

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

هدا هاشمی<sup>۱</sup>، عباس صفرنژاد<sup>۲\*</sup> و عبدالرضا باقری<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد، دانشکده یا گروه دانشگاه فردوسی، مشهد.

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، مشهد، پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۱۹

### 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 ۱۵ توده بومی زیره پارسی ایران و به جهت خطای حداقل، DNA ژنومی بصورت بالک (۴۰ گیاهچه از هر توده) با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییر و افزایش مراحل شستشوی DNA، استخراج گردید. کمیت و کیفیت نمونه های DNA با الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی و سپس با ۲۱ آغازگر RAPD تکثیر صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزارهای POPGENE و NTSYS انجام و دندروگرام برپایه UPGMA ترسیم شد. با انجام واکنش PCR، تعداد ۱۰۸ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی در نمونه ها به دست آمد که ۴۵ باند، معادل ۴۱٪ باندها چندشکل بود. بر اساس داده های مولکولی، دامنه شباهت بین نمونه ها از ۰/۶۶ تا ۰/۹۳ متغیر بود. نتایج تجزیه داده های مولکولی با نتایج مورفولوژی و فواصل جغرافیایی آنها نیز منطبق بود، به طوری که در شباهت ژنتیکی ۸۵٪، نمونه های هر استان در شاخه های مشترکی قرار گرفتند. به طور کلی، بررسی تنوع در ژنوتیپهای زیره با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که این مارکر در شناسایی نواحی چندشکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرم پلاسم این گونه می تواند مفید باشد.

واژه های کلیدی: زیره پارسی، گیاهان دارویی، تنوع ژنتیکی، مارکر مولکولی

### مقدمه

اقتصادی این گیاه، دانه (میوه شیزوکارپ) است که جهت مصارف دارویی و ادویه ای استفاده می شود 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 تقریباً محدود به منطقه تولید طبیعی آن بوده است. در حال حاضر با حفظ ساختار طبیعی این گیاه،

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 ( $2n=2x=14$ ) و خودگرده افشان با گلپایی هرمافروdit است که در تیره چتریان Apiaceae قرار دارد. محصول

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 پاریسی استفاده شد (۱۹۹۷ *Kapila et al.* و *Mittal et al.*، ۲۰۰۶). از مارکرهای ملکولی و نشانگرهای ملکولی در بررسی تنوع ژنتیکی گونه های مختلف داروئی، جنگلی و مرتعی استفاده گسترده ای 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 تفاوت های ژنتیکی نیست، بنابراین امروزه برای تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی استفاده می شود. در حال حاضر انواع نشانگرهای مولکولی نظیر RFLP، میکروستلایت و انواع روش های مبتنی بر PCR در اختیار است. نشانگر RAPD 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 DNA ژنومی نیاز است. در این روش با استفاده از آغازگرهای کوتاه و دمای پایین برای اتصال این آغازگرها به DNA الگو می توان شرایط را برای تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی قطعات فراهم کرد، این روش علی رغم تکرارپذیری کم، یکی از روش های 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.*,

فن آوری تولید زراعی آن در کشور فراهم شده است (Sheidai and Ahmadian, 1996، نادرنژاد و پورسیدی، ۱۳۸۲).

خواب موجود در بذر زیره پاریسی 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 می شوند (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 پلاسمن مناسبی برای برنامه های اصلاحی می باشند. بانک های ژن با جمع آوری، شناسایی و ارزیابی دقیق و حفاظت از ذخایر توارثی و توده های گیاه، اطلاعات مورد نیاز محققان را تأمین می کنند. کشاورزی و تولید غذا نیز بستگی به استفاده از ژنوتیپ های گیاهی پرمحصول دارد. روش های متداول اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ های مطلوب از بین جوامع با تنوع ژنتیکی می باشد، بنابراین آگاهی از تنوع جمعیت پیش شرط اصلی و اولین گام در اصلاح گیاهان می باشد (فارسی و باقری ۱۳۷۷).

در حال حاضر بررسی تنوع و گروه بندی گیاهان بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می پذیرد. طی تحقیقی مراحل فنولوژی، عملکرد و اجزاء عملکرد و وضعیت مورفولوژی توده های زیره پاریسی بررسی شد، که در برخی صفات از جمله طول

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 آغازگر تصادفی (Cinagene) RAPD صورت گرفت (جدول ۲). واکنش‌های تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر در دو تکرار همراه با نمونه کنترل منفی انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل  $2/5 \mu\text{L}$  از بافر PCR با غلظت  $10x$ ،  $50$  نانوگرم DNA،  $2$  میلی‌مول  $\text{MgCl}_2$ ،  $0/2$  میکرومول dNTPmix و نهایتاً یک واحد *Taq polymerase* در هر واکنش  $25$  میکرولیتری بود.

دنا توره شدن اولیه در  $95$  درجه سانتیگراد به مدت  $5$  دقیقه و در  $30$  سیکل بعدی، دنا توره شدن در  $95$  درجه سانتیگراد به مدت  $1$  دقیقه، سپس مرحله اتصال در دمای  $35$  درجه سانتیگراد به مدت  $30$  ثانیه و مرحله آخر یا مرحله گسترش در  $72$  درجه سانتیگراد به مدت  $2$  دقیقه اعمال شد و سپس مرحله گسترش نهایی، جهت تکمیل رشته‌های دوتایی DNA در  $72$  درجه سانتیگراد به مدت  $8$  دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها در دمای  $4$  درجه سانتیگراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند محصولات PCR به نسبت  $5$  به  $1$  با بافر ( $6x$  Loading) مخلوط شده و الکتروفورز تحت ولتاژ ثابت  $90$  ولت به مدت  $120$  دقیقه انجام گرفت. از DNA Ladder 1kbp (MBI Fermentus) و رنگ آمیزی اتیدیوم برآید  $0/5$  میلی گرم در میلی لیتر، به مدت  $10$  دقیقه و سپس رنگ بری  $5$  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.

(2006)، و انار (Sarkhosh et al., 2006) مورد استفاده قرار گرفته است. اکثر مطالعاتی که تا به حال روی زیره پارسی صورت گرفته، عمدتاً بر روی اسانس، خواص دارویی و جنبه‌های زراعی (عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸۴)، کشت بافت (ولی زاده و همکاران، ۱۳۸۶ و Valizadeh et al., 2006) و مطالعات سیتوژنتیکی (نادرزاد و پورسیدی، ۱۳۸۲) بوده است. عملیات به نژادی در زیره، در مقایسه با سایر محصولات زراعی از قدمت کمتری برخوردار است و فعالیت نسبتاً 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 مولکولی RAPD انجام شده است.

### مواد و روشها

بذور  $15$  توده زیره پارسی (جدول ۱) 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 سرمایی  $4$  درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس جهت رشد و نمو برگها به اتاقک کشت تحت کنترل با دمای  $25$  درجه سانتیگراد، با برنامه نوری  $16$  ساعت روشنایی و  $8$  ساعت تاریکی منتقل شدند (Bonyanpour et al., 2001 و Sharifi, 2002 & Pouresmael). DNA ژنومی بصورت بالک ( $40$  گیاهچه از هر توده) با استفاده از روش CTAB بهینه شده برای این

کردند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۵/۱ و میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر جفت آغازگر ۲/۱۴ بود. بسته به نوع آغازگر تعداد باند چندشکل از ۱ تا ۶ باند متغیر بود. بیشترین چند شکلی را آغازگر OPB17 با توالی ۳' CGA CTG CAG T ۵' از خود نشان داد (شکل ۱)

بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی جفت نمونه های استان کرمان (بردسیر N12 و کوههای جوپار N11) در کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۹۲ شباهت) و نمونه های جنگل خواجه خراسان N15 و سیاه کوه استان مرکزی N8 در دورترین فاصله نسبت به هم (۰/۶۶ شباهت) قرار داشتند (جدول ۳)، که در مقایسه نتایج آنالیز داده های مولکولی، با نتایج حاصله از داده های مورفولوژیکی (عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸۴) مشخص شد که این دو نمونه در بررسی های میانگین و درصد عملکرد اسانس توده های زیره پارسی ایران نیز دارای بیشترین اختلاف بوده اند. همچنین نمونه های کوه لახسه مهریز استان یزد N9 و کوه های جوپار استان کرمان N11 دارای بیشترین شباهت در عملکرد بذر (شباهت خیلی معنی دار) بودند که این مسئله در دندروگرام حاصل از داده های مولکولی هم با ۹۳٪ شباهت تایید شد (شکل ۲). همچنین فاصله ژنتیکی بین دو نمونه از استان های مجاور، نمونه استان سمنان N4 و نمونه های استان خراسان (N5, N13, N14, N15)، نمونه بابا امان بجنورد N5 که بین چهار نمونه استان خراسان، از نظر فاصله جغرافیایی هم کمترین فاصله را با سمنان دارند، بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۸۷) وجود داشت. بین نمونه های جنگل خواجه استان خراسان N5 و توده کوه های جوپار کرمان N11 نیز فاصله ژنتیکی بالایی وجود داشت که این دو توده در بررسی های

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 POPGENE (v.32) (بر پایه روش ضریب تشابه نی<sup>۱</sup> و شانون<sup>۲</sup>) و NTSYS (v.2.02) 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. مدل MXCOMP برای محاسبه همبستگی کوفنتیک استفاده و ماتریکس تشابه توسط<sup>۴</sup> UPGMA با استفاده از مدل کلاستری<sup>۵</sup> SAHN آنالیز و نهایتاً 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 تأیید شد. در واکنش PCR، تعداد ۱۰۸ قطعه DNA تکثیر شده قابل ارزیابی از نمونه ها به دست آمد که ۴۵ باند (۴۱٪ باندها) چندشکل بودند. آغازگرهای مختلف بین ۲ تا ۹ باند تولید

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

است، در مراحل بعدی از نتایج این تحقیق می توان 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 توده ای<sup>۱</sup> و گزینش لاین های خالص<sup>۲</sup> استفاده می شود که کارایی این روش ها به میزان تنوع ژنتیکی بستگی دارد (فارسی، ۱۳۷۷).

به طور کلی، بررسی تنوع در توده های زیره با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که این مارکر در شناسایی نواحی چند شکلی و مدیریت ژرم پلاسم می تواند مفید باشد. بنابراین به نظر می رسد این نشانگر مولکولی را می توان به عنوان یک ابزار مفید در بررسی فاصله ژنتیکی و تفاوت بین نمونه های 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 کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگر مولکولی ریزوماهواره (SSR). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. همین شماره، ۱۶(۲): ۱۸۲-۱۷۳  
-عسگرزاده، م.، غلامی، ب. و نگاری، ع.، ۱۳۸۴. بررسی عملکرد کمی و کیفی اکوتیپ های زیره کوهی (*Bunium persicum*)

عسگرزاده و همکاران (۱۳۸۴) 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 نمونه هاست که این مقدار در دندروگرام ها هم تأیید شد. شاخص اطلاعاتی شانون هم که شاخصی دیگر از تنوع است ۰/۲۷۳ به دست آمد. همچنین ضریب کوفتیک محاسبه شده ( $r=0/91$ )، که در ارزیابی ها جز رده خیلی خوب به حساب می آید.

در دندروگرام ترسیم شده در فاصله ژنتیکی ۸۵٪، نمونه ها بر اساس استان های مربوطه در شاخه های مجزایی قرار گرفتند. از آنجایی که نمونه ها توده های بومی مناطق بوده است، همان طور که انتظار می رفت میان پراکنش جغرافیایی و فواصل ژنتیکی رابطه مستقیمی وجود دارد و نمونه هایی که در یک ناحیه جغرافیایی هستند، در یک گروه یا گروه های نزدیک به هم قرار گرفتند (شکل ۲). به عنوان مثال نمونه های استان کرمان بالای ۸۷٪، نمونه های استان اصفهان بالای ۸۳٪ و نمونه های استان های 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 توده ای و یا خطای احتمالی در جمع آوری بذور می باشد. نهایتا، نمونه سیاه کوه استان مرکزی دارای کمترین شباهت به سایر نمونه ها بوده و در سطح شباهت ۷۵٪، از سایر نمونه ها جدا و در شاخه مجزایی قرار گرفت که احتمالا به علت تنوع بالای درون توده های می باشد، که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

با توجه به تنوع به دست آمده بین توده های مورد بررسی و نظر به اینکه زیره پارسی گیاهی خود بارور

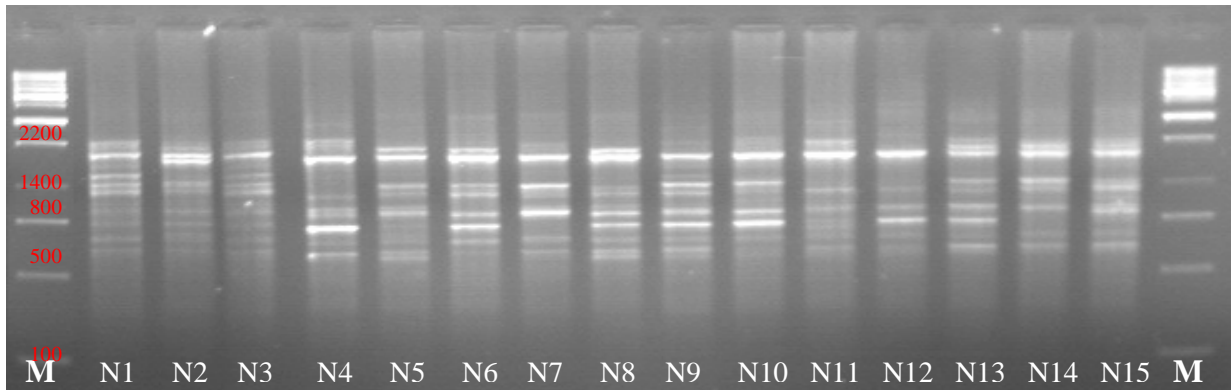
- diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.) . South African Journal of Botany, 73:43-48.
- Kapila, R.K., Panwar, K.S. and Badiyala, D., 1997. Variation and association analysis in domesticated populations of black caraway (*Bunium persicum*). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science. 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.
- 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، ۲۳۰ صفحه.
- نادرنژاد، ن. و پورسیدی، ش.، ۱۳۸۲. تاکسونومی عددی برخی جمعیت‌های زیره ایران در جنس‌های *Bunium*, *Carum* و *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. و کاظمی 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

جدول ۱: منشا جغرافیایی توده های بومی زیره های پارسى 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 لاخته مهریز)
N۲	استان اصفهان (خونج)	N۱۰	استان کرمان (سیرج)
N۳	استان اصفهان (جندق)	N۱۱	استان کرمان (کوه های جوپار)
N۴	استان سمنان (کوه زر دامغان)	N۱۲	استان کرمان (بردسیر)
N۵	استان خراسان شمالی (بابا امان بجنورد)	N۱۳	استان خراسان رضوی (فریزی چناران)
N۶	استان قزوین (کوه های الموت)	N۱۴	استان خراسان رضوی (چلمیر درگز)
N۷	استان هرمزگان (کوه گنو بندرعباس)	N۱۵	استان خراسان رضوی (جنگل خواجه)
N۸	استان مرکزی (سیاه کوه)		

جدول ۲: کد و توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق

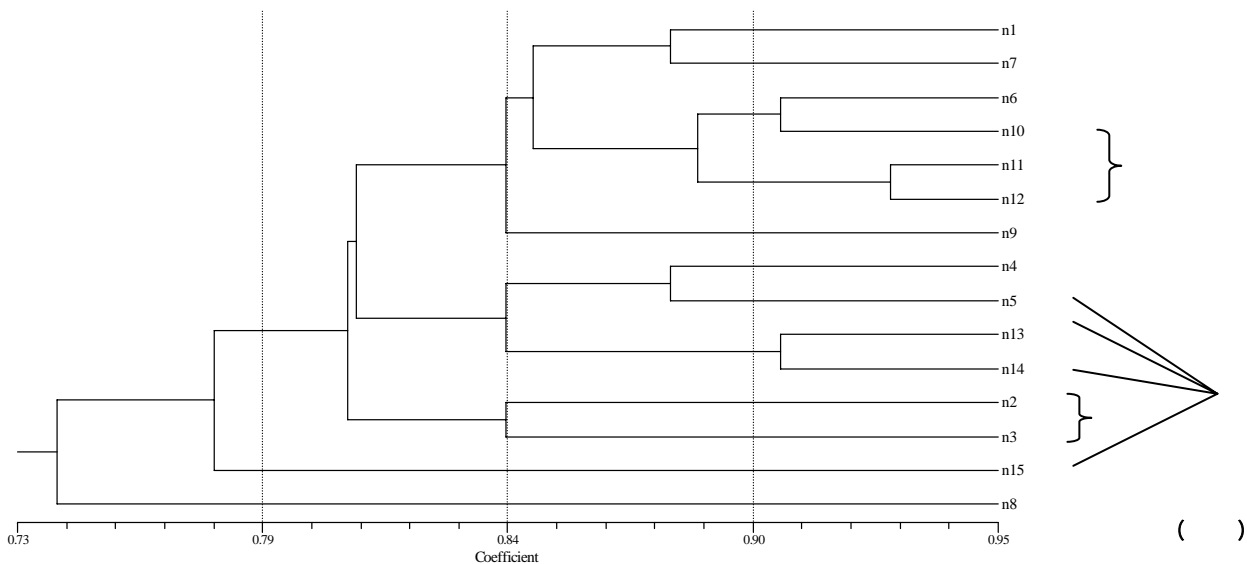
کد آغازگر	توالی آغازگر	کد آغازگر	توالی آغازگر
OPU12	۵´ TCA CCA GCC A ۳´	OPE7	۵´ AGA TGC AGC C ۳´
OPS17	۵´ TGG GGA CCA C ۳´	OPJ20	۵´ AAG CGG CCT C ۳´
OPU6	۵´ ACC TTT GCG G ۳´	OPK14	۵´ GAC GGA TCA G ۳´
OPJ21	۵´ ACG AGG GAC T ۳´	OPU20	۵´ ACA GCC CCC A ۳´
OPA9	۵´ GGG TAA CGC C ۳´	OPJ1	۵´ CCC GGC ATA A ۳´
OPC8	۵´ TGG ACC GGT G ۳´	OPJ19	۵´ GGA CAC CAC T ۳´
OPJ18	۵´ TGG TCG CAG A ۳´	OPF5	۵´ CCG AAT TCC C ۳´
OPP6	۵´ GTG GGC TGA C ۳´	OPB17	۵´ CGA CTG CAG T ۳´
OPC13	۵´ AAG CCT CGT C ۳´	OPD7	۵´ TGT CTG GGT G ۳´
OPI14	۵´ TGA CGG CGG T ۳´	OPP7	۵´ GTC CAT GCC A ۳´
OPQ6	۵´ GAG CGC CTT G ۳´	OPS17	۵´ TGG GGA CCA C ۳´
OPU12	۵´ TCA CCA GCC A ۳´		



شکل ۱: نمونه‌ای از الگوی RAPD به دست آمده با آغازگر OPB17. نمونه‌ها با ترتیب شماره از چپ به راست بارگذاری شده‌اند.

جدول ۳: محاسبه میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های 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	<b>0.92</b>	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	<b>0.65</b>	0.71	0.79	0.79	0.79	0.8	0.77	1



شکل ۲: دندروگرام حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی زیره پارسی با روش UPGMA



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

H. Hashemi<sup>1</sup>, A.Safarnejad\*<sup>2</sup>, and A. Bagheri<sup>3</sup>

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.