علـوم محـیـطی سال هفتم ، شماره دوم، زمستان ۱۳۸۸
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.7, No.2 , Winter 2010
۷۶-۶۳

بررسی تنوع و تفرق ژنتیکی برخی جمعیت‌های زیرهٔ پارسی (*Bunium persicum* (Boiss)) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

مریم پژمان مهر[۱*]، محمد اسماعیل حسنی[۱]، سید محمد فخر طباطبایی[۱]، جواد هادیان[۲]

۱ – گروه علوم باغبانی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲- گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

زیرهٔ پارسی یا زیره سیاه کرمانی یکی از گیاهان دارویی ارزشمند بومی ایران است که به صورت خودرو در مناطق زیادی از کشور یافت می‌شود. در این پژوهش تنوع ژنتیکی درون و بین برخی جمعیت‌های این گیاه در مناطقی که مهم‌ترین مراکز رویش زیرهٔ پارسی در ایران می‌باشند با کمک نشانگرهای RAPD بررسی شده است. ۱۵ آغازگر RAPD بر روی گیاهان مورد بررسی، تولید ۲۲۹ باند DNA نمودند که از این تعداد ۲۱۶ باند (۹۴ درصد)، چند شکلی نشان دادند. تنوع درون جمعیت‌ها با استفاده از میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون با نرم افزار Popgene آنالیز و مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین و کم‌ترین تنوع ژنتیکی درون جمعیتی به ترتیب در الموت قزوین و سقفی اصفهان مشاهده شد. محاسبه نسبت آلل های موثر به آلل های مشاهده شده در هر جمعیت نشان داد که جمعیت‌ها دارای توزیع متعادل بوده و از قانون هاردی- وینبرگ پیروی می کنند. هم‌چنین بالا بودن شاخص Fst به دست آمده در این پژوهش حاکی از آن است که جمعیت‌های مورد بررسی به طور کامل از هم جدا بوده و تکامل جداگانه دارند. در دندروگرام حاصل از آنالیز کلاستر بر اساس ماتریس تشابه ژنتیکی جاکارد، در اکثر موارد افراد مختلف هر جمعیت در گروه‌های متفاوت همراه با افرادی از جمعیت‌های دیگر قرار گرفته‌اند که این امر تنوع بالای ژنتیکی درون جمعیت‌ها نسبت به بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. تنوع ژنتیکی موجود باید در برنامه های بهره‌برداری، اهلی کردن و اصلاح و حفاظت ژرم پلاسم مورد توجه و استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، زیرهٔ پارسی، جمعیت، نشانگرهای RAPD.

Evaluation of Genetic Diversity and Differentiation of Some Bunium Persicum (Boiss) Populations Using RAPD Markers

Maryam Pezhmanmehr[1]*, Mohammad Esmail Hassani[1], Mohammad Fakhre Tabatabaie[1], Javad Hadian[2]

1- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj

2- Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin Tehran, Iran.

Abstract

Bunium persicum (Boiss) is a valuable medicinal plant native to Iran which grows wild in various parts of Iran. In the present study, genetic diversity was investigated within and among some populations of *B. persicum* collected from the main growing areas of this plant in Iran using RAPD markers. Fifteen RAPD primers produced a total of two hundred and twenty-nine bands, with two hundred and sixteen (94%) polymorphic bands between single plants of six investigated populations. Popgene software was used to describe population structure thought calculation of Shannon's information index and Nei's gene diversity analysis. Genetic diversity within a population from Ghazvin Province was more than other populations and, within it, the population of Saghafy was less than others. Calculation of the ratio of the effective number of alleles to observed number of alleles within each population showed that the populations had equal distributions in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. Also, a high Fst index derived by this study showed that the populations investigated were completely different from each other and had independent evolution. In UPGMA derived dendrogram based on the Jaccard similarity matrix, in most cases different individuals belonging to the same population were represented in different groups, showing a high level of genetic variation within all populations. The available genetic diversity of *B. persicum* must be considered in domestication, breeding and conservation programs.

Keywords: *Bunium persicum* (Boiss), Genetic diversity, Population, RAPD markers.

* Corresponding author. *E-mail Address*: m_pezhmanmehr@yahoo.com

مقدمه

زیـرهٔ پارسـی یـا زیـره سـیاه کرمـانی بـا نـام علمـی *Bunium persicum* (Boiss) B. Fedtsch از گیاهان دارویی و ادویـه‌ای بـومی ایـران، هنـد، ترکمنـستان، افغانـستان، پاکـستان، کـشمیر، آسـیای مرکـزی و پـامیر اسـت (Anonymous, 2002). بذرهای این گیاه بـه دلیـل خـواص دارویی و ادویه‌ای دارای ارزش اقتصادی بالایی بوده و از طریق صادرات آنهـا سـالانه مبلغ قابـل تـوجهی ارز وارد کشور می شود. رویشگاه‌هـای متعـدد ایـن گیـاه در نقـاط مختلـف ایـران در حـال حاضـر تنهـا منبـع تولیـد زیـره می‌باشند. با توجه به مـصرف روزافـزون ایـن گیـاه و اهمیـت اقتصادی آن، در سال‌های اخیر تلاش‌هـایی در جهـت اهلـی سازی این گیاه صـورت گرفتـه اسـت (Khosravi, 1993). در فراینـد اهلـی سـازی و اصـلاح، آگـاهی از تنـوع و تفـرق ژنتیکی جمعیت‌های مختلف می‌تواند قدم مـوثری در جهـت درک ساختار و روابط ژنتیکی جمعیت‌ها و کمک به فراینـد انتخاب در مسیر اهلی کردن نماید (Devi, 2004).

روش‌هـای متعـددی چـون روش‌هـای مرفولـوژیکی، شـیمیایی و مولکـولی بـه منظـور بررسـی تنـوع ژنتیکـی جمعیت‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مورد گیاه زیره پارسی تا به حال چندین بررسی در جهت تعیین تنـوع ژنتیکـی در بـین جمعیـت‌هـای مختلـف بـا کمـک نشانگرهای مرفولوژیکی و مولکولی در کشورهای هند و پاکستان انجام گرفته اسـت. Devi (2004) بـه بررسـی ژرم پلاسم توده های مختلف زیرهٔ پارسـی بـا کمـک صـفات مربـوط بـه رشـد و عملکـرد در هیماچـال پـرادش در هندوستان پرداخت. نتایج حاکی از میزان بـالایی از تنـوع در بین تـوده‌هـای مـورد مطالعـه بـود. Mittal و همکـاران (2006) تنوع ژنتیکی توده‌هـای مختلـف زیـرهٔ پارسـی در شمال غرب هیمالیا را بر اساس ویژگی‌های مرفولـوژیکی مورد مطالعه قـرار دادنـد. Kapila و همکـاران (1997) نیـز تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های اهلی شـده ایـن گیـاه را بـا کمـک نـشانگرهای مرفولـوژیکی مـورد مطالعـه قـرار دادند. در مطالعه دیگری Majeed (2005) به بررسی تنـوع ژنتیکـی ایـن گیـاه در پاکـستان بـا اسـتفاده از صـفات مرفولـوژیکی و نـشانگرهای RAPD پرداخـت و تنـوع بالایی را در بین توده‌های مورد بررسی گزارش نمود.

روش‌هـای مولکـولی بررسـی تنـوع ژنتیکـی بـا پیـشرفت‌هـای بیولـوژی مولکـولی در سـال‌هـای اخیـر گـسترش زیـادی یافتـه‌انـد. ایـن روش‌هـا بیـشترین و مطمئن‌ترین اطلاعات را از ژنوم در اختیار می‌گذارنـد. در بـین نـشانگرهای مختلـف، نـشانگرهای RAPD بـه علـت مزیت‌هایی چـون عـدم نیـاز بـه اطلاعـات اولیـه در مـورد توالی DNA بـرای طراحـی و سـاخت آغازگرهـا، امکـان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه‌ها، عدم نیاز به کاوشگر و مواد پرتو زا، هزینـه کـم کـاربرد و سـرعت اجرای آن از پراستفاده‌ترین نشانگرهای مولکـولی هـستند (Williames *et al.*, 1990). از طرفـی معـایبی چـون عـدم تکرارپذیری و حساسیت بالا به آلودگی را نیز می‌توان بـا افزایش دقت و تکرار آزمایش و نمره‌دهی باندهای واضـح و مـشترک در تکرارهـا افـزایش داد. نـشانگرهای مولکـولی RAPD به عنوان ابـزاری مـوثر در بررسـی تنـوع درون و بـین جمعیتـی معرفـی شـده‌انـد (Lynch and Milligan, 1994). در مطالعات متعـددی ایـن نـشانگرها جهـت بررسـی تنـوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی مختلف مورد استفاده قـرار گرفتـه انـد. Davic (1997) ایـن نـشانگرها را جهـت بررسی میزان تفرق ژنتیکی در بین جمعیـت‌هـای مختلـف رای گراس[1] مورد استفاده قرار دادنـد. هـم‌چنـین Kiani و همکاران (2008) تنوع ژنتیکی جمعیت‌هـای مختلـف رز[2] ایرانی را با استفاده از نشانگرهای RAPD بررسـی کردنـد. نـشانگرهای RAPD هـم‌چنـین بـه منظـور بررسـی تنـوع

ژنتیکی درون جمعیت‌های گیاه زول[3] از خانواده چتریان مورد استفاده قرار گرفته است (Byleby, 2008).

زیرهٔ پارسی همانند بسیاری از گونه‌های دیگر خانواده چتریان از نظر سیستم باروری دگرگشن می‌باشد (Saberamoli, 1997). در مورد گونه‌های دگرگشن بیشترین میزان تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها پراکنده است تا در بین جمعیت‌ها (Wricke and Weber, 1986). این امر در مطالعات Bradeen و همکاران (2002) و Shim و Jorgensen (2000) روی جمعیت‌های وحشی و کشت شده هویج نیز نشان داده شده است. در این مطالعه الگوی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های زیره پارسی در مناطقی از ایران که مهم‌ترین مراکز رویش این گیاه می‌باشند با کمک نشانگرهای RAPD بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای انجام این تحقیق بذر جمعیت‌های مختلف زیره پارسی از مهم‌ترین مناطق رویشی آن در استان‌های کرمان (۲ جمعیت با فاصله‌ای بیش از ۳ کیلومتر)، خراسان، اصفهان، سیستان و بلوچستان و قزوین (هر کدام یک جمعیت) با کمک سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و با مراجعه به محل جمع‌آوری شدند نقشه سایت‌های مورد مطالعه و شمارهٔ تک بوته‌ها در جمعیت‌ها در شکل ۱ و جدول۲ ذکر شده است. از هر جمعیت ۵ تا ۷ تک بوته برای انجام مطالعه انتخاب شدند. بذور زیرهٔ پارسی دارای رکود جنینی هستند که برای از بین بردن آن نیاز به یک دوره سرمادهی مرطوب می‌باشد (Sasani *et al.*, 2007). این بذور پس از گذراندن دورهٔ سرمایی و جوانه دار شدن، در گلدان‌هایی در گلخانه گروه باغبانی پردیس کشاورزی کرج کشت و نگهداری گردیدند.

شکل ۱ – نقشه پراکنش جمعیت های زیره پارسی مورد استفاده در این تحقیق.

استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت آن

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های لپه‌ای تازه به طور جداگانه از هر تک بوته از هر جمعیت با استفاده از روش Sharp و همکاران (1988) صورت گرفت. به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA، یک یا دو میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی استخراج شده در کنار DNA استاندارد لامبدا بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد. پس از تخمین غلظت، با افزودن آب دوبار تقطیر شدهٔ استریل، محلول مصرفی DNA برای هر نمونه با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد.

آزمایشات RAPD

به منظور انتخاب آغازگرهای RAPD که DNA الگو را به خوبی تکثیر نموده و چند شکلی بالایی در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان می‌دهند، ۳۸ آغازگر ده نوکلئوتیدی RAPD سری TIB MOLBIOL بر روی ۴ نمونه DNA مورد مطالعه قرار گرفتند و از میان آنها ۱۵ آغازگر انتخاب شد. حجم نهایی هر مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۵ میکرولیتر بود که محتوی ۱ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر،۱ میکرولیتر آغاز گر تصادفی RAPD با غلظت ۰/۲ میکرو مولار، ۷/۵ میکرولیتر کیت PCR (MgCl۲ ۱/۵mM- *Taq* DNA polymerase master mix) از شرکت آریا طب ژن (ایران) و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. چرخه‌های حرارتی تکثیر شامل: یک دورهٔ ۴ دقیقه‌ای دمای ۹۴ °C ، ۳۵ دوره در دماهای۹۴°C یک دقیقه ۳۷ °C یک دقیقه و۷۲ °C دو دقیقه و یک دورهٔ ۱۰ دقیقه‌ای دمای۷۲ °C بود که توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad, USA) اجرا شد. الکتروفورز فراورده های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ تهیه شده با بافر تریس بوریک اسید- EDTA (۱X) ، به مدت ۱۴۰ دقیقه و شدت جریان ۷۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت.

سپس ژل آگاروز در محلول اتیدیم بروماید ۰/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه مخصوص عکس برداری از ژل[۴]، تحت نور UV قطعات تکثیر یافته DNA مشاهده و عکس برداری از آنها صورت گرفت. اندازهٔ قطعات با کمک نشانگر اندازه ۱kb محصول شرکت فرمنتاز[۵] تخمین زده شدند. به منظور افزایش تکرار پذیری رپید، آزمایش برای هر پرایمر در دو تکرار انجام و تنها باندهای واضح و پایدار نمره دهی شدند.

تجزیه‌های آماری

در مرحله نمره‌دهی، قطعات تکثیر شده توسط آغازگرها در محدودهٔ ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز مورد بررسی قرار گرفتند. در باندهای ایجاد شده به حضور هر قطعه عدد یک و عدم حضور قطعه عدد صفر داده شد. پس از تهیه ماتریس صفر و یک، با کمک نرم افزار NTSYS-pc, Version 2.1 (Rohlf, 2000) ماتریس فواصل ژنتیکی بین افراد توسط روش نی (Nei, 1972) محاسبه شد و بر اساس تجزیه خوشه‌ای حاصل از این ماتریس، دندروگرام به روش UPGMA[۶] ترسیم گردید (شکل ۴). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA[۷]) داده‌های RAPD نیز به منظور تعیین تشابه ژنتیکی افراد انجام و پلات دو بعدی جهت نمایش پراکنش افراد بر اساس فواصل ژنتیکی ترسیم گردید. هم‌چنین با استفاده از نرم افزار Popgene, Ver.1.31 (Yeh *et al.*, 1999) تجزیه‌های آماری ذیل صورت گرفت. تنوع ژنتیکی برای همه مکان‌های آللی به کمک آنالیز نی (Nei, 1987) محاسبه شد. در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های موثر (Kimura and Crow, 1963)، شاخص تنوع

ژنتیکی نی[8] (Nei, 1973) **و** شاخص اطلاعاتی شانون[9] (Lewontin, 1972)، برای هر یک از جمعیت‌ها محاسبه شد (جدول۲). هم‌چنین هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی کل $(H_t = H_s + D_{st})$ که در آن Dst هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌هاست، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها $(G_{st} = D_{st}/H_t)$ ، تخمین جریان ژنی از Gst یا Gcs (Nm) برای هر یک از مکان های آللی توسط نرم افزار Popgene محاسبه گردید (Nei, 1987) و با کمک Ht و Hs به دست آمده شاخص F_{ST} (Wright, 1951) ازطریق فرمول روبرو محاسبه شد (Lynch and Milligan, 1994):

$$Fst = 1 - \frac{Hs}{Ht}$$

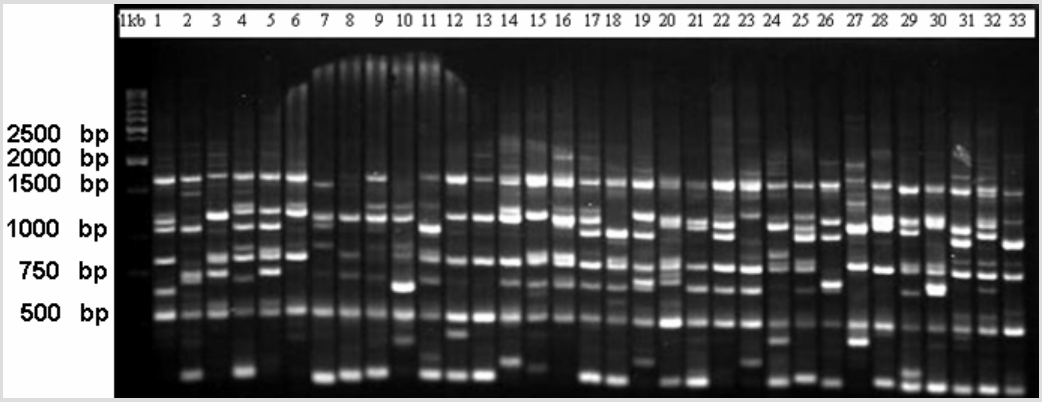
این شاخص ساختار و دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد (Wright, 1951).

نتایج

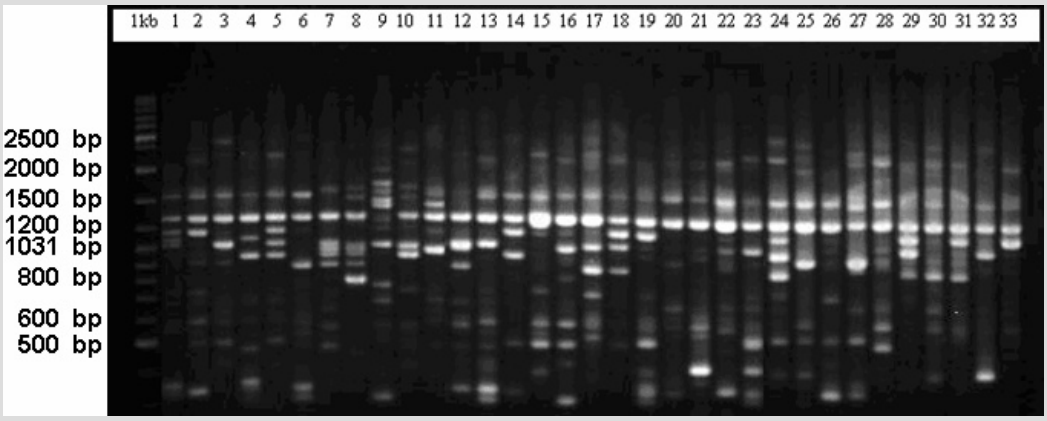
در این تحقیق، حاصل آزمایش ۱۵ آغازگر RAPD روی تک بوته‌های مربوط به ۶ جمعیت زیرهٔ پارسی، تکثیر ۲۲۹ باند بود که ۲۱۶ باند از آنها (۹۴٪) چند شکل بودند (جدول۱). میانگین چند شکلی حاصل از کاربرد هر آغازگر RAPD، ۱۴/۴ محاسبه شد. تعداد باندهای چند شکل حاصل از آزمایش آغازگرهای RAPD بر روی تک بوته‌های جمعیت‌های زیرهٔ پارسی در این آزمایش، از ۹ تا ۲۰ باند متغیر بود. در بین آغازگرها، بیشترین باند تکثیر شده توسط آغازگر TIBMBB-13 با ۲۲ باند تکثیر شده ایجاد شد که ۲۰ باند از آن‌ها چند شکل بودند (شکل ۲) و کمترین باند تکثیر شده مربوط به آغازگر TIBMBC-08 با ۹ باند تکثیر یافته بود که همه آن‌ها چند شکلی نشان دادند (شکل ۳).

جدول۱- آغازگرهای RAPD انتخاب شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی و درصد چندشکلی آن‌ها درجمعیت‌های زیره پارسی

آغازگر	توالی بازی	تعداد کل قطعات تکثیر شده (a)	تعداد قطعات چند شکل (b)	درصد چند شکلی
TIBMBA-02	5'TGCTCGGCTC3'	14	13	93
TIBMBA-03	5'GTGCGAGAAC3'	19	17	89
TIBMBA-06	5'GGACGACCGT3'	16	16	100
TIBMBA-09	5'GGAACTCCAC3'	16	15	94
TIBMBB-13	5'CTTCGGTGTG3'	22	20	91
TIBMBB-15	5'AAGTGCCCTG3'	15	14	93
TIBMBB-16	5'TCGGCACCGT3'	17	15	88
TIBMBB-17	5'ACACCGTGCC3'	16	15	94
TIBMBC-03	5'GGCTTGACCT3'	19	18	95
TIBMBC-05	5'GAGGCGATTG3'	12	11	92
TIBMBC-06	5'GAAGGCGAGA3'	14	13	93
TIBMBC-08	5'GGTCTTCCCT3'	9	9	100
TIBMBC-10	5'AACGTCGAGG3'	14	14	100
TIBMBC-12	5'CCTCCACCAG3'	14	14	100
TIBMBC-16	5'CTGGTGCTCA3'	12	12	100
میانگین	–	15.27	14.4	94
کل	–	229	216	–



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی در ۳۳ فرد از جمعیت‌های زیره پارسی توسط آغازگر TIBMBB-13 (شماره ها به ترتیب ذکر شده در جدول۲).



شکل ۳- الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی در ۳۳ فرد از جمعیت‌های زیره پارسی توسط آغازگر TIBMBC-08 (شماره ها به ترتیب ذکر شده در جدول۲).

تنوع داخل جمعیت‌های زیره پارسی با استفاده از میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون (جدول ۲) مورد مطالعه قرار گرفت که نشان داد تنوع ژنتیکی درون جمعیت الموت قزوین (I= ۰/۳۵ و h = ۰/۲۳) از سایر جمعیت‌ها بیشتر و در جمعیت سقفی اصفهان (I= ۰/۲۳ و h= ۰/۱۶) نسبت به سایر جمعیت‌ها کمتر است.

تعداد آلل‌های مشاهده شده (na) در جمعیت‌ها در دامنه‌ای بین ۱/۴۳۰ تا ۱/۶۷۶ و تعداد آلل‌های موثر(ne) در دامنه‌ای بین ۱/۲۷۴ تا ۱/۳۹۱ قرار داشت و نسبت آلل‌های موثر به آلل های مشاهده شده بین ۰/۸۱ تا ۰/۸۹ بود. تعداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت‌های الموت قزوین (۱/۶۷۵) و سیستان و بلوچستان (۱/۶۷۵) از سایر جمعیت‌ها بیشتر و در جمعیت سقفی اصفهان (۱/۴۳)

نسبت به سایر جمعیت‌ها از میزان کمتری برخوردار بود. در این بین تعداد آلل‌های موثر یعنی آلل‌هایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع خوبی می‌باشند در جمعیت الموت قزوین (۱/۳۹۱) بیشتر از سایر جمعیت‌ها و در جمعیت سقفی اصفهان (۱/۲۷۴) کمتر از دیگر جمعیت‌های مورد مطالعه بود. با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هر یک از جمعیت‌ها از طریق محاسبه نسبت آلل‌های موثر به آلل‌های مشاهده شده تعیین گردید. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار این نسبت در جمعیت سقفی اصفهان، (۸۹ درصد) و کم‌ترین آن در جمعیت سیرچ کرمان (۸۱ درصد) بدست آمده است.

در این مطالعه میزان Ht، Hs، Gst و Nm به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۲۰، ۰/۲۲ و ۱/۷۸ به دست آمد و با استفاده از Ht و Hs بدست آمده، شاخص F_{ST} محاسبه و برابر با ۰/۲۲ بدست آمد. انحراف معیار استاندارد[۱۰] مربوط به تنوع در داخل جمعیت‌ها در جمعیت سقفی اصفهان (۰/۱۹۹) از سایر جمعیت‌ها بیشتر بود. کم‌ترین انحراف معیار استاندارد نیز در جمعیت سیستان و بلوچستان (۰/۱۸۷) بود. میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس آنالیز نی (Nei, 1972) ۰/۰۹ بدست آمد. دامنه فواصل ژنتیکی بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ متغیر بود که کم‌ترین آن بین جمعیت‌های سیرچ و درین از استان کرمان مشاهده شد. آنالیز کلاستر بر اساس ماتریس تشابه ژنتیکی انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید (شکل۴). در اکثر موارد افراد مختلف هر جمعیت در گروه‌های متفاوت همراه با افرادی از جمعیت‌های دیگر قرار گرفته‌اند. تجزیه به مختصات اصلی به عنوان روش مکمل آنالیز کلاستر انجام شد. الگوی توزیع افراد مورد مطالعه در دندروگرام بوسیله پلات دوبعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز تایید گردید (شکل ۵). هم‌چنین عامل‌های اول و دوم بدست آمده به ترتیب ۱۶/۳ و ۱۱/۳ از واریانس کل را توجیه نمودند.

جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های زیره پارسی مورد مطالعه

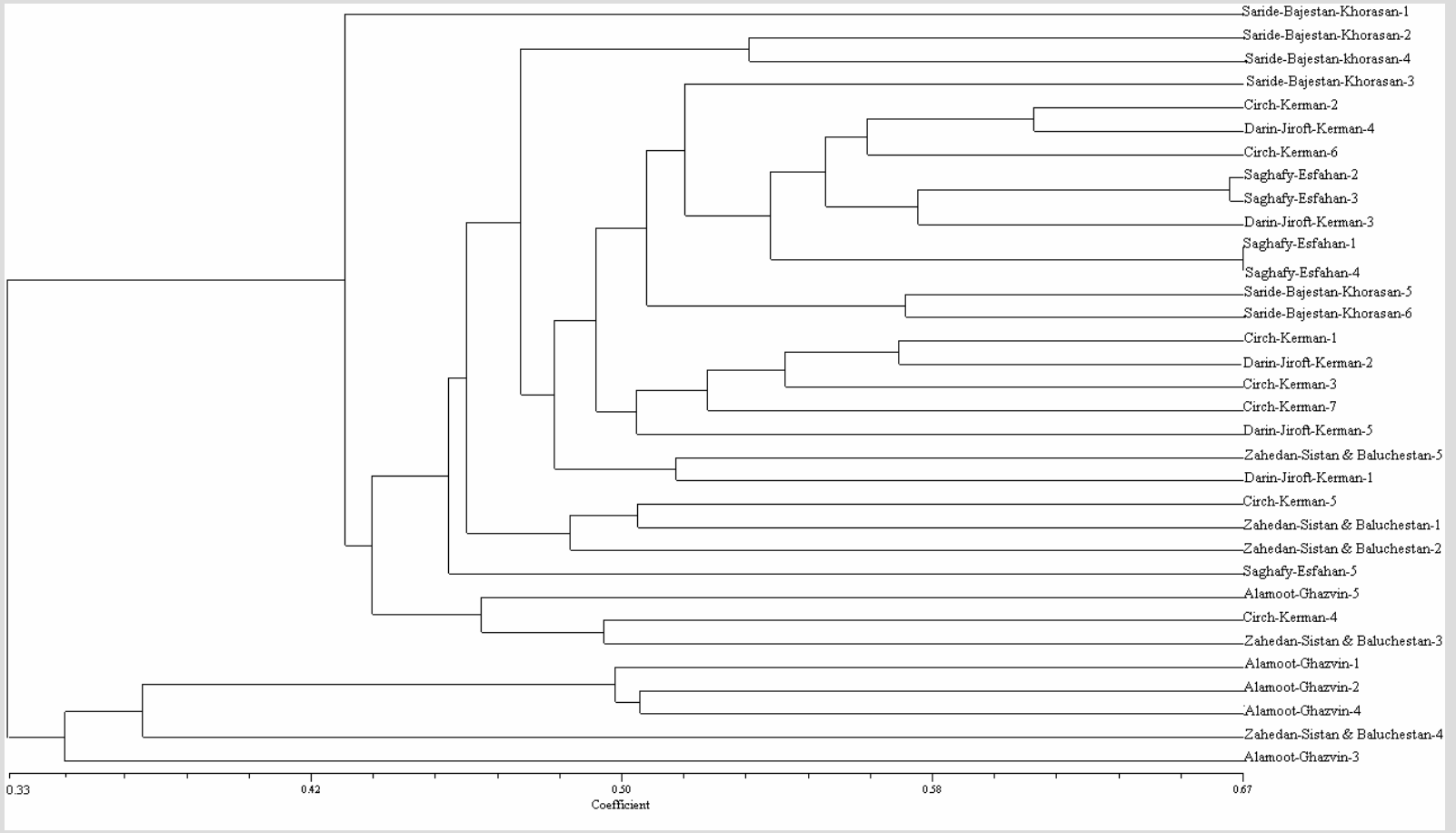
جمعیت	شماره	تعداد تک بوته	تعداد آلل‌های مشاهده شده (na)	تعداد آلل‌های موثر (ne)	$\frac{ne}{na}\times 100$	شاخص شانون (h)	تنوع ژنتیکی نی (I)
سریده- بجستان- خراسان	1-6	6	1/550	1/330	86 %	0/194	0/291
الموت – قزوین	7-11	5	1/675	1/391	83 %	0/233	0/352
سیرچ – کرمان	12-18	7	1/615	1/317	81 %	0/191	0/293
سقفی – اصفهان	19-23	5	1/430	1/274	89 %	0/157	0/234
سیستان و بلوچستان	24-28	5	1/675	1/375	82 %	0/225	0/342
درین – جیرفت، کرمان	29-33	5	1/546	1/326	86 %	0/190	0/286

جدول ۳- ماتریش تشابه ژنتیکی ۳۳ فرد گیاه متعلق به جمعیتهای مختلف زیره پارسی بر اساس ضریب تشابه جاکارد

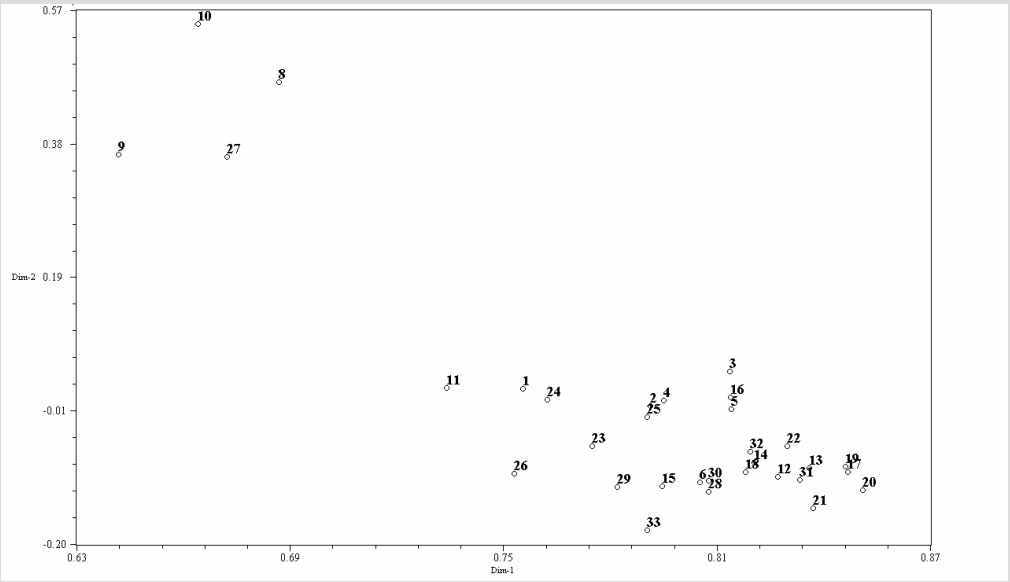
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1/00																
2	0/45	1/00															
3	0/51	0/51	1/00														
4	0/42	0/53	0/52	1/00													
5	0/45	0/50	0/52	0/53	1/00												
6	0/41	0/46	0/48	0/50	0/58	1/00											
7	0/27	0/30	0/36	0/32	0/31	0/31	1/00										
8	0/33	0/36	0/38	0/35	0/40	0/32	0/50	1/00									
9	0/33	0/36	0/36	0/30	0/35	0/29	0/35	0/32	1/00								
10	0/34	0/34	0/35	0/38	0/33	0/32	0/50	0/50	0/36	1/00							
11	0/41	0/37	0/39	0/38	0/37	0/41	0/27	0/31	0/33	0/34	1/00						
12	0/44	0/48	0/51	0/43	0/43	0/46	0/35	0/37	0/27	0/32	0/44	1/00					
13	0/42	0/49	0/54	0/52	0/52	0/51	0/34	0/36	0/31	0/34	0/39	0/55	1/00				
14	0/43	0/50	0/49	0/48	0/49	0/46	0/29	0/39	0/29	0/34	0/47	0/52	0/50	1/00			
15	0/38	0/46	0/46	0/43	0/47	0/47	0/27	0/35	0/34	0/31	0/47	0/50	0/46	0/51	1/00		
16	0/43	0/41	0/46	0/43	0/49	0/46	0/33	0/38	0/35	0/36	0/45	0/46	0/50	0/53	0/46	1/00	
17	0/46	0/54	0/51	0/50	0/50	0/49	0/35	0/36	0/34	0/34	0/43	0/57	0/58	0/52	0/49	0/53	1/00
18	0/43	0/49	0/46	0/44	0/47	0/48	0/31	0/37	0/34	0/34	0/40	0/53	0/48	0/52	0/52	0/50	0/54
19	0/42	0/45	0/53	0/48	0/52	0/52	0/33	0/36	0/35	0/35	0/39	0/50	0/51	0/50	0/51	0/53	0/58
20	0/47	0/47	0/55	0/52	0/50	0/50	0/33	0/35	0/33	0/34	0/41	0/54	0/61	0/50	0/48	0/44	0/55
21	0/38	0/48	0/50	0/50	0/47	0/56	0/33	0/34	0/32	0/31	0/41	0/54	0/56	0/50	0/53	0/47	0/57
22	0/42	0/46	0/50	0/46	0/49	0/50	0/33	0/36	0/34	0/36	0/41	0/49	0/52	0/51	0/43	0/52	0/54
23	0/40	0/43	0/41	0/42	0/39	0/42	0/30	0/34	0/29	0/35	0/39	0/52	0/49	0/45	0/40	0/43	0/50
24	0/38	0/39	0/41	0/40	0/40	0/43	0/32	0/33	0/37	0/32	0/39	0/43	0/43	0/42	0/40	0/50	0/46
25	0/40	0/48	0/45	0/43	0/44	0/38	0/31	0/33	0/34	0/32	0/41	0/49	0/44	0/46	0/43	0/49	0/46
26	0/38	0/36	0/38	0/40	0/45	0/45	0/28	0/32	0/32	0/28	0/45	0/41	0/40	0/38	0/49	0/47	0/45
27	0/37	0/36	0/41	0/37	0/39	0/35	0/34	0/37	0/37	0/41	0/34	0/36	0/35	0/36	0/31	0/39	0/32
28	0/47	0/41	0/45	0/48	0/53	0/46	0/27	0/36	0/32	0/31	0/39	0/51	0/53	0/48	0/48	0/50	0/47
29	0/41	0/39	0/43	0/40	0/45	0/50	0/28	0/30	0/36	0/30	0/40	0/46	0/46	0/47	0/45	0/45	0/55
30	0/36	0/45	0/42	0/41	0/43	0/47	0/30	0/38	0/28	0/30	0/37	0/57	0/49	0/57	0/46	0/50	0/50
31	0/46	0/46	0/51	0/47	0/52	0/52	0/29	0/37	0/33	0/33	0/39	0/54	0/56	0/50	0/46	0/48	0/50
32	0/43	0/45	0/49	0/45	0/50	0/50	0/31	0/37	0/31	0/37	0/38	0/50	0/61	0/48	0/48	0/51	0/55
33	0/45	0/47	0/40	0/48	0/45	0/46	0/23	0/33	0/28	0/31	0/41	0/51	0/48	0/52	0/45	0/42	0/48

ادامه جدول ۳

	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
18	1/00															
19	0/55	1/00														
20	0/50	0/56	1/00													
21	0/50	0/56	0/66	1/00												
22	0/49	0/67	0/57	0/50	1/00											
23	0/45	0/52	0/53	0/45	0/53	1/00										
24	0/46	0/48	0/46	0/41	0/45	0/40	1/00									
25	0/48	0/49	0/50	0/48	0/47	0/48	0/48	1/00								
26	0/41	0/49	0/46	0/47	0/45	0/41	0/42	0/44	1/00							
27	0/30	0/34	0/37	0/35	0/34	0/29	0/30	0/38	0/28	1/00						
28	0/48	0/50	0/54	0/50	0/46	0/41	0/46	0/43	0/47	0/33	1/00					
29	0/49	0/48	0/49	0/52	0/44	0/40	0/41	0/45	0/41	0/32	0/51	1/00				
30	0/52	0/51	0/48	0/50	0/53	0/47	0/48	0/50	0/44	0/38	0/48	0/47	1/00			
31	0/50	0/56	0/57	0/59	0/55	0/42	0/47	0/51	0/46	0/38	0/50	0/45	0/50	1/00		
32	0/53	0/53	0/54	0/55	0/50	0/42	0/44	0/44	0/42	0/34	0/49	0/42	0/47	0/56	1/00	
33	0/50	0/44	0/57	0/49	0/49	0/46	0/40	0/42	0/38	0/33	0/50	0/47	0/49	0/50	0/46	1/00



شکل ٤- تجزیه کلاستر ۳۳ فرد گیاه متعلق به جمعیت‌های مختلف زیره پارسی بر اساس ماتریس تشابه حاصل از داده‌های RAPD



شکل ۵- گروه‌بندی ۳۳ فرد گیاه متعلق به جمعیت‌های مختلف زیره پارسی بر اساس تجزیه پلات دو بعدی داده‌های RAPD (شماره ها به ترتیب ذکر شده در جدول ۲).

بحث

میزان بالای چند شکلی بدست آمده در الگوهای باندی آغازگرهایRAPD نشان داد که RAPD تکنیک مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زیره پارسی است. آغازگرهای مختلف RAPD قدرت متفاوتی در شناسایی چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی داشتند.

دامنه کوچک تغییر آلل‌های موثر و آلل‌های مشاهده شده نشان‌دهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها در بین جمعیت‌ها است و این که جمعیت‌ها تقریباً در سطح یکنواختی از توزیع آللی قرار دارند. بنا به قانون هاردی- وینبرگ در جمعیت‌های دگر گرده افشان متعادل فراوانی ژنی و ژنوتیپی در غیاب گزینش، موتاسیون و مهاجرت از نسلی به نسل دیگر تغییر نمی‌کند و رابطه بین آنها ثابت بوده و همواره از توزیع دو جمله‌ای $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ پیروی می‌نمایند. در هر ۶ جمعیت مورد مطالعه، آلل‌های موثر یعنی نسبت آلل‌هایی که فراوانی برابر دارند به کل آلل ها بالای ۸۰ درصد می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که با پیروی از قانون هاردی- وینبرگ[11]، توزیع آللی درون جمعیت‌های مورد مطالعه نسبتاً برابر است و جمعیت‌ها از نظر فراوانی آللی دارای توزیع متعادل هستند (Kimura and Crow, 1963).

روش‌های زیادی جهت محاسبه تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها وجود دارد که یکی از آن‌ها محاسبه شاخص F می‌باشد، این شاخص که توسط Wright[12] در سال ۱۹۵۱ ابداع گردید شامل ۳ شاخص F_{IT} (همبستگی ژن‌های افراد در کل جمعیت‌ها)، F_{IS} (همبستگی ژن‌های افراد درون جمعیت‌ها) و

F_{ST} (همبستگی ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت) می‌باشد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی‌که افراد از نظر آللی کاملاً متفاوت باشند این مقدار برابر با یک می‌شود (Weir, 1996). شاخص F_{ST} برای مطالعه تفاوت بین جمعیت‌ها نیز به کار می رود. در مطالعه جمعیت‌ها اگر میزان F_{ST} بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ به دست بیاید F_{ST} بالایی دارند که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند. مقدار بدست آمده برای شاخص F_{ST} در این مطالعه نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند و در بین آنها تلاقی تصادفی و مهاجرت صورت نمی‌گیرد. این جمعیت‌ها دارای تکامل مستقل هستند و از نظرساختاری (فراوانی آللی) شباهتی با هم ندارند (Weir, 1996).

میانگین ضریب فاصله ژنتیکی بدست آمده بین جمعیت‌ها بر اساس آنالیز نی (Nei, 1972) منطبق بر فاصله جغرافیایی بود چنان‌که کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین نزدیک‌ترین جمعیت‌ها بدست آمد. بر اساس آنالیز کلاستر، در اکثر موارد افراد مختلف هر جمعیت در گروه‌های متفاوت همراه با افرادی از جمعیت‌های دیگر قرار گرفته‌اند که این امر تنوع بالای ژنتیکی درون جمعیت‌ها و نبود واگرایی ژنتیکی بین آنها را نشان می‌دهد. هم‌چنین مقادیر پایین واریانس بدست آمده از عامل های اول و دوم در تجزیه به مختصات اصلی نشان‌دهنده توزیع مناسب نشانگرهای مورد مطالعه در کل ژنوم می‌باشد.

با توجه به دگرگشنی در زیرهٔ پارسی، تنوع ژنتیکی بالایی درون جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده شد. همان‌طور که ذکر شد جمعیت‌های زیرهٔ پارسی در این تحقیق با فاصله ای بیش از ۳ کیلومتر نسبت به هم قرار داشتند، به همین دلیل دگرگشنی در این گیاه نمی‌تواند سبب انتقال ژرم پلاسم از یک جمعیت به جمعیت دیگر گردد. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین فاکتور از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهندهٔ جمعیت دارای پیچیدگی‌هایی است (Mohammadi and Prasanna, 2003). هم‌چنین این بررسی‌ها به تعداد افراد مورد بررسی در هر جمعیت، تعداد مکان‌های آللی مورد بررسی، موقعیت آللی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازهٔ جمعیت بستگی دارد (Namkoong, 1988, Nei and Chesser, 1983, Weir, 1990).

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق، تنوع بالایی را درون و بین جمعیت‌های زیرهٔ پارسی نشان داد. وجود تنوع بالا در جمعیت‌های گیاهی مختلف گزارش شده است. Bradeen و همکاران (2002) و هم‌چنین Shim و Jorgensen (2000) تنوع وسیعی درون جمعیت‌های هویج مورد بررسی گزارش نمودند. Kiani و همکاران (2008) نیز تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را در جمعیت‌های مختلف رز ایرانی گزارش کردند.

میزان بالای تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های زیره پارسی در مطالعه حاضر در مرحله اول کارایی بالای تکنیک RAPD را در آنالیز ژنوم این گیاه آشکار می‌سازد. از طرف دیگر حضور چنین تنوعی با توجه به باززایی گیاه از طریق بذر و طبیعت دگرگردافشان بودن آن قابل انتظار می‌باشد. حضور تنوع ژنتیکی بالا بین و درون جمعیت‌های این گیاه مشخص می کند که در برنامه جمع آوری و حفاظت ژرم پلاسم بذرهای باید چندین گیاه با توزیع مناسب در هر یک از جمعیت‌ها جمع آوری شوند. در حال حاضر بذرهای زیره پارسی فقط از رویشگاه‌های طبیعی توسط مردم محلی جمع آوری می‌شوند. تنوع ژنتیکی بالای جمعیت‌هایی که جزء مهم‌ترین مناطق رویش این گیاه هستند نشان می‌دهد که

برداشت از طبیعت نمی‌تواند منجر به کاهش تنوع و فرسایش ژنتیکی شود. این امر ممکن است به دلیل تعداد زیاد بذر در هر گیاه و ریزش بالای بذر قبل یا طی برداشت باشد. در سال‌های اخیر استفاده از اسانس زیره پارسی در صنایع دارویی و غذایی افزایش قابل توجهی یافته است. ترکیب اسانس گیاه تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد. میزان بالای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زیره پارسی می‌تواند منجر به تنوع در عطر و طعم و خواص دارویی آن شود (Heywood, 2002). برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی ضروری است که تنوع ژنتیکی موجود در جهت اصلاح ارقام همگن با ویژگی‌های مطلوب تولیدی و شیمیایی بکار رود. تنوع ژنتیکی بالا می‌تواند کارایی فرایند انتخاب در برنامه اهلی کردن و اصلاح گیاه به منظور رسیدن به ارقام با ویژگی‌های مطلوب را افزایش دهد.

پی‌نوشت‌ها

[1] - *Lolium perenne*

2- *Rosa damascena*

3- *Eryngium campestre*

4- Bio Doc-ItTM system CCD camera - UVP (Upland, U.S.A)

5-WWW. fermentas.com

6- Unweighted Pair- Group Method using an Arithmetic average

7- Principal coordinate analysis

8- Nei's gene diversity

9- Shannon's Information Index

10- Standard deviation

11- Hardy- Wienberg

12- Wright

منابع

Agriculture and Natural Resources Research Center (1997). *Collection and Identification of medicinal plants in Kerman (Final report)*. Saberamoli, S., Kerman, Ministry of Jahad Keshavarzi Pub.

Bradeen, J.M., I.C. Bach, M. Briard, V. Le. Clerc, D. Grzebelus, D.A. Senalik and P.W. Simon (2002). Molecular diversity analysis of cultivated carrot (Daucus carota L.) and wild Daucus populations reveals a genetically nonstructured composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 383-391.

Bylebyl, K., P. Poschlod and C. Reisch (2008). Genetic variation of Eryngium campestre L. (Apiaceae) in Central Europe. *Molecular Ecology* 17: 3379–3388.

Davic, R.H. (1997). RAPD characterization of heterogeneous perennial Ryegrass cultivars. *Crop Science*, 37: 557-561.

Devi, S. (2004). *Evaluation of Bunium persicum (Boiss.) Fedtsch. germplasm in Himachal Peradesh*. Ph.D Thesis- Parmar University of Horticulture and Forestry.

Farsi, M. and A. Bagheri (1999). *Principles of crop breeding*. Mashhad: Jahad-daneshgahi of Mashhad University Press.

Heywood V.H. (2002). *The conservation of genetic and chemical diversity in medicinal and aromatic plants*. In: Şener, B., Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. p. 13-22. New York: Springer Pub.

Kapila, R.K., K.S. Panwar and D. Badiyala (1997). Variation and association analysis in domesticated population of black caraway (Bunium persicum). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science 19: 709-711.

Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.

Namkoong, G. (1988). Sampling for germplasm collections. *Horticultural Science*, 23: 79-81.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283- 293.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 (12):3321-3323.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University press.

Nei, M. and R.K. Chesser (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, 47: 253-259.

Rohlf, F.J. (2000). *NTsys-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publications.

Salehi Sormaghi, M.H., G. Amin and S. Kaveh (2002). *Bunium persicum*. In: Iranian Herbal Pharmacopoeia. Ghasemi Dehkordi, N. (ed.), No. 2, pp. 426–432.Tehran: Ministry of Healths and Medical Education Pub.

Sasani, S., R. Tavakkol-Afshari, K. Poostini and F. Sharifzadeh (2007). Dormancy-breaking in Bunium persicum (Boiss.) seeds by cold stratification, dry storage and some phytohormones. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 38(1): 287-294.

Sharp, P.J., M. Kreis, P.R. Shewry and M.D. Gale (1988). Location of β-amylase sequences in

Khosravi, M. (1993). *Black cumin (Bunium persicum L.), Botany, Ecology and Evaluation of the possibility of production*. MS.c Thesis, The University of Ferdosi Mashhad, Faculty of Agriculture.

Kiani, M., Z. Zamani, A. Khalighi, R. Fatahi and D.H. Byrne (2008). Wide genetic diversity of Roza damascene Mill. germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 115 (4): 386-392.

Kimura, M. and J.F. Crow (1963). The measurement of effective population number. *Evolution*, 17: 279-288.

Lewontin R.C. (1972). *The apportionment of human diversity*. In: Dobzhansky, T., Hecht, M. K., Steere W.C., (Eds). Evolutionary Biology, 6. p. 381-398. New York: Appleton- Century- Crofts Pub.

Lynch, M. and B.G. Milligan (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.

Majeed, S. (2005). *Assessment of genetic divergence and in-vitro conservation in Bunium persicum (Boiss.) Fedtsch*. Ph.D Thesis- Parmar University of Horticulture and Forestry.

Mittal, R.K., R.K. Chahota, S.L. Gartan and G. Katna. (2006). Genetic variability and component analysis in kalazira (*Bunium persicum*) in dry temperate areas of North-western Himalayas. *Crop Improvement* 33: 202-204.

Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-

wheat and its relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 289-290.

Shim, S.I. and R.B. Jorgensen (2000). Genetic structure in cultivated and wild carrots (Daucus carota L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 227-233.

Weir, B.S. (1990). *Genetic data analysis*. Sunderland: Sinauer Associates Pub.

Weir, B.S. (1996). *Intraspecific differentiation*. In: D.M. Hillis et al. (Ed). Molecular systematics, 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates Pub. pp: 385- 403.

Williames, J.G.K., A.E. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.C. Tingey (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primer is useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 118: 6531-6535.

Wricke, G. and W.E. Weber (1986). *Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding*. Berlin: Walter de Gruyter and Co.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of European Genetics*, 15: 323-354.

Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle (1999). *Popgene, Version 1.31. Microsoft window- based freeware for population genetic analysis*. Edmonton: University of Alberta Pub.