دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ijrfpbgr.2018.120315.1287
جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۳۰۱-۲۹۲ (۱۳۹۷)

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره‌سبز خراسان با استفاده از نشانگرهای پروتئینی

محمد ضابط[۱*]، آتنا رحیمی[۲]، علی ایزانلو[۳] و زهره علیزاده[۳]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

پست الکترونیک: mzabet@birjand.ac.ir

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹

چکیده

زیره سبز یکی از قدیمی‌ترین و از نظر اقتصادی مهمترین گونه در خانواده چتریان است که بالاترین سطح زیر کشت در استان‌های خراسان را دارد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ زیره‌سبز با پراکندگی کامل از سه استان خراسان شمالی، رضوی و جنوبی توسط نشانگرهای پروتئینی بررسی گردید. بررسی تغییرات پروتئین با روش SDS-PAGE با طی مراحل استخراج پروتئین از بذر، تعیین غلظت نمونه‌ها و بعد انجام الکتروفورز انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بین و درون جمعیت‌ها تنوع وجود داشت. بر اساس نشانگر پروتئینی ۲۴ درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و ۷۶ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بود. درصد چندشکلی به‌دست آمده از نشانگر پروتئینی ۲۷ درصد، میانگین محتوای چندشکلی ۰/۰۱، میانگین شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۴۹ و میانگین شاخص اطلاعاتی نی ۰/۶۸ به‌دست آمد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول ۸۳ درصد از تغییرات را توجیه کردند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه اکوتیپ‌های مورد مطالعه را در پنج خوشه گروه‌بندی نمود. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیّت نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: آلل‌های مؤثر، الکتروفورز، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند. زیره‌سبز (*Cuminum cyminum* L.) یکی از گیاهان دارویی و مهمترین اعضای خانواده چتریان می‌باشد (Kafi *et al*., 2001). این گیاه در حالت دیپلوئید دارای فرمول ۲n=۲X=۱۴ است (Bagheri & Mahmoodi, 2002). زیره‌سبز کاربردهای دارویی بسیاری دارد که از آن به‌عنوان ضد تشنج، ضد نفخ، شیرافزا، تحریک‌کننده، اشتهاآور و در معالجه بی‌خوابی، سرماخوردگی و تب‌ها استفاده می‌شود (Khalilipoor, 2009).

افزایش در عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی نه تنها به عملیات به‌زراعی بلکه به تغییر ساختار ژنتیکی گیاه و به‌نژادی آن نیز ارتباط دارد. تنوع ژنتیکی پایه و اساس اصلاح گیاهان است که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است که سازگاری درازمدت و بقای جمعیت‌های گیاهی را تضمین می‌کند (Uzun & Yesiloglu, 2012). تخمین تنوع ژنتیکی

Archive of SID

www.SID.ir

مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آنها از گذشته‌های دور معمول بوده است. این تخمین معمولا بر اساس ارزیابی صفات زراعی و یا نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود (Rahman Poor *et al.*, 2014).

نشانگرهای پروتئینی قبل از ورود نشانگرهای DNA، قوی‌ترین سیستم نشانگری بودند (Farooq & Azam, 2002). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه به‌دلیل اینکه به‌میزان زیادی مستقل از نوسانهای محیطی هستند، برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارزشمندتر از پروتئین‌های رویشی می‌باشند و از آنجا که نوع و میزان پروتئین‌ها در بذرهای بالغ به‌مراتب ثابت‌تر از سایر بافت‌های گیاهی است (Magni *et al.*, 2007) و دارای چندشکلی بالایی بوده، بنابراین الگوی پروتئینی بذرها بر پایه حضور یا غیاب باندهای پروتئینی، تنوع ژنتیکی و مقایسه کیفی ارقام را تعیین می‌کند (Farshadfar, 2010).

تجزیه‌وتحلیل SDS- PAGE یکی از روش‌های عملی است که به‌مطالعه رابطه تکاملی گیاهان می‌پردازد (Ravi *et al.*, 2003) و ازجمله تکنیک‌های پر استفاده‌ای می‌باشد که در جداسازی و تشخیص پروتئین (Laemmli, 1970)، توصیف بیوشیمیایی جمعیت‌های گیاهی، شناسایی گونه‌ها و ارقام زراعی کارآیی بالایی دارد. هریک از باندهای حاصل شده در الکتروفورز، به‌منزله یک صفت تلقی می‌شوند (Guo, 2013). الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌ها یک منبع بر اساس نشانگرهای ژنومی تظاهر یافته است. پروتئین‌های مشخص در مکان‌های خود متنوع‌اند و تجزیه ژنتیکی آنها نشان می‌دهد که تک ژنی و هم‌بارز هستند (Bihamta *et al.*, 2009).

گوناگونی آنزیمی جمعیت‌های بابونه با استفاده از الگوی الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز در نه جمعیت از سه گونه *A. haussknechtti*، *A. psudocutula* و *A. triumfetti* مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *A. pseudocutula* و *A. triumfetti* و کمترین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *A. triumfetti* و *A. haussknechtii* مشاهده شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که گونه *A. pseudocutula* بیشترین فاصله را از دو گونه دیگر داشته و در تجزیه خوشه‌ای نیز در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت. البته بین داده‌های اکولوژیکی و فواصل ژنتیکی حاصل از تجزیه داده‌های آنزیمی همبستگی دیده نشد، ولی همبستگی بین طول و عرض جغرافیایی با فواصل ژنتیکی معنی‌دار بود. تفاوت در بین جمعیت‌ها ۱۸٪ و درون جمعیت‌ها ۴۴٪ بود (Zakeri *et al.*, 2014).

بررسی ارتباط نشانگرهای پروتئینی و مورفولوژیکی در زیره‌سبز نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین ماتریس‌های تشابه حاصل از دو نوع نشانگر مورد استفاده وجود داشت (Soreni *et al.*, 2012). در مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده چتریان (زیره‌سبز، رازیانه، غازیاقی) بر اساس الگوهای پروتئین دانه اکوتیپ زیره‌سبز در گروه اول، سه اکوتیپ رازیانه در گروه دوم و غازیاقی در گروه سوم جای گرفت (Maasomi *et al.*, 2012). در مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی زیره‌سبز با استفاده از روش SDS-PAGE و تجزیه خوشه‌ای با روش اتصال منفرد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در پنج گروه با ضریب شباهت ۰/۲۶ جای گرفتند (Shoride & Pakniyat, 2004).

در حال حاضر کارهای اصلاحی اندکی بر روی زیره‌سبز انجام شده و به‌دلیل جمع‌آوری آن از طبیعت توسط افراد بومی احتمال نابودی ذخایر ژنتیکی آن وجوددارد. با توجه به وجود توده‌های متفاوت و همچنین نمونه‌های ژنتیکی مختلف در درون یک توده که در اقلیم‌های مختلف کشور می‌رویند، به‌نظر می‌رسد که تفاوت‌هایی از نظر ژنتیکی، خصوصیات فنولوژیکی، مقاومت به تنش‌های خشکی، شوری و برخی از بیماری‌ها و نیز در میزان اسانس و مواد مؤثره در بین آنها وجود داشته باشد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی اکوتیپ‌های زیره‌سبز جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی بر اساس نشانگرهای پروتئینی و فراهم آوردن اطلاعات ژنتیکی لازم برای برنامه‌های اصلاحی آینده می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۰ اکوتیپ مختلف از گونه زیره‌سبز با پراکندگی کاملی از تمام مناطق خراسان شمالی، خراسان رضوی و خراسان جنوبی مورد تحقیق قرار گرفت. این اکوتیپ‌ها شامل ۱-فردوس، ۲-بیرجند، ۳-زیرکوه، ۴-کاشمر، ۵-خوسف، ۶-خواف، ۷-گناباد، ۸-طبس، ۹-سرایان، ۱۰-قوچان، ۱۱-اسفدن، ۱۲-سبزوار، ۱۳-اسفراین، ۱۴-سربیشه، ۱۵-مشهد، ۱۶-تایباد، ۱۷-بردسکن، ۱۸-رشتخوار، ۱۹-مود و ۲۰-تربت‌جام بود. در هر منطقه نمونه‌ها به‌طور تصادفی از یک مزرعه یک هکتاری جمع‌آوری شد. بذرهای جمع‌آوری شده در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی بیرجند کشت و پس از رسیدن به ارتفاع ۱۵ سانتی‌متری آزمایش‌های مربوطه انجام شد. برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE (Kim *et al.*, 2001) طبق روش Laemmli و همکاران (1970) استفاده شد. غلظت پروتئین به‌روش برادفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین ابتدا از ۲۰ نمونه بذر جمع‌آوری شده، یک توده بالک تهیه و پروتئین آن استخراج شد. درون هر چاهک حجم‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین بالک تزریق شد. نمونه‌ای که باندهایش از یکدیگر بهتر تفکیک شده بودند به‌عنوان بهترین حجم انتخاب شد. با توجه به بهترین حجم و غلظت نمونه و با توجه به نمودار استاندارد برادفورد، میزان حجم تزریقی درون هر چاهک از هر نمونه تعیین شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی استفاده شد. برای رنگ‌بری ژل حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌بری را به ظرف مسطح حاوی ژل اضافه کرده و به‌مدت ۱ ساعت روی شیکر گذاشته تا باندها در ژل رؤیت شوند. بعد از رؤیت باندها محلول رنگ‌بری را تخلیه کرده و ژل را با آب دوبار تقطیر شده دوبار شستشو داده شد. با استفاده از اسکنرهای رنگی از ژل عکس گرفته شد.

با توجه به اطلاعات جغرافیایی، اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف به دو گروه (خراسان رضوی و شمالی در یک گروه و خراسان جنوبی در گروه دیگر) تقسیم‌بندی شد، سپس عکس‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ1.44 امتیازبندی شد؛ به حضور باند عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر اختصاص یافت. در این مطالعه شاخص‌ها و پارامترهای ژنتیکی ذیل محاسبه شد: درصد چندشکلی: تعداد نوارهای چندشکل تقسیم بر تعداد کل نوارها؛ شاخص محتوای چند شکلی PIC: PIC=1-Σpi2 (Polymorphic Information Content) که Pi فراوانی نشانگر i ام می‌باشد، شاخص نسبت چند شکلی EMR (Effective Multiplex Ratio): درصد چندشکلی ضرب در تعداد نوارهای چندشکل، شاخص نشانگر (Marker Index): شاخص نسبت چندشکلی ضرب در شاخص محتوای چند شکلی (Anderson *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996)، تعداد آلل‌ها (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne (Kimura & Crow, 1963))، شاخص تنوع ژنی نی (H (Nei, 1987; Nei & Li, 1979))، شاخص اطلاعاتی شانون (I) (Lowontin, 1972)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها (Dst)، هتروزیگوسیتی کل (Ht=HS+Dst)، تخمین جریان ژنی و شاخص Fst (Wright, 1951))، (Lynch & Milligan, 1994). شباهت ژنتیکی افراد بر اساس ضرایب شباهت جاکارد و از الگوریتم UPGMA برای تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. در تجزیه‌های فوق از نرم‌افزارهای NTSYSpc2.2، xlstat 2015 و GENALEX 6.0 استفاده شد.

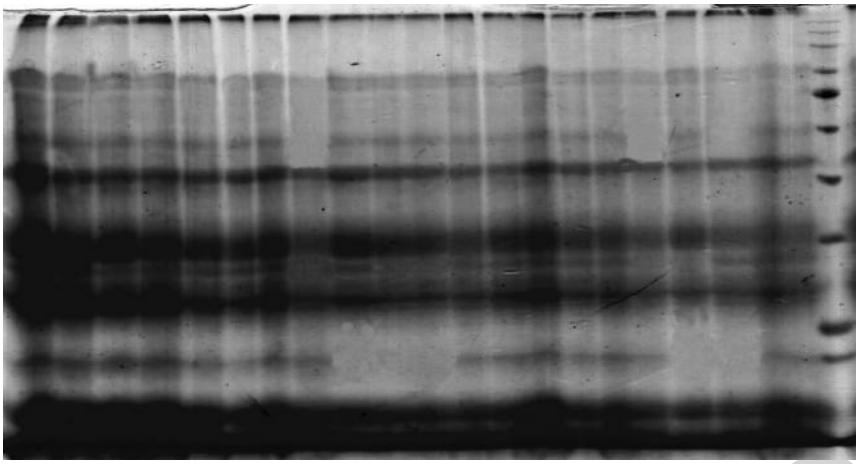
نتایج

الکتروفورز پروتئین‌ها

در این الکتروفورز ۱۵ باند ظاهر شد که چهار باند آن چندشکلی نشان دادند. درصد چندشکلی مشاهده شده ۲۷ درصد بود (شکل یک). در مطالعه کنونی اگرچه میزان چند شکلی پایین بود، اما در متمایز کردن اکوتیپ‌ها از یکدیگر کفایت نمود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- الکتروفورز پروتئین‌های ۲۰ اکوتیپ زیره‌سبز

پارامترهای ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره‌سبز با استفاده از نشانگر پروتئینی

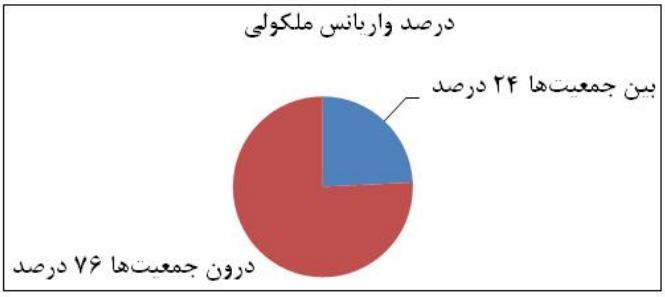
پارامترهای ژنتیکی به‌دست آمده طبق جدول دو می‌باشد. شاخص تنوع ژنتیکی نی و شانون به‌میزان ۰/۴۹ و ۰/۶۸ به‌دست آمد. میزان هتروزیگوسیتی در درون جمعیت و بین جمعیت تقریبا برابر و ۰/۴۹ تا ۰/۴۳ بود.

جدول ۲- پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده بر اساس نشانگر پروتئینی در اکوتیپ‌های زیره‌سبز

پارامتر ژنتیکی	ارزش	پارامتر ژنتیکی	ارزش
شاخص Fst	۰/۱۳	میانگین هتروزیگوسیتی کل	۰/۴۹
میانگین تعداد آلل‌ها	۲	هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها	۰/۴۳
تعداد آلل‌های مؤثر	۱/۹۶	ضریب تنوع بین جمعیت‌ها	۰/۱۳
شاخص تنوع ژنتیکی نی	۰/۴۹	جریان ژنی	۸/۲۶
شاخص شانون	۰/۶۸	هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها	۰/۰۶

تجزیه واریانس مولکولی و ماتریس تشابه بر اساس نشانگر پروتئینی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد (شکل دو) که ۲۴ درصد از تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها و ۷۶ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بود.



شکل ۲- تجزیه واریانس مولکولی اکوتیپ‌های زیره‌سبز بر اساس نشانگر پروتئینی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- ماتریس تشابه در اکوتیپ‌های زیره‌سبز بر اساس نشانگر پروتئینی

زنوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
۱	۱																			
۲	۱	۱																		
۳	۱	۱	۱																	
۴	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۱																
۵	۱	۱	۱	۰/۲۵	۱															
۶	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۳۳	۰/۶۷	۱														
۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۱													
۸	۱	۱	۱	۰/۲۵	۱	۰/۶۷	۰/۵	۱												
۹	۱	۱	۱	۰/۲۵	۱	۰/۶۷	۰/۵	۱	۱											
۱۰	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱										
۱۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱									
۱۲	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۱								
۱۳	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۱	۱							
۱۴	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱						
۱۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۱	۱	۰/۷۵	۱					
۱۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۱				
۱۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۱	۱	۰/۷۵	۱	۰/۵	۱			
۱۸	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۶۷	۰/۷۵	۱		
۱۹	۰	۰	۰	۰/۵	۰	۰	۰/۳۳	۰	۰	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۳۳	۱	
۲۰	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۶۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۶۷	۰/۵	۱

Archive of SID

www.SID.ir

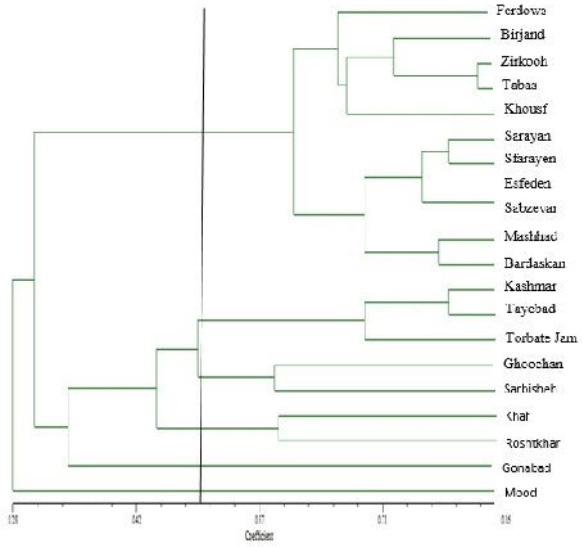
ماتریس تشابه به‌دست آمده برای نشانگر پروتئینی در ۲۰ اکوتیپ زیره‌سبز در جدول سه نشان داده شده است. میانگین ماتریس تشابه ۰/۶۱ به‌دست آمد. کمترین ضریب تشابه ۰/۲۵ و بیشترین مقدار ۱ به‌دست آمد. با توجه به میزان کم چندشکلی به‌دست آمده بین بعضی از ژنوتیپ‌ها تشابه ۱۰۰ درصدی مشاهده شد.

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگر پروتئینی

تجزیه خوشه‌ای براساس سه الگوریتم (UPGMA، اتصال منفرد و اتصال کامل) با استفاده از چهار ماتریس تشابه (دایس، جاکارد، تطابق ساده، UV1) انجام شد (جدول چهار). کمترین ضریب همبستگی ۰/۵۸ و بیشترین مقدار ۰/۸۹ به‌دست آمد. به‌طور کل بیشترین ضرایب همبستگی با استفاده از روش UPGMA به‌دست آمد. با توجه به ضرایب به‌دست آمده، ضریب تشابه جاکارد به‌عنوان بهترین ضریب و الگوریتم UPGMA خوشه‌بندی به‌عنوان بهترین الگوی خوشه‌بندی انتخاب شدند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها در پنج گروه قرار گرفتند (شکل سه). گروه اول شامل دو زیرگروه بود. زیرگروه اول شامل اکوتیپ‌های فردوس، بیرجند، زیرکوه، خوسف، طبس و سرایان و زیرگروه دوم شامل اکوتیپ‌های اسفدن، اسفراین، سبزوار، مشهد و بردسکن بود. گروه دوم شامل اکوتیپ‌های گناباد و سربیشه بود. در گروه سوم اکوتیپ‌های خواف، قوچان و رشتخوار قرار گرفت. در گروه چهارم اکوتیپ‌های کاشمر، تایباد و تربت‌جام و در گروه پنجم اکوتیپ مود جای گرفت.

جدول ۴- ضرایب همبستگی کوفنتیک بر اساس تطابق ساده، جاکارد، دایس و UV1

ضریب کوفنتیک	اتصال کامل	اتصال منفرد	UPGMA
تطابق ساده (SM)	۰/۷۸**	۰/۶۸**	۰/۸۲**
جاکارد (J)	۰/۸۲**	۰/۸۲**	۰/۸۹**
دایس (DICE)	۰/۷۶**	۰/۷۶**	۰/۸۵**
UV1	۰/۷۰**	۰/۵۸**	۰/۷۶**

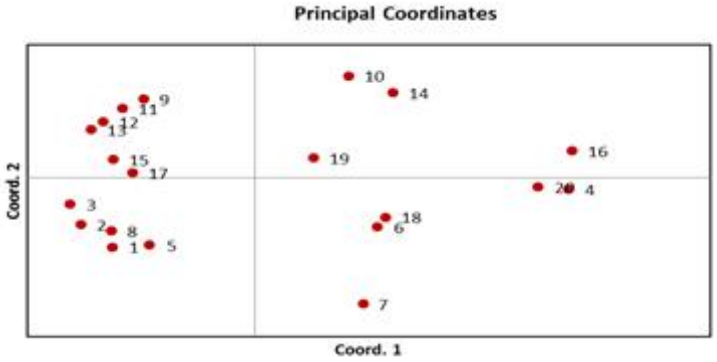


شکل ۳- دندروگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر پروتئین بر اساس الگوریتم UPGM

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس تجزیه به مختصات اصلی سه مؤلفه اول ۸۳ درصد از واریانس کل را توجیه کردند (جدول ارائه نشده است). درصد بالای توجیه واریانس توسط دو مؤلفه اول نشان می‌دهد که نشانگر پروتئینی پراکندگی خوبی در جمعیت نداشته است. البته با توجه به‌میزان بالای تنوع توجیه شده توسط دو مؤلفه اول به‌منظور نمایش تصویری الگوی تنوع در اکوتیپ‌های مورد مطالعه، نمودار دوبعدی رسم شد تا مطالعه روابط و میزان قرابت و یا فاصله بین اکوتیپ‌ها به راحتی امکان‌پذیر شود (شکل ۴).



شکل ۴- پراکنش ۲۰ اکوتیپ زیره‌سبز به‌صورت دوبعدی

بحث

در مطالعه کنونی درصد چندشکلی به‌دست آمده پایین بود که این امر در مطالعات دیگر نیز پیدا می‌شود. در مطالعات دیگری که بر روی نشانگرهای پروتئینی گیاهان دارویی و به‌ویژه زیره‌سبز کار شده است معمولا درصد چند شکلی نسبتاً بالایی به‌دست نیامده است. به‌عنوان مثال نتایج به‌دست آمده از یک مطالعه بر روی بررسی تنوع ژنتیکی زیره‌سبز بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای وجود ۲۹ باند واضح و قابل امتیازدهی را نشان داد که از این تعداد ۸ باند چندشکل مشاهده شد که این نشان‌دهنده میزان چندشکلی نسبتا پایین است (Masomi *et al.*, 2011). میزان پایین درصد چندشکلی به‌دست آمده برای نشانگر پروتئینی حکایت از آن دارد که این نشانگر در تفکیک اکوتیپ‌ها کارایی بالایی ندارد، اما می‌تواند اکوتیپ‌ها را تفکیک نماید.

دامنه تعداد آلل‌های مؤثر در این مطالعه کم می‌باشد. دامنه کم تغییر آلل‌های مؤثر و آلل‌های مشاهده شده نشان‌دهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها در بین جمعیت‌ها است و اینکه جمعیت‌ها تقریباً در سطح یکنواختی از توزیع آللی قرار دارند. پایین بودن شاخص Fst نشان‌دهنده همبستگی پایین بین ژنهای افراد مورد مطالعه در جمیعت می‌باشد. به‌عبارت دیگر افراد مورد مطالعه همبستگی بالایی ندارند و درون جمعیت تنوع ژنتیکی وجود دارد. البته بالا بودن هتروزیگوسیتی درون جمعیت مطلب فوق را تأیید می‌کند و پایین بودن شاخص Fst را مورد تأکید قرار می‌دهد. دو شاخص نی و شانون نیز نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی کافی در بین اکوتیپ‌های زیره سبز وجود دارد و زمینه کارهای اصلاحی بعدی در این گیاه فراهم است (Taheri *et al.*, 2016).

با توجه به اینکه درصد واریانس مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها کمتر از داخل جمعیت‌ها بود، می‌توان نتیجه گرفت که درون جمعیت‌ها تنوع بیشتری وجود داشت. در بین جمعیت‌ها نیز تنوع معنی‌داری مشاهده شد، اما این تنوع به‌مراتب کمتر از تنوع مشاهده شده در داخل جمعیت‌ها بود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از ماتریس تشابه؛ اکوتیپ‌های فردوس، بیرجند، زیرکوه، خوسف، طبس و سرایان با یکدیگر؛ اکوتیپ‌های اسفدن، اسفراین، مشهد و بردسکن با یکدیگر؛ اکوتیپ‌های کاشمر، تایباد و تربت‌جام با یکدیگر و اکوتیپ‌های گناباد با سربیشه دارای ضریب شباهت یک بودند. به‌عبارت دیگر از لحاظ پروتئین ۱۰۰ درصد مشابه یکدیگر

Archive of SID
www.SID.ir

بودند. کمترین ضریب شباهت که نشان‌دهنده بیشترین تنوع موجود در بین اکوتیپ‌ها می‌باشد، متعلق به اکوتیپ‌های مود، فردوس، بیرجند، زیرکوه، خوسف، خواف، طبس و سرایان با ضریب شباهت صفر بود. تشابه ۱۰۰ درصدی بین اکوتیپ‌های دور مانند بیرجند با طبس (فاصله جغرافیایی بیش از ۲۷۰ کیلومتر)، مشهد با اسفدن (بیش از ۵۰۰ کیلومتر)، گناباد با سربیشه (بیش از ۳۰۰ کیلومتر)، کاشمر با تربت جام و تایباد (بیش از ۲۴۰ کیلومتر) و مشهد با اسفراین (نزدیک به ۳۰۰ کیلومتر) و عدم شباهت بین اکوتیپ‌های نزدیک مانند مود و بیرجند (فاصله جغرافیایی نزدیک به ۳۰ کیلومتر)، خوسف با بیرجند (کمتر از ۳۰ کیلومتر) و مود با خوسف (نزدیک به ۶۰ کیلومتر) نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند، زیرا اکوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی دور و نسبتاً دور کاملا مشابه بوده و از سویی اکوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی نزدیک و نسبتاً نزدیک کاملا نامتشابه می‌باشد. این مطلب در دیاگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌خوبی نمایان است. در بررسی ۴۰ توده زیره‌سبز بومی ایران بعلاوه دو توده از کشورهای سوریه و افغانستان با استفاده از نشانگر ISSR تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌ها ژنوتیپ‌ها را به سه گروه متمایز تقسیم نمود (Rostami Ahmadvandi, 2013).

قرار گرفتن اکوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی دور در یک خوشه و قرار گرفتن اکوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی نزدیک در خوشه‌های متفاوت نتایج حاصل از ماتریس تشابه را مورد تأکید قرار می‌دهد و دوباره عدم تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی را اثبات می‌کند. از سوی دیگر قرار گرفتن اکوتیپ‌ها در گروه‌های مختلف نشان از وجود تنوع در بین اکوتیپ‌ها دارد که این موضوع دوباره تجزیه واریانس مولکولی را مورد تأکید قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط Masomi و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد توده‌های مورد مطالعه زیره‌سبز در سه گروه قرار گرفت. در تحقیقی دیگر نیز تجزیه خوشه‌ای به‌روش اتصال منفرد توده‌های بومی زیره‌سبز مورد مطالعه را در پنج گروه با ضریب شباهت ۰/۲۶ جای داد (Shoride & Pakniyat, 2004). تمام این نتایج وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زیره‌سبز را نشان می‌دهد که این خود انجام کارهای اصلاحی در آینده را نوید می‌دهد. اصلاحگران می‌توانند با توجه به‌وجود تنوع، واریته‌های با صفات مورفوفنولوژیکی و کمی برتری تولید نمایند.

نمودار دوبعدی براساس دو مؤلفه اول و دوم (شکل چهار) نشان داد که اکوتیپ‌ها در نقاط مختلفی از بای‌پلات پراکنده شدند، به‌عبارت دیگر بین اکوتیپ‌ها تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. علاوه بر آن بیشتر اکوتیپ‌هایی که در تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفته بودند، در نمودار پراکنش نیز در کنار هم قرار گرفتند. بای‌پلات به‌خوبی توانست فواصل ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها را به نمایش بگذارد.

در نهایت با توجه به اطلاعات حاصل شده ازجمله درصد چند شکلی، دامنه زیاد بین ضرایب تشابه به‌دست آمده و گروه‌بندی اکوتیپ‌ها در خوشه‌های مجزا و سایر اطلاعات، نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه دارد. البته بین تنوع موجود در اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده و موقعیت جغرافیایی در بیشتر موارد ارتباط وجود داشت. به‌طور کلی بررسی تنوع در توده‌های زیره‌سبز نشان داد که این نشانگر در شناسایی نواحی چندشکل و مدیریت ژرم‌پلاسم می‌تواند مفید باشد ولی کافی نمی‌باشد. بنابراین می‌توان نشانگر پروتئینی را به‌عنوان ابزاری مفید در بررسی فاصله ژنتیکی و تفاوت بین نمونه‌های مختلف زیره‌سبز به‌همراه سایر نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار داد. به‌هرحال استفاده از نشانگرهای پروتئینی در کنار نشانگرهای مولکولی باتوجه به اطلاعاتی که درباره روابط ژنتیکی نزدیک در اختیار به‌نژادگر قرار می‌گیرد مفید می‌باشد. بنابراین استفاده از تکنیک‌های انگشت‌نگاری DNA برای انجام برنامه‌های اصلاحی هدف‌دار مانند تولید ارقام متمایز، ژنوتیپ‌هایی با تنوع ژنتیکی پایه‌ای بالا و بهبود بهره‌وری پیشنهاد می‌شود.

منابع مورد استفاده

– Anderson, J.A., Churchill, G.A., Sutrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome Biology, 36:181-186.

– Bagheri, A.A. and Mahmoodi, A.A., 2002 Cumin

Archive of SID

www.SID.ir

(*Cuminum cyminum*) proteins by SDS- PAGE. Annual scientific conference of Razi University from December 20 to December 23, 2011.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. and Li, W.H., 1979 Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Journal of Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA, 76:5269-5273.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A., 1996. The comparison of RFLP RAPD AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.
- Rahmanpour, S., Abdollahi Mandolkani, B. and Ghadimzadeh, M., 2014. Evaluation of genetic variation of native and hybrid Melon ecotypes using ISSR markers. Journal of Genetics, 9 (1): 76-67
- Ravi, M., Geethanjali, S.F., Sameeyafarheen, F.M. and Maheswaran, M., 2003. Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L) using RAPD and SSR markers. Euphytica, 133:243–252.
- Rostami-Ahmadvandi, H., Cheghamirza, K., Kahrizi, D. and Bahraminejad, S., 2013. Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L accessions. Australian Journal of Crop Science, 7(3):367-361.
- Shorideh, H. and Pekniyat, H., 2004. Study of genetic diversity of Cumin (*Cuminum Cyminum*) ecotypes of Iran using seed proteins. Electrophoresis Proceedings of the First National Symposium on Cumin, Sabzevar, Iran P 109.
- Soreni, J., Rostami Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., and Masoumi, S.M., 2012. Investigation of the Relationship between Protein and Morphological markers in *Cuminum Cyminum* L. 12th Iranian Congress of Genetics, Tehran, May 3-1.
- Taheri, S., Zabet, M., Izanlo, A. and Izadi Darbandi, A., 2016. Assessment of genetic diversity of fennel ecotypes using RAPD and ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology, 7 (4): 113-128.
- Uzun, A. and Yesiloglu, T., 2012. Genetic diversity in Citrus In: Genetic Diversity in Plants, Calhskan, M. (Ed) In Tech, PP: 213-231.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. Annuals of European Genetics, 15: 323-354.
- Zakeri, M.A., Salehi Shanjani, P., Javadi, H., and Alizadeh, A., 2014. Genetic variation of *A. triumfetti*, *A pseudocutula* and *Anthemis haussknechtti* species using electrophoretic pattern of total proteins. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22 (2): 302-311.

production and processing technology Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Press 143-150.
- Bihamta, M.R., Naserian Khiabani, B. and Zamani, M.J., 2009. Molecular markers in plant genetics and biotechnology (translation). Tehran University Press , P 53-54.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochemistry, 72: 248-254.
- Farooq, F. and Azam, F., 2002. Molecular markers in plant breeding: concepts and characterization. Pakistan Journal of Biological Science, 5(10): 1135-1140.
- Farshadfar, A., 2010. Molecular Plant Breeding. Taghe Bostan Publication, Kermanshah, Iran.
- Guo, L.J., 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. Intech Open Science/ Open Minds http:// creative commonsorg/licenses/by/30.
- Kafi, M., 2001. Cumin ecophysiology Cumin article series technology production and processing Ferdowsi University Press, Mashhad, I.R.Iran.
- Khalilipour, J., 2009. Green cumin. Skill Monthly Journal of Scientific Technical and Profession 50: 38-39.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S., and Kang, K.Y., 2001. Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. Electrophoresis, 22: 2103-2109.
- Kimura, M. and Crow, J.F., 1963. The measurement of effective population number. Evolution, 17: 279-288.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.
- Lewontin, R.C., 1972. The apportionment of human diversity. Evolution Biology, 6: 381–398.
- Lynch, M., and Milligan, B., 1994. Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99.
- Magni, C., Scarafoni, A., Herndi, A., Sessa, F., Prinsi, B., Espen, I., and Duranti, M., 2007. Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white Lupine mature seed storage proteome. Phytochemistry 68: 997-1007.
- Masoumi, S.M., Kahrizi, D., Rostami- Ahmadvandi, H., Soreni, J., Kiani, S., Mostafaie, A. and Yari, K.H., 2012. Genetic diversity study of some medicinal plant accessions belong to Apiaceae family based on seed storage proteins patterns. Molecular Biology Reports, 39:10361-10365.
- Masoumi, S.M., Kahrizi, D., Soreni, J., Rostami, H., Mostafaie, A. and Kiani, S., 2011. Study of genetic variation of some cumin mass based on seed storage

Archive of SID

www.SID.ir

The study of genetic diversity of cumin ecotypes of Khorasan provinces using protein markers

M. Zabet[1*], A. Rahimi[2], A. Izanloo[3] and Z. Alizadeh[3]

1- Assoc. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, I.R.Iran
2-Former M.Sc. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, I.R.Iran
3-Assist. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, I.R.Iran

Received: 17.01.2018 Accepted: 28.02.2018

Abstract

Cuminum cyminum is one of the oldest and most economically important species in the Apiaceae family that has the highest cultivated areas of Khorasan provinces in Iran. Genetic diversity of 20 ecotypes of *Cuminum cyminum* was investigated by protein markers. The ecotypes were randomly collected from three provinces of North, Razavi and South Khorasan provinces. Protein profile analysis was carried out by SDS-PAGE method. The method included: extracting protein from the sample seeds, determining samples concentration, and finally running on electrophoresis gel. Analysis of molecular variance showed that there was variation between and within the populations. Based on the protein markers %24 of the variations belonged to between populations and %76 belonged to within populations. Polymorphism percentage, polymorphic content mean, Shannon's information index and the average of Nei's information index were 27%, 0.01, 0.49, and 0.68, respectively. Results of PCoA showed that the first three components accounted for 83% of the variation. Cluster analysis based on the similarity matrix classified the studied ecotypes in 5 clusters.

Keywords: Cluster analysis, effective alleles, electrophoresis, polymorphism

Archive of SID

www.SID.ir