

ارزیابی ژنتیکی برخی جمعیت‌های گیاه دارویی زیره سیاه (*Carum carvi* L.) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

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

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

^۲ پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۷

چکیده

در این تحقیق به منظور تعیین رابطه خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های زیره سیاه از نشانگرهای RAPD و ISSR استفاده شد. با استفاده از نشانگر RAPD در مجموع ۱۲۶ آلل تکثیر شد که آغازگر TIBMBC08 و TIBMBA02 با ۷ آلل کمترین تعداد و آغازگر TIBMBC05 با ۲۲ آلل بیشترین تعداد داشتند. در نشانگر ISSR در مجموع ۷۹ آلل شناسایی که آغازگر UBC112 با ۱ آلل کمترین تعداد و آغازگر UBC809 با ۱۵ آلل بیشترین تعداد داشتند. در نشانگر RAPD، بیشترین میزان شاخص چندشکلی با میزان ۰/۹۴ مربوط به آغازگر TIBMBC05 و کمترین میزان شاخص چندشکلی با میزان ۰/۸ مربوط به آغازگر TIBMBA02 و میزان شاخص تنوع شانن (۰/۵۷) و شاخص تنوع نی (۰/۳۸) مشاهده گردید. همچنین در نشانگر ISSR، بیشترین میزان شاخص چندشکلی با میزان ۰/۹۲ مربوط به آغازگرهای UBC809 و کمترین میزان شاخص چندشکلی مربوط به آغازگر UBC112 با میزان صفر و میزان شاخص تنوع شانن (۰/۵۷) و شاخص تنوع نی (۰/۳۹) مشاهده گردید. بر اساس اطلاعات RAPD و ISSR به صورت توأم بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره سیاه کرمان و زیره سیاه جندق (۰/۴۸) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های زیره سیاه کرمان و زیره سیاه نیشابور (۰/۱۱۵) با میانگین ۰/۳۱۵ می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره سیاه را بر اساس اطلاعات توأم هر دو نشانگر RAPD و ISSR در سه گروه مختلف که تا حدودی با موقعیت جغرافیایی آنها مطابقت داشت، طبقه بندی و از همدیگر تفکیک نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، زیره سیاه، شاخص چندشکلی، نشانگر RAPD و ISSR

مقدمه

اروپای جنوب شرقی و در گستره‌ی ایران، استان‌های تهران، قزوین، کرمان، خراسان، بندرعباس، اصفهان، فارس، سمنان و یزد است (Ranjbarian et al., 2004). به دلیل خواص دارویی (درمان زخم معده و شکستگی استخوان، برطرف کردن نفخ شکم، تب‌بر، کاهش چربی و کلسترول خون، ضد آلرژی و کاهش قند خون) و ادویه‌ای دارای ارزش اقتصادی بالایی می‌باشد و بذور آن حاوی اسانس (شامل کومین

زیره سیاه (*Carum carvi*) یا زیره ایرانی، از خانواده چتریان، چندساله، دو لپه، خودگشن با گل‌هایی دو جنسه، دیپلوئید با $2n = 2x = 14$ کروموزوم (Sheidai et al., 1996) می‌باشد. زیستگاه، طبیعی زیره سیاه در سطح جهان آسیای مرکزی، غربی،

*نویسنده مسئول: l.fahmideh@uoz.ac.ir

تکرارهای ریز ماهواره مورد استفاده به‌عنوان آغازگر، می‌تواند 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 براساس آن‌ها، گسترش می‌یابند (Zietkiewicz et al., 1994).

تاکنون تحقیقات مختلفی در مورد استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR به‌صورت جداگانه جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف مثل رازیانه (Alamdary et al., 2012)، آویشن کوهی (Zabeti et al., 2013)، نعنا (Momeni et al., 2006)، مریم‌گلی (Echeverrigaray et al., 2006) and Agostini, 2006) زیره‌ی پارسی (Hashemi, and Safarnejad, 2010)، گزنه (Safarnejad, 2010) et al., 2012) و زیره سیاه (Bahraminejad Dehghan-kohestani et al., 2008) گزارش شده است. با توجه به اینکه زیره‌ی سیاه از مهم‌ترین گیاهان دارویی کشور محسوب می‌شود (Kafi et al., 2012) و ارزیابی تنوع ژنتیکی و اصلاح آن نیز از اهمیت بالایی برخوردار است، لذا در این تحقیق تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف زیره‌ی سیاه با استفاده از هر دو نشانگر RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: تعداد ۵ جمعیت زیره سیاه (جدول ۱) از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه و با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۴ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج و تکثیر DNA: استخراج DNA ژنومی بر مبنای روش Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) به صورت تک بوته و برای جمعیت سه بوته، در مجموع

آلدئید، آلفاپنن و گاماترپنن و بسیاری مواد مؤثر دیگر) است (Sharifi and Pouresmael, 2006).

از دلایل اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده در مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی باهدف کاهش هزینه‌ها، افزایش دقت 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 (Naghavi et al., 2007). فن‌آوری RAPD از نوع نشانگر مبتنی بر PCR است (Williams et al., 1990) که ارزان، سریع و نیازمند به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم موردنظر نیست (Agarwal et al., 1990). 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 چند شکلی تکثیر یافته (RAPD) می‌گویند (Williams et al., 1990). محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگاروز، بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل تشخیص می‌باشند (Gupta, 2010) آنالیز RAPD اطلاعاتی را فراهم می‌کند که می‌تواند در تعیین تمایز گونه‌ها و روابط فیلوژنتیکی در سطح مولکولی کمک کند (Subramanyam et al., 2009).

فن‌آوری Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)، 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 فن‌آوری، از میکروساتلیت‌ها (ریز ماهواره) با طول ۱۶-۲۵۰bp، به‌عنوان آغازگر یک واکنش تک آغازگری که لوکوس‌های چندگانه ژنومی را برای تکثیر توالی‌های بین ریز ماهواره‌ای با اندازه‌های مختلف، هدف می‌گیرد، بهره می‌برد.

استخراج از ۱۵ بوته انجام شد. برای آنالیز RAPD، از میان تعداد زیادی آغازگر RAPD که توسط Williams و همکاران (۱۹۹۰) گزارش شده بود، تعداد ۱۵ آغازگر که در سایر گیاهان خانواده چتریان تکثیر شده بودند برای این تحقیق انتخاب شد (جدول ۶).

واکنش PCR مطابق با شرایط مندرج در جدول ۲ و با ۱۵ آغازگر در حجم نهایی ۱۵ μL مطابق جدول ۳ انجام شد، سپس محصولات PCR به همراه نمونه شاهد بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

جدول ۱: مشخصات جمعیت‌های زیره سیاه مورد استفاده

اسم فارسی	اسم علمی	محل جمع‌آوری	موقعیت جغرافیایی	کد نمونه
زیره سیاه	<i>Carum carvi</i>	نیشابور	N, 36° 12' 0"; E, 58° 48' 0"	۶
زیره سیاه	<i>Carum carvi</i>	مشهد	N, 59° 21' 36"; E, 36° 10' 48"	۷
زیره سیاه	<i>Carum carvi</i>	خور بیابانک	N, 55° 5' 31.7"; E, 33° 46' 12"	۸
زیره سیاه	<i>Carum carvi</i>	جندق	N, 54° 24' 56"; E, 24° 2' 30"	۹
زیره سیاه	<i>Carum carvi</i>	کرمان	N, 57° 3' 36"; E, 30° 17' 24"	۱۰

جدول ۲: چرخه دمایی واکنش‌های PCR

مرحله	تعداد چرخه PCR	دما (C°)	زمان
	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۱ دقیقه
۴۰	اتصال آغازگر	۳۵/۵	۱ دقیقه
	بسط آغازگر	۷۲	۲ دقیقه
۱	بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

جدول ۳: مواد استفاده شده برای واکنش PCR

مقادیر مواد	مواد شرکت کننده در واکنش
۱ μL	آغازگرها (۱۰ پیکومولار)
۵,۵ μL	مستر میکس (۲x) (Amplicon)
۱ μL	DNA (۱۰ ng/ul)
۷,۵ μL	آب دی‌یونایزر
۱۵ μL	حجم نهایی

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و چرخه‌های حرارتی بر اساس روش Terzopoulos and Bebeli (۲۰۰۸) با کمی تغییر مطابق با شرایط مندرج شده در جدول ۴ و ۵ به شرح زیر انجام شد؛ جهت الکتروفورز از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. صفاتی همچون تعداد ال‌های تکثیر شده (AB=Amplified Bands)، تعداد ال‌های چند شکل (PB= Ploymorphic Bands)، تعداد ال موثر

برای آنالیز ISSR با توجه به اینکه تاکنون هیچ نوع اطلاعاتی مبنی بر شناسایی نشانگرهای ISSR زیره و حتی خانواده چتریان وجود نداشت، لذا با توجه به اصول تکامل و نیمه تصادفی بودن ISSR در این تحقیق از ۱۰ آغازگر ISSR که در گوجه‌فرنگی و لوبیبا Terzopoulos and Bebeli (۲۰۰۸) و Subramanyam و همکاران (۲۰۰۹) آزمایش و نتیجه مناسبی ارائه داده بودند استفاده شد (جدول ۷). حجم

(Ne=Effective number of alleles)، درصد چند شکلی (PP= Percent of Polymorphic)، شاخص چند شکلی (DI= Diversity Index)، شاخص شانن (I= Shannon's Information index)، شاخص نی

(gene diversity h= Nei's) و ارتباط بین تعداد الل تکثیر شده توسط هر آغازگر ISSR و RAPD با شاخص چند شکلی اندازه گیری شد.

جدول ۴: چرخه دمایی واکنش های PCR

مرحله	تعداد چرخه PCR	دما (C°)	زمان
	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۱ دقیقه
۴۰	اتصال آغازگر	۳۵/۵	۱ دقیقه
	بسط آغازگر	۷۲	۱/۵ دقیقه
۱	بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

جدول ۵: مواد استفاده شده برای واکنش PCR

مقادیر مواد	مواد شرکت کننده در واکنش
۱ μL	آغازگرها (۱۰ پیکومولار)
۷/۵ μL	مستر میکس (۲x) (Amplicon)
۱ μL	DNA (۱۰ ng/ul)
۵/۵ μL	آب دی یونایزر
۱۵ μL	حجم نهایی

جدول ۶: نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای RAPD مورد استفاده (Williams et al., 1990)

نام آغازگر	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال (C°)	نام آغازگر	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال (C°)
TIBMBA02	TGCTCGGCTC	۳۵/۵	TIBMBC03	GGCTTGACCT	۳۵/۵
TIBMBA03	GTGCGAGAAC	۳۵/۵	TIBMBC05	GAGGCGATTG	۳۵/۵
TIBMBA06	GGACGACCGT	۳۵/۵	TIBMBC08	GGTCTTCCCT	۳۵/۵
TIBMBA16	TCGGCACCGT	۳۵/۵	TIBMBC12	CCTCCACCAG	۳۵/۵
TIBMBA17	ACACCGTGCC	۳۵/۵	TIBMBC16	CTGGTG CTCA	۳۵/۵

جدول ۷: نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده (Terzopoulos and Bebeli, 2008a & b)

نام آغازگر	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال (C°)	نام آغازگر	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال (C°)
UBC112	GACAGACAGACAGACA	۴۷/۶	UBC872	GATAGATAGATAGATA	۳۲/۹
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۱/۸	UBC864	ATGATGATGATG	۳۲/۹
UBC820	ACTGACTGACTGACTG	۴۷/۶	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	۵۱/۸
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۵۱/۸	UBC857	ACACACACACACACT	۵۰/۱
UBC818	CACACACACACACACAG	۵۱/۸	UBC827	GACTGACTGACTGACT	۴۷/۶

تجزیه و تحلیل داده ها

دندروگرام ضریب کوفتیک توسط آزمون مانتل با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc v.2.1 (Assessment, 2012) بدست آمد. همچنین به منظور تایید آنالیزهای کلاستر بندی آزمون کوفتیک و بوتسترپینگ صورت گرفت.

نتایج

چند شکلی: از ۱۰ آغازگر RAPD مورد استفاده، تعداد ۹ آغازگر تکثیر و چندشکلی مناسبی از خود نشان دادند (جدول ۸). در مجموع ۱۲۶ الل شناسایی شد که آغازگرهای TIBMBC08 و TIBMBA02 با ۷ الل کمترین تعداد و آغازگرهای TIBMBC05 با ۲۲ الل بیشترین تعداد را در میان الل های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد الل در کل جایگاهها برابر ۱۴ بود.

تمام ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده تکثیر شده و چندشکلی مناسب از خود نشان دادند (جدول ۹). در مجموع ۷۹ الل شناسایی شد که آغازگر UBC112 با ۱ الل کمترین تعداد و آغازگر UBC809 با ۱۵ الل بیشترین تعداد را در میان الل های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد الل در کل جایگاهها برابر ۷/۹ بود.

شاخص چند شکلی: در نشانگر RAPD بیشترین میزان شاخص چند شکلی (۰/۹۴) مربوط به آغازگر TIBMBC05 و کمترین میزان شاخص چند شکلی (۰/۸) مربوط به آغازگر TIBMBA02 با میانگین کل ۰/۸۹ مشاهده گردید بود بیشترین میزان شاخص مارکری (۲۰/۶۸) مربوط به آغازگر TIBMBC05 و کمترین میزان شاخص مارکری (۴/۹) و (۴/۹۶) به ترتیب مربوط به آغازگرهای TIBMBA02 و TIBMBC08 بود (جدول ۸) ضمناً در نشانگر RAPD میزان شاخص تنوع شانن (۰/۵۷) و شاخص تنوع نی (۰/۳۸) بدست آمد. در نشانگر ISSR

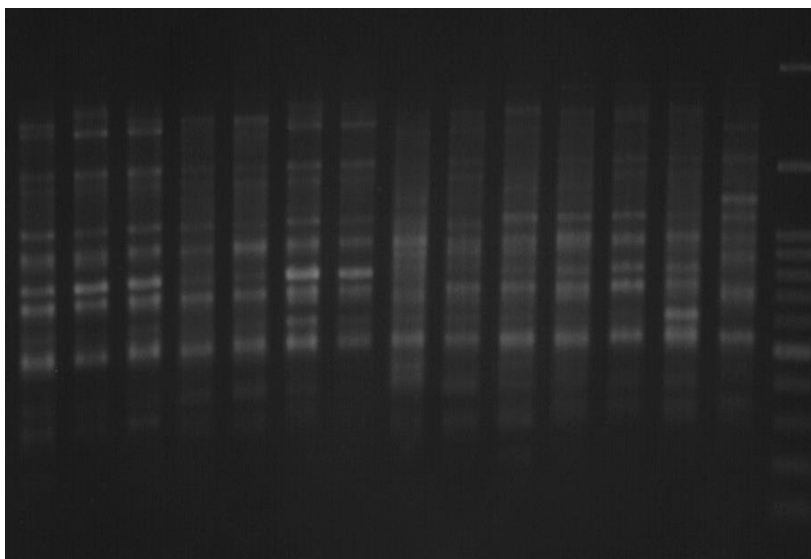
شاخص چند شکلی که میزان آن بین صفر تا یک است (Agrama and Tuinstra, 2003) با استفاده از فرمول $DI = 1 - \sum_{j=1}^n p_j^2$ (Pj فراوانی الل زام در تمام ژنوتیپهای مورد ارزیابی) محاسبه شد (et al., 1980) (Botstein et al., 2015). ضمناً شاخص مارکری (MI) (Khaled et al., 2015)، شاخص تنوع شانن (Lewontin, 1972)، شاخص تنوع نی (Nei, 1973) و تنوع بین و درون جمعیتی بر اساس هر دو نشانگر RAPD و ISSR با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.32 محاسبه شد. لازم به ذکر است که شاخص چند شکلی (DI) یا محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC = Polymorphism Information Content) هر آغازگر برای هر نشانگر مولکولی می تواند با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_j^2$ (Pj فراوانی الل زام در بین تمام الل های تولیدی ژنوتیپهای مورد استفاده) (Anderson et al., 1993) و یا با استفاده از فرمول

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

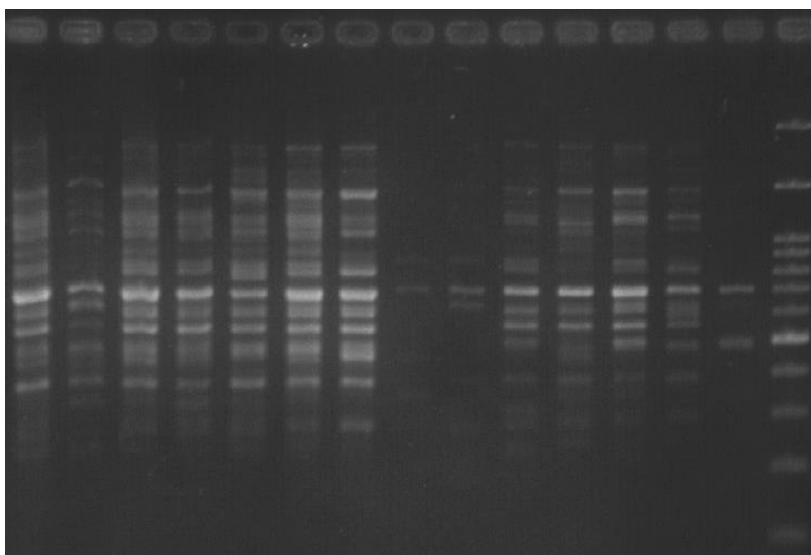
(Pi و Pj فراوانی الل i ام و j ام در تمام جمعیتها و n مجموع تعداد الل هر لوکوس) (Pasqualone et al., 1993) محاسبه گردد. شاخص مارکری (Marker Index) نشان دهنده کارایی نشانگر می باشد و با استفاده از فرمول $MI = EMR * DI$ (or PIC) که در آن EMR نسبت چندگانه موثر بوده و بیانگر تعداد جایگاههای ژنی چند شکل موجود در یک ژنوم می باشد بدست آمد. EMR با استفاده از فرمول $EMR = N_a * \beta$ که در آن Na تعداد مکانهای چند شکل و β نیز نسبت مکانهای چند شکل به تعداد کل مکان ها می باشد محاسبه شد (Khaled et al., 2015). تجزیه خوشه ای بر اساس الگوریتم Nj و با استفاده از نرم افزار Darwin 6.0.12 (Seguin et al., 2003) مبتنی بر ماتریس تشابه نی و لی (Nei and Li, 1979) و جاکارد (Jaccard, 1912) انجام شد. ضمناً برای هر

(جدول ۹). ضمناً در نشانگر ISSR میزان شاخص تنوع شانن (۰/۵۷) و شاخص تنوع نی (۰/۳۹) بدست آمد. در داده‌های ادغام شده از اطلاعات حاصل از دو نشانگر ISSR و RAPD میزان شاخص تنوع شانن (۰/۵۷) و شاخص تنوع نی (۰/۳۹) بدست آمد.

بیشترین میزان شاخص چند شکلی (۰/۹۲) مربوط به آغازگر UBC809 و کمترین میزان (صفر) مربوط به آغازگر UBC112 و با میانگین کل ۰/۷۵ مشاهده گردید. بیشترین میزان شاخص مارکری (۱۳/۸) مربوط به آغازگر UBC809 و کمترین میزان شاخص مارکری (صفر) مربوط به آغازگر UBC112 بود



شکل ۱: نمونه‌ای از الگوی نواری تکثیرشده در نشانگر RAPD با استفاده از آغازگر TIBMBA-02



شکل ۲: نمونه‌ای از الگوی نواری تکثیرشده در نشانگر ISSR با استفاده از آغازگر UBC812

جدول ۸: تعداد الل تکثیر شده (AB)، تعداد الل چند شکل (PB)، تعداد الل موثر (Ne)، شاخص چند شکلی (DI)، شاخص شانن (I)، شاخص نی (h) و شاخص مارکری (MI) در آغازگرهای RAPD

MI	DI	h	I	PP	Ne	PB	AB	آغازگر
۴/۹	۰/۸	۰/۳۶۵	۰/۵۴۹	۸۷/۵	۱/۵۹	۷	۸	TIBMBA-02
۱۴/۷۲	۰/۹۲	۰/۴۲۱	۰/۶۱۱	۱۰۰	۱/۷۵	۱۶	۱۶	TIBMBA-06
۱۱/۷۶	۰/۹	۰/۳۸۸	۰/۵۷	۹۳/۳۳	۱/۶۶	۱۴	۱۵	TIBMBA-16
۱۲/۷۹	۰/۹۱	۰/۴۰۵	۰/۵۹۲	۹۳/۷۵	۱/۷۱	۱۵	۱۶	TIBMBA-17
۱۹/۵۳	۰/۹۳	۰/۳۶۵	۰/۵۴۹	۱۰۰	۱/۵۹	۲۱	۲۱	TIBMBA-03
۲۰/۶۸	۰/۹۴	۰/۳۶۳	۰/۵۴۷	۱۰۰	۱/۵۹	۲۲	۲۲	TIBMBA-05
۴/۹	۰/۸۱	۰/۳۸۸	۰/۵۷۴	۸۷/۵	۱/۶۶	۷	۸	TIBMBA-08
۸/۸	۰/۸۸	۰/۴۳۲	۰/۶۲۱	۱۰۰	۱/۷۸	۱۰	۱۰	TIBMBA-12
۱۲/۸۸	۰/۹۲	۰/۳۸۸	۰/۵۷۴	۱۰۰	۱/۶۶	۱۴	۱۴	TIBMBA-16

جدول ۹: تعداد الل تکثیر شده (AB)، تعداد الل چند شکل (PB)، تعداد الل موثر (Ne)، شاخص چند شکلی (DI)، شاخص شانن (I)، شاخص نی (h) و شاخص مارکری (MI) در آغازگرهای ISSR

MI	DI	h	I	PP	Ne	PB	AB	آغازگر
۴/۸	۰/۸	۰/۴	۰/۵۸۶	۱۰۰	۱/۶۹	۶	۶	UBC808
۱۳/۸	۰/۹۲	۰/۴۰۵	۰/۵۹۲	۱۰۰	۱/۷۱	۱۵	۱۵	UBC809
۸/۸	۰/۸۸	۰/۴۳۲	۰/۶۲۱	۱۰۰	۱/۷۸	۱۰	۱۰	UBC811
۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۱۰۰	۱	۱	۱	UBC112
۷/۷۴	۰/۸۶	۰/۳۹۱	۰/۵۷۷	۱۰۰	۱/۶۷	۹	۹	UBC818
۵/۸۱	۰/۸۳	۰/۴۱	۰/۵۹۹	۱۰۰	۱/۷۱	۷	۷	UBC820
۲/۱۴	۰/۶۷	۰/۴۴	۰/۶۲۹	۸۰	۱/۸	۴	۵	UBC827
۹/۲۵	۰/۹	۰/۳۸۶	۰/۵۷۲	۸۵/۷۱	۱/۶۵	۱۲	۱۴	UBC857
۳/۸۵	۰/۷۷	۰/۴	۰/۵۵	۱۰۰	۱/۸	۵	۵	UBC864
۸/۷	۰/۸۷	۰/۳۵	۰/۵	۱۰۰	۱/۶۴	۱۰	۱۰	UBC872

زیره سیاه نیشابور با میانگین ۰/۳۷۶ مشاهده گردید. میانگین میزان تنوع درون جمعیت (۶۲/۶ درصد) و تنوع بین جمعیت (۳۷/۴ درصد) بدست آمد. اما بر اساس اطلاعات RAPD و ISSR به صورت توأم بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره سیاه کرمان و زیره سیاه جندق (۰/۴۸) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپهای زیره سیاه کرمان و زیره سیاه نیشابور (۰/۱۱۵) با میانگین ۰/۳۱۵ است. از اهداف این تحقیق انتخاب دورترین جمعیتها جهت تلاقیهای احتمالی و ایجاد تنوع جدید و مفیدتر است

ضرب تشابه: در نشانگر RAPD بیشترین میزان تشابه ژنتیکی (۰/۳۸۸) مربوط به زیره سیاه جندق و زیره سیاه کرمان و کمترین میزان تشابه (۰/۰۸۳) مربوط به ژنوتیپهای زیره سیاه کرمان و زیره سیاه مشهد با میانگین ۰/۲۶۸ مشاهده گردید. میانگین میزان تنوع درون جمعیت (۶۴/۵ درصد) و تنوع بین جمعیت (۳۶/۵ درصد) بدست آمد. در نشانگر ISSR بیشترین میزان تشابه (۰/۶۰۳) مربوط به زیره سیاه کرمان و زیره سیاه جندق و کمترین میزان تشابه (۰/۱۱۳) مربوط به ژنوتیپهای زیره سیاه کرمان و

که زیره سیاه کرمان و زیره سیاه نیشابور دورترین جمعیت‌ها بودند (جدول ۱۰).

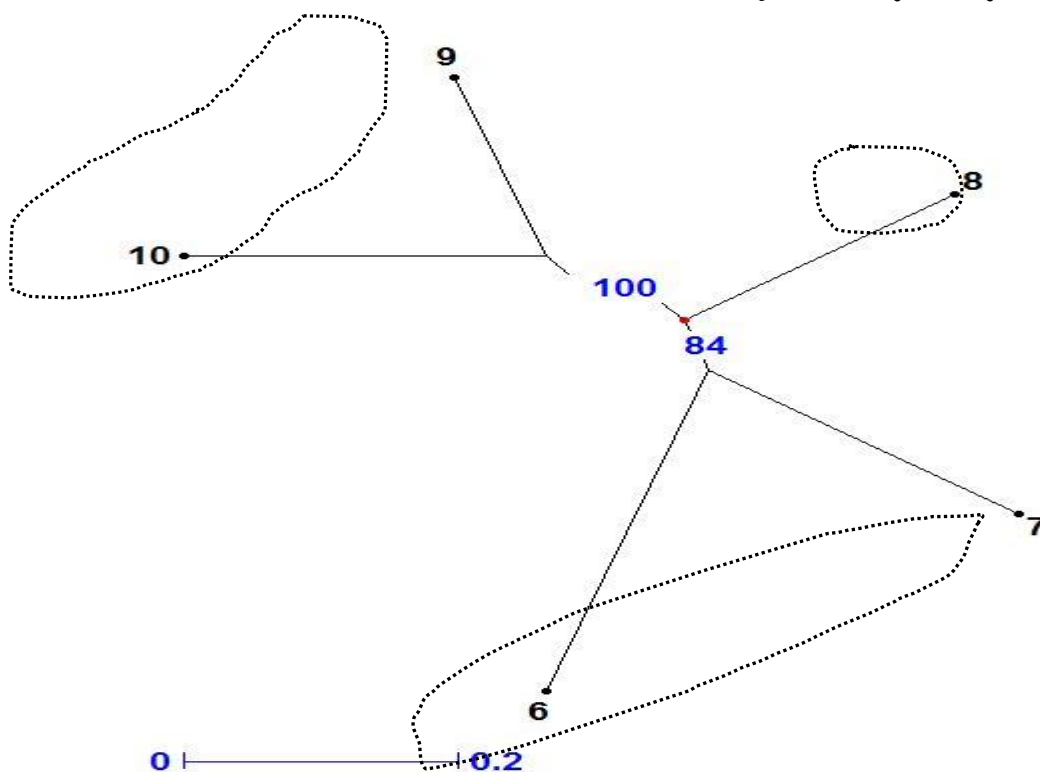
جدول ۱۰: دورترین جمعیت‌ها بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از روش نی و لی و نشانگرهای RAPD، ISSR و توأم

میزان تشابه	نشانگر مورد استفاده	دورترین جمعیت‌ها
۰/۰۸۳	RAPD	زیره‌ی سیاه کرمان - زیره‌ی سیاه مشهد
۰/۱۱۳	ISSR	زیره‌ی سیاه کرمان - زیره‌ی سیاه نیشابور
۰/۱۱۵	RAPD- ISSR	زیره‌ی سیاه کرمان - زیره‌ی سیاه نیشابور

تجزیه خوشه‌ای

جمعیت‌های زیره سیاه بر اساس اطلاعات نشانگر RAPD، ISSR و توأم در سه گروه مختلف طبقه‌بندی و از لحاظ موقعیت جغرافیایی تا حدودی از همدیگر تفکیک شدند (شکل ۳). به منظور تایید نتایج خوشه بندی از بوتستریپینگ (میانگین ۱۰۰ باز خوشه بندی به طور تصادفی هر بار با استفاده از ۷۰ درصد داده) و ضریب همبستگی کوفنتیک که در این بخش ($r=0.97$) بود استفاده شد. ضمناً در این خوشه بندی جمعیت‌های زیره‌ی سیاه نیشابور و زیره‌ی سیاه مشهد در یک گروه و زیره‌ی سیاه خور بیابانک از استان

اصفهان در یک گروه و زیره‌ی سیاه جندق از اصفهان و زیره‌ی سیاه کرمان که از دو منطقه متفاوت هستند با هم در یک گروه قرار گرفتند و تنها گروه مختلط است. ضمناً بر اساس اطلاعات شجره‌های به دست آمده مشخص شد که جمعیت‌ها بر اساس اطلاعات حاصل دو نشانگر RAPD و ISSR به صورت توأم با استحکام بیشتری نسبت به RAPD و RAPD نیز نسبت به ISSR در سه گروه مختلف طبقه‌بندی شدند یعنی نتایج نشانگر RAPD در این تحقیق نسبت به ISSR ملموس‌تر بوده است.

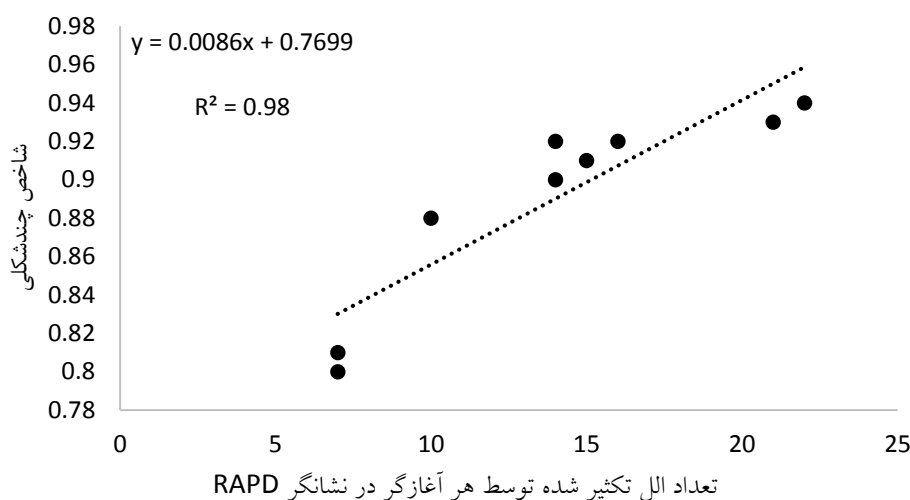


شکل ۳: تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره‌ی سیاه بر اساس نشانگر RAPD و ISSR، ماتریس تشابه نی و لی و روش NJ (میزان بوتستریپینگ ۱۰۰ دفعه با استفاده از ۷۰ درصد داده‌ها) با استفاده از نرم‌افزار Darwin

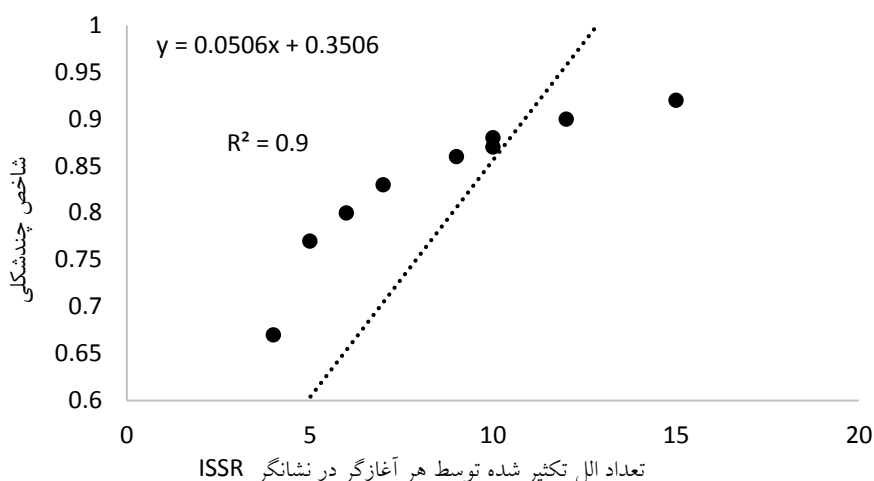
بحث

ژنوتیپ‌ها ۶ عدد بود ۵۴٪ به دست آوردند (et al., 2000). با توجه به این که میزان چندشکلی با میانگین تعداد الل تولیدی در هر جایگاه همبستگی مثبت دارد لذا در این تحقیق نیز همبستگی بالای بین تعداد الل تولید شده توسط هر آغازگر و شاخص چندشکلی مؤید مطلب بالا و صحت آزمایش است (شکل ۴ و ۵). گزارش شده که در گیاهان خودگشن تنوع درون جمعیتی بیشتر از بین جمعیتی است (Terzopoulos and Bebeli, 2008) و در این تحقیق نیز تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی بر اساس اطلاعات هر دو نشانگر بیشتر بود. نشانگر RAPD و ISSR بر اساس شاخص مارکری معنی‌دار و مقایسه میانگین نشان داد که نشانگر RAPD شاخص مارکری بالاتری نسبت ISSR داشته لذا می‌تواند به این دلیل باشد که نشانگر RAPD تصادفی بوده اما نشانگر ISSR نیمه تصادفی و چون نشانگرهای تصادفی معمولاً در صورت تکثیر تعداد الل بیشتر تکثیر می‌کنند در نتیجه RAPD توانسته تعداد الل بیشتر و پیرو آن شاخص مارکری بالاتری نیز داشته است.

چندشکلی و شاخص چندشکلی: تاکنون مقادیر مختلفی برای چندشکلی و شاخص چندشکلی گزارش شده است مثلاً Bahraminejad و همکاران (۲۰۱۳)، شاخص چندشکلی را در زیره‌ی سبز از ۰/۰۷۵ تا ۰/۳۷، Bryan و همکاران (۱۹۹۷) میانگین ۰/۵۱، Maccaferri و همکاران (۲۰۰۷) از ۰/۰۷ تا ۰/۸ و با میانگین ۰/۵۶، Prasad و همکاران (۲۸) میانگین ۰/۹ (فقط برای موتیف‌های دی نوکلئوتیدی)، zhou و همکاران (۲۰۰۳) از ۰/۴ تا ۱ و با میانگین ۰/۸۳۳ و Bohn و همکاران (۱۹۹۹) میانگین ۰/۳ گزارش داده‌اند. مطالعات قبلی به‌علاوه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شاخص چندشکلی دارای میزان ثابتی نبوده و بستگی به عواملی مثل تعداد الل تولیدی توسط هر جایگاه داشته و حتی تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر نیز همبستگی مثبتی با شاخص چندشکلی دارد (Fazeli-nasab and Naghavi, 2011). به‌طوری‌که Roder و همکاران (۱۹۹۵) میانگین شاخص چندشکلی را در تحقیقی با ۱۸ ژنوتیپ و ۱۵ آغازگر در گندم را ۰/۶۳ و همین میزان را زمانی که تعداد



شکل ۴: ارتباط بین تعداد الل تولیدشده توسط هر آغازگر RAPD و محتوای چندشکلی



شکل ۵: ارتباط بین تعداد الل تکثیر شده توسط هر آغازگر ISSR و شاخص چندشکلی

این تحقیق میانگین شاخص تنوع آغازگرهای RAPD بیشتر از ISSR بود در نتیجه لازم دانسته تا مقایسه میانگین بین شاخص تنوع به دست آمده از آغازگرهای RAPD و ISSR صورت گیرد لذا نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داده که اختلاف معنی داری بین نشانگر RAPD و ISSR وجود ندارد از طرفی برابری شاخص تنوع شان و شاخص تنوع نی در هر دو نشانگر می تواند دلیلی بر صحت این موضوع در این تحقیق باشد.

لازم به ذکر است که آغازگرهای ISSR که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت برای اولین بار در گوجه فرنگی و لوبیا آزمایش شده بودند (Terzopoulos and Bebeli, 2008 a & b) و توانستند در زیره سبز نیز تکثیر شوند که این خود می تواند دلیلی بر روند تکاملی باشد.

مقایسه RAPD و ISSR: در ضمن 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 آزمایشگاه های مختلف نسبت به RAPD از این دو نشانگر به طور گسترده در تحقیقات مختلف استفاده شده است و از طرفی برخی محققین دریافته اند که ISSR الگوی نشانگری پیچیده تری نسبت به RAPD تولید می کند (Zinodini et al., 2008; Yang et al., 2007; et al., 2013; Sarwat et al., 2008) و همچنین برخی دیگر نیز دریافته اند که RAPD الگوی نشانگری پیچیده تر تولید می کند (Domblides et al., 2010; et al., 2015). البته هیچ کدام از این محققین اطلاعاتی که ثابت کند کدام نشانگر بهتر است، را ارائه نداده اند. از طرفی چون در

جدول ۷: تجزیه واریانس شاخص تنوع آغازگرهای RAPD و ISSR

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
شاخص تنوع	۱	۰/۰۹۲۸۴	۰/۰۹۲۸۴	۲/۲۷n.s
خطا	۱۷	۰/۶۹۴۰۰	۰/۰۴۰۸۲	
کل	۱۸	۰/۷۸۶۸۴		

n.s غیر معنی داری

حدودی بر اساس فواصل جغرافیایی از همدیگر تفکیک کند. در تحقیق حاضر نیز نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس دو نشانگر RAPD و ISSR نشان داده که این دو نشانگر توانایی تفکیک جمعیت‌های زیره را از هم دارند.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس اطلاعات RAPD و ISSR به صورت توأم بیشترین میزان تشابه مربوط به زیره‌ی سیاه کرمان و زیره‌ی سیاه جندق (۰/۴۸) و کمترین میزان تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های زیره‌ی سیاه کرمان و زیره‌ی سیاه نیشابور (۰/۱۱۵) با میانگین ۰/۳۱۵ می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های زیره‌ی سیاه را بر اساس اطلاعات توأم هر دو نشانگر RAPD و ISSR در سه گروه مختلف که تا حدودی با موقعیت جغرافیایی آنها مطابقت داشت، طبقه بندی و از همدیگر تفکیک نمود. دورترین جمعیت‌ها جهت تلاقی‌های احتمالی و ایجاد تنوع جدید و مفیدتر، زیره سیاه مشهد و زیره‌ی سیاه کرمان بودند. همچنین نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین نتایج حاصل از RAPD و ISSR وجود ندارد.

ضریب تشابه: با توجه به میزان پایین اعداد بین جمعیت‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که زیره‌های سیاه دارای تنوع زیاد می‌باشد که می‌توان در بهبود خصوصیات کمی و کیفی استفاده کرد. مطالعات نشان داده است که ضریب تشابه تا حدودی تحت تأثیر تعداد ژنوتیپ، تعداد آغازگر و.... قرار می‌گیرد (Terzopoulos and Bebeli, 2008). Parashar و همکاران (۲۰۱۴) در زیره‌ی سبز با استفاده از نشانگر ISSR تشابه را از ۰/۶۳ تا ۰/۹۴، Seidler-Łożykowska و همکاران (۲۰۱۴) از ۰/۳۳ تا ۰/۷۸، Bohn و همکاران (۱۹۹۹) میانگین ۰/۵۷، Maccaferi و همکاران (۲۰۰۷) میانگین ۰/۴۴، Tuinstra and Agrama (۲۰۰۳) میانگین ۰/۴۳ به دست آوردند.

تجزیه خوشه‌ای: در تحقیقی مشخص شده که نشانگر ITS جهت بررسی تنوع ژنتیکی در زیره سیاه مناسب نمی‌باشد (Azimzade et al., 2014) از طرفی در تحقیقی دیگر که توسط توسط Dehghan-kohestani و همکاران (۲۰۰۸) در مورد زیره‌ی سیاه صورت گرفته بود مشخص شد RAPD توانسته جمعیت را تا

References

- Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant cell reports. 27 (4): 617-631.
- Agrama, H., and Tuinstra, M. (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology. 2 (10): 334-340.
- Alamdary, S., Safarnejad, A. and Nematzadeh, G. (2012). Using RAPD Marmer For Genetic Diversity Assessment of Several Thymus Species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 20(40):192- 201.
- Anderson, J.A., Churchill, G., Autrique, J., Tanksley, S. and Sorrells, M. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome. 36 (1): 181-186.
- Assessment, G.M. (2012). Recent Publications of F. James Rohlf. Evolution. 44: 665-683.
- Bahmani, K., Noori, S. A. S., Darbandi, A. I. and Akbari, A. (2015). Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. Australian Journal of Crop Science. 9 (4): 321.
- Bahraminejad, A., Mohammadi-Nejad, G., Abdul Kadir, K., Bin Yusop, M.R. and Samia, M. A. (2012). Molecular diversity of Cumin ('*Cuminum cyminum*' L.) using RAPD markers. Australian Journal of Crop Science. 6 (2): 194.
- Bohn, M., Utz, H.F. and Melchinger, A.E. (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 (1): 228-237.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32 (3): 314.
- Dehghan-kohestani, S., Amin-Baghizadeh, A.G., Ranjbar, A. and 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 (4): 414-427.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983).** A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1 (4): 19-21.
- Domblides, A., Domblides, Kharchenko, E. V. and 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 (4): 152-154.
- Echeverrigaray, S. and Agostini, G. (2006).** Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 8 (esp).
- Fazeli-nasab, B. and Naghavi, M.R. (2011).** Identification of Rust resistance among wheat cultivars by using SSRs markers. *Journal of Agronomy Science*. 4 (5): 81-88.
- Gupta, P. (2010).** Elements of biotechnology: Rastogi Publications.
- Hashemi, H. and Safarnejad, A. (2010).** The use of RAPD markers for assessing the genetic diversity of *Bunium persicum* (Boiss) B. FEDTSCH populations. *International Journal of Science and Nature*. 1(2):202-208.
- Jaccard, P. (1912).** The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist*. 11 (2): 37-50.
- Kafi, M., M.H, R.M., Kochaki, A. and Mplafiaei, A. (2000).** Cumin, Produced and production technology: Ferdowsi University of Mashhad Institute Press.
- Khaled, A., Motawea, M. and Said, A. (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(2): 243-252.
- Lewontin, R.C. (1972).** The apportionment of human diversity. In *Evolutionary biology*: Springer, 381-398.
- Maccaferri, M., Stefanelli, S. Rotondo, F. Tuberosa, R. and Sanguineti, M.C. (2007).** Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome*, 50 (4):373-384.
- Momeni, S., Shiran, B. and Razmjoo, K. (2006).** Genetic variation in Iranian mints on the bases of RAPD analysis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(10): 1898-1904.
- Naghavi, M. R., Ghareyazi, B. and Hoseinisalekdeh, G. (2007).** Molecular markers: Tehran University Press.
- Nei, M. (1973).** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70 (12): 3321-3323.
- Nei, M. and Li, W.H. (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76 (10): 5269-5273.
- Parashar, M., Jakhar, M. and Malik, C. (2014).** A review on biotechnology, genetic diversity in cumin (*Cuminum cyminum*). *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 4 (4): L17-L34.
- Pasqualone, A., Lotti, C. and Blanco, A. (1999).** Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microsatellites. *European Food Research and Technology*. 210 (2): 144-147.
- Prasad, M., Varshney, R., Roy, J., Balyan H. and Gupta, P. (2000).** The use of microsatellites for detecting DNA

- polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 100 (3-4): 584-592.
- Ranjbarian, P., Sadeghian, S., Shirazi, M., SarafNejad, A., Fazeli, M., Majlesi, G.O., Kashani, K.M. and Kooraki, M. (2004).** Evaluation of antibacterial effect of 4 plant extract on *heliobacterpilori* with Difusion disk and focitometry methods. *Scientific Journal of Hamedan University of Medical Sciences*. 3 (42-47).
- Roder, M.S., Plaschke, J., König, S. U., Börner, A.M., Sorrells, E. Tanksley, S.D. and Ganal, M.W. (1995).** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics MGG*. 246 (3): 327-333.
- Rostami-Ahmadvandi, H., Cheghamirza, K. Kahrizi, D. and 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 (3): 361.
- Sarwat, M., Das, S. and Srivastava, P. (2008).** Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant cell reports*. 27 (3): 519-528.
- Seguin, M., Flori, A. Legnate, H., Clément-Demange, A., Hamon, P., Perrier, X. and Glaszmann Jean, C. (2003).** Rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*: 277.
- Seidler-Łożykowska, K., Kuczyńska, A., Mikolajczyk, K. Nowakowska, J. and Bocianowski, J. (2014).** Estimation of genetic distance among genotypes of caraway (*Carum carvi* L.) using RAPD-PCR. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 36 (2): 183-188.
- Sharifi, M. and Pouresmael, M. (2006).** Breaking seed dormancy in *Bunium persicum* by stratification and chemical substances. *Asian Journal of Plant Sciences*.8:695-699.
- Sheidai, M., Ahmadian, P. and Poorseyedy, S. (1996).** Cytological Studies in Iran Zira from Three Genus: *Bunium*, *Carum* and *Cuminum*. *Cytologia*. 61 (1): 19-25.
- Subramanyam, K., Muralidhararao, D. and Devanna, N. (2009).** Novel molecular approach for optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis and genetic diversity assessment of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Current Biotica*. 3 (1):1-13.
- Terzopoulos, P. and Bebeli, P. (2008 a).** DNA and morphological diversity of selected Greek tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Scientia Horticulturae*. 116 (4): 354-361.
- Terzopoulos, P. and Bebeli, P. (2008 b).** Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*. 108 (1): 39-44.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22): 6531-6535.
- Yang, K.-J., Zhang, X.-P., Zhang, Z.-X. and Gong, Y.-x. (2007).** Analysis of actuality of *Emmenopterys henryi* community in Tiantangzhai of Anhui Province. *Journal of Plant Resources and Environment*. 16 (1):79.
- Ye, Y., Zhang, J. Ning, G. and 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): 1-7.
- Zabeti, S.M., Ismaeili, A., Madah-arefi, H., Nazaryan-firouzabadi, F., Rezaeinezhad, A. and Mojori, F. (2013).** Genetic diversity thyme, *Thymus Pubescens* based on indicator species RAPD. *New Journal of Cellular and Molecular Biology Biotechnology*. 4(13): 25-31.
- Zhou, H.-F., Xie, Z.-W. and 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 (2): 332-339.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20 (2): 176-183.
- Zinodini, A., Farshadfar, M., Safari, H., Moradi, F. and Shirvani, H. (2013).** Study of Genetic Relationships of Some Mint Species Using R-ISSR Markers. Crop Biotechnology. 5: 11-21.