دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ١٦، شمارهٔ ٢، صفحهٔ ٢٤٦-٢٣٨ (١٣٨٧)

مطالعه تنوع ژنتیکی توده های بومی زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss) ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

هدا هاشمی[1]، عباس صفرنژاد*[2] و عبدالرضا باقری[3]

١- کارشناس ارشد، دانشکده یا گروه دانشگاه فردوسی، مشهد.
٢*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، مشهد، پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com
٣- استاد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت:١٣٨٧/٣/١٩ تاریخ پذیرش:١٣٨٧/٩/١٨

چکیده

زیره پارسی(*Bunium persicum*) از جمله گیاهان دارویی با ارزش اقتصادی و صادراتی بالا می باشد و اولین قدم برای کارهای به نژادی، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین آنهاست. تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از نشانگرهای مولکولی روی این گیاه، منتشر نشده است. به منظور ارزیابی تنوع مولکولی بین ١٥ توده بومی زیره پارسی ایران و به جهت خطای حداقل، DNA ژنومی بصورت بالک (٤٠ گیاهچه از هر توده) با استفاده از روشCTAB با اندکی تغییر و افزایش مراحل شستشویDNA ، استخراج گردید. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی و سپس با ٢١ آغازگرRAPD تکثیر صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای POPGENE وNTSYS انجام و دندروگرام برپایه UPGMA ترسیم شد. با انجام واکنش PCR، تعداد ١٠٨ قطعه DNA تکثیرشده قابل ارزیابی در نمونه‌ها به دست آمد که ٤٥ باند، معادل٤١٪ باندها چندشکل بود. بر اساس داده‌های مولکولی، دامنه شباهت بین نمونه‌ها از ٠/٦٦ تا ٠/٩٣ متغیر بود. نتایج تجزیه داده‌های مولکولی با نتایج مورفولوژی و فواصل جغرافیایی آنها نیز منطبق بود، به طوری که در شباهت ژنتیکی ٨٥٪، نمونه‌های هر استان در شاخه‌های مشترکی قرار گرفتند. به طور کلی، بررسی تنوع در ژنوتیپهای زیره با استفاده از نشانگرRAPD نشان داد که این مارکر در شناسایی نواحی چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم پلاسم این گونه می تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی : زیره پارسی، گیاهان دارویی، تنوع ژنتیکی، مارکر ملکولی

مقدمه

زیره پارسی(بانام های: زیره سیاه، زیره کوهی، زیره کرمان) و با نام علمی *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch گیاهی علفی، دولپه ای چندساله، دیپلوئید (٢n=٢x=١٤) و خودگرده افشان با گلهایی هرمافرودیت است که در تیره چتریانApiaceae قرار دارد. محصول اقتصادی این گیاه، دانه (میوه شیزوکارپ) است که جهت مصارف دارویی و ادویه‌ای استفاده می‌شود و از هزاران سال قبل در فرهنگ غذایی مردم قسمتی از غرب آسیا، که زیستگاه این گیاه است، وجود دارد. بنابراین تجارت و مصرف آن تقریبا محدود به منطقه تولید طبیعی آن بوده است. در حال حاضر با حفظ ساختار طبیعی این گیاه،

Archive of SID

www.SID.ir

فن‌آوری تولید زراعی آن در کشور فراهم شده است (Sheidai and Ahmadian ۱۹۹۶، نادرنژاد و پورسیدی ۱۳۸۲).

خواب موجود در بذر زیره پارسی یکی از موانع گسترش کشت این محصول است. این خواب از نوع خواب رویان بوده و تنها استفاده از تیمار سرمایی به مدت حداقل ۴۵ روز، می تواند باعث جوانه زنی گیاه شود و سایر تیمارها از قبیل اسید جیبرلیک، سیتوکنین، آبشویی و تیمارهای نوری نمی توانند باعث شکست کامل خواب بذور این گیاه شوند، البته برخی فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی بر خواب آن اثر گذاشته و باعث کاهش دوره آن می‌شوند (Pouresmael & Sharifi, 2002).

تنوع ژنتیکی گیاهان طی هزاران سال ایجاد شده و در طبیعت به صورت پایدار باقی مانده است. توده های بومی یک گیاه، ژرم پلاسم مناسبی برای برنامه های اصلاحی می باشند. بانک‌های ژن با جمع‌آوری، شناسایی و ارزیابی دقیق و حفاظت از ذخایر توارثی و توده‌های گیاه، اطلاعات مورد نیاز محققان را تأمین می‌کنند. کشاورزی و تولید غذا نیز بستگی به استفاده از ژنوتیپ‌های گیاهی پرمحصول دارد. روش‌های متداول اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب از بین جوامع با تنوع ژنتیکی می‌باشد، بنابراین آگاهی از تنوع جمعیت پیش شرط اصلی و اولین گام در اصلاح گیاهان می‌باشد(فارسی و باقری ۱۳۷۷).

در حال حاضر بررسی تنوع و گروه‌بندی گیاهان بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌پذیرد. طی تحقیقی مراحل فنولوژی، عملکرد و اجزاء عملکرد و وضعیت مورفولوژی توده‌های زیره پارسی بررسی شد، که در برخی صفات از جمله طول بذر، عملکرد بذر در واحد سطح (متر مربع)، وزن هزار دانه، عملکرد اسانس و تعداد بوته های مستقر شده اختلاف معنی داری وجود داشت (عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸۴). در تحقیقاتی مشابه از مارکرهای مورفولوژیک برای بررسی تنوع ژنتیکی زیره پارسی استفاده شد(۱۹۹۷ Kapila *et a.l,* و۲۰۰۶ Mittal *et a.l,*). از مارکرهای ملکولی و نشانگرهای ملکولی در بررسی تنوع ژنتیکی گونه های مختلف داروئی، جنگلی و مرتعی استفاده گسترده‌ای شده است (کرمانی و همکاران، ۱۳۸۷، ذوالفقاری و همکاران، ۱۳۸۷، میرزایی ندوشن و همکاران ۱۳۸۰).

به طور کلی، با توجه به اینکه اندازه گیری صفات مورفولوژیک نیاز به صرف وقت و انرژی و همچنین هزینه زیادی دارد و به دلیل اثر محیط بر بیان ژن روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوتهای ژنتیکی نیست، بنابراین امروزه برای تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی استفاده می شود. در حال حاضر انواع نشانگرهای مولکولی نظیرRFLP، میکروستلایت و انواع روشهای مبتنی بر PCR در اختیار است. نشانگرRAPD از جمله نشانگرهای مبتنی بر PCR است که ضمن سهولت در استفاده از آن، نیاز به استفاده از مواد رادیواکتیو نداشته و برای انجام آن به مقدار کمی DNAی ژنومی نیاز است. در این روش با استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای پایین برای اتصال این آغازگرها به DNAی الگو می‌توان شرایط را برای تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی قطعات فراهم کرد، این روش علی‌رغم تکرارپذیری کم، یکی از روشهای تعیین تنوع ژنتیکی است (Simmon *et al.* 2006). این نشانگر برای تعیین تنوع ژنتیکی بسیاری گیاهان مانند گندم (Suvarna, 2001)، جو (Volis *et al.*, 2001 و Ildiko-Karasi *et al.*,

Archive of SID

www.SID.ir

2006)، و انار (Sarkhosh *et al.*, 2006) مورد استفاده قرار گرفته است.

اکثر مطالعاتی که تا به حال روی زیره پارسی صورت گرفته، عمدتا بر روی اسانس، خواص دارویی و جنبه‌های زراعی(عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸٤) ، کشت بافت (ولی زاده و همکاران، ۱۳۸٦و Valizadeh *et al.*, 2006) و مطالعات سیتوژنتیکی (نادرنژاد و پورسیدی، ۱۳۸۲) بوده است. عملیات به نژادی در زیره، در مقایسه با سایر محصولات زراعی از قدمت کمتری برخوردار است و فعالیت نسبتا جدیدی است. از آنجایی که مواد ژنتیکی مورد استفاده توده‌های بومی از مناطق مختلف جمع‌آوری شده است. بررسی تنوع در این توده‌ها، تفکیک و طبقه‌بندی آنها می‌تواند کمک موثری در روند اصلاحی این گیاه به حساب آید. لذا این بررسی با هدف ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی بین توده‌های بومی ایران با استفاده از مارکرهای مولکولیRAPD انجام شده است.

مواد و روشها

بذور ۱۵ توده زیره پارسی(جدول۱) به منظور دسترسی به گیاهچه‌های سه برگی برای استخراج DNA، در محیط کشت B5 بدون هورمون کشت شدند. سپس برای گذراندن خواب بذر و ظهور جوانه‌ها، نمونه‌ها به مدت حدود سه ماه در تیمار سرمایی٤ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس جهت رشد و نمو برگها به اتاقک کشت تحت کنترل با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، با برنامه نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Bonyanpour *et al., 2001* و Sharifi, 2002 & Pouresmael). DNA ژنومی بصورت بالک (٤۰ گیاهچه از هر توده) با استفاده از روشCTAB بهینه شده برای این گیاه، استخراج شد (هاشمی و همکاران، ۱۳۸۵). جهت تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. سپس تکثیر قطعات در PCR با ۲۱ آغازگرتصادفی (Cinagene) RAPD صورت گرفت(جدول۲). واکنش‌های تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر در دو تکرار همراه با نمونه کنترل منفی انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل µL ۲/۵ از بافرPCR با غلظت 10x ،۵۰ نانوگرم DNA، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۵ /۰ میکرو مولار آغازگر، ۰/۲ میکرومول dNTPmix و نهایتا یک واحد *Taq* polymerase در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری بود.

دناتوره شدن اولیه در۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در۳۰ سیکل بعدی، دناتوره شدن در۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، سپس مرحله اتصال در دمای۳۵ درجه سانتیگراد به مدت۳۰ ثانیه و مرحله آخر یا مرحله گسترش در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه اعمال شد و سپس مرحله گسترش نهایی، جهت تکمیل رشته‌های دوتایی DNA در۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها در دمای٤ درجه سانتیگراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند محصولاتPCR به نسبت ۵ به ۱ با بافر(٦x Loading (مخلوط شده و الکتروفورز تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام گرفت. از DNA Ladder 1kbp (MBI Fermentus) و رنگ آمیزی اتیدیوم برماید ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر، به مدت ۱۰ دقیقه و سپس رنگ بری ۵ دقیقه با استفاده از آب مقطر برای تشخیص و مشاهده باندها استفاده گردید. عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation UVP و توسط نرم‌افزار Gene Scan انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه های مختلف بر اساس باندهای پدیدار شده روی ژل آگارز با منظور نمودن یک برای حضور باند و صفر برای غیاب باند مشابه مقایسه شدند. در برنامه Microsoft Excel ماتریس صفر و یک تهیه و از نرم افزارهای(v.32) POPGENE (بر پایه روش ضریب تشابه نی[1] و شانون[2]) و (v.2.02) NTSYS جهت محاسبه شباهت ژنتیکی استفاده شد. بر اساس فرمول اصلاح شده نی فاصله ژنتیکی میان تمام جفت نمونه ها محاسبه و ماتریس فاصله ها تشکیل شد. همچنین معیار آماری ضریب همبستگی کوفنتیک (r^3) نیز محاسبه شد که از طریق آن میزان شباهت بین ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفنتیک) با ماتریس تشابه سنجیده می شود. مدلMXCOMP برای محاسبه همبستگی کوفنتیک استفاده و ماتریکس تشابه توسط UPGMA[4] با استفاده از مدل کلاستری SAHN[5] آنالیز و نهایتا دندروگرام ترسیم شد.

نتایج

نتایج اولیه نشان داد که کشت بذر روی محیط کشت B5، روشی ساده برای تولید گیاهچه مناسب در تکثیر این گیاه در شرایط آزمایشگاه است. پروتکل مورد استفاده برای استخراج DNA برای قسمتهای مختلف گیاه (برگ، بذر، کالوس، پوست غده، مغز غده) آزمایش و تائید شد. در واکنش PCR، تعداد ۱۰۸ قطعه DNA تکثیرشده قابل ارزیابی از نمونه‌ها به دست آمد که ٤٥ باند (٤١٪ باندها) چندشکل بودند. آغازگرهای مختلف بین ۲ تا ۹ باند تولید کردند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر۵/۱ و میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر جفت آغازگر۲/۱٤ بود. بسته به نوع آغازگر تعداد باند چندشکل از۱ تا ٦ باند متغیر بود. بیشترین چند شکلی را آغازگر OPB17 با توالی ۵´ CGA CTG CAG T ۳´ از خود نشان داد (شکل۱)

بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی جفت نمونه های استان کرمان (بردسیرN12 وکوههای جوپارN11) در کمترین فاصله ژنتیکی (۰/92 شباهت) و نمونه های جنگل خواجه خراسان N15 و سیاه کوه استان مرکزی N8 در دورترین فاصله نسبت به هم (۰/66 شباهت) قرار داشتند (جدول۳)، که در مقایسه نتایج آنالیز داده‌های مولکولی، با نتایج حاصله از داده‌های مورفولوژیکی (عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸٤) مشخص شد که این دو نمونه در بررسی‌های میانگین و درصد عملکرد اسانس توده‌های زیره پارسی ایران نیز دارای بیشترین اختلاف بوده‌اند. همچنین نمونه‌های کوه لاخسه مهریز استان یزد N9 و کوه‌های جوپار استان کرمانN11 دارای بیشترین شباهت در عملکرد بذر (شباهت خیلی معنی دار) بودند که این مسئله در دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی هم با ۹۳٪ شباهت تایید شد (شکل۲). همچنین فاصله ژنتیکی بین دو نمونه از استان‌های مجاور، نمونه استان سمنان N4 و نمونه‌های استان خراسان (N5,N13,N14,N15)، نمونه بابا امان بجنوردN5 که بین چهار نمونه استان خراسان، از نظر فاصله جغرافیایی هم کمترین فاصله را با سمنان دارند، بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/87) وجود داشت. بین نمونه‌های جنگل خواجه استان خراسانN5 و توده کوه‌های جوپار کرمان N11 نیز فاصله ژنتیکی بالایی وجود داشت که این دو توده در بررسی‌های

1 Nei' coefficient
2 Shannon's Information index
3 Cophenetic correlation coefficient
4 Unweighted pairs group method using arithmetic average
5 Sequential agglomerative hierarchical, nested clustering

Archive of SID

www.SID.ir

عسگرزاده و همکاران (۱۳۸٤) روی خصوصیات مورفولوژیکی، عملکرد و اجزای عملکرد هم بالاترین تفاوت را از خود نشان دادند.

میانگین تنوع ژنی Nei ۰/۱۸ به دست آمد که به طور متوسط بیانگر ۱۸٪ تنوع و تفاوت در نمونه‌هاست که این مقدار در دندروگرام‌ها هم تائید شد. شاخص اطلاعاتی شانون هم که شاخصی دیگر از تنوع است ۰/۲۷۳ به دست آمد. همچنین ضریب کوفنتیک محاسبه شده (r=۰/۹۱)، که در ارزیابی ها جز رده خیلی خوب به حساب می‌آید.

در دندروگرام ترسیم شده در فاصله ژنتیکی ۸۵٪، نمونه‌ها بر اساس استان‌های مربوطه در شاخه‌های مجزایی قرار گرفتند. از آنجایی که نمونه‌ها توده‌های بومی مناطق بوده است، همان طور که انتظار می‌رفت میان پراکنش جغرافیایی و فواصل ژنتیکی رابطه مستقیمی وجود دارد و نمونه‌هایی که در یک ناحیه جغرافیایی هستند، در یک گروه یا گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند (شکل۲). به عنوان مثال نمونه‌های استان کرمان بالای ۸۷٪ ، نمونه‌های استان اصفهان بالای ۸۳٪ و نمونه‌های استان‌های خراسان بالای ۸۰٪ با هم شباهت داشتند. البته نمونه جنگل خواجه استان خراسان در فاصله دورتری جای گرفت که احتمالا به علت تنوع بالای درون توده‌ای و یا خطای احتمالی در جمع‌آوری بذور می‌باشد. نهایتا، نمونه سیاه کوه استان مرکزی دارای کمترین شباهت به سایر نمونه‌ها بوده و در سطح شباهت ۷۵٪، از سایر نمونه‌ها جدا و در شاخه مجزایی قرار گرفت که احتمالا به علت تنوع بالای درون توده‌های می‌باشد، که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

با توجه به تنوع به دست آمده بین توده‌های مورد بررسی و نظر به اینکه زیره پارسی گیاهی خود بارور است، در مراحل بعدی از نتایج این تحقیق می‌توان جهت اصلاح گیاه با روشهای گزینش که برای اصلاح گیاهان بومی کاربرد فراوان دارد، استفاده کرد. معمولا در اصلاح به روش بدون دو رگ گیری در گیاهان خودبارور، از دو روش گزینش توده‌ای[1] و گزینش لاین‌های خالص[2] استفاده می شود که کارایی این روش‌ها به میزان تنوع ژنتیکی بستگی دارد (فارسی، ۱۳۷۷).

به طور کلی، بررسی تنوع در توده‌های زیره با استفاده از نشانگرRAPD نشان داد که این مارکر در شناسایی نواحی چند شکلی و مدیریت ژرم پلاسم می تواند مفید باشد. بنابراین به نظر می‌رسد این نشانگر مولکولی را می‌توان به عنوان یک ابزار مفید در بررسی فاصله ژنتیکی و تفاوت بین نمونه‌های مختلف زیره پارسی مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

از مدیریت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی که امکان اجرای این تحقیق را فراهم نمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع مورد استفاده

-ذوالفقاری، ر. اکبری نیا، م. مردی م. و فائزه قناتی. ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی بلوط ایرانی *Quercus branti* Lindl. در جوامع مختلف ارتفاعی استان کهکیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره (SSR). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. همین شماره.، ۱٦(۲):۱۸۲-۱۷۳
-عسکرزاده، م.، غلامی، ب. و نگاری ع.، ۱۳۸٤. بررسی عملکرد کمی و کیفی اکوتیپ‌های زیره کوهی (*Bunium persicum*)

1 Mass Selection
2 Pure Line Selection

Archive of SID
www.SID.ir

کشور در شرایط آب و هوایی مشهد. همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی. مشهد.

–کرمانی، م.، مرعشی، س. ح.، صفر نژاد، ع. ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین دو گونه از جنس *Cuminum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. همین شماره، ۱۶(۲):۲۰۷-۱۹۹.

–فارسی، م. و باقری، ع. ، ۱۳۷۷. اصول اصلاح نباتات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۳۰صفحه.

–نادرنژاد، ن. و پورسیدی، ش.، ۱۳۸۲. تاکسونومی عددی برخی جمعیت‌های زیره ایران در جنس‌های Bunium, Carum Cuminum, بر اساس صفات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۱۶: ۱۵-۱۰.

–میرزایی ندوشن، ح. شریعت آ و اسدی کرم، ف. ۱۳۸۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیتهای مختلف تاغ (*Haloxylon sp.*) با استفاده از الکتروفورز. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی، ۷ : ۹۹-۱۱۷.

–ولی زاده، م.، صفرنژاد، ع.، نعمت زاده، غ. و کاظمی تبار، ک.، ۱۳۸۶. باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch) با استفاده از ریزنمونه محور جنینی. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۳۳-۳۹:۴۲.

–هاشمی، ه.، صفرنژاد، ع. وکاظمی تبار، ک.، ۱۳۸۵. بهینه سازی استخراج DNA ژنومیک در گیاه دارویی زیره پارسی (*Bunium persicum*). چهاردهمین کنفرانس سراسری و دومین کنفرانس بین‌المللی زیست‌شناسی ایران. دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

–Bonyanpour, A.R. and Khosh-Khui, M., 2001. Factors influencing seed germination and seedling growth in Black Zira *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 8:79-86.

–Ildiko-Karsai, K.M., Kuti, C., Banyai, J., Lang, L. and Bedo, Z., 2006. Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.) . South African Journal of Botany, 73:43-48.

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

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

–Pouresmael, M. and Sharifi, M., 2002. Dormancy-breaking in *Bunium persicum* (Boiss.) Fedtsch seeds by stratification and certain plant growth regulators. Annual Scientific Conference Botany,329.

–Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. and Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. Scientia Horticulturae, 111:24-29.

–Sheidai, M. and Ahmadian, P., 1996. Cytological studies in Iran Zira from three genus: *Bunium*, *Carum* and *Cuminum*. Cytologia, 61:19-25.

–Simmons, M.P., Zhang, L.B., Webb, C.T. and Muller, K., 2006. A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution. In press.

–Suvarna, T.T., 2001. Molecular analysis of wheat genome using ISSR and RAPD markers. a biochemistry MSc thesis, University of Pune, India.

–Valizadeh, M., Safarnejad., A., Nematzadeh, G.A., and Kazemitabar, S.K., 2006. Regeneration of plantlet from embryo explants of (*Bunium persicum*) B. Fedtsch. Indian Journal of Crop Science, 1:93-96

–Volis, S., Yakubov, B., Shulginai, I., Ward, D., Zur, V., and Samuel, M., 2001. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. Biological Journal of the Linnean Society, 74: 289–303.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱: منشا جغرافیایی توده های بومی زیره های پارسی مورد استفاده در این تحقیق

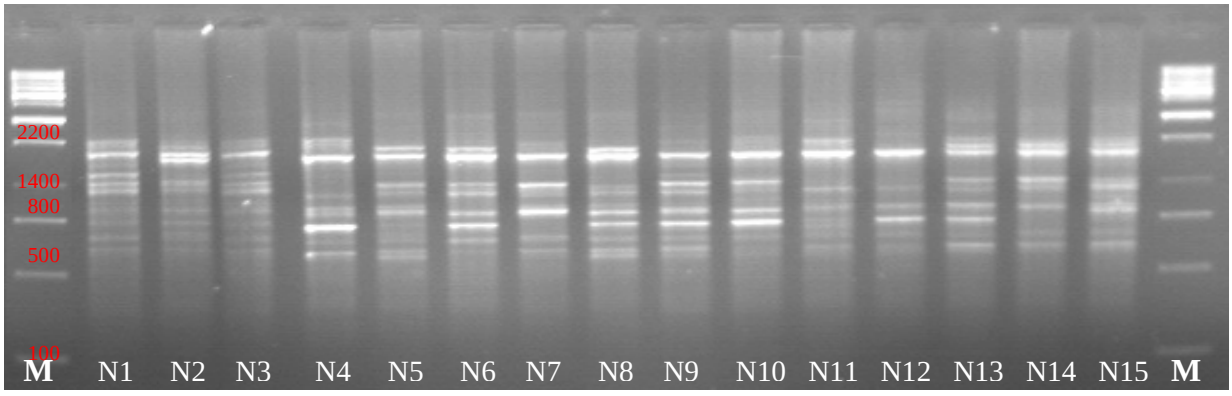
شماره نمونه	منشا (محل جمع آوری)	شماره نمونه	منشا (محل جمع آوری)
N۱	استان فارس (کوه تودج استهبان شیراز)	N۹	استان یزد (کوه لاخسه مهریز)
N۲	استان اصفهان (خونچ)	N۱۰	استان کرمان (سیرچ)
N۳	استان اصفهان (جندق)	N۱۱	استان کرمان (کوه‌های جوپار)
N٤	استان سمنان (کوه زر دامغان)	N۱۲	استان کرمان (بردسیر)
N٥	استان خراسان شمالی (بابا امان بجنورد)	N۱۳	استان خراسان رضوی (فریزی چناران)
N٦	استان قزوین (کوه‌های الموت)	N۱٤	استان خراسان رضوی (چلمیر درگز)
N۷	استان هرمزگان(کوه گنو بندرعباس)	N۱٥	استان خراسان رضوی (جنگل خواجه)
N۸	استان مرکزی (سیاه کوه)		

جدول۲ : کد و توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق

کد آغازگر	توالی آغازگر	کد آغازگر	توالی آغازگر
OPU12	٥´ TCA CCA GCC A ٣´	OPE7	٥´AGA TGC AGC C ٣´
OPS17	٥´ TGG GGA CCA C ٣´	OPJ20	٥´ AAG CGG CCT C ٣´
OPU6	٥´ ACC TTT GCG G ٣´	OPK14	٥´ GAC GGA TCA G ٣´
OPJ21	٥´ ACG AGG GAC T ٣´	OPU20	٥´ ACA GCC CCC A ٣´
OPA9	٥´ GGG TAA CGC C ٣´	OPJ1	٥´ CCC GGC ATA A ٣´
OPC8	٥´ TGG ACC GGT G ٣´	OPJ19	٥´ GGA CAC CAC T ٣´
OPJ18	٥´ TGG TCG CAG A ٣´	OPF5	٥´ CCG AAT TCC C ٣´
OPP6	٥´ GTG GGC TGA C ٣´	OPB17	٥´ CGA CTG CAG T ٣´
OPC13	٥´ AAG CCT CGT C ٣´	OPD7	٥´ TGT CTG GGT G ٣´
OPI14	٥´ TGA CGG CGG T ٣´	OPP7	٥´ GTC CAT GCC A ٣´
OPQ6	٥´ GAG CGC CTT G ٣´	OPS17	٥´ TGG GGA CCA C ٣´
OPU12	٥´ TCA CCA GCC A ٣´		

Archive of SID

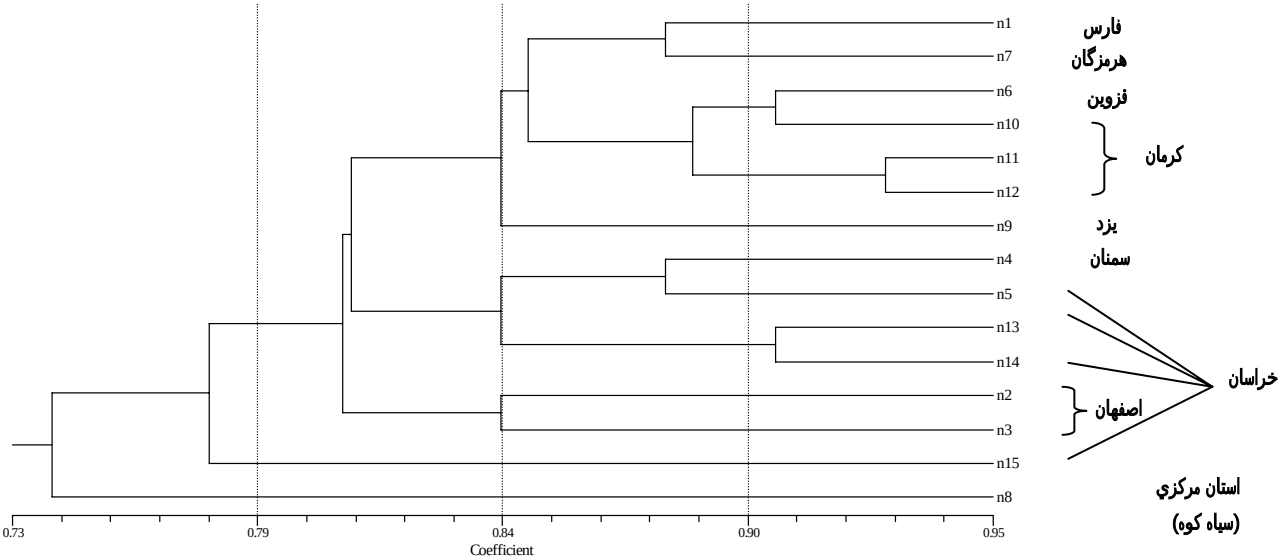
www.SID.ir



شکل۱: نمونه‌ای از الگوی RAPD به دست آمده با آغازگرOPB17. نمونه ها با ترتیب شماره از چپ به راست بارگذاری شده‌اند.

جدول۳: محاسبه میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه های مختلف

	NO 1	NO 2	NO 3	NO 4	NO 5	NO 6	NO 7	NO 8	NO 9	NO 10	NO 11	NO 12	NO 13	NO 14	NO 15
NO 1	1														
NO 2	0.86	1													
NO 3	0.85	0.83	1												
NO 4	0.82	0.76	0.77	1											
NO 5	0.85	0.81	0.82	0.87	1										
NO 6	0.85	0.81	0.85	0.8	0.87	1									
NO 7	0.87	0.76	0.82	0.75	0.82	0.87	1								
NO 8	0.76	0.7	0.71	0.66	0.71	0.79	0.79	1							
NO 9	0.82	0.69	0.8	0.72	0.77	0.82	0.85	0.81	1						
NO 10	0.77	0.76	0.8	0.77	0.82	0.9	0.8	0.76	0.8	1					
NO 11	0.85	0.76	0.82	0.75	0.82	0.87	0.85	0.76	0.85	0.87	1				
NO 12	0.87	0.76	0.85	0.8	0.85	0.9	0.87	0.79	0.87	0.87	**0.92**	1			
NO 13	0.79	0.8	0.83	0.76	0.86	0.83	0.79	0.7	0.76	0.83	0.83	0.83	1		
NO 14	0.81	0.77	0.83	0.83	0.88	0.83	0.76	0.7	0.71	0.79	0.81	0.83	0.9	1	
NO 15	0.74	0.8	0.76	0.79	0.81	0.76	0.71	**0.65**	0.71	0.79	0.79	0.79	0.8	0.77	1



شکل۲: دندروگرام حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی زیره پارسی با روشUPGMA

www.SID.ir

Investigation of genetic variation among Iran's Persian Zira (*Bunium persicu*m Boiss**) landraces using RAPD marker**

H. Hashemi[1], A.Safarnejad*[2], and A. Bagheri[3]

1 – MSc., Ferdowsi University, Mashhad, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assis. Prof. Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad., I.R.Iran.
E-Mail: sebre14@yahoo.com E-mail
3 – Prof., Ferdowsi University, Mashhad, I.R.Iran.

Received: 08.06.2008 Accepted: 08.12.2008

Abstract

Persian Zira (*Bunium persicum*) is one of the most important medicinal and economical plants. The first step for breeding purposes is to determine the genetic variation. There isn't any report on using molecular markers for evaluating genetic variation in Persian Zira. In order to evaluate the genetic variation the genomic DNA was extracted as a bulk method (40 plantlets of each landrace) using modified CTAB protocol with increasing DNA washing steps. The quality and quantity of DNA were examined using electrophoresis and spectrophotometry methods. Genetic variation of the plants was analyzed by RAPD molecular methods. Amplification with 21 random primers in PCR generated 108 reproducible bands, 45 of which were polymorphic (41%). Data were analyzed using NTSYS and POPGENE software and a dendrogram was drawn based on UPGMA results. On the basis of molecular data, the scope of samples ranged from 0.66 to 0.93. There was a direct relationship between genetic distance and geographical distribution and in 85% level of similarity. Samples of each province were classified in the same group. Finally, investigation of genetic variation on this species indicated that RAPD marker is suitable approach to determine the polymorphic loci and to estimate the genetic distance between the populations of the species.

Keywords: Persian Zira, *Bunium persicum*, Genetic variation, Medicinal plant, RAPD.

Archive of SID

www.SID.ir