Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of molecular diversity and population structure analysis in some local black caraway (*Nigella sativa* L.) ecotypes using ISSR marker

Hamid Reza Fanaei
*Corresponding author. Professor, Department of Genetics and National Plant Gene Bank of Iran, SPII., AREEO, Karaj, Iran. E-mail: fanay52@yahoo.com

Mahdi Hadadinejad
Assistant professor, Horticulture Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E–mail: m.hadadinejad@sanru.ac.ir

Nadali Bagheri
Associate professor, Horticulture Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E–mail: NadaliBagheri@sanru.ac.ir

Manni Marefatzadeh-Khameneh
*Corresponding author. Researcher, Department of Genetics and National Plant Gene Bank of Iran, SPII., AREEO, Karaj, Iran. E–mail: mani.marefatzadeh@gmail.com

Noosheen Rahmani
Graduated of M.Sc., Horticulture Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E–mail: noosheen.rahmani@gmail.com

Pegah Beyzaee
Researcher, Department of Genetics and National Plant Gene Bank of Iran, SPII., AREEO, Karaj, Iran. E–mail: pegah.beyzaee@yahoo.com

Abstract

Objective

Black cumin (*Nigella sativa* L.), a plant belonging to the Ranunculaceae family with a 3000-year history, has wide applications in the pharmaceutical industry. Despite the increasing global trend in the use of medicinal and aromatic plants in various pharmaceutical, health, and therapeutic industries, and despite numerous studies on the agronomy of medicinal plants, a significant gap is felt in breeding evaluations aimed at achieving high-yielding cultivars suitable for cultivation under different conditions in the country.

Materials and methods

In this study, the genetic diversity of 20 black cumin ecotypes collected from different regions of Iran was investigated using the ISSR molecular marker. Genomic DNA was extracted from

young, fresh leaves using the CTAB protocol based on the modified method of Lodhi et al. (1994). The obtained data were analyzed to calculate various indices such as Polymorphic Information Content (PIC), Resolving Power (Rp), and Marker Index (MI). Grouping was performed using cluster analysis (based on Jaccard's dissimilarity matrix and the Neighbor-joining method) and Principal Coordinate Analysis (PCoA) with the Darwin software. The population structure of the molecular data was also investigated using the STRUCTURE software.

Results

Out of the 10 primers used, nine produced scorable bands. The primers collectively amplified 77 bands, of which 55 were polymorphic. The average number of bands produced per primer was 6.56. Primer 3 had the highest PIC value (0.408), and primer 4 had the lowest (0.217). Based on the calculated values of PIC, MI, and Rp indices, the ISSR-1 primer was identified as the most suitable primer for assessing the genetic diversity of black cumin in this study. The observed genetic similarity based on these markers ranged from 0.123 to 0.485, indicating high genetic diversity among the studied ecotypes. Cluster analysis separated the studied ecotypes into three distinct groups; however, population structure analysis identified eight different population groups.

Conclusions

Overall, the results of this research indicate the existence of high and potential genetic diversity among the studied black cumin ecotypes. Given that native ecotypes are highly adapted to their environment, this collection can be introduced as a valuable genetic resource for future black cumin breeding programs.

Keywords: genetic diversity, plant gene bank, polymorphic information content, principal coordinate analysis

Paper Type: Research Paper.

Citation: Fanaei, H.R., Hadadinejad, M., Bagheri, N.A., Marefatzadeh-Khameneh, M., Rahmani, N. & Beyzaee, P. (2026). Evaluation of molecular diversity and population structure analysis in some local black caraway (*Nigella sativa* L.) ecotypes using ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(4), 1-22.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 1-22. DOI: 10.22103/jab.2026.24178.1622

Received: March 25, 2026. Received in revised form: May 24, 2026.

Accepted: May 25, 2026. Published online: August 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Black cumin (*Nigella sativa* L.), a diploid (2n=2x=12) annual self-pollinated medicinal plant belonging to the *Ranunculaceae* family with over 3000 years of documented use, possesses

well-established immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant properties. Despite the rising global demand for medicinal and aromatic plants and numerous agronomic studies, a significant gap remains in targeted breeding programs aimed at developing high-yielding, locally adapted varieties suitable for the diverse agro-ecological conditions of Iran. Native ecotypes are particularly valuable because they carry adaptive alleles shaped by long-term natural and farmer selection. In this context, the present study was conducted to assess the molecular diversity of 20 Iranian local black cumin ecotypes obtained from the National Plant Gene Bank of Iran using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers, to evaluate the efficiency of these markers through various indices (Polymorphism Information Content, Marker Index, and Resolving Power), to analyze the population structure through Bayesian clustering, and to classify the ecotypes for future breeding applications.

Materials and methods

Genomic DNA was extracted from young healthy leaves collected at the flowering stage using a modified CTAB protocol based on Lodhi et al. (1994). Ten ISSR primers were initially tested, of which nine produced scorable and reproducible bands. PCR reactions were performed in a 10 µL volume containing 50 ng of template DNA, 1 µL of primer, and 5 µL of 2X MasterMix. Thermal cycling conditions included an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at primer-specific temperatures (35–59 °C) for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. Amplicons were resolved on 1.5 % agarose gels, stained with Safe View II, and visualized under a gel documentation system. Band presence was scored as binary data (1 for presence, 0 for absence). Various genetic parameters were calculated using GenAlex version 6.41, including the number of observed alleles (Na), effective number of alleles (Ne), Shannon's information index (I), expected heterozygosity (He), and unbiased expected heterozygosity (UHe). Marker efficiency was assessed through PIC, MI, and Rp. Genetic similarity was estimated using Jaccard's dissimilarity matrix. Cluster analysis was performed using the Neighbor-Joining (NJ) method with DARwin version 6.0, and the cophenetic correlation coefficient was calculated to evaluate the robustness of the clustering. Principal Coordinate Analysis (PCoA) was carried out using GenAlex. Population structure was inferred with STRUCTURE software version 2.3.4 using an admixture model with correlated allele frequencies, assuming K values from 2 to 10, a burn-in period of 100 000 iterations followed by 100 000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) replicates, with 10 independent runs for each K. The optimal number of subpopulations (optimal K) was determined using STRUCTURE HARVESTER based on the ΔK method of Evanno et al. (2005).

Results

The nine ISSR primers amplified a total of 77 distinct bands, of which 55 were polymorphic, resulting in an overall polymorphism percentage of 71.57 %. The number of amplified bands per primer ranged from 4 (primer 4) to 11 (primer 10), with an average of 8.55 bands per primer. The average number of polymorphic bands per primer was 6.11, and the average number of bands per genotype was 6.56. Percentage of polymorphism varied from 40 % (primer 2 and primer 6) to

100 % (primer 3 and primer 9). The Polymorphism Information Content (PIC) ranged from 0.217 (primer 4) to 0.408 (primer 3), with a mean value of 0.339. According to standard classification, primers 3 (PIC=0.408) and 7 (PIC=0.401) were considered highly informative, demonstrating good utility for distinguishing even closely related individuals. The Marker Index (MI) varied from 0.408 (primer 4) to 2.306 (primer 1), averaging 1.541. Resolving Power (Rp) ranged from 1.875 (primer 4) to 6.872 (primer 10), with a mean of 4.501. The average number of observed alleles (Na) per primer was 14.556, while the effective number of alleles (Ne) averaged 1.516. Shannon's information index (I) ranged from 0.00 to 0.64 (mean = 0.41), and expected heterozygosity (He) ranged from 0.00 to 0.45 (mean = 0.285). Based on the combined values of PIC, MI, Rp, Ne and I, primers 1, 3 and 7 were identified as the most suitable markers for assessing genetic diversity in black cumin. Genetic similarity coefficients (Jaccard) among the 20 ecotypes ranged from as low as 0.123 (between ecotype 16 from Ferdos and ecotype 17 from Chenaran) to a maximum of 0.485 (between ecotype 10 and ecotype 12), with an overall low average similarity of approximately 0.29, demonstrating that the studied germplasm possesses a high level of genetic diversity. The cophenetic correlation coefficient for the NJ method (0.956) was higher than for Ward (0.926), Single linkage (0.918), UPGMA (0.930) and WPGMA (0.935), confirming that the NJ dendrogram faithfully represented the original distance matrix. The cluster analysis divided the 20 ecotypes into three main groups: Group I comprised six ecotypes (KC-82-191 from Isfahan, KC-59-248 from Hamadan, KC-59-751 from Gonabad, KC-82-750 from Ferdos, KC-82-749 from Chenaran, and the IPK reference ecotype); Group II contained eight ecotypes (KC-82-746 from Golestan, KC-59-268, KC-82-747 from Golestan, KC-59-267, KC-59-257, KC-59-256, KC-59-254, and KC-59-249 from Khorasan); Group III included the remaining six ecotypes (KC-59-252, KC-59-251, KC-59-255, KC-82-691 from Zabol, and KC-59-224). Ecotype 12 (Kurdistan) was the most divergent, showing the largest genetic distances from ecotypes 10, 13 and 20. The population structure analysis using Bayesian clustering revealed that the optimal number of subpopulations was K = 8, based on the highest ΔK value, indicating the presence of eight genetically distinct groups among the 20 ecotypes. The eight inferred groups (shown as different colors in the Q-plot) were as follows: group 1 (red) contained only ecotype 12 (Kurdistan); group 2 (green) contained ecotypes 9, 19, 18, 7, 5, 20 (IPK), 4 and 1; group 3 (dark blue) contained only ecotype 11; group 4 (cyan) contained ecotypes 13, 15 and 3; group 5 (pink) contained only ecotype 10; group 6 (purple) contained only ecotype 14; group 7 (yellow-orange) contained ecotypes 17, 16, 6 and 8; group 8 (light blue) contained only ecotype 2. Several ecotypes (e.g., KC-82-747 and KC-59-256) showed admixed ancestry (mixed colors), suggesting historical gene flow between populations. The Principal Coordinate Analysis (PCoA) showed that the first three principal components (eigenvalues greater than 1) collectively explained 62.82 % of the total molecular variance. The two-dimensional PCoA plot confirmed the grouping patterns observed in both the cluster analysis and the Bayesian structure analysis: ecotypes belonging to the same STRUCTURE groups tended to cluster together in the PCoA space, and admixed ecotypes were positioned intermediate between groups, thus strongly validating the consistency of the genetic groupings. Notably, the structure results (eight groups) were only partially congruent with the simpler dendrogram (three

groups), a discrepancy that is expected because hierarchical clustering is based on distance matrices while Bayesian structure analysis partitions individuals based on allele frequency differences without assuming any particular distance metric. Consequently, both approaches are complementary rather than contradictory: the cluster analysis provides a hierarchical overview, while the Bayesian method reveals cryptic subpopulations that can cause spurious associations if not accounted for in subsequent marker-trait association studies.

Conclusion

The overall findings of this research demonstrate the existence of high and potentially valuable genetic diversity among the studied Iranian black cumin ecotypes. Because native ecotypes have undergone long-term adaptation to their local environments, this collection can be considered a precious genetic resource for future black cumin breeding programs. The high genetic distance observed between certain ecotype pairs (e.g., between ecotype 12 and ecotype 16 and 17, with similarity coefficients as low as 0.123–0.429) makes them ideal candidates for producing F1 hybrids with potentially high heterosis, as well as for generating transgressive segregants in later selfing generations. The identification of eight distinct subpopulations underscores the importance of controlling for population structure before conducting any association mapping (AM) or genome-wide association study (GWAS) using this germplasm. If structure is ignored, the proportion of false positive marker-trait associations can become unacceptably high. For this reason, any future association study should incorporate the Q matrix (derived from STRUCTURE) or principal components (from PCoA) together with a kinship matrix (K) into a Mixed Linear Model (MLM). The most informative ISSR primers identified in this study – namely primers 1, 3 and 7 – are recommended for fingerprinting, genebank quality control, and marker-assisted selection once quantitative trait loci (QTLs) for economically important traits (such as thymoquinone content, seed yield under drought stress, or disease resistance) have been identified. From a conservation perspective, the National Plant Gene Bank of Iran holds a unique and irreplaceable genetic repository that can support a long-term, sustainable breeding program for black cumin. Future research should expand the sample size to include more provinces across Iran, incorporate codominant markers (e.g., SSR or SNP) for finer resolution of population genetic parameters, integrate molecular data with morphological, agronomic and phytochemical traits, and include additional reference accessions from international gene banks to place Iranian diversity in a global context.

Author contribution

Conceptualization: Hamid Reza Fanaei (H.R.F.) and Mahdi Hadadinejad (M.H.); methodology, H.R.F., M.H., and Nadali Bagheri (N.A.B.); software: Manni Marefatzadeh-Khameneh (M.M.-Kh.); validation: H.R.F. and M.H.; formal analysis: M.M.-Kh., investigation: Noosheen Rahmani (N.R.) and Pegah Beyzaee (P.B.); writing original draft preparation: N.R. and M.M.-Kh.; writing-review and editing: H.R.F.; supervision: N.A.B.; project administration: H.R.F. and M.H.. All authors have read and agreed to the published version of the

manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability statement

Not applicable.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the NPGBI, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), AREEO, Karaj, for providing the black cumin ecotypes and laboratory facilities. We also extend our thanks to Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University for Scientific support. Special thanks are due to the laboratory staff Dr. Ali Sajad Bokaei at the Department of Genetics, SPII, for their technical help.

Ethical consideration

This study involved only plant genetic resources conserved in NPGBI. No ethical approvals were required as no animals, humans or endangered species were used. All authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This research received partial financial support from Sari University. The majority of field experiments, laboratory and gene bank accessions were supported by the NPGBI. No specific external funding from pharmaceutical or commercial companies was received.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی تنوع مولکولی و تجزیه ساختار جمعیت برخی از اکوتیپ‌های بومی سیاهدانه با استفاده از نشانگر ISSR

حمید رضا فنایی

*نویسنده مسئول: استاد بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: fanay52@yahoo.com

مهدی حدادی‌نژاد

*استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: m.hadadinejad@sanru.ac.ir

نادعلی باقری

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: NadaliBagheri@sanru.ac.ir

مانی معرفت‌زاده خامنه

*نویسنده مسئول: محقق بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: mani.marefatzadeh@gmail.com

نوشین رحمانی

فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: noosheen.rahmani@gmail.com

پگاه بیضایی

محقق بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: pegah.beyzaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۰۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۴

چکیده

هدف: سیاهدانه با نام علمی *Nigella sativa* L. گیاهی از تیره آلاله و با قدمتی ۳۰۰۰ ساله است که کاربرد وسیعی در صنعت داروسازی دارد. علی‌رغم روند فزاینده استفاده از گیاهان دارویی و معطر در صنایع مختلف داروسازی، بهداشتی و درمانی در جهان و انجام مطالعات مختلف در زمینه به‌زراعی گیاهان دارویی، خلأ محسوسی در زمینه ارزیابی‌های به‌نژادی به‌منظور دستیابی به ارقام پر محصول و مناسب کشت در شرایط مختلف کشور احساس می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ سیاهدانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی از برگ‌های جوان و تازه با استفاده از دستورالعمل CTAB و بر اساس روش تغییریافته Lodhi و همکاران (۱۹۹۴) انجام گرفت. داده‌های به‌دست آمده، برای محاسبه شاخص‌های مختلفی همچون محتوای اطلاعات چندشکلی، قدرت تفکیک و شاخص نشانگری تجزیه شدند و گروه‌بندی آن‌ها به کمک تجزیه خوشه‌ای (بر اساس ماتریس عدم تشابه جاکارد و به روش Neighbor joining) و تجزیه به مختصات اصلی به کمک نرم‌افزار Darwin انجام شد. ساختار جمعیت داده‌های مولکولی نیز با نرم‌افزار STRUCTURE بررسی و انجام شد.

نتایج: از تعداد ۱۰ آغازگر مورد استفاده تعداد نه آغازگر دارای باندهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۷۷ باند تکثیر شده تولید کردند که از این بین تعداد ۵۵ باند چندشکل مشاهده شد. میانگین تعداد باند تولیدشده توسط هر آغازگر ۶/۵۶ بود. آغازگر سه از بیشترین (۰/۴۰۸) و آغازگر چهار (۰/۲۱۷) از کم‌ترین میزان شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی برخوردار بودند. با توجه به مقادیر محاسبه شده شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری و شاخص قدرت تفکیک، آغازگر ISSR-1 به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگر جهت بررسی تنوع ژنتیکی سیاهدانه در این مطالعه معرفی شد. میزان شباهت ژنتیکی مشاهده شده براساس اطلاعات این نشانگرها از ۰/۱۲۳ الی ۰/۴۸۵ متغیر بود که پایین بودن میزان شباهت ژنتیکی نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه است. نتایج تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های مورد بررسی را در سه گروه متمایز تفکیک کرد، با این وجود در تجزیه ساختار جمعیت تعداد هشت گروه جمعیتی مختلف شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج این تحقیق حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالقوه و بالا در بین اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد مطالعه بود. با توجه به اینکه اکوتیپ‌های بومی دارای سازگاری بالا با محیط هستند می‌توان این مجموعه را به عنوان یک منبع ژنتیکی ارزشمند در برنامه‌های به‌نژادی آتی سیاهدانه معرفی نمود.

کلیدواژه‌ها: بانک ژن گیاهی، تجزیه به مختصات اصلی، تنوع ژنتیکی، محتوای اطلاعات چندشکلی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: فنایی حمیدرضا، حدادی‌نژاد مهدی، باقری نادعلی، معرفت‌زاده خامنه مانی، رحمانی نوشین، بیضایی پگاه (۱۴۰۵) بررسی تنوع مولکولی و تجزیه ساختار جمعیت برخی از اکوتیپ‌های بومی سیاهدانه با استفاده از نشانگر ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۴)، ۲۲-۱.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سیاهدانه با نام علمی *Nigella sativa*، گیاهی از تیره آلاله (*Ranunculaceae*) و جنس *Nigella* است که تا کنون ۱۴ گونه از این جنس در جهان شناخته شده است. مبدأ سیاهدانه را اروپا و مرکز پراکنش آن‌را آسیای میانه و مناطق کوهستانی غرب آسیا و شمال آفریقا گزارش کرده‌اند (Kapital et al., 2015). سیاهدانه گیاهی دیپلوئید (2n=2x=12)، یکساله، خودگشن و مخصوص نواحی نیمه خشک جهان است (D'antuono et al., 2002)، که از تأثیر بالایی بر سیستم ایمنی بدن برخوردار است

(Avramidis et al., 1998). امروزه گرایش جهانی به گیاه درمانی و کاربرد گسترده گونه‌های دارویی در صنایع مختلف موجب شده است تا مساله حفاظت از آن‌ها در تمام نقاط جهان مورد توجه زیادی قرار بگیرد (Franz et al., 1998). با این حال، به‌نژادی گیاهان دارویی به‌علت وجود اهداف متنوع به‌نژادی و در دسترس نبودن اطلاعات بیولوژیکی کافی برای هر گونه امر پیچیده‌ای است (Pank, 2007). در این راستا، ارزیابی ژنتیکی تنوع گونه‌های دارویی یکی از اولین مراحل برنامه‌های به‌نژادی مطرح می‌باشد که خوشبختانه برای بسیاری از گونه‌های دارویی، تنوع ژنتیکی کافی در اکوتیپ‌های وحشی و نژادهای بومی در دسترس است (Zheleva et al., 2007). آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت صحیح این منابع نه تنها اهمیت حفاظت از ذخایر ژنتیکی موجود را صد چندان می‌کند بلکه اهمیت استفاده از آنها را در برنامه‌های به‌نژادی آشکار می‌سازد (Qarayazi et al., 1996). با توسعه نشانگرهای مولکولی و نقشه‌های ژنتیکی، گرایش به استفاده از فناوری‌های نوین برای اهداف به‌نژادی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی افزایش یافت. در مدت زمان اندکی، استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌عنوان گام نخست در بررسی پارامترهای کلیدی در تحقیقات ژنتیک جمعیت یعنی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت مطرح شد (Foolad, 2012). به علاوه، نشانگرهای مولکولی ابزار مهمی برای بررسی تخمین‌های دقیق تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت بین ارقام و نمونه‌های گیاهی و حیوانی هستند که می‌توانند در پروژه‌های اصلاح دام و گیاه مورد استفاده قرار گیرند (Bokaei et al., 2024; Bokaei et al., 2025). در میان نشانگرهای مولکولی، ISSR (تکرار توالی ساده بین گونه‌ای) به طور گسترده و دقیق برای دسترسی به تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم گیاهی و جانوری، غربالگری گیاهان و جانوران جهش‌یافته و شناسایی افراد نزدیک به هم مورد استفاده قرار گرفته است. مزایای این نشانگرها، قابلیت اطمینان، سرعت، سادگی، مقرون به صرفه بودن و تعیین تنوع ژنتیکی بین افراد نزدیک به هم است. توالی‌های تکراری ساده میانی (ISSR) به‌عنوان یک نشانگر مولکولی از قابلیت تکرارپذیری مناسبی برخوردار بوده و از توارث‌پذیری ساده مندلی تبعیت می‌کند (Luz et al., 2020). استفاده از نشانگرهای مولکولی برای مطالعه تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف سیاهدانه در مطالعات مختلفی گزارش شده است (Mirzaei and Mirzaghaderi, 2016; Kapital et al., 2015; Iqbal et al., 2010; Al-Huqail and Al-Saad, 2010). در یکی از این مطالعات، Kapital et al. (2015) تنوع ژنتیکی ۸۴ نمونه سیاهدانه جمع آوری شده از منطقه اتیوپی را با استفاده از ۵ نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار دادند، که در مجموع ۷۲ باند با ۱۰۰ درصد چندشکلی تولید شد. شاخص اطلاعات شانون برابر با ۰/۵۲۴ و مقدار تنوع در درون جمعیت ۹۵/۰۴ درصد بود که سطح بسیار بالای تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم را آشکار کرد. در پژوهشی Al-Huqail & Al-Saad (2010) نیز با مطالعه ۴ ژنوتیپ سیاهدانه (عربستان سعودی، اتیوپی، مصر و سوریه) با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR، چندشکلی بالایی مشاهده و گزارش کردند که تفاوت ژنتیکی زیادی بین ژنوتیپ‌های مختلف وجود داشت. این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی۲۰ اکوتیپ بومی سیاهدانه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و مطالعه ساختار جمعیت آن به‌منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی پیش‌روی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA ژنومی: در این تحقیق ۲۰ اکوتیپ بومی سیاهدانه دریافتی از بانک ژن گیاهی ملی ایران مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشخصات مربوط به اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت برخی از اکوتیپ‌های بومی سیاهدانه با استفاده از نشانگر ISSR انجام شد.

برای استخراج DNA ژنومی، از برگ‌های جوان، سالم و تازه در زمان گلدهی استفاده شد. پس از برداشت نمونه برگی، بلافاصله نمونه‌ها داخل یک فویل آلومینیومی پیچیده و در مخزن ازت منجمد شـــدند. برای جلوگیری از تخریب احتمالی DNA توســـط نوکلئازهای درون ســلولی، نمونه‌ها در فریزر منهای ۸۰ درجه ســانتی‌گراد نگهداری شــدند. اســتخراج DNA ژنومی با اســتفاده از دســتورالعمل CTAB و بر اســاس روش تغییر یافته Lodhi و همکاران (۱۹۹۴) انجام گرفت. برای اطمینان از صــحت اســتخراج انجام شــده، نمونه‌های مورد نظر روی ژل آگارز ۱/۵ درصــد الکتروفورز شــدند و در مرحله بعد کیفیت DNA موجود در هر نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد.

جدول ۱. مشخصات اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد مطالعه در این آزمایش

Table 1. Characteristics of black caraway ecotypes studied in this experiment

مبدأ Origin	اکوتیپ Ecotype	کد نمونه Plant code	مبدأ Origin	اکوتیپ Ecotype	کد نمونه Plant code
کردستان Kurdistan	KC-59-267	11	گلستان Golestan	KC-82-746	1
کردستان Kurdistan	KC-59-257	12	کردستان Kurdistan	KC-59-268	2
کردستان Kurdistan	KC-59-256	13	گلستان Golestan	KC-82-747	3
کردستان Kurdistan	KC-59-254	14	اصفهان Isfahan	KC-82-191	4
خراسان Khorasan	KC-59-249	15	کردستان Kurdistan	KC-59-259	5
خراسان رضوی/مشهد/فردوس Khorasan razavi/Mashhad/Ferdos	KC-82-750	16	همدان Hamadan	KC-59-248	6
خراسان رضوی/مشهد/چناران Khorasan razavi/Mashhad/Chenaran	KC-82-749	17	کردستان Kurdistan	KC-59-252	7
سیستان و بلوچستان/زابل Sistan & Balochestan/Zabol	KC-82-691	18	خراسان رضوی/مشهد/گناباد Khorasan razavi/Mashhad/Gonabad	KC-59-751	8
کردستان Kurdistan	KC-59-224	19	کردستان Kurdistan	KC-59-251	9
IPK	IPK	20	کردستان Kurdistan	KC-59-255	10

آغازگرهای مورد استفاده و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): در این آزمایش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر و شامل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر آغازگر مورد استفاده، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۵ میکرولیتر MasterMix 2X PCR تهیه شــده از شــرکت پارس طوس بود. چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به این صورت بود که واسرشت‌سازی اولیه طی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله میانی طی ۳۵ چرخه به ترتیب شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر طبق دمای اختصاصی هر آغازگر به مدت یک دقیقه و بسط آغازگر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه ودر

مرحله آخر بسط نهایی طی یک چرخه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TAE 1X برای جداسازی و آشکارسازی باندهای تکثیر شده استفاده شد. رنگ‌آمیزی توسط Safe view II انجام شد و باندهای تکثیری با دستگاه ژل‌داکیومنت (Vilber Lourmant) آشکارسازی شدند.

جدول ۲. آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سیاهدانه

Table 2. ISSR primers were used to investigate the genetic diversity of black caraway ecotypes

شماره آغازگر Primer No.	کد آغازگر Primer code	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال T. Annealing
1	ISSR1	5′-GAGAGAGAGAGAGARG-3′	57
2	ISSR2	5′-CACACACACACACAYC-3′	53
3	ISSR3	5′-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3′	57.5
4	ISSR4	5′-AGAGAGAGAGAGAGAGYC-3′	50
5	ISSR5	5′-GTGTGTGTGTGTGTGTYC-3′	54
6	ISSR6	5′-ACACACACACACACACYG-3′	54
7	ISSR7	5′-TGTGTGTGTGTGTGTGRC-3′	52
8	ISSR8	5′-ATATATATATATATRC-3′	35
9	ISSR9	5′-CACACACACACACAYG-3′	59
10	ISSR10	5′-CACACACACACACACARC-3′	52

تجزیه‌های آماری: نمره‌دهی باندهای تکثیر شده به‌صورت صفر و یک به‌ترتیب برای عدم وجود و وجود باندهای تکثیری صورت گرفت. به منظور بررسی کارایی آغازگرها شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی، قدرت تفکیک، شاخص نشانگر، تعداد کل باندهای تکثیری و تعداد باندهای تکثیری چندشکل با استفاده از نرم‌افزار GenAlex version 6.41 محاسبه شد (Lemos et al., 2019; Powell et al., 1996). گروه‌بندی اکوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس ماتریس عدم تشابه جاکارد و به روش Neighbor joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin version 6.0 انجام گرفت. تجزیه به مختصات اصلی به کمک نرم‌افزار GenALEx version 6.41 صورت گرفت. ساختار جمعیت داده‌های حاصل از آغازگرهای ISSR با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 در حالت admixrute با Burn-in برابر ۱۰۰۰۰۰ و MCMC برابر ۱۰۰۰۰۰ در مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ و ۱۰ مرتبه تکرار برای هر K بررسی شد. عدد K بهینه نیز با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE HARVESTER و بر اساس بیشترین حد ΔK پیشنهاد شده توسط Evanno و همکاران (۲۰۰۵) تعیین شد.

نتایج

از بین آغازگرهای ISSR به‌کار گرفته شده در این آزمایش تنها ۹ آغازگر از کیفیت تکثیر مطلوبی برخوردار بودند و باندهای چندشکل تولید نمودند که مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج تجزیه الگوهای باندی آغازگرهای ISSR در جدول ۳ درج شده است. در مجموع از تعداد ۱۱۸۰ باند تکثیری، ۸۴۴ باند (۷۱/۵۷ درصد) چندشکل بودند. متوسط تعداد کل باندهای (آلل) تکثیری، متوسط درصد چندشکلی باندها و متوسط تعداد باند برای هر ژنوتیپ به‌ترتیب ۸/۵۵ عدد، ۷۱/۵۷ درصد و ۶/۵۶ باند بود. به‌طور متوسط ۱۳۱/۱۱۱ باند توسط هر کدام از آغازگرهای ISSR مطالعه شده به‌دست آمد. تعداد باند (آلل) تکثیری و تعداد باند چندشکل

به‌دست آمده از هر آغازگر از ۴ باند (۴) تا ۱۱ باند (۱۰) متغیر بود. درصد چندشکلی در آغازگرهای مورد مطالعه با دامنه نوسانی بین ۴۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. متوسط تعداد کل باندهای (آلل) تکثیری و درصد چندشکلی باندها برای هر آغازگر نیز به‌ترتیب ۸/۵۶ عدد و ۷۱/۵۷ درصد بود. متوسط تعداد باند برای هر ژنوتیپ ۶/۵۶ باند بود. آغازگرهای ISSR مورد مطالعه به طور متوسط دارای قدرت تمایز برابر ۴/۵۰۱ بودند. دامنه تغییرات شاخص نشانگری از ۰/۴۰۸ تا ۲/۳۰۶ و به طور متوسط ۱/۵۴۱ بود. کم‌ترین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی برابر ۰/۲۱۷ و بیشترین میزان آن ۰/۴۰۸ با متوسط ۰/۳۳۹ بود (جدول ۴).

جدول ۳. نتایج تجزیه الگوهای باندی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سیاهدانه

Table 3. The results of analyzes the band patterns of ISSR primers were used to investigate the genetic diversity of black caraway ecotypes

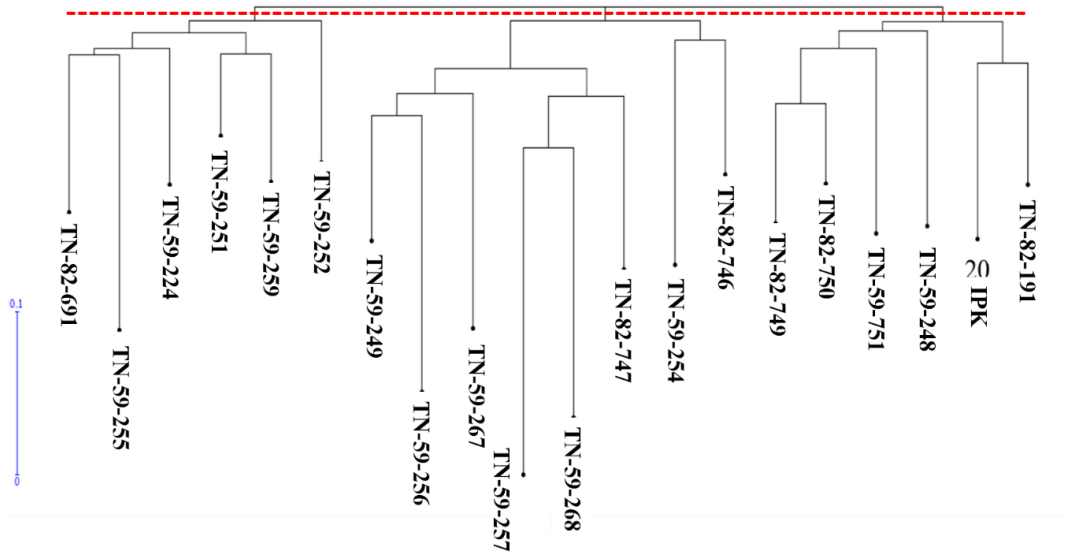
محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content	قدرت تمایز Resolving power	شاخص نشانگری Marker index	تعداد متوسط باند برای هر ژنوتیپ Number of bands per genotypes	درصد باندهای تکثیر شده چندشکل Percentage of number of polymorphic amplified bands	تعداد باندهای تکثیر شده چندشکل Number of polymorphic amplified bands	تعداد باندهای تکثیر شده Number of amplified bands	آغازگر Primer
0.339	6.795	2.306	7.55	90.00	9	10	1
0.375	3.480	1.305	8.70	40.00	4	10	2
0.408	4.500	1.839	4.50	100.00	7	7	3
0.217	1.875	0.408	3.75	50.00	2	4	4
0.382	3.563	1.359	5.70	60.50	5	8	5
0.373	3.520	1.311	8.80	40.00	4	10	6
0.401	5.200	2.083	5.85	88.89	8	9	7
0.283	4.700	1.328	4.70	100.00	8	8	9
0.281	6.872	1.929	9.45	72.73	8	11	10
0.339	4.501	1.541	6.56	71.57	6.11	8.55	میانگین Mean

مقادیر ضـــرایب تشـــابه ژنتیکی دارای دامنه تغییراتی بین ۰/۱۲۳ تا ۰/۴۸۵ بود. ضـــریب کوفنتیک به‌دســـت آمده برای روشNeighbor joining (۰/۹۵۶) بالاتر از ســـایر روش‌های تجزیه خوشـــه‌ای بود. مقدار ضـــریب کوفنتیک برای روش‌های Ward، Single linkage، UPGMA و WPGMA بـه‌ترتیـب برابر بـا ۰/۹۲۶، ۰/۹۱۸، ۰/۹۳۰ و ۰/۹۳۵ بود. لـذا روش Neighbor joining برای گروه‌بندی اکوتیپ‌ها مورد اسـتفاده قرار گرفت (شـکل ۱). بر این اسـاس اکوتیپ‌های سـیاهدانه مورد مطالعه در ســه گروه مجزا تقســیم شــدند. اکوتیپ‌های شــماره TN-82-191، TN-59-248، TN-59-751، TN-82-750، TN-82-749 در گروه اول؛ اکوتیپ‌های شـــماره TN-82-746، TN-59-268، TN-82-747، TN-59-267، TN-59-257، TN-59-256، TN-59-254 TN-59-249 گروه دوم؛ و اکوتیپ‌های شـــماره ، TN-59-252، TN-59-251، TN-59-255، TN-82-691 و TN-59-224 گروه سوم قرار گرفتند.

جدول ٤. پارامترهای ژنتیکی برآوردشده در اکوتیپ‌های سیاهدانه با استفاده از نشانگر ISSR

Table 5. Genetic parameters estimated in black caraway ecotypes using ISSR marker

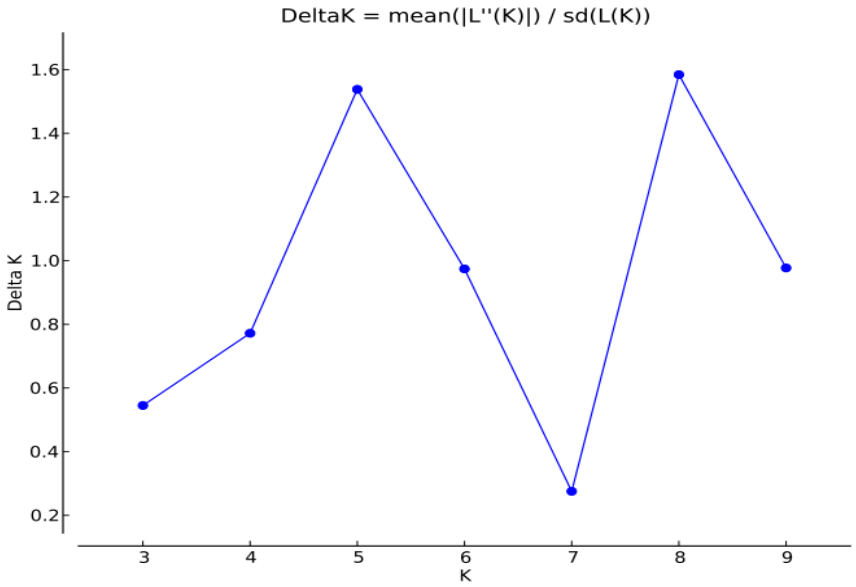
نشانگر Primer	درصد چندشکلی PPL	هتروزیگوتی مورد انتظار بدون خطا UHe	هتروزیگوتی مورد انتظار He	شاخص اطلاعات شانون I	تعداد آلل‌های مؤثر Ne	تعداد آلل‌های مشاهده شده Na
1	0.75	0.41	0.40	0.57	1.72	19.00
2	0.87	0.18	0.18	0.25	1.32	14.00
3	0.64	0.46	0.45	0.64	1.82	14.00
4	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	4.00
5	0.71	0.31	0.30	0.44	1.52	14.00
6	0.88	0.18	0.17	0.25	1.32	14.00
7	0.65	0.39	0.38	0.55	1.72	17.00
8	0.58	0.36	0.36	0.53	1.62	16.00
9	0.85	0.33	0.33	0.46	1.60	19.00
10	0.75	0.292	0.285	0.41	1.516	14.556
Mean	77.13	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.43	0.41 ± 0.05	0.05±1.72	19.00



شکل ۱. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های سیاهدانه بر اساس نشانگر ISSR

Figure 1. Cluster analysis of studied black caraway ecotypes based on ISSR marker

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه ساختار جمعیت، میزان بهینه شده K برابر با ۸ در نظر گرفته شد (شکل ۲ و جدول ۵). میزان بهینه شده K نشان از وجود هشت گروه مجزا در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی داشت که تا حدودی نشان‌دهنده وجود اختلاف و تمایز ژنتیکی بالا بین آنها است.



شکل ۲. نمودار تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت‌های موجود بین اکوتیپ‌های سیاهدانه بر اساس نشانگر هدف

Figure 2. The plot of appropriate number of subpopulations determination between black caraway ecotypes based on the target marker

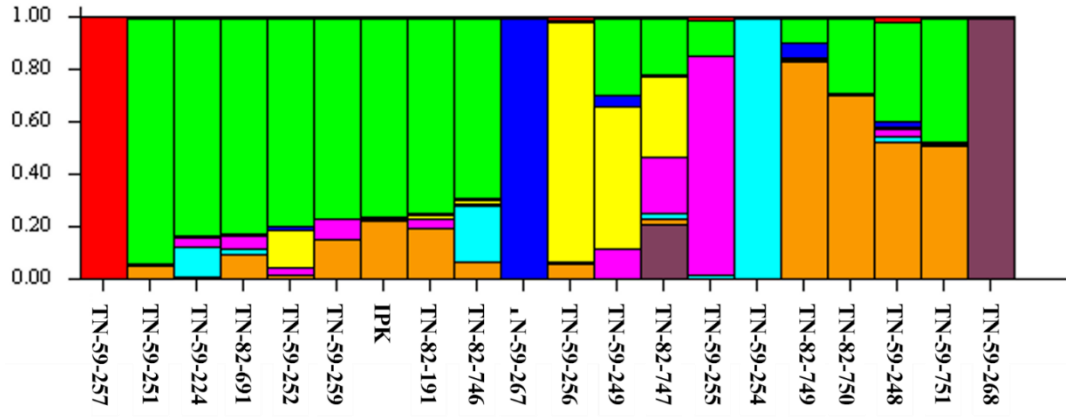
جدول ۵. آماره‌های محاسبه شده برای مقدار بهینه K با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE

Table 6. Statistics calculated for the optimal value of K using STRUCTURE software

K	Ln'(K)	Stdev LnP(K)	Mean LnP(K)	Reps	|Ln"(K)|	Delta K
2	10	-1050.680	1.006	-	-	-
3	10	-985.070	4.331	65.610	2.360	0.544
4	10	-921.820	13.863	63.250	10.700	0.771
5	10	-847.870	16.076	73.950	24.730	1.538
6	10	-798.650	20.492	49.220	19.960	0.974
7	10	-729.450	10.175	69.180	2.800	0.275
8	10	-663.090	14.984	66.380	23.740	1.584
9	10	-620.450	25.351	42.640	24.770	0.977
10	10	-553.040	18.266	67.410	-	-

تمایز هشت گروه مختلف در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی در شکل ۳ نیز نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نشانگر ISSR اکوتیپ‌های سیاهدانه را به هشت گروه تقسیم کرده و از کارایی لازم در این زمینه برخوردار بوده است. در این راستا در گروه اول اکوتیپ شماره ۱۲ (KC-59-257)، در گروه دوم اکوتیپ های شماره ۹ (KC-59-251)، ۱۹ (KC-59-224)، ۱۸ (KC-82-691)، ۷ (KC-59-252)، ۵ (KC-59-259)، ۲۰ (IPK)، ۴ (KC-82-191) و ۱ (KC-82-746)، در گروه سوم اکوتیپ شماره ۱۱ (KC-59-267)، در گروه چهارم اکوتیپ های شماره ۱۳ (KC-59-256)، ۱۵ (KC-59-249) و ۳ (KC-82-747)، در گروه پنجم اکوتیپ شماره ۱۰ (KC-59-255)، در گروه ششم اکوتیپ شماره ۱۴ (KC-59-254)، در

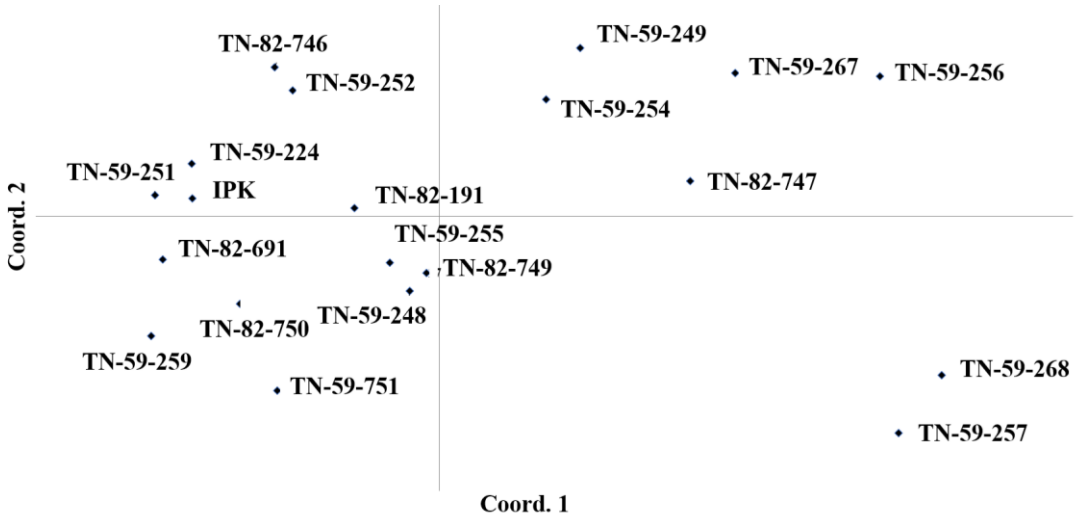
گروه هفتم اکوتیپ های شـــماره ۱۷ (KC-82-749)، ۱۶ (KC-82-750)، ۶ (KC-59-248) و ۸ (KC-59-751) و در گروه هشتم اکوتیپ شماره ۲ (KC-59-268) قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار Q پلات اکوتیپ‌های سیاه دانه مورد بررسی بر اساس مدل Bayesian و آغازگرهای ISSR. رنگ‌های مختلف گروه‌های ژنتیکی متفاوت را نشان می‌دهند

Figure 3. Q plot of black caraway ecotypes investigated based on the Bayesian model and ISSR primers. Different colors represent different genetic groups

در تجزیه به مختصات اصلی سه مؤلفه نخست با ضریب عاملی بالای یک به‌دست آمد که در مجموع ۶۲/۸۲ درصد از تغییرات ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد بررســی را توجیه نمودند. با توجه به دو مؤلفه اول که بیشــترین درصــد تغییرات موجود بین ژرم‌پلاسم مورد مطالعه را توجیه کردند نمودار بای‌پلات اکوتیپ‌های مورد مطالعه ترسیم شد (شکل ۴).



شکل ٤. نمایش دو بعدی اکوتیپ‌های سیاهدانه بر اساس تجزیه به مختصات اصلی با نشانگر ISSR

Figure 4. Two-dimensional plot of black caraway ecotypes based on principal coordinates analysis using ISSR marker

بحث

یکی از مراحل ابتدایی در انتخاب سیستم نشانگری مناسب در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی، دستیابی به دانش کافی از کارآیی سیستم‌های مبتنی بر نشانگرهای مولکولی برای نشان دادن تنوع موجود بین نمونه‌های مورد بررسی است. در این راستا شاخص‌های مختلفی هم‌چون محتوای اطلاعات چندشکلی، قدرت تفکیک، شاخص نشانگری، تعداد کل باندهای تکثیری و تعداد باندهای تکثیری چندشکل به‌منظور بررسی و مقایسه کارآیی انواع نشانگرهای مولکولی و آغازگرها و همچنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه ساختار جمعیت به‌کار گرفته شد. از نظر تعداد باندهای تکثیر شده، آغازگر شماره ۱۰ با ۱۱ باند و آغازگرهای شماره ۶، ۱ و ۲ با ۱۰ باند بیشترین و آغازگر شماره ۴ با ۴ باند کم‌ترین میزان باند تکثیر شده را داشتند. بیشترین میزان چندشکلی در بین آغازگرهای مورد مطالعه نیز به آغازگر شماره ۹ و ۳ تعلق داشت که دارای چندشکلی صددرصدی بودند. کم‌ترین میزان چندشکلی نیز در آغازگرهای شماره ۶ و ۴ به‌ترتیب با ۵۰ و ۴۰ درصد مشاهده شد. در بررسی آلل‌ها، آغازگرهای شماره ۱۰ و ۱ به‌ترتیب با ۱۱ و ۱۰ آلل مشاهده شده بیشترین و آغازگر شماره ۴ با ۴ آلل مشاهده شده کم‌ترین میزان را داشتند. این در حالی بود که آغازگرهای شماره ۳، ۷ و ۱ به‌ترتیب با ۱/۸۲۵، ۱/۷۲۳ و ۱/۷۱۶ آلل مؤثر بیشترین و آغازگر شماره ۴ با ۱ آلل مؤثر کم‌ترین میزان را به خود اختصاص دادند. از سوی دیگر، شاخص تنوع شانون در این بررسی با میزان ۰/۶۴ به آغازگر شماره ۳ تعلق داشت. در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های سیاهدانه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اتیوپی Kapital et al. (2015) گزارش کردند که درصد چندشکلی برای جمعیت‌ها از ۶۳/۸۹ درصد تا ۱۰۰ درصد و شاخص تنوع شانون در درون جمعیت‌ها نیز از ۰/۳۶ تا ۰/۵۱ متغیر بود. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از مهم‌ترین معیارهای مورد استفاده جهت مقایسه نشانگرهای مختلف می‌باشد. از آنجایی که مقدار PIC بر مبنای تعداد آلل‌های مشاهده شده و نحوه پراکنش آن‌ها در جمعیت محاسبه می‌شود، لذا مقادیر بالای آن نشان دهنده وجود چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد (Shazdehahmadi and Kharazi, 2016). به همین دلیل نشانگرهایی که از میزان بالای این شاخص برخوردار هستند برای تفکیک ژنوتیپ‌های با نسبت خویشاوندی نزدیک مفید خواهند بود (Ren and Timko, 2001). در این مطالعه آغازگرهای شماره ۳ و ۷ به‌ترتیب با ۰/۴۰۸ و ۰/۴۰۱ بیشترین و آغازگر شماره ۴ با ۰/۲۱۷ کم‌ترین میزان شاخص اطلاعات چندشکلی را داشتند. به عبارت دیگر دامنه نوسان این متغیر از ۰/۲۱۷ تا ۰/۴۰۸ متغیر بود. بالا بودن میزان شاخص PIC در بین آغازگرهای مورد استفاده نشان دهنده کارآیی بالای آنها در تمایز اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد بررسی در این مطالعه است. به همین دلیل این آغازگرها می‌توانند از سودمندی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی سیاهدانه برخوردار باشند. در پژوهشی Mehri et al. (2022) در مطالعه‌ای گزارش کردند که آغازگرهای دارای مقادیر PIC بزرگ‌تر از ۰/۴ دارای سودمندی بالا، با مقادیر ۰/۲ الی ۰/۳ سودمند و با مقادیر کم‌تر از ۰/۱ حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند. در این مطالعه، با توجه به اینکه مقادیر شاخص اطلاعات چندشکلی به‌طور متوسط ۰/۳۴ به‌دست آمد و هم‌چنین وجود آغازگرهایی که دارای مقادیر بیشتر و نزدیک به ۴ بودند، می‌توان اظهار داشت که این آغازگرها حاوی اطلاعات مفیدی بوده و از پراکندگی مطلوبی در بین اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد بررسی برخوردار بودند. در بررسی تنوع ژنتیکی سیاهدانه با استفاده از آغازگرهای SCoT، Mirzaei & Mirzaghaderi (2016) ۱۰۶ باند چندشکل مشاهده کردند، به‌طوری که میزان چندشکلی ۳۱ درصد و مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی بین ۰/۰۳۵ تا ۰/۱۳ و با متوسط ۰/۰۷۸ متغیر بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، آغازگر ۴ کم‌ترین قدرت تمایز (۱/۸۷۵) و آغازگرهای ۱۰ (۶/۸۷۲) و ۱ (۶/۷۹۵) بیشترین قدرت تمایز را در بین آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه داشتند. دامنه تغییرات شاخص نشانگری

نیز با متوسط ۱/۵۴۱ از ۰/۴۰۸ در آغازگر ۴ تا ۲/۳۰۶ در آغازگر ۱ متغیر بود. به‌طور کلی آغازگرهای شماره ۳، ۷ و ۱ با دارا بودن بیشترین میزان شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری، قدرت تمایز، تعداد آلل مؤثر و شاخص تنوع شانون به‌عنوان بهترین آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه جهت بررسی تنوع ژنتیکی سیاهدانه معرفی شدند. از سوی دیگر، ضریب تشابه ساده به‌عنوان یکی از بهترین ضرایب در بررسی تنوع ژنتیکی در نشانگرهای غالب مطرح است و شباهت را بر اساس وجود باند گروه‌بندی می‌کند. به‌منظور بررسی روابط بین اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد مطالعه از ضرایب تشابه ژنتیکی به روش Neighbor joining استفاده شد. تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR و بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده با متوسط ۰/۲۹ از ۰/۱۲ تا ۰/۴۸ در نوسان بود. بیشترین شباهت بین اکوتیپ‌های شماره ۱۰ و ۱۲ و کم‌ترین شباهت بین اکوتیپ‌های شماره ۱۶ و ۱۷ مشاهده شد (داده‌ها آورده نشده است). میزان کم شباهت نشان دهنده این است که دو ژنوتیپ دارای اختلاف ژنتیکی زیادی می‌باشند. با توجه به اینکه اکوتیپ شماره ۱۶ مربوط به منطقه فردوس در جنوب مشهد و اقلیم گرم و خشک است و اکوتیپ شماره ۱۷ مربوط به منطقه چناران در شمال مشهد و اقلیم معتدل سرد است، می‌توان تفاوت مشاهده شده در این دو اکوتیپ را به شرایط اقلیمی آنها نسبت داد. با توجه به تفاوت بالای مشاهده شده در این دو اکوتیپ می‌توان از آنها در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در برنامه‌های به‌نژادی سیاهدانه استفاده کرد. تصور می‌شود با تلاقی بین ژنوتیپ‌هایی که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته‌اند، نتاج نوترکیب با تفکیک متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های به‌نژادی تولید شود، چرا که یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا که در سیاهدانه از اهمیت زیادی برخوردار است، استفاده از مواردی است که دارای کم‌ترین خویشاوندی باشند. شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و معمولا والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند (Yang et al., 2020). اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد مطالعه در سه گروه مجزا تقسیم شدند. اکوتیپ‌های شماره ۴ (اصفهان)، ۶ (همدان)، ۸ (گناباد)، ۱۶ (فردوس)، ۱۷ (چناران) و ۲۰ (IPK) در گروه اول؛ اکوتیپ‌های شماره ۱ (گلستان)، ۲ (کردستان)، ۳ (گلستان)، ۱۱ (کردستان)، ۱۲ (کردستان)، ۱۳ (کردستان)، ۱۴ (کردستان) و ۱۵ (خراسان) در گروه دوم؛ و اکوتیپ‌های شماره ۵ (کردستان)، ۷ (کردستان)، ۹ (کردستان)، ۱۰ (کردستان)، ۱۸ (زابل) و ۱۹ (کردستان) در گروه سوم قرار گرفتند. این نتایج اگر چه در نوع قرارگیری اکوتیپ‌ها در گروه‌های مختلف دارای نتایج متفاوتی با گروه‌بندی به‌دست آمده از داده‌های فنوتیپی بود (Rahmani et al., 2023)، با این حال در تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های فنوتیپی و مولکولی، تفکیک اکوتیپ‌ها در سه گروه صورت پذیرفت. از سوی دیگر، اکوتیپ شماره ۱۲ (کردستان) متفاوت‌ترین اکوتیپ سیاهدانه در این مطالعه بود. به‌طوری که بیشترین فاصله را با اکوتیپ‌های شماره ۱۰ (کردستان)، ۱۳ (کردستان) و ۲۰ (IPK) به‌ترتیب به میزان ۰/۴۸۵، ۰/۴۴۷ و ۰/۴۲۹ داشت. کم‌ترین فواصل ژنتیکی به‌دست آمده در این مطالعه به‌ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های ۱۶ (فردوس) و ۱۷ (چناران) به میزان ۰/۱۲۱، ۵ (کردستان) و ۹ (کردستان) به میزان ۰/۱۲۸، ۹ (کردستان) و ۱۹ (کردستان) به میزان ۰/۱۵۷ و ۷ (کردستان) و ۹ (کردستان) به میزان ۰/۱۵۸ بود. در مطالعه حسنی و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده شد که درصد تشابه ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه از ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ با متوسط ۰/۵۹ متغیر بود. RasouliAzar et al. (2019) در مطالعه‌ای با استفاده از تجزیه خوشه‌ای نشان دادند که نشانگرهای ISSR به خوبی می‌توانند روابط واقعی بین لاین‌هایی با تنوع ژنتیکی اندک را نشان دهند و به وضوح نمونه‌های مورد بررسی را بر اساس نسبت فیلوژنتیکی آن‌ها جدا کند. با این حال برخی لاین‌های با منشأ جغرافیایی نزدیک در یک گروه قرار نگرفتند که می‌توان این موضوع را به فرآیندهای به‌نژادی که در نهایت منجر به تولید این لاین‌ها شده ارتباط داد. در پژوهشی Ibrahim & Erdnic (2020) از

ماتریس شباهت برای مقایسه تنوع ژنتیکی بین ۳۲ اکوتیپ مورد مطالعه با استفاده از نشانگر ISSR استفاده نمودند. بر طبق گزارش آن‌ها ضرایب تشابه جاکارد بر اساس ۱۵ آغازگر مورد استفاده بین ۰/۲۶۱ تا ۰/۹۴۱، کم‌ترین فاصله ژنتیکی ۰/۲۶۱ و ۰/۲۶۹ و بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۹۴۱، ۰/۹۳۳ و ۰/۹۳۰ بود. بر این اساس اکوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار گروه اصلی قرار گرفتند که سه گروه تنها شامل ۴ اکوتیپ و گروه دیگر شامل ۲۸ اکوتیپ با چندین زیرگروه مختلف بود. در مرحله بعد ساختار جمعیت داده‌های حاصل از آغازگرهای ISSR با استفاده از نرم افزار STRUCTURE بررسی شد که نشان از وجود هشت گروه مجزا در بین اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد بررسی داشت. تعداد گروه‌های به‌دست آمده نشان دهنده وجود اختلاف و تمایز ژنتیکی بالا بین اکوتیپ‌های مورد بررسی است. در این راستا در گروه اول اکوتیپ شماره ۱۲ (کردستان)، در گروه دوم اکوتیپ‌های شماره ۹ (کردستان)، ۱۹ (کردستان)، ۱۸ (زابل)، ۷ (کردستان)، ۵ (کردستان)، ۲۰ (IPK)، ۴ (اصفهان) و ۱ (گلستان)، در گروه سوم اکوتیپ شماره ۱۱ (کردستان)، در گروه چهارم اکوتیپ‌های شماره ۱۳ (کردستان)، ۱۵ (خراسان) و ۳ (گلستان)، در گروه پنجم اکوتیپ شماره ۱۰ (کردستان)، در گروه ششم اکوتیپ شماره ۱۴ (کردستان)، در گروه هفتم اکوتیپ‌های شماره ۱۷ (چناران)، ۱۶ (فردوس)، ۶ (همدان) و ۸ (گناباد) و در گروه هشتم اکوتیپ شماره ۲ (کردستان) قرار گرفتند. اکوتیپ شماره ۱۲ (کردستان) در این تجزیه نیز بسیار متمایز از سایر اکوتیپ‌های مورد بررسی بود. یک جمعیت می‌تواند از لحاظ ساختار ژنتیکی که ناشی از تفاوت فراوانی آللی است به زیر گروه‌های مختلف تقسیم شود. گروه‌بندی بر اساس ساختار جمعیت نتایج متفاوت از تجزیه خوشه‌ای خواهد داشت. چون اساس و نحوه گروه‌بندی در تجزیه خوشه‌ای منطبق بر ماتریس شباهت یا فاصله متفاوت از هم می‌باشد. نکته‌ای که باید در نظر داشت این است که اگر بدون شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، تجزیه ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات انجام گیرد منجر به شناسایی روابط کاذب بین نشانگر و QTL خواهد شد. از این رو تعیین ساختار ژنتیکی در جمعیت‌ها و مجموعه ژرم‌پلاسم‌ها از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد (Falush et al., 2007). لذا از نتایج حاصل می‌توان به‌عنوان اطلاعات مورد نیاز قبل از انجام تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی با استفاده از این مجموعه ژرم‌پلاسم سیاهدانه استفاده نمود تا از شناسایی بخشی از پیوستگی‌های کاذب که ممکن است به خاطر تفاوت در ساختار جمعیت باشد ممانعت به عمل آید. در پژوهشی Mehri et al. (2018) نیز در تحقیقی اقدام به بررسی ساختار جمعیت ۲۸ اکوتیپ سیاهدانه متعلق به نواحی جغرافیایی متفاوت نمودند. در این بررسی ΔK به‌دست آمده نشان از وجود دو جمعیت متفاوت در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی داشت. بر این اساس اکوتیپ‌های اردبیل-۳، کرج، همدان، اردبیل-۱، مشهد-۱، لردگان، نیشابور، قزوین، سمیرم، مریوان، تربت حیدریه، شیراز، کاشان، کاشمر، لرستان، پیرانشهر، املش، میاندواب و کردستان در گروه اول و اکوتیپ‌های تاکستان، اصفهان-۲، اراک، اردبیل-۲ و مشهد-۲ به گروه دوم منتسب شدند. اکوتیپ‌های اهواز، بروجن، اصفهان-۱ و سربیشه جزء اکوتیپ‌های مخلوط شناخته شدند. استفاده از روش‌های مختلف برای گروه‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه و هم‌چنین نشانگرهای مختلفی که قادر به پوشش کامل ژنوم مورد بررسی هستند به احتمال فراوان این امکان را پیش روی ما قرار می‌دهد تا بتوانیم به اطلاعات ارزشمندی در راستای تمایز نمونه‌های مختلف مورد بررسی دست پیدا کنیم. با این حال وجود تلاقی‌های بین گونه‌ای و فشار انتخاب در فعالیت‌های به‌نژادی بایستی همواره مورد توجه قرار بگیرد. تجزیه به مختصات اصلی نیز منطبق با نتایج به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار جمعیت بود. اکوتیپ‌های دارای فاصله ژنتیکی کم نسبت به یکدیگر (نزدیک به هم) در تجزیه خوشه‌ای که در یک گروه قرار گرفته بودند، در نمودار تجزیه به مختصات اصلی نیز نزدیک همدیگر قرار گرفتند. هم‌چنین توزیع اکوتیپ‌های سیاهدانه در تجزیه ساختار جمعیت انطباق بالایی با نتایج تجزیه به مختصات اصلی داشت. همانطور که

در شکل ۴ ملاحظه می‌شود، اکوتیپ‌های شماره ۱۲ (کردستان)، ۱۱ (کردستان)، ۹ (کردستان) و ۱۰ (کردستان) در چهار ناحیه مختلف ترسیم شده در نمودار بای‌پلات تجزیه به مختصات اصلی قرار گرفتند که با مراجعه به تجزیه ساختار جمعیت مشخص می‌شود که این اکوتیپ‌ها به‌ترتیب دارای رنگ‌های قرمز، آبی پر رنگ، سبز و صورتی بوده و به‌طور کامل توسط این تجزیه به واسطه ساختار ژنومی از هم تفکیک شده‌اند. هم‌چنین اکوتیپ‌های ۹ (کردستان)، ۱۹ (کردستان)، ۲۰ (IPK)، ۱۸ (زابل)، ۷ (کردستان)، ۵ (کردستان)، ۴ (اصفهان) و ۱ (گلستان) که در تجزیه ساختار جمعیت در یک گروه (به رنگ سبز) قرار گرفته بودند، در نمودار بای‌پلات تجزیه به مختصات اصلی به صورت متمرکز در یک ناحیه قرار گرفتند. اکوتیپ‌های شماره ۱۷ (چناران)، ۱۶ (فردوس)، ۶ (همدان) و ۸ (گناباد) نیز در ناحیه سمت چپ و پایین در کنار یکدیگر قرار گرفتند که در تجزیه ساختار جمعیت با ژنوم غالب زرد تیره رنگ از سایر نمونه‌های سیاهدانه تفکیک شده بودند. اکوتیپ شماره ۳ (گلستان) در تجزیه ساختار جمعیت به صورت مخلوط (نمونه‌ای که دارای ترکیبی گوناگون از ساختار ژنتیکی می‌باشد) تفکیک شده بود که در نمودار بای‌پلات به‌دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی بینابین سایر دسته‌ها قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های سیاهدانه مورد مطالعه از نظر خصوصیات مولکولی مشاهده شد. بر این اساس اکوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای اطلاعات مستخرج از آغازگرهای مولکولی به سه گروه تقسیم شدند. با توجه به وجود تنوع بالا بین اکوتیپ‌ها می‌توان انتظار داشت که بتوان از آنها در برنامه‌های به‌نژادی آتی استفاده نمود. هم‌چنین با توجه به قدرت تفکیک بالای آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای نشان دادن تنوع اکوتیپ‌های سیاهدانه می‌توان این آغازگرها را جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سیاهدانه توصیه نمود.

منابع

قره‌یاضی بهزاد، بنت جان، کوش گوردیو اس (۱۳۷۵) کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات اصفهان، صفحه ۲۰-۲۵.

مهری نرگس، محب‌الدینی مهدی، بهنامیان مهدی (۱۳۹۷) بررسی تنوع مورفولوژیکی توده‌های سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) با استفاده از روشهای آماری چند متغیره. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۰(۲۶)، ۳۲-۴۲.

شازده احمدی مرضیه، خرازی مهین (۱۳۹۴) استفاده از نشانگر مولکولی ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های توتون. مجله پژوهش‌های ژنتیک گیاهی ۲ (۲)، ۳۳-۴۶.

رحمانی نوشین، حدادی‌نژاد مهدی، فنایی حمید رضا، باقری نادعلی (۱۴۰۱) بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی گیاه سیاهدانه (*Nigella Sativa* L) با استفاده از نشانگر ISSR. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی باغبانی گرایش گیاهان دارویی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۸۱ صفحه.

رسولی آذر سیامک، صیدی مهدی، فاضلی آرش، محمدی یحیی (۱۳۸۹) بکارگیری نشانگر مولکولی ISSR در شناسایی لاین‌های متنوع گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) برای دورگ گیری. ژنتیک نوین ۱۴(۳)، ۲۷۳-۲۷۷.

References

Al-Huqail, A., & Al-Saad, F. (2010) DNA fingerprinting and genotyping of four black seed (*Nigella sativa* L.) Taxa. *King Abdulaziz University: Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture*, 142(574), 1–31. https://doi.org/10.4197/Met. 21-1.7

Avramidis, N., Kourounakis, A., Hadjipetrou, L., & Senchuk, V. (1998) Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. *Arzneimittel Forschung*, 48(7), 764-71. PMID: 9706378.

Bokaei, A.S., Sofalian, O., Sorkhilalehloo, B., Asghari, A., & Pour-Aboghadareh, A. (2024) Investigation of genetic diversity and study of population structure in Aegilops species with U genome by CBDP markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16 (2), 69-90. https://doi.org/10.22103/jab.2024.22506.1524

Bokaei, A.S., Sofalian, O., Sorkhilalehloo, B., Asghari, A., & Pour-Aboghadareh, A. (2025) Revealing molecular variability and population structure analysis in Iranian wheat germplasm using CAAT-box derived polymorphism (CBDP) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Volume 72, pages 6845–685916 (2), 69-90. https://doi.org/10.1007/s10722-025-02363-6

D'antuono, F.L., Moretti, A., & Lovato, F.S.A. (2002) Seed yield, components, oil content and essential oil content and composition of Nigella sativa L. and *Nigella damascene* L. *Industrial Crops and Products*, 15, 59-69. https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00096-6

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14, 2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Falush, S., Stephens, M., & Pritchard, J.K. (2007) Inference of population STRUCTURE using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x

Foolad, M.R. (2012) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 1(52), 1-121. https://doi.org/10.1155/2007/64358

Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Ruhnke, M., & Morschhauser, J. (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical Candida albicans strains. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42, 3065–3072. https://doi.org/10.1128/aac.42.12.3065

Ibrahim, A.S., & Erdinc, C. (2020) Determination of genetic relations among Tomato accessions in Sulaymaniyah region throught ISSRs markers genetic relations in Tomato accessions. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Science*, 30(4), 31-12. https://doi.org/10.29133/yyutbd.755083

Iqbal, M.S., Sharif Qureshi, A., & Ghafoor, A. (2010) Evaluation of *Nigella sativa* L. for genetic variation and ex-situ conservation. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 42(4), 2489-2495.

Kapital, B., Feyissa, T., Petros, Y., Mohammed, S., Oumer, A., Yohannes, P., Kassahun, T., Abel, T., & Endashaw, B. (2015) Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.)

from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 18, 1543-1551. https://doi.org/10.5897/AJB2015.14567

Lemos, S.C.M., Lia Rejane Silveira, R., Karol Buuron, S., Silvia Machado dos Santos, R., Charlene Moro, S., (2019) Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. *Gene*, https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., & Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis Species, *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13. https://doi.org/10.1007/BF02668658

Luz, G.C., Strioto, D.K., Mangolin, C.A., & Machado, M.F.P.S. (2020) ISSR markers to assess genetic diversity of cultivated populations from artificial selection of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Breeding Science*, 70(4), 508-514. https://doi.org/10.1270/jsbbs.20014

Mehri, M., Mohebodini, M., Behnamian, M., & Farmanpour-Kalalagh, K. (2022) Phylogenetic, Genetic Diversity, and Population Structure Analysis of Iranian Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Genotypes Using ISSR Molecular Markers. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(2), 151-163. https://doi.org/10.22059/IJHST.2021.311894.402

Mehri, N., Mohebodini, M., & Behnamian, M. (2018) Morphological Diversity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Accessions using Multivariate Analysis Methods. *Journal of Crop Breeding*, 10(26), 32-42. https://doi.org/10.29252/jcb.10.26.32 (In Persian)

Mirzaei, K., & Mirzaghaderi, G. (2016) Genetic diversity analysis of Iranian Nigella sativa L. landraces using SCOT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. *Plant Genetic Resources*, (In Press) https://doi.org/10.1017/S1479262115000386

Pank, F. (2007) Breeding of medicinal plants. In: medicinal plant biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications, 417- 447.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238. https://doi.org/10.1007/BF00564200

Qarayazi, B., Bennett, J., & Kosh, G.S. (1996) Application of DNA markers in plant breeding. 4th Congress of Agriculture and Plant Breeding, Isfahan, 20-25. (In Persian)

Rahmani, N., Hadadinejad, M., Fanaei, H.R., & Bagheri, N.A. (2023) Investigation of morphological and molecular diversity of some cultivars and ecotypes of Black cumin (*Nigella sativa*) via ISSR marker. A Thesis Submitted for Degree of Master of Science in Horticultural Sciences. Pp. 81.

RasouliAzar, S., Seydi, M., Mohammadi, Y., Fazeli, A. (2019) Utilization of ISSR Molecular Markers in Identification of Diverse Tomato (*Solanum lycopersicum*) Lines for Hybridization. *MGj*, 14(3), 275-279. URL: http://mg.genetics.ir/article-1-124-fa.html (In Persian).

Ren, N., & Timko, M.P. (2001) AFLP Analysis of Genetic Polymorphism and Evolutionary Relationships among Cultivated and Wild Nicotiana Species. *Genome*, 44, 559-571. https://doi.org/10.1139/g01-060

Shazdehahmadi, M., & Kharrazi, M. (2016) Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes. *Plant Genetic Research*, 2(2), 33-46. URL: http://pgr.lu.ac.ir/article-1-46-fa.html (In Persian)

Yang, M., Abdalrahman, H., Sonia, U., Mohammed, A.I., Vestine, U., Wang, M., Ebadi, A.G., & Toughani, M. (2020) The application of DNA molecular markers in the study of *Codonopsis* species genetic variation, a review. *Cellular and Molecular Biology*, 66(2), 23–30. https://doi.org/10.14715/cmb/2020.66.2.3.

Zheleva, D., Todorovska, E., Christov, N., Ivanov, P., Ivanova, I., & Todorov, I. (2007). Assessing the Genetic Variation of Bulgarian Bread Wheat Varieties by Biochemical and Molecular Markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(3), 311–321. https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817466