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

Investigating Genetic and Phytochemical Diversity of Cumin Ecotypes Cultivated in Different Rangelands of Yazd Province

Samira Hossein Jafari

Post-doctoral researcher, Faculty of Natural Resources and Desert Study, Yazd University, Yazd, Iran. Email: Samirahosseinjafari@yahoo.com.

Amir Saadatfar*

* Corresponding author, Assistant Professor, Department of Medicinal Plant, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: 09133428816. Email: saadatfar.amir@uk.ac.ir.

Afsaneh Mohkami

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: amohkami@uk.ac.ir.

Ali Akbar Karimian

Associate Professor, Faculty of Natural Resources and Desert Study, Yazd University, Yazd, Iran. Email: akarimian@yazd.ac.ir.

Abstract

Objective

According to economic value of cumin (*Cuminum cyminum*) medicinal plant, it is essential to do its genetic and phytochemical assessment to conserve genetic sources and achieve better quality of essential oil in breeding programs. This study purpose is to investigate genetic and phytochemical diversity of different cumin ecotypes in Yazd province.

Materials and methods

To study genetic diversity using 10 ISSR markers, cumin plants DNA extraction of four habitats, was done using CTAB method. The quantity and quality of DNA were determined using spectrophotometer and electrophoresis. Clear Bands resulting from

electrophoresis of PCR products on 1.5% agarose gel were scored. To investigate phytochemical diversity using GC-MS method, essential oil from cumin seeds was extracted via water steam distillation method.

Results

The results showed that ISSR-14 and ISSR-13 primers had higher amount of PIC (0.39 and 0.38) and MI (13.3 and 12.48) and number of bands (35 and 32). Cluster analysis using Jacquard's coefficient and UPGMA method, grouped four populations into 8 groups. PCA analysis showed three components explained 57.17% of total variance. The results of this analysis correspond with cluster analysis and match with the geographical regions. Analysis of molecular variance showed genetic variation within and among populations 93% and 7% of total variation, respectively. On the basis of GC-MS results, Propanal, Benzenmethanol, 1-phenyl-1-butanol, γ-terpinene, β-Pinene and P-cymene compounds were identified as the main compounds. Cluster analysis of samples on the basis of phytochemical parameters put Taft, Mehriz and Ardakan habitats in one group and Bahabad habitat in another group so that it doesn't correspond with geographical distance.

Conclusions

Based the results, it can be concluded that there is high potential of diversity among cumin ecotypes. ISSR application in assessing genetic diversity of the ecotypes was successful. Grouping on the basis of phytochemical compounds didn't correspond with genetic grouping.

Keywords: Cluster analysis, Genetic diversity, ISSR marker, Medicinal plant, Phytochemistry

Citation: Hossein Jafari S, Saadatfar A, Mohkami A**,** Karimian A.A (2019) Investigating Genetic and Phytochemical Diversity of Cumin Ecotypes Cultivated in Different Rangelands of Yazd Province. Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 51-66.

Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 51-66.

DOI: 10.22103/jab.2019.14682.1167

Received: October 30, 2019; Accepted: December 5, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های زیره سبز کشت‌شده در مراتع مختلف استان یزد

سمیرا حسین‌جعفری

پژوهشگر پسادکتری، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
ایمیل: Samirahosseinjafari@yahoo.com.

امیر سعادت فر

* نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهیدباهنر کرمان، کرمان، ایران.
تلفن: 09133428816. ایمیل: saadatfar.amir@uk.ac.ir.

افسانه محکمی

استادیار، گروه به‌نژادی و زیست فناوری گیاهی، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهیدباهنر کرمان، کرمان، ایران.
ایمیل: amohkami@uk.ac.ir.

علی اکبر کریمیان

دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران. ایمیل: akarimian@yazd.ac.ir.

تاریخ دریافت: 1397/08/08، تاریخ پذیرش: 1398/09/14

چکیده

هدف: با توجه به ارزش اقتصادی گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، ارزیابی ژنتیکی و فیتوشیمیایی آن بمنظور نگهداری منابع ژنتیکی و دستیابی به عملکرد و کیفیت برتر اسانس، در برنامه‌های اصلاح نژاد امری حیاتی است. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های مختلف زیره سبز در استان یزد می‌باشد.

مواد و روش‌ها: جهت بررسی تنوع ژنتیکی با 10 آغازگر ISSR، استخراج DNA از گیاهان زیره سبز چهار رویشگاه به روش CTAB انجام شد. کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز تعیین شد. باندهای واضح حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد، امتیازدهی شدند. جهت بررسی تنوع فیتوشیمیایی با روش GC-MS، اسانس-گیری به روش تقطیر با آب از زیره سبز انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که آغازگرهای ISSR-14 وISSR-13 بالاترین میزان PIC (0/39و 0/38)، MI (13/3 و 12/48) و تعداد باند (35 و 32) را دارا بودند. آنالیز خوشه‌ای با ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA، چهار اکوتیپ را در هشت گروه

طبقه‌بندی کرد. در آنالیز تجزیه به مختصات اصلی،57/17% از واریانس کل توسط سه مؤلفه بیان شد. نتایج این آنالیز با تجزیه خوشه‌ای و با پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها همخوانی داشت. آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون و بین جمعیتی را به ترتیب 93 و 7 درصد از کل تنوع نشان داد. براساس نتایج GC-MS، ترکیبات Propanal، Benzenemethanol، 1-phenyl-1-butanol، γ-terpinene، β-Pinene و P-cymene به عنوان ترکیبات عمده اسانس شناسایی شدند. تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها براساس پارامترهای فیتوشیمیایی، رویشگاه‌های تفت، مهریز و اردکان را در یک گروه و رویشگاه بهاباد را در گروه دیگر قرار داد که با فاصله جغرافیایی مطابقت نداشت.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌ها مشخص گردید که پتانسیل بالایی از تنوع در اکوتیپ‌های زیره سبز استان یزد وجود دارد. استفاده از نشانگر ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره موفقیت‌آمیز بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای براساس ترکیبات فیتوشیمیایی با خوشه‌بندی ژنتیکی همخوانی نداشت.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، فیتوشیمی، گیاه دارویی، نشانگر ISSR

مقدمه

زیره سبز گیاهی علفی و یکساله متعلق به تیره چتریان، یکی از مهمترین گیاهان دارویی اهلی در ایران بوده و در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی کاربرد گسترده‌ای دارد (Ebrahimiyan et al. 2017). این گیاه قدمت زیادی داشته و از زمان باستان در هند و مصر مورد استفاده قرار گرفته است (Mulpuri et al. 2013). زیره سبز بومی مناطق مرکزی و جنوب آسیا بوده و در چند کشور از جمله هند، پاکستان، ترکیه، ایران و اسپانیا کشت می‌شود (Bahraminejad et al. 2011). این گیاه مقاوم به خشکی بوده بنابراین کشت آن بویژه در مناطق خشک از نظر اقتصادی بصرفه است. در زیره سبز 7/7 درصد روغن، 13/5 درصد رزین، 8 درصد صمغ و موسیلاژ و 15/5 درصد پروتئین یافت می‌شود (Haghiroalsadat et al. 2015). این ادویه منبع مهمی از آهن، مس، کلسیم، پتاسیم، منگنز، روی، منیزیم و دارای ویتامین‌های A، B، C و E است. زیره سبز ضد نفخ، هضم‌کننده و ادرارآور بوده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Parashar & Malik 2014).

براساس گزارش‌های موجود، عملکرد گیاهان در اکوسیستم‌های مختلف تحت تأثیر عواملی مانند اکوتیپ‌های مختلف، نوع گونه، اقلیم، خاک، مشخصات جغرافیایی و عوامل ژنتیکی قرار دارد که هریک از این عوامل می‌تواند تأثیر بسزایی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه داشته باشد (Eskandari & Kazemi 2010). در برنامه‌های اصلاحی هدف اصلی حفاظت ژنتیکی گونه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌باشد (Barrandeguy & Garcia 2014). استفاده از نشانگرهای مولکولی روشی مناسب جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی و حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاهان دارویی است (Dk et al. 2016). از معیارهای اولیه برای انتخاب نشانگرهای مولکولی هزینه، ابزار و نیازهای تکنیکی، تعداد نشانگر و میزان اطلاعات حاصل از آن است (Zabet et al. 2019). نشانگر

مولکولی ISSR یک روش مبتنی بر PCR، سریع، قابل اعتماد و کم‌هزینه برای ارزیابی روابط خویشاوندی گیاهان است و دارای ویژگی‌هایی از قبیل چندمکانی بودن، چندشکلی نسبتاً بالا و عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر است (Hossein Jafari et al. 2018).

بطور کلی داشتن تنوع در نمونه‌های گیاهان دارویی، از اهمیت خاصی برخوردار است. ارزیابی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی گونه‌های گیاهی بویژه اکوتیپ‌های مختلف و ترکیبات موجود در آنها، بمنظور نگهداری منابع ژنتیکی و دستیابی به عملکرد و کیفیت برتر اسانس، در برنامه‌های اصلاح نژاد امری حیاتی است (Moghaddam & Farhadi 2015). چنین تحقیقاتی در مورد گیاهان متعلق به تیره چتریان از قبیل زیره سبز به دلیل کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف، بسیار حائز اهمیت است. در مورد تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی گیاهان تیره چتریان با استفاده از نشانگرهای مولکولی و روش GC/MS آنها تحقیقاتی صورت گرفته است. برای مثال در ارزیابی 49 اکوتیپ زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از 9 استان مختلف با استفاده از نشانگر RAPD مشخص شده است که براساس تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها در دو گروه قرار گرفته‌اند، در حالی که آنالیز تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌های زیره سبز را به پنج طبقه گروه‌بندی کرده که با آنالیز خوشه‌ای مطابقت نداشت (Bahraminejad et al. 2012). در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه زیره سبز مشخص شده است که از 39 پرایمر استفاده شده، 27 پرایمر چندشکل بودند. چندشکل بودن با پرایمر UBC873 ماکسیمم بوده (88/88 درصد) و با پرایمر UBC817 مینیمم بوده است (18/18 درصد) (Parashar & Malik 2014). در ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های زیره سبز در ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD، تجزیه خوشه‌ای مربوط به هرکدام از آغازگرها، جمعیت‌های زیره سبز را در سه گروه طبقه‌بندی کرده است. در این مطالعه مشاهده شد که جمعیت‌ها از لحاظ موقعیت جغرافیایی نیز از یکدیگر تفکیک شده‌اند. همچنین نتایج تجزیه واریانس مولکولی حاکی از تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در جمعیت‌های این گونه بود (Janipour et al. 2018). در پژوهشی تنوع ژنتیکی 20 اکوتیپ زیره سبز در استان خراسان با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مورد ارزیابی قرار گرفته است. تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه اکوتیپ‌ها را به ترتیب در هفت و شش خوشه گروه‌بندی نمود. بین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه و موقعیت جغرافیایی در بیشتر موارد ارتباط وجود داشت (Zabet et al. 2019). در رابطه با بررسی ترکیبات مؤثره زیره سبز در استان یزد مشخص شده است که مواد عمده تشکیل‌دهنده اسانس بذر زیره سبز Propanal (26/9 درصد)، Benzenemethanol (25/4 درصد)، 1-phenyl-1-butanol (16/49 درصد) و γ-terpinene (13/04 درصد) می‌باشد (Haghiroalsadat et al. 2015). بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سبز در استان کرمان نشان داده که عمده‌ترین ترکیب اسانس زیره سبز، cuminaldehyde با میزان 29/02 درصد است (Mahmoudi et al. 2012).

با توجه به ارزش اقتصادی زیره سبز، مطالعات بیوشیمیایی و اصلاحی آن از اهمیت زیادی برخوردار است که پایه و اساس آنها بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی این گونه باارزش می‌باشد. با توجه به پژوهش‌های قبلی در مورد زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، تاکنون در رابطه با تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های این گیاه در استان یزد مطالعه‌ای انجام نشده است و نیز

با توجه به این که استفاده از نشانگرهای ISSR نیازی به اطلاعات توالی ژنوم ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چندجایگاهی و بسیار چندشکل می‌شود (Askari *et al*. 2010؛ Ghasemi *et al*. 2010؛ Askari *et al*. 2011؛ Zamani *et al*. 2011؛ Zamani *et al*. 2015؛ Bahador et al. 2016؛ Mohammadabadi et al. 2017)، لذا هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی، ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس، مقایسه دندروگرام‌های حاصل از ارزیابی ژنتیکی و ترکیبات شیمیایی اکوتیپ‌های این گیاه در استان یزد و تعیین مؤثرترین نشانگر ISSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

زیره سبز در مراتع مختلف استان یزد بصورت کشت‌شده وجود دارد. در واقع سال‌ها پیش جهت انجام عملیات احیا، بذرپاشی گیاه مذکور در برخی مناطق استان، کشت این گیاه صورت گرفت که تنها در چهار منطقه از این مناطق، این گیاه به خوبی استقرار و تکثیر یافته است. هرچند در چند منطقه دیگر نیز بطور پراکنده و اندک مشاهده می‌شود. بنابراین جهت انجام این مطالعه از چهار منطقه مذکور نمونه‌برداری صورت گرفت که مشخصات این مناطق در جدول 1 ذکر شده است.

جدول 1. مکان جمع‌آوری و خصوصیات جغرافیایی اکوتیپ‌های زیره سبز (*Cuminum Cyminum*)

Table 1. Collection site and geographical characteristics of *Cuminum cyminum* ecotypes

اکوتیپ‌ها Ecotypes	منطقه نمونه‌برداری Sampling Region	مختصات جغرافیایی Geographical coordinate	متوسط ارتفاع (m) Average altitude (m)	بارندگی (mm) Precipitation (mm)
یزد Yazd	اردکان (A) Ardakan (A)	32˚ 24' N, 54˚ 38' E	2400	150
	بهاباد (B) Bahabad (B)	31˚ 49' N, 55˚ 54' E	2200	220
	مهریز (M) Mehriz (M)	31˚ 22' N, 54˚ 19' E	2300	200
	تفت (T) Taft (T)	31˚ 34' N, 54˚ 10' E	2350	230

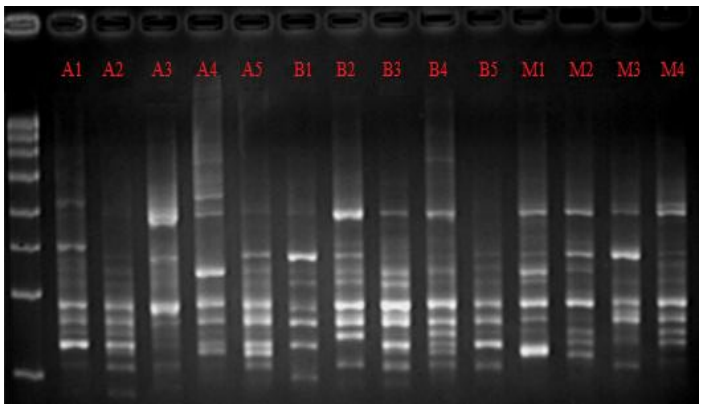
جهت بررسی تنوع ژنتیکی، نمونه‌برداری از گیاهان زیره سبز متعلق به چهار رویشگاه انجام گردید، بطوری که 5 نمونه بطور کاملاً تصادفی از هر رویشگاه برداشت شد (در مجموع 20 نمونه) و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت. استخراج DNA از نمونه برگ‌های تازه زیره سبز به روش CTAB در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهیدباهنر کرمان انجام شد. کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومترتعیین شد و رقیق سازی لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت

استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. کیفیت DNA استخراج شده نیز با استفاده از الکتروفورز (مدل Midi HU-10 زیماژن) با ژل آگارز 1/5 درصد تعیین شد. در این مطالعه از 10 آغازگر ISSR با مشخصات ارائه شده در جدول 2 تهیه شده از شرکت سیناکلون استفاده گردید. هر مخلوط واکنش PCR، شامل 6/5 µl DNA با غلظت 10 ng/µl، 1 µl آغازگر ISSR 10 Pmol/µl و 7/5 µl مستر میکس 2X (شرکت Amplicon) بود. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از برنامه کند شونده بدین صورت انجام گرفت: واسرشت اول DNA در دمای 94°C (به مدت 2 دقیقه) انجام شد. 35 سیکل دمای 94°C (به مدت 30 ثانیه)، 55°C (به مدت 1 ثانیه)، کاهش دما تا 52°C با سرعت 0/5 درجه در ثانیه، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای در دمای اتصال بهینه آغازگر (کاهش دما تا 52°C (به مدت 45 ثانیه)، بسط آغازگر در دمای 72°C (به مدت 1 دقیقه و 30 ثانیه)، تکمیل بسط در دمای 72°C (به مدت 20 دقیقه) انجام شد. باندهای واضح و دقیق حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد، برحسب وجود (1) یا عدم وجود (0) امتیازدهی شدند. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزارهای NTSYSpc ، GeneAlex و Pop Gene انجام شد.

بمنظور بررسی پارامترهای فیتوشیمیایی، جمع‌آوری بذرهای زیره سبز نیز از گیاهان یکسان همزمان با نمونه‌برداری جهت بررسی تنوع ژنتیکی، صورت گرفت. پس از خشک کردن بذرها در سایه، میزان 150 گرم از آنها پودر شده و جهت اسانس‌گیری آماده شدند. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر به مدت چهار ساعت انجام شد. اسانس حاصل با سولفات سدیم خشک آبگیری شد. برای آنالیز اسانس از دستگاه کروماتوگراف مدل 6890 کوپل‌شده با طیف‌سنج جرمی مدل 5973N- (شرکت Agilent) استفاده شد. دستگاه GC-MS مجهز به ستون موئین HP-5MS با طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر ، ضخامت لایه‌ی ساکن 0/25 میکرومتر و انرژی یونیزاسیون 70 الکترون‌ولت است. برنامه‌ریزی دمایی در ابتدا دمای آون در دمای 60 درجه سانتی‌گراد شروع و پس از آن با سرعت 3 درجه سانتی‌گراد بردقیقه تا دمای 246 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. شناسایی ترکیبات توسط اندیس بازداری، مقایسه طیف‌ها با اطلاعات کتابخانه دستگاه و طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد (Adams 2007) صورت گرفت. آنالیز خوشه‌ای حاصل از پارامترهای فیتوشیمیایی با روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی در نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی تنوع ژنتیکی بین 4 اکوتیپ زیره سبز در استان یزد، نشان داد که تنوع ژنتیکی معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها وجود دارد. تعداد 10 آغازگر ISSR مورد استفاده در این تحقیق، 198 نوار قابل امتیازدهی ایجاد کردند. نمونه‌ای از الگوی الکتروفورزی حاصل از PCR اکوتیپ‌های زیره سبز با استفاده از آغازگر ISSR-13 در شکل 1 نشان داده شده است.



شکل 1. الگوی باندی تکثیر شده توسط نشانگر ISSR-13

Figure 1. Banding pattern reproduced by ISSR-13 primer

طبق جدول 2، درصد چندشکلی تمام آغازگرها 100% بود. اندازه باندهای ایجاد شده در محدوده 1100-100 جفت باز بود. بالاترین تعداد باند در درجه اول مربوط به آغازگر ISSR-14 (35 باند) و بعد از آن آغازگر ISSR-13 (32 باند) بود. کمترین باند توسط آغازگر ISSR-58 (4 باند) تولید شد. میانگین PIC در این مطالعه 0/33 بود. با توجه به میانگین شاخص مذکور در این مطالعه مشخص می‌شود که آغازگرهای انتخاب شده پراکندگی نسبتاً مناسبی در ژنوم اکوتیپ‌های مورد بررسی داشتند (Nagy et al. 2012). با توجه به میزان شاخص‌های PIC (0/33) و MI (7/33) مشخص گردید که نشانگر ISSR کارایی خوبی در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه زیره سبز دارد. در پژوهش‌های دیگر نیز در رابطه با تنوع ژنتیکی گیاهان تیره چتریان، کارایی خوب این نشانگر گزارش شده است (Bahraminejad et al. 2012; Salami et al. 2017; Hossein Jafari et al. 2018; Zabet et al. 2019). در این تحقیق آغازگر ISSR-14 و بعد از آن ISSR-13 بالاترین میزان PIC (به ترتیب با میزان 0/39و 0/38)، MI (به ترتیب با میزان 13/3 و 12/48) و تعداد باند را دارا بودند. بنابراین می‌توان آغازگرهای ISSR-14 و ISSR-13 را بعنوان مناسب‌ترین آغازگرهای ISSR برای مطالعات بعدی در زمینه تنوع ژنتیکی و تکاملی اکوتیپ‌های زیره سبز پیشنهاد کرد. تجزیه خوشه‌ای برای چهار اکوتیپ مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA[1]، با ضریب کوفنتیک r= 0/70 انجام شد. نمودار خوشه‌ای در این تحقیق، دارای ضریب کوفنتیک 0/70 بود که نشان‌دهنده برازش خوب می‌باشد. بنابراین دندروگرام مربوط به آن ترسیم شد (شکل 1). طبق شکل2، آنالیز خوشه‌ای، چهار اکوتیپ زیره سبز را در 8 گروه طبقه‌بندی کرد که چهار گروه آن تک‌عضو بودند. 3 گروه تک‌عضو همه مربوط به منطقه بهاباد و یک گروه تک عضو آن مربوط به منطقه مهریز بود. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در درون اکوتیپ‌ها می‌باشد (Hossein Jafari et al. 2018).

[1] Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average

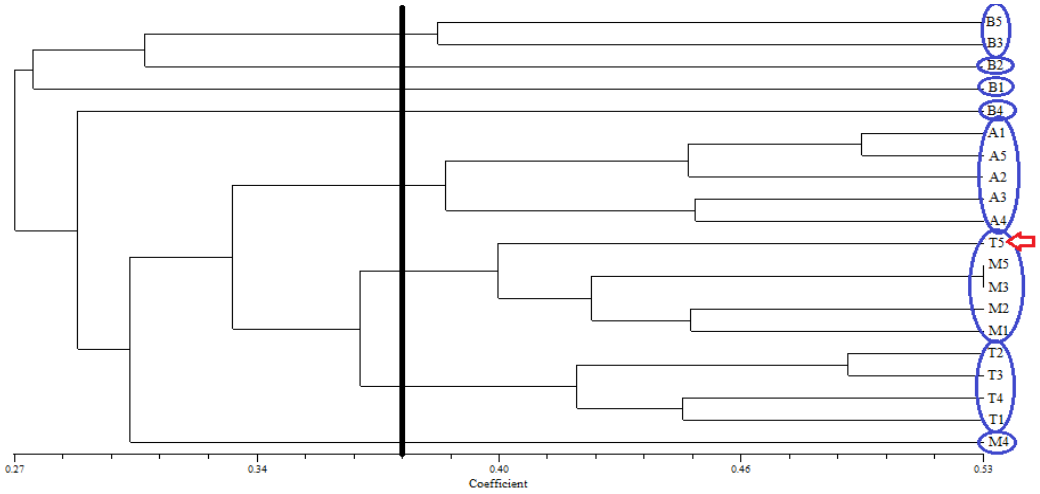
جدول2. مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده جهت بررسی تنوع ژنتیکی زیره سبز

Table 2. Characteristics of ISSR Primers used to assay genetic diversity of Cumin

شاخص نشانگری MI	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	نسبت باندهای چندشکل Polymorphic Bands	دمای اتصال بهینه شده (°C) Temperature	توالی (3′→5′) Sequence	نام آغازگر Primer Name
4.6	0.23	20/20 (100%)	51.8	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR-12
12.48	0.39	32/32 (100%)	51.8	AGAGAGAGAGAGAGAGG	ISSR-13
13.3	0.38	35/35 (100%)	51.8	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR-14
6.72	0.28	24/24 (100%)	51.8	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR-15
5.28	0.24	22/22 (100%)	51.8	CACACACACACACACAG	ISSR-21
1.02	0.17	6/6 (100%)	51.8	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR-53
10.15	0.35	29/29 (100%)	51.8	GAGAGAGAGAGAGAGAG	ISSR-55
2.64	0.24	11/11 (100%)	51.8	CACACACACACACACAT	ISSR-57
0.68	0.17	4/4 (100%)	47.6	GACAGACAGACAGACA	ISSR-58
1.76	0.22	8/8 (100%)	51.8	GAGAGAGAGAGAGAGAA	ISSR-59

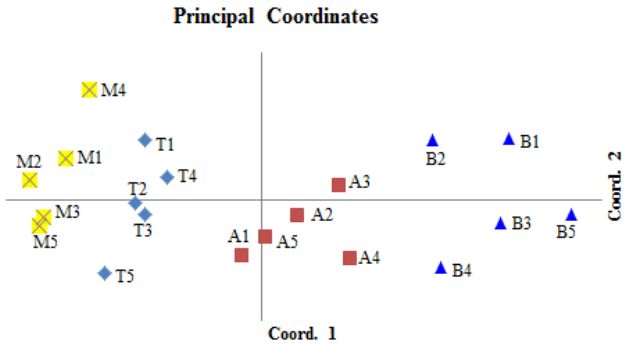
با توجه به دندروگرام، افراد متعلق به هر اکوتیپ و هر منطقه جغرافیایی در خوشه‌های جداگانه قرار گرفته‌اند. تنها در یک مورد که یک عضو از اکوتیپ تفت در خوشه مربوط به اکوتیپ مهریز قرار گرفت. این مسأله می‌تواند بیانگر قرابت ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مربوط به این اکوتیپ‌ها باشد، البته در زیرخوشه‌ها این عضو از اعضای مربوط به اکوتیپ مهریز جدا می‌شود. این گروه-بندی با محدوده پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها انطباق دارد. این امر می‌تواند به دلیل اثر متقابل محیط و گونه برای محتوای ژنتیکی گیاه باشد. بنابراین گیاهانی که در نقاط مختلف از لحاظ اقلیمی و تحت تنش‌های متفاوت سازگار شوند، مکانیسم‌های سازگاری خود را در محتوای ژنتیکی خود تثبیت کرده و به نسل بعد انتقال می‌دهند. نتایج مشابه در این زمینه توسط برخی محققین دیگر نیز گزارش شده است (Baldemir *et al*., 2017; Janipour *et al*., 2017).

به منظور تجزیه و تحلیل بیشتر اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR، از آنالیز تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد. نتایج نشان داد که مؤلفه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب 21/20%، 19/58% و 16/39% اطلاعات را دربرداشتند (در مجموع 57/17%). همانطور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، اکوتیپ‌های 4 منطقه کاملاً از یکدیگر جدا شده‌اند. اکوتیپ‌های مهریز و تفت در فاصله نزدیک‌تری از هم قرار گرفته‌اند. نتایج این آنالیز با تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشت. محققان در بررسی تنوع ژنتیکی زیره سبز در پژوهش‌های دیگر به نتایج مشابه دست یافتند (Bahraminejad et al. 2012; Zabet et al. 2019). نتایج تجزیه واریانس مولکولی اکوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که براساس آماره φ_{pt} در بین گروه‌ها در سطح 1 درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول 3).



شکل 2. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های زیره سبز براساس نشانگر ISSR

Figure 2. Cluster analysis of Cumin ecotypes based on ISSR markers



شکل 3. نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌های زیره سبز

Figure 3. Two dimensional diagram of principal coordinate analysis for Cumin ecotypes

آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون و بین جمعیتی زیره سبز را به ترتیب 93 و 7 درصد از کل تنوع نشان دادند که بیانگر تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در اکوتیپ‌های زیره سبز استان یزد بوده و این مطلب مؤید نتایج دندروگرام است (جدول 3). علی رغم شرایط اکولوژیک مختلف و فاصله جغرافیایی آنها از یکدیگر، این مسأله می‌تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی درون جمعیت‌های زیره سبز استان یزد باشد. وجود تنوع بالا درون جمعیت در گیاهان دیگر تیره چتریان با نشانگر ISSR گزارش شده است (Salami et al. 2017; Hossein Jafari et al. 2018; Zabet et al. 2019). در مطالعه‌ای از عوامل مؤثر در توجیه تنوع بیشتر درون جمعیت را مواردی از جمله دگرگشن بودن گیاه، یک‌ساله بودن، ازدیاد با بذر، موقعیت اللی، ژنوتیپی و اندازه جمعیت گزارش نموده‌اند (Janipour et al. 2018) که می‌تواند از دلایل افزایش تنوع درون جمعیت‌ها در این تحقیق نیز باشد.

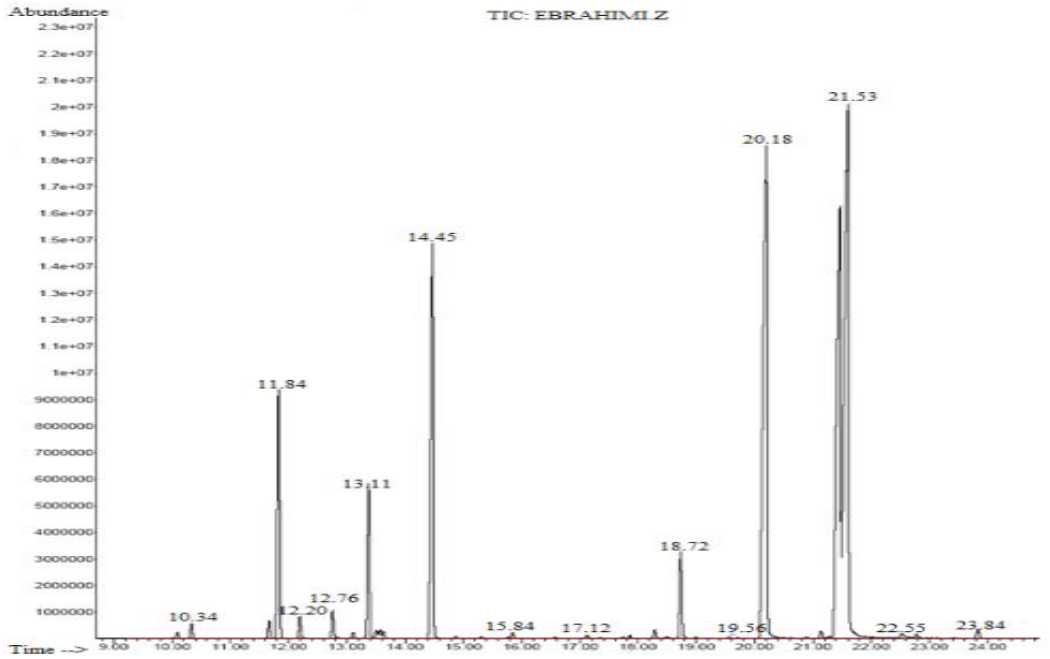
جدول 3. تجزیه واریانس مولکولی بین اکوتیپ‌های زیره سبز

Table 3. Analysis of molecular variance among cumin ecotypes

منبع تغییرات Source of changes	درجه آزادی Degrees of freedom	مجموع مربعات Sum of square	میانگین مربعات Mean of square	% 	φ_{pt}
بین جمعیت‌ها Among Pops	1	63.8	63.8	7	**0.07****
درون جمعیت Within Pops	18	659.8	36.66	93	
کل Total	19	723.6		100	

** معنی‌دار در سطح احتمال 0/01 (**p<0.01)

بازده اسانس بذرهای زیره سبز جمع آوری شده از چهار منطقه در استان یزد در مراتع اردکان و بهاباد هرکدام 2/2% و در مناطق مهریز و تفت هرکدام 2% بدست آمد. در تحقیقی در استان یزد بازده اسانس زیره سبز 2 درصد گزارش شد (Haghiroalsadat et al. 2015). همچنین بازده اسانس زیره سبز در استان کرمان 2/5 درصد بدست آمد (Mahmoudi et al. 2012). این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر تقریباً مشابه است، البته عوامل آب و هوایی و شرایط رویشگاهی نیز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر میزان اسانس دارد (Moghaddam & Farhadi 2015). نمونه‌ای از کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-MS برای زیره سبز در شکل 4 نشان داده شده است. جدول 4، ترکیبات شناسایی‌شده، درصد آنها و شاخص‌های بازداری مربوط به هرکدام از مناطق مورد مطالعه را نشان می‌دهد. از تجزیه اسانس حاصل از دانه‌های زیره، 16 ترکیب در اسانس زیره اردکان، 12 ترکیب در بهاباد و 17 ترکیب در اسانس زیره هرکدام از مناطق مهریز و تفت شناسایی شد. ترکیبات Propanal، Benzenemethanol، 1-phenyl-1-butanol، γ-terpinene، β-Pinene و P-cymene به ترتیب به عنوان ترکیبات عمده و مشترک بین مناطق مورد مطالعه شناسایی شدند. در مطالعه‌ای دیگر در استان یزد نیز همین ترکیبات بعنوان ترکیبات عمده موجود در اسانس زیره سبز گزارش شد (Haghiroalsadat et al. 2015)، اما درصد ترکیبات مذکور و تعداد ترکیبات شناسایی شده با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است. همچنین طبق جدول 4، درصد ترکیبات و تعداد ترکیبات بین اکوتیپ های مورد مطالعه نیز متفاوت می‌باشد. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اکولوژیکی محل رویش گیاه زیره سبز مانند عوامل اقلیمی، ادافیکی و ژنتیکی باشد (Baghizadeh et al., 2018). ترکیباتی از قبیل α-terpinene، Cuminaldehyde، γ-terpinene-7-al و Cis-dihydrocarvone در اسانس زیره سبز بهاباد و ترکیب 1,8- cineole در اسانس زیره سبز اردکان مشاهده نشد.



شکل 4. نمونه‌ای از کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-MS برای زیره سبز

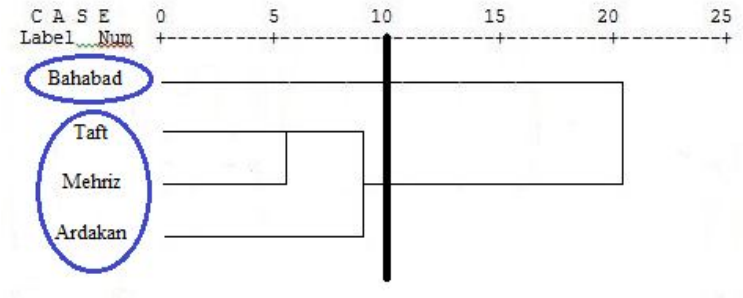
Figure 4. A chromatogram sample of GC-MS analysis for Cumin

نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس زیره سبز نشان داد که چهار اکوتیپ مورد مطالعه، در 2 گروه قرار گرفتند (شکل 5). رویشگاه‌های تفت، مهریز و اردکان از لحاظ ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس در یک گروه و رویشگاه بهاباد به تنهایی در گروه دیگر قرار گرفت. به نظر می‌رسد این امر به دلیل عدم وجود برخی ترکیبات (مانند α-terpinene، Cuminaldehyde، γ-terpinene-7-al و Cis-dihydrocarvone) و یا بیشتر بودن درصد برخی ترکیبات اصلی از قبیل Propanal (25%/89)، Benzenemethanol (25%/11)، 1-phenyl-1-butanol (16%/36) و γ-terpinene (13%/24) در اسانس زیره سبز بهاباد نسبت به رویشگاه‌های دیگر باشد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌بندی براساس ترکیبات اسانس با فاصله جغرافیایی موجود در مناطق مطابقت ندارد. در این تحقیق، نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های ژنتیکی با تجزیه کلاستر داده‌های فیتوشیمیایی همخوانی چندانی نداشت. در پژوهشی Hadian *et al.* (2011) و Baghizadeh *et al.* (2018) نیز در مطالعات خود در مورد بررسی ژنتیکی و فیتوشیمیایی جمعیت‌های گیاه *Nepeta cataria* و *Zataria multiflora* عدم همخوانی خوشه‌بندی ژنتیکی و فیتوشیمیایی را تأیید نمودند.

جدول4. ترکیبات شیمیایی موجود اسانس حاصل از زیره سبز در نقاط مختلف استان یزد

Table 4. Chemical compounds in Cumin essential oil in different regions of Yazd province

درصد ترکیبات موجود در اسانس Compounds percentages in essential oil				شاخص بازداری Retention Index	ترکیبات Compounds	شماره Number
تفت Taft	مهریز Mehriz	بهاباد Bahabad	اردکان Ardakan			
0.76	0.78	0.59	0.59	935	α-Pinene	1
0.65	0.67	0.51	0.63	976	sabinene	2
9.62	9.5	8.18	9.29	979	β-Pinene	3
0.87	0.9	0.72	0.9	988	β-myrcene	4
0.62	0.66	-	0.71	1019	α-terpinene	5
4.52	4.44	5.14	4.69	1026	P-cymene	6
0.32	0.28	-	-	1035	1,8- cineole	7
12.7	12.69	13.24	12.8	1060	γ-terpinene	8
0.9	0.95	0.73	0.9	1086	α-Phellandrene	9
2.8	2.76	2.58	2.9	1231	Pulegone	10
0.25	0.23	-	0.1	1253	Cuminaldehyde	11
24.32	24.4	25.89	24.1	1266	Propanal	12
15.82	15.9	16.36	16.1	1295	1-phenyl-1-butanol	13
0.13	0.15	-	0.19	1298	γ-terpinene-7-al	14
24.4	24.35	25.11	24.7	1299	Benzenemethanol	15
0.22	0.24	-	0.29	1400	Cis-dihydrocarvone	16
0.95	0.92	0.87	0.97	1414	α-Cedrene	17
99.85	99.82	99.92	99.86	-	Total	



شکل 5. تجزیه خوشه‌ای 4 اکوتیپ زیره سبز براساس پارامترهای فیتوشیمیایی

Figure 5. Cluster analysis of 4 Cumin ecotypes based on phytochemical parameters

براساس یافته‌ها مشخص گردید که پتانسیل بالایی از تنوع در جوامع زیره سبز استان یزد وجود دارد. استفاده از نشانگر ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گونه مذکور موفقیت‌آمیز بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها مطابقت داشت. اما گروه‌بندی براساس ترکیبات شیمیایی با خوشه‌بندی ژنتیکی همخوانی نداشت. از اطلاعات حاصل از تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های زیره سبز می‌توان در فراهم نمودن اطلاعات مناسب جهت مدیریت و حفاظت منابع ژنتیکی جمعیت‌ها و بهبود استراتژی‌های اصلاحی جهت بهبود کمیت و کیفیت اسانس این گونه باارزش استفاده نمود.

منابع

ابراهیمیان مهسا، ابراهیمی محسن، مرتضویان سید محمد مهدی، رامشینی حسین (1396) بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت-های ایرانی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT. ژنتیک نوین 2 (12)، 292- 285.

باقی زاده امین، مشایخی زهرا، ابراهیمی محمدعلی (1397) بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی برخی از جمعیت‌های پونه‌سا گربه-ای (*Nepeta cataria* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و روش GC/MS. مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران 5 (34)، 836-848.

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

جانی پور لیلا، فهمیده لیلا، فاضلی نسب بهمن (1397) ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف زیره سبز با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) 1 (31)، 1-15.

حقیرالسادات فاطمه، اژدری مریم، عروجعلیان فاطمه، امیدی میثم، عظیم زاده مصطفی (1393) بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس بذر سه گیاه دارویی بومی استان یزد (زیره سیاه، زیره سبز و زنیان) و مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی آنها. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد 6 (22)، 1592-1603.

ضابط محمد، رحیمی آتنا، ایزانلو علی، علیزاده زهره (1398) بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum*) خراسان با استفاده از نشانگرهای رپید و آی اس اس آر. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 1 (11)، 98-75.

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

محمودی رزاق، احسانی علی، زارع پیمان (1391) ویژگی‌های ترکیبات شیمیایی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس زیره سبز. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی 3 (22)، 311-321.

References

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA. 804 p.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genetics J 5 (2), 49-56 (In Persian).

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

Baghizadeh A, Mashayekhi Z, Ebrahimi MA (2018) Investigation of genetic and phytochemical diversity of some catnip (*Nepeta cataria* L.) populations by RAPD molecular marker and GC/MS method. Iran. J Medic Aroma Plants 5 (34), 836-848.

Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Research on Animal Production 7 (13), 186-192 (In Persian).

Bahraminejad A, 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 (2), 194-199.

Bahraminejad A, Mohammadi-Nejd Gh, Abdul Khadir M (2011) Genetic diversity evaluation of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) based on phenotypic characteristics. Aust J Crop Sci 5 (3), 304-310.

Baldemir A, Topcu H, Paksoy MY et al. (2017) First microsatellite markers for *Scaligeria lazica* Boiss. (Apiaceae) by next generation sequencing: population structure and genetic diversity analysis. Biotech Biotech Equip 1-10.

Barrandeguy ME, Garcia MV (2014) Quantifying genetic diversity: the starting point for population genetic studies using molecular markers. J Genet 93 (2), 587-589.

DK S, Tewari R, NK S, Singh Sh S (2016) Genetic Diversity Cucumber using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Transcriptomics 4 (1), 1-4.

Ebrahimiyan M, Ebrahimi M, Mortazavian SMM, Ramshini H (2017) The structure and genetic diversity of Iranian cumin populations (*Cuminum cyminum* L.) using SCoT molecular markers. New Genet 2 (12), 285-292.

Eskandari H, Kazemi K (2010) Response of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to post-anthesis water deficit. Not Sci Biol 2, 49-52.

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

Hadian J, Nejad Ebrahimi S, Mirjalili M et al. (2011) Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. Accessions growing wild in Iran. Chem Biodiv 8 (1), 176-188.

Haghiroalsadat F, Azhdari M, Oroojalian F et al. (2015) The chemical assessment of seed essence of three native medicinal plants of Yazd province (*Bunium premium*, *Cuminum cyminum*, *Trachyspermum copticum*) and the comparison of their antioxidant properties. J Shahid Sadoughi Uni Medic Sci 6 (22), 1592-1603.

Hossein Jafari S, Sepehry A, Soltanloo H, Karimian AA (2018) Genetic differentiation between bitter and sweet asafetida plants using ISSR markers. Mol Biol Rep 1-10.

Janipour L, Fahmideh L, Fazeli Nasab B (2018) Genetic evaluation of different population of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) using DNA molecular markers. J Cell Mol Res (Iran Biol) 1 (31), 1-15.

Mahmoudi R, Ehsani A, Zare P (2012) Phytochemical, antibacterial and antioxidant properties of *Cuminum cyminum* L. essential oil. J Food Indus Res 3 (22), 311-321.

Moghaddam M, Farhadi N (2015) Influence of environmental and geneic factors on resin yield, essential oil cotten and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. J Appl Res Medic Aroma Plants 2 (2015), 69-76.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J. Res Develop 5 (2),154

Mulpuri S, Muddanuru T, Francis G (2013) Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-taxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. Plant Sci 207, 117-127.

Nagy S, Poczai P, Cernak I et al. (2012) PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. Biochem Genetics 50, 670-672.

Parashar M, Malik C (2014) Appraisal of genetic diversity in *Cuminum cyminum* L. using molecular markers. Int J Life Sci 3, 143-156.

Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH (2017) Genetic Variability of Outcross and Selfed Fennel Based on Morphological and ISSR Markers. J Agri Sci Tech 19,157-172.

Zabet M, Rahimi A, Izanlo A, Alizadeh Z (2019) Investigation of genetic variation in Cumin (*Cuminum cyminum*) ecotypes of Khorasan province using RAPD and ISSR markers. Agri Biotech J 1 (11), 75-98.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Research 132, 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afric J Biotech 10, 1812–1817.