

ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاه دارویی زیره سبز با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA

لیلا جانی پور^۱، لیلا فهمیده^{۱*} و بهمن فاضلی نسب^۲

^۱ زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

^۲ زابل، دانشگاه زابل، پژوهشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای در شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان است. بدین منظور در این تحقیق سعی خواهد شد تا روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های زیره سبز مورد ارزیابی قرار گیرد. تعداد پنج جمعیت زیره سبز جمع‌آوری و با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD و ۱۰ آغازگر ISSR بررسی خواهد شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای NTsys pc2.1، GenAlex6.501 و Popgene32 تجزیه و تحلیل خواهند شد. در نشانگر RAPD در مجموع ۱۸۲ باند تکثیر که آغازگر TIBMBC03 دارای بیشترین تعداد باند (۲۷)، شاخص نشانگری (۱۲/۱۵) و شاخص چندشکلی (۰/۵) و در نشانگر ISSR در مجموع ۱۳۵ باند تکثیر که آغازگر UBC809 دارای بیشترین تعداد باند (۱۸)، شاخص نشانگری (۷/۵۶) و شاخص چندشکلی (۰/۴۲) بودند. در نشانگر RAPD، بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی (۰/۳۲) و شاخص شانس (۰/۲۳۳) متعلق به جمعیت زیره سبز سبزوار و در نشانگر ISSR نیز بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی (۰/۱۸) و شاخص شانس (۰/۲۷) متعلق به جمعیت زیره سبز سبزوار بود. کمترین میزان تشابه (۰/۱۴۴) بر اساس نشانگر RAPD مربوط به زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان و در نشانگر ISSR نیز کمترین میزان تشابه (۰/۰۸۵) مربوط به زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان و همچنین بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگر RAPD و ISSR توأم، کمترین میزان تشابه (۰/۱۱۷) مربوط به زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان بود. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که زیره سبز سبزوار به‌عنوان مرکز تنوع این گیاه بر اساس جمعیت‌های مورد بررسی پیشنهاد و دورترین جمعیت‌ها جهت تلاقی‌های احتمالی و ایجاد تنوع جدید و مفیدتر زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، زیره سبز، RAPD، ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴-۳۱۲۳۲۱۸۰، پست الکترونیکی: l.fahmideh@uoz.ac.ir، bfazeli@uoz.ac.ir

مقدمه

طب سنتی و درمان با مفردات گیاهی آن‌هم به‌صورت خیلی محدود و گاهی نادرست وجود داشته است (۳۶).

با توجه به افزایش سریع جمعیت ایران و نیاز روزافزون صنایع دارویی به گیاهان دارویی به‌عنوان ماده اولیه تولید دارو، ضرورت مطالعه و تحقیق بر روی این دسته از گیاهان بیش از پیش اهمیت یافته است. استفاده مطلوب،

ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان است متأسفانه، با وجود بنیان‌گذاران طب سنتی و گیاهی در ایران باستان، هیچ‌گونه کوششی برای پیشرفت در این زمینه صورت نگرفته و فقط فعالیت‌هایی در حد

و قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. بنابراین یکی از پایه‌های اساسی علم اصلاح نباتات به‌ویژه برای گیاهان دارویی، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است (۶).

نشانگرهای مولکولی یک ابزار ارزشمندی را برای توصیف و ارزیابی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها فراهم کرده‌اند به‌طوری‌که نشانگرهای مختلف سطوح مختلفی از تنوع را نشان می‌دهند (۱۷).

فن RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) از نوع نشانگر مبتنی بر PCR، ارزان، سریع و نیازمند به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد نظر نیست. در این روش برخلاف سایر روش‌های مبتنی بر PCR از آغازگر منفرد به طول ۱ تا ۱۳ نوکلئوتید که توالی آن به‌طور اختیاری تعیین می‌شود استفاده می‌گردد. هر آغازگر بخش قابل توجهی از یک مکان ژنی را تکثیر می‌نماید که به آن DNA چندشکلی تکثیر یافته (RAPD) می‌گویند (۴۸).

فن ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)، یک روش مبتنی بر PCR است که شامل تکثیر یک قطعه DNA موجود در فاصله تکثیر پذیر میان دو ناحیه تکراری ریز ماهواره منحصر به فرد با جهات مختلف است. این فن، از ریز ماهواره‌ها (ریز ماهواره) با طول ۲۵-۱۶ bp، به‌عنوان آغازگر یک واکنش تک آغازگری که لوکوس‌های چندگانه ژنومی را برای تکثیر توالی‌های بین ریز ماهواره‌ای با اندازه‌های مختلف، هدف می‌گیرد بهره می‌برد. تکرارهای ریز ماهواره مورد استفاده به‌عنوان آغازگر، می‌توانند دو، سه، چهار یا پنج نوکلئوتیدی باشند. آغازگرهای مورد استفاده می‌توانند به هر نقطه‌ای از DNA متصل شوند. اگرچه معمولاً در انتهای ۳' یا ۵' خود به یک تا چهار باز متصل بوده و بر اساس آن‌ها، گسترش می‌یابند (۲۰).

تاکنون تحقیقات مختلفی در مورد استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR به‌صورت جداگانه جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف مثل رازیانه (۸)، آویشن باغی (۴)،

منطقی و بهینه از این منابع که به لحاظ فناوری بسیار کم‌هزینه‌تر و ساده‌تر از صنایع دارویی شیمیایی است، می‌تواند ضمن تأمین بخشی از نیازهای عمده بهداشتی و درمانی جامعه از خروج مقادیر متنبهی ارز جلوگیری نموده و مانع گسترش وابستگی به بیگانگان شود. بنابراین با اتخاذ سیاست‌ها و راهکارهای مناسب و مبتنی بر یک شناخت واقع‌گرایانه از وضعیت موجود این منابع و کاربرد روش‌های علمی و صحیح در تمام ابعاد اعم از کاشت، داشت، برداشت و بهره‌برداری صنعتی و اقتصادی آن، چه از طبیعت و چه به‌صورت کشت مکانیزه، می‌توان به درکی واقعی و اصولی در خصوص نقش و بازدهی گیاهان دارویی در جوامع رو به رشدی همچون ایران رسید و علاوه بر حفظ و حراست از این سرمایه‌های ملی به شکوفایی و توسعه پایدار جامعه نیز دست یافت (۳۶).

زیره سبز با نام علمی (*cuminum cyminum*) از خانواده چتریان (*apiaceae*) و سرشار از متابولیت‌های ثانویه است. زیره سبز گیاهی است یک‌ساله از خانواده جعفری و ارتفاع آن برحسب شرایط محیطی از ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر متغیر است (۴۴). زیره سبز بومی مناطق مرکزی و جنوبی آسیا بوده و در چند کشور از جمله هند، پاکستان، ترکیه، ایران، مصر و اسپانیا کشت می‌شود این گیاه از لحاظ ارزش اقتصادی مهم‌ترین گیاه دارویی کشور محسوب می‌شود (۲۲). اهمیت اقتصادی زیره سبز به دلیل دارا بودن ویژگی‌های از قبیل فصل رشد کوتاه، نیاز آبی کم، عدم تداخل فصل رشد آن با سایر محصولات کشاورزی، توجیه اقتصادی آن نسبت به دیگر محصولات کشاورزی و دیگر محصولات زراعی و صادراتی بودن آن است (۲۸). اسانس این گیاه شامل ترکیباتی نظیر تانن، رزین، آلورون، سیمن، فلاندون و کارون است. ماده اصلی تشکیل‌دهنده اسانس آلدیدکومینیک یا کومینول است (۴۰).

از دلایل اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده در مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی باهدف کاهش هزینه‌ها، افزایش دقت

میکس (۲x) (شرکت امپلیکون دانمارک)، ۱ میکرو لیتر DNA (۱۰ نانوگرم در میکرو لیتر) و با آب دی یونایزر حجم نهایی تا ۱۵ میکرو لیتر و سپس چرخه حرارتی بدین صورت که یک چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۴۰ چرخه (تک رشته ای شدن DNA در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه؛ اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای در دمای ۳۵/۵ درجه به مدت یک دقیقه و بسط آغازگر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه) و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت الکتروفورز از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با استفاده از ژل رد انجام شد.

فن ISSR: با توجه به اینکه تاکنون هیچ نوع اطلاعاتی مبنی بر شناسایی نشانگرهای ISSR زیره و حتی خانواده پتریان وجود نداشت لذا در این تحقیق از ۱۰ آغازگر ISSR گوجه فرنگی استفاده شد (جدول ۳). حجم واکنش زنجیره ای پلی مرز و چرخه های حرارتی بر اساس روش یا ترزوپولوس و ببلی (۴۷) با کمی تغییر به شرح زیر انجام شد:

حجم واکنش زنجیره ای پلیمرز ۱۵ میکرو لیتر شامل؛ ۱ میکرو لیتر آغازگر (۱۰ پیکو مولار) با غلظت نهایی ۰/۲۵ میکرو مولار، ۷/۵ میکرو لیتر مسترمیکس (امپلیکن دانمارک (۲x))، ۱ میکرو لیتر DNA (۱۰ نانوگرم در میکرو لیتر) و ۵/۵ میکرو لیتر آب دی یونایزر و سیکل حرارتی شامل؛ یک چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد واحد به مدت ۵ دقیقه؛ ۴۰ چرخه (تک رشته ای شدن DNA در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای در دمای مخصوص (جدول ۳) به مدت ۱ دقیقه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه) و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. جهت

آویشن کوهی (۵۱)، نعنا (۳۱)، مریم گلی (۱۶)، زیره پارس (۱۹)، گزنه (۹) و زیره سیاه (۱۳) گزارش شده است.

با توجه به اینکه زیره سبز از مهم ترین گیاهان دارویی کشور محسوب و سرشار از متابولیت های ثانویه است (۴۴) به دلیل دارا بودن ویژگی های از قبیل فصل رشد کوتاه، نیاز آبی کم، عدم تداخل فصل رشد آن با سایر محصولات کشاورزی، توجه اقتصادی آن نسبت به دیگر محصولات کشاورزی و دیگر محصولات زراعی و صادراتی بودن آن است (۲۸). و از لحاظ ارزش اقتصادی مهم ترین گیاه دارویی کشور محسوب می شود (۲۲) در نتیجه در این تحقیق سعی خواهد شد جمعیت های مختلف گیاه دارویی زیره سبز از لحاظ میزان تنوع، شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مورد ارزیابی قرار گیرند.

مواد و روشها

مواد گیاهی: تعداد ۵ جمعیت گیاه زیره سبز از بانک ژن سازمان جنگل ها و مراتع کشور تهیه (جدول ۱) و با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج و تکثیر DNA: استخراج DNA ژنومی بر مبنای روش دلاپورتا و همکاران (۱۴) به روش تک بوته و از هر جمعیت سه بوته در مجموع پانزده جمعیت انجام شد.

فن RAPD: تعداد ۱۰ آغازگر RAPD که در سایر گیاهان خانواده پتریان جواب داده بودند برای این تحقیق انتخاب (جدول ۲) و واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس دستورالعمل ویلیمز و همکاران (۴۸) با کمی تغییر به قرار زیر انجام شد: یک میکرو لیتر آغازگرها (۱۰ پیکو مولار) با غلظت نهایی ۰/۲۵ میکرو مولار؛ ۵/۵ میکرو لیتر مستر

الکتروفورز از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با استفاده از ژل رد انجام شد.

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد استفاده در تحقیق

کد نمونه	اسم فارسی	اسم علمی	محل جمع‌آوری	موقعیت جغرافیایی
۱	زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	سبزوار	N, 57° 25' 48"; E, 36° 7' 12"
۲	زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	نیشابور	N, 36° 12' 0"; E, 58° 48' 0"
۳	زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	گزر بر خوار	N, 51° 23' 24"; E, 32° 22' 48"
۴	زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	اصفهان	N, 51° 39' 0"; E, 32° 37' 48"
۵	زیره سبز	<i>Cuminum cyminum</i>	کاشان	N, 51° 34' 48"; E, 33° 58' 48"

جدول ۲- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای RAPD مورد استفاده (۴۸)

ردیف	نام آغازگر	توالی ۵'→۳'	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
۱	TIBMBA02	TGC TCG GCT C	۳۵/۵
۲	TIBMBA03	GTG CGA GAA C	۳۵/۵
۳	TIBMBA06	GGA CGA CCG T	۳۵/۵
۴	TIBMBA16	TCG GCA CCG T	۳۵/۵
۵	TIBMBA17	ACA CCG TGC C	۳۵/۵
۶	TIBMBC03	GGC TTG ACC T	۳۵/۵
۷	TIBMBC05	GAG GCG ATT G	۳۵/۵
۸	TIBMBC08	GGT CTT CCC T	۳۵/۵
۹	TIBMBC12	CCT CCA CCA G	۳۵/۵
۱۰	TIBMBC16	CTG GTG CTC A	۳۵/۵

جدول ۳- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده (۴۷)

ردیف	نام آغازگر	توالی ۵'→۳'	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
۱	UBC-112	GACAGACAGACAGACA	۴۷/۶
۲	UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۱/۸
۳	UBC-820	ACTGACTGACTGACTG	۴۷/۶
۴	UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۵۱/۸
۵	UBC-818	CACACACACACACAG	۵۱/۸
۶	UBC-872	GATAGATAGATAGATA	۳۲/۹
۷	UBC-864	ATGATGATGATG	۳۲/۹
۸	UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	۵۱/۸
۹	UBC-857	ACACACACACACACT	۵۰/۱
۱۰	UBC-827	GACTGACTGACTGACT	۴۷/۶

نتایج و بحث

چندشکلی و شاخص چندشکلی: از ۱۰ آغازگر RAPD مورد استفاده در این تحقیق، تعداد ۹ آغازگر در تمام زیره-های سبز تکثیر شده و چندشکلی مناسب از خود نشان دادند (شکل ۱). در مجموع ۱۸۲ باند شناسایی شد که آغازگر TIBMBC08 با ۳ باند کمترین تعداد و آغازگر TIBMBC03 با ۲۷ باند بیشترین تعداد را در میان باندهای تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد باند در کل جایگاه‌ها برابر ۱۳/۱۱ بود (جدول ۴) و با نتایجی که در مطالعات قبلی (۳۶) با میانگین ۱۳/۶۶ برای زیره گزارش شده مشابهت داشت.

در نشانگر RAPD، بیشترین میزان شاخص نشانگری با میزان ۱۲/۱۵ مربوط به آغازگر TIBMBC03 و کمترین میزان شاخص نشانگری با میزان ۰/۰۹ مربوط به آغازگر TIBMBC08 و میانگین ۵/۴ مشاهده گردید. بیشترین میزان شاخص چندشکلی (۰/۵) مربوط به آغازگر TIBMBC03 و کمترین میزان شاخص چندشکلی (۰/۰۴) مربوط به آغازگر TIBMBC08 و با میانگین کل ۰/۳۷ مشاهده گردید. بیشترین میزان تعداد باند مؤثره، شاخص تنوع شانون و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/۷۱، ۰/۵۸ و ۰/۴۱ به ترتیب متعلق به آغازگرهای TIBMBC05 و TIBMBC08 و کمترین میزان تعداد باند مؤثره، شاخص تنوع شانون و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/۴۷، ۰/۴۵ و ۰/۲۹ متعلق به آغازگر TIBMBC16 بود (جدول ۴).

ضمناً تمام ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده در این تحقیق در تمام زیره‌های سبز تکثیر شده و چندشکلی مناسبی از خود نشان دادند (شکل ۲). در مجموع ۱۳۵ باند شناسایی شد که آغازگر UBC112 با ۳ باند کمترین تعداد و آغازگر UBC809 با ۱۸ باند بیشترین تعداد را در میان باندهای تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد باند در کل جایگاه‌ها برابر ۹/۹ بود (جدول ۵) و با نتایجی که در

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق امتیازبندی الگوهای باندی به صورت یک (وجود) و صفر (عدم وجود) برای هر باند انجام شد. صفاتی همچون تعداد باندهای تکثیر شده (AB=Amplified Bands)، تعداد باندهای چندشکل (PB=Polymorphic Bands)، تعداد باند مؤثر (Ne=Effective number of alleles)، درصد چندشکلی (PP= Percent of Polymorphic)، شاخص چندشکلی (DI= Diversity Index)، شاخص شانون (I= Shannon's Information index) و شاخص نی (h= Nei's gene diversity) اندازه-گیری شد. شاخص چندشکلی که میزان آن بین صفر تا یک

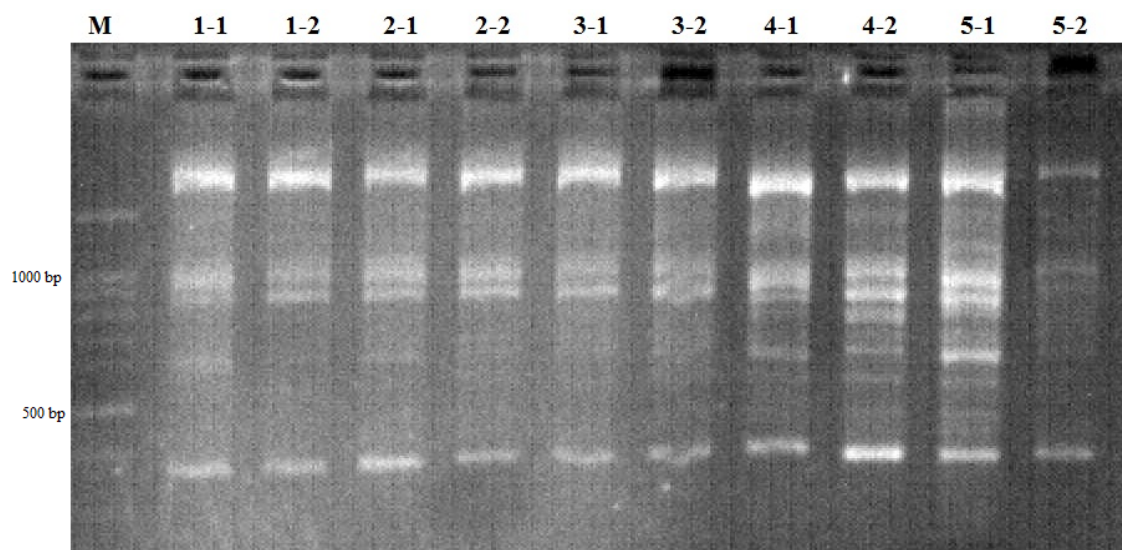
است (۳) با استفاده از فرمول $DI = 1 - \sum_{j=1}^n p_j^2$ فراوانی باند j ام در تمام ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی محاسبه شد (۱۱). ضمناً شاخص نشانگری (MI) (۲۴)، شاخص تنوع شانون (۲۶)، شاخص تنوع نی (۳۲) و تنوع بین و درون جمعیتی بر اساس هر دو نشانگر ISSR و RAPD با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.32 محاسبه شد.

شاخص نشانگری (Marker Index) نشان‌دهنده‌ی کارایی نشانگر است و با استفاده از فرمول $MI = EMR * DI$ (or PIC) که در آن EMR نسبت چندگانه مؤثر بوده و بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چند شکل موجود در یک ژنوم است به دست آمد. EMR با استفاده از فرمول $EMR = N_a$ β که در آن N_a تعداد مکان‌های چند شکل و β نیز نسبت مکان‌های چند شکل به تعداد کل مکان‌ها است محاسبه شد (۲۴).

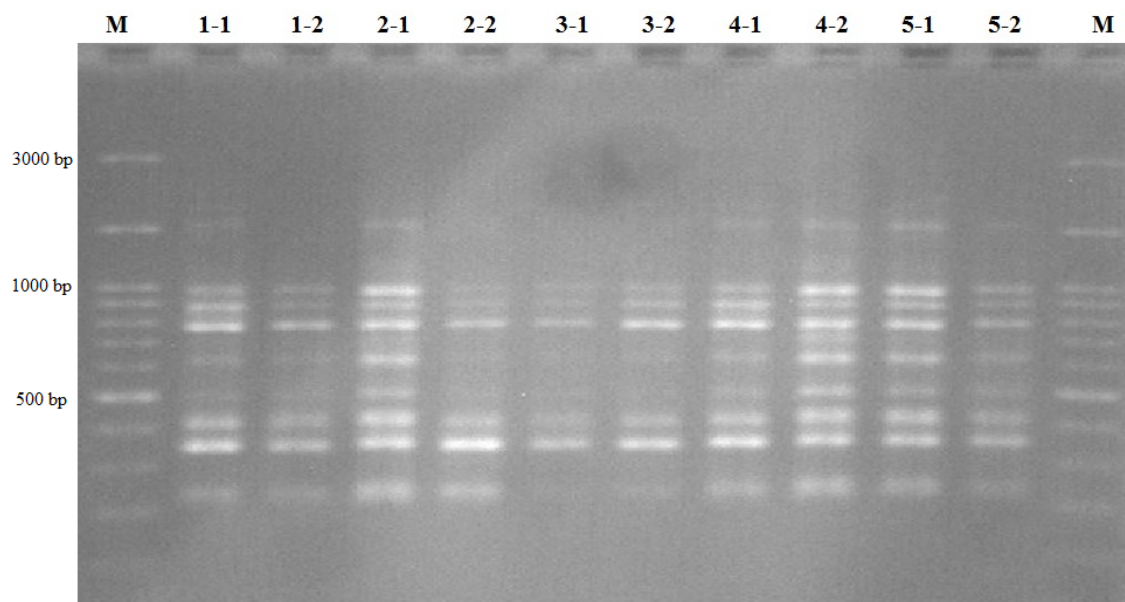
تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم N_j و با استفاده از نرم-افزار Darwin 6.0.12 مبتنی بر ماتریس تشابه نی و لی (۳۳) و جاکارد (۲۱) انجام شد. ضمناً برای هر دندروگرام ضریب کوفتیک توسط آزمون مانتل با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc v.2.1 به دست آمد. همچنین به منظور تأیید آنالیزهای کلاستر بندی آزمون کوفتیک و بوتسترپینگ صورت گرفت.

ISSR در پژوهش حاضر را میتوان به وسعت مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده نسبت داد (۱).

مطالعات قبلی (۴۳) از ۶ تا ۱۵ باند و میانگین ۱۰/۴ گزارش شده بود مشابهت داشت ضمناً چندشکلی بالای



شکل ۱- الگوی نواری تکثیرشده در نشانگر RAPD با استفاده از آغازگر TIBMBC05 (شماره‌ها بیانگر جمعیت‌های مورد استفاده و M بیانگر سایز مارکر DM2300)



شکل ۲- الگوی نواری تکثیرشده در نشانگر ISSR با استفاده از آغازگر UBC857 (شماره‌ها بیانگر جمعیت‌های مورد استفاده و M بیانگر سایز مارکر DM2300)

جدول ۴- تعداد باند تکثیرشده (AB)، تعداد باند چندشکلی (PB)، تعداد باند مؤثر (Ne)، درصد چندشکلی (PP)، شاخص چندشکلی (DI)، شاخص شانن (I)، شاخص نی (h) و شاخص نشانگری (MI) در نشانگر RAPD

آغازگر	AB	PB	Ne	PP	I	h	DI	MI
TIBMBA02	۸	۸	۱/۵	۱۰۰	۰/۴۶	۰/۳	۰/۴۴	۳/۵۲
TIBMBA06	۱۴	۱۴	۱/۶۲	۱۰۰	۰/۵۴	۰/۳۶	۰/۵	۷
TIBMBB16	۱۳	۱۱	۱/۴۷	۸۶/۶۱	۰/۴۵	۰/۲۹	۰/۳۸	۳/۶
TIBMBB17	۱۹	۱۹	۱/۷۱	۱۰۰	۰/۵۸	۰/۴۰	۰/۴۳	۸/۱۷
TIBMBC03	۲۷	۲۷	۱/۶۷	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۸	۰/۴۵	۱۲/۱۵
TIBMBC05	۱۵	۱۵	۱/۶۹	۱۰۰	۰/۵۸	۰/۴۰	۰/۴۱	۶/۱۵
TIBMBC08	۴	۳	۱/۷۵	۷۵	۰/۶۰	۰/۴۱	۰/۰۴	۰/۰۹
TIBMBC12	۱۰	۱۰	۱/۶۶	۱۰۰	۰/۵۷	۰/۳۹	۰/۳۸	۳/۸
TIBMBC16	۱۱	۱۱	۱/۵۴	۱۰۰	۰/۴۹	۰/۳۲	۰/۳۸	۴/۱۸

نتیجه گرفت که شاخص چندشکلی نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد و بستگی به عواملی مثل تعداد باند تولیدی توسط هر جایگاه داشته و حتی تعداد ژنوتیپ، تعداد آغازگر و شاخص چندشکلی دارند (۳۷). به‌طوری‌که رادر و همکاران (۴۱) میانگین شاخص چندشکلی را در تحقیقی با ۱۸ ژنوتیپ و ۱۵ آغازگر در گندم را ۰/۶۳ و همین مقدار را زمانی که تعداد ژنوتیپ‌ها ۶ عدد بود ۰/۵۴ به‌دست آوردند.

نشانگر RAPD نسبت به ISSR از شاخص نشانگری و شاخص تنوع شانن و نی بالاتری برخوردار بود و می‌تواند به این دلیل باشد که نشانگر RAPD تصادفی بوده اما نشانگر ISSR نیمه تصادفی و چون نشانگرهای تصادفی معمولاً در صورت تکثیر تعداد باند بیشتر تکثیر می‌کنند در نتیجه RAPD توانسته تعداد باند بیشتر و پیرو آن شاخص نشانگری بالاتری نیز داشته است.

ضریب تشابه: ضریب تشابه ژنتیکی در بین ۵ ژنوتیپ زیره سبز مورد استفاده با توجه به کل ۱۸۲ باند تولیدشده در نشانگر RAPD، بر اساس روش نی و لی (۳۳) محاسبه گردید و بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره سبز نیشابور و زیره سبز گز برخوار (۰/۵۲۶) و کمترین میزان تشابه

در نشانگر ISSR، بیشترین میزان شاخص نشانگری با میزان ۷/۵۶ مربوط به آغازگر UB809 و کمترین میزان شاخص نشانگری با میزان ۰/۳۳ مربوط به آغازگر UBC112 و میانگین ۳/۶۱ مشاهده گردید. بیشترین میزان شاخص چندشکلی (۰/۴۲) مربوط به آغازگرهای UBC809 و UBC857 و کمترین میزان شاخص چندشکلی (۰/۱۱) مربوط به آغازگر UBC812 و میانگین کل ۰/۳۴ مشاهده گردید. بیشترین میزان تعداد باند مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/۸۴، ۰/۶۴ و ۰/۴۵ به‌ترتیب متعلق به آغازگر UBC808 و کمترین میزان تعداد باند مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به‌ترتیب ۱/۴۵، ۰/۴۱ و ۰/۲۷ متعلق به آغازگر UBC872 بود (جدول ۵).

تاکنون مقادیر مختلفی برای چندشکلی و شاخص چندشکلی گزارش شده است مثلاً عبدالهی مندولکانی (۱)، ۷/۳، بریان و همکاران (۱۲) میانگین ۰/۵۱، ماکفری و همکاران (۲۷) از ۰/۰۷ تا ۰/۸ و با میانگین ۰/۵۶، پراساد و همکاران (۳۷)، میانگین ۰/۹ (فقط برای موتیف‌های دی نوکلئوتیدی)، ژو و همکاران (۵۲) از ۰/۴ تا ۱ و با میانگین ۰/۸۳۳ و بوهن و همکاران (۱۰) میانگین ۰/۳ گزارش داده‌اند. از تمام نتایج بالا به‌علاوه نتایج این تحقیق می‌توان

ژنتیکی یافت شده درون جمعیت‌ها و ۲۱ درصد در بین جمعیت‌ها (جدول ۹) و بر اساس اطلاعات حاصل از ISSR، ۷۷ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده درون جمعیت‌ها و ۲۳ درصد در بین جمعیت‌ها مشاهده شد (جدول ۱۰).

گزارش گردیده که ضریب تشابه تا حدودی تحت تأثیر تعداد ژنوتیپ، تعداد آغازگر و غیره قرار می‌گیرد. مثلاً پاراشهر و همکاران (۳۵) در زیره سبز با استفاده از نشانگر ISSR تشابه را از ۰/۶۳ تا ۰/۹۴، سیدلر و همکاران (۴۶) از ۰/۳۳ تا ۰/۷۸، بوهن و همکاران (۱۰)، میانگین ۰/۵۷، ماکافری و همکاران (۲۷) میانگین ۰/۴۴، آگراما و تونستر (۳) میانگین ۰/۴۳ به دست آوردند.

چندین عامل اکولوژیکی سبب انباشته شدن تفاوت ژنتیکی بین دو جمعیت می‌شود. مکان‌های جغرافیایی مختلف از نظر برخی ویژگی‌های اکولوژیکی از جمله عرض و طول جغرافیایی، دما و رطوبت متفاوت‌اند. این عوامل فاکتورهای اکو جغرافیایی خوانده می‌شوند و سبب گوناگونی ژنتیک در بین دو جمعیت می‌شوند. با توجه به نتایج، استفاده از جمعیت‌های مناطق جغرافیایی بیشتر برای تأیید الگوی موجود لازم است.

در گونه‌های دگرگشن به علت ایجاد ترکیبات ژنی جدید، جریان ژنی بالا و فشار شرایط محیطی حاکم بر منطقه، منجر به تثبیت یک سری ژن‌های خاص شده لذا فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها پراکنده بوده و در عوض تنوع بین جمعیت نسبتاً کم است (۳۹) اما در گونه‌های خودگشن به دلیل وجود الل‌های متفاوت درون هر جمعیت، تغییرات بیشتری درون جمعیت‌ها وجود دارد (۳۸) و در کل هم در گیاهان خودگشن و هم دگرگشن در اکثر حالات تنوع درون جمعیت بیشتر از تنوع بین جمعیت بوده ولی این میزان تنوع در گیاهان خودگشن بیشتر از دگرگشن است.

مربوط به ژنوتیپ‌های زیره سبز سبزواری و زیره سبز کاشان (۰/۱۴۴) با میانگین ۰/۳۶۴ مشاهده گردید. از طرفی ضریب تشابه ژنتیکی با توجه به کل ۱۳۵ باند تولید شده در نشانگر ISSR، بر اساس روش نی و لی (۳۳) نیز محاسبه و بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره سبز کاشان و زیره سبز اصفهان (۰/۶۴۷) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های زیره سبز سبزواری و زیره سبز کاشان (۰/۰۸۵) با میانگین ۰/۳۲۳ مشاهده گردید؛ اما ضریب تشابه ژنتیکی با توجه به کل ۲۱۷ باند تولید شده در نشانگر RAPD و ISSR، محاسبه و بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره سبز کاشان و زیره سبز اصفهان (۰/۵۴۷) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های زیره سبز سبزواری و زیره سبز کاشان (۰/۱۱۷) با میانگین ۰/۳۴۶ به دست آمد (جدول ۸).

در نشانگر RAPD، بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانن به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۲۳۳ متعلق به جمعیت زیره سبز سبزواری و کمترین میزان شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانن به ترتیب ۰/۲۱ و ۰/۲۳ متعلق به جمعیت زیره سبز کاشان بود (جدول ۶) و در نشانگر ISSR نیز بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانن به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۲۷ متعلق به جمعیت زیره سبز سبزواری و کمترین میزان شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانن به ترتیب ۰/۱۱۳ و ۰/۱۱۵ متعلق به جمعیت زیره گز برخوار بود (جدول ۷).

بنا بر نظریه واولوف، منشأ یا خاستگاه اولیه گیاهان متعلق به مراکزی است که بیشترین تنوع را دارا هستند (۲). لذا ضرورت دارد در جمع‌آوری ژرم پلاسما و پیدا کردن ژن-های مفید به زیره سبز سبزواری توجه بیشتری شود.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی که در آن تغییرات مشاهده شده داخل و بین اجزا جمعیت با استفاده از فاصله‌های ژنتیکی دسته‌بندی می‌شود محاسبه و بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگر RAPD، ۷۹ درصد تغییرات

جدول ۵- تعداد باند تکثیر شده (AB)، تعداد باند چندشکلی (PB)، تعداد باند مؤثر (Ne)، درصد چندشکلی (PP)، شاخص چندشکلی (DI)،

شاخص شانن (I)، شاخص نی (h) و شاخص نشانگری (MI) در نشانگر ISSR

آغازگر	AB	PB	Ne	PP	I	H	DI	MI
UBC808	۷	۷	۱/۸۴	۱۰۰	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۳۴	۲/۳۸
UBC809	۱۸	۱۸	۱/۷۶	۱۰۰	۰/۶	۰/۴۲۱	۰/۴۲	۷/۵۶
UBC811	۱۱	۱۱	۱/۵۵	۱۰۰	۰/۵۱	۰/۳۳۶	۰/۳۷	۴/۰۷
UBC112	۳	۳	۱/۵۴	۱۰۰	۰/۵۰	۰/۳۲۹	۰/۱۱	۰/۳۳
UBC818	۱۲	۱۲	۱/۵۴	۱۰۰	۰/۴۸	۰/۳۲۰	۰/۳۹	۴/۶۸
UBC820	۱۰	۱۰	۱/۵۱	۱۰۰	۰/۴۹	۰/۳۲۲	۰/۳۶	۳/۶
UBC827	۶	۶	۱/۶۸	۱۰۰	۰/۵۳۷	۰/۳۷۴	۰/۳	۱/۸
UBC857	۱۷	۱۶	۱/۷۱	۹۴/۱۱	۰/۵۷	۰/۳۹۴	۰/۴۲	۶/۳۲
UBC864	۸	۸	۱/۷۵	۱۰۰	۰/۶۱	۰/۴۲	۰/۳۶	۲/۸۸
UBC872	۹	۸	۱/۴۵	۸۸/۸۸	۰/۴۱	۰/۲۷	۰/۳۵	۲/۴۸

جدول ۶- تعداد کل باندها (AB)، تعداد باند چندشکلی (PB)، درصد چندشکلی (PP)، تعداد باند مؤثر (Ne)، شاخص شانن (I) و شاخص نی (h)

در نشانگر RAPD

کد جمعیت	AB	PB	PP	Ne	h	I
۱	۱۸۲	۱۱۴	۶۲/۶۴	۱/۳۵	۰/۳۲	۰/۳۳۳
۲	۱۸۲	۸۹	۴۸/۹۰	۱/۲	۰/۲۱	۰/۲۳
۳	۱۸۲	۹۹	۵۴/۴۰	۱/۲۵	۰/۲۴	۰/۲۶
۴	۱۸۲	۹۰	۴۹/۴۵	۱/۲۱	۰/۲۵	۰/۲۳
۵	۱۸۲	۱۱۰	۶۰/۴۴	۱/۳۷۹	۰/۲۱	۰/۲۳

جدول ۷- تعداد کل باندها (AB)، تعداد باند چندشکلی (PB)، درصد چندشکلی (PP)، تعداد باند مؤثر (Ne)، شاخص شانن (I) و شاخص نی (h)

در نشانگر ISSR

کد جمعیت	AB	PB	PP	Ne	h	I
۱	۱۳۵	۶۲	۴۵/۹۳	۱/۳۳	۰/۱۸	۰/۲۷
۲	۱۳۵	۴۰	۲۹/۶۳	۱/۲	۰/۱۳۱	۰/۱۸۰
۳	۱۳۵	۲۱	۱۵/۵۶	۱/۰۷	۰/۱۱۳	۰/۱۱۵
۴	۱۳۵	۱۹	۱۴/۰۷	۱/۱۲	۰/۱۲۶	۰/۱۲۹
۵	۱۳۵	۶۰	۴۴/۴۴	۱/۲۷	۰/۱۶۲	۰/۱۵۴

جدول ۸- دورترین جمعیت‌های زیره سبز مورد استفاده بر اساس ماتریس تشابه به‌دست‌آمده از روش نی و لی و نشانگرهای RAPD، ISSR و توأم

میزان تشابه	نشانگر مورد استفاده	دورترین جمعیت‌ها
۰/۱۴۴	RAPD	زیره سبز سبزوار - زیره سبز کاشان
۰/۰۸۵	ISSR	زیره سبز سبزوار - زیره سبز کاشان
۰/۱۷۷	RAPD - ISSR	زیره سبز سبزوار - زیره سبز کاشان

جدول ۹- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های زیره سبز بر اساس اطلاعات نشانگر RAPD

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس
بین جمعیت	۴	۲۴۰/۲۶۷	۶۰/۰۶۷**	۲۱
درون جمعیت	۱۰	۳۴/۶۶۷	۳۳/۴۶۷**	۷۹
جمع کل	۱۴	۵۷۴/۹۳۳		

** تفاوت معنی دار در سطح یک درصد ($P < 0.01$)

جدول ۱۰- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های زیره سبز بر اساس اطلاعات نشانگر ISSR

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس
بین جمعیت	۴	۲۷۰/۹۳۳	۶۷/۷۳۳**	۲۳
درون جمعیت	۱۰	۱۳۴/۶۶۷	۱۳/۴۶۷**	۷۷
جمع کل	۱۴	۴۰۵/۶۰۰		

** تفاوت معنی دار در سطح یک درصد ($P < 0.01$)

جمعیت‌ها از یکدیگر این مسئله می‌تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب جنگلی شمال ایران باشد (۲۵).

با توجه به اینکه فاصله ژنتیکی بیشتر در هنگام تلاقی جمعیت‌ها یا لاین‌ها، سبب افزایش مکان‌های ژنی هتروزیگوت و بالا بردن احتمال اثر هتروزیس می‌شود (۳۴)؛ و از طرفی فاصله ژنتیکی ممکن است با صفات مطلوب مرتبط باشد در نتیجه می‌توان پس از بررسی‌های بیشتر، از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد (۷). لذا بر این اساس چون کمترین میزان تشابه مربوط به جمعیت‌های تربچه French breakfast و Vikima بوده و بیشترین تنوع درون جمعیتی مربوط به جمعیت French breakfast بود در نتیجه می‌توان ذکر کرد که جهت هر نوع تلاقی و اصلاح گیاه دارویی تربچه بهتر است جمعیت French breakfast به عنوان یکی از پایه‌های پدری یا مادری و یا دهنده ژن انتخاب کرد.

تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای در روش RAPD، ISSR

و توام، جمعیت‌های زیره سبز را در سه گروه مختلف طبقه‌بندی کرده و مشاهده شد جمعیت‌ها از لحاظ موقعیت جغرافیایی از همدیگر تفکیک شدند (شکل ۳، ۴ و ۵). در گروه اول جمعیت‌های زیره سبز نیشابور، سبزوهر قرار گرفتند و در گروه دوم جمعیت زیره سبز گز برخوار و در

در تحقیق حاضر نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر RAPD (تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۷۹ و تنوع بین جمعیت‌ها ۲۱ درصد) و بر اساس نشانگر ISSRs (تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۷۷ و تنوع بین جمعیت‌ها ۲۳ درصد) بود. وجود تنوع بالا درون جمعیت در گیاهان دیگر با استفاده از نشانگر RAPD (شبهات بیشتر گونه *M. piperita* را با گونه *M. aquatic*) (۳۱) و نشانگر ISSR؛ شوید (۷)، لاله واژگون (۳۰)، مازودار و وی‌ول (۵)، نعناع (۴۲)، سیب شرقی (۲۵) و مرزه (۲۳) گزارش شده است

از عوامل مؤثر در توجیه تنوع بیشتر درون جمعیت مواردی از جمله خودگشن بودن گیاه، یک‌ساله بودن، ازدیاد با بذر، تعداد مکان‌های الی موردبررسی، موقعیت الی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازه جمعیت را می‌توان ذکر نمود (۳۶) بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها دارای پیچیدگی‌هایی است (۲۹).

در تحقیقی نیز آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون و بین جمعیتی سیب شرقی را به ترتیب ۹۴ و ۶ درصد از کل تنوع نشان دادند، که بیانگر تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در جمعیت‌های این گونه بوده و بیان کردند که علی‌رغم شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد

دریافته‌اند که RAPD الگوی نشانگر پیچیده‌تری تولید می‌کند (۱۵، ۱۸، ۲۴) در این تحقیق نیز تا حدودی RAPD نسبت به ISSR تنوع بیشتری تولید نمود.

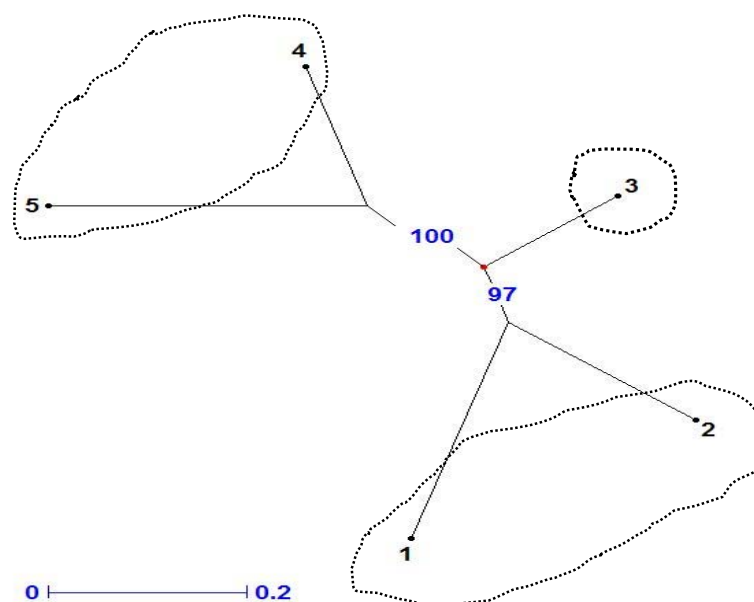
یکی دیگر از اهداف این تحقیق انتخاب دورترین جمعیت‌ها جهت تلاقی‌های احتمالی و ایجاد تنوع جدید و مفیدتر است که زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان دورترین جمعیت‌ها بودند. همچنین بر اساس شاخص‌های تنوع شانون و نی، سبزوار به عنوان مرکز تنوع این گیاه بر اساس جمعیت‌های مورد بررسی پیشنهاد می‌گردد.

لازم به ذکر است که آغازگرهای ISSR که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت برگرفته از گوجه فرنگی (۴۷) بودند و توانستند در زیره سبز نیز تکثیر شوند که این خود می‌تواند دلیلی بر روند تکاملی و مناطق حفاظت شده مشترک بین زیره سبز و گوجه‌فرنگی باشد.

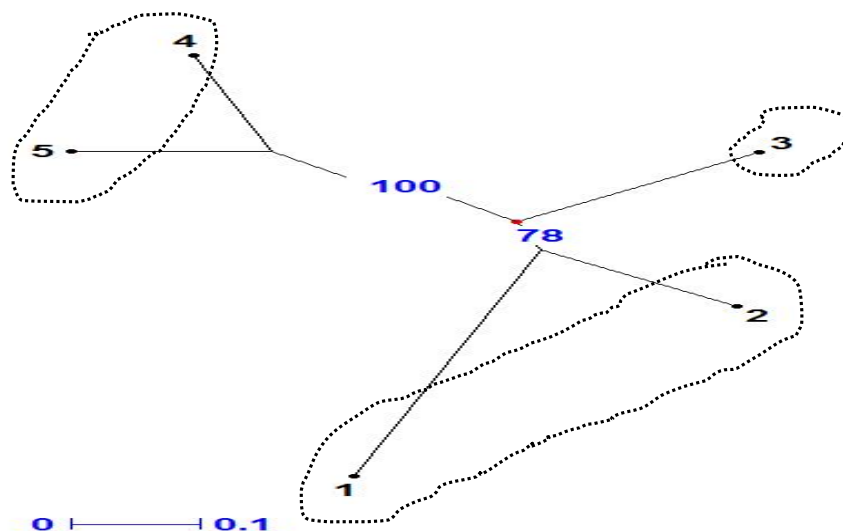
گروه سوم جمعیت‌های زیره سبز اصفهان و کاشان قرار گرفتند که در هر سه گروه جمعیت‌های که از لحاظ موقعیت جغرافیایی نزدیک به هم بودند در یک گروه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که جمعیت زیره سبز گز برخوار که در یک گروه جداگانه قرار گرفته دارای بیشترین میزان باند تکثیری در بین تمام جمعیت‌ها بود (داده نشان داده نشده است).

نتیجه‌گیری

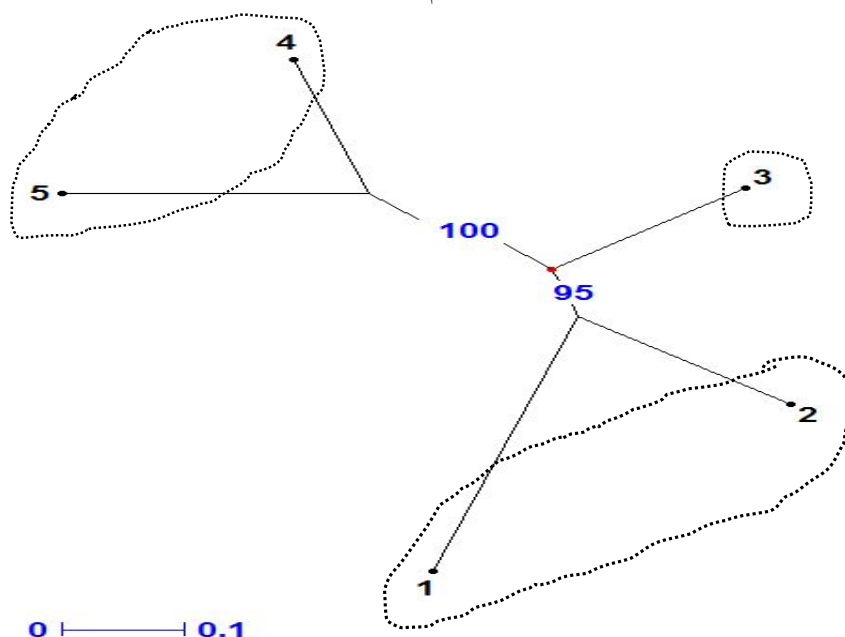
با توجه به اینکه RAPD و ISSR دو نشانگر غالب بوده و بر اساس کم هزینه و آسان بودن جهت انجام و قابلیت تکرار بودن ISSR در آزمایشگاه‌های مختلف نسبت به RAPD، از این دو نشانگر بسیار در تحقیقات مختلف استفاده شده است و از طرفی برخی محققین دریافته‌اند که ISSR الگوی نشانگر پیچیده‌تری نسبت به RAPD تولید می‌کند (۴۵، ۴۹، ۵۰، ۵۳) و همچنین برخی دیگر نیز



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره سبز بر اساس نشانگر RAPD، ماتریس تشابه نی و لی و روش NJ با نرم افزار Darwin.



شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره سبز بر اساس نشانگر ISSR، ماتریس تشابه نی و لی و روش NJ با استفاده از نرم افزار Darwin



شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره سبز بر اساس نشانگر RAPD و ISSR، ماتریس تشابه نی و لی و روش NJ با استفاده از نرم افزار Darwin

منابع

- 1- Abdollahi Mandoulakani B, Azizi H (2014) Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. Journal of Cellular and Molecular Researches 27: 260-268. 27210
- 2- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured publishing corporation.
- 3- Agrama H, Tuinstra M (2003) Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African journal of biotechnology 2: 334-340.

- 4- Alamdary SBL, Safarnejad A, Nematzadeh GA (2012) Using RAPD Marmer For Genetic Diversity Assessment of Several *Thymus* Species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 20: 192-201.
- 5- Alikhani L, Rahmani MS, Shabanian N, Badakhshan H, Khadivi-Khub A (2014) Genetic variability and structure of *Quercus brantii* assessed by ISSR, IRAP and SCoT markers. Gene 552: 176-183. 10.1016/j.gene.2014.09.034
- 6- Avise JC (2012) Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media.
- 7- Bahari Z, Shojaeiyan A, Rashidi Monfared S, Mirshekari A, Nasiri K, Amiriyan M (2015) Investigation of Genetic Diversity among Some Iranian Dill (*Anethum graveolens* L.) Landraces, Using ISSR Markers. Journal of Plant Genetic Research 2: 11-22.
- 8- Bahmani K, Noori SAS, Darbandi AI, Akbari A (2015) Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. Australian Journal of Crop Science 9: 321.
- 9- Bharmauria V, Narang N, Verma V, Sharma S (2009) Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Research 3: 166-170.
- 10- Bohn M, Utz HF, Melchinger AE (1999) Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. Crop Science 39: 228-237.
- 11- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics 32: 314-322.
- 12- Bryan G, Collins A, Stephenson P, Orry A, Smith J, Gale M (1997) Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics 94: 557-563.
- 13- Dehghan-kohestani S, Amin-Baghizadeh A, Ranjbar GA, Babaeian-jelodar N (2008) Genetic diversity of germplasm cumin [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] Kerman province using molecular markers RAPD. Quarterly Scientific-Research Medicinal and Aromatic Plants of Iran 24: 414-427.
- 14- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant molecular biology reporter 1: 19-21.
- 15- Domblides A, Domblides E, Kharchenko V, Potekhin G (2010) Study of genetic variation among parsley (*Petroselinum Crispum* (Mill.) Nym.) samples using RAPD and ISSR markers. Moscow University biological sciences bulletin 65: 152-154.
- 16- Echeverrigaray S, Agostini G (2006) Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 8: 7-13.
- 17- Fazeli-Nasab B, Naghavi MR (2011) Identification of Rust resistance among wheat cultiras using SSRs markers. Daneshe Zeraat 3: 79-88.
- 18- Gajera BB, Kumar N, Singh AS, Punvar BS, Ravikiran R, Subhash N, Jadeja GC (2010) Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. Industrial Crops and Products 32: 491-498. 10.1016/j.indcrop.2010.06.021
- 19- Hashemi H, Safarnejad A (2010) The use of RAPD markers dor assessing the genetic diversity of *Bunium persicum* (Boiss) B. FEDTSCH populations. International Journal of Science and Nature 1: 202-208.
- 20- Innark P, Ratanachan T, Khanobdee C, Samipak S, Jantasuriyarat C (2014) Downy mildew resistant/susceptible cucumber germplasm (*Cucumis sativus* L.) genetic diversity assessment using ISSR markers. Crop Protection 60: 56-61. 10.1016/j.cropro.2014.03.003
- 21- Jaccard P (1912) The distribution of the flora in the alpine zone. New phytologist 11: 37-50.
- 22- Kafi M, Rashed Mohasel MH, Kochaki A, Mplafiaei A (2002) Cumin, produced and production technology. Ferdowsi University of Mashhad Institute Press: 200.
- 23- Kameli M, Hesamzadeh S, Ebadi M (2013) Assessment of genetic diversity on populations of three satureja species in Iran using ISSR markers. Annals of Biological Research 4: 64-72.
- 24- Khaled AGA, Motawea MH, Said AA (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 13: 243-252. 10.1016/j.jgeb.2015.05.001

- 25- khodadoost a, yousefzadeh h, amirchakhmaghi n, Abdollahi h, hoseinzadeh a (2017) Genetic diversity of *Malus orientalis* in Hyrcanian forest using ISSR-PCR markers. *Journal of Cellular and Molecular Researches* 29: 359-369.
- 26- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. In: *Evolutionary biology*. (ed)^(eds). Springer. pp. 381-398.
- 27- Maccaferri M, Stefanelli S, Rotondo F, Tuberosa R, Sanguineti MC (2007) Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome* 50: 373-384. 10.1139/g06-151
- 28- Meghdadi N, Kamkar B (2011) Land suitability analysis for Cumin production in the North Khorasan province (Iran) using Geographical Information System. *Int J Agri Crop Sci* 3: 105-110.
- 29- Mohammadi SA, Prassana BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.
- 30- Momeni H, Shiran B, Khodambashi M, Cheghamirzaei K (2013) Studying of genetic diversity in some population of *Fritillaria imperialis* L. in Iranian Zagros region using ISSR marker and morphological traits. *Iranian journal of horticulture* 44: 61-72.
- 31- Momeni S, Shiran B, Razmjoo K (2006) Genetic variation in Iranian mints on the bases of RAPD analysis. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 1898-1904.
- 32- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- 33- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269-5273.
- 34- Olfati JA, Samizade H, Peyvast GA, Rabiei B, Khodaparast SA (2012) Relationship between genetic distance and heterosis in cucumber. *International Journal of plant breeding* 6: 21-26.
- 35- Parashar M, Jakhar M, Malik C (2014) A review on biotechnology, genetic diversity in cumin (*Cuminum cyminum*). *International Journal of Life Science and Pharma Research* 4: L17-L34.
- 36- Pejmanmehr M, Hasani MA, Fakhr-Tabatabai SM, Hadian J (2009) Genetic diversity and segregating of populations Zyrh English (*Bunium persicum* (Boiss)) using molecular markers RAPD. *Journal of Environmental Sciences* 7: 63-76.
- 37- Prasad M, Varshney R, Roy J, Balyan H, Gupta P (2000) The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 584-592.
- 38- Rao VR, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture* 68: 1-19.
- 39- Rauf S, Teixeira da Silva J, Khan AA, Naveed A (2010) Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of plant breeding* 4: 1-21.
- 40- Rios J, Recio M (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology* 100: 80-84.
- 41- Roder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics MGG* 246: 327-333.
- 42- Rodrigues VF, Oliveira RR, Vega MR (2014) A new isocoumarin from *Cajanus cajan* (*Fabaceae*). *Natural product communications* 9: 493-494.
- 43- Rostami-Ahmadvandi H, Cheghamirza K, Kahrizi D, Bahraminejad S (2013) Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L. accessions. *Australian Journal of Crop Science* 7: 361.
- 44- Salamati M, Zeinali H (2013) Evaluation of genetic variation in different populations of *Cuminum cyminum* L. using morphological traits. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 29: 51-61.
- 45- Sarwat M, Das S, Srivastava P (2008) Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant cell reports* 27: 519-528.
- 46- Seidler-Łożykowska K, Kuczyńska A, Mikołajczyk K, Nowakowska J, Bocianowski J (2014) Estimation of genetic distance among genotypes of caraway (*Carum carvi* L.) using RAPD-PCR. *Acta Scientiarum Agronomy* 36: 183-188.
- 47- Terzopoulos P, Bebeli P (2008) DNA and morphological diversity of selected Greek

- tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Scientia Horticulturae* 116: 354-361.
- 48- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18: 6531-6535.
- 49- Yang K-j, Zhang X-p, Zhang Z-x, Gong Y-x (2007) Analysis of actuality of *Emmenopterys henryi* community in Tiantangzhai of Anhui Province. *Journal of Plant Resources and Environment* 16: 79.
- 50- Ye Y, Zhang J, Ning G, Bao M (2008) A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118: 1-7.
- 51- Zabeti SM, Ismaeili A, Madah-arefi H, Nazaryan-firouzabadi F, Rezaeinezhad A, Mojori F (2013) Genetic diversity thyme, *Thymus Pubescens* based on indicator species RAPD. *New Journal of Cellular and Molecular Biology Biotechnology* 4: 25-31.
- 52- Zhou H-f, Xie Z-w, Ge S (2003) Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 332-339.
- 53- Zinodini A, Farshadfar M, Safari H, Moradi F, Shirvani H (2013) Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers. *Crop Biotechnology* 5: 11-21.

Genetic evaluation of different population of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) using DNA molecular markers

Janipour L.¹, Fahmideh L.¹ and Fazeli Nasab B.²

¹ Breeding and Biotechnology Dept., University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

²- Agronomy and Plant Breeding Dept., Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

Abstract

Iran is one of the richest sources of medicinal plants in the world with high variability in habitat conditions for a variety of these plants. Therefore, in this study tries to kinship and genetic distance between populations is assessed cumin. A total of five population of cumin were collected and then were analyzed using 10 RAPD primers and 10 ISSR primers. To analysis of data will be used NTsys pc2.1, GenAlex6.501 and Popgene32 software. The RAPD primers gave 182 Amplified bands that TIBMBC03 primer had the highest bands (24), marker index (12.15) and diversity index (0.5) and The ISSR primers gave 135 Amplified bands that UBC809 primer had the highest bands (18), marker index (7.56) and diversity index (0.47). In RAPD marker, the highest Nei diversity (0.32) and Shanon diversity (0.333) was belong to cumin of Sabzvar and also in ISSR marker the highest Nei diversity (0.18) and Shanon diversity (0.27) was belong to cumin of Sabzvar. According to RAPD marker, the lowest value of similarity (0.114) between Sabzvar and Kashan Cumin and also in ISSR primer, the lowest value of similarity was observed (0.085) between Sabzvar and Kashan Cumin. Moreover, according to both ISSR and RAPD analysis, the lowest genetic similarity was 0.117 between Sabzvar and Kashan Cumin. The results of this study showed that Sabzevar cumin is recommended as a center of plant diversity on the basis of studied populations and the farthest population to earliest possible crosses and create a variety of genetic diversity were cumin of Sabzevar and Kashan.

Key words: Genetic diversity, *Cuminum cyminum*, RAPD, ISSR