Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/ijrfpbgr.2026.372999.1497

Vol. 34, No. 1, Page 70- 87 (2026)

Molecular and Cytogenetic Characterization of Superior Populations of the Medicinal Plants Ajowan (*Carum copticum* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Zahra Shirazi[1*], Bohloul Abbaszadeh[2] and Fereshteh Asadi-Corom[3]

1* Corresponding author, Assist.Prof., Research Institute of Forests and Rangelands (AREEO), Tehran, Iran.
E-mail:z.shirazi@rifr-ac.ir
2 Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands (AREEO), Tehran, Iran
3 Researcher, Research Institute of Forests and Rangelands (AREEO), Tehran, Iran

Received: 2026/06/02 Revised: 2026/07/19 Accepted: 2026/08/19

Abstract

Background and Objective: Ajowan (*Carum copticum* L.) is one of the important annual spice and medicinal plants cultivated in various regions of the world, particularly in the Middle East, Iran, and India. Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is also an important aromatic and medicinal plant and is among Iran's export commodities. Fennel's seeds are the major essential oil-producing organ. Both species belong to the family Apiaceae. In recent years, with the cultivation and domestication of indigenous medicinal plant populations in Iran, several superior genotypes with high yield and economic cultivation potential have been identified and are currently at the stage of registration and release. In the introduction of new cultivars, yield, phytochemical, molecular, and cytogenetic characteristics should be investigated and documented as components of cultivar identification. The simultaneous use of molecular markers and cytogenetic characteristics can facilitate the identification and discrimination of genotypes at different genetic levels and provide complementary information on genetic diversity and chromosomal structure. Given the economic and medicinal importance of these two species and the need for accurate identification of superior genotypes, simultaneous assessment of molecular diversity and cytogenetic characteristics can contribute to completing the identification profiles of these genotypes. Therefore, this study aimed to develop molecular profiles using SCoT markers, document the chromosome number, evaluate karyotype characteristics, and ploidy variation of superior ajwaan and fennel

Materials and Methods: Three ajowan populations, including Sarbisheh (gene bank code 37251), Shiraz (12313), and Khorasan (1085), and two fennel populations, including Ardabil (10589) and Isfahan (945), were investigated. For molecular diversity analysis, genomic DNA was extracted from young leaves and amplified using six Start Codon Targeted (SCoT) markers. PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels, and bands were scored as a binary matrix based on their presence or absence. Primer performance was evaluated using Polymorphic Information Content (PIC), Effective Multiplex Ratio (EMR), Resolving Power (RP), and Marker Index (MI). In addition, genetic diversity indices, including observed number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne), Shannon's information index (I), expected

Copyright: © 2026 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

heterozygosity (He), and unbiased expected heterozygosity (uHe), were estimated, and genetic similarity among populations was determined based on Nei's genetic similarity. For cytogenetic analysis, young roots were subjected to pretreatment, fixation, hydrolysis, and staining, and chromosome preparations were obtained using the squash method. Suitable metaphase plates were identified using a light microscope and photographed with a digital camera. Chromosome number, chromosome dimensions, and karyotypic symmetry indices were then measured and compared.

Results: In the molecular analysis of fennel populations using six SCoT markers, a total of 60 bands were detected, of which 56 (93.33%) were polymorphic. The highest values of PIC, EMR, RP, and MI were 0.422, 15, 10, and 6.33, respectively, obtained from SCoT11. Based on the genetic diversity indices Na, Ne, I, He, and uHe, the Isfahan population (945) of fennel exhibited higher genetic diversity than the Ardabil population (10589), and Nei's genetic similarity between the two populations was 0.783. In ajowan, 50 bands were detected, of which 45 (90%) were polymorphic. The highest values of PIC, EMR, RP, and MI were 0.401, 16, 9.55, and 6.42, respectively, obtained from SCoT20. The highest and lowest genetic similarity were observed between the Sarbisheh and Shiraz populations (0.876) and between the Sarbisheh and Khorasan populations (0.757), respectively. Among the ajowan populations, Shiraz (12313) showed the highest genetic diversity, whereas Sarbisheh (37251) exhibited the lowest. Cytogenetic analysis revealed chromosome numbers of 2n=18 in ajowan and 2n=22 in fennel populations. In ajowan, chromosome length ranged from 2.29 to 2.34, the centromeric index ranged from 0.348 to 0.371, and the symmetry index ranged from 72.190 to 76.460. In fennel, chromosome length was 2.954 and 3.009 in the Ardabil and Isfahan populations, respectively, while the centromeric index was 0.391 and 0.350, and the symmetry index was 66.056 and 65.481, respectively. Despite these numerical differences, statistical analyses revealed no significant differences in chromosome traits or karyotypic symmetry indices among the populations of either species.

Conclusion: The findings demonstrated that SCoT markers were highly effective in detecting polymorphism and genetic differentiation among the superior populations of ajowan and fennel. SCoT11 in fennel and SCoT20 in ajowan exhibited the highest discriminatory efficiency and may therefore be useful for the preliminary screening of genotypes. In contrast, the relative stability of karyotypic characteristics indicated that the observed molecular differences were not necessarily accompanied by major chromosomal changes. Therefore, the integration of molecular and cytogenetic data can provide a suitable basis for genetic fingerprinting, genotype identification, and the management and conservation of genetic resources in these medicinal plants.

Keywords: Cytogenetics, Genetic Diversity, Genetic Distance, Karyotype, SCoT Marker

تهیه شناسنامه مولکولی و سیتوژنتیکی جمعیت‌های برتر گیاهان دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) و رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)

زهرا شیرازی[۱]، بهلول عباس‌زاده[۲] و فرشته اسدی کرم[۳]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست‌الکترونیک: z.shirazi@rifr-ac.ir

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- محقق، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۸

چکیده

سابقه و هدف:

زنیان (*Carum copticum* L.) از مهمترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی یکساله است که در مناطق مختلف جهان، به‌ویژه خاورمیانه، ایران و هند، کشت می‌شود. گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* Mill.) نیز یکی از مهم‌ترین گیاهان معطر و دارویی بوده و از اقلام صادراتی ایران به‌شمار می‌رود. دانه رازیانه مهم‌ترین اندام تولیدکننده اسانس در این گیاه است. هر دو گونه متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) هستند. در سال‌های اخیر، با کشت و اهلی‌کردن توده‌های بومی گیاهان دارویی کشور، تعدادی ژنوتیپ برتر با عملکرد و قابلیت کشت اقتصادی بالا شناسایی شده‌اند که در مرحله ثبت و معرفی قرار دارند. در معرفی ارقام جدید، لازم است ویژگی‌های عملکردی، فیتوشیمیایی، مولکولی و سیتوژنتیکی به‌عنوان بخشی از شناسنامه رقم مورد بررسی و مستندسازی قرار بگیرند. استفاده همزمان از نشانگرهای مولکولی و ویژگی‌های سیتوژنتیکی می‌تواند امکان شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها را در سطوح مختلف ژنتیکی فراهم کرده و اطلاعات مکملی درباره تنوع ژنتیکی و ساختار کروموزومی آنها ارائه دهد. با توجه به اهمیت اقتصادی و دارویی این دو گونه و ضرورت شناسایی دقیق ژنوتیپ‌های برتر، بررسی همزمان تنوع مولکولی و ویژگی‌های سیتوژنتیکی می‌تواند به تکمیل اطلاعات شناسنامه‌ای این ژنوتیپ‌ها کمک کند. این پژوهش با هدف تهیه شناسنامه مولکولی استفاده از نشانگرهای SCoT و مستندسازی تعداد کروموزوم‌ها و ویژگی‌های کاریوتیپی و تنوع پلوئیدی در جمعیت‌های برتر زنیان و رازیانه اجرا شد.

مواد و روش‌ها:

در این پژوهش، سه جمعیت زنیان شامل سربیشه (کد بانک ژن ۳۷۲۵۱)، شیراز (۱۲۳۱۳) و خراسان (۱۰۸۵) و دو جمعیت رازیانه شامل اردبیل (۱۰۵۸۹) و اصفهان (۹۴۵) بررسی شدند. برای بررسی تنوع مولکولی، DNA ژنومی از برگ‌های جوان استخراج و با استفاده از شش نشانگر، توالی ناحیه کدکننده (SCoT) تکثیر شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد، براساس حضور یا عدم حضور باندها به‌صورت ماتریس صفر و یک امتیازدهی شدند. به‌منظور ارزیابی کارایی آغازگرها، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، قدرت تفکیک (RP) و شاخص نشانگر (MI) محاسبه شد. همچنین، شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده‌شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار تصحیح شده (uHe) محاسبه گردید و تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها با استفاده از شاخص نی محاسبه شد. در مطالعات سیتوژنتیکی، ریشه‌های جوان پس از پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی، به روش اسکواش آماده شدند. صفحات متافازی مناسب با میکروسکوپ نوری شناسایی و با دوربین دیجیتال تصویربرداری شدند. سپس تعداد کروموزوم‌ها، ابعاد کروموزومی و شاخص‌های تقارن کاریوتیپی اندازه‌گیری و مقایسه گردیدند.

نتایج:

در بررسی تنوع مولکولی جمعیت‌های رازیانه با استفاده از شش نشانگر SCoT، در مجموع ۶۰ باند شناسایی شد که ۵۶ باند (۹۳/۳۳) چندشکل بودند. بیشترین مقادیر PIC، EMR، RP و MI به‌ترتیب ۰/۴۲۲، ۱۵، ۱۰ و ۶/۳۳ مربوط به نشانگر SCoT11 بود. براساس شاخص‌های تنوع ژنتیکی Na، Ne، I، He و uHe جمعیت اصفهان (۹۴۵) در رازیانه تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به اردبیل (۱۰۵۸۹) داشت و تشابه ژنتیکی نی بین دو جمعیت ۰/۷۸۳ به‌دست آمد. در زنیان، ۵۰ باند شناسایی شد که ۴۵ باند (۹۰ درصد) چندشکل بودند. بیشترین مقادیر PIC، EMR، RP و MI به‌ترتیب ۰/۴۰۱، ۱۶، ۹/۵۵ و ۶/۴۲ مربوط به نشانگر SCoT20 بود. بیشترین و کمترین تشابه ژنتیکی به‌ترتیب بین جمعیت‌های سربیشه و شیراز (۰/۸۷۶) و بین سربیشه و خراسان (۰/۷۵۷) مشاهده شد. در زنیان نیز جمعیت شیراز (۱۲۳۱۳) بیشترین تنوع ژنتیکی و جمعیت سربیشه (۳۷۲۵۱) کمترین تنوع را نشان داد. در بررسی سیتوژنتیکی، جمعیت‌های زنیان ۲n=۱۸ و جمعیت‌های رازیانه ۲n=۲۲ کروموزوم داشتند. در زنیان، طول کروموزوم‌ها ۲/۲۹ تا ۲/۳۴، شاخص سانترومری ۰/۳۴۸ تا ۰/۳۷۱ و شاخص تقارن نیز ۷۲/۱۹۰ تا ۷۶/۴۶۰ به‌دست آمد. در رازیانه، طول کروموزوم‌ها ۲/۹۵۴ و ۳/۰۰۹، شاخص سانترومری ۰/۳۹۱ و ۰/۳۵۰ و شاخص تقارن ۶۶/۰۵۶ و ۶۵/۴۸۱ به ترتیب در جمعیت اردبیل و اصفهان بدست آمد. با وجود این تفاوت‌های عددی، آزمون‌های آماری تفاوت معنی‌داری در صفات کروموزومی و شاخص‌های تقارن بین جمعیت‌های هر دو گونه نشان ندادند.

نتیجه‌گیری:

در مجموع، نشانگرهای SCoT توانایی مناسبی در شناسایی تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های زنیان و رازیانه نشان دادند. در رازیانه، دو جمعیت مورد بررسی با تشابه ژنتیکی ۰/۷۸۳ از یکدیگر قابل تمایز بودند. در زنیان، جمعیت‌های سربیشه و شیراز بیشترین تشابه (۰/۸۷۶) و جمعیت‌های سربیشه و خراسان کمترین تشابه (۰/۷۵۷) را داشتند که بیانگر تمایز ژنتیکی بیشتر جمعیت سربیشه و خراسان است. این جمعیت‌ها می‌توانند به‌عنوان منابع ژنتیکی متمایز و والدین متفاوت در برنامه‌های اصلاحی آینده مورد توجه قرار بگیرند. از نظر سیتوژنتیکی، ۲n=۱۸ در زنیان و ۲n=۲۲ در رازیانه مشاهده شد و نبود تفاوت معنی‌دار در صفات کاریوتیپی، بیانگر ثبات نسبی ساختار کروموزومی جمعیت‌ها در هر گونه بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، سیتوژنتیک، کاریوتیپ، فاصله ژنتیکی، نشانگر SCoT

مقدمه

گیاهان دارویی از منابع مهم ژنتیکی و گیاهی هستند. شناخت تنوع ژنتیکی آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی اهمیت دارد. این تنوع با استفاده از صفات ریخت‌شناسی، مولکولی و سیتوژنتیکی قابل بررسی است. در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر، تولید ارقام جدید و بررسی روابط خویشاوندی و فیلوژنتیکی کاربرد دارد (Mohammadi and Prasanna, 2003; Mohammadi, 2006).

رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller.) از خانواده Apiaceae، یکی از گیاهان دارویی و معطر مهم با کاربردهای گسترده در طب سنتی و مدرن است. این گیاه به‌طور عمده در بهبود اختلالات گوارشی، کاهش نفخ و به‌عنوان ادرارآور و افزایش‌دهنده ترشح شیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. دانه‌های رازیانه به دلیل عطر و طعم مطلوب، کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و فراورده‌های گیاهی دارند. ترکیبات زیست‌فعال اصلی آن شامل ترکیبات فنولی و ترکیبات فرّاری مانند ترانس‌آنتول، استراگول و فنچون است. مطالعات آزمایشگاهی و حیوانی، فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی رازیانه را نشان داده‌اند که بخش مهمی از این فعالیت‌ها به ترکیبات فنولی آن نسبت داده می‌شود (Rather *et al.*, 2016). رازیانه به‌دلیل سازگاری با مناطق خشک و نیمه‌خشک و عملکرد مناسب، به‌ویژه در شرایط کشت آبی، می‌تواند گزینه‌ای اقتصادی برای کشاورزی باشد. همچنین، فرآوری دانه و استخراج ترکیبات دارویی آن از ظرفیت بالایی برای ایجاد ارزش افزوده برخوردار است. هند بزرگ‌ترین

تولیدکننده و صادرکننده دانه رازیانه در جهان است و کشورهای مصر، ترکیه و چین نیز از تولیدکنندگان مهم آن به‌شمار می‌روند. در ایران، در سال ۱۴۰۳ حدود ۳۲۳۲ هکتار از اراضی به کشت رازیانه اختصاص یافته و بیش از ۸۱۷۵ تن دانه تولید شده است. استان‌های همدان، خوزستان، اصفهان و زنجان از مناطق مهم تولید رازیانه هستند و شهرستان رزن در استان همدان به‌عنوان قطب تولید این محصول شناخته می‌شود. عملکرد دانه رازیانه نیز با توجه به شرایط کشت، حدود ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (Makizadeh and Kamalioun, 2026).

تنوع ژنتیکی رازیانه با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی بررسی شده است. نشانگرهای RAPD، ISSR و SCoT توانسته‌اند تنوع و چندشکلی ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها و توده‌های رازیانه را آشکار کنند (Taheri *et al*., 2016; Farshadfar *et al*., 2017). این مطالعات، قابلیت استفاده از نشانگرهای مولکولی را برای ارزیابی و تفکیک ژنوتیپ‌های رازیانه نشان داده‌اند.

زنیان (*Carum copticum* L.) نیز از گیاهان دارویی خانواده Apiaceae است. دانه‌های زنیان به‌دلیل دارا بودن اسانس غنی از ترکیبات زیست‌فعال، از ارزش دارویی بالایی برخوردارند. ترکیبات اصلی اسانس آن شامل تیمول، کارواکرول، گاما-ترپینن و پاراسایمن است که در بروز بسیاری از فعالیت‌های زیستی این گیاه نقش دارند (Bairwa *et al*., 2012; Jalal-Dowlatshahi *et al*.,2023). مطالعات دارویی، خواص متعددی ازجمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی، ضددرد، ضدفشارخون، ضداسپاسم، ضدسرفه، ضدکرم را برای زنیان گزارش کرده‌اند که بخش قابل‌توجهی از این اثرها به ترکیبات اسانس آن نسبت داده می‌شود (Amiripour *et al*., 2018; Sadat-Noori *et al*., 2020). در سال ۱۴۰۳، سطح زیر کشت زنیان با هدف تولید دانه در ایران حدود ۸ هکتار و میزان تولید آن بیش از ۷ تن گزارش شده است. خراسان جنوبی و فارس از مهم‌ترین مناطق تولید این گیاه در کشور هستند. عملکرد دانه زنیان با توجه به ژنوتیپ، شرایط محیطی و شیوه‌های مدیریتی متفاوت بوده و از حدود ۸۰۰ تا بیش از ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است. هند مهم‌ترین صادرکننده زنیان در جهان است و کشورهای پاکستان، چین، عربستان سعودی، ایالات متحده آمریکا و امارات متحده عربی نیز در تجارت این محصول نقش دارند. زنیان در کشورهایی ازجمله هند، ایران، مصر، افغانستان و پاکستان کشت می‌شود. با وجود برخورداری ایران از ژنوتیپ‌های بومی و ارزشمند، واردات قابل‌توجه این محصول نشان‌دهنده ظرفیت توسعه کشت، فرآوری و تولید محصولات با ارزش افزوده از زنیان به‌عنوان یک فرصت اقتصادی در بخش کشاورزی است (Makizadeh and Kamalioun, 2026).

تنوع ژنتیکی زنیان با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین، نشانگرهای SSR مبتنی بر ژن برای این گونه توسعه داده شده است (Jalalifar and Shahbazi, 2024; Soltani Howyzeh *et al*., 2019). با این حال، براساس منابع بررسی‌شده، استفاده از نشانگر SCoT در مطالعه تنوع ژنتیکی زنیان کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

مطالعات سیتوژنتیکی نیز در بررسی تنوع گیاهان اهمیت دارند. کاریوتیپ، تعداد، اندازه و ویژگی‌های مورفولوژیکی کروموزوم‌ها را نشان می‌دهد. بررسی این ویژگی‌ها می‌تواند برای مقایسه جمعیت‌ها و تعیین سطح پلوئیدی مورد استفاده قرار بگیرد (Dadashian *et al*., 2017; Zabet and Afshari, 2015). مطالعات سیتوژنتیکی بر روی جمعیت‌های مختلف رازیانه نشان داده‌اند که این گونه دارای عدد کروموزومی دیپلوئید ۲n=۲۲ و عدد پایه x=۱۱ است. بررسی‌های میوزی و کاریوتیپی، تفاوت‌هایی را میان جمعیت‌های بومی از نظر ویژگی‌های کروموزومی و میزان تقارن کاریوتیپ نشان داده‌اند. کروموزوم‌ها عمدتاً از انواع متاسانتریک، ساب‌متاسانتریک و ساب‌تلوسانتریک بوده و برخی جمعیت‌ها، ازجمله لرستان، فزوه و نجف‌آباد، کاریوتیپ متقارن‌تری نسبت به سایر جمعیت‌ها داشته‌اند؛ در حالی که جمعیت اصفهان کمترین میزان تقارن را نشان داده است. این یافته‌ها بیانگر وجود تنوع سیتوژنتیکی میان جمعیت‌های بومی

رازیانه در ایران است (Safae *et al*., 2008; Sheidai *et al*., 2007).

در بررسی سیتوژنتیکی ۱۹ اکوتیپ بومی زنیان در ایران گزارش شده که تمامی اکوتیپ‌ها دارای عدد کروموزومی ۲n=۱۸ و کاریوتیپی نسبتاً متقارن بودند. همچنین، تحلیل شاخص‌های کاریوتیپی و نتایج خوشه‌بندی، وجود تنوع سیتوژنتیکی قابل‌توجه میان اکوتیپ‌های بومی زنیان را نشان داد (Jalali *et al*., 2018).

بررسی ویژگی‌های مولکولی و سیتوژنتیکی در کنار یکدیگر می‌تواند اطلاعات متفاوتی از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها فراهم کند. مطالعات مولکولی بر تنوع در سطح DNA تمرکز دارند، در حالی که مطالعات سیتوژنتیکی ویژگی‌های کروموزومی و کاریوتیپی را بررسی می‌کنند. استفاده از این دو رویکرد در کنار یکدیگر می‌تواند شناخت جامع‌تری از تفاوت‌های جمعیت‌ها فراهم کند. هدف پژوهش، تهیه شناسنامه مولکولی و سیتوژنتیکی و بررسی تمایز ژنتیکی و سیتوژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برتر دو گونه رازیانه و زنیان و تکمیل داده‌های حاصل از ارزیابی‌های مورفولوژیکی و زراعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی‌های مورفولوژیکی و زراعی

در این تحقیق از ۳ جمعیت زنیان با کدهای بانک ژن ۱۰۵۸-۳۷۲۵۱-۱۲۳۱۳ به‌ترتیب با منشأ شیراز، سربیشه و خراسان و ۲ جمعیت رازیانه کدهای بانک ژن ۹۴۵ (با منشأ اردبیل-مشگین‌شهر) و کد ۱۰۵۸۹ (با منشاء اصفهان-ایستگاه شهید فزوه) استفاده گردید (جدول‌های ۱ و ۲). این ژنوتیپ‌ها طی تحقیقات انجام شده در استان‌ها و ایستگاه تحقیقات البرز کرج از لحاظ صفات مورفولوژیکی و عملکردی به‌عنوان ژنوتیپ‌های منتخب معرفی شده‌اند (Jafari, 2019). در مقایسه بین جمعیت‌های زنیان، از لحاظ عملکرد بذر تفاوت معنی‌داری بین ۳ جمعیت مشاهده نشد ولی از لحاظ عملکرد اندام هوایی، جمعیت شیراز از لحاظ آماری نسبت به دو جمعیت دیگر برتری معنی‌داری داشت ($P<0.05$) (جدول ۱). در مقایسه بین دو جمعیت رازیانه نتایج نشان داد که بیشترین عملکرد بذر با ۳۴۷۷ کیلوگرم در هکتار و بیشترین عملکرد اندام هوایی با ۵۷۹۵ کیلوگرم در هکتار در اکسشن فزوه اصفهان مشاهده شد که از لحاظ آماری نسبت به جمعیت اردبیل برتری معنی‌دار داشت ($P<0.05$) (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین جمعیت‌های مختلف زنیان در ایستگاه البرز کرج (مستخرج از گزارش نهایی، Jafari, 2019)

Table 1. Comparison of the means of different Ajowan populations at the Alborz Research Station, Karaj (Final project report, (Jafari, 2019)

Genotype code	Origin	Plant height (cm)	Canopy diameter (cm)	Biomass yield (kg ha^{-1})	Seed yield (kg ha^{-1})
37251	Sarbisheh	55.0 c	171.4 b	4897.2 b	1412.4 a
12313	Shiraz	69.4 b	186.0 ab	6230.4 a	1491.6 a
1085	Khorasan	85.0 a	220.0 a	4580.4 b	1254.0 a

Similar letters within each column indicate no significant differences. حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۲- مقایسه میانگین دو جمعیت رازیانه در ایستگاه البرز کرج (مستخرج از گزارش نهایی، Jafari, 2019)

Table 2. Comparison of the means of two fennel populations at the Alborz Research Station, Karaj (Final project report (Jafari, 2019)

Genotype code	Origin	Plant height (cm)	Canopy diameter (cm)	Biomass yield (kg ha^{-1})	Seed yield (kg ha^{-1})
10589	Ardabil	143.3a	98.00b	5237.1 a	2348.6 b
945	Isfahan	141.2a	119.30a	5795.6 a	3477.9 a

Similar letters within each column indicate no significant differences. حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

ارزیابی مولکولی با استفاده از نشانگرهای Scot

استخراج DNA

بذر جمعیت‌های زنیان و رازیانه در گلدان‌های مجزا برای هر جمعیت در خاک گلدان کشت گردید. گلدان‌ها در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از هر جمعیت سه نمونه برگی در مرحله گیاهچه یکماهه به‌عنوان تکرار بیولوژیک برای تهیه پروفایل مولکولی و سیتوژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر استفاده شد. نمونه‌های برگی استخراج شده به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. استخراج DNA به روش (Cai et al., 1997) با تغییرات جزئی انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ تعیین شد و نسبت A260/A280 در محدوده تقریبی ۱/۷ تا ۲ قرار داشت که نشان‌دهنده خلوص قابل‌قبول DNA برای تکثیر PCR بود. سپس ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر از هر نمونه DNA برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر با اجزای مندرج در جدول ۳ انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵-۴۹ درجه سانتی‌گراد با توجه به نوع آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

پس از انجام واکنش PCR، تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ۲ ساعت انجام شد. در این مطالعه از ۶ آغازگر SCoT برای هر دو گونه استفاده شد. پنج آغازگر شامل SCoT21، SCoT60، SCoT11، SCoT3 و SCoT13 در هر دو گونه مشترک بودند و آغازگر SCoT40 برای رازیانه و آغازگر SCoT20 برای گونه زنیان استفاده شد. توالی این آغازگرها در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای نشانگر SCoT

Table 3. Components of PCR reaction for SCoT marker

Component	Volume (for 15 µL)
Master Mix	7.5 µL
DNA (20 ng/µL)	1 µL
SCoT primer (10 µM)	1.5 µL
Sterile distilled water	5 µL

جدول ۴- نام و توالی آغازگرهای SCoT

Table 4. Name and sequence of SCoT primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SCoT 3	CAACAATGGCTACCACCG
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA
SCoT 13	ACGACATGGCGACCATC
SCoT 20	ACCATGGCTACCACCGC
SCoT 21	CACCATGGCTACCACCAT
SCoT 40	CAATGGCTACCACTACAG
SCoT 60	ACAATGGCTACCACCACA

شاخص‌های کارایی نشانگر و تنوع ژنتیکی

به دلیل غالب بودن نشانگر SCoT، امتیازدهی قطعات تکثیری بر مبنای کد صفر (عدم وجود باند) و کد یک (وجود باند) انجام شد. هریک از باندها در بین نمونه‌ها به عنوان یک آلل در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی کارایی نشانگرهای SCoT، شاخص‌های مرتبط محاسبه شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 1-(p\ 2 + q\ 2)$ که در آن p فراوانی حضور آلل و q عدم حضور آلل است، محاسبه گردید (Serrote *et al.*, 2019).

نسبت مؤثر چندگانگی (EMR) با فرمول $EMR = NPB \times \beta$ محاسبه شد. NPB تعداد باندهای چندشکل و β نمایانگر درصد چندشکلی است (Kumar *et al.* 2009).

قدرت تمایز (RP=Resolving Power) با استفاده از فرمول $RP = \sum IB$ محاسبه شد که $IB = 1 - [2 \times (Pi - 0.5)]$ برابر با تعداد باندهاست (Pi) (Altintas *et al.*, 2008).

شاخص نشانگری (MI=Marker Index) برای هر نشانگر، به‌عنوان شاخصی کلی از کارایی نشانگر استفاده شد

و از فرمول $MI = PIC \times N \times \beta$ محاسبه شد. PIC محتوای چندشکلی، N تعداد کل باندها و β نشان‌دهنده نسبت چندشکلی برای هر نشانگر است (Powell *et al*., 1996).

محاسبات با استفاده از Microsoft Excel انجام شد. شاخص‌های ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و هتروزیگوسیتی تصحیح‌شده (uHe) برای نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex محاسبه گردید (Peakall and Smouse 2006). تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز با نرم‌افزار GenAlex انجام گردید. برای بررسی میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های رازیانه و زنیان، شاخص هویت ژنتیکی نی (Nei's Genetic Identity) براساس الگوهای باندی حاصل از نشانگرهای SCoT محاسبه شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx انجام گردید.

روش تحقیق مطالعه سیتوژنتیکی

به‌منظور بررسی ویژگی‌های سیتوژنتیکی جمعیت‌های زنیان و رازیانه، ریشه‌های جوان گیاهچه‌ها برای بررسی تقسیمات میتوزی مورد استفاده قرار گرفتند. بذرها در پتری‌دیش کشت و پس از اعمال شوک رطوبتی در دمای پایین، برای جوانه‌زنی به ژرمیناتور منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی، ریشه‌چه‌های جوان با طول مناسب برای انجام مطالعات سیتوژنتیکی انتخاب شدند. ریشه‌ها ابتدا تحت پیش‌تیمار قرار گرفته و پس از شست‌وشو با آب مقطر، با محلول تثبیت‌کننده مناسب تثبیت گردیدند. پس از تثبیت، نمونه‌ها شست‌وشو داده شده و برای انجام مراحل بعدی آماده شدند. در ادامه، ریشه‌های تثبیت‌شده هیدرولیز و پس از شست‌وشو با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. سپس با تهیه اسلاید و بررسی میکروسکوپی، مناسب‌ترین صفحات متافازی از نظر وضوح و پراکنش کروموزوم‌ها انتخاب گردیدند. براساس صفحات متافازی منتخب، کاریوتایپ جمعیت‌ها تهیه و ویژگی‌های کروموزومی آن‌ها بررسی شد. اندازه‌گیری پارامترهای طولی کروموزوم‌ها، شامل طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S) و طول کل کروموزوم (CL) با استفاده از نرم‌افزار ایدیوکار اندازه‌گیری شد (Mirzaghaderi and Marzangi, 2015).

براساس اندازه‌های به‌دست‌آمده، فاکتورهای کروموزومی و کاریوتیپی شامل نسبت بازویی $AR = L/S$، $r - value = S/L$ نسبت بازوی کوتاه به کل، درصد شکل کروموزوم $F\% = S/\sum CL \times 100$، شاخص سانترومری $CI = S/CL$ و اختلاف دامنه طول نسبی $DRL\% = MaxRL\% - MinRL\%$ بود (Huziwara 1962).

درصد شکل کلی $TF\% = \sum S / \sum CL \times 100$، شاخص تقارن $S\% = (Lmin / Lmax) \times 100$، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی $A1 = 1 - \sum(S/L)/n$ و شاخص عدم تقارن بین کروموزومی $A2 = SD/X$ محاسبه شد (Zarco, 1986).

فرمول‌های کاریوتیپی (KF) براساس موقعیت سانترومر و طبقه‌بندی کروموزوم‌ها مطابق با سیستم ارائه‌شده توسط Levan *et al*. (1964) تعیین شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات کروموزومی و کاریوتیپی در سه تکرار مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها براساس این صفات انجام شد.

نتایج

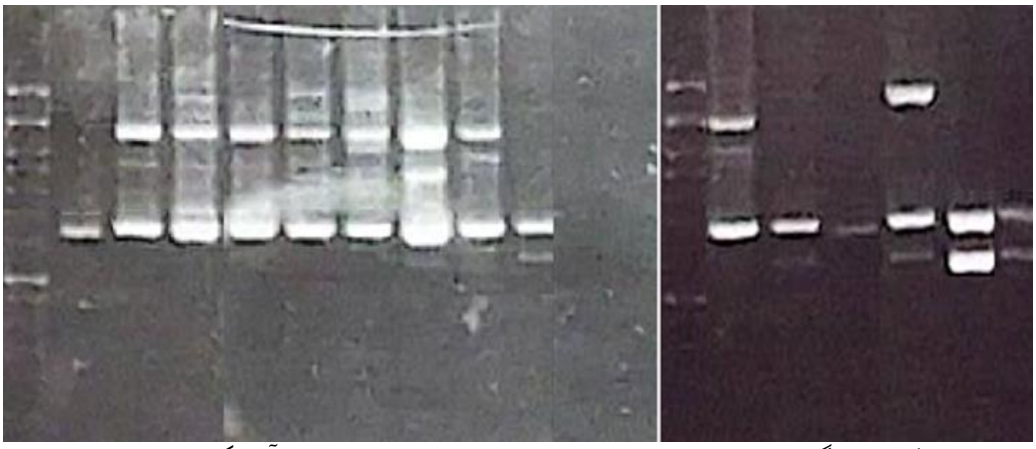
در این مطالعه از ۶ آغازگر SCoT برای هر دو گونه استفاده شد. تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از دستگاه الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده شد. نمونه‌ای از عکس باندهای تکثیر شده در شکل ۱ آورده شده است.

چندشکلی نشانگرها و شاخص تنوع ژنتیکی

الف) زنیان

در زنیان برای شش آغازگر SCoT20، SCoT60، SCoT11، SCoT3، SCoT13 و SCoT21 در مجموع ۵۰ باند (آلل) مشاهده شد که از این تعداد ۴۵ باند به عنوان چندشکل تشخیص داده شدند (جدول ۵). تعداد باندهای

تولیدی توسط هر آغازگر از ۴ تا ۱۶ متغیر بود. آغازگرهای SCoT3 و SCoT11 هریک با ۴ باند کمترین مقدار و آغازگر SCoT20 با ۱۶ باند بیشترین تعداد باند را تولید کردند. در میان آغازگرهای بررسی‌شده، SCoT20 با بیشترین مقدار MI (۶/۴۱۶) و نیز بیشترین مقدار RP (۹/۵۵۶) به عنوان کارآمدترین آغازگر برای تفکیک تنوع ژنتیکی نمونه‌ها شناخته شد. این آغازگر دارای PIC=۰/۴۰۱ و EMR =۱۶ است.



شکل ۱- الگوی نواربندی ژنوتیپ‌های برتر رازیانه و زنیان با استفاده آغازگر SCOT60
شکل سمت راست: نمونه‌های رازیانه از چپ به راست بعد از لدر به ترتیب سه تکرار از کد ۱۰۵۸۹ (اردبیل) و ۹۴۵ (اصفهان).
شکل سمت چپ: نمونه‌های زنیان از چپ به راست بعد از لدر به ترتیب سه تکرار از کدهای (۱۲۳۱۳) شیراز، (۳۷۲۵۱) سربیشه و (۱۰۸۵) خراسان و دو نمونه کنترل منفی. لدر (bp ۱۵۰۰-۵۰).

Figure 1. Banding pattern of superior fennel and aojwan genotypes using the SCOT60 primer. Right figure: Fennel samples from left to right after leader, three replicates respectively, from 10589 (Ardabil) and 945 (Isfahan) populations. Left figure: Ajwain samples from left to right after the leader, three replicates respectively, from (37251) Sarbisheh, (12313) Shiraz, and (1085) Khorasan populations and two negative control samples; Ladder (50-1500bp).

شاخص‌های تنوع ژنتیکی در سه جمعیت زنیان بررسی گردید (جدول ۶). تعداد آلل‌های متفاوت (Na) در جمعیت شیراز با ۱/۳۸۰ آلل بیشترین و در جمعیت سربیشه با ۰/۹۸۰ آلل کمترین بود. آلل‌های مؤثر (Ne) در جمعیت شیراز با ۱/۴۳۳ بیشترین و در جمعیت سربیشه با ۱/۲۱۳ کمترین بود. بیشترین میزان تنوع در جمعیت شیراز براساس شاخص شانون (I =۰/۳۶۱) و شاخص نی (He=۰/۲۴۶) و کمترین آن در جمعیت سربیشه (He =۰/۱۳۵ و I =۰/۲۰۷) بود. درصد آلل‌های چندشکل در جمعیت‌های سربیشه، شیراز و خراسان به ترتیب برابر با ۵۰، ۶۲ و ۵۲ درصد بود.

نتایج ماتریس تشابه ژنتیکی نی در جمعیت‌های زنیان نشان داد که بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های سربیشه و شیراز با مقدار ۰/۸۷۶ مشاهده شد. پس از آن، جمعیت‌های شیراز و خراسان با مقدار ۰/۸۳۹ و جمعیت‌های سربیشه و خراسان با مقدار ۰/۷۵۷ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. بنابراین، کمترین میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های سربیشه و خراسان مشاهده شد (جدول ۷).

در زنیان نیز سهم تنوع درون جمعیت‌ها (۸۰ درصد) از تنوع بین جمعیت‌ها (۲۰ درصد) بیشتر بود. بالا بودن میزان واریانس درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع و تفاوت ژنتیکی افراد درون آن جمعیت می‌باشد.

ب) رازیانه

در رازیانه برای شش نشانگر SCoT3، SCoT11، SCoT13، SCoT21، SCoT40 و SCoT60 در مجموع ۶۰ باند (آلل) مشاهده شد که از این تعداد ۵۶ باند به عنوان

باندهای چندشکل شناسایی گردید که نشان‌دهنده توان بالای نشانگرهای SCoT در آشکارسازی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است (جدول ۵). تعداد باندهای تولیدشده توسط هر آغازگر متفاوت بود و از ۵ باند در آغازگر SCoT60 تا ۱۵ باند در آغازگر SCoT11 متغیر بود. بیشترین مقدار PIC مربوط به نشانگر SCoT11 (۰/۴۲) و پس از آن SCoT40 (۰/۴۱) بود، در حالی که کمترین مقدار PIC در نشانگر SCoT13 (۰/۳۰) مشاهده شد. بیشترین مقدار EMR در نشانگر SCoT11 (۱۵) مشاهده شد. شاخص قدرت تفکیک (RP) بیشترین مقدار را در نشانگر SCoT11 (۱۰) نشان داد. در نهایت، شاخص اطلاعات نشانگری (MI) که ترکیبی از شاخص‌های PIC وEMR بوده و بیانگر توان کلی هر نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی است، در نشانگر SCoT11 با مقدار ۶/۳۳ بیشترین مقدار را داشت. این نتایج نشان می‌دهد که SCoT11 با دارا بودن بیشترین مقادیر PIC، EMR وRP قوی‌ترین و کارآمدترین نشانگر در این مطالعه محسوب می‌شود.

با استفاده از نرم‌افزار GenAlex، شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جمعیت رازیانه بررسی گردید (جدول ۶). تعداد آلل‌های متفاوت (Na) در جمعیت اصفهان با ۱/۳۶۸۸ آلل نسبت به جمعیت اردبیل با ۰/۸۳۳ آلل بیشتر بود. آلل‌های مؤثر (Ne) در جمعیت اصفهان با ۱/۲۷۸ آلل نسبت به جمعیت اردبیل با ۱/۰۹۲ آلل بیشتر بود. میزان تنوع در جمعیت اصفهان براساس شاخص شانون (I=۰/۲۰۲) و شاخص نی (He =۰/۱۶۸) بیشتر از جمعیت اردبیل (He=۰/۰۶۱ و I= ۰/۰۹۴) بود. درصد چندشکلی در جمعیت اصفهان ۴۶/۶۷ درصد و در جمعیت اردبیل ۱۸/۳۳ درصد بود. ماتریس تشابه ژنتیکی نی نشان داد که میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت اردبیل و جمعیت اصفهان در رازیانه ۰/۷۸۳ بود که بیانگر تشابه ژنتیکی قابل‌توجه بین این دو جمعیت است (جدول ۷). همچنین نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی در رازیانه نشان داد که سهم تنوع درون جمعیت‌ها (۷۰ درصد) از تنوع بین جمعیت‌ها (۳۰ درصد)، بیشتر است (داده ها نشان داده نشده‌اند).

جدول ۵- ویژگی‌ها و درصد چندشکلی آغازگرهای SCoT در رازیانه و زنیان

Table 5. Characteristics and polymorphism percentage of SCoT primers in fennel and Ajowan

Species Name	Primer name	AT(°C)	PIC Value	Total band	PPB%	EMR	PB	RP	MI
Fennel	SCoT3	55	0.397	8	87.5	6.125	7	4.0	2.48
	SCoT11	55	0.422	15	100	15	15	10.0	6.33
	SCoT13	53	0.306	8	75	4.5	6	2.33	1.37
	SCoT21	53	0.350	10	100	10	10	5.0	3.50
	SCoT40	54	0.417	14	100	14	14	9.0	5.84
	SCoT60	55	0.333	5	80	3.2	4	2.0	1.07
	Primer name	AT(°C)	PIC Value	Total band	PPB%	EMR	PB	RP	MI
Ajowan	SCoT3	55	0.391	4	100	4	4	2.50	1.56
	SCoT11	55	0.305	4	75	2.25	3	2.25	0.69
	SCoT13	53	0.386	11	100	11	11	6.00	4.25
	SCoT21	53	0.189	6	50	1.5	3	1/77	0.28
	SCoT20	57	0.401	16	100	16	16	9.55	6.42
	SCoT60	55	0.382	9	89	7.12	8	5.50	2.72

PIC: Polymorphism Information Content — محتوای اطلاعات چندشکلی
PPB%: Percentage of Polymorphic Bands — درصد چندشکلی
EMR: Effective Multiplex Ratio — نسبت مؤثر چندگانگی
MI: Marker Index — شاخص نشانگری
PB: Polymorphic Bands — تعداد باندهای چندشکلی
RP: Resolving Power — قدرت تمایز

جدول ۶- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های زنیان و رازیانه

Table 6. Genetic diversity indices in fennel and Ajowan populations

SpeciesName	Papulation	Gene nbank code	Na	Ne	I	He	uHe
fennel	Ardabil	10589	0/833	1.092	0.094	0.061	0.076
	Isfahan	945	1.333	1.278	0.253	0.168	0.202
	Papulation	Gene nbank code	Na	Ne	I	He	uHe
Ajowan	Sarbisheh	37251	0.980	1.213	0.207	0.135	0.162
	Shiraz	12313	1.380	1.433	0.361	0.246	0.295
	Khorasan	1085	1.280	1.359	0.301	0.205	0.246

Na: Observed number of alleles تعداد آلل متفاوت مشاهده شده
Ne: Effective number of alleles تعداد مؤثر آلل‌ها
He: Expected heterozygosity هتروزیگوسیتی مورد انتظار
I: Shannon's information index شاخص شانون
uHe: Unbiased expected heterozygosity هتروزیگوتی مورد انتظار تصحیح شده

جدول ۷- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها در رازیانه و زنیان با استفاده از آغازگرهای **SCoT**

Table 7. Similarity matrix among genotypes of fennel and ajowan using SCoT primers

Species Name	Papulation	10589 (Ardabil)	945 (Isfahan)	
fennel	10589 (Ardabil)	1.00		
	945 (Isfahan)	0.783	1.00	
Species Name	Papulation	37251 (Sarbisheh)	12313 (Shiraz)	1085 (Khorasan)
Ajowan	37251 (Sarbisheh)	1.00		
	12313 (Shiraz)	0.876	1.00	
	1085 (Khorasan	0.757	0.839	1.00

نتایج سیتوژنتیکی

الف) زنیان

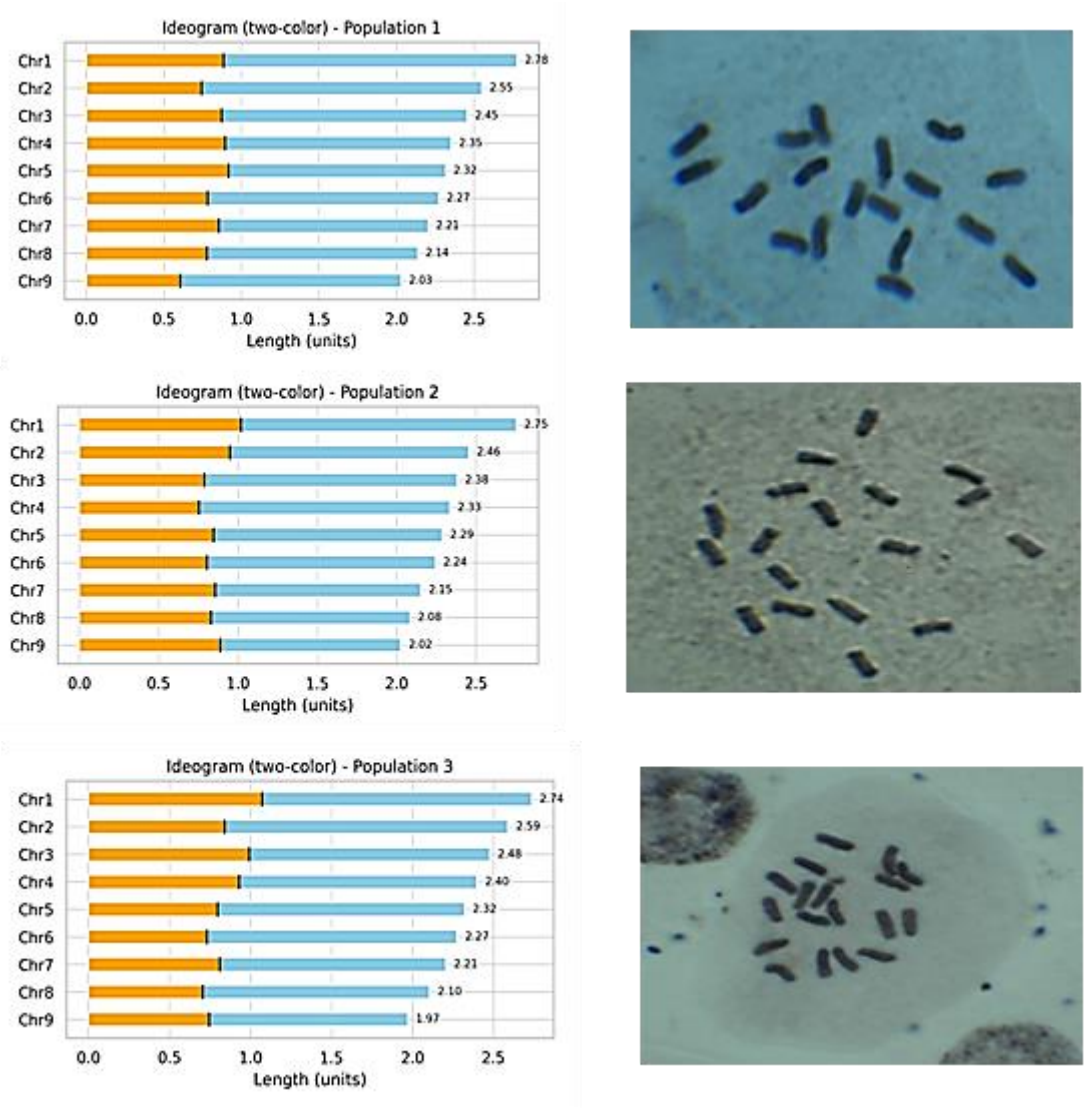
در بررسی سیتوژنتیکی، هر سه جمعیت زنیان دارای عدد کروموزومی ۲n=۱۸ بودند (شکل ۲). تجزیه واریانس (α=۰/۰۵) برای تمامی صفات کاریوتیپی و کروموزومی مورد مطالعه ازجمله طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، طول کل کروموزوم (CL)، نسبت بازویی (AR)، شاخص سانترومری (CI)، نسبت بازوی کوتاه به کل (r-Value)، درصد شکل کلی (TF٪)، شاخص تقارن (S٪)، اختلاف دامنه طول نسبی (DRL٪) و شاخص‌های عدم‌تقارن درون‌کروموزومی (A1) و بین‌کروموزومی (A2) اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۸). میانگین صفات اندازه‌گیری‌شده نشان داد که مقادیر در سه جمعیت در یک دامنه نزدیک قرار دارند. برای نمونه، TF% با ۳۴/۷۷ ، ۳۷/۴۶ و ۳۶/۱۰ درصد و A1 با ۰/۴۴۳، ۰/۳۸۴ و ۰/۴۲۲ به‌ترتیب در جمعیت سربیشه، شیراز و خراسان گزارش شد؛ مقادیر A2 نیز پایین و در محدوده ۰/۰۸۵ و ۰/۱۰۲ قرار گرفت. با وجود ثبات آماری، فرمول کاریوتیپی هر جمعیت اندکی تفاوت نشان داد. غلبه کروموزوم‌های متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک و حضور محدود کروموزوم‌های ساب‌تلوسنتریک مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۸- تجزیه واریانس و میانگین صفات کاریوتیپی و کروموزومی در جمعیت‌های مورد بررسی گیاه زنیان

Table 8- Analysis of variance and means of karyotypic and chromosomal traits in the studied populations of ajowan

Full name of Chromosome traits	Abbrev.	MS		Fvalue	Meam		
		Treat (df=2)	Error (df=6)		37251 (Sarbisheh)	12313 (Shiraz)	1085 (Khorasan)
Long arm length	L	0.006	0.003	1.95	1.52	1.44	1.49
Short arm length	S	0.002	0.006	0.24	0.815	0.859	0.846
Chromosome length	CL	0.003	0.008	0.33	2.34	2.29	2.34
Arm ratio	AR	0.065	0.051	1.26	2.144	1.855	1.950
Ratio of the longest to shortest chromosomes	r-Value	0.002	0.003	0.63	0.569	0.621	0.600
Form percentage of chromosome	F%	0.011	0.016	0.73	1.931	2.053	2.005
Centromeric index	CI	0.000	0.000	0.82	0.348	0.371	0.360
Total form percentage	TF%	5.436	5.759	0.94	34.769	37.461	36.098
Symmetry index	S%	14.15	10.66	1.32	73.139	76.460	72.190
Difference in relative chromosome length	DRL%	0.296	0.259	1.14	3.535	3.036	3.616
Intrachromosomal asymmetry indices	A1	0.003	0.003	0.90	0.443	0.384	0.422
Interchromosomal asymmetry indices	A2	0.000	0.000	0.92	0.097	0.085	0.102
Karyotype formula	KF				n=4m+5sm	n=3m+6sm	n=3m+6sm

L	طول بازوی بلند	CI	شاخص سانترومری	KF	فرمول کاریوتایپ
S	طول بازوی کوتاه	TF(%)	درصد شکل کلی	m	کروموزوم متاسانتریک
CL	طول کروموزوم	S (%)	شاخص تقارن	sm	کروموزوم ساب متاسانتریک
AR	نسبت بازویی	DRL(%)	اختلاف دامنه طول نسبی	st	کروموزوم ساب تلوسانتریک
r-Value	نسبت بازوی کوتاه به بلند	A1	شاخص عدم تقارن درون کروموزومی		
F(%)	درصد شکل کروموزوم	A2	شاخص عدم تقارن بین کروموزومی		



شکل ۲- کاریوتیپ و آیدیوگرام جمعیت‌های زنیان (از بالا به پایین به‌ترتیب: کد **۳۷۲۵۱** (سربیشه)، کد **۱۲۳۱۳** (شیراز) و کد **۱۰۸۵** (خراسان))

Figure 2. Karyotypes and ideograms of Ajowan populations; from top to bottom: accession 37251 (Sarbisheh), accession 12313 (Shiraz), and accession 1085 (Khorasan)

ب) رازیانه

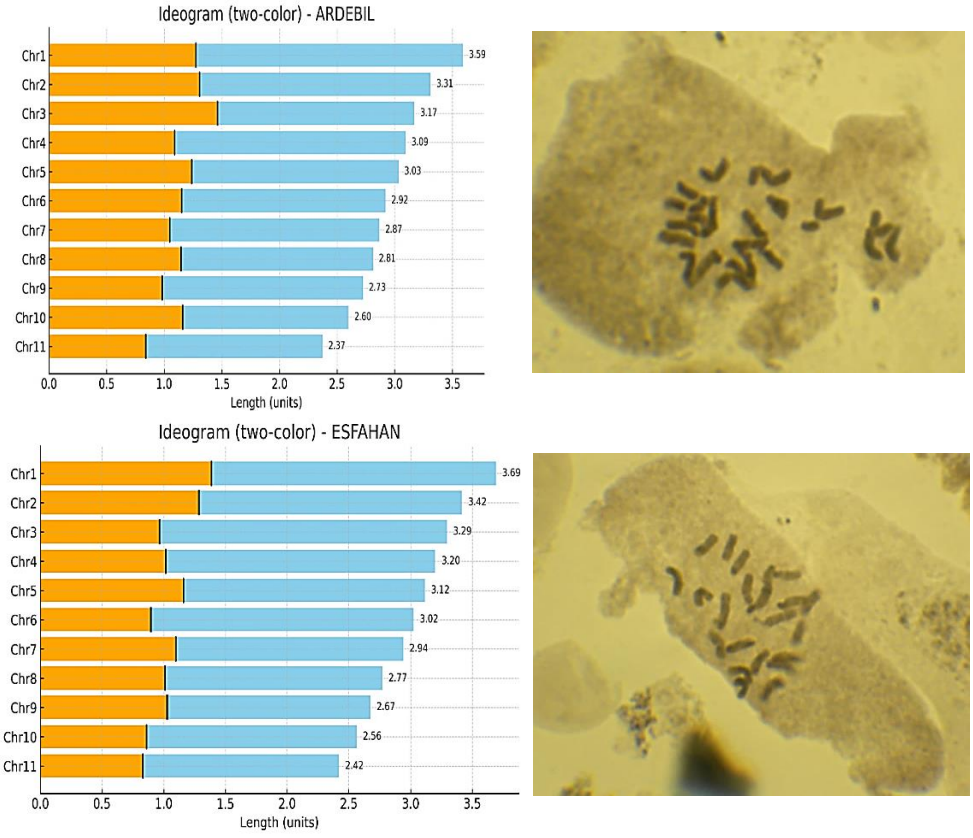
دو جمعیت رازیانه دارای عدد کروموزومی ۲n=۲۲ بودند (شکل ۳). مقایسه دو جمعیت با آزمون t مستقل (α=۰/۰۵) در هیچیک از شاخص‌ها ازجمله L، S، CL، AR، CI، r-Value، TF%، S%، DRL%، A1 و A2 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۹). برای نمونه، TF% (۳۹/۱۲۹ و ۳۵/۰۲۵)، CI (۰/۳۹۱ و ۰/۳۵) و A1 (۰/۳۳۷ و ۰/۴۴۰) به ترتیب در جمعیت‌های اردبیل و اصفهان گزارش شد. A1 و A2 بین دو جمعیت اختلاف معنی‌داری نداشتند و مقادیر TF% و S% ضمن هم‌پوشانی دامنه، تفاوت آماری معناداری را نشان ندادند؛ در نتیجه، هر دو جمعیت دارای کاریوتایپی هم‌سطح از منظر تقارن کلی تشخیص داده شدند (شکل ۳).

جدول ۹- مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی و کروموزومی در دو جمعیت گیاه رازیانه به روش **t-test** مستقل

Table 10. Comparison of mean karyotypic and chromosomal traits between two fennel populations using an independent-samples t-test

Karyotypic and chromosomal traits	10589 (Ardabil) (Mean ± SD)	945 (Isfahan) (Mean ± SD)	T value (df)	(P value)
L	1.800 ± 0.179	1.960 ± 0.262	−0.874 (4)	0.432
S	1.153 ± 0.109	1.049 ± 0.043	1.548 (4)	0.197
CL	2.954 ± 0.096	3.009 ± 0.251	−0.357 (4)	0.739
AR	1.771 ± 0.438	2.100 ± 0.362	−1.001 (4)	0.373
r-Value	0.677 ± 0.111	0.570 ± 0.091	1.279 (4)	0.270
F%	1.778 ± 0.208	1.592 ± 0.156	1.240 (4)	0.283
CI	0.391 ± 0.044	0.350 ± 0.036	1.211 (4)	0.293
TF%	39.129 ± 4.586	35.025 ± 3.439	1.240 (4)	0.283
S%	66.056 ± 1.011	65.481 ± 6.375	0.154 (4)	0.885
DRL%	3.758 ± 0.233	31.893 ± 0.974	−0.234 (4)	0.827
A1	0.337 ± 0.118	0.440 ± 0.090	−1.195 (4)	0.298
A2	0.116 ± 0.003	0.131 ± 0.031	−0.742 (4)	0.499
KF	n =7m +3sm +1st	n =5m +5sm +1st		

The full name of karyotypic and chromosomal traits is given in Table 8. # نام کامل صفات کاریوتیپی و کروموزومی در جدول ۸ آمده است.



شکل ۳- کاریوتیپ و آیدیوگرام جمعیت‌های رازیانه (از بالا به پایین به‌ترتیب: کد ۱۰۵۸۹ (اردبیل) و کد ۹۴۵ (اصفهان))

Figure 3. Karyotypes and idiograms of fennel populations (from top to bottom: accession 10589 (Ardabil) and accession 945 (Isfahan).

بحث

زنیان

نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای SCoT در زنیان توانایی مناسبی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارند و ۹۰ درصد باندها چندشکل بودند که بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی است. تفاوت در کارایی آغازگرها نشان داد که قدرت تفکیک آغازگرهای SCoT یکسان نیست. در میان آغازگرهای مورد استفاده، SCoT20 بیشترین تعداد آلل و بالاترین مقادیر PIC، EMR، RP و MI را به خود اختصاص داد، بنابراین می‌توانند برای شناسایی اولیه ژنوتیپ‌های متمایز مورد توجه قرار بگیرند. مقادیر بالاتر شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان‌دهنده توان بیشتر نشانگر در آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی، ایجاد باندهای اطلاعات‌دهنده و قدرت بالای تمایز بین ژنوتیپ‌هاست (Vaishnav *et al*., 2023). بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان داد که کد ۱۲۳۱۳ (شیراز) دارای بیشترین مقادیر Na، Ne، He و شاخص شانون (I) است و از بیشترین تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های مورد بررسی برخوردار می‌باشد. وجود مقادیر بالاتر این شاخص‌ها نشان‌دهنده غنای ژنتیکی بیشتر و ظرفیت بالاتر این جمعیت برای سازگاری و اصلاح ژنتیکی است. در مطالعه در مزرعه (Jafari, 2019) با مقایسه بین جمعیت‌های زنیان، از لحاظ عملکرد بذر تفاوت معنی‌داری بین ۳ جمعیت مشاهده نشد ولی از لحاظ عملکرد اندام هوایی، جمعیت شیراز از لحاظ آماری نسبت به دو جمعیت دیگر برتری معنی‌داری داشت (جدول ۱)، به‌نحوی‌که با این نتایج ارزیابی مولکولی همخوانی دارد.

در مطالعه‌ای بر گونه‌های *Zanthoxylum* مشخص شد که جمعیت Pop1 دارای بالاترین مقادیر Na، Ne، He و I بود که این موضوع نشان‌دهنده بالاترین سطح تنوع ژنتیکی در این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌هاست (Zhang *et al*., 2024). نتایج AMOVA نشان داد که ۸۰ درصد از تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و تنها ۲۰ درصد بین جمعیت‌ها قرار دارد. این نتایج بیانگر آن است که بخش عمده تغییرات ژنتیکی زنیان در سطح افراد هر جمعیت حفظ شده است. البته الگوی مشابهی در مطالعه Heidari و همکاران (۲۰۱۶) بر روی جمعیت‌های زنیان ایران نیز گزارش شده است؛ به‌طوری‌که سهم عمده تنوع ژنتیکی به درون جمعیت‌ها اختصاص داشت. چنین ساختاری معمولاً نشان‌دهنده وجود تنوع قابل توجه در سطح افراد و ظرفیت مناسب برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی است. نتایج سیتوژنتیکی در کنار داده‌های مولکولی، اطلاعات مکملی درباره وضعیت ژنتیکی جمعیت‌ها فراهم کرد. هر سه جمعیت زنیان دارای ۲n=۱۸ کروموزوم بودند و اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های اصلی کاریوتیپی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد. بررسی کاریوتیپی بر روی ۱۹ اکوتیپ بومی زنیان ایران انجام شد و نتایج نشان داد تمامی اکوتیپ‌ها دارای عدد کروموزومی ۲n=۱۸ و کاریوتیپی نسبتاً متقارن با فرمول 7sm + 2m هستند. تحلیل شاخص‌های کاریوتیپی و خوشه‌بندی اکوتیپ‌ها وجود تنوع سیتوژنتیکی معنی‌دار میان جمعیت‌های بومی زنیان را نشان داد (Jalali *et al*., 2014).

رازیانه:

تنوع ژنتیکی یکی از عوامل کلیدی در موفقیت برنامه‌های به‌نژادی گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آن‌ها به‌شمار می‌رود. اصلاح‌گران از این تنوع به‌منظور توسعه ارقام جدید، انتقال ژن‌های مطلوب و ایجاد پایه‌های ژنتیکی قوی بهره می‌گیرند و در واقع، تنوع ژنتیکی اساس برنامه‌های اصلاح نباتات را تشکیل می‌دهد (Mohammadi, 2006). در این پژوهش، نشانگرهای SCoT کارایی بالایی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های رازیانه نشان دادند. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها در رازیانه ۹۳/۳۳ درصد بود که با نتایج گزارش‌شده توسط Nikkerdar و همکاران (۲۰۱۸) که ۹۶ درصد چندشکلی را گزارش کردند، مطابقت داشت. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگرهای SCoT به دلیل تکرارپذیری مناسب و ارتباط با نواحی عملکردی ژنوم، ابزار مؤثری برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در رازیانه محسوب می‌شوند. در میان آغازگرهای مورد بررسی، SCoT11 بیشترین قدرت تفکیک را در بین ژنوتیپ‌های رازیانه داشت. استفاده از این آغازگر

در کنار سایر نشانگرهای مولکولی می‌تواند دقت مطالعات تنوع ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی را افزایش دهد.

نتایج شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان داد که کد ۹۴۵ (اصفهان) در تمامی شاخص‌ها شامل تعداد آلل مشاهده‌شده (Na =۱/۳۳۳)، تعداد آلل مؤثر (Ne =۱/۲۷۸)، شاخص شانون (I =۰/۲۵۳) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He =۰/۱۶۸) مقادیر بالاتری نسبت به کد ۱۰۵۸۹ (اردبیل) دارد. این موضوع بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بیشتر در کد ۹۴۵ (اصفهان) است. درصد بالاتر باندهای چندشکل در جمعیت اصفهان نشان می‌دهد که این جمعیت از ذخیره ژنتیکی غنی‌تری برخوردار بوده و می‌تواند به‌عنوان منبع مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظتی رازیانه مورد استفاده قرار بگیرد. در مطالعه در مزرعه رازیانه (Jafari, 2019) نتایج نشان داد که بیشترین عملکرد بذر با ۳۴۷۷ کیلوگرم در هکتار و بیشترین عملکرد اندام هوایی با ۵۷۹۵ کیلوگرم در هکتار در اکسشن فزوه اصفهان مشاهده شد که از لحاظ آماری نسبت به جمعیت اردبیل برتری معنی‌دار داشت(جدول ۲) که با نتایج ارزیابی مولکولی همخوانی دارد.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۷۰ درصد از تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و تنها ۳۰ درصد بین جمعیت‌ها قرار دارد. این الگو با نتایج مطالعه Nikkerdar و همکاران (۲۰۱۸) بر روی ۱۶ توده بومی رازیانه ایران همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که در آن پژوهش نیز ۷۶ درصد از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و ۲۴ درصد بین جمعیت‌ها گزارش شد. همچنین Shabanian و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی جمعیت‌های بلوط ایرانی با استفاده از نشانگرهای SCoT گزارش کردند که بخش عمده تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها متمرکز است. چنین الگویی نشان می‌دهد که تغییرات ژنتیکی عمدتاً در سطح افراد هر جمعیت حفظ شده و اهمیت حفاظت از تنوع درون‌جمعیتی را برجسته می‌کند. نتایج سیتوژنتیکی در کنار داده‌های مولکولی، اطلاعات مکملی درباره وضعیت ژنتیکی جمعیت‌ها فراهم کرد. هر دو جمعیت رازیانه دارای ۲n=۲۲ کروموزوم بود و اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های اصلی کاریوتیپی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد. بررسی سیتوژنتیکی رازیانه، عدد کروموزومی سوماتیک این گیاه را ۲n=۲۲ گزارش کرد (Safae *et al.*, 2008; Sheidai *et al.*, 2007) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در مجموع، نتایج این مطالعه بیانگر آن است که جمعیت‌های رازیانه کد ۱۰۵۸۹ (اردبیل) و کد ۹۴۵ (اصفهان) از نظر ویژگی‌های کاریوتیپی دارای ساختاری هم‌سطح و متقارن هستند و تفاوت‌های جغرافیایی تأثیر محسوسی بر سازمان کروموزومی این گونه نداشته است.

نتیجه‌گیری

نکته مهم این است در حالی که نشانگرهای SCoT تفاوت‌های ژنتیکی را در سطح DNA آشکار کردند، صفات کاریوتیپی ثبات نسبی ساختار کروموزومی جمعیت‌ها را نشان دادند. بنابراین، تفاوت‌های مولکولی مشاهده‌شده الزاماً با تغییر در تعداد کروموزوم‌ها یا شاخص‌های کلی کاریوتیپی همراه نبود. این یافته اهمیت استفاده همزمان از دو رویکرد را نشان می‌دهد؛ زیرا داده‌های مولکولی امکان شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی ظریف‌تر را فراهم می‌کنند و داده‌های سیتوژنتیکی اطلاعات مکملی درباره تعداد و سازمان کروموزوم‌ها ارائه می‌دهند. در مجموع، نتایج مولکولی و سیتوژنتیکی تصویری مکمل از تنوع ژنتیکی دو گونه ارائه کردند.

نتایج مولکولی و سیتوژنتیکی نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر مولکولی دارای قابلیت تفکیک بوده، در حالی که ویژگی‌های کاریوتیپی آن‌ها ثبات نسبی را نشان داد. تلفیق نشانگرهای SCoT با ویژگی‌های سیتوژنتیکی می‌تواند مبنای مناسبی برای تهیه شناسنامه ژنتیکی و سیتوژنتیکی، شناسایی و تمایز ژنوتیپ‌ها و مدیریت و حفاظت از ژرم‌پلاسم این گیاهان دارویی باشد. همچنین، SCoT11 در رازیانه و SCoT20 در زنیان می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای کارآمد در غربالگری اولیه و شناسایی ژنوتیپ‌های متمایز مورد استفاده قرار بگیرند.

در مطالعه نشانگرهای مولکولی، درصد آلل‌های چندشکل

در جمعیت شیراز نسبت به دو جمعیت سربیشه و خراسان بیشتر بود و در نتایج تحقیق مزرعه‌ای نیز جمعیت شیراز ۳۰ درصد افزایش عملکرد بیوماس هوایی نسبت به دو جمعیت دیگر داشت. به همین ترتیب، درصد چندشکلی در جمعیت اصفهان حدود دو برابر جمعیت اردبیل بود و نتایج تحقیق مزرعه ای نیز برتری ۴۸ درصدی عملکرد بذر جمعیت اصفهان نسبت به جمعیت اردبیل را نشان داد که نشان‌دهنده همخوانی نتایج تنوع مولکولی با تنوع صفات زراعی بود. از آنجایی که لازمه اجرای برنامه‌های اصلاحی، وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های گیاه است، بنابراین در این تحقیق تنوع مشاهده شده در جمعیت‌های زنیان شیراز و رازیانه اصفهان می‌تواند کمک شایانی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی بعدی داشته باشد. انتخاب این جمعیت‌ها می‌تواند در کارهای اصلاحی آینده در مسیر معرفی رقم کارگشا باشد.

References

Altıntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Zkan, H. O. 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. Plant Breeding, 127: 9-14. 10.1111/j.1439-0523.2007.01424.x

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).

Bairwa, R., Sodha, R. S., Rajawat, B. S. 2012. *Trachyspermum ammi*. Pharmacognosy Reviews, 6(11), 56. DOI:10.4103/0973-7847.95871

Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein-Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, U. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275(5301), pp.832-834. DOI: 10.1126/science.275.5301.832

Dadashian, A., NoSrati, H., Zarban, A. 2017. Karyotype study of three populations of *Silybum marianum* as a medicinal plant. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal, 7: 62–68. (In Persian).

Farshadfar, M., Moradzade, N., Farshadfar, E. and Shirvani, H. 2017. Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research.25 (2).212-231. 10.22092/ijrfpbgr.2017.113312

Heidari, E. F., Rahimmalek, M., Mohammadi, S., Ehtemam, M. H. 2016. Genetic structure and diversity of ajowan (Trachyspermum ammi) populations based on molecular and morphological markers and volatile oil content. Industrial Crops and Products, 92, 186-196. 10.1016/j.indcrop.2016.08.014

Huziwara, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of Aster. American Journal of Botany 49(2): 116-119. 10.1002/j.1537-2197.1962.tb14916.x

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 the medicinal plant ajowan (Trachyspermum ammi L.). Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. 12(1). (In Persian). 10.30479/IJGPB.2023.18141.1332

Jalali, Z., Sadat Nouri, A., Mirza-Ghadri, Q., Norouzi, M., Izadi Darbandi, A. 2018. Karyotype analysis of Ajowan (*Trachyspermum copticum* L.) ecotypes using classical methods and fluorescence in situ hybridization (FISH). Master's thesis, University of Kurdistan. (In Persian)

Jalalifar, T., Shahbazi, E. 2024. Assessment of genetic diversity in some indigenous ajwain (*Trachyspermum ammi* L.) populations using RAPD molecular markers. Research in Plant Metabolites, 2(2), 73-85. 10.22034/jrpsm.2025.509010.1053

Jafari, A.A. 2019. Identification, evaluation and conservation of important medicinal plant genetic resources in order to build up a gene bank of natural resources in Iran. Final report of research project, Fareast No. 93138-09-09, Pages No. 255. Publication of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.

Kumar, M., Mishra, G.P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P.K. and Singh, S.B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of the Trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(3): 225-236.10.1007/s12298-009-0026-6

Levan, A., Fredg, K., Sandber, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52, 201–222.

Makizadeh, M., Kamalioun, A. 2026. National Cropping Pattern Program for Agricultural Crops. Volume 4: Medicinal Plants (Final Edition). Agricultural Research, Education and Extension Organization

(AREEO). (In Persian)
Mirzaghaderi, G., Marzangi, K. 2015. IdeoKar: an ideogram-constructing and karyotype-analyzing software. Caryologia 68(1): 31-35. 10.1080/00087114.2014.998526
Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43(4), 1235-1248. https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235
Mohammadi, SA .2006. Analysis of molecular data from the perspective of genetic diversity evaluation, Proc. of the 9th Iranian Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aug 27, 2006. Tehran, Iran (In Persian).
Nikkerdar, F., Farshadfar, M., Ebrahimi, M. A., Shirvani, H. (2018). Genetic Diversity among Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Landraces using Scot Markers. Journal of Crop Breeding, 9(24), 95-102. (In Persian).
Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288–295. 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225-238. 10.1007/BF00564200
Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. 2016. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arabian Journal of Chemistry, 9, S1574-S1583. 10.1016/j.arabjc.2012.04.011
Sadat-Noori, S. A., Niazian, M., Soltani Howyzeh, M., Amiripoor, M. 2018. Ajowan medicinal plant (Botany, medicinal properties, agronomy, plant breeding and biotechnology). Academic Center of Education, Culture and Research-Tehran Branch.
Safae, L., Zainali, H. and Jaber-al-Ansar, Z. 2008. Karyotype study of five Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 117-125 (In Persian)
Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., dos Santos Rabaiolli, S. M., Stefanel, C. M. 2020. Determining the polymorphism information content of a molecular marker. Gene, 726, 144175. 10.1016/j.gene.2019.144175
Shabanian, N., Alikhani, L. and Rahmani, M.S. 2015. Phenotypic and genotypic diversity in Persian oak (*Quercus brantii*) populations of declining North-Zagros forests using biochemical characteristics and molecular SCoT markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 23-29. 10.22092/ijrfpbgr.2015.101532
Sheidai, M., Kalhor-Home, N., Poorneydanei, A. 2007. Cytogenetic study of some populations of Foeniculum vulgare (Umbelliferae) in Iran. Caryologia, 60(3), 257–261. 10.1080/00087114.2007.10797945
Soltani Howyzeh, M., Sadat Noori, S.A., Shariati, V. and Amiripour, M. 2025. Large-scale identification of SSR molecular markers in Ajowan (*Trachyspermum ammi*) using RNA sequencing. Plant Genetic Research, 6(1), pp.31-46. 10.29252/pgr.6.1.31
Taheri, S., Zabet, M., Izanlou, A., Izadi Darbandi, A. 2016. Assessment of genetic diversity of fennel ecotypes using RAPD and ISSR markers. Agricultural Biotechnology Journal, 7(4), 113-128. University Press, Iran, pp. 271 (In Persian). 10.22103/jab.2016.1394
Vaishnav, K., Tiwari, V., Durgapal, A., Meena, B., & Rana, T. S. 2023. Estimation of genetic diversity and population genetic structure in *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult. populations using DAMD and ISSR markers. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 21(1), 42. 10.1186/s43141-023-00497-7
Zabet, M., Afshari, F. 2015. Karyotypic analysis of Yarrow (*Achillea* spp.) genotypes using multivariate statistical methods. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 28: 371-383 (In Persian).
Zarco, C.R. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35, 526–530. 10.2307/1221906
Zhang, X., Chen, W., Yang, Z., Luo, C., Zhang, W., Xu, F., Ye, J., Liao, Y. 2024. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of Zanthoxylum species based on SSR and iPBS markers. BMC Plant Biology, 24(1), 843. 10.1186/s12870-024-05373-1