CG                  | 52                                       |
| ISSR11                           | UBC834                      | AGA GAG AGA GAG AGA GYT                 | 53                                       |
| ISSR12                           | UBC857                      | ACA CAC ACA CAC ACA CYG                 | 55                                       |
| ISSR13                           | UBC807                      | AGA GAG AGA GAG AGA GT                  | 50                                       |
| ISSR14                           | UBC846                      | CAC ACA CAC ACA CAC ART                 | 53                                       |
| ISSR15                           | UBC890                      | GAG AGA GAG AGA GAG AT                  | 50                                       |
| ISSR16                           | UBC808                      | AGA GAG AGA GAG AGA GC                  | 52                                       |
| ISSR17                           | UBC800                      | AGA GAG AGA GAG AGA GRC                 | 52                                       |

در این پژوهش تعداد ۱۷ نشانگر ISSR (جدول ۲) برای مطالعه

تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد آزمایش انتخاب شد و برای

این منظور، اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل، ۱/۵ میکرولیتر

DNA رقیق شده (۷۵ نانوگرم)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس

در این پژوهش تعداد ۱۷ نشانگر ISSR (جدول ۲) برای مطالعه

بیشترین تعداد باند برای آغازگر UBC876 به تعداد ۱۰ باند بود (شکل ۱). درصد چندشکلی برای هر آغازگر از ۲۹ درصد (آغازگر UBC815) تا ۱۰۰ درصد (آغازگرهای UBC812 و UBC894) متغیر بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به ترتیب ۶۳۵ و ۳۷۶ باند بود (جدول ۳). بهمنی و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی ۲۵ اکوتیپ رازیانه را با ۷ آغازگر ISSR بررسی نمودند که از ۵۲ مکان شناسایی شده توسط آغازگرها، ۴۹ مکان چندشکل بودند که بیشترین باند توسط آغازگرهای ۲ و ۴ به تعداد ۹ عدد و کمترین باند توسط آغازگر ۵ به تعداد ۵ نشان داده شد (Bahmani et al. 2012). نیک‌کردار و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از نشانگر ملکولی SCoT و صفات ریخت شناسی تنوع ژنتیکی را در ۱۶ اکسشن مختلف رازیانه مورد بررسی قرار دادند، که در مجموع با ۵۵ باند تولید شده که SC5 با ۱۰ باند و SC29 با ۹ باند بیشترین تعداد باند را ایجاد نمود (Nikkerdar et al. 2018).

در این پژوهش، بیشترین میزان شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) متعلق به آغازگر UBC812 بود که بیانگر تعداد بیشتر باندهای چند شکل در این آغازگر است (جدول ۳). در یک پژوهش امجدیان و قلی‌پور (۲۰۲۰) ۱۶ اکوتیپ مختلف رازیانه با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند که شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) آن بین مقادیر ۱/۵ تا ۱۰ با میانگین ۴/۹۸ محاسبه شد (amjadian and gholipour 2020).

همچنین بیشترین میزان شاخص نشانگر (MI) نیز در آغازگر UBC812 مشاهده شد که کارایی خوب این آغازگر را نسبت به سایر آغازگرها نشان می‌دهد که بالا بودن میزان آن بیان‌کننده بیشترین باند چندشکل و تهیه اطلاعات بیشتری از ژنوم می‌باشد (جدول ۳). چاودری و همکاران (۲۰۱۸) ۱۰ نشانگر ISSR را در گیاه رازیانه به کار بردند که شاخص نشانگر (MI) به دست آمده بین ۰ تا ۵/۲۸ متغیر بود و میانگین آن ۱/۸۶ بود که بالاترین مقدار شاخص نشانگر (MI) ۵/۲۸ در نشانگر UBC810 مشاهده شد که بیشترین چندشکلی را تولید کرد که نشان می‌دهد شاخص نشانگر (MI) بیان‌کننده قابلیت‌های نشانگرها در شناسایی چندشکلی است (Choudhary et al. 2018).

Ampliqon Taq Master Mix به شماره کاتالوگ (A180303) (dNTP, MgCl<sub>2</sub> و Taq پلیمرز به ترتیب با غلظت‌های نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌مولار و ۱ واحد)، ۲ میکرولیتر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) و ۹ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه بود. چرخه دمایی PCR و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, iCycler, USA) به ترتیب زیر بود: ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در نهایت برای بسط نهایی فرآورده‌های PCR، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. پس از انجام واکنش تکثیر، فرآورده‌های PCR بر روی ژل‌آگارز ۱/۸ درصد تفکیک شدند. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از DNA Safe Stain انجام شده و در پایان عکس‌برداری از آن‌ها توسط دستگاه Gel doc (Biovision, E-Box CX5, France) صورت گرفت.

امتیازدهی هر یک از ژل‌ها بر اساس باندهای تکثیر شده و به صورت صفر و یک انجام شد. به منظور بررسی توانایی تمایز بین جمعیت‌ها توسط نشانگرهای استفاده شده، شاخص‌های تعیین‌کننده قدرت تفکیک سیستم نشانگری شامل شاخص محتوای چند شکلی (PIC)<sup>۱</sup>، شاخص نشانگر (MI)<sup>۲</sup>، شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR)<sup>۳</sup>، توان تفکیک (RP)<sup>۴</sup> محاسبه شدند (Anderson et al. 1993; Chesnokov et al. 2015; Powell et al. 1996). گروه‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش WARD و با استفاده از ضریب تشابه دایس<sup>۵</sup> انجام گرفت.

## نتایج و بحث

در این مطالعه، در مجموع ۱۰۸ باند با استفاده از ۱۷ نشانگر ISSR برای ۱۸ جمعیت مختلف رازیانه تولید شدند که از مجموع مکان‌های شناسایی شده ۶۴ مکان چندشکلی را نشان دادند. کمترین تعداد باند برای آغازگر UBC894 به تعداد سه باند و

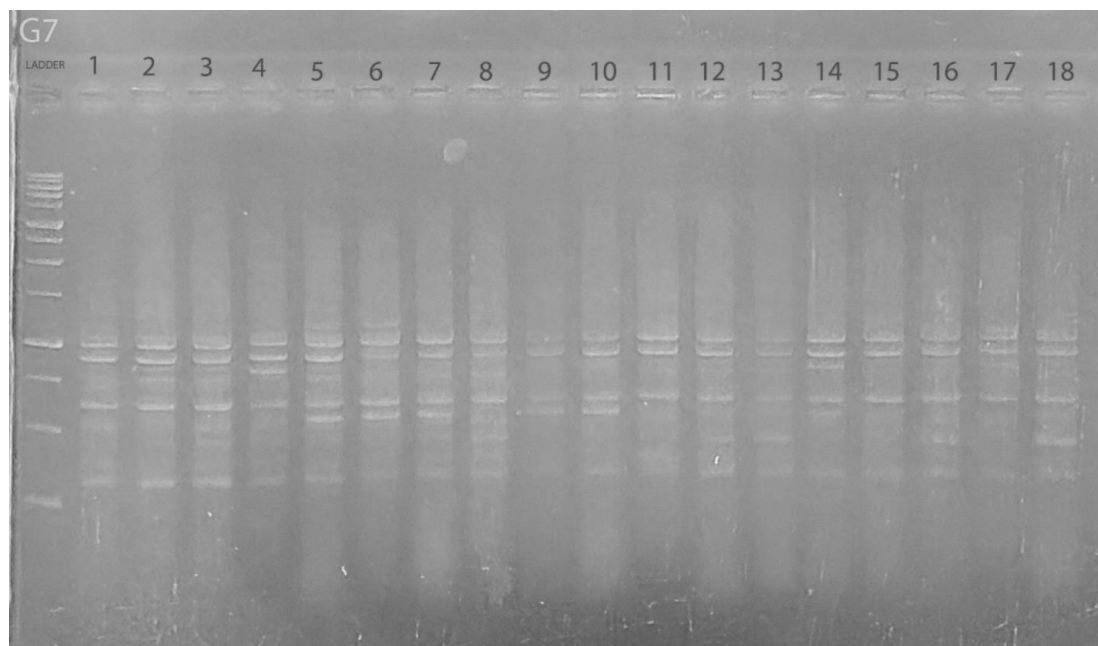
<sup>1</sup> Polymorphism Information Content

<sup>2</sup> Marker Index

<sup>3</sup> Effective multiplex ratio

<sup>4</sup> Resolving Power

<sup>5</sup> Dice similarity coefficient



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل الکتروفورز نمونه‌های DNA تکثیر شده مربوط به جمعیت‌های مختلف رازیانه با آغازگر UBC876 در ژل آگارز ۱/۵ درصد- نشانگر تعیین اندازه ۱ کیلوباز

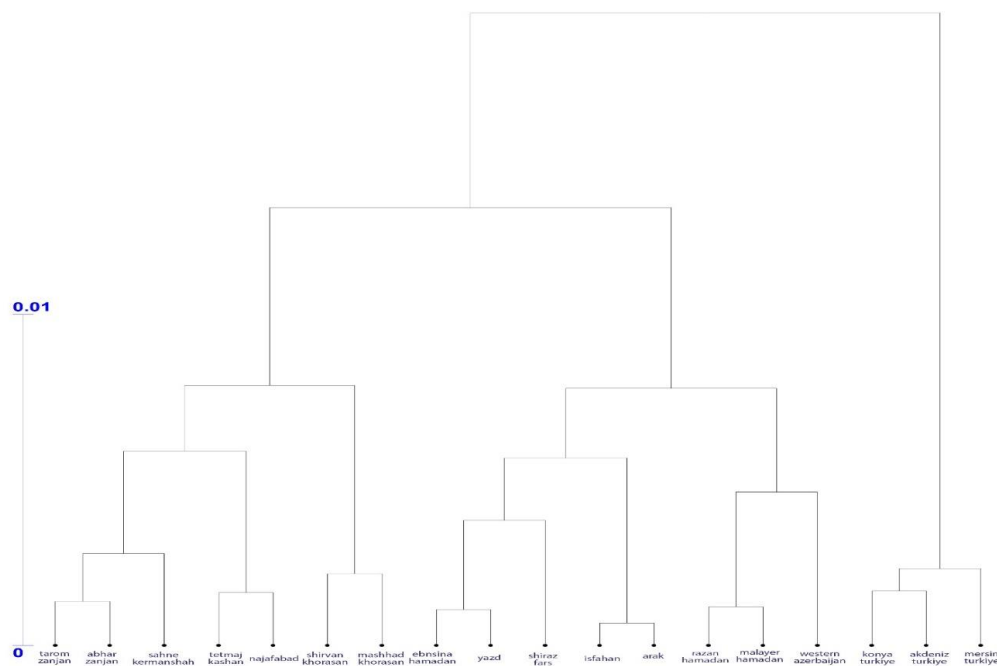
جدول ۳- اطلاعات و جزئیات الگوبندی به دست آمده از آغازگرهای ISSR به کار برده شده در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه

| primer | Total number of bands | Number of polymorphic bands | Percentage of polymorphism | polymorphism information content | effective multiplex ratio | Marker index | Resolving power |
|--------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-----------------|
| آغازگر | تعداد کل باندها       | تعداد باندهای چندشکلی       | درصد چندشکلی               | محتوای اطلاعات چندشکلی           | شاخص نسبت چندگانه مؤثر    | شاخص نشانگر  | توان تفکیک      |
| UBC826 | 9                     | 4                           | 44.44                      | 0.11                             | 1.78                      | 0.19         | 1.44            |
| UBC835 | 8                     | 4                           | 50.00                      | 0.19                             | 2.00                      | 0.39         | 2.11            |
| UBC899 | 8                     | 4                           | 50.00                      | 0.11                             | 2.00                      | 0.22         | 1.00            |
| UBC894 | 3                     | 3                           | 100                        | 0.20                             | 1.33                      | 0.27         | 1.00            |
| UBC811 | 7                     | 5                           | 71                         | 0.25                             | 2.29                      | 0.58         | 3.00            |
| UBC812 | 7                     | 7                           | 100                        | 0.37                             | 7.00                      | 2.56         | 3.78            |
| UBC876 | 10                    | 6                           | 60                         | 0.19                             | 3.60                      | 0.68         | 2.56            |
| UBC815 | 7                     | 2                           | 29                         | 0.11                             | 0.57                      | 0.06         | 1.11            |
| UBC848 | 6                     | 2                           | 33.33                      | 0.06                             | 0.67                      | 0.04         | 0.44            |
| UBC827 | 6                     | 5                           | 83.33                      | 0.25                             | 4.17                      | 1.05         | 2.22            |
| UBC834 | 7                     | 4                           | 57                         | 0.15                             | 2.29                      | 0.34         | 1.44            |
| UBC857 | 5                     | 3                           | 60.00                      | 0.18                             | 1.80                      | 0.32         | 1.44            |
| UBC807 | 4                     | 2                           | 50.00                      | 0.25                             | 1.00                      | 0.25         | 1.89            |
| UBC846 | 6                     | 4                           | 66.67                      | 0.16                             | 2.67                      | 0.42         | 1.11            |
| UBC890 | 4                     | 3                           | 75.00                      | 0.24                             | 2.25                      | 0.55         | 1.44            |
| UBC808 | 5                     | 2                           | 40.00                      | 0.14                             | 0.80                      | 0.11         | 0.89            |
| UBC800 | 6                     | 4                           | 66.67                      | 0.20                             | 2.67                      | 0.54         | 1.56            |

گیاجینو و اوچی (۲۰۲۰) ۱۱ نشانگر ISSR را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۶ جمعیت رازیانه که از محیط‌های طبیعی جمع‌آوری شده بودند، به کار بردند که از مجموع ۵۷ باند ایجاد شده ۴۸ باند چندشکلی بودند، در این مطالعه بیشترین مقدار PIC متعلق به نشانگر ISSR11 با مقدار ۰/۴۳ و میانگین مقادیر PIC ۰/۳۷ بوده و میانگین توان تفکیک (RP) پرایمرها ۴/۱۷ به دست آمده است. تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد مطالعه با استفاده از داده‌های مولکولی با هدف بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه و روابط میان آن‌ها انجام شد. برای این منظور، تجزیه خوشه‌ای به روش WARD بر اساس ضریب تشابه دایس روی نتایج داده‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (WARD 1963). با توجه به شکل ۲، اغلب جمعیت‌های مختلف رازیانه که منشأ جغرافیایی نزدیک به هم داشتند، کنار هم در یک گروه قرار گرفتند که این امر نشان‌دهنده مطابقت فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف رازیانه با منشأ جغرافیایی بود. نتایج مشابهی در بررسی تنوع ژنتیکی شش جمعیت رازیانه با استفاده از شش آغازگر ISSR گزارش شده است (Akçali Giachino 2020). در این مطالعه، در تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها، چهار جمعیت زراعی و تجاری شده در یک گروه و دو جمعیت وحشی در گروه‌های دیگری قرار گرفتند. نتایج برخی مطالعات صورت گرفته در مورد گیاه رازیانه با نتیجه مطالعه حاضر متفاوت است. بر اساس مشاهدات Zahid et al. (2009)، Meena et al. (2010)، Sefidan et al. (2014) و Deswal et al. (2017)، در گیاه رازیانه لزوماً تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی ارتباط مثبت و معنی‌دار ندارد. این عدم مطابقت الگوی گروه‌بندی با منشأ جغرافیایی، ممکن است به دلیل شارش ژنی و یا به دلیل محدودیت‌های خاص آغازگرهای ISSR باشد (Potter et al. 2002).

در ایجاد ارقام جدید با استفاده از روش‌های هیبریداسیون به منظور دستیابی به هتروزیس بالا، انتخاب مواد اصلاحی با بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین خویشاوندی بسیار مناسب است. این انتخاب موجب افزایش تنوع، تجمع صفات مطلوب از منابع مختلف در نتاج و کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی در افراد حاصل از تلاقی می‌شود (Yang et al. 2005).

در این تحقیق توان تفکیک آغازگر UBC812 بالاترین توان تفکیک (RP) را داشته که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در شناسایی تنوع ژنتیکی است (جدول ۳). آکچالی گیاجینو و اوچی (۲۰۲۰) ۶ نشانگر ISSR را جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ۶ جمعیت رازیانه به کار بردند که میانگین مقدار توان تفکیک RP پرایمرها ۴/۱۷ به دست آمد که بالاترین مقدار ۶/۳۳ بود (Akçali Giachino and Avcı 2020). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) جهت بررسی قدرت تفکیک نشانگرها در ایجاد چندشکلی در یک جمعیت برای هر نشانگر محاسبه شد. در بین آغازگرهای استفاده شده، آغازگر UBC812 بیشترین (۰/۳۷) و آغازگر UBC848، کمترین (۰/۰۶) مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بیانگر آن است که آغازگر UBC812 نسبت به سایر آغازگرهای مورد بررسی دارای اطلاعات مفید بیشتر بوده است (جدول ۳). مقادیر شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در نشانگرهای غالب در محدوده صفر تا نیم متغیر است و میزان بیشتر این شاخص، نشان‌دهنده قابلیت بالای آغازگر مورد استفاده در غربالگری ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Serrote et al. 2020). مقدار پایین PIC به دست آمده توسط برخی از نشانگرهای ISSR ممکن است به دلیل تعداد کم جایگاه ISSR مورد مطالعه باشد. نتایج مشابه توسط سایر محققان گزارش شده است (Pirseyedi et al. 2010; Soriano et al. 2011; Sharma et al. 2019). همچنین بالا بودن میزان PIC در بعضی از آغازگرهای مورد استفاده، کارایی بالای این آغازگرها را در تمایز جمعیت‌های مورد بررسی و سودمندی آن‌ها را جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی رازیانه نشان می‌دهد. میزان اطلاعات چندشکلی، به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها محسوب می‌شود. مقادیر بالای این شاخص که در تفکیک و تمایز افراد نقش مهمی دارد، نشان‌دهنده چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری است. به‌طورکلی، جهت تمایز ژنوتیپ‌هایی که خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند، استفاده از نشانگرهای دارای محتوای اطلاعات چندشکلی بالا مفید هستند (Shazdehahmadi and Kharrazi 2016).



شکل ۲ - دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۱۸ جمعیت رازیانه با استفاده از نشانگرهای ISSR

### نتیجه‌گیری کلی

ارزیابی تنوع بین جمعیت‌ها و گونه‌های گیاهی برای حفظ تنوع زیستی و استفاده پایدار از منابع ژنتیکی بسیار مهم است. روش‌های مولکولی به‌طور گسترده‌ای در مشخص نمودن تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی استفاده شده و نتایج دقیق و قابل اعتمادی را ارائه می‌دهند، به‌ویژه برای گونه‌ها، جمعیت‌ها یا واریته‌هایی که نمی‌توان آنها را به‌روش ریخت‌شناسی یا شیمیایی تمایز داد. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی بین ۱۸ جمعیت‌های مختلف رازیانه با استفاده از ۱۷ نشانگر ISSR ارزیابی شد و روابط ژنتیکی آنها تعیین شد. نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان‌دهنده تنوع بالای بین جمعیت‌های بررسی‌شده رازیانه است.

تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد مطالعه با استفاده از داده‌های مولکولی نشان داد که بیشترین شباهت بین جمعیت‌های اصفهان و اراک با یکدیگر بوده و همچنین جمعیت‌های رازیانه کشت‌شده از کشور ترکیه (آکدنیز، مرسین و قونیه) شباهت ژنتیکی بالایی با یکدیگر داشته و کمترین شباهت بین گروه جمعیت‌های ترکیه با سایر جمعیت‌ها وجود دارد.

تجزیه داده‌های حاصل از این آزمایش مشخص نمود در بین پرایمرهای ISSR بررسی‌شده UBC812 به‌لحاظ تعداد باندهای

چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، توان تفکیک (RP)، نسبت مؤثر چندگانه (EMR) و شاخص نشانگر (MI) برجسته بود.

در مطالعه حاضر، نشانگرهای ISSR بینش جامعی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های رازیانه ایرانی و ترکیه ارائه کردند و چشم‌انداز مناسبی از خصوصیات مولکولی، چندشکلی نشانگرها و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه از مناطق جغرافیایی مشخص داخلی و خارجی فراهم آوردند. نتایج نشان داد که نشانگر ISSR به‌طور مؤثری تنوع ژنتیکی بین این ۱۸ جمعیت را شناسایی کرده و در نتیجه امکان توصیف جمعیت‌های مورد مطالعه را فراهم می‌کند. اطلاعات به‌دست‌آمده از این تحقیق به اصلاح‌گران و محققان کمک خواهد کرد تا علاوه بر درک بهتر تنوع ژنتیکی و شناخت پایه ژنتیکی جمعیت‌های مورد استفاده برای اصلاح رازیانه، از نشانگرهای ISSR به‌طور مؤثر، سریع و قابل اعتماد در ارزیابی تنوع ژنتیکی و مولکولی گیاه رازیانه استفاده نمایند.

## منابع

- Abdel-Sattar M, Zayed EM, AbouShlell MK, Rihan HZ, Helal AA, Mekhaile NE, El-Badan GE (2024) Assessment of genetic diversity by phenological traits, field performance, and Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism marker of seventeen soybean genotypes (*Glycine max* L.). *Peer J* 12:e17868.
- Akçali Giachino RR (2020) Investigation of the genetic variation of anise (*Pimpinella anisum* L.) using RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 67:763-80.
- Akçali Giachino R, Avcı B (2020) ISSR-based molecular variation of some fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations. *Anadolu Tarım Bilimleri Derg* 35:140-146.
- Akçali Giachino R, Akçali RA, Boztaş G (2025) Advanced techniques and applications in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) breeding. *Molecular Genetics and Genomics* 300: 85
- Amjadian M, Gholipour M (2020) The study of genetic diversity in *Foeniculum vulgare* using ISSR molecular marker. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 33:203-211.
- Anabat MM, Riahi H, Sheidai M, Koohdar F (2020) Population genetic study and barcoding in Iran saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products* 143: 111915.
- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, ME, Sorrells (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186
- Bahmani K, Darbandi AI, Jafari AA, Noori SAS, Farajpour M (2012) Assessment of genetic diversity in Iranian fennels using ISSR markers. *Journal of Agricultural Science* 4:79-84.
- Bhanu, AN (2017) Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants - An Overview'. *Advances in Plants & Agriculture Research* 7:279-286.
- Bidyananda N, Jamir I, Nowakowska K, Varte V, Vendrame WA, Devi RS, Nongdam P (2024) Plant genetic diversity studies: insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology* 15:607-640
- Choudhary S, Sharma R, Meena RS, Verma AK (2018) Molecular diversity analysis in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) genotypes and its implications for conservation and crop breeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 7:794-809.
- Chukwu SC, Rafii MY, Ramlee SI, Ismail SI, Oladosu Y, Okporie E, Jalloh M (2019) Marker-assisted selection and gene pyramiding for resistance to bacterial leaf blight disease of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 33:440-55.
- Deswal S, Mor VS, Malik TP, Tehlan SK, Mekala S (2017) Seed quality and vigour assessment of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) genotypes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:4970-80.
- Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Food Control* 35:109-16.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Elsherbeny E, Eldemerdash ES (2019) Genetic diversity among *Thymus* spp. using RAPD and ISSR markers. *Egyptian Journal of Desert Research* 69:91-106.
- Farajpour M, Ebrahimi M, Amiri R, Golzari R, Sanjari S (2012) Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker. *Biochemical Systematics and Ecology* 43:73-9.
- Gehan GM, Alhamd MFA (2015) Induction of salt tolerant mutants of *Foeniculum vulgare* by dimethyl sulphate and their identification using protein pattern and ISSR markers. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 60:98-109.
- Grover S, Malik CP (2017) Genetic diversity and identification of variety-specific RAPD and ISSR markers in *Foeniculum vulgare*. *International Journal of Life Sciences* 6:31-8.
- Gündeşli MA, Korkmaz N, Okatan V, Polat M (2021) Polyphenol content and antioxidant capacity of medicinal and aromatic plants. In: *Proceedings of AGRIBALKAN 2021*, pp 311-320.
- Hosseini E, Majidi MM, Saeidnia F, Ehtemam MH (2022) Genetic analysis and physiological relationships of drought response in fennel: Interaction with mating system. *PLOS ONE* 17:e0277926.
- Hussain H, Nisar M (2020) Assessment of plant genetic variations using molecular markers: A review. *J Appl Biol Biotechnol* 8:99-109.
- Khammassi M, Mighri H, Mansour MB, Amri I, Jamoussi B, Khaldi A (2022) Metabolite profiling and potential antioxidant activity of sixteen fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) populations growing wild in Tunisia. *South African Journal of Botany* 148:407-14.
- Khan RU, Fatima A, Naz S, Ragni M, Tarricone S, Tufarelli V (2022) Prospective, opportunities and challenges in using fennel (*Foeniculum vulgare*) in poultry health and production as an eco-friendly alternative to antibiotics: A review. *Antibiotics* 11:278.
- Magon G, Palumbo F, Barcaccia G (2025) Genetics, genomics and breeding of fennel. *BMC Plant Biology* 25:595.
- Mahgoub YA, Mahmoud HA, El-Sebakhy NA, Abdallah II (2025) Unravelling *Artemisia* species genetic variation via DNA barcoding, ISSR and RAPD with the development of eco-specific SCAR markers. *BMC Plant Biology* 25:1034.
- Meena RS, Anwer MM, Lal G, Mehta RS, Kakani RK, Panwar A (2010) Genetic diversity analysis in fennel. *Indian Journal of Horticulture* 64:500-4.
- Misra R, Pham D, Hassan H, Gupta B, Orestes G (2025) Fennel seeds as a natural bridge between dermatology and oncology. *J Clin Med Re: AJCMR* 177
- Moyo M, Amoo SO, Bairu MW, Finnie JF, Van Staden J (2008). Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 74:771-775.
- Nam VT, Hang PLB, Linh NN, Ly LH, Hue HTT, Ha NH, Hien LTT (2020) Molecular markers for analysis of plant

- genetic diversity. Vietnam Journal of Biotechnology 18:589-608.
- Nikkerdar F, Farshadfar M, Ebrahimi MA, Shirvani H (2018) Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) landrace using Scot markers. J Crop Breed 9:95-102.
- Noreen S, Tufail T, Ain HBU, Awuchi CG (2023) Pharmacological, nutraceutical, functional and therapeutic properties of fennel (*Foeniculum vulgare*). International Journal of Food Properties 26:915-927.
- Piccaglia R, Marotti M (2001) Characterization of some Italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:239-44.
- Pirseyyedi SM, Valizadehghan S, Mardi M, Ghaffari MR, Mahmoodi P, Zahravi M, Zeinalabedini M, Khayam Nekoui SM (2010) Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). International Journal of Molecular Sciences 11:2010-6.
- Potter D, Gao F, Aiello G, Leslie C, McGranahan G (2002) Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. J Am Soc Hortic Sci 127:75-81.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2:225-38.
- Roldan Ruiz FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J (2001) A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics 103:1138-1150.
- Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH (2016) Inhibitory effect of different fennel (*Foeniculum vulgare*) samples and their phenolic compounds on formation of advanced glycation products and comparison of antimicrobial and antioxidant activities. Food Chemistry 213:196-205.
- Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH (2017) Genetic variability of outcross and selfed fennel based on morphological and ISSR markers Journal of Agricultural Science and Technology 19:157-72.
- Sefidan AY, Valizadeh M, Aharizad S, Sabzi M (2014) Path analysis of grain yield, some morphological traits and essential oil content in different fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) populations Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 4:10-5.
- Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, dos Santos Rabaiolli SM, Stefanel CM (2020) Determining the polymorphism information content of a molecular marker. Gene 726:144175.
- Sharma A, Rajpurohit D, Jain D, Verma P, Joshi A (2019) Molecular characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8:4770-5.
- Shazdehahmadi M, Kharrazi M (2016) Application of ISSR molecular markers for genetic diversity study of some tobacco genotypes. Plant Genetic Research 2:33-46.
- Shojaiefar S, Sabzalian MR, Mirlohi A, Tajdivand A (2021) Evidence for self-compatibility and variation for inbreeding depression within breeding populations of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), J Appl Res Med Aromat Plants 22:100299.
- Soriano JM, Zuriaga E, Rubio P, Llácer G, Infante R, Badenes ML (2011) Development and characterization of microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). Molecular Breeding 27:119-28.
- Ward HJ (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of the American Statistical Association 58:236-44.
- Yadav C, Malik CP (2018) Genetic variation among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) varieties on the basis of essential oil composition and molecular markers (ISSR, SCoT, CDDP and CBDP). Journal of Plant Science Research 34:45-50.
- Yang BC, Xiao BG, Chen XJ, Shi CH (2005) Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers. Yi Chuan-Hereditas 27:753-8.
- Zahid NY, Abbasi NA, Hafiz IA, Ahmad Z (2009) Genetic diversity of indigenous fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) germplasm in Pakistan assessed by RAPD markers. Pakistan Journal of Botany 41:1759-67.