Assessment of Genetic Diversity in Some Indigenous Ajwain (*Trachyspermum ammi* L.) Populations using RAPD Molecular Markers

Pages 73-85

T. Jalalifar[1], M. Soltani Howyzeh[2,*] and E. Shahbazi[3*]

1& 2) Department of Genetics and Plant Breeding, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
3) Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding authors**: mehdisoltani@iau.ac.ir, es.shahbazi@gmail.com**

Received date: 2024.03.18 **Accepted date: 2024.06.12**

Abstract

The medicinal plant Ajwain (*Trachyspermum ammi* L.) is a native species of Iran, rich in bioactive medicinal compounds. This study aimed to assess the genetic diversity and distance among its native ecotypes, which can be useful for selecting suitable parents for the development of hybrid or composite populations. To investigate the genetic diversity of indigenous populations of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) using RAPD molecular markers, 23 ecotypes were obtained from the gene bank of the Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR). After DNA extraction with CTAB-activated charcoal method, A total of 20 primers were screened during the PCR amplification. Genetic similarity among populations was calculated using the Jaccard similarity coefficient, and a similarity-based dendrogram was constructed through the UPGMA clustering algorithm. Statistical analysis was performed using NTSYS software. PCR amplification generated 84 distinct DNA fragments, 81 of which (96%) were polymorphic, demonstrating significant genetic variability. The highest band numbers (6) were observed with primers OPC17, OPB15, OPB19, and OPB18. All primers, except OPB7, exhibited 100% polymorphism, underscoring the high genetic diversity present in the *Trachyspermum ammi* samples. Cluster analysis segregated the samples into three primary clusters: 21 ecotypes in the first group, ecotype 10 in the second, and ecotype 12 in the third. The results indicated that RAPD markers can effectively determine the genetic diversity of native Ajwain populations and identify parents with greater genetic distance for selecting superior crosses.

Keywords: Ecotype, Genetic relationships, Jaccard coefficient, Cluster analysis and Genetic distance.

بررسی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های بومی گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولیRAPD

شماره صفحات
۷۳-۸۵

تینا جلالی‌فر[۱]، مهدی سلطانی حویزه[۲*]و احسان شهبازی[۳*]

۱ و ۲) گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۳) گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی ،دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسندگان مسئول: **mehdisoltani@iau.ac.ir, es.shahbazi@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳

چکیده

گیاه دارویی زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* L. یک گیاه بومی ایران و سرشار از ترکیبات زیست فعال دارویی است. هدف از این تحقیق، آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های بومی این گیاه می‌باشد، که می‌تواند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت‌های ترکیبی یا هیبرید مورد استفاده قرار گیرد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی گیاه دارویی زنیان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تعداد ۲۳ توده گیاه دارویی زنیان از بانک ژن منابع طبیعی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور بدست آمد. پس از استخراج DNA به روش CTAB-activated charcoal، تعداد ۲۰ آغازگر RAPD مورد استفاده قرار گرفت و برای تعیین میزان تشابه بین جمعیت‌ها، با استفاده از ضریب جاکارد و الگوریتم UPGMA یک دندروگرام بر مبنای ماتریس تشابه تهیه شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام گرفت. با انجام PCR تعداد ۸۴ قطعه DNA تکثیر شده به دست آمد که ۹۶ ٪ نوارها چند شکل بودند. بیشترین تعداد نوار مربوط به آغازگرهای OPC17 و OPB15 و OPB19 و OPB18 با ۶ نوار بود. همه آغازگرها به جزء آغازگرOPB7 صددرصد چندشکلی را نشان دادند که بیانگر تنوع بالای نمونه‌های زنیان می‌باشد. تجزیه کلاستر، نمونه‌های زنیان را به سه گروه اصلی تقسیم نمود. در گروه اول ۲۱ اکوتیپ قرار گرفتند و گروه دوم و سوم شامل تنها یک اکوتیپ بودند. نتایج نشان داد با استفاده از نشانگر RAPD می‌توان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی زنیان را مشخص و والدین با فاصله ژنتیکی بیشتر را جهت انتخاب تلاقی‌های برتر معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، روابط خویشاوندی، ضریب جاکارد، تجزیه کلاستر و فاصله ژنتیکی.

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی است که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند (WHO, 2023). بیشتر ترکیبات طبیعی هزینه کمتر، سمیت کمتر و اثرات نامطلوب کمتری دارند (Motie *et al*., 2024). علاوه بر این اهمیت گونه‌های بومی گیاهان دارویی به‌عنوان منابع طبیعی ارزشمند برای استفاده پایدار در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی در تحقیقات مختلف نشان داده شده است (Borna and Negaresh, 2024; Tadayoni and Cheragi, 2024; Farasat *et al*., 2023). در این میان زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* از خانواده آپیاسه یک منبع سرشار از ترکیبات فعال دارویی و اثرات مختلف دارویی می‌باشد که پیدا کردن کاربردهای درمانی جدید آن به شدت مورد علاقه محققین است (Sadat-Noori *et al*., 2018; Bairwa *et al*, 2012). دانه‌های زنیان برای اهداف دارویی ارزشمند هستند زیرا اسانس آنها حاوی مواد فعال تیمول و کارواکرول و گاما ترپینن و پاراسایمن است (Jalal-Dowlatshahi *et al*., 2023). با بررسی‌های دارویی ثابت شده است که میوه گیاه زنیان دارای خواص مختلف دارویی از قبیل آنتی اکسیدانی، ضد قارچی، ضد درد، ضد فشار خون، ضد اسپاسم، ضد سرفه، ضد انگل، ضد کرم و ضد فیلاریا (Filariasis) می‌باشد، که این خواص به اسانس آن بر می‌گردد (Sadat-Noori *et al*., 2020; Amiripour *et al*., 2018). تحقیقات نشان دادند که زنیان دارای ترکیب شیمیایی است که می‌تواند به شدت با مراحل رشد گل آذین تغییر یابد و مراحل مختلف برداشت گل آذین زنیان بر غلظت و ترکیب اسانس تاثیر معناداری دارد (Soltani Howyzeh *et al*, 2018). همچنین کمیت و کیفیت اسانس در توده‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد (Bhadra *et al*., 2020). از این رو استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند در شناسایی و تعیین روابط خویشاوندی این توده‌ها به کار گفته شود (Shahbaz *et al*, 2023). مطالعات نشان می‌دهد که نشانگرهای RAPD ابزار مناسبی در جهت تشخیص تنوع گونه‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاح گونه‌ها ارایه می‌دهد (Khadivi *et al*., 2024; Nabhani *et al*, 2023) و ابزار ارزشمندی برای افزایش درک و استفاده ما از گیاهان دارویی، حمایت از تلاش‌ها در حفاظت، کنترل کیفیت و توسعه داروهای گیاهی هستند (Huang *et al*., 2024). در مورد سایر گیاهان دارویی، گزارشاتی مبنی بر استفاده از این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد بطور مثال Trindade *et al* و همکاران (2008) در۳۱ تک بوته از گونه آویشن (*Thymus Caespititius*) تنوع ژنتیکی را به وسیله نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. Hadian *et al* (2008) به بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۸ نمونه مرزه تابستانه (*Staureia hortensis*) با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند. Thormann *et al* (1994) اظهار داشتند که نشانگرهای RFLP و RAPD نتایج بسیار مشابهی در شناسایی روابط ژنتیکی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در کروسیفرها نشان دادند. با این وجود جهت بررسی روابط ژنتیکی توده‌های گیاه زنیان این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی گیاه دارویی زنیان با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۳ توده محلی گیاه دارویی زنیان از بانک ژن منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران که از مکان‌های مختلف ایران هستند تهیه گردید (جدول ۱). سپس هر توده را در یک سینی نشاء، کشت گردید سینی‌های نشاء در اتاقک رشد و شرایط کنترل شده دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره ساعت۱۰ به ۱۴ ساعت تاریکی/ روشنایی قرار گرفتند و زمانی که گیاهان به مرحله ۴ برگی رسیدند نمونه‌های برگی از تمام اکوتیپ‌های برداشت در درون فویل قرار گرفت و فویل‌ها در ازت مایع قرار گرفتند و جهت استخراج DNA و انجام مراحل بعدی آزمایش به آزمایشگاه تحقیقاتی واحد اهواز منتقل گردید. در این بررسی جهت بهینه سازی استخراج DNA براساس مطالعه قبلی (Jalalifar *et al*, 2015) از روش‌های مختلفی استفاده گردید و نهایتاً از روش CTAB-activated charcoal که توسط Krizman *et al* (2006) معرفی گردید و نوارهایی با کیفیت بالا و وضوح بیشتر و کمیت بهتر نسبت به سایر روش‌ها نشان داد، استفاده شد. بررسی کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر *(T90+UV Spectrometer-PG instruments)* انجام شد و کیفیت استخراج به کمک الکتروفورز به اثبات رسید.

جدول۱-اکوتیپ های زنیان مورد مطالعه و منشا آنها بدست آمده از بانک ژن منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران

کد اکوتیپ	محل رویش	ردیف	کد اکوتیپ	محل رویش	ردیف
۳۱۸۳۱	**یزد**	**۱۳**	۹۰۶	**کرج**	**۱**
۳۷۴۷۷	**سربیشه – خراسان جنوبی**	**۱۴**	۹۴۳	**اصفهان**	**۲**
۳۷۴۸۳	**بیرجند – خراسان جنوبی**	**۱۵**	۱۰۸۵	**اردبیل**	**۳**
۳۷۴۹۲	**بیرجند – خراسان جنوبی**	**۱۶**	۴۰۷۷	**فلاورجان**	**۴**
۳۷۵۲۹	**قائن – خراسان جنوبی**	**۱۷**	۱۰۵۶۹	**اردبیل**	**۵**
۳۸۹۱۳	**خراسان جنوبی - بشرویيه**	**۱۸**	۱۴۳۲۲	**همدان**	**۶**
۳۸۹۲۹	**خراسان جنوبی - سربیشه**	**۱۹**	۱۵۴۸۴	**شاهدیه- یزد**	**۷**
۷۸۹۳	**قم**	**۲۰**	۱۵۸۶۴	**صدوق - یزد**	**۸**
۱۲۳۱۳	**شیراز**	**۲۱**	۲۰۰۵۵	**قزوین**	**۹**
۱۴۴۹۲	**اراک**	**۲۲**	۳۷۲۵۱	**شاهدیه- یزد**	**۱۰**
۱۷۹۰۲	**مرودشت - شیراز**	**۲۳**	۲۳۰۱۱	**رفسنجان**	**۱۱**
			۲۳۰۲۳	**رفسنجان**	**۱۲**

در مجموع ۲۰ آغازگر ساخت شرکت تکاپو زیست پس از بررسی مطالعات انجام شده در گیاهان دارویی مورد آنالیز قرار گرفت. در نتیجه واسرشت سازی آغازی DNA در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، تک رشته‌ای شدن DNA در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه, اتصال آغازگر در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر به مدت ۲ دقیقه (۳۶ سیکل)، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، تکمیل بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل داده‌ها اطلاعات مربوط ژل‌ها امتیازدهی گردید هر نوار چند شکل به عنوان یک

نشانگر در نظر گرفته شد. امتیاز ۱ به وجود باند و امتیاز صفر به عدم وجود باند اختصاص داده شد. این امتیازها بصورت ماتریس دو در دو وارد نرم افزار اکسل گردید. جهت بررسی کارایی نشانگرها محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI)، نسبت چندگانه موثر (EMR) و قدرت تفکیک (Resolving Power یا RP) محاسبه گردید (Chesnokov and Artemyeva, 2015). همچنین جهت تعیین شباهت بین اکوتیپ‌ها از ضریب جاکارد (Jacard) استفاده شد. جهت خوشه‌بندی و گروهبندی اکوتیپ‌ها تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA انجام شد. آنالیز آماری داده های حاصل با استفاده از نرم افزار NTSYS نسخه 2.11X انجام گرفت.

جدول ۲- توالی آغازگرهای رپید مورد استفاده جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی گیاه دارویی زنیان

کد آغازگر	توالی آغازگر	Volum for 100 pmol/ µL
OPB7	GGTGACGCAG	200 µL
OPB8	GTCCACACGC	442 µL
OPB10	CTGCTGGGAC	280 µL
OPB12	CCTTGACGCA	363 µL
OPB13	TTCCCCCGCT	515 µL
OPB15	GGAGGGTGTT	318 µL
OPB16	TTTGCCCGGA	366 µL
OPB17	AGGGAACGAG	362 µL
OPB18	CCACAGCAGT	303 µL
OPB19	ACCCCCGAAG	302 µL
OPB20	GGACCCTTAC	435 µL
OPC1	TTCGAGCCAG	242 µL
OPC2	GTGAGGCGTC	239 µL
OPC7	GTCCCGACGA	343 µL
OPC11	AAAGCTGCGG	200 µL
OPC17	TTCCCCCCAG	394 µL
OPC20	ACTTCGCCAC	375 µL
OPJ6	TCGTCCCGCA	451 µL
OPJ8	CATACCGTGG	261 µL
OPJ12	GTCCCGTGGT	445 µL

نتایج و بحث

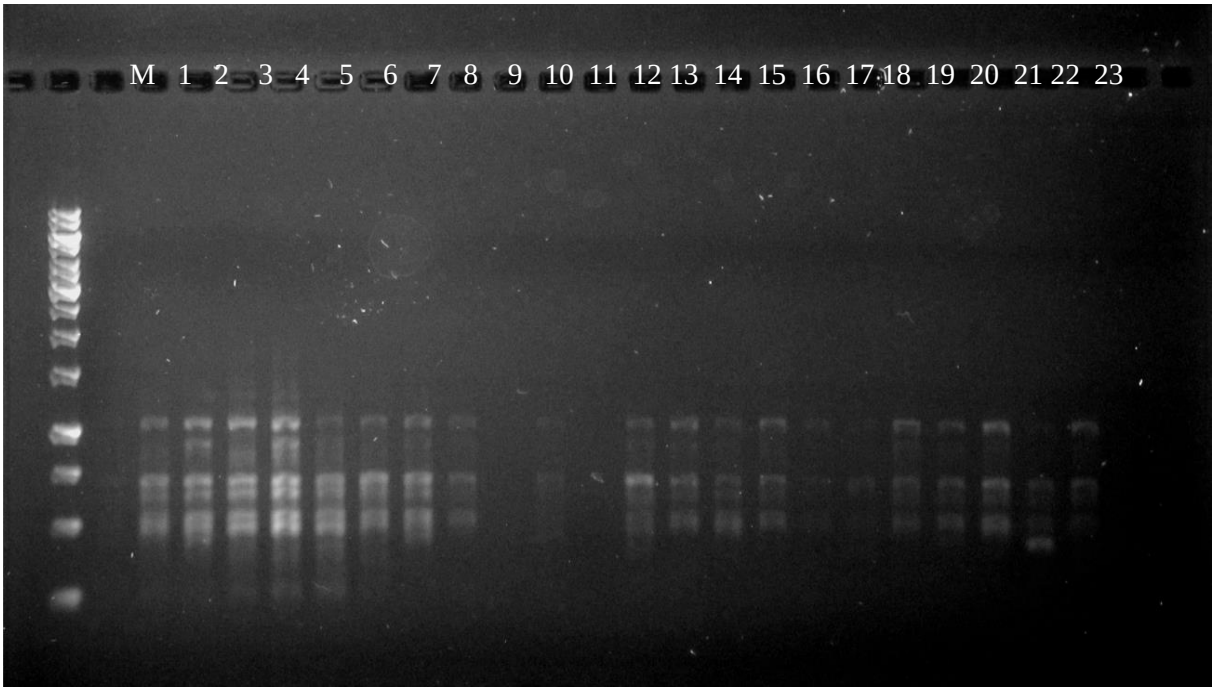
با انجام واکنش PCR تعداد ۸۴ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی در نمونه‌ها بدست آمد که ۸۱ نوار ، معادل ۹۶ ٪ نوارها چند شکل بودند. بیشترین تعداد نوار مربوط به آغازگرهای OPC17 و OPB15 و OPB19 و OPB18 با ۶ نوار بود. همه آغازگرها به جزء آغازگرOPB7 صددرصد پلی مورفیسم را نشان دادند که بیانگر تنوع بالای نمونه‌های زنیان می‌باشد. مقدار چند

شکلی (۹۶٪) بدست آمده در این آزمایش نسبت به گیاهان دارویی دیگر بالاتر بود. بعنوان مثال، در جمعیتی از گیاه گل محمدی میانگین هر آغازگر ۶۷ درصد (Tabaei Aghdaei *et al*., 2007)، در گیاه دارویی استبرق ۱۶ درصد (Boomibalagan *et al*., 2021)، در گیاه مریم گلی ۴۴ درصد (Zheng *et al*., 2021)، در گیاه شاهی ۶۷ درصد (Mortazavi *et al*., 2021) و در گیاه پنج انگشت ۱۶ درصد (Chaudhary *et al*., 2024) گزارش نمودند که نسبت به نتایج این آزمایش، چند شکلی کمتری را بدست آوردند. میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) در آغازگرهای مورد استفاده برابر ۰/۵۷ بود که بیشترین مقادیر آن مربوط به آغازگرهای OPJ8، OPJ6، OPB20 با مقدار ۰/۹۹ بود که نشان دهنده توانایی بیشتر این آغازگرها برای جداسازی فاصله ژنتیک اکوتیپ‌ها براساس شاخص PIC بود (جدول ۳). از سوی دیگر میانگین نسبت چندگانه موثر (EMR) برابر با ۳/۹۹ و بیشترین مقادیر آن متعلق به آغازگرهای OPB15، OPB18، OPB19 و OPC17 بود. اما براساس شاخص نشانگر (MI) با میانگین ۲/۱۶، آغازگر OPC17 دارای بیشترین مقدار این شاخص با عدد ۵/۸۳ بود که نشان دهنده قدرت کلی این نشانگر در تحلیل ژنتیکی اطلاعات براساس تعداد باند و بر اساس اطلاعات چندشکلی است. از لحاظ شاخص قدر تفکیک (RP) با میانگین ۲/۰۳ بهترین آغازگرها OPB8، OPB15، OPB18، OPC2 به ترتیب با مقادیر ۶/۶۱، ۴، ۳/۴۸ و ۳/۴۸ بودند (جدول ۳). نشانگرهایی با تعداد باندهای بیشتر و فراوانی های نزدیک به ۰/۵ معمولاً RP بالاتری دارند زیرا بهتر می‌توانند تفاوت‌ها بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند. این شاخص به‌ویژه در بررسی تنوع ژنتیکی، شناسایی ژنوتیپ‌ها، و انتخاب نشانگرهای مناسب در جمعیت‌ها استفاده می‌شود (Gupta *et al*, 2008). نمونه‌ای از نوارهای محصول PCR ۲۳ اکوتیپ بومی زنیان با استفاده از آغازگر تصادفی OPB15 در شکل ۱ آمده است. نشان داد که تعداد نوارهای تشکیل شده ۶ باند و تعداد باندهای پلی مورفیسم ۶ باند و درصد پلی مورفیسم ۱۰۰٪ است. در مطالعه‌ای که Chung و همکاران (۲۰۱۲) که در گیاه آویشن انجام دادند تعداد باندهای تشکیل شده ۹ باند و درصد پلی مورفیسم ۱۰۰٪ بود. پس تعداد نوارهایی که با آغازگر OPB15 در ۲۳ اکوتیپ بومی زنیان تکثیر شد در مقایسه با مطالعه Chung و همکاران (۲۰۱۲) کمتر بوده ولی درصد تنوع ژنتیکی یکسانی دارند. تجزیه کلاستر، نمونه‌های زنیان را به سه گروه اصلی تقسیم نمود. در گروه اول ۲۱ اکوتیپ قرار گرفتند که از بین آنها نمونه‌های ۱۶ و ۱۹ که هر دو از خراسان جنوبی می‌باشند بیشترین تشابه را نشان دادند و گروه‌های دوم و سوم به ترتیب شامل اکوتیپ‌های ۱۰ (شاهدیه یزد) و ۱۲ (رفسنجان) بودند که تفاوت عمده‌ای را با سایر جمعیت‌ها در سطح مولکولی نشان دادند که موید قدرت بالای این نشانگر در تفکیک بین توده ها می باشد. نتایج حاصل از داده‌های مولکولی نشان داد که بعضی جمعیت‌های یک منطقه در کنار هم و برخی نمونه‌های یک منطقه جداگانه و دور از هم گروه‌بندی شده‌اند که حاکی از تنوع ژنتیکی بالایی در میان آنها می‌باشد. بخش‌هایی از دندروگرام حاصل، بیانگر آن است که تنوع مولکولی نمونه‌های زنیان مورد بررسی با منشأ جغرافیایی آنها در برخی موارد مطابقت داشته و در برخی موارد مطابقت نداشته است. در مطالعات انجام شده در گیاهان متفاوت، وجود تنوع بالا در جمعیت‌های مختلف و همچنین عدم ارتباط بین تنوع جغرافیایی و مولکولی گزارش شده است بطور مثال این گزارشات

در مورد گیاه زنیان در تایوان (Nagar *et al*., 2019)، گیاه دارویی نعنا (Naseem *et al*., 2024) و ریحان (El-Hadi *et al*., 2024) وجود دارد که حاکی از تنوع متفاوت بر اساس مولکولی و جغرافیایی می‌باشد.

جدول ۳- تعداد باندهای تشکیل شده ، درصد پلی مورفیسم، محتوای اطلاعات چند شکلی، نسبت چندگانه موثر، شاخص نشانگر و قدرت تفکیک در آغازگرهای مورد بررسی

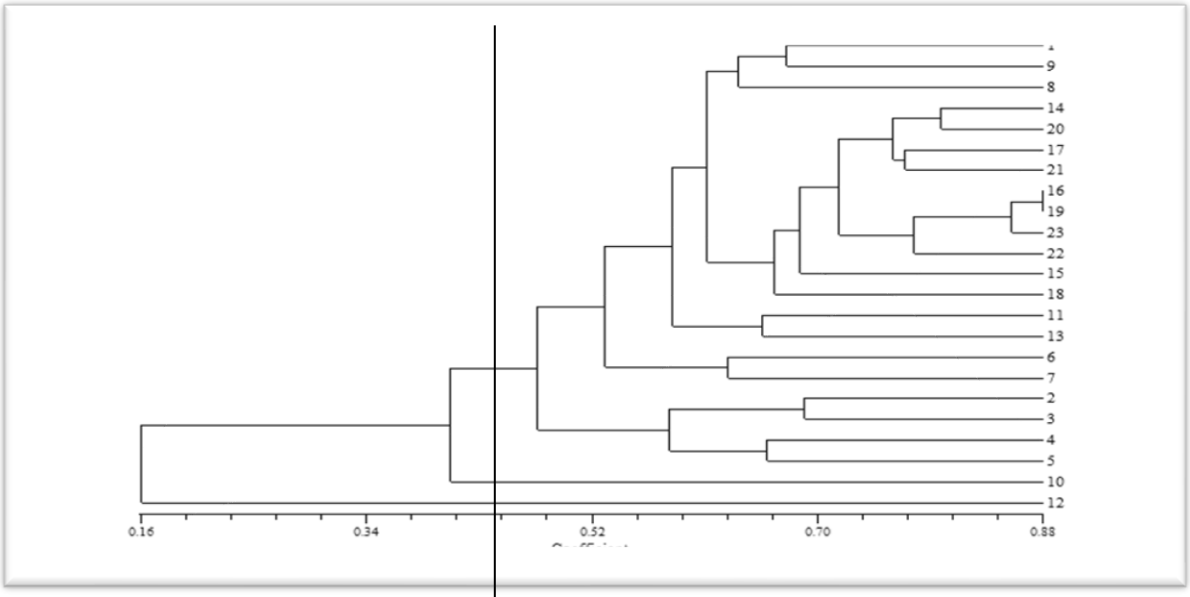
آغازگر	تعداد باندهای تشکیل شده	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چند شکلی PIC	نسبت چندگانه موثر EMR	شاخص نشانگر MI	قدرت تفکیک RP
OPB7	۵	۲	۴۰	۰/۱۶	۰/۸	۰/۱۳	۲/۰۹
OPB8	۴	۴	۱۰۰	۰/۰۲	۴	۰/۰۷	۶/۶۱
OPB10	۳	۳	۱۰۰	۰/۰۹	۳	۰/۲۷	۲/۵۲
OPB12	۳	۳	۱۰۰	۰/۹۱	۳	۲/۷۴	۰/۸۷
OPB13	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۶	۳	۰/۷۹	۲/۵۲
OPB15	۶	۶	۱۰۰	۰/۰۶	۶	۰/۳۵	۴/۰۰
OPB16	۳	۳	۱۰۰	۰/۹۸	۳	۲/۹۵	۰/۴۳
OPB17	۵	۵	۱۰۰	۰/۲۳	۵	۱/۱۶	۲/۹۶
OPB18	۶	۶	۱۰۰	۰/۱۴	۶	۰/۸۳	۳/۴۸
OPB19	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۲	۶	۱/۹۳	۳/۰۴
OPB20	۳	۳	۱۰۰	۰/۹۹	۳	۲/۹۸	۰/۲۶
OPC1	۳	۳	۱۰۰	۰/۹۷	۳	۲/۹۰	۰/۵۲
OPC2	۵	۵	۱۰۰	۰/۲۷	۵	۱/۳۳	۳/۴۸
OPC7	۳	۳	۱۰۰	۰/۹۰	۳	۲/۶۹	۱/۰۴
OPC11	۴	۴	۱۰۰	۰/۷۷	۴	۳/۰۸	۱/۵۷
OPC17	۶	۶	۱۰۰	۰/۹۷	۶	۵/۸۳	۰/۷۸
OPC20	۴	۴	۱۰۰	۰/۸۷	۴	۳/۴۷	۱/۲۲
OPJ6	۴	۴	۱۰۰	۰/۹۹	۴	۳/۹۵	۰/۴۳
OPJ8	۴	۴	۱۰۰	۰/۹۹	۴	۳/۹۷	۰/۳۵
OPJ12	۴	۴	۱۰۰	۰/۴۶	۴	۱/۸۴	۲/۵۲
میانگین	۴/۲	۴/۰۵	۹۷	۰/۵۷	۳/۹۹	۲/۱۶	۲/۰۳



شکل۱- محصول PCR ۲۳ اکوتیپ بومی زنیان با استفاده از آغازگر تصادفی OPB15. M: نشانگر مولکولی bp ۱۰۰ و ۱ تا ۲۳ شماره ردیف اکوتیپ‌ها.

در تحقیقی که Modareskia *et al* (2001) انجام دادند میزان تنوع ژنتیکی توده های بومی گیاه دارویی زنیان با استفاده از نشانگر ISSR، ۶۰/۷۸ درصد گزارش دادند. که از میان ۱۵۳ باند تکثیر شده، ۹۳ باند پلی مورفیسم را نشان دادند در حالی که در این بررسی، میزان تنوع ژنتیکی توده‌های بومی گیاه دارویی زنیان با استفاده از نشانگر RAPD، ۹۶ درصد بود. در مطالعه‌ای که Sadati *et al* و همکاران (2014) انجام دادند جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های زنیان از نشانگر ISSR استفاده کردند. آنها گزارش کردند که از ۹۳ نواری که در کل توده‌ها تولید شدند ۶۶ نوار چند شکل بودند و درصد چند شکلی کل ۷۱٪ محاسبه گردید. در حالی که در بررسی توده‌های زنیان با استفاده از RAPD درصد چند شکلی ۹۶٪ بدست آمد. بنابراین نشانگر RAPD نسبت به نشانگر ISSR تنوع ژنتیکی بیشتری را در جمعیت‌های زنیان نشان داده است. در گیاه دارویی آویشن نیز از برگ‌های جوان آویشن DNA ژنومی استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR با استفاده از ۹ آغازگر RAPD بر روی DNA ژنومی توده‌های مورد مطالعه انجام گردید و ۱۴۹ نوار تولید نمود که ۱۲۴ تا از نوارها ۲۲/۸۳٪ چند شکلی نشان دادند (Dalir and Safarnejad, 2017). عناب گیاه داروئی ارزشمندی است که در طب سنتی ایران جایگاه ویژه‌ای دارد. در پـژوهشی که در مورد این گیاه صورت گرفته از ۳۴ اکوتیپ عناب که از هشت استان عناب‌خیز کشور جمع‌آوری شده‌اند، استفاده گردید. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD در گیـاه عناب، ۱۵ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت که ۶ آغازگر در بین نمونه‌ها دارای چندشکلی مطلوبی بودنـد و در مجمـوع تعـداد ۶۵ جایگـاه تکثیـر کردند که در این بین تعداد ۴۹ جایگاه (۷۵ درصد) چندشکلی نشان دادند (Abasi *et al*., 2012). هم چنین جهت بررسی تنوع فیتوشیمیایی و ژنتیکی سه توده بومادران در استان هرمزگان با استفاده از نه آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع نه آغازگر که برای انگشت نگاری انتخاب شد, در مجموع ۱۱۲ نوار چندشکل تولید شد. مقدار متوسط نوار چندشکل برای هر آغازگر ۴۴/۱۲ باند بود (Taheri, 2016). در گیاه زعفران نیز برای بررسی وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و تجاری رایج زعفران کشور نمونه‌های مختلف زعفران از مناطق مختلف ایران ۱۷ نمونه زراعی جمع‌آوری و سپس تنوع ژنتیکی آنها با استفاد از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۸ آغازگر در مجموع ۱۱۳ قطعه چند شکل با میانگین ۱۴/۱۳, ۲۳ قطعه تکثیر نمودند که بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگر oligo۳۴۰ بود. درصد چند شکلی نیز ۷۳/۷۷ محاسبه شد. نتیجه حاکی از آن است که هنوز وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی بین این گونه‌ها وجود دارد که حکایت از یک پیشینه ژنتیکی است و نشانگر RAPD توانسته تنوع معناداری نشان دهد (Babaei *et al*., 2017). تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها را به ۴ گروه تقسیم نمود. در این تحقیق بر اساس نتایج که بیشترین میزان تشابه بین دو نمونه ۱۶ و ۱۹، (۸۸٪) مشاهده شد و کمترین میزان تشابه بین دو نمونه ۱۰ و۱۲، (۱۰٪) مشاهده شده است. لذا ارقام دورتر با داشتن چندشکلی بالا تفاوت بیشتری از نظر مولکولی خواهند داشت و از طرف دیگر امکان دورگ‌گیری بین ارقام با بیشترین تفاوت ژنتیکی، امکان انتقال صفات نادر را خواهد داشت. بنابراین انجام تلاقی بین ارقام والدینی دورتر کارایی بیشتری خواهد داشت. لذا بر اساس اطلاعات حاصل از کلاستر داده‌های نشانگر رپید

و میزان تشابه آنها بر اساس جدول ماتریس تشابه، تلاقی بین افراد موجود در یک گروه بهتر است صورت نگیرد چرا که شباهت بیشتری با هم دارند.



شکل ۲- تجزیه خوشه ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد توده‌های زنیان براساس تنوع مشاهده شده برای نشانگرهای RAPD

نتیجه گیری

در علم اصلاح نباتات، آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد، در انتخاب والدین مناسب برای تولید هیبریدهای برتر بسیار با اهمیت است، ضمن اینکه تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب می‌شود. در این تحقیق تنوع مولکولی نمونه‌های مختلف زنیان از ۲۳ مکان ایران که زنیان به طور طبیعی در آنها رشد می‌کند، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۲۰ آغازگر مورد استفاده، ۱۸ آغازگر ۱۰۰ درصد پلی مورفیسم را نشان دادند که بیانگر قدرت بالای این آغازگرها در بررسی تنوع مولکولی و همچنین بیانگر تنوع زیاد جمعیت‌های زنیان مورد استفاده می‌باشد. نتایج این مطالعه و سایر مطالعات نشان دادند که نشانگرهای RAPD، ابزاری مناسب برای تجزیه ژنوم گیاهان هستند، هر چند به منظور غلبه بر مشکل تکرارپذیری کم، شرایط PCR بایستی کاملاً کنترل شده باشد. این تحقیق با استفاده از نشانگر RAPD، الگوی ژنتیکی جمعیت‌های زنیان را نسبت به همدیگر مشخص ساخت. شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم پلاسم زنیان ایران و همچنین در تدوین برنامه‌های اصلاحی مفید خواهد بود.

سپاسگزاری

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از موسسه تحقیقات مراتع و جنگل‌های ایران بابت در اختیار گذاشتن مواد ژنتیکی گیاه زنیان که از مکان‌های مختلف ایران جمع آوری شده‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Abbasi, S., Malekzadeh Shafaroudi, S. , Ghous, K. and Shahriari, F. (2012). Genetic Diversity Analysis of Iranian Jujube Ecotypes (Ziziphus spp.) Using RAPD Molecular Marker. *Iranian Journal of Field Crops Research, 10*(3), 583-590. doi: 10.22067/gsc.v10i3.17821

Amiripour, M., Nouri, A., Shariati, V., & Soltani Howyzeh, M. (2018). Identification of terpene skeleton biosynthetic pathway genes in the medicinal plant Trachyspermum ammi L. using RNA sequencing. *Iranian Genetics Society*, 13(1), 141-133. (In Persian).

Babaee, F., Tahmasebi, Z., Feyzi, H., & Fazeli, A. (2017). The evaluation of genetic diversity in some saffron (Crocus sativus L.) samples of Iran using RAPD marker. (In Persian).

Bairwa, R., Sodha, R. S., & Rajawat, B. S. (2012). Trachyspermum ammi. *Pharmacognosy reviews*, *6*(11), 56.

Bhadra, P. (**2020**). An Overview of Ajwain (Trachyspermum ammi). *Indian Journal of Natural Sciences*, 10(59), pp.18466-182474.

Boomibalagan, P., Subramanian, S.R., Rajasekharan, P.E., Karpakal, S., Veeranan, U., Saminathan, E., Narayanan, V, & Kathiresan, D. (2021). Genetic relationship and polymorphism of selected medicinal plants of Asclepiadaceae using RAPD molecular analysis method. *Ecological Genetics and Genomics*, 21, p.100101.

Borna, F. and Negaresh, K. (2024). Biochemical Characteristics and Medicinal Value of Some Native Plant Species in Khuzestan Province. *Research in Plant Metabolites*, *2*(2), 23-37. doi:10.22034/jrpsm.2025.497965.1048. (In Persian).

Chaudhary, S., Garg, G, & Bharadwaj, A. (2024). Assessment of Genomic Integrity of Vitex negundoL., An Important Indian Medicinal Plant, Using RAPD Markers. *Acta Biologica Slovenica*, 67(3).

Chesnokov, Y. V., & Artemyeva, A. M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. Сельскохозяйственная биология, (5 (eng)), 571-578.

Chung, S. Y., Choi, S. H., Kim, M. J., Yoon, K. E., Lee, G. P., Lee, J. S., & Ryu, K. H. (2012). Genetic relationship and differentiation of Paphiopedilum and Phragmepedium based on RAPD analysis. *Scientia horticulturae*, *109*(2), 153-159.

Dalir, M. and Safarnejad, A. (2017). Morphological, Molecular and Phytochemical Variation in Some Thyme Genotypes. *Journal of Medicinal plants and By-Products*, *6*(1), 41-52. doi: 10.22092/jmpb.2017.113149

El-Hadi, A., Habiba, R.M., El-Leel, A., Omneya, F, & Ahmed, N.F. (2024). Genetic Diversity of some Basil Varieties Estimated using RAPD, *SCoT and ISSR Techniques. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 15(8), pp.93-101.

Farasat, N., EydiZadeh, A. , Zangeneh, M. and Poshtdar, A. (2023). Study of the essential oil of Ditrichia graveolens (L.) Greuter (Asteraceae) from Khouzestan province (Mollasani). *Research in Plant Metabolites*, *1*(2), 5-16. doi: 10.22034/jrpsm.2023.196751. (In Persian).

Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G. P., Naik, P. K., Chauhan, R. S., Tiwari, S. K., ... & Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different Jatropha curcas genotypes. *African journal of biotechnology*, 7(23).

Hadian, J., Tabatabaei, S. M. F., Naghavi, M. R., Jamzad, Z., & Ramak-Masoumi, T. (2008). Genetic diversity of Iranian accessions of Satureja hortensis L. based on horticultural traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, *115*(2), 196-202.

Huang, S., Wei, X., Quan, C., Xu, M., Chen, Z., Wei, F, & Tang, D. (2024). Genetic diversity evaluation and germplasm identification of Mesona chinensis Benth from plant morphology, cytology, and EST-SSR molecular markers. *Acta Physiologiae Plantarum*, 46(11), p.98.

Jalalifar, T., Soltani Howyzeh, & M., Shahbazi, A. 2015. Study of different methods for DNA extraction from the medicinal plant *Trachyspermum ammi*. The second national conference on new topics in agriculture. Iran, Tehran, 12405.

Jalal-Dowlatshahi, S., Sadat-Noori, S. A., Mortazavian, S. M. M., Howyzeh, M. S., & Esfahani, K. (2023). The molecular cloning and structural analysis of a cytochrome P450 (CYP71D500) encoding gene from ajowan (*Trachyspermum ammi L*.) medicinal plant. *Iranian Journal of Genetics & Plant Breeding (IJGPB)*, 12(1). (In Persain)

Khadivi, A., Hosseini, A.S, & Kashi, F. (2024). Association between quantitative morphological traits and RAPD molecular markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Science & Nutrition*, 12(1), pp.105-115.

Krizman, M., Jakše, J., Baričevič, D., Javornik, B., & Prošek, M. (2006). Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta Agriculturae Slovenica*, *87*(2), 427-433.

Modareskia M. Darvishzadeh R. Hassani A and Kholghi M. Molecular diversity within and between Ajowan (*Carum copticum* L.) populations based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of Plant Molecular Breeding (JPMB), Vol.1/No.1/December 2012/ 51-62.

Mortazavi Moghadam, F.A., Qaderi, A, & Sharifi-Sirchi, G.R. (2021). Evaluation of Genetic Diversity of 17 Populations (*Lepidium sativum* L.) Plant Collected from Different Regions of Iran by RAPD Marker. *ACS Agricultural Science & Technology*, 1(6), pp.684-690.

Motie, F. M., Howyzeh, M. S., & Ghanbariasad, A. (2024). Synergic effects of DL-limonene, R-limonene, and cisplatin on AKT, PI3K, and mTOR gene expression in MDA-MB-231 and 5637 cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136216.

Nabhani, A., Soltani Howyzeh, M., & Parvizi Alemani, M. (2023). Genetic diversity analysis in the local treasury of sugarcane germplasm in Khuzestan province using RAPD marker. *Plant Research Journal (Iranian Journal of Biology)*, (online published). https://doi.org/10.22034/jpr.2024.2357. (In Persian).

Nagar, O., Maloo, S. R., & Bisen, P. (2019). Assessment of genetic diversity in ajwain (Trachyspermum ammi L.) genotypes using morphological and molecular markers. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, *32*(02), 141-149.

Naseem, I., Khan, M.A., Habib, U., Rana, R.M., Qasim, M., Alwahibi, M.S., Khanum, R., Shafiq, M. & Iqbal, R. (2024). Morphological profiling and DNA barcoding revealed genetic diversity and phylogeny of Mentha species cultivated in Pakistan. *Genetic Resources and Crop Evolution*, pp.1-19.

Sadati, S., Sadatnouri, A., Ramshini, H. and Soltani, A. 2014. Identification of the best ISSR primer to evaluate the genetic diversity in the ecotypes of Zynia (Trachyspermum copticum), the first international congress and the 13th genetics congress. Iran, Tehran, 328072. (In Persian).

Sadat-Noori, S. A., M. Niazian, M. Soltani Howyzeh, & M. Amiripoor. (2018). Ajowan Medicinal Plant. *Botany, Medicinal Properties, Agronomy, Plant Breeding and Biotechnology*.

Sadat-Noori, A., Soltani Howyzeh, A. & Moradi, N. 2020. Ajowan." In *Carrots and related Apiaceae crops*, pp. 231-239. Wallingford UK: CABI, 2020.

Shahbaz, Sh., Soltani Howyzeh, M., & Shariati, V. (2023). Large Scale Identification of SSR Molecular Markers Using RNA Sequencing in Yarrow (*Acillea millefolium* L.). *Journal of Crop Breeding,* 15(46), 156-165. (In Persian).

Soltani Howyzeh, M., Noori, S. A. S., & Shariati, V. (2018). Essential oil profiling of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) industrial medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, *119*, 255-259.

Tabaei Aghdaei, S.R., Hosseini Monfared, H., Fahimi, H., Ebrahimzade, H., Jebelly, M., Naghavi M.R & Babaei A. (2007). Genetic variations amongst Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) landraces from different regions of Iran. *Iranian Journal of Botany*, 12: 121-127. (In Persian).

Tadayoni, M. and Cheragi, P. (2024). The Effect of Aqueous and Ethanolic Extract of Acorn (Quercus persica) on Shelf life of Prebiotic and Egg-Free salad sause. *Research in Plant Metabolites*, *1*(4), 17-32. doi: 10.22034/jrpsm.2024.442340.1030. (In Persian).

Taheri E., Shirzadian Khorramabad R., Sharifi sirchi Gh., Sabouri A., Abbaszadeh Kh. (2016). Investigation of Genetic and Photochemical diversities of yarrow (Achillea wilhelmsii) in Iran. *Modern Genetics Journal*, 11 (3) :367-376. http://mg.genetics.ir/article-1-1435-fa.html. (In Persian).

Thormann, CE., Fetrria, ME, & Camargo, HEA. (1994). comparision of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationship within and among craciferous. *Theoretical and Applid Genetics*, 88:973-980.

Trindade, H., Costa, M.M., Sofia, B.L.A., Pedro, L.G., Figueiredo,A.C. & Barroso, J.G. (2008). Genetic diversity and chemical poly morphism of Thymus caespititius from Dico, Sao Jorgeand Terceira Islands (Azores). *Biochemical systematics an Ecology*,36:790-797.

World Health Organization. (2023). WHO monographs on selected medicinal plants (Vol. 2). World Health Organization.

Zheng, R., Zhao, S., Khayyatnezhad, M, & Shah, S.A. (2021). Comparative study and genetic diversity in Salvia (Lamiaceae) using RAPD Molecular Markers. *Caryologia*, 74(2), pp.45-56.