Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Investigation of Genetic Variation in Cumin (*Cuminum cyminum*) Ecotypes of Khorasan Provinces using RAPD and ISSR Markers

Mohammad Zabet

* Corresponding Author: Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Tel: +989151605645, Email: mzabet@birjand.ac.ir

Atena Rahimi

MSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Tel: +989156450769, Email: atenarahimi88@yahoo.com

Ali Izanlo

Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Tel: +989159776145, Email: a.izanlo@birjand.ac.ir

Zohreh Alizadeh

Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Tel: +989155643148, Email: zoalizade@birjand.ac.ir

Abstract

Objective

Determination of genetic variation in plant material is an initial step for identification, preservation and maintenance of heritable reserves as well as the basis for genetic research and breeding programs. The aim of this research was to study the genetic diversity and categorization of cumin ecotypes collected from North, Razavi and South Khorasan provinces based on RAPD and ISSR markers. Ultimately, the aim was to answer the following questions: Is there a genetic diversity between cumin populations and is there a correlation between the genetic diversity and geographic diversity of cumin ecotypes?

Materials and methods

In this research, 20 different cumin ecotypes were cultivated for DNA extraction in the College of Agriculture of university of Birjand. The quantity and quality of the extracted DNA were evaluated using Nano drop and 1% agarose gel electrophoresis. For genetic variation, nine primers of RAPD and 30 ISSR primers were used.

Results

The results of the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there were variations between and within populations. Based on the RAPD and ISSR markers, 10 and 9 percent of the variation were between populations and 90 and 91 percent were within populations, respectively. Based on the RAPD and ISSR markers the percentage of polymorphism 62% and 70%, the mean of polymorphic content was 0.26 and 0.3, the mean of Shannon's information index was 1.37 and 1.9, and the mean of the information index 2.1 and 2.76 were obtained, respectively. The results PCoA showed that for the RAPD marker, the first two components were accounted 40.4% and for ISSR marker, however, the first four components were accounted for 49.6% of the variation. The cluster analysis based on the similarity matrix grouped the ecotypes in 6 and 7 clusters, respectively.

Conclusions

According to the obtained information, such as the polymorphism, the large amplitude between the similarity coefficients (jacquard) and the grouping of ecotypes in distinct clusters, there is a genetic diversity between the studied cumin ecotypes. The other hand, in most cases, there was the correlation between the genetic variation in the collected ecotypes and geographic location.

Keywords: Biplot, Cluster Analysis, Principal Coordinates Analysis

Citation: Zabet M, Rahimi A, Izanlo A, Alizadeh Z (2019) Investigation of Genetic Variation in Cumin (*Cuminum cyminum)* Ecotypes of Khorasan Provinces using RAPD and ISSR Markers. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 75-98.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 75-98.

10.22103/jab.2019.12102.1050

Received: October 7, 2018; Accepted: April 8, 2019

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره‌سبز (*Cuminum cyminum*) خراسان با استفاده از نشانگرهای رپید و آی‌اس‌اس‌آر

محمد ضابط

* نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران، تلفن: 09151605645، ایمیل: mzabet@birjand.ac.ir

آتنا رحیمی

دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند ایران، تلفن: 09156450769، ایمیل: atenarahimi88@yahoo.com

علی ایزانلو

استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران، تلفن: 09159776145، ایمیل: a.izanlo@birjand.ac.ir

زهره علیزاده

استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران، تلفن: 09155643148، ایمیل: zoalizade@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: 1397/07/15، تاریخ پذیرش: 1398/01/19

چکیده

هدف: تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی، گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگه‌داری ذخایر توارثی و همچنین پایه و اساس تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی است. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی اکوتیپ‌های زیره‌سبز جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق 20 اکوتیپ مختلف زیره‌سبز به منظور استخراج DNA در دانشکده کشاورزی بیرجند کشت گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تنوع ژنتیکی از نه آغازگر RAPD و 30 آغازگر ISSR استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بین و درون جمعیت‌ها تنوع وجود دارد. بر اساس نشانگر RAPD، 10 درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و 90 درصد مربوط به درون جمعیت‌ها و بر اساس نشانگر ISSR، نه درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و 91 درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بود. درصد چندشکلی بدست آمده از نشانگر RAPD و ISSR به ترتیب 62 و 70 درصد؛ میانگین محتوای چندشکلی 0/26 و 0/3؛ میانگین شاخص اطلاعاتی شانون 1/37 و 1/9 و میانگین شاخص اطلاعاتی نی 2/1 و 2/76 بدست آمد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که در نشانگر RAPD دو مولفه اول 40/6 درصد و در نشانگر ISSR چهار مولفه اول 49/6 درصد از تغییرات را توجیه کردند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه اکوتیپ‌های مورد مطالعه را به ترتیب در 6 و 7 خوشه گروه‌بندی نمود.

نتیجه گیری: با توجه به اطلاعات حاصله از جمله، درصد چند شکلی، دامنه زیاد بین ضرایب تشابه (جاکارد) حاصل شده و گروه‌بندی اکوتیپ‌ها در خوشه های مجزا، بین اکوتیپ‌های زیره مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود دارد. از سوی دیگر بین تنوع ژنتیکی موجود در اکوتیپ‌های جمع آوری شده و موقعیت جغرافیایی، در بیشتر موارد ارتباط وجود داشت.

کلمات کلیدی: بای‌پلات، تجزیه به مختصات اصلی، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

زیره (*Cuminum cyminum*) یکی از گیاهان دارویی و مهم‌ترین اعضای خانواده چتریان با فرمول ژنومی 2x =14 = 2n بومی مناطق مرکزی و جنوبی آسیا بوده و در چند کشور از جمله هند، پاکستان، ترکیه، ایران، مصر و اسپانیا کشت می‌شود (Bagheri & Mahmoodi 2002). این گیاه قدیمی‌ترین و از نظر اقتصادی مهم‌ترین گونه در این خانواده می‌باشد که مصارف دارویی، غذایی و صنعتی فراوانی دارد (Kafi et al. 2002). استان خراسان عمده ترین تولید کننده زیره‌سبز در ایران می‌باشد. سطح زیر کشت زیره‌سبز نزدیک به 43000 هکتار است که 25/7 درصد سطح زیر کشت از کل سطح زیر کشت گیاهان دارویی کشور و 0/22 درصد از کل سطح زیر کشت گیاهان زراعی در کشور را به خود اختصاص داده است (Koocheki et al. 2004).

تنوع ژنتیکی پایه و اساس اصلاح گیاهان است که از تکامل طبیعی نشات گرفته و مهم‌ترین جز در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است که سازگاری دراز مدت و بقای جمعیت‌های گیاهی را تضمین می‌کند (Uzun & Yesiloglu 2012). بیوتکنولوژی مدرن به دنبال استفاده گسترده‌تر از تنوع ژنتیکی می‌باشد تا با استفاده از ویژگی‌های مناسب در گونه‌های وحشی، به اصلاح گیاهان زراعی بپردازد (Farsi & Bagheri 2009). تخمین تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آن‌ها از گذشته‌های دور معمولاً بر اساس ارزیابی صفات زراعی و یا نشانگرهای ملکولی صورت می‌گیرد (Rahman Poor et al. 2014). از نشانگرهای DNA برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط فنتیکی[1] در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود (Naghavi et al. 2013). در بررسی تنوع ژنتیکی، معیارهای اولیه برای گزینش نشانگرها هزینه، ابزار و نیازهای تکنیکی، تعداد نشانگر در هر بررسی و میزان اطلاعات حاصل از آن نشانگر است (Kumar et al. 2009). از مزیت‌های آغازگرهای RAPD سریع، ارزان بودن، تهیه آسان و نیاز به مقدار کم DNA می‌باشد (Giovannoni et al. 1991). امکان غربال سریع و مؤثر توالی DNA، بر اساس چندشکلی در تعداد زیادی مکان را فراهم می‌نماید و به مواد رادیواکتیو و امکانات آزمایشی گسترده نیاز ندارد (Sudupak et al. 2002).

در میان نشانگرهای مختلف نشانگر بین ریز ماهواره ای یا ISSR[2] یک روش مبتنی بر PCR است که شامل تکثیر یک قطعهDNA حاضر در فاصله تکثیر پذیر میان دو ناحیه تکراری ریز ماهواره منحصر به فرد با جهات مخالف می باشد (Zamani et al. 2015). این تکنیک، معمولا از میکروساتلیت‌ها (ریزماهواره‌های) با طول 16-25 جفت باز، بعنوان آغازگر یک واکنش تک آغازگری که لوکوس‌های چندگانه ژنومی را برای تکثیر توالی های بین ریزماهواره‌ای با اندازه‌های مختلف، هدف می‌گیرد بهره می‌برد (Ghasemi et al. 2010). تکرارهای ریزماهواره مورد استفاده به عنوان آغازگر، می توانند دو، سه، چهار یا پنج نوکلئوتیدی باشند (Zamani et al. 2011). آغازگرهای مورد استفاده می‌توانند به هر نقطه‌ای از DNA متصل شوند اگرچه

1. Phenetic
2 Inter Simple Sequence Repeat

معمولا در انتهای 3 یا 5 خود به یک تا چهار باز متصل بوده و براساس آنها، گسترش می یابند (Askari et al. 2011). این تکنیک بیشتر مزایای AFLP و ریز ماهواره را با جامعیت RAPD ترکیب کرده است (Mohammadabadi et al. 2017). تکرارپذیری بالای ISSRs احتمالا به سبب استفاده از آغازگرهای طولانی‌تر در مقایسه با آغازگرهای کوتاه‌تر RAPD می باشد که این امر امکان استفاده از دمای بالای اتصال را فراهم می کند که منجر به افزایش احتمال اتصال آغازگر به نقاط مشخصی از DNA (تکرار پذیری بیشتر) می شود (Bahador et al. 2016). ISSRs عمدتا بعنوان مارکرهای غالب، تابع توارث پذیری ساده مندلی شناخته می‌شوند (Askari et al. 2010). تکرارپذیری بالای ISSR احتمالا به سبب استفاده از آغازگرهای طولانی‌تر در مقایسه با آغازگرهای کوتاه‌تر RAPD می‌باشد که این امر منجر به افزایش تکرار پذیری می‌شود (Pradeep et al. 2002).

در بررسی تنوع ژنتیکی 49 اکوتیپ از نه زیر جمعیت زیره‌سبز با استفاده از 23 نشانگر RAPD معلوم شد که جمعیت‌های خراسان‌جنوبی، اصفهان و کرمان دارای اجداد یکسانی می‌باشند (Bahraminejad et al. 2012). بررسی همین توده‌ها با استفاده از شش نشانگر AFLP[3] نشان داد که اکوتیپ‌های کرمان، اصفهان و خراسان‌رضوی اجداد یکسانی دارند. بر اساس شباهت و تفاوت بین اکوتیپ ها بیان شد که تلاقی بین جمعیت‌های سمنان و فارس می‌تواند هیبریدهای بسیار قوی را بوجود آورد (Bahraminejad & Mohammadinejad 2015). تحقیق بر روی 32 ژنوتیپ زیره‌سبز (29 نمونه از مناطق مختلف استان کرمان و سه نمونه از سبزوار، طبس و بیرجند) با استفاده از 15 آغازگر RAPD نشان داد که ژنوتیپ‌ها در 6 گروه با 46 درصد شباهت تقسیم‌بندی شدند (Baghizadeh et al. 2013). در مطالعه 40 توده زیره‌سبز بومی ایران بعلاوه دو توده از کشورهای سوریه و افغانستان با 10 آغازگر ISSR در مجموع 88 باند تولید شده که حدود 51 باند چند شکل بودند (75/9 درصد). بر اساس تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد ژنوتیپ‌ها به سه گروه متمایز تقسیم شدند (Rostami Ahmadvandi et al. 2013).

نشانگرهای ISSR، RAPD و SCOT به طور موفقیت‌آمیزی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی و پراکندگی‌های 12 اکوتیپ زیره‌سبز را به خوبی نشان داد (Madhuri 2012). در بررسی تنوع ژنتیکی زیره‌سیاه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور اتیوپی با استفاده از نشانگر ISSR پنج منطقه جغرافیایی از اتیوپی دارای بیشترین سطوح تنوع ژنی بودند و بایستی مناطقی که از تنوع ژنی کمتری برخوردارند در اولویت حفاظت قرار گیرند (Kapital et al. 2015). هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی اکوتیپ‌های زیره‌سبز جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR بود. در نهایت هدف این است تا به این سوال ها پاسخ داده شود که آیا بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده زیره‌سبز تنوع ژنتیکی وجود دارد؛ بین تنوع اکوتیپ‌های مختلف و تنوع جغرافیایی ارتباط وجود دارد؟ و اینکه آیا نشانگرهای RAPD و ISSR قادر به تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌باشند یا خیر؟

2. Amplified Fragment Length Polymorphism

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از 20 اکوتیپ مختلف زیره‌سبز استفاده شد که همه نمونه‌ها پراکندگی کاملی از تمام مناطق خراسان (شمالی، رضوی و جنوبی) داشتند (جدول 1). در اردیبهشت ماه سال 1393 در هر منطقه به طور تصادفی از سه مزرعه یک هکتاری، سه نمونه جمع‌آوری گردید و در نهایت نمونه بذرهای هر منطقه با یکدیگر مخلوط شدند. نمونه بذرهای جمع‌آوری شده، جهت تهیه‌ی مواد برگی گیاه به منظور استخراج DNA، در دانشکده کشاورزی بیرجند کشت گردید. از جوان‌ترین برگ‌ها جهت استخراج DNA به روش CTAB استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش نه آغازگر RAPD و 30 آغازگر ISSR آزمایش گردید که در نهایت نه آغازگر RAPD و 15 آغازگر ISSR که چندشکلی نشان دادند، مورد استفاده قرار گرفت (جدول 2).

جدول 1. اکوتیپ های مورد مطالعه

Table 1. The studied ecotypes

شماره Number	نام Name	شماره Number	نام Name	شماره Number	نام Name	شماره Number	نام Name
1	فردوس Ferdows	6	خواف Khaf	11	اسفدن Esfeden	16	تایباد Taibad
2	بیرجند Birjand	7	گناباد Gonabad	12	سبزوار Sabzevar	17	بردسکن Bardaskan
3	زیرکوه Zirkooh	8	طبس Tabas	13	اسفراین Esfarayen	18	رشتخوار Roshtkhar
4	کاشمر Kashmar	9	سرایان Sarayan	14	سربیشه Sarbisheh	19	مود Mood
5	خوسف Khousf	10	قوچان Ghoochan	15	مشهد Mashhad	20	تربت‌جام Torbate-Jam

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی 15 میکرو لیتر شامل 7/5 میکرولیتر PCR مسترمیکس آماده X2 از شرکت سناکلون، یک میکرولیتر آغازگر RAPD یا آغازگر ISSR (جدول 2) با غلظت 10 پیکومول و یک میکرولیتر DNA با غلظت 50 نانوگرم در میکرولیتر و 5/5 میکرولیترآب دوبار تقطیر انجام شد (جدول 3).

جدول 2. مشخصات آغازگرهای رپید و آی‌اس‌اس‌آر

Table 2. Specifications of RAPD and ISSR primers

آغازگر	توالی	دمای اتصال	آغازگر	توالی	دمای اتصال
RAP1	'TGCGGCTGAG -3 -'5	33	ISSR4	5'- (AG)8RC-3'	53.9
RAP2	'GGCACTGAGG--3 -'5	33	ISSR5	5'- (AG)8YT-3'	51.6
RAP3	'GTGCCTAACC -3 -'5	33	ISSR6	5'-(TC)9C-3'	52.1
RAP4	'GATGACCGCG -3 -'5	33	ISSR7	5'-(CT)8T-3'	43.5
RAP5	'TGCGGCTGAG -3 -'5	33	ISSR8	5'-(TTG)6C-3'	58.1
RAP6	'GGCACTGAGG--3 -'5	33	ISSR9	5'-hbdb(GACC)4-3'	64.8
RAP7	'GTGCCTAACC -3 -'5	33	ISSR10	5'-(TC)8RT-3'	43.1
RAP8	'GATGACCGCG -3 -'5	33	ISSR11	5'-(GACA)4-3'	45
RAP9	'CAATCGCCGT -3 -'5	33	ISSR12	5'-(CT)8RC-3'	42.3
ISSR1	'AG)8T-3) -'5	50	ISSR13	5'-(GA)8YG-3'	43.1
ISSR2	'GA)8T-3) -'5	50	ISSR14	5'-(GA)8YC-3'	43.1
ISSR3	'CT)8RG-3) -'5	53.9	ISSR15	5'-(AC)7T-3'	49.2

جدول 3. برنامه دمایی واکنش پی‌سی‌آر برای نشانگر آی‌اس‌اس‌آر و رپید

Table 3. The PCR reaction temperature program for the ISSR and RAPD markers

	ISSR			RAPD		
مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت سازی اولیه Initial denaturation	94	4min	1	94	2min	
واسرشت سازی Denaturation	94	30s		92	1min	
اتصال Annealing	Tm- 5	30s	44	35	1min	35
بسط Extension	72	30s		72	2min	
بسط نهایی Final extension	72	7min	1	72	5min	

Tm: دمای ذوب آغازگر است. دمای اتصال مناسب برای آغازگرها پنج درجه از آن کمتر در نظر گرفته شد.

هشت میکرولیتر از محصول PCR به کمک دو میکرولیتر رنگ بارگذاری، رنگ آمیزی شد و مقدار 10 میکرولیتـر درون چاهک‌های ژل یک درصد آگارز در بافر X5/0 TBE تزریق شد. برای بررسی بهتر باندها میزان پـنج میکرولیتـر DNA Size Marker نیز درون چاهک ژل تزریق شد. قطعات تکثیر یافته توسط ژل‌داک زیر نور فرابنفش مشاهده و عکس‌برداری شد.

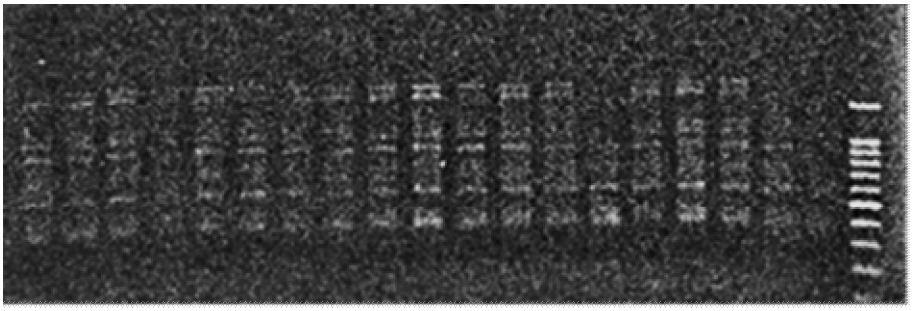
عکس‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزارهایTL120 Total lab و ImageJ1.44 امتیاز بندی شد؛ به حضور بانـد عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر اختصاص یافت. پس از امتیاز دهی با توجه به اطلاعات جغرافیایی، اکوتیپ‌هـای جمـع‌آوری شده ازمناطق مختلف به دو گروه (خراسان رضوی و شمالی دریک گروه و خراسان جنوبی در گروه دیگر) تقسیم‌بندی شد و تجزیه های آماری انجام گرفت. شاخص‌های ملکولی زیر محاسبه گردید: درصد چندشکلی: جهت محاسبه این شـاخص تعـداد نوارهـای چندشکل بر کل نوارها تقسیم گردید. شاخص محتوای چند شکلی (PIC): محتوای چندشکلی هر آغازگر بـا اسـتفاده از رابطـه 1 محاسبه شد. رابطه 1: $PIC = 1 - \sum pi2$ که Pi فراوانی نشانگر i ام می‌باشد. شاخص PIC=1-Σp_{i2} نسبت چند شکلی (EMR) این شاخص از درصد چندشکلی ضرب‌در تعداد نوارهای چندشکل به دست آمد. شاخص نشانگر (MI): شاخص نسبت چندشکلی ضرب در شاخص محتوای چند شـکلی (Anderson et al. 1993; Powell et al. 1996). تعـداد آلل‌ها (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) (Kimura & crow 1973)، شاخص تنوع ژنی نـی (H) (Nei & Li 1979; Nei 1987)، شـاخص اطلاعـاتی شـانون (Lewontin 1972) (I)، هتروزیگوسـیتی درون جمعیـت‌هـا (Hs)، هتروزیگوسـیتی بـین جمعیت‌ها (Dst)، تخمین جریان ژنی (Nm)، هتروزیگوسیتی کل (Ht) با استفاده از رابطه 2 و شاخص Fst (Wright 1951) با استفاده از رابطه 3 محاسبه شد.

رابطه (2): $Ht = Hs + Dst$ رابطه (3): $Fst = 1 - Hs/Ht$

بر حسب خصوصیات آماری و ژنتیکی ضرایب (ضریب تشابه نی و لی (Nei & Li 1979) یـا Dice، ضـریب تشـابه جاکارد (Jaccard)، ضریب تشابه تطابق ساده، ضریب تشابهUN1)، هر کدام برای شرایط خاصی مناسب‌تر می‌باشند (Lynch & Milligan 1994). در این تحقیق شباهت ژنتیکی افراد بر اساس ضرایب شباهت جاکارد محاسبه شد. در این تحقیق از الگوریتم UPGMA برای تجزیه خوشه‌ای استفاده شد و ضریب همبستگی کوفنتیک و نیز به منظور گروه‌بندی ژنوتیـپ‌هـا از تجزیـه بـه مختصات اصلی استفاده شد که با استفاده از نرم افزار NTSYSpc نسخه 2/2 انجام شد. پلات دو بعدی با نـرم‌افـزار XLstat 2015، تجزیه واریانس ملکولی با استفاده از نرم‌افزار GENALEX 6.0 و برای سایر تجزیه‌هـا از نـرم‌افـزار POPGEN1.3 استفاده شد.

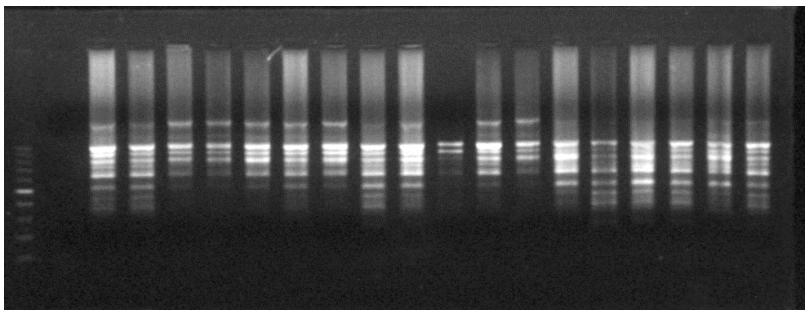
نتایج و بحث

بررسی تنوع: DNA های استخراج شده از کیفیت و کمیت بالایی برخوردار بودند. نسبت طول موج 280 تا 260 در تمامی نمونه‌ها در محدوده 1/7 تا 2/1 بود که نشان دهنده کیفیت بالای نمونه‌ها و همچنین کمیت DNA استخراجی در محدوده 150 تا 800 نانوگرم در میکرولیتر بود. بعد از رقیق سازی غلظت به کمتر از 50 نانوگرم رسانده شد. به عنوان نمونه نتایج حاصل از PCR اکوتیپ های زیره‌سبز با استفاده از آغازگر RAP8 و ISSR15 در شکل1 و 2 نشان داده شده است.



شکل 1. الگوی نواری حاصل از تکثیر 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از آغازگر RAPD8

Figure 1. Banding patterns of 20 ecotypes amplified using primers RAPD8



شکل 2. الگوی نواری حاصل از تکثیر 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از آغازگر ISSR15

Figure 2. Banding patterns of 20 ecotypes amplified using primers ISSR15

نتایج حاصل از 9 آغازگر RAPD نشان داد (جدول 4) که تعداد کل نوارها 50 بود که 31 نوار چند شکلی نشان دادند. درصد چند شکلی کل 62 درصد محاسبه گردید. درصد چندشکلی مشاهده شده بین 33 تا 83 درصد مشاهده شد. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای دو و چهار و کمترین آن متعلق به آغازگر هشت بود. شاخص محتوای چند شکلی بین 0/13 تا 0/37 محاسبه شد. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگر چهار و کمترین شاخص محتوای چند شکلی مربوط به آغازگر هشت بود. شاخص نسبت چند شکلی بین کمترین مقدار (0/2) مربوط به آغازگر پنج و بیشترین مقدار (4/17) مربوط به

آغازگر دو و چهار متغیر بود. کمترین شاخص نشانگر متعلق به آغازگر پنج (0/07) و بیشترین شاخص نشانگر متعلق به آغازگر چهار (1/56) بود. کمترین شاخص قدرت تفکیک را آغازگر پنج (4/7) و بیشترین مقدار را آغازگر هشت (16/3) به خود اختصاص داد. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگر چهار (0/37) بود که دلالت بر چندشکلی زیاد این آغازگر در یک جایگاه نشانگری دارد، از اینرو این نشانگر برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید می‌باشد. آغازگر چهار همچنین دارای بیشترین مقدار شاخص نسبت چند شکلی و شاخص نشانگر را داشت، بنابراین آغازگر چهار پتانسیل بالایی جهت تولید نوار بیشتر را دارا بود (Anderson et al. 1993; Powell et al. 1996). محققان مختلف در بررسی خود بر روی زیره سبز از نواحی مختلف و متفاوت با ما با استفاده از نشانگر RAPD در صد چند شکلی را بلاتر از 50 درصد اعلام کرده اند. به عنوان مثال در بررسی تنوع ژنتیکی 42 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از 13 آغازگر RAPD، درصد چندشکلی کل 55/3 درصد (Rostami-Ahmadvandi et al. 2013) و یا در بررسی تنوع ژنتیکی 32 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر RAPD، درصد چندشکلی 86 درصد گزارش شده است (Baghizadeh et al. 2013). مطالعات بر روی زیره های سبز غیر بومی ایران در کشورهای دیگر نیز حکایت از وجود تنوع کافی در زیره سبز دارد. در بررسی 55 اکوتیپ زیره‌سبز با20 آغازگر RAPD، تعداد 1191 باند تولید شد که 218 باند آن چند شکل بودند و متوسط درصد چند شکلی 18/3 بدست آمد. در تحقیقی دیگر از 400 آغازگر RAPD آزمون شده بر روی 12 واریته زیره سبز تعداد 508 باند تکثیر شد که 321 باند چندشکل بودند. میانگین میزان چندشکلی 62/2 و میانگین 5/8 باند چندشکل در هر آغازگر دیده شد (Madhuri 2012; Choudhary et al. 2015). همانطور که ملاحظه می‌شود از لحاظ میزان تنوع مشاهده شده مطالعه کنونی با مشاهدات (Madhuri, 2012) مطابقت دارد.

نتایج حاصل از 15 آغازگر ISSR نشان داد (جدول 4) که از تعداد کل 99 نوار 69 تا چند شکلی نشان دادند. درصد چند شکلی کل 70 درصد و بین 50 تا 86 درصد بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر دو (86 درصد) و کمترین آن متعلق به آغازگر شش (50 درصد) بود.. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگر هشت (0/36) بود. این آغازگر بهتر از همه آغازگرهای مورد استفاده توانست فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کند. کمترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگر شش بود که توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها را نداشت. بیشترین شاخص نسبت چند شکلی مربوط به آغازگر هشت (5/44) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر سه (0/57)، کمترین شاخص نشانگر را آغازگر شش (0/17) و بیشترین شاخص نشانگر را آغازگر هشت (1/06)، کمترین شاخص قدرت تفکیک مربوط به آغازگر چهار (4/2) و بیشترین مقدار مربوط به آغازگر 15 (15/7) بود. نتایج حاصل از نشانگر ISSR نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی کافی در بین توده های بومی خراسان وجود دارد. در بررسی تنوع ژنتیکی 42 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از 22 آغازگر ISSR، درصد چندشکلی را 32/7 گزارش دادند (Rostami-Ahmadvandi et al. 2013).

جدول 4. پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای آغازگرهای رپید و آی‌اس‌اس‌آر در 20 اکوتیپ زیره‌سبز

Table 4. The calculated genetic parameters for RAPD and ISSR primers in 20 cumin ecotypes

RP	MI	EMR	PIC	PC	NPB	NFB	Marker	RP	MI	EMR	PIC	PC	NPB	NFB	Marker
4.2	0.33	1.3	0.25	67	2	3	ISSR4	7.3	0.51	1.8	0.28	60	3	5	RAP1
6.1	0.71	2.2	0.32	75	3	4	ISSR5	8.4	1.3	4.2	0.31	83	5	6	RAP2
7	0.17	1	0.18	50	2	4	ISSR6	5.4	0.23	1.3	0.17	67	2	3	RAP3
8.6	0.86	2.7	0.32	67	4	6	ISSR7	8	1.6	4.2	0.37	83	5	6	RAP4
9.5	1.96	5.4	0.36	78	7	9	ISSR8	4.7	0.07	0.2	0.34	80	4	5	RAP5
7.8	1.16	3.6	0.33	71	5	7	ISSR9	9.1	0.58	2.3	0.25	57	4	7	RAP6
6.5	1.08	3.2	0.34	80	4	5	ISSR10	5.3	0.22	1	0.22	50	2	4	RAP7
12.3	0.86	3.1	0.27	63	5	8	ISSR11	16.3	0.13	1	0.13	33	3	9	RAP8
6.3	0.69	2.7	0.26	67	4	6	ISSR12	6.5	0.52	1.8	0.29	60	3	5	RAP9
10.1	1.53	4.5	0.34	75	6	8	ISSR13	1.25	0.54	2.8	0.19	56	5	9	ISSR1
5.4	0.93	3.2	0.29	80	4	5	ISSR14	1.3	1.78	5.1	0.35	86	6	7	ISSR2
1.75	1.28	4.4	0.29	64	7	11	ISSR15	1.7	1.08	0.57	0.30	72	5	7	ISSR3

M: نشانگر، NFB: تعداد باندهای تشکیل شده NPB: تعداد باندهای چندشکل PC: درصد چندشکلی، PIC: شاخص محتـوای چند شکلی، EMR: شاخص نسبت چند شکلی، MI: شاخص نشانگر، RP: شاخص قدرت تفکیک

در مطالعه‌ای دیگر از 100 آغازگر ISSR مورد آزمایش، 27 آغازگر گروه‌های چندشکل را به وجود آوردند. در مجموع 305 باند تکثیر شد که 169 تا از آنها چندشکل بودند و در نتیجه میانگین چندشکلی 55/40 درصد و میانگین 6/2 باند چندشکل در هر آغازگر دیده شد (Madhuri, 2012). همانطور که ملاحظه می‌شود تنوع مشاهد ه شـده در بـین زیـره هـای سـبز خراسـان بـا آغازگرهای بکار رفته نسبت به سایر مطالعات بیشتر است که این موضوع با توجه به وسعت زیاد سه استان خراسان و تفاوت آب و هوایی آنها دور از انتظار نیست.

محاسبه پارامترهای ژنتیکی در اکوتیپ‌های زیره سبز: در آغازگر RAPD (جـدول 5) میـزان هتروزیگوسـیتی کل، هتروزیگوسیتی درون جمعیت، ضریب تنوع بین جمعیت، جریان ژنی، هتروزیگوسیتی بین جمعیت و Fst بـه ترتیـب 0/39، 0/35، 0/09، 20/5، 0/04 و 0/09 بدست آمد. بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر هشت (0/47) و کمترین مربوط بـه آغازگر پنج و هفت (0/30) بود. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی درون جمعیت را به ترتیب آغازگر چهار (0/43) و آغازگر پنج، هفت (0/27) داشتند.

جدول 5. پارامترهای محاسبه شده به کمک آنالیز نی برای نشانگرهای رپید و آی‌اس‌اس‌آر در 20 اکوتیپ زیره‌سبز

Table 5. The calculated parameters using Nei analysis for RAPD and ISSR markers in 20 cumin ecotypes

Fst	Dst	Nm	Gst	Hs	Ht	Marker	Fst	Dst	Nm	Gst	Hs	Ht	Marker
0.02	0.01	127.3	0.02	0.39	0.39	ISSR4	0.08	0.04	45.6	0.08	0.40	0.44	RAP1
0.03	0.01	120.6	0.03	0.48	0.49	ISSR5	0.02	0.02	36.4	0.02	0.42	0.43	RAP2
0.01	0.01	374.7	0.02	0.47	0.48	ISSR6	0.18	0.07	27.2	0.18	0.36	0.43	RAP3
0.09	0.04	12.3	0.09	0.41	0.45	ISSR7	0.04	0.02	16.1	0.04	0.43	0.45	RAP4
0.23	0.09	2.2	0.23	0.30	0.39	ISSR8	0.09	0.03	6.8	0.90	0.27	0.30	RAP5
0.14	0.05	5.1	0.14	0.28	0.33	ISSR9	0.10	0.03	10.0	0.10	0.30	0.33	RAP6
0.06	0.02	65.6	0.06	0.39	0.41	ISSR10	0.11	0.03	14.7	0.11	0.27	0.30	RAP7
0.01	0.01	245.7	0.01	0.46	0.46	ISSR11	0.22	0.10	4.35	0.22	0.37	0.47	RAP8
0.00	0.00	728.6	0.001	0.26	0.26	ISSR12	0.02	0.01	22.8	0.02	0.36	0.36	RAP9
0.01	0.01	200.5	0.02	0.39	0.41	ISSR13	0.09	0.04	20.5	0.09	0.35	0.39	Mean
0.03	0.02	125.2	0.03	0.31	0.33	ISSR14	0.08	0.03	115.8	0.08	0.41	0.44	ISSR1
0.02	0.01	44.4	0.02	0.42	0.43	ISSR15	0.09	0.04	148.9	0.09	0.43	0.47	ISSR2
0.06	0.02	158.3	0.06	0.39	0.41	Mean	0.02	0.01	57.6	0.02	0.47	0.48	ISSR3

Ht: هتروزیگوسیتی کل، Hs: هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها، Gst: ضریب تنوع بین جمعیت‌ها، Nm: جریان ژنی، Dst: هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها

بیشترین میزان جریان ژنی را آغازگر یک (45/6) و کمترین میزان جریان ژنی را آغازگر هشت (4/35)، بیشترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت مربوط به آغازگر هشت (0/10) و کمترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت مربوط به آغازگر نه (0/01)، بیشترین میزان Fst را آغازگر هشت (0/22) و کمترین میزان Fst را آغازگر نه (0/02) داشت.

میانگین تعداد آلل‌ها برای آغازگر RAPD، 9/6 بدست آمد. کمترین تعداد آلل مربوط به آغازگر سه و هفت (4) و بیشترین تعداد آلل‌ها مربوط به آغازگر دو و چهار (10) بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر 5/82 بدست آمد. کمترین تعداد آلل‌های موثر مربوط به آغازگر هفت (2/88) و بیشترین تعداد آلل‌های موثر مربوط به آغازگر چهار (9/24) بود که احتمالاً نشان دهنده وجود تنوع بیشتر در این نشانگر است.

جدول 6. پارامترهای تنوع ژنتیکی محاسبه شده به کمک نشانگرهای رپید و آی‌اس‌آر در 20 اکوتیپ زیره‌سبز

Table 6. The calculated genetic diversity parameters using RAPD and ISSR markers in 20 cumin ecotypes

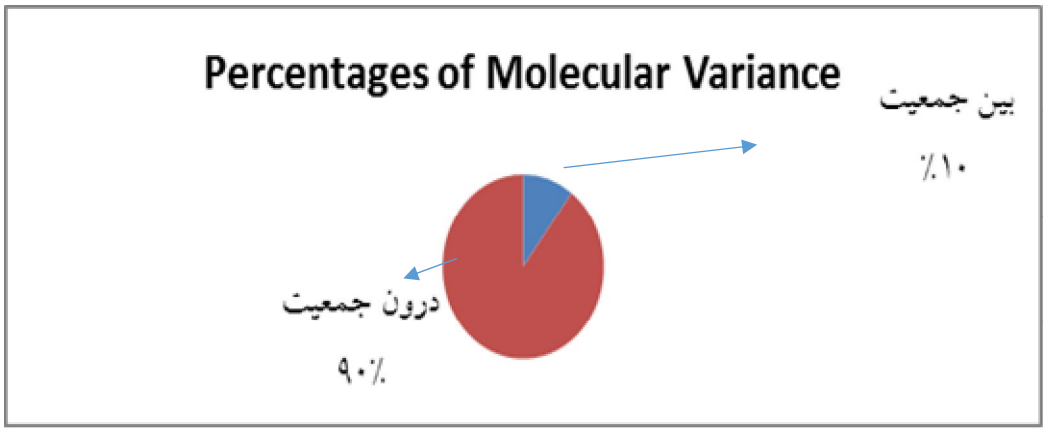
I	H	Ne	Na	Marker	I	H	Ne	Na	Marker
1.14	0.77	3.36	4	ISSR4	1.88	1.31	5.41	6	RAP1
2.05	1.47	5.88	6	ISSR5	3.08	2.14	8.89	10	RAP2
1.34	0.95	3.82	4	ISSR6	1.27	0.88	3.59	4	RAP3
2.61	1.84	7.42	8	ISSR7	3.22	2.27	9.24	10	RAP4
3.87	2.59	11.24	14	ISSR8	1.94	1.24	5.85	8	RAP5
2.64	1.73	7.73	10	ISSR9	2.09	1.37	6.17	8	RAP6
2.44	1.69	7.06	8	ISSR10	0.96	0.61	2.88	4	RAP7
3.28	2.33	9.44	10	ISSR11	1.96	1.39	5.62	6	RAP8
1.70	1.04	5.46	8	ISSR12	1.65	1.09	4.71	6	RAP9
3.54	2.42	10.26	12	ISSR13	2.10	1.37	5.82	6.9	Mean
1.98	1.32	6.35	8	ISSR14	3.2	2.25	9.18	10	ISSR1
4.28	2.96	12.26	14	ISSR15	3.96	2.80	11.3	12	ISSR2
2.76	1.90	8.02	9.2	Mean	3.35	2.39	9.59	10	ISSR3

میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب 1/37 و 2/01 بود. بالابودن میزان شاخص نی، شاخص شانون، PIC، MI و EMR در آغازگر چهار نشان دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌ها می‌باشد. محققان در بررسی تنوع و تفرق ژنتیکی برخی از جمعیت‌های زیره‌پارسی به کمک نشانگر RAPD میانگین تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون را به ترتیب 0/18 و 0/273 گزارش کردند (Hashemi et al. 2008) که کمتر از مطالعه کنونی می باشد. بیشترین و کمترین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب مربوط به آغازگر چهار (2/27 و 3/22 و آغازگر هفت (0/61 و 0/96) بود.

در آغازگر ISSR (جدول 5) میانگین هتروزیگوسیتی کل، هتروزیگوسیتی درون جمعیت، ضریب تنوع بین جمعیت، جریان ژنی، هتروزیگوسیتی بین جمعیت و Fst به ترتیب 0/41، 0/39، 0/6، 158/30، 0/023 و 0/057 بدست آمد. بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر پنج (0/49) و کمترین مربوط به آغازگر 12 (0/26) بود. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی درون جمعیت به ترتیب مربوط به آغازگر پنج (0/48) و آغازگر 12 (0/26) بود. بیشترین ضریب تنوع بین جمعیت، هتروزیگوسیتی بین جمعیت و Fst را آغازگر هشت (0/23، 0/091 و 0/23) و کمترین را آغازگر 12 (0/001، 0/0003 و 0/001) به

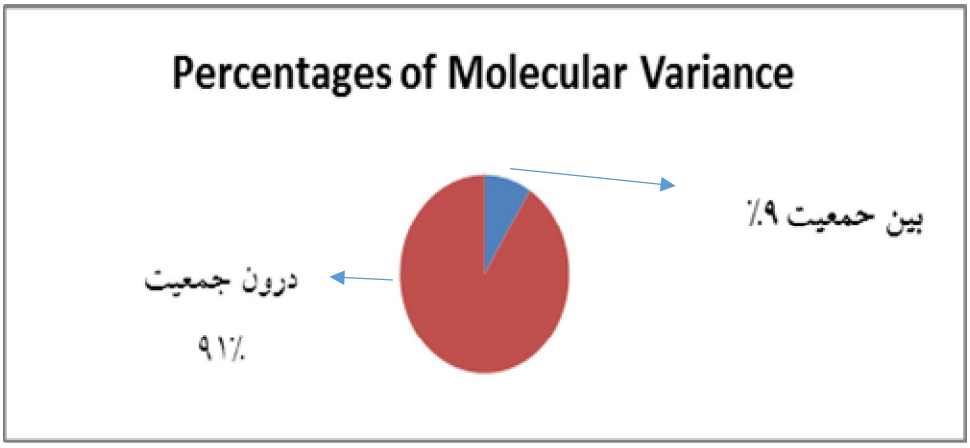
خود اختصاص داد. بیشترین و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر 12 (728/6) و هشت (2/2) بود. میانگین تعداد آلل‌ها 9/2 بدست آمد. کمترین تعداد آلل مربوط به آغازگر چهار و شش (4) بود و بیشترین مربوط به آغازگرهای هشت و 15 (14) بـود. میانگین تعداد آلل‌های موثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون به ترتیب 8/02، 1/90 و 2/76 برای آغازگر ISSR بدست آمد. بالابودن میزان شاخص نی و شاخص شانون در نشانگر 15 نشان دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

تجزیه واریانس ملکولی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در نشانگر RAPD نشان داد (شـکل 3) کـه 10 درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و 90 درصد مربوط به درون گروه‌ها و در نشانگر ISSR9 (شـکل 4) درصـد از تغییـرات مربوط به بین جمعیت‌ها و 91 درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بود. تفاوت معنی‌دار بین جمعیـت‌هـا نشـان از وجـود تنـوع بـین جمعیت‌ها بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین گروه‌ها از تنوع درون گروه‌ها کمتر است که علـت این امر می تواند وسعت زیاد هر یک از استان‌های مورد مطالعه شامل خراسان جنوبی، رضوی و شمالی باشد. دلیل دیگری که می تواند موجب این امر باشد انتقال بذرها از یک شهر به شهر هم‌جوار آن باشد که بعدا بر اساس تقسیمات استانی در یک استان دیگر واقع شده است. در نتیجه باعث کاهش تغییرات بین گروهی گردیده است. در تحقیقی مشابه تنوع ژنتیکـی 13 اکوتیـپ رازیانـه و شش اکوتیپ زیره‌سبز بومی هند با استفاده از DNAای ریبوزومی هسته‌ای و نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس AMOVA مشاهده شد که تغییرات درون جمعیت بیشتر از بین جمعیت می باشد (Singh et al. 2012) که از ایـن لحـاظ بـا مطالعه کنونی همخوانی دارد.



شکل 3. تجزیه واریانس ملکولی 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر رپید

Figure 3. Analysis of variance of 20 cumin ecotypes using the RAPD marker



شکل 4. تجزیه واریانس ملکولی 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر آی‌اس‌اس‌آر

Figure 4. Analysis of variance of 20 cumin ecotypes using the ISSR marker

ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفنتیک و تجزیه خوشه ای: بر اساس آغازگر RAPD اکوتیپ سبزوار با اسفراین (0/86 درصد) و اکوتیپ طبس با زیرکوه (0/82 درصد) دارای بیشترین ضریب تشابه بودند. همچنین شباهت اکوتیپ‌های تایباد با کاشمر، اسفراین با سرایان و اسفراین با سبزوار (0/79 درصد) و بردسکن با مشهد (0/78 درصد) و زیرکوه با بیرجند، کاشمر با فردوس و اسفدن با سرایان (0/77 درصد) نسبتا بالا بدست آمد. کمترین درصد تشابه بین اکوتیپ مود با گناباد (0/05 درصد)، اکوتیپ‌های کاشمر با بیرجند و تایباد با فردوس (0/07) بدست آمد. بر اساس آغازگر ISSR زیرکوه با بیرجند (0/80) بیشترین درصد تشابه را نشان دادند. درصد شباهت اکوتیپ اسفدن با خوسف (0/72) و اکوتیپ‌های اسفراین و گناباد (0/70) نیز نسبتا بالا برآورد گردید. اکوتیپ تربت‌جام با رشتخوار (0/16) و اکوتیپ فردوس با تایباد (0/18) کمترین ضریب تشابه را دارا بودند. همچنین شباهت اکوتیپ تربت‌جام با بردسکن (0/20)، رشتخوار با فردوس (0/21) و اکوتیپ‌های تربت‌جام با سربیشه (0/22) درصد بدست آمد که نسبتا پاین بود. (جداول نیامده است). با استفاده از چهار ماتریس تشابه دایس (DICE)، جاکارد (J)، تطابق ساده (SM) و UV1 آنالیز خوشه‌ای براساس سه الگوریتم UPGMA، اتصال ساده و اتصال کامل انجام شد. برای تک تک دندروگرام‌های حاصل، ضریب کوفنتیک (r) محاسبه شد. همه ضرایب کوفنتیک در سطح یک درصد معنی‌دار بودند که نشان دهنده میزان شباهت بالای نتایج ماتریس تشابه و دندوگرام است (جدول 7).

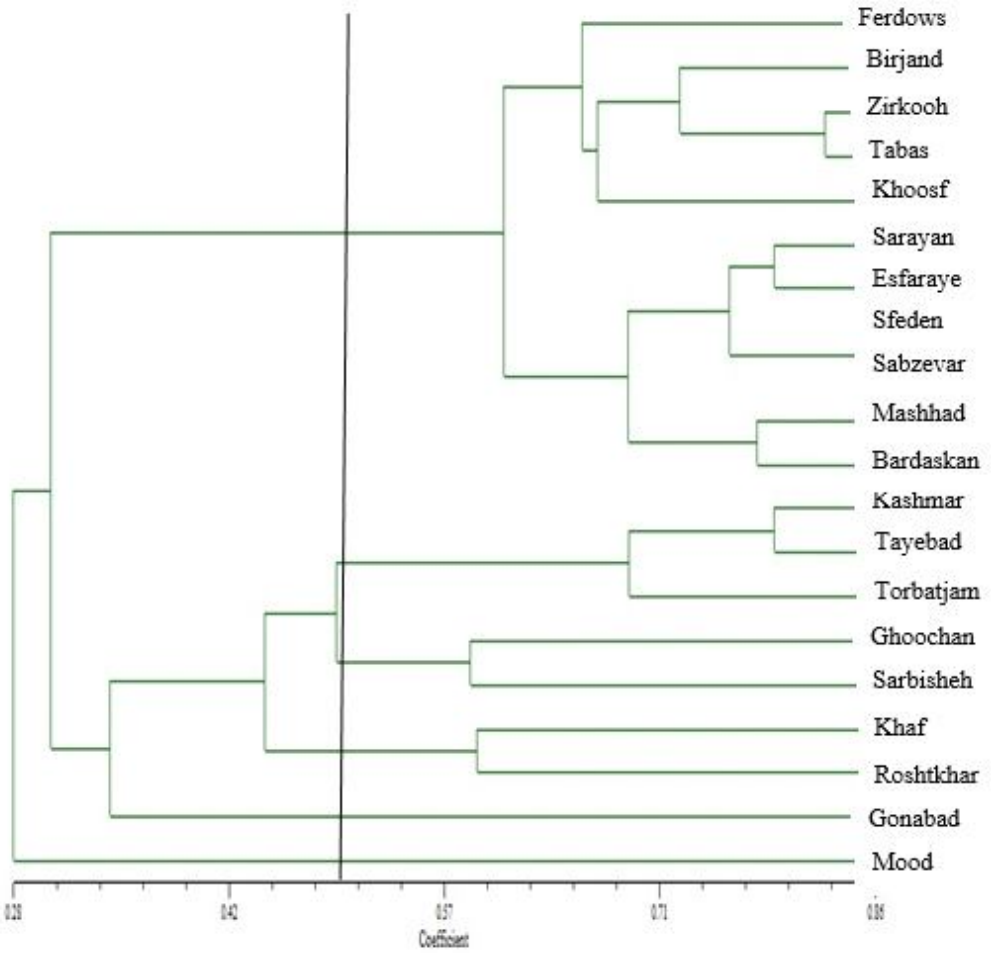
جدول 7. ضرایب همبستگی کوفنتیک بر اساس SM، J، DICE و UV1 درنشانگرهای رپید و آی‌اس‌اس‌آر

Table 7. Cophenetic correlation coefficients based on SM, J, DICE and UV1 in RAPD and ISSR markers

ISSR			RAPD			ضریب کوفنتیک
UPGMA	Single	Complete	UPGMA	Single	Complete	Cophenetic coefficient
0.69**	0.68**	0.69**	0.86**	0.79**	0.83**	SM
0.85**	0.78**	0.78**	0.87**	0.79**	0.84**	J
0.83**	0.77**	0.77**	0.83**	0.72**	0.80**	DICE
0.73**	0.65**	0.63**	0.82**	0.72**	0.80**	UV1

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

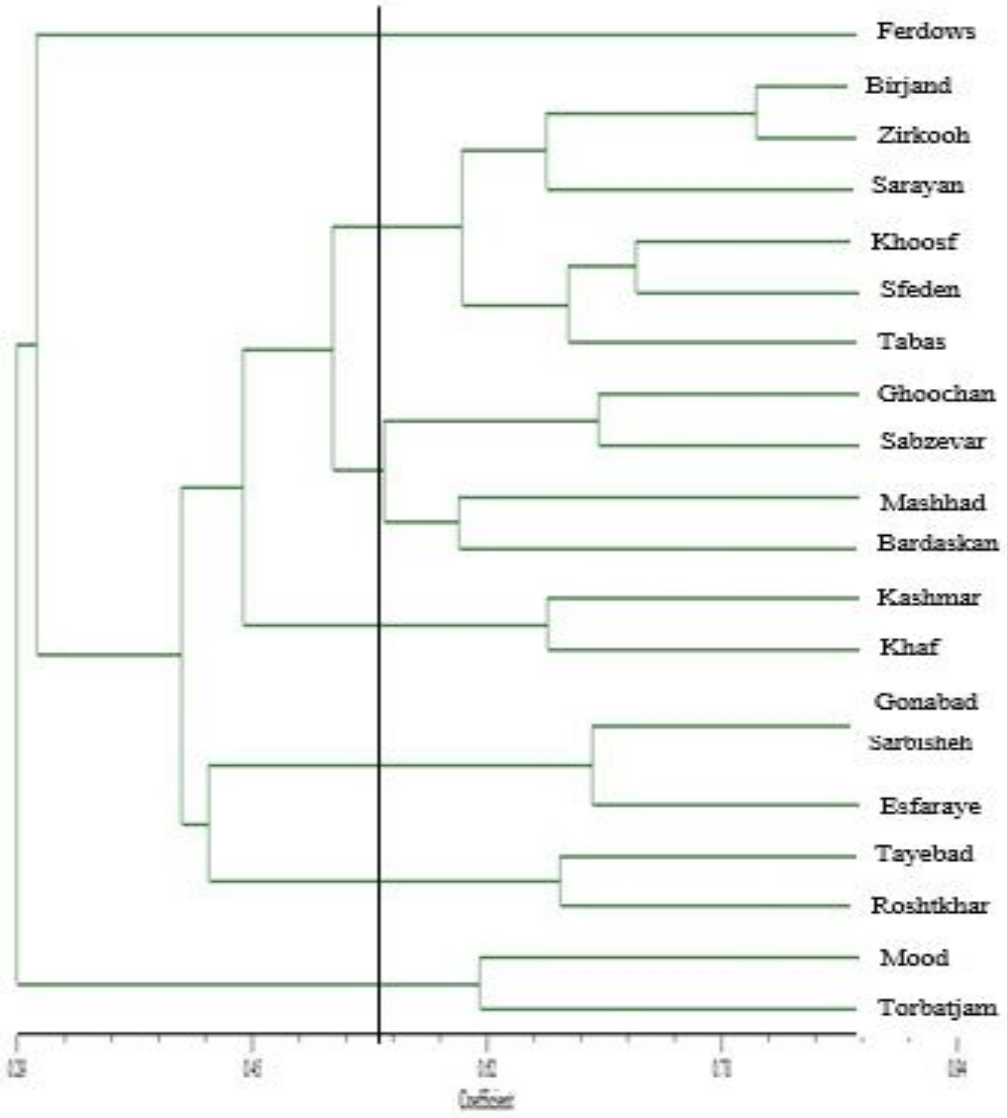
با توجه به ضرایب بدست آمده، ضریب تشابه جاکارد به عنوان بهترین ضریب و الگوریتم UPGMA به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی (به ترتیب 0/87 و 0/85 در نشانگر RAPD و ISSR) به عنوان بهترین الگوی خوشه بندی انتخاب شدند. در تحقیق دیگر که برای بررسی تنوع ژنتیکی42 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از 22 آغازگر ISSR انجام شد ضریب کوفنتیک بر اساس ضریب جاکارد برابر با 0/81 بدست آمد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD (شکل 5) اکوتیپ‌ها را در شش گروه تقسیم‌بندی نمود. گروه اول شامل دو زیر گروه بود. در زیر گروه یک اکوتیپ‌های فردوس، بیرجند، زیرکوه، طبس و خوسف و در زیر گروه دو اکوتیپ‌های سرایان، اسفراین، اسفدن، سبزوار، مشهد و بردسکن قرار گرفت. گروه دوم شامل اکوتیپ‌های کاشمر، تایباد و تربت‌جام تشکیل بود. در گروه سوم اکوتیپ‌های قوچان و سربیشه، در گروه چهارم اکوتیپ‌های خواف و رشتخوار، در گروه پنجم تنها اکوتیپ گناباد و در گروه ششم نیز تنها اکوتیپ مود جای گرفت. با ملاحظه زیرگروها و گروها ملاحظه می‌شود که در بعضی از خوشه ها تطابقی بین فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و فاصله جغرافیایی نبود. به عنوان مثال فاصله جغرافیایی بین اسفراین در خراسان شمالی با سرایان در خراسان جنوبی نسبتا زیاد می‌باشد (بیش از 400 کیلومتر) ولی در یک گروه واقع شده‌اند که این عدم تبعیت فاصله ژنتیکی از جغرافیایی را نشان می‌دهد. با بررسی سایر گروه ها ملاحظه می‌شود که تقریبا فاصله ژنتیکی از فاصله جغرافیایی تبعیت می‌کند.



شکل 5. گروه‌بندی اکوتیپ‌های زیره‌سبز مورد مطالعه بر اساس نشانگر رپید

Figure 5. Grouping of cumin ecotypes based on RAPD marker

گروه‌بندی انجام شده بر اساس نشانگرهای ISSR (شکل 6) اکوتیپ‌ها را در هفت گروه تقسیم‌بندی کرد. گروه اول شامل اکوتیپ فردوس بود. گروه دوم شامل دو زیرگروه بود. در زیرگروه اول اکوتیپ‌های بیرجند، زیرکوه و سرایان و در زیرگروه دوم خوسف، اسفدن و طبس قرار گرفت. گروه سوم شامل قوچان، سبزوار، مشهد و بردسکن؛ گروه چهارم شامل اکوتیپ‌های خواف و کاشمر؛ گروه پنجم اکوتیپ‌های گناباد، سربیشه و اسفراین؛ گروه ششم اکوتیپ تایباد و رشتخوار و گروه هفتم شامل اکوتیپ‌های مود و تربت‌جام بود. با بررسی گروه ها و زیرگروه ها ملاحظه می‌شود که در کل فاصله جغرافیایی از فاصله ژنتیکی تبعیت می‌کند، لیکن در برخی موارد مانند گروه هفت اکوتیپ مود در جنوبی ترین نقطه خراسان جنوبی با اکوتیپ تربت جام در خراسان رضوی (فاصله جغرافیایی بیش از 400 کیلومتر) و اکوتیپ سربیشه با اسفراین (فاصله جغرافیایی بیش از 600 کیلومتر) در یک گروه قرار گرفتند که به نظر می‌رسد برای اصل تبعیت استثناء می باشند.



شکل 6.گروه‌بندی اکوتیپ‌های زیره‌سبز مورد مطالعه بر اساس نشانگر آی‌اس‌اس‌آر

Figure 6. Grouping of cumin ecotypes based on ISSR marker

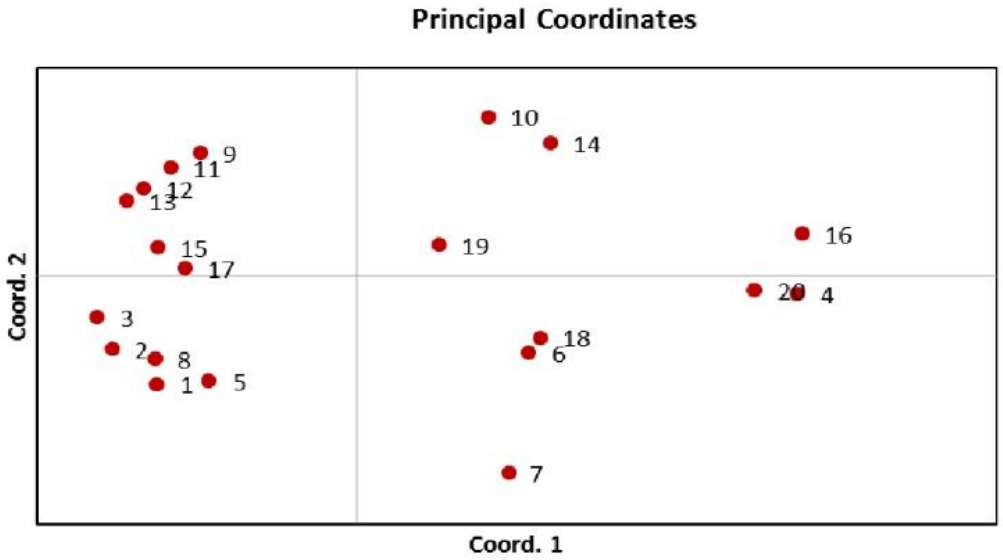
در کل بر اساس دو نشانگر با چشم‌پوشی از موارد استثناء ملاحظه می‌شود که تنوع جغرافیایی از تنوع زنتیکی تبعیت می‌کند. دلیل این امر می تواند این باشد که در اکثر این مناطق زیره سبز از گذشته کشت و کار می‌شده است و احتمال اینکه از یک ناحیه به ناحیه دیگر منتقل شده باشد خیلی کم است. در پژوهشی Baghizadeh et al. (2013) 32 اکوتیپ زیره‌سبز را در شش گروه تقسیم‌بندی کردند. در این بررسی تنوع مولکولی بیشتر اکوتیپ‌ها منطبق بر تنوع جغرافیایی آن‌ها بود. لیکن در موارد

خاص این انطباق پیدا نشد. آنچه از مقایسه مطالعه کنونی با مطالعات سایر محققین بر می آید این است که در زیره سبز تنوع جغرافیایی از تنوع ژنتیکی به طور کل تبعیت می‌کند ولی در موارد استثناء این تبعیت وجود ندارد.

تجزیه به مختصات اصلی: در نشانگر RAPD دو مؤلفه اول 40/6 درصد از واریانس کل و در نشانگر ISSR چهار مولفه اول 49/6 درصد از واریانس کل را توجیه کردند (جداول نیامده است). با توجه به اینکه میزان سهم هر مولفه در توجیه واریانس کل کم می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هر یک از نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق بخش‌های متفاوت از ژنوم نمونه‌ها را مورد ارزیابی قرار داده‌اند و نشانگرها به خوبی در سطح ژنوم پراکنده بودند. در بررسی تنوع ژنتیکی 49 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر RAPD، Bahraminejad et al. (2012) گزارش کردند 79 درصد از تغییرات توسط دو مؤلفه اول توجیه شد. نتایج نشان داد که نشانگرها به خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده اند. در بررسی تنوع ژنتیکی 32 اکوتیپ زیره‌سبز به Baghizadeh et al. (2013) این نتیجه رسیدند که نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مؤلفه به اندازه کافی تطابق ندارد. در مطالعه آنها نیز سه مؤلفه اول مقادیر کمی (37/08 درصد) از واریانس را توجیه کردند که به نظر می‌رسد انتخاب آغازگر مناسب بوده است. نتایج حاصل از این مطالعه و سایر تحقیقات نشان می دهد که بررسی تنوع ژنتیکی با آغازگرهای مناسب صورت گرفته است و لذا قضاوت های بیان شده در مورد تنوع ژنتیکی دارای اعتبار می باشد. نمودار پراکنش اکوتیپ‌ها بصورت دوبعدی بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها را به خوبی به صورت بصری نمایان ساخت (شکل های 7 و 8). نتایج نشان داد که اکثر اکوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای دریک گروه قرار بودند در نمودار پراکنش نیز در کنار هم قرار گرفتند.

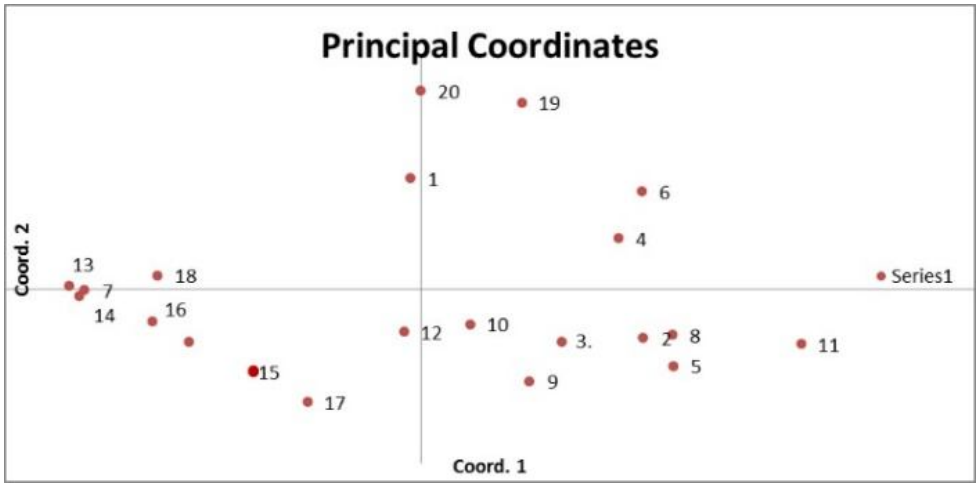
نتیجه‌گیری

در پایان با توجه به اطلاعات حاصل شده از جمله، درصد چند شکلی، دامنه زیاد بین ضرایب تشابه (جاکارد) حاصل شده و گروه‌بندی اکوتیپ‌ها در خوشه های مجزا و سایر اطلاعات حاصل شده نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه دارد. بین تنوع موجود در اکوتیپ‌های جمع آوری شده و موقعیت جغرافیایی، در بیشتر موارد ارتباط وجود داشت. به طور کلی، بررسی تنوع در توده‌های زیره‌سبز نشان داد که این نشانگرها در شناسایی نواحی چند شکلی و مدیریت ژرم‌پلاسم می‌توانند مفید باشند. بنابراین به نظر می‌رسد نشانگر RAPD را می‌توان به عنوان ابزاری مفید در بررسی فاصله ژنتیکی و تفاوت بین نمونه‌های مختلف زیره سبز مورد استفاده قرار داد.



شکل 7. پراکنش 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر رپید به صورت بای پلات

Figure 7. Biplot of 20 cumin ecotypes using the RAPD marker



شکل 8. پراکنش 20 اکوتیپ زیره‌سبز با استفاده از نشانگر آی‌اس‌اس‌آر به صورت بای پلات

Figure 8. Biplot of 20 cumin ecotypes using the ISSR marker

منابع

باقری عبدالرضا، محمودی علی‌اکبر (1381) زیره سبز، فناوری تولید و فرآوری. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

بهادر یاسر ، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین و همکاران (1395) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشان‌گرهای ISSR. 7(13)، 56-49.

عسکری ناهید ، باقی زاده امین ، محمدآبادی محمدرضا (1389) بررسی تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی رائینی با استفاده از لوکوس های بین ریزماهواره (ISSR)، 5(2)، 49-56.

فارسی محمد، باقری عبدالرضا (1388) اصول اصلاح نباتات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

نقوی محمدرضا، قره یاضی بهزاد، حسینی سالکده قاسم (1392) نشانگرهای مولکولی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. تهران.

References

Anderson JA, Churchill GA, Sutrique JE et al. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome Biol 36, 181-186.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5, 49-56 (In Persian).

Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222-229.

Bagheri AA, Mahmoodi AA (2002) Cumin production and processing technology. Department of agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Press 143-150 (In Persian).

Baghizadeh A, Salar Karimi M, Pourseyedi SH (2013) Genetic diversity assessment of Iranian green cumin genotypes by RAPD molecular markers. Intl J Agron Plant Prod 4, 472-479.

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7, 186-192 (In Persian).

Bahraminejad AR, Mohammadi-Nejad GH, Abdul Kadir M, Bin- Yusop MR (2012) Molecular diversity of Cumin (*Cuminum cyminum* L) using RAPD markers. Aust J Crop Sci 6, 194-199.

Choudhary SH, Meena RS, Singh R, Panwar A (2015) Analysis of diversity among cumin (*Cuminum cyminum*) cultivars using RAPD markers. Indian J Agr Sci 85, 117-121.

Farsi M, Bagheri AR (2009) Principles of Plant Breeding. Mashhad University Jihad Publications. 368 pp (In Persian).

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4, 5758-5760.

Giovannoni JJ, Wing RA, Ganal MW, Tanksley SD (1991) Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. Nucleic Acids Res 19, 6553-6558.

Hashemi H, Safarnejad A, Bagheri AR (2008) Study of genetic diversity of *Bunium Persicum* Boiss using RAPD markers. Iranian J Rangelands and Forest Plant Breed 16 (2): 246-238.

Kafi M, Rashed-Mohassel MH, Koocheki A, Mollafilabi A (2002) Cumin Production Technology and Processing. Ferdowsi University Press, Mashhad, Iran.

Kapital B, Feyissa T, Yohannes P, Said M (2015) Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L) from Ethiopia as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 14, 1543-1551.

Kimura M, Crow JF (1963) The measurement of effective population number. Evolution 17, 279-288.

Koocheki AR, Nasiri-Mahallati M, Najafi F (2004) Biological diversity of medicinal and aromatic plants in Iranian ecosystems. Iran Agric Res 2, 208-215.

Kumar P, Gupta VK, Misra AK et al. (2009) Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics 2, 141-162.

Lewontin RC (1972*)* The apportionment of human diversity. Evolution Biology 6: 381–398.

Lynch M, Milligan B (1994) Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. Mol Ecol 3, 91-99.

Madhuri P (2012) Appraisal of Genetic Diversity in *Cuminum cyminum* L using Molecular Markers. Intl J of Life Sci 3, 143-156.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Dev 5, 154.

Naghavi MR, Gharehyazi B, Hosseini-Salekdeh GH (2013) Molecular markers. University of Tehran Publications, Tehran. 340 pp (In Persian).

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.512 pp.

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA 76, 5269-5273.

Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breed 2, 225-238.

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. Aust J Crop Sci 7, 367-361.

Singh SK, Kakani RK, Meena RS et al. (2012) Genetic diversity among Indian varieties of foeniculum vulgare and *Cuminum cyminum* L based on nuclear ribosomal DNA and RAPD analyses. Intl J of Agri and Stat Sci 8(2)493-502.

Sudupak MA, Akkoya MS, Kence A (2002) Analysis of relationships among perennial and annual cicer species growing in Turkey using RAPD markers. Theor Appl Genet 105, 1220-1228.

Uzun A, Yesiloglu T (2012) Genetic diversity in citrus, genetic diversity in plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, In Tech, Available from: http://www.intechopen.com/books/ genetic diversity- in-plants/genetic-diversity-in-citrus PP: 213-231.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. Ann of Eur Genet 15, 323-354.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of inter simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumint Res 132, 123-127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812-1817.