

Implementation of association mapping for identification of ISSR markers linked with morphological characteristics of Ajowan (*Trachyspermum copticum*)

Mahdieh Modareskia 

Ph.D. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail address: m.modareskia@yahoo.com

Reza Darvishzadeh

Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail address: darvish_r2001@yahoo.com

Mohsen Modareskia 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: modares1982@gmail.com

Hamid Hatami Maleki 

Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. E-mail address: hatamimaleki@yahoo.com

Abstract

Objective

Ajowan (*Trachyspermum copticum*) is a medicinal species that is very useful and is used to treat stomach problems and some other diseases. This study aimed to fingerprint Ajowan accessions collected from different geographical regions of Iran by using ISSR markers and identifying markers linked with agro-morphological traits through an association mapping approach.

Materials and methods

In this study, a number of 40 Ajowan genotypes related to 10 different populations from different regions of Iran were collected, and then their morphological characteristics were recorded in greenhouse conditions. Leaf samples were taken from each genotype and ISSR fingerprinting was done after DNA extraction.

Results

The results of descriptive statistics indicate the existence of genetic diversity in the germplasm of the studied Ajowan in terms of morphological characteristics and the highest and lowest coefficients of phenotypic variation were obtained for the number of seeds formed and the number

of flowers per umbrella, respectively. Results of DNA fingerprinting using 12 ISSR primers lead to the amplification of 153 loci, 93 of which were polymorphic and the rest were monomorphic. Analysis of molecular variance depicted that 37% and 63% of total variation belonged to between and within populations. In this research private markers were detected for accessions collected from Hamedan and Rafsanjan. The study of population structure related to 40 Ajowan genotypes using ISSR data and STRUCTURE software placed them in two different subpopulations. Using an association mapping approach, significant positive markers for biological yield, shoot dry weight, harvest index, number of lateral branches, number of seeds formed, 100-seed weight, mean internode length, umbrella per flower, stem diameter, and single plant yield, number of umbrellas, number of leaves, number of flowers in an inflorescence and leaf length were identified.

Conclusions

In this research, the UBC807-2, UBC812-10, UBC818-8, UBC840-5, UBC848-4, UBC857-11, and UBC857-6 markers control more than one trait simultaneously and can thus be bred in breeding programs of Ajowan to a simultaneous selection of multiple traits.

Keywords: Ajowan, Population structure, Marker location, Simultaneous selection

Paper Type: Research Paper.

Citation: Modareskia M, Darvishzadeh, Modareskia M, Hatami Maleki H (2022) Implementation of association mapping for identification of ISSR markers linked with morphological characteristics of Ajowan (*Trachyspermum copticum*). Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 85-102.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 85-102. DOI: 10.22103/jab.2022.19139.1402

Received: August 19, 2022.

Received in revised form: October 01, 2022.

Accepted: October 02, 2022.

Published online: November 15, 2022


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



© the authors

استفاده از تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با ویژگی‌های


مرفولوژیکی در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum copticum*)

مهديه مدرس کیا 


دانشجوی دکتری، گروه باغبانی-گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
رایانامه: m.modareskia@yahoo.com

رضا درویش زاده

استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: darvish_r2001@yahoo.com

محسن مدرس کیا 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: modares1982@gmail.com

حمید حاتمی ملکی 

دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایانامه: hatamimaleki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

چکیده

هدف: گیاه زنیان (*Trachyspermum copticum*) یکی از گونه‌های دارویی است که برای درمان مشکلات معده و برخی بیماری‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مطالعه با هدف شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات زراعی-ریخت‌شناختی در توده‌های زنیان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور با استفاده از تجزیه ارتباطی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، ویژگی‌های ریخت‌شناختی ۴۰ ژنوتیپ زنیان از ۱۰ توده مختلف در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شدند. در آزمایش مولکولی، نمونه‌های برگ‌ها در مرحله چهارم برگ‌ها از ژنوتیپ‌های مورد نظر برداشته شده و پس از استخراج DNA انگشت‌نگاری با نشانگرهای ISSR انجام شد.

نتایج: آماره‌های توصیفی بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم زنیان مورد مطالعه از نظر ویژگی‌های مرفولوژیکی بوده؛ بیشترین و کمترین ضریب تغییرات فنوتیپی به ترتیب برای صفات تعداد بذرهای تشکیل شده و تعداد گل در هر چتر فرعی بدست آمد. نتایج انگشت‌نگاری DNA با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، موجب تکثیر ۱۵۳ مکان ژنی گردید که ۹۳ عدد از آنها چندشکل و مابقی

تک شکل بودند. در تجزیه ساختار جمعیت زنیان مورد مطالعه با استفاده از داده‌های ISSR در نرم افزار Structure دو زیرجمعیت شناسایی شد. با استفاده از تجزیه ارتباطی نشانگرهای با ارتباط معنی‌دار برای صفات عملکرد زیستی، وزن خشک اندام هوایی، شاخص برداشت، تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد بذر تشکیل شده، وزن صد دانه، طول متوسط میانگره، چتر فرعی در هر گل، قطر ساقه و عملکرد تک بوته، تعداد چتر، تعداد برگ، تعداد گل در یک گل آذین و طول برگ شناسایی شد. در این تحقیق، جایگاه‌های نشانگری UBC857-6 و UBC857-11، UBC848-4، UBC840-5، UBC818-8، UBC812-10، UBC807-2 بطور همزمان برای بیش از یک صفت شناسایی شدند و بدین ترتیب می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی گیاه دارویی زنیان به منظور گزینش همزمان چند صفت مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق نشانگرهای UBC857-11 UBC848-4 UBC840-5 UBC812-10 UBC807-2 UBC818-8 بطور همزمان بیش از یک صفت را کنترل می‌نمودند و می‌توانند بطور موثری در برنامه‌های به‌نژادی زنیان از طریق گزینش مورد استفاده قرار بگیرند.

کلیدواژه‌ها: زنیان، ساختار جمعیت، گزینش همزمان، نشانگر ISSR

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مدرس کیا مهدیه، درویش زاده رضا، مدرس کیا محسن، حاتمی ملکی حمید (۱۴۰۱) استفاده از تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با ویژگی‌های مرفولوژیکی در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum copticum*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۴(۴)، ۸۵-۱۰۲.

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



© the authors

مقدمه

زنیان (*Trachyspermum copticum*) گیاهی است علفی، بدون کرک و معطر با ساقه افراشته به ارتفاع ۲۰ الی ۵۰ سانتی‌متر با میوه کوچک و تخم‌مرغی شکل به رنگ زرد تیره که حاوی تیمول می‌باشد. اندام دارویی گیاه زنیان را میوه آن تشکیل می‌دهد که به صورت خشک و رسیده مصرف می‌شود (Hedge and Lamond 1987). مهم‌ترین ترکیبات موثره گیاه دارویی زنیان تیمول، سیمن، آلفاپینن، دی پنتین، بتاپینن، کارواکرول و گاماترپنین می‌باشد که از بین آنها تیمول (۳۵-۶۰٪) جزء اصلی و عمده روغن زنیان می‌باشد (Mirzavand 1992). پراکندگی جغرافیایی این گیاه در کشور در استان‌های سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، یزد، فارس، کرمان، خراسان دیده شده و در خارج از ایران در نواحی مختلف اروپای مرکزی، هندوستان و مصر

نیز یافت می‌شود (Mirzavand 1992). از گیاه زنیان به صورت خوراکی به عنوان ضد درد، ضد آسم، ضد تهوع و خلط آور و به صورت موضعی در درمان دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود. همچنین اثر درمانی زنیان بر بیماری‌های جلدی، عصبی و ادراری-تناسلی، و به عنوان مدر، ضدنفخ و ضدکرم نیز اثبات شده است (Mirzavand 1992). بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان برای حفاظت از ذخایر توارثی و پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گیاهی در راستای ایجاد ارقام و ژنوتیپ‌های جدید مهم می‌باشد (Mohammadi and Prasanna 2003). از نشانگرهای مولکولی، نشانگر ISSR شامل تکثیر قطعه‌های DNA موجود در فواصل بین دو ناحیه تکراری ریزماهورهای است که در دو سوی آن قرار دارند (Li et al. 2008). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به RAPD تکثیرپذیری و تنوع پذیری بالاتری داشته، سریع بوده و روشی آسان است (Mohammadabadi et al. 2021). این نشانگرها نیاز کم به DNA الگو دارند (Bahador et al. 2016). این نشانگرها تکرارپذیری نشانگرهای ریزماهوره (SSR) را به دلیل طولی بودن طول نشانگرهاشان دارا می‌باشند (Mohammadabadi et al. 2017). در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهورها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Ghasemi et al. 2010). آغازگرهای آن غیراختصاصی و این تکنیک ساده، سریع و نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و هزینه ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi and Askari 2012). این نشانگرها در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al., 2010; Ghasemi et al., 2010; Askari et al., 2011; Zamani et al., 2011; Mohammadabadi and Askari 2012; Zamani et al., 2015; Bahador et al., 2016; Mohammadabadi et al., 2017; Mohammadabadi et al. 2021). در سال‌های اخیر با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA روابط ژنتیکی و چندشکلی موجود در ژرمپلاسم زنیان از مناطق مختلف (Heidari et al. 2016; Sadati et al. 2016) گزارش شده است. تحقیقات نشان داده است که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در توده‌های مختلف زنیان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران وجود دارد و این تنوع می‌تواند به عنوان ابزاری سودمند در به‌نژادی گیاه زنیان استفاده شود. از طرفی شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده ویژگی‌های مرفولوژیکی به لطف نشانگرهای مولکولی زمینه را برای به‌نژادی مولکولی گیاه فراهم می‌نماید. امروزه با وجود نشانگرهای مولکولی DNA، امکان شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات و گزینش به کمک نشانگر، برای به‌نژادی صفات با وراثت‌پذیری پایین و صفات با قابلیت ظهور در مراحل انتهایی رشد و توسعه گیاه میسر شده است. بدین منظور می‌توان با ارزیابی تنوع فنوتیپی و مولکولی جمعیت ژنتیکی علاوه بر اطلاع از غنای آلی، از طریق روش‌های تجزیه ارتباطی (Association analysis) نشانگرهای مولکولی پیوسته با عوامل کنترل کننده صفات را شناسایی کرد. در تجزیه پیوستگی هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با یک صفت کمی در یک جمعیت خواهر-برادری است. محدودیت‌های اساسی این روش، تعداد محدود کراسینگ اور و در نتیجه وضوح پایین نقشه ژنتیکی (۲۰-۱۰ سانتی مورگان)، و هزینه بالای تکثیر رگه‌ها برای رسیدن به تعداد کافی کراسینگ‌اور است. ضمن اینکه ایجاد چنین جمعیت‌هایی بسیار زمان‌بر بوده و جمعیت ایجاد شده فقط برای صفات و مطالعات محدودی کارایی دارد (Gupta et al. 2005; Holland 2007). در تجزیه ارتباطی که با استفاده از

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ های زنیان مورد استفاده در پژوهش

Table 1. Characteristics of Ajowan genotypes used in the present study

کد Cod e	توده Accessi on	درصد عضویت به زیرجمعیت		زیرجمعیت Subpopulat ion	کد Cod e	توده Accessi on	درصد عضویت به زیرجمعیت		زیرجمعیت Subpopulat ion
		اول	دوم				اول	دوم	
G01	Raf1_1	0.38	0.62	مختلط (Mixed)	G21	Isf-1	0.42	0.58	مختلط (Mixed)
G02	Raf1_2	0.24	0.76	سبز (Green)	G22	Isf-2	0.46	0.54	مختلط (Mixed)
G03	Raf1_3	0.41	0.59	مختلط (Mixed)	G23	Isf-3	0.43	0.57	مختلط (Mixed)
G04	Raf1_4	0.15	0.85	سبز (Green)	G24	Isf-4	0.37	0.63	مختلط (Mixed)
G05	Ard-1	0.32	0.68	مختلط (Mixed)	G25	Ham1_1	0.46	0.54	مختلط (Mixed)
G06	Ard-2	0.13	0.87	سبز (Green)	G26	Ham1_2	0.39	0.61	مختلط (Mixed)
G07	Ard-3	0.47	0.53	مختلط (Mixed)	G27	Ham1_3	0.48	0.52	مختلط (Mixed)
G08	Ard-4	0.36	0.64	مختلط (Mixed)	G28	Ham1_4	0.62	0.38	مختلط (Mixed)
G09	Raf2_1	0.15	0.85	سبز (Green)	G29	Ham2_1	0.78	0.23	قرمز (Red)
G10	Raf2_2	0.12	0.88	سبز (Green)	G30	Ham2_2	0.60	0.40	مختلط (Mixed)
G11	Raf2_3	0.44	0.56	مختلط (Mixed)	G31	Ham2_3	0.73	0.27	قرمز (Red)
G12	Raf2_4	0.19	0.81	سبز (Green)	G32	Ham2_4	0.73	0.27	قرمز (Red)
G13	Far-1	0.40	0.60	مختلط (Mixed)	G33	Gha-1	0.35	0.65	مختلط (Mixed)
G14	Far-2	0.53	0.47	مختلط (Mixed)	G34	Gha-2	0.53	0.47	مختلط (Mixed)
G15	Far-3	0.39	0.61	مختلط (Mixed)	G35	Gha-3	0.40	0.61	مختلط (Mixed)
G16	Far-4	0.38	0.63	مختلط (Mixed)	G36	Gha-4	0.58	0.43	مختلط (Mixed)
G17	Dam-1	0.14	0.86	سبز (Green)	G37	Kho-1	0.83	0.17	قرمز (Red)
G18	Dam-2	0.18	0.82	سبز (Green)	G38	Kho-2	0.90	0.10	قرمز (Red)
G19	Dam-3	0.27	0.73	سبز (Green)	G39	Kho-3	0.86	0.14	قرمز (Red)
G20	Dam-4	0.07	0.93	سبز (Green)	G40	Kho-4	0.86	0.14	قرمز (Red)

Raf: Rafsanjan; Ard: Ardebil, Dam: Damyal, Ham: Hamedan, Gha: Ghazvin, Isf: Isfahan, Kho: Khorasan,

Far: Fars

بذور هر یک از توده های مورد بررسی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی و در شرایط گلخانه ارزیابی شدند. تعدادی از صفات ریخت شناختی در مرحله گلدهی کامل و تعدادی دیگر از صفات در مرحله رسیدگی بذور توده ها اندازه گیری شدند. صفات مورد بررسی شامل قطر ساقه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه های جانبی، تعداد برگ، تعداد برگچه، تعداد چتر، تعداد چترهای فرعی در هر گل آذین، تعداد گل در هر چتر فرعی، تعداد گل در یک گل آذین، طول برگ، طول متوسط میانگره، وزن خشک اندام هوایی، وزن صد دانه، عملکرد تک بوته، عملکرد زیستی، تعداد بذرهای تشکیل شده و شاخص برداشت بودند.

استخراج DNA ژنومی و نشانگر ISSR: در مرحله چهارم برگری از هر توده ۴ بوته به تصادف انتخاب و نمونه برگری هر گیاه داخل فویل آلومینیومی و سپس در داخل ازت مایع قرار داده شد. استخراج DNA ژنومی نمونه‌ها به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Murray and Thompson 1980) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪ تعیین شد. برای انگشت‌نگاری ژرم‌پلاسم مورد مطالعه، ۱۲ آغازگر (جدول ۲) ISSR بکار گرفته شد. اجزاء واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (کیت PCR تهیه شده از شرکت سیناژن حاوی dNTP، MgCl₂، بافر PCR و آنزیم Taq پلیمرز)، ۷ میکرولیتر DNA (۳۰ ng)، ۲ میکرولیتر آغازگر همراه با ۳/۵ میکرو لیتر آب دیونیزه بود. برنامه دمایی ترموسایکلر شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۶ چرخه بصورت واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر ترکیب آغازگر (جدول ۲)، مرحله توسعه رشته جدید به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد از همدیگر تفکیک شدند و برای مشاهده باندها از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

جدول ۲. آغازگرهای ISSR مورد استفاده در پژوهش و توالی آن‌ها

Table 2. Name and sequence of ISSR primers used in the present study

Primer	نام آغازگر	توالی Sequence	Annealing temperature	دمای اتصال
UBC812		5'- (GA) ₈ AA-3'	45	
UBC818		5'- (CA) ₇ G-3'	45	
UBC807		5'- (AG) ₈ T-3'	46	
UBC825		5'- (AC) ₈ T-3'	60	
A7		5'- (AG) ₁₀ T-3'	50	
A13		5'- (GT) ₆ CC-3'	48	
UBC857		5'- (AC) ₈ YG-3'	40	
UBC840		5'- (GA) ₈ YT-3'	43	
UBC849		5'- (GT) ₈ CG-3'	56	
CAG5		5'- (CAG) ₅ -3'	60	
UBC848		5'- (CA) ₈ RG-3'	57	
UBC810		5'- (GA) ₈ T-3'	48	

R = A/T, Y = G/C, B = T/G/C; D = A/T/G, H = A/T/C, V = A/G/C

تجزیه آماری داده‌ها: امتیازدهی باندها در ژل، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار صورت گرفت و ماتریس صفر و یک بدست آمده برای تجزیه و تحلیل‌های آماری استفاده شد. با استفاده از روش آماری Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4، تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب (K) انجام گرفت (Pritchard et al. 2000). در این نرم‌افزار، مقادیر زیرجمعیت فرضی اولیه (K) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها جهت افزایش دقت، ۱۰ تکرار لحاظ گردید. همچنین جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture

و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار Burn-in (دوره گرم کردن) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید (Evanno *et al.*, 2005). برای تعیین تعداد بهینه K، از روش ایوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. نرم افزار Structure برای هر مقدار K (زیر جمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Q (مارتیس عضویت افراد در زیر گروه‌ها) را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیر جمعیت‌ها است. میزان عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium) با استفاده از نرم افزار TASSEL 2.1 محاسبه گردید. عدم تعادل پیوستگی (LD) در حقیقت ارتباط غیر تصادفی بین آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی مختلف هست که از این پیوستگی ژنتیکی غیرتصادفی بین نشانگرها و ژن‌های کنترل کننده صفات می‌توان برای تعیین مکان ژن‌ها استفاده نمود. در مرحله بعدی شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی با مدل مخلوط وابسته به مدل Q+K (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت و تعداد جمعیت فرضی) در نرم افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه تنوع ژنتیکی: مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین حسابی و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات در توده‌های مورد مطالعه (جدول ۳) بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا در ژرم پلاسما گیاه زنیان مورد بررسی می‌باشد. بیشترین مقدار ضریب تغییرات فنوتیپی (به عنوان شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی) در صفت تعداد بذرها تشکیل شده و کمترین مقدار در صفت تعداد گل در هر چتر فرعی مشاهده شد (جدول ۳). در پژوهشی که توسط Ghassemi *et al.* (2019) به منظور بررسی تاثیر تنظیم کننده های رشد در گیاه زنیان انجام گرفت بیشترین ضریب تغییرات در صفت ارتفاع بوته مشاهده شد. همچنین Negar *et al.* (2018) در ارزیابی مورفولوژیکی توده های مختلف زنیان جمع آوری شده از مناطق مختلف هند بیشترین و کمترین مقدار ضریب تغییرات فنوتیپی را برای صفات تعداد چتر فرعی در چتر اصلی و روز تا رسیدگی گزارش نموده اند. مطالعات قبلی نیز بیانگر وجود تنوع قابل ملاحظه در ژرم پلاسما گیاه زنیان بر اساس ویژگی های ریخت شناختی می‌باشند؛ بطوری که Heidari *et al.* (2016) و Sadati *et al.* (2016) و Niazian *et al.* (2017) نیز سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی را بین توده‌های جمع‌آوری شده از ایران بر اساس ویژگی های ریخت شناختی و نیز عملکرد روغن گزارش نموده‌اند و این امر بیانگر توجه به حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسما گیاه مزبور در ایران است. ارزیابی تنوع ژنتیکی پیش نیاز برنامه‌های دورگ‌گیری بوده و می‌تواند با تلاقی والدین با فاصله ژنتیکی زیاد، پدیده هتروزیس یا برتری نتاج نسبت به والدین را بدست آورد. همچنین، موفقیت یک پروژه تجزیه ارتباطی نیز به وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما مورد ارزیابی بستگی دارد. نتایج انگشت نگاری DNA در ژنوتیپ‌های مختلف با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، موجب تکثیر ۱۵۳ مکان ژنی گردید که ۹۳ عدد از آنها چندشکل و مابقی تک شکل بودند.

تجزیه ساختار جمعیت: الزاماً در مطالعات تجزیه ارتباط از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود و بهتر است که جمعیت مورد نظر فاقد هر گونه ساختار باشد؛ زیرا وجود ساختار در جمعیت عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد بوده و در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط لحاظ نشوند نتایج مثبت دروغین می‌تواند حاصل گردد (Breseghello 2006).

جدول ۳. آماره‌های توصیفی صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های زنیان

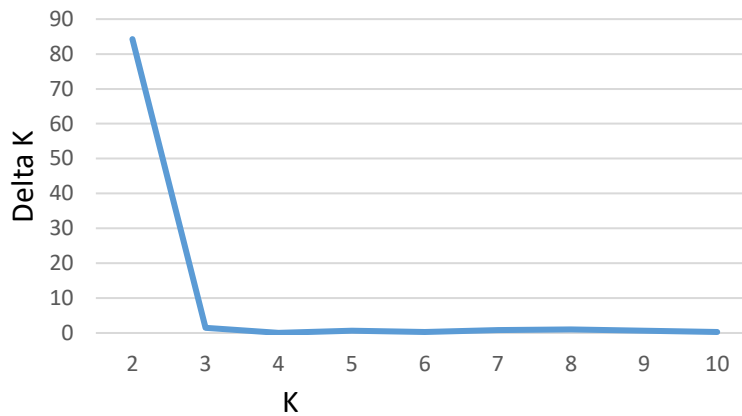
Table 3. Descriptive statistics related to morphological traits in Ajowan genotypes

صفت Trait	میانگین Mean	انحراف معیار Standard deviation	حداقل Min	حداکثر Max	ضریب تغییرات فنوتیپی Phenotypic coefficient of variation
SD	2.48	0.88	1	6.03	35.39
PH	60.04	12.14	26	99	20.21
NB	5.36	1.23	2	9	22.93
NL	22	8.13	8	50	36.95
NLlet	73.64	36.64	17	236	49.75
NU	23.86	9.28	11	60	38.89
NUI	7.37	2.05	4	15	27.79
NFU	14.2	2.15	9	20	15.12
NFWI	91.89	25.83	46	200	28.11
LL	6.47	1.11	4	10.3	17.08
I	6.59	1.25	3.3	8.8	19.05
DWAP	1.9	1.07	0.46	7.01	56.28
HSW	0.08	0.02	0.06	0.15	18.34
SPY	1.09	0.63	0.29	3.36	57.56
BY	3.05	1.52	0.96	9.9	50
NS	1599.29	3.16	331.19	31.33	197.58
HI	0.36	0.1	0.14	0.66	27.18
RPL	24.31	7.57	11	41	31.14

: تعداد چترهای فرعی NUI، تعداد چتر، NU: تعداد برگچه، NLlet: تعداد برگ، NL: تعداد شاخه‌های جانبی، NB: ارتفاع بوته، PH قطر ساقه، SD: وزن DWAP: طول متوسط میانگره، I: طول برگ، LL: تعداد گل در یک گل آذین، NFWI: تعداد گل در هر چتر فرعی، NFU: در هر گل آذین، شاخص برداشت، HI: تعداد بذرهای تشکیل شده، NS: عملکرد بیولوژیک، BY: عملکرد تک بوته، SPY: وزن صد دانه، HSW خشک اندام هوایی، طول دوره ی رسیدگی RPL:

از طرفی تجزیه ساختار جمعیت به زیرجمعیت‌ها، شنا سایی ژنوتیپ‌های مختلط را امکان پذیر می‌سازد (Dadras et al. 2014). برر سی منابع نشان می‌دهد، معمولاً وقتی در صد عضویت هر یک از افراد به زیر جمعیت‌ها کمتر از ۷٪ باشد، آن فرد به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مختلط) در نظر گرفته می‌شود (Spataro et al. 2011). در این پژوهش، تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی افراد به زیر جمعیت‌های مناسب با استفاده از مکان‌های نشانگری تکثیر یافته و روش بی‌زین و در نرم افزار Structure

انجام شد. با توجه به تغییرات مقدار ΔK به ازای تعداد مختلف گروه‌ها (K) (شکل ۲) و حداکثر بودن نمودار تغییرات مقدار ΔK در $K=2$ ، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۲ گروه قرار گرفتند.



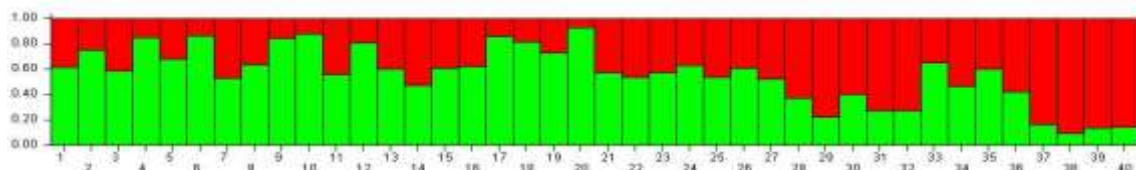
شکل ۲. نمودارهای دوطرفه برای تعیین تعداد زیر جمعیت‌ها در توده‌های زنیان مورد مطالعه ($K=2$) بر اساس نشانگرهای ISSR در نرم‌افزار Structure

Figure 2. Bilateral graphs for determining optimum subpopulations in studied Ajowan accessions ($K=2$) based on ISSR markers in Structure software

وجود ساختار در جمعیت مورد بررسی بیانگر اهمیت استفاده از ماتریس ساختار جمعیتی در مطالعات مرتبط با تجزیه ارتباطی در گیاه زنیان است تا بتوان درصد خطاهای مثبت را کاهش داد. با توجه به آستانه تصمیم‌گیری ۷۰ درصد (Spataro et al. 2011)، از میان ۴۰ ژنوتیپ زنیان مورد مطالعه، ۷ ژنوتیپ به زیر جمعیت اول (قرمز) و ۱۰ ژنوتیپ به زیر جمعیت دوم (سبز) تعلق داشتند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق رفسنجان و اردبیل یا در زیر جمعیت دوم (سبز) قرار داشتند و یا بصورت مختلط بودند (جدول ۱). در رابطه با توده‌های جمع‌آوری شده از مناطق همدان، اصفهان، قزوین، خراسان، فارس و دامپال، زیر جمعیت‌های شناسایی شده با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت داشت. با توجه به جدول ۱ و شکل ۳، بیشترین اختلاط در توده Ham1_3 (از همدان) مشاهده شد. وجود ساختار در ژرم پلاسما زنیان می‌تواند بدلیل فشار گزینشی و انتقال بذور جمعیت‌های مختلف از یک منطقه به منطقه دیگر باشد (Ersoz et al. 2009).

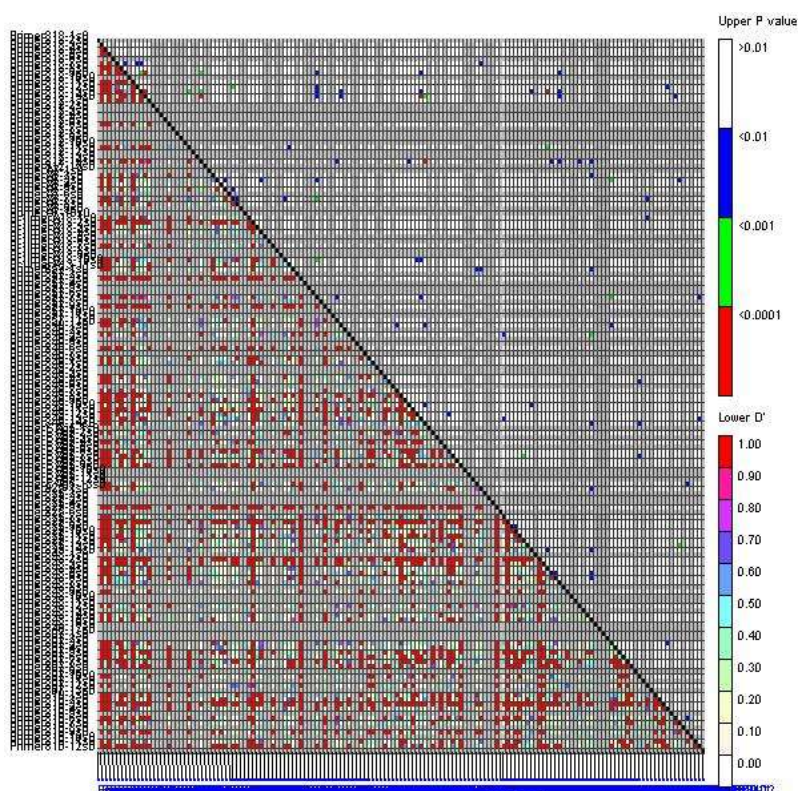
تجزیه ارتباطی صفات زراعی-ریخت‌شناختی: در نقشه یابی ارتباطی که مکان یابی QTL ها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) در ژنوم نیز از اهمیت اساسی برخوردار است (Al-Maskri et al. 2012). در این تحقیق، ۱/۲ درصد از کل نامتعادلی‌های محاسبه شده بین جفت نشانگرها در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند (شکل ۴). وجود عدم تعادل پیوستگی ژنتیکی در ژرم پلاسما زنیان مورد مطالعه، آنالیزهای مکانیابی ارتباطی را امکانپذیر می‌سازد. از عوامل افزایش دهنده مقدار LD میتوان به سیستم اتوگامی، ایستازی، نوآرایه‌های ژنومی، رانده شدن ژنتیکی، ایزولاسیون ژنتیکی، ساختار جمعیت، اندازه کوچک جمعیت، انتخاب و درجه

خویشاوندی اشاره کرد، ر حالیکه دگرآمیزی (آلوگامی)، تبدیل ژنی، مقادیر بالای نوترکیبی و جهش و همچنین جهش های دوره ای از عوامل کاهنده مقدار LD می باشند.



شکل ۳. تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian توده های زنیان مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ISSR. هر رنگ یک زیر جمعیت را نشان می دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به کلاستر یا زیر جمعیت را نشان می دهد.

Figure 3. Bayesian model based-cluster analysis of studied Ajowan accessions by using ISSR markers. Numbers on the y-axis indicate the membership coefficient (Q) and on the x-axis indicate the individual's number



شکل ۴. پلات عدم تعادل لینکاژی. مقادیر پایین قطر میزان آماره عدم تعادل لینکاژی (D') و بالای قطر P-value را برای جفت نشانگرها نشان می دهد.

Figure 4. Linkage disequilibrium plot (LD plot). Diameter lower and upper indicating linkage disequilibrium and p-value statistics for each pair of marker, respectively.

به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات ریخت شناختی در ژرمپلاسم زنیان، تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی مخلوط (Mixed Linear Model) انجام گرفت (جدول ۴). در تجزیه ارتباط با استفاده از MLM در مجموع ۲۰ جایگاه نشانگر ISSR مختلف ارتباط معنی‌داری با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی نشان دادند ($P \leq 0.01$). بر اساس مدل MLM، برای هر یک از صفات عملکرد زیستی، وزن خشک اندام هوایی، شاخص برداشت، تعداد شاخه‌های جانبی و تعداد بذر تشکیل شده تعداد ۲ مکان ژنومی شناسایی گردید (جدول ۴). برای صفات وزن صد دانه، طول متوسط میانگره، چتر فرعی در هر گل، قطر ساقه و عملکرد تک بوته تنها یک نشانگر پیوسته معنی‌دار شناسایی شد (جدول ۴). برای هر یک از صفات تعداد چتر، تعداد برگ، تعداد گل در یک گل آذین و طول برگ تعداد ۳ نشانگر با ارتباط معنی‌دار شناسایی شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که هیچ یک از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه دارای ارتباط معنی‌دار با صفات تعداد برگچه، طول متوسط میانگره، وزن صد دانه، طول دوره رسیدگی و تعداد گل در هر چتر فرعی نیستند. استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف در گیاهان دارویی مختلف (Kaya et al. 2016; Otto et al. 2017; Mohammadi et al. 2018) گزارش شده؛ ولی با این حال در مورد گیاهان دارویی زنیان گزارشی وجود ندارد. همچنین نتایج مکان‌یابی ژنی در سایر گیاهان موجود در خانواده چتریان از قبیل هویج، جعفری، کرفس، زیره، رازیانه و شوید نشان می‌دهد که مطالعات کمی در زمینه مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های مختلف این گیاهان به جز چند مورد در هویج (Iovene et al. 2011; Budahn et al. 2014) و زیره (Archangi et al. 2019) وجود دارد. برای مثال نقشه پیوستگی بوسیله نشانگرهای RAPD و AFLP در هویج با طول ۷۸۱cM و شامل ۷ گروه پیوستگی توسط Budahn et al. (2014) تهیه گردیده که در آن متوسط فاصله بین دو نشانگر ۲/۷cM می‌باشد. آنها (Budahn et al., 2014) توانستند مکان‌های ژنی کنترل‌کننده متغیرهای تکامل گل و رسیدگی (مکان ژنی Cola) و نیز مکان ژن‌های مرتبط با گلدهی شامل DcMADS3 و DcMADS5 را شناسایی نمایند. اخیراً در مطالعه‌ای (Archangi et al. 2019) از روش تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای با ارتباط معنی‌دار در گیاه زیره از خانواده چتریان استفاده شده است. بدین منظور ۱۵ توده زیره تحت شرایط نرمال و تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند و سپس ارتباط بین نشانگرهای cDNA-AFLP و خصوصیات ارزیابی شده با استفاده از مدل‌های GLM و MLM بررسی شدند و مشاهده گردید که تعداد زیادی از نشانگرها با ویژگی‌های ریخت شناختی گیاه در ارتباط هستند؛ منتهی به ترتیب ۲ و ۵ نشانگر دارای ارتباط معنی‌دار قوی به ترتیب در شرایط نرمال و تنش خشکی می‌باشند. مطابق با گزارش‌های قبلی در سایر گیاهان دارویی و زراعی اگرچه تعداد نشانگرهای با ارتباط معنی‌دار شناسایی شده در مدل MLM در مقایسه با سایر مدل‌ها کمتر می‌باشد؛ ولی توجه به این امر ضروری است که استفاده از مدل (Q+K) در زنیان بهبود معنی‌داری را در کاهش نتایج مثبت کاذب در تجزیه ارتباط در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q می‌دهد (Zhu et al. 2008). بر اساس نتایج این مطالعه، برخی از نشانگرهای ISSR شامل جایگاه‌های نشانگری UBC807-2، UBC812-10، UBC818-8، UBC840-5، UBC848-4، UBC857-11 و

UBC857-6 در میان برخی از صفات مشترک بوده و بطور همزمان با بیش از یک صفت مرتبط می‌باشند (جدول ۴) که می‌تواند به دلیل پلیوتروپی و یا پیوستگی ژن‌ها باشد (Jun et al. 2008).

جدول ۴. نتایج حاصل از تجزیه ارتباطی با مدل MLM در زنیان با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 4. The results of association analysis with MLM in Ajowan using ISSR markers

Trait	Locus	MLM	
		F_Marker	p_Marker
عملکرد بیولوژیک BY	A13-6	8.30	0.01
	UBC840-8	6.98	0.01
وزن خشک اندام هوایی DWAP	A7-10	14.37	0.00
	UBC 810-11	10.52	0.00
شاخص برداشت HI	A13-1	14.64	0.00
	UBC 812-10	7.04	0.01
وزن صد دانه HSW	UBC 848-3	7.89	0.01
طول متوسط میانگره I	UBC 812-10	22.58	0.00
	LL طول برگ	UBC 848-4	14.37
تعداد شاخه های جانبی NB	UBC 857-11	10.63	0.00
	UBC 857-6	6.73	0.01
	UBC 812-13	8.42	0.01
تعداد گل در یک گل آذین NFWI	UBC 818-8	7.15	0.01
	UBC 807-2	8.18	0.01
	UBC 840-5	7.62	0.01
تعداد برگ NL	UBC 818-10	7.29	0.01
	UBC 857-11	9.40	0.00
	UBC 818-8	8.65	0.01
تعداد بذر تشکیل شده NS	UBC 857-6	7.62	0.01
	UBC 848-4	11.41	0.00
تعداد چتر NU	CAG5-1	6.97	0.01
	UBC 812-10	17.73	0.00
	UBC 840-5	7.16	0.01
	A13-10	6.86	0.01
چتر فرعی در هر گل آذین NUI	UBC 807-2	6.73	0.01
	UBC 807-5	6.82	0.01
	PH ارتفاع گیاه	UBC 857-12	9.93
قطر ساقه SD	UBC 807-9	8.58	0.01
	UBC 849-13	7.30	0.01
	UBC 812-10	7.31	0.01
عملکرد تک بوته SPY	UBC 812-10	17.87	0.00

نشانگرهای ژنومی شنا سایی شده در این تحقیق بویژه آنهایی که در کنترل بیش از یک صفت نقش دارند و در صد قابل توجهی از تغییرات صفت را توجیه می نمایند، در صورت تأیید با آزمایش های تکمیلی می توانند به نشانگرهای اختصاصی SCAR (نواحی تکثیر شده با توالی مشخص) تبدیل شده و در برنامه های به نژادی گیاهی از طریق گزینش به کمک نشانگر (MAS) استفاده شوند. نشانگرهای مشترک گزینش هم زمان چند صفت را امکان پذیر می سازد (Tuberosa et al. 2002) از اهمیت ویژه ای در به نژادی گیاهان برخوردار هستند.

نتیجه گیری: تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای بین اکوتیپ های جمع آوری شده گیاه دارویی زنیان از کشور ایران وجود دارد که می تواند در برنامه های به نژادی از طریق گزینش، انتخاب والدین مناسب برای تلاقی ها و گزینش به کمک نشانگر مورد استفاده قرار بگیرد. در این تحقیق تنوع ریخت شناختی و ژنتیکی قابل ملاحظه ای بین توده های جمع آوری شده وجود داشت و نشانگرهای اختصاصی برای توده های جمع آوری شده از مناطق همدان و رفسنجان شناسایی گردید که بواسطه آنها می توان توده های مذکور را شنا سایی نمود. علیرغم اینکه توده های مورد بررسی از مناطق جغرافیایی مختلف جمع آوری شده بودند، در تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از مدل بیضین تنها دو زیرجمعیت تشکیل دادند و این مهم نشان دهنده جابجایی بذور توده های مختلف بذر در مناطق مختلف و اختلاط در این گیاه می باشد. در بین مکان های ژنی مورد بررسی، جایگاههای نشانگری UBC812-10 و UBC848-4 به دلیل پیوستگی همزمان با چندین صفت و بویژه ویژگی های مرتبط با عملکرد تر گیاه زنیان و تعداد چتر در بوته، می توانند بطور موثری در برنامه های گزینشی این گیاه استفاده شوند.

سپاسگزاری: از دانشگاه ارومیه بخاطر حمایت مالی از این پژوهش سپاسگزاری می شود.

منابع

- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. ژوهش های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۴۹-۵۶.
- محمدی آلاگوز رسول، درویش زاده رضا، علیجانپور احمد، حاتمی ملکی حمید، ابراهیمی راحله (۱۳۹۷). شناسایی نشانگرهای DNA مرتبط با ویژگی های فیتوشیمیایی میوه سماق. (*Rhus coriaria* L.) مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰، ۱۴۲-۱۲۹.
- میرزاوند بروجنی سهراب (۱۳۷۱). بررسی و مقایسه خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و فیتوشیمیایی میوه های استاندارد انیسون *Pimpinella anisum* L. رازیانه *Foeniculum vulgare* L. زنیان *Ammi cypripitum* L. و تشخیص آنها از یکدیگر. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

References

- Afzal S, Saleem M, Yasmin R, et al. (2010) Pre and post cloning characterization of a beta-1, 4-endoglucanase from *Bacillus* sp. *Mol Bio Res* 37, 23–1717.
- Amiripour M, Sadat Noori SA, Shariati V, Soltani Howyzeh M (2019) Transcriptome analysis of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) inflorescence. *J Plant Biochem Biotechnol* 28, 496-508.
- Archangi A, Heidari B, Mohammadi-Nejad G (2019) Association between seed yield-related traits and cDNA-AFLP markers in cumin (*Cuminum cyminum*) under drought and irrigation regimes. *Ind Crops Prod* 133, 276-283.
- Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi 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, Mohammad Abadi 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.
- Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A, Asadi M, Medhati L (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Res Anim Prod* 7, 186-192 (In Persian).
- Breseghele F, Sorrells ME (2006) Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci* 46, 1323- 1330.
- Budahn H, Barański R, Grzebelus D, et al. (2014) Mapping genes governing flower architecture and pollen development in a double mutant population of carrot. *Front Plant Sci* 8, 504
- Dadras AR, Sabouri H, Nejad GM, Sabouri A, Shoai-Deylami M (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Mol Biol Rep* 41, 3317-3329
- Ersoz ES, Yu J, Buckler ES (2009) Applications of linkage disequilibrium and association mapping in maize. p. 173–195. In A.L. Kriz and B.A. Larkins (ed.) *Molecular genetic approaches to maize improvement*. Springer-Verlag, New York, NY.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611–2620.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian J Basic Appl Sci* 4, 5758–5760.

- Ghassemi S, Zehtab-Salmasi S, Ghassemi- Golezani K, Alizadeh-Salteh S (2019) Morphological traits and yield of Ajowan affected by different irrigation intervals and growth regulators. *Adv Hort Sci* 33, 97-104
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mol Biol* 57, 461–485.
- Hedge IC, Lamond JM (1987) *Trachyspermum*. *Flora Iranica* 162, 336-8
- Heidari E, Rahimmalek M, Mohammady S, Ehtemam M (2016) Genetic structure and diversity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) populations based on molecular, morphological markers, and volatile oil content. *Ind Crops Prod* 92, 186-196.
- Holland JB (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr Opinion Plant Biol* 10, 156–161.
- Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica* 162, 179-191.
- Kaya HB, Cetin O, Kaya HS, et al. (2016) Association mapping in turkish olive cultivars revealed significant markers related to some important agronomic traits. *Biochem Genet* 54, 506-533.
- Mirzavand S (1992) Evaluation and comparison of Macroscopic, microscopic and phytochemical properties of anise, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum Copticum* fruits. Pharmaceutical thesis. Isfahan University of Medical Science (In Persian).
- Mohammadabadi M, Askari N (2012) Characterization of genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany. 120pp.
- Mohammadabadi M, Oleshko V, Oleshko O, et al. (2021) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Guppy Fish. *Turkish J Fisheries Aquatic Sci* 21, 603-613.
- 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, 154.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. *Crop Sci* 43, 1235-1248.
- Mohammadi R, Darvishzadeh R, Alijanpour A, Hatami-Maleki H, Ebrahimi R (2018) Identification of DNA markers related to phytochemical characteristics in Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits. *Agric Biotech J* 10, 130-142 (In Persian).
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147, 969–977.

- Nagar O, Maloo S, Bisen P, Kumar A, Motasara N (2018) Assessment of variability in Ajwain (*Trachyspermum ammi* L.) genotypes. *Int J Agric Environ Biotechnol* 73, 845-848.
- Niazian M, Sadat Noori SA, Tohidfar M, Mortazavian SMM (2017) Essential oil yield and agromorphological traits in some Iranian ecotypes of Ajowan (*Carum copticum* L.). *J Essential Oil Bearing Plants* 20, 1151-1156.
- Otto LG, Mondal P, Brassac J, et al. (2017) Use of genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile, and to identify flowering time and alpha-bisabolol associated SNP-loci by genome-wide association mapping. *BMC Genomics* 18, 599.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Sadati S, Sadat-Noori S, Ramshini H, Soltani E, Foghi B (2016) Towards conservation and breeding of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) by assessing ISSR, morphological traits and germination variability. *Iranian J Genet Plant Breed* 5, 8-21.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, et al. (2011) Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor Appl Genet* 122, 1281-1291.
- Tuberosa R, Gill BS, Quarrie SA (2002) Cereal genomics: ushering in a brave new world. *Plant Mol Biol* 48, 445-449.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. *Small Rumin 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. *Afric J Biotechnol* 10, 1812-1817.