مقایسه کارایی نشانگر RAPD و Modified RAPD در تعیین تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی بین جمعیت‌های مختلف گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgar*)

علیرضا اطمینان[1]، لیا شوشتری[1]، منصور قربانپور[2]، علی مهرآفرین[3]، اردشیر قادری[4]*

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، گروه اصلاح نباتات، کرمانشاه، ایران
۲- استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۳- عضو هیأت علمی گروه کشت و توسعه گیاهان دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
٤- عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی: ۱۳٦۹ - ۳۱۳۷۵
تلفن: ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦)، نمابر: ۳٤۷٦۰۲۱ (۰۲٦)
پست الکترونیک: Ardeshir582003@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۳۰ **تاریخ تصویب:** ۹۲/٦/۱۳

چکیده

مقدمه: گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgar*) متعلق به خانواده چتریان است که دارای کاربردهای فراوانی در صنایع دارویی و غذایی می‌باشد.

هدف: در این مطالعه، تأثیر هضم آنزیمی محصول RAPD - PCR به منظور افزایش کارایی نشانگر RAPD در ارزیابی تنوعات ژنومی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: پس از تکثیر DNA ژنومی ۱۵ جمعیت رازیانه با استفاده از ۹ آغازگر RAPD، بخشی از محصول PCR توسط دو آنزیم برشی *Mse*I و *Eco*RI مورد هضم قرار گرفت. سپس محصول PCR هضم شده و بدون هضم، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تفکیک شد. برای تعیین کارآیی نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، از معیار میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و برای گروه‌بندی نمونه‌ها از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. همچنین درصد اسانس و اجزای تشکیل‌دهنده آن در جمعیت‌های فوق با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تعیین شد.

نتایج: مقایسه الگوی باندی محصول PCR هضم شده و هضم نشده نشان داد که استفاده از یک آنزیم چهاربازبر مانند MseI برای هضم قطعات حاصل از تکثیر RAPD-PCR می‌تواند تا حد قابل توجهی میزان چندشکلی را نسبت به روش RAPD استاندارد افزایش دهد. همچنین تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های حاصل از روش RAPD تغییریافته، جمعیت‌ها را به صورت مناسب‌تری گروه‌بندی نمود.

نتیجه‌گیری: به عنوان یک نتیجه کلی، هضم آنزیمی مناسب محصول PCR می‌تواند کارایی نشانگر مولکولی RAPD را تا حد قابل توجهی در بررسی تنوعات در سطح ژنوم بهبود بخشد. از سوی دیگر نتایج نشان داد که میان عملکرد اسانس و تنوع ژنتیکی موجود همبستگی وجود ندارد.

گل‌واژگان: *Foeniculum vulgar*، اسانس، تنوع ژنتیکی، هضم آنزیمی، RAPD

مقدمه

رازیانه (*Foeniculum vulgar*) یک گیاه دارویی از خانواده چتریان است که دارای کاربردهای فراوانی در صنایع دارویی و غذایی می‌باشد. این گیاه علفی معطر دارای ارتفاع یک تا دو متر بوده، در رویشگاه طبیعی به صورت چندساله ولی به صورت زراعی ۲ ساله می‌باشد [۲، ۱]. از مهم‌ترین مواد مؤثره رازیانه می‌توان به آنتول اشاره کرد. آنتول (پارامتوکسی فنیل پروپن، پروپنیل آنیسول و یا ایزو استراگول) یک ترکیب آروماتیک است که به طور وسیعی در طبیعت یافت می‌شود. رازیانه دارای اسانس به مقدار ٤ تا ٦ درصد می‌باشد که مقدار اسانس و ترکیب مواد تشکیل‌دهنده آن بر حسب محل رویش گیاه متفاوت است. در اسانس رازیانه بیش از ۳۰ نوع ترکیب ترپنی وجود دارد که مهم‌ترین آنها آنتول، فنچون، لیمونن و متیل کاویکول می‌باشد [۱]. قسمت مورد استفاده رازیانه ریشه، برگ و میوه آن است ولی معمولاً کلیه قسمت‌های گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

صرف نظر از اهمیت ارزیابی‌های مربوط به تنوع‌های اکولوژیکی و ریخت‌شناسی، اهمیت تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی در تمام تحقیقات ذکر شده است. ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح گونه به سه دلیل عمده حائز اهمیت است: الف) ارتباط درجه تغییرات تکاملی با میزان تنوع ژنتیکی مشاهده شده ب) هتروزیگوسیتی ج) تکمیل و مطابقت با خزانه ژن جهانی که نماینده تمام اطلاعات موجود درباره فرآیندهای بیولوژیکی است [۳]. با دانستن روابط ژنتیکی بین گیاهان، از اطلاعات رده‌بندی می‌توان به عنوان راهنمایی برای بهره‌گیری از منابع ژنتیکی در استفاده از آنها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد [٤]. نشانگرهای مولکولی را می‌توان از هر نوع داده مولکولی که اختلافات قابل گزینشی بین دو موجود زنده را در دسترس قرار می‌دهند، به دست آورد. تکنیک‌های مختلفی برای آشکارسازی این اختلافات و چندشکلی‌ها توسعه یافته‌اند. به دلیل عدم وجود نشانگرهای ریزماهواره در گیاهان دارویی و یا تعداد کم آنها، یکی از پرکاربردترین نشانگرهای DNA در گیاهان دارویی، نشانگرهای ISSR و RAPD است. در هر بار تکثیر با یک آغازگر، یک قطعه در یک فرد تکثیر می‌شود و الگوهای نواری حاصل به صورت غالب امتیازدهی می‌شود. عدم نیاز به شناسایی و تعیین توالی DNA جهت ساخت پرایمرها در کنار هزینه کمتر و سرعت عمل زیادتر نسبت به سایر نشانگرهای DNA سبب شده که RAPD کاربرد فراوانی در تحقیقات ژنومیکس داشته باشد اما در این میان، این نشانگر دارای معایبی نظیر توان شناسایی چندشکلی در حد بسیار پایین‌تری در مقایسه با نشانگرهای دیگری نظیر AFLP می‌باشد. بنابراین افزایش توان این نشانگر در تعیین نقاط پلی مورف در سطح DNA افراد مورد مطالعه می‌تواند کارایی این نشانگر را در بررسی تنوعات ژنتیکی بسیار افزایش دهد. یکی از راه‌های افزایش پلی‌مورفیسم، هضم آنزیمی قطعات حاصل از تکثیر و سپس تفکیک قطعات هضم شده بر روی ژل الکتروفورزی می‌باشد [١٦]. بر این اساس، اهداف اصلی در این پژوهش را می‌توان بررسی تأثیر هضم آنزیمی DNA در افزایش کارایی RAPD، بررسی امکان تشخیص نقاط چندشکلی بیشتر با استفاده از سیستم‌های هضم آنزیمی در تکثیر DNA با پرایمرهای RAPD، محاسبه میزان چندشکلی و تعیین میزان افزایش آن در زمان استفاده از آنزیم‌های برشی بیان نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

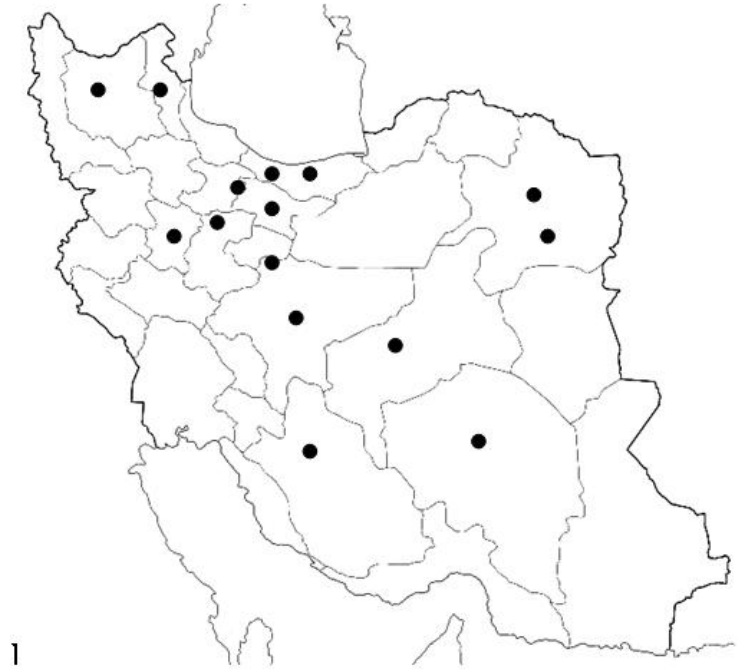
در این تحقیق تعداد پانزده جمعیت رازیانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران مورد استفاده قرار گرفت که محل جمع‌آوری جمعیت‌ها در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱ ارایه شده است.

کشت بذور و تولید گیاهچه

به منظور بهینه‌سازی جوانه‌زنی بذرها، سه مقدار (۲۰۰ ppm، ۱۵۰ ppm، ۱۰۰ ppm) جیبرلیک اسید و سه دوره سرمادهی (صفر، ۷ و ۱۵ روز) برای شکست خواب بذور و یکنواخت‌سازی جوانه‌زنی آنها به صورت یک آزمایش فاکتوریل

جدول شماره ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد بررسی

شماره جمعیت	منشاء (شهر جمع‌آوری نمونه)
۱	کاشان
۲	کرمان
۳	اصفهان
٤	اردبیل
٥	دماوند
٦	ساوه
۷	کرج
۸	شیراز
۹	تبریز
۱۰	گناباد
۱۱	همدان
۱۲	تهران
۱۳	بابل
۱٤	یزد
۱٥	مشهد



شکل شماره ۱- نمایش محل جمع‌آوری جمعیت‌های رازیانه مورد استفاده بر روی نقشه ایران

مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت با استفاده از ترکیب ppm ۲۰۰ جیبرلیک اسید و ۱۵ روز سرمادهی، بذور مورد نظر تیمار شد. سپس بذور تیمار شده در ظروف کوچک کشت و در شرایط کنترل شده نگهداری شد. پس از تولید گیاهچه‌های مناسب، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه انجام شد.

استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA ژنومی از گیاهچه‌های ۳ تا ٤ هفته‌ای حاصل از کشت بذرها استفاده شد. استخراج DNA از هر جمعیت به صورت بالک انجام شد. از هر جمعیت، نمونه‌های برگی از ٤ تا ۸ بوته برداشت و بلافاصله با استفاده از روش دلاپورتا [۵] با اندکی تغییرات، استخراج DNA از آنها انجام شد.

آنالیز GC و GC-MS

عمل اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب از ۱۰۰ گرم بذر هر کدام از پانزده جمعیت مورد مطالعه با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۱٦۰ دقیقه انجام گرفت [٦] اسانس‌های حاصل به منظور مقایسه عملکرد متابولیکی جمعیت‌ها به دستگاه GC-MS با مشخصات Knauer, Germany با ستون (Perfectsil Target, ODS3, 5 µm, 250 × 4.6 C18 mm, Teknokrome, Germany) با دتکتور (K-250, Knauer, Germany) تزریق شد.

انجام واکنش PCR

واکنش RAPD- PCR بر اساس روش ویلیامز و همکاران [۷] انجام گرفت. تمامی مواد مورد نیاز برای واکنش از شرکت‌های فرمنتاز و سیناژن خریداری شد و حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر درنظر گرفته شد (جدول شماره ۲).

آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی

با توجه به بررسی منابع، در این تحقیق از ۱۵ پرایمر تصادفی استفاده شد اما تنها ۹ پرایمر باندهای پلی مورف قابل امتیازدهی و مشخصی ایجاد نمودند. بنابراین تنها الگوهای باندی حاصل از این پرایمرها مورد بررسی و تجزیه آماری قرار گرفت. مشخصات این پرایمرها در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

برای تکثیر نمونه‌های DNA از دستگاه Biorad مدل iCycler استفاده شد. چرخه‌های دمایی واکنش PCR در جدول شماره ٤ ارائه شده است. پس از تکثیر DNA نمونه‌های مورد بررسی، بخشی از محصول PCR توسط دو آنزیم *Mse* I و *Eco* RI به صورت جداگانه مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

جدول شماره ۲- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR

واکنش‌دهنده‌ها	مقدار مصرفی (میکرولیتر)	غلظت نهایی در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر
بافر **PCR** (۱۰×)	۲/۵	۱ برابر
دزوکسی نوکلئوتیدها (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۵	۰/۲ میلی‌مولار
کلرید منیزیوم (۵۰ میلی‌مولار)	۰/۵۷	۱/۱٤ میلی‌مولار
آغازگر (۱۰ میکرومولار)	۰/۵	۰/۲ میکرومولار
DNA پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۲	۱ واحد
آب دو بار تقطیر	۱۹/۷۳	-
DNA (۵ نانوگرم در میکرولیتر)	۱	۵ نانوگرم
کل	**۲۵**	

جدول شماره ۳– نام آغازگرها و توالی آنها

نام آغازگر	توالی آغازگر
OPJ12	5′-GTCCCGTGGT-3′
OPA-01	5′-CAGGCCCTTC-3′
OPB-16	5′-TTTGCCCGGA-3′
OPB-17	5′-AGGGAACGAG-3′
OPD-05	5′-GATGACCGCC-3′
OPD-01	5′-ACCGCGAAGG-3′
K-05	5′-TCTGTCGAGG-3′
K-10	5′-GTGCAACGTG-3′
K-15	5′-CTCCTGCCAA-3′

جدول شماره ٤– پروفایل دمایی در نظر گرفته شده برای تکثیر PCR

تعداد چرخه	زمان	درجه حرارت	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹٤	واسرشت‌سازی اولیه
	۳۰ ثانیه	۹٤	واسرشت‌سازی
۳۵	۳۰ ثانیه	دمای آغازگر	اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای
	٤۵ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	بسط (توسعه) آغازگر
۱	۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	بسط (توسعه) نهایی

انجام الکتروفورز

در این آزمایش از ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TBE (lx) استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا از DNA های تکثیر شده میزان ۵ µL برداشته و همراه با ۵ µL بافر بارگذاری در درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل اگارز ۱/۵ درصد قرار داده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت و به مدت ۲ تا ۲/۵ ساعت صورت گرفت. سپس ژل جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برماید تهیه شده (۲۵ میکرولیتراتیدیوم در ۱ لیتر آب مقطر) به مدت ٤۵ – ۳۰ دقیقه قرار داده شد و از دستگاه ژل داکیومنت جهت نمایان شدن باندها و عکسبرداری استفاده شد.

تجزیه‌های آماری

الگوی نواری نشانگرهای RAPD قبل و بعد از هضم آنزیمی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار)، امتیازدهی شد. برای تعیین کارآیی و مقایسه نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، از معیار میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) استفاده شد [۸]. این شاخص از فرمول $PIC= 1- \sum p_i^2$ محاسبه شد که در این فرمول، pi فراوانی وجود نشانگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد [۹]. همچنین برای تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در هر دو روش نشانگری از ضرایب شباهت دایس و جاکارد و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSpc و DARwin استفاده شد.

نتایج

بررسی ژل‌های الکتروفورزی نشان داد که از بین ۱۵ آغازگر مورد مطالعه تنها ۹ آغازگر باندهای پلی مورف و قابل امتیازدهی ایجاد نمودند و بنابراین تنها نمونه‌های تکثیر یافته با این آغازگرها وارد مرحله هضم آنزیمی شد و تجزیه‌های آماری تنها بر اساس باندهای پلی مورف حاصل از این ۹ آغازگر انجام شد. اطلاعات مربوط به میزان چندشکلی آغازگرهای مورد استفاده در هر دو روش نشانگری در جدول شماره ۵ ارائه شده است. در روش RAPD استاندارد در

مجموع ۵۸ باند چند شکل ایجاد شد که بیشترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر OPB-17 با ۱۰ باند و کمترین تعداد مربوط به آغازگر OPJ12 با ٤ باند چند شکل بود. میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر آغازگر نیز برابر با ٦/٤ به دست آمد. اما در استفاده از آنزیم برشی *Mse*I و هضم آنزیمی قطعات حاصل از تکثیر، میزان پلی‌مورفیسم به میزان ١/٦ برابر افزایش یافت. به طوری که پس از هضم آنزیمی محصول PCR و سپس تفکیک قطعات بر روی ژل، در مجموع ٩٤ باند چند شکل با متوسط ١٠/٤ باند در هر آغازگر- آنزیم ایجاد شد که بیشترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر OPB-17 به همراه آنزیم *Mse*I با ١٤ باند و کمترین تعداد، مربوط به آغازگر OPJ12 به همراه آنزیم *Mse*I با ٧ باند چند شکل بود. لازم به ذکراست هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم شش بازبر *Eco*RI هیچ تغییری در الگوی باندی به وجود نیاورد (جدول شماره ٦).

مقادیر محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در جدول شماره ٧ برای آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که در نشانگر RAPD استاندارد، بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکل (٠/٤٦) مربوط به آغازگر K-15 می‌باشد. حداکثر مقدار شاخص PIC در نشانگرهای غالب مانند RAPD برابر با ٠/٥ می‌باشد. بنابراین با توجه به مقدار شاخص محتوای اطلاعات چند شکل به دست آمده در این بررسی برای این پرایمر (٠/٤٦)، می‌توان گفت این میزان PIC بالا نشان‌دهندهٔ کارآیی بالا در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق بوده است و بنابراین به کارگیری آن جهت مطالعات مشابه مطلوب و امکان‌پذیر می‌باشد. در ترکیب آغازگر - آنزیم برشی نیز ترکیب آغازگر OPB-17 به همراه هضم آنزیمی با *Mse*I دارای بیشترین مقدار (٠/٤٤) شاخص PIC بود که برتری این ترکیب آغازگر - آنزیم را نسبت به سایر گروه‌های آغازگر - آنزیم در تمایز جمعیت‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان می‌دهد (جدول شماره ٧).

جدول شماره ۵ – مقایسه دو سیستم نشانگری از نظر تعداد باندهای چند شکل ایجاد شده

ردیف	نام آغازگر	تعداد باند چند شکل ایجاد شده	
		RAPD	Modified RAPD
١	OPJ12	٤	٧
٢	OPA-01	٥	٩
٣	OPB-16	٨	١١
٤	OPB-17	١٠	١٤
٥	OPD-05	٧	١١
٦	OPD-01	٥	١٠
٧	K-05	٦	١١
٨	K-10	٨	١٢
٩	K-15	٥	٩
میانگین		**٦/٤**	**١٠/٤**

جدول شماره ٦- اطلاعات مربوط به میزان چندشکلی حاصل از دو روش مورد مطالعه

پارامتر	Modified RAPD	RAPD
تعداد آغازگر	٩	٩
تعداد باند پلی‌مورف	٩٤	٥٨
حداقل تعداد باند پلی‌مورف در هر آغازگر	٧	٤
حداکثر تعداد باند پلی‌مورف در هر آغازگر	١٤	١٠
متوسط تعداد باند پلی‌مورف در هر آغازگر	١٠/٤	٦/٤

جدول شماره ٧ – مقایسه دو سیستم نشانگری از نظر میزان شاخص محتوای اطلاعات چندشکل

ردیف	نام آغازگر	PIC	
		RAPD	Modified RAPD
١	OPJ12	٠/٤٢	٠/٤١
٢	OPA-01	٠/٤١	٠/٤٠
٣	OPB-16	٠/٣٢	٠/٣٣
٤	OPB-17	٠/٣٧	٠/٤٤
٥	OPD-05	٠/٣٧	٠/٣٩
٦	OPD-01	٠/٣٢	٠/٣٦
٧	K-05	٠/٣٢	٠/٣٠
٨	K-10	٠/٣١	٠/٤٢
٩	K-15	٠/٤٦	٠/٣٤
میانگین		٠/٣٧	٠/٣٨

میانگین شاخص محتوای اطلاعات چند شکل به دست آمده برای آغازگرهای RAPD برابر با ٠/٣٧ و هنگام هضم آنزیمی قطعات تکثیر یافته توسط آغازگرها برابر با ٠/٣٨ به دست آمد که مقادیر حاصله بیانگر مناسب بودن مجموع آغازگرهای مورد استفاده در متمایز نمودن جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. در همین رابطه در بررسی تنوع ژنتیکی ١٨ جمعیت از سه گونه مختلف گیاه دارویی بذرالبنج با استفاده از نشانگرهای RAPD متوسط شاخص PIC را برابر با ٠/٤١ گزارش نمودند [١٠]. در مطالعه تنوع ژنتیکی لوبیا با استفاده از ٢٠ ترکیب پرایمری AFLP و نیز نشانگر SSR مقدار شاخص PIC برای آغازگرهای AFLP بین ٠/٠٣ تا ٠/٣٧ با متوسط ٠/٢٩ و برای آغازگرهای SSR بین ٠/٠٣ تا ٠/٧ با متوسط ٠/٤٧ گزارش شد [١١].

نتایج حاصل از بررسی میزان تشابه ژنتیکی (GS) جمعیت‌های مختلف در هر دو روش به صورت جداگانه و نیز با در نظر گرفتن مجموع باندهای هر دو روش نشانگری در جدول شماره ٨ ارائه شده است. متوسط میزان تشابه ژنتیکی بین افراد در نشانگر RAPD استاندارد برابر ٦٣/٣ درصد و در RAPD تغییر یافته (تکثیر همراه با هضم آنزیمی) برابر ٦٢/٤ درصد بود. میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نشانگر RAPD استاندارد از ٠/٢٤ تا ٠/٩١ متغیر بود. بیشترین میزان تشابه (٠/٩١) بین یک جمعیت از کرج (جمعیت شماره ٧) و یک جمعیت از همدان (جمعیت شماره ١١) به دست آمد و کمترین تشابه (٠/٢٤) میان جمعیت شماره ٤ از اردبیل با یک جمعیت از ساوه (جمعیت شماره ٦) مشاهده شد. در نتایج حاصل از روش RAPD تغیر یافته، تغییرات میزان تشابه

جدول شماره ۸ – مقایسه تشابه ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه در دو سیستم نشانگر

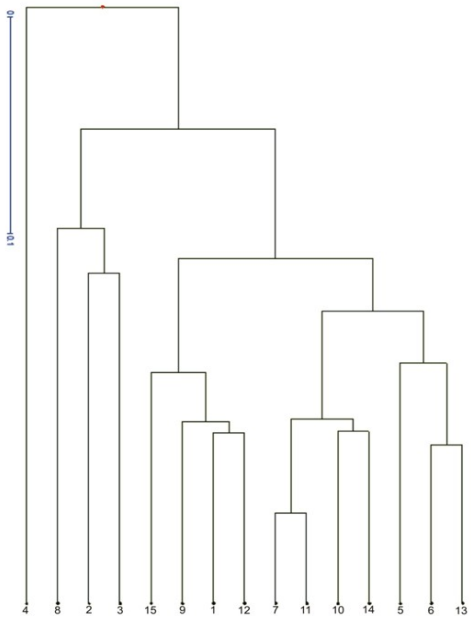
تشابه ژنتیکی	سیستم نشانگری	
	RAPD	Modified RAPD
حداقل	۰/۲٤	۰/٤
حداکثر	۰/۹۱	۰/۸۹
میانگین	۰/٦۳۳	۰/٦۲٤

ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه بین دو مقدار ۰/٤ تا ۰/۸۹ با متوسط ٦۲/٤ درصد به دست آمد. بیشترین میزان تشابه (۰/۸۹) بین جمعیت کرج (جمعیت شماره ۷) و جمعیت تهران (جمعیت شماره ۱۲) و کمترین تشابه (۰/٤۰) میان جمعیت شماره ۱۳ از بابل با یک جمعیت از شیراز (جمعیت شماره ۸) مشاهده شد. با توجه به فاصله جغرافیایی بین این دو منطقه و نیز نزدیکی تهران و کرج که جمعیت‌های آنها دارای بیشترین میزان تشابه بودند به نظر می‌رسد داده‌های حاصل از روش RAPD تغییر یافته بهتر توانسته ژنوتیپ‌ها را بر اساس پراکنش جغرافیایی از یکدیگر متمایز نماید. هرچند معمولاً تشابه ژنتیکی بالای دو فرد نمی‌تواند دلیلی بر نزدیکی رویشگاه‌های آنها باشد. اما با توجه به تعداد باندهای پلی‌مورف بیشتری که در روش RAPD تغییر یافته حاصل شده است و پوشش ژنومی مناسب‌تری را به دنبال داشته می‌توان نتایج حاصل از این روش را بر نتایج RAPD استاندارد ترجیح داد.

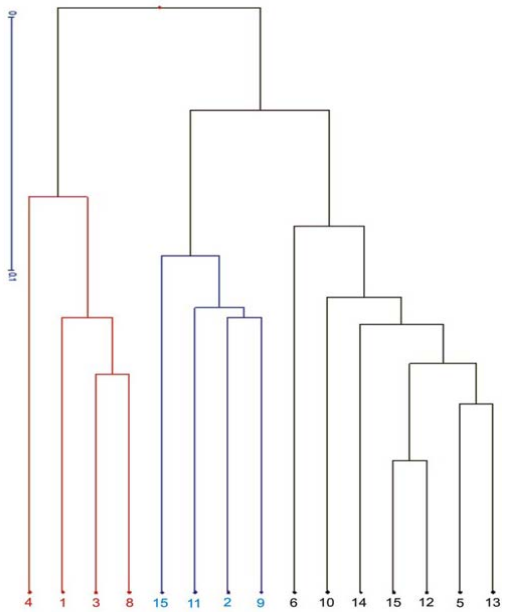
تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA جمعیت‌های مورد مطالعه را در روش RAPD استاندارد، در سه گروه به ترتیب شامل ۱۱، ۳ و ۱ جمعیت قرار داد. در این دسته‌بندی، جمعیت شماره ٤ (از شهرستان اردبیل) به صورت تکی در یک کلاستر جداگانه قرار گرفت. جمعیت‌های شماره ۳، ۲ و ۸ در یک گروه دسته‌بندی شدند و سایر جمعیت‌ها در یک گروه کلی قرار گرفتند که به زیر گروه‌های مجزایی قابل تقسیم بودند. تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های حاصل از روش RAPD تغییر یافته، تفاوت‌هایی با دسته‌بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های RAPD داشت و در برخی موارد جمعیت‌ها را به صورت مناسب‌تری گروه‌بندی نمود. به عنوان مثال در دسته‌بندی اخیر، دو جمعیت شماره ۱ و ۳ که هر دو دارای منشاء جغرافیایی یکسان (استان اصفهان) بودند، با ضریب تشابه ۷۵ درصد، در یک گروه قرار گرفتند در حالی‌که بر اساس داده‌های RAPD این دو جمعیت هم منشاء در دو گروه جداگانه دسته‌بندی شده بودند. اگر چه در اغلب موارد دسته‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه، بر اساس منشاء جغرافیایی آنها صورت گرفته است، اما در پاره‌ای از موارد مشاهده شد که دو جمعیت مربوط به یک ناحیه جغرافیایی با فاصله مکانی اندک در دسته‌بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های مولکولی در دو گروه کاملاً جدا از هم قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال می‌توان به دو جمعیت شماره ٤ (اردبیل) و جمعیت شماره ۹ (تبریز) اشاره نمود. با اینکه هر دو این جمعیت‌ها متعلق به یک اقلیم بوده و مربوط به دو شهر نزدیک به هم می‌باشند اما در تمامی تجزیه کلاسترهای انجام شده چه بر اساس داده‌های RAPD استاندارد و چه بر اساس داده‌های RAPD تغیر یافته در گروه‌هایی مجزا از یکدیگر طبقه‌بندی شدند (شکل شماره ۲). مارتینز و همکاران (۲۰۰٦) نیز چنین نتایجی را در گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا با استفاده از نشانگرهای AFLP گزارش می‌نمایند [۱۲]. به طور کلی، گزارش‌های بسیار زیادی در خصوص عدم انطباق گروه‌بندی افراد بر اساس داده‌های مولکولی با گروه‌بندی آنها بر اساس مناطق جغرافیایی وجود دارد که می‌توان به بررسی تنوع ژنتیکی در *Daucus carota* [۱۳] بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های ایرانی گیاه دارویی زیره ایرانی (*Bunium persicum*) با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP [۱٤] و بررسی تنوع ژنتیکی *Matricaria chamomilla* [۱۵] اشاره نمود.

در آنالیز GC/MS ۳٤ ترکیب مختلف در اسانس شناسایی شد که به ترتیب E-Anethole و Estragole و

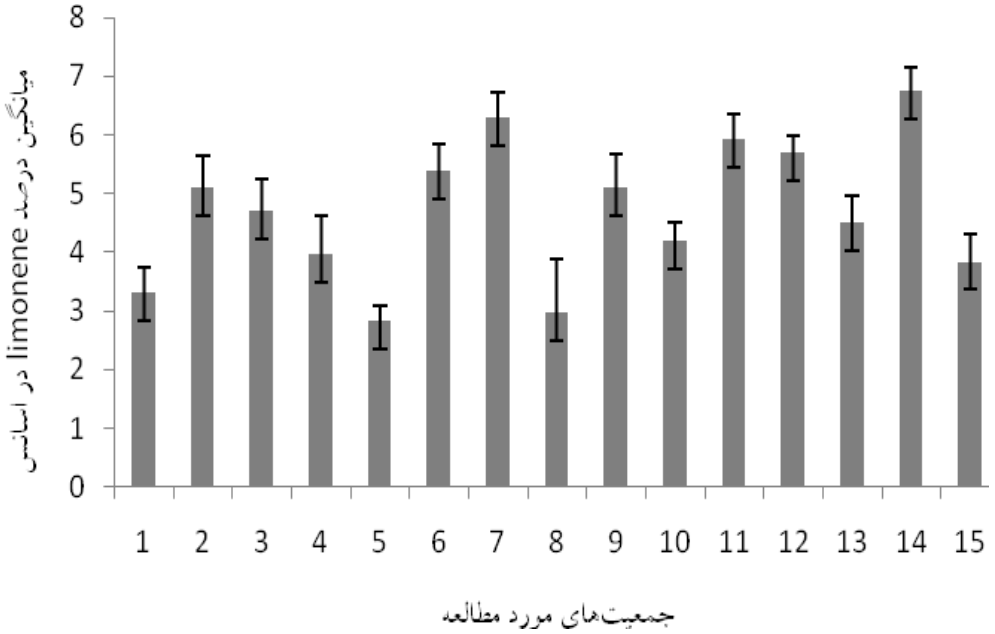
D(+)-Fenchone و Limonene بیشترین درصد اسانس را به خود اختصاص داده بودند. در این میان جمعیت ١٤ بالاترین درصد اسانس (2.9%) (12.8%) Estragole و D(+)-Fenchone (8.75%) و Limonene (6.75%) و جمعیت ٣ بالاترین مقدار (62.3%) E-Anethole جمعیت (شکل‌های شماره ٣،٤،٥،٦،٧).



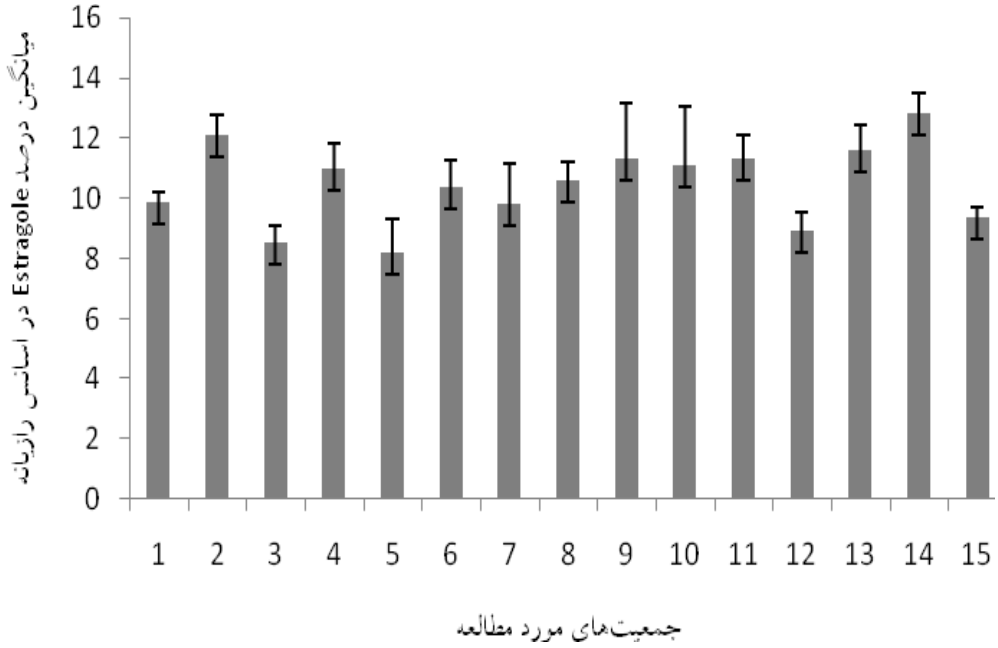
شکل شماره ٢-١- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر اکسشن‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های نشانگر RAPD



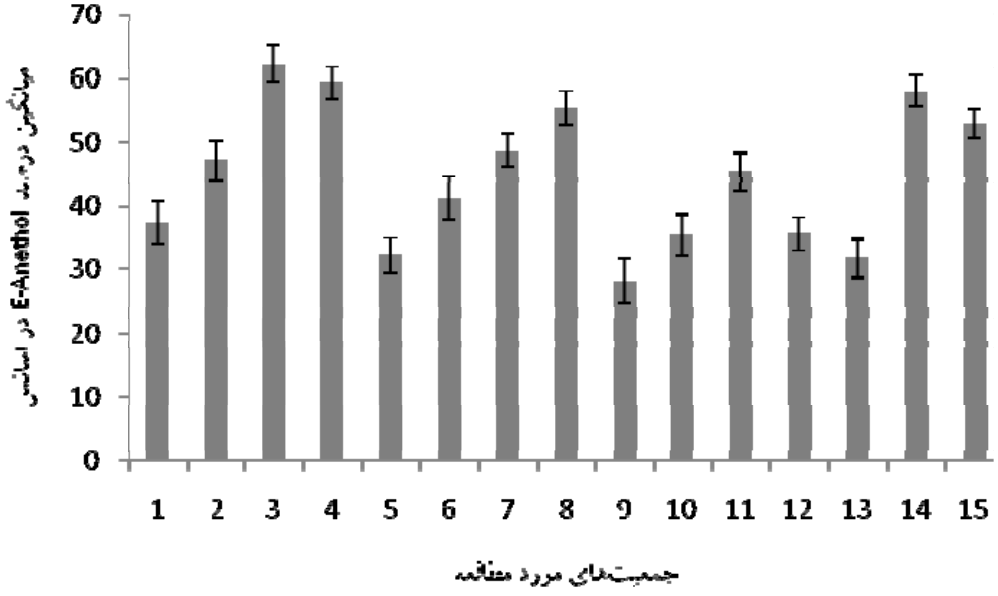
شکل شماره ٢-٢- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر اکسشن‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های نشانگر RAPD تغییر یافته



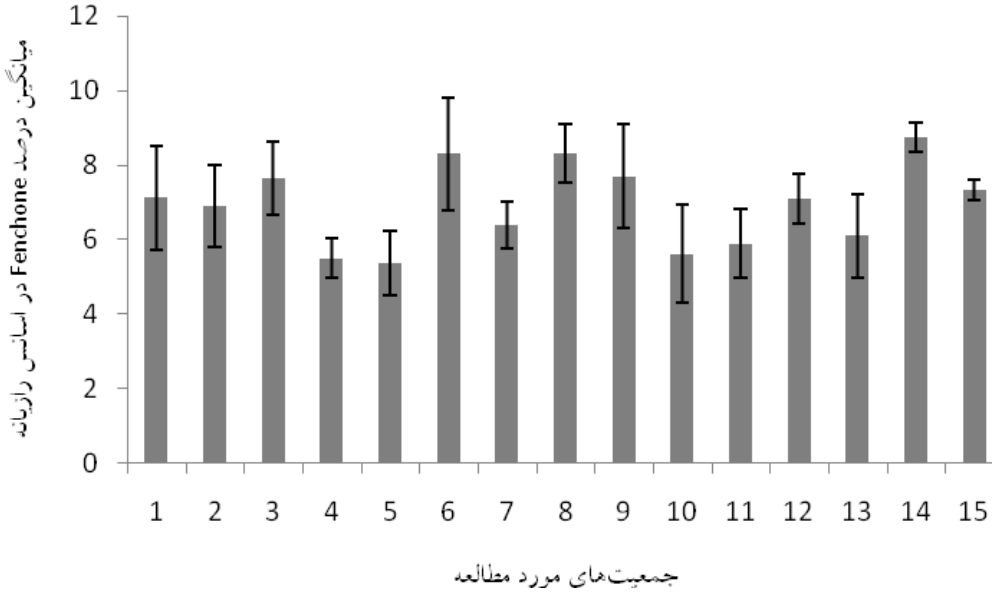
شکل شماره ٣- مقایسه میانگین درصد ماده Limonene در اسانس رازیانه جمعیت‌های مورد مطالعه



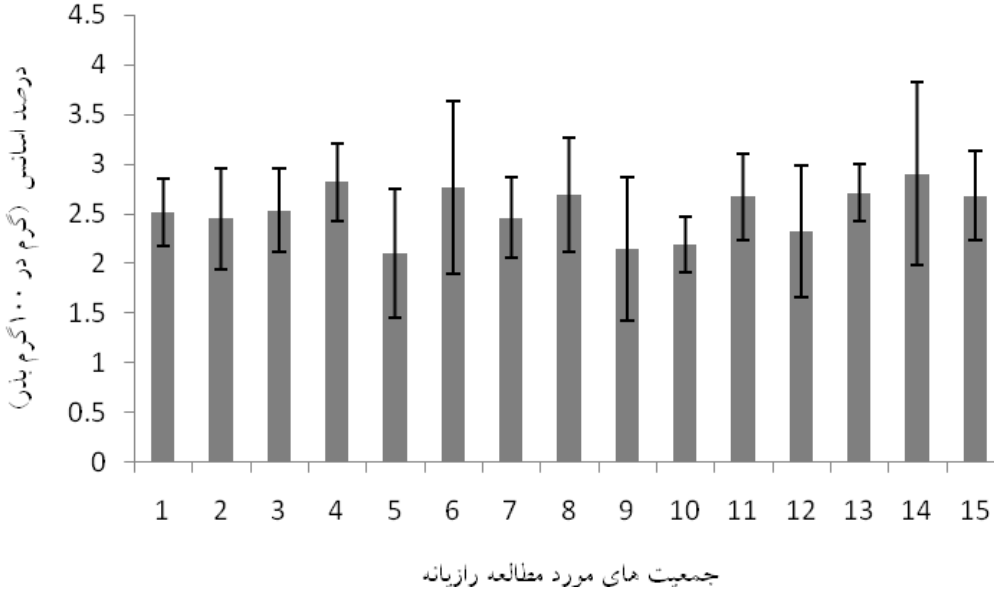
شکل شماره ٤- مقایسه میانگین درصد ماده Estragole در اسانس رازیانه جمعیت‌های مورد مطالعه



شکل شماره ٥- مقایسه میانگین درصد ماده E-Anethol در اسانس رازیانه جمعیت‌های مورد مطالعه



شکل شماره ٦- مقایسه میانگین درصد ماده D(+)-Fenchone در اسانس رازیانه جمعیت‌های مورد مطالعه



شکل شماره ۷- درصد اسانس بذر رازیانه (گرم در ۱۰۰ گرم بذر) در جمعیت‌های مورد مطالعه

بحث

در مجموع، نتایج به دست آمده نشان داد که هضم قطعات حاصل از تکثیر RAPD-PCR با استفاده از یک آنزیم برشی مناسب با تعداد برش بالا همانند آنزیم‌های چهاربازبر می‌تواند تا حد قابل توجهی میزان پلی‌مورفیسم را افزایش دهد. عدم مؤثر بودن آنزیم برشی *Eco*RI را می‌توان به نقاط هدف محدودتر این آنزیم که یک آنزیم شش بازبر می‌باشد نسبت به آنزیم‌های چهاربازبر مرتبط دانست زیرا یک آنزیم شش بازبر به طور متوسط به میزان ۱٦ برابر کمتر از یک آنزیم چهاربازبر قادر به شناسایی محل برش و هضم آنزیمی است که با توجه به محدود بودن طول قطعات تکثیر شده در روش RAPD (کمتر از ۳۰۰۰ باز) هضم قطعات تکثیرشده با آنزیم شش بازبر بعید خواهد بود. همچنین می‌توان با ترکیبات آنزیمی مختلف و مناسب، تنوع بیشتری را قابل مشاهده نمود که این موضوع بخصوص در مطالعه جمعیت‌های کمتر متنوع می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. از سوی دیگر با شناسایی نقاط چندشکل بیشتر بین افراد یک جمعیت می‌توان گروه‌بندی افراد را به صورت صحیح‌تری انجام داد. به عنوان مثال در این بررسی، صرف‌نظر از پاره‌ای استثناها، به طور کلی نتایج دسته‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از روش RAPD تغیر یافته (تکثیر همراه با هضم آنزیمی) بیانگر آن بود که تجزیه کلاستر، نمونه‌ها را بر اساس منشاء جغرافیایی آنها به خوبی تفکیک کرده است. این نتایج به طور نسبی با نتایج یوسفی و همکاران (۱۳۸۸) که نشان‌دهنده قرار گرفتن توده‌های متعلق به مناطق جغرافیایی نزدیک به یکدیگر در یک گروه و یا زیر گروه‌های نزدیک به هم بر اساس داده‌های مولکولی می‌باشند مطابقت دارد [۱٦]. بنابراین به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان استنباط نمود که هضم آنزیمی مناسب محصول PCR می‌تواند کارایی نشانگر RAPD را تا حد قابل توجهی در بررسی تنوعات در سطح ژنوم بهبود بخشد.

همچنین در توضیح مواردی از عدم مطابقت بین گروه‌بندی انجام شده بر اساس داده‌های مولکولی و منشاء جغرافیایی می‌توان این طور بیان نمود که این گونه گروه‌بندی‌ها ممکن است در نتیجه زمینه ژنتیکی منحصر به فرد این جمعیت‌ها و در نتیجه دارا بودن ویژگی‌های خاص در توالی ژنوم باشد. از سوی دیگر قرار گرفتن جمعیت‌های متعلق به دو ناحیه جغرافیایی دور از یکدیگر در یک گروه بر اساس تجزیه داده‌های مولکولی نیز می‌تواند به عواملی همچون جابجائی ژرم پلاسم، تعداد ناکافی آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی و یا پراکنش بسیار وسیع یک گیاه در محدوده جغرافیایی مورد مطالعه مربوط باشد. به بیان دیگر فواصل جغرافیایی توده‌ها نمی‌تواند دلیلی بر دوری یا نزدیکی زمینه ژنتیکی آنها باشد [۱۵]. از آنجا که جمعیت‌های ۱٤ و ۵ بالاترین و کمترین مقادیر مواد مؤثره را در اسانس دارا بوده و از سوی دیگر بر اساس مطالعه مولکولی انجام گرفته در یک گروه قرار گرفته‌اند می‌توان اظهار داشت میان عملکرد متابولیتی و تنوع ژنتیکی همبستگی وجود نداشته و تفاوت در عملکرد بیشتر تحت شرایط محیطی است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به دست آمده نشان داد که برای استفاده از تمامی ظرفیت تولید متابولیت ثانویه در کشت درون شیشه‌ای رازیانه نیاز به استفاده از القاکننده‌ها و سایر محرک‌های زیستی و غیر زیستی ضروری می‌باشد.

منابع

1. Omidbeigi R. Approaches for production and processing of medicine herbs. 2nd Volume, Tarahan- e Nashr Publication. 1997, pp: 300 - 420.

2. Zargari A. Medicinal plants. Volume 1. Tehran University of Medical Sciences 1988, pp: 481.

3. Newbury HJ and Ford-Lloyd BV. Estimation of genetic diversity. In: Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG, editors. Plant Genetic Conservation: The in situ Approach. Chapman and Hall; New York: 1997, pp: 192 – 206.

4. Marshall D. R and Brown A. H. D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. Crop Genetic Resoutces for Today and Tomorrow. *Cambridge university press, London*, 1975; pp: 53 - 80.

5. Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983; 1: 19.

6. Shams Ardakani MR, Abdi KH, Jamshidi AH and Haji Akhondi A. The study of volatile oil of Foeniculum Vulgar Miller. In their tissue culture and omparison with the whole plant. *Journal of Medicinal Plants* 2005; 4 (15): 73 - 80.

7. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. DNApolymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 6531 - 5.

8. Botstein D, White RL, Skolmick M and Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1980; 32: 314 - 32.

9. Mohammadi SA and Prasanna BM. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. *Crop Sci*. 2003; 43: 1235 - 48.

10. Abou-Isba SM, Abdel-Ghani AH and Al-Qura n. S, Variation in Hyoscyamus spp. Populations from Jordan Using Morphological Traits and RAPD Markers. *Jordan Journal of Agricultural Sci.* 2007; 3 (4): 411 - 28

11. Juliana M.K.C.P, Alisson F.C, Maria I.Z, Carlos AC, Sergio A.M.C, Jorge M.C.M, Rodrigo G, Antonio A.F.G, Tatiana d.C, Anete P.d.S and Luciana B.R. Genetic diversity in cultivated carioca common beans based on molecularmarker analysis. *Genetics and Molecular Biol.* 2011; 34 (1): 88 – 102.

12. Martins S.R, Vences F.J, Saenz de Miera L.E, Barrosa M.R and Carnide V. RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Sci. Hort*. 2006; 108: 133 - 42.

13. Bradeen J.M, Bach I.C, Briard M, Le C.V, Grzebelus D, Senalik D.A and Simon, P.W. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild Daucus populations reveals a genetically nonstructured composition. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 2002; 127: 383 - 91.

14. Pezhmanmehr M, Hassani M.E, Jahansooz F, Najafi A.A, Sefidkon F, Mardi M and Pirseiedi M. Assessment of genetic diversity in some Iranian populations of Bunium persicum using RAPD and AFLP markers. *Iranian J. Biotechnol.* 2009; 7 (2): 93 – 100.

15. Solouki M, Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh AA. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Sci. Hort*. 2008; 117: 281 - 7.

16. Yousefi Harikandehei M.J, Hasani M.E, Madah Arefi H and Mohammadipour M. Evaluation of Genetic diversity of several accessions of Iranian *Hyoscyamus niger* L.

Based on RAPD markers. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Res*. 2009; 17 (1 (33)): 1 - 14.