دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ١٦، شمارهٔ ٢، صفحهٔ ٢٠٦-١٩٨ (١٣٨٧)

مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین دو گونه از جنس *Cuminum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

منصوره کرمانی*[1] ، سید حسن مرعشی[2] ، عباس صفر نژاد[3]

١* – نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکترای رشته بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
پست الکترونیک: mansoore_kermani@yahoo.com
٢ – استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد
٣ – استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، مشهد

تاریخ دریافت: ١٣٨٧/٥/٦ تاریخ پذیرش:١٣٨٧/٩/١٣

چکیده

زیره سبز*(Cuminum cyminum)* و زیره سفید *(C. setifolium)*، دو گونه نزدیک به هم از خانواده چتریان هستند که بومی قسمتهای مرکزی و جنوبی آسیا می‌باشند. در این مطالعه، از نشانگرهای مولکولی AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین ١٥ لاین زیره سبز و سه جمعیت زیره سفید استفاده شد. با استفاده از ٦ ترکیب آغازگری(*EcoRI/MseI*)، ١٤٩ باند قابل امتیاز دهی ایجاد شد که ٧٣ عدد از آنها (٤٩٪) چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل (٢٠ باند) با استفاده از ترکیب آغازگری (E-AGT/ M-CCG) و کمترین تعداد باند چند شکل (٣ عدد) با استفاده از ترکیب آغازگری (E-ACT/ M-CGG) تولید شد. تنوع ژنتیکی(h) درون گونه زیره سبز (٠/١٥٠) بیشتر از زیره سفید (٠/٠٨٤) بود، درحالی‌که تنوع بین این دو گونه (٠/١٦٣) بیشتر از تنوع درون آنها بود. دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA، در فاصله ژنتیکی ٤٥٪ توانست این دو گونه را به طور کامل از هم تفکیک کند. این پژوهش نشان داد که جنس زیره ، بدلیل خودگشن بودن، از سطح تنوع نسبتاً کمی برخوردار است و ممکن است بتوان از زیره سفید بعنوان یک منبع جدید تنوع ژنتیکی جهت تلاقی‌های بین گونه‌ای و انتقال ژنهای مطلوب به زیره سفید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: زیره سبز، زیره سفید، AFLP ، تنوع ژنتیکی

مقدمه

جنس *Cuminum* (زیره) یکی از مهمترین اعضای خانواده چتریان *Apiaceae* (umbelferae) می‌باشد که دو گونه زیره سبز(*C. cyminum* L.) و زیره سفید (*C. setifolium* (Bioss) Koso- Pol.) بعنوان نزدیکترین خویشاوندان خانواده چتریان در آن حضور دارند. زیره سبز بومی مناطق مرکزی و جنوبی آسیا بوده و در چند کشور از جمله هند، پاکستان، ترکیه، ایران، مصر و اسپانیا کشت می‌شود. این گیاه قدیمی‌ترین و از نظر اقتصادی مهم‌ترین گونه در این خانواده می‌باشد که مصارف

دارویی، غذایی و صنعتی فراوانی دارد (کافی و همکاران، ۱۳۸۱). زیره سفید نیز در کشورهایی مثل ایران، ترکمنستان، افغانستان، پاکستان و آسیای مرکزی بصورت وحشی بر روی کوه‌ها می‌روید (Mozaffarian، ۱۹۸۳). این گیاه، علفی، یکساله، به ارتفاع ۱۰-۳۰ سانتیمتر با ساقه‌های منشعب، برگ‌های منشعب و نخی شکل، گل آذین چتر مرکب و میوه شیزوکارپ به طول ٤-۵ میلی‌متر بوده (Rechinger، ۱۹۸۱) و از نظر مورفولوژی و زیستگاه مشابه زیره سبز می‌باشد. اختلاف اساسی آنها در کرکهای روی میوه است که در زیره سبز بلندتر می‌باشد (کافی و همکاران،۱۳۸۱). زیره سبز دارای عدد کروموزومی ١٤= ۲x =۲n (Sharma و Ghosh، ۱۹٥٤) است که مشابه عدد کروموزومی در زیره سفید می‌باشد (صفرنژاد، اطلاعات منتشر نشده). در کشور ما رقم اصلاح شده ای از زیره سبز وجود ندارد و توده‌های بومی در مناطق مختلف کشت می‌شوند و علیرغم اینکه استان خراسان با ۹۰٪ تولید زیره سبز کشور مقام اول را داراست، اما روی جنبه‌های به زراعی آن پژوهش‌های کمتری صورت گرفته است. تولید زیره سبز هر ساله بدلیل تنش‌های زنده مثل بیماری بوته‌میری (*Fusarium oxysporum*) و سوختگی برگ (*Alternaria bumsii*) محدود می‌شود (حاجیان و جعفرپور، ۱۳۷۵). تنوع ژنتیکی بالقوه برای استفاده از طریق روشهای اصلاح نباتات کلاسیک، در ژرم پلاسم زیره سبز بویژه برای تنش‌های زنده بسیار محدود است (Champawat و Pathak،.۱۹۹۰) و به نظر می‌رسد در صورت موفقیت آمیز بودن تلاقی بین زیره سبز و زیره سفید، می‌توان از زیره سفید بعنوان یک منبع بالقوه و جدید از ژنهای سودمند، برای افزایش تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم زیره سبز و اصلاح آن استفاده نمود.

بررسی روابط ژنتیکی میان توده‌ها و لاین‌های زیره سبز، قبلاً با استفاده از صفات مورفولوژیک (بالندری، ۱۳۷۱، Avatar و همکاران، ۱۹۹۱)، تنوع برای عکس العمل به شوری (Dhayal و همکاران، ۱۹۹۹)، و نیز عملکرد و صفات رشدی (Baswana و همکاران، ۱۹۸۳) انجام شده بود. گزارشهای معدودی درباره استفاده از نشانگرهای مولکولی در زیره سبز وجود دارد. فقط دو مطالعه بر روی رابطه تکاملی بین اعضای خانواده چتریان (از جمله جنس *Cuminum*) با استفاده از تنوع در توالی نوکلئوتیدی منطقه ITS[1] (DNA ریبوزومی) (Downie و همکاران، ۲۰۰۰) و نیز تنوع در مکان‌های برشی DNA کلروپلاستی (cpDNA) (Lee و Downie، ۲۰۰۰) صورت گرفته است. در مورد بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف زیره سفید بر اساس صفات مورفولوژیک یا مولکولی نیز گزارشی مشاهده نشد. از آنجایی که ارزیابی بر اساس فنوتیپ یا صفات قابل اندازه‌گیری، بدلیل تأثیر عوامل محیطی بر بروز این صفات، سودمندی انتخاب را در برنامه‌های به نژادی کاهش می‌دهد، امروزه از نشانگرهای مولکولی بطور وسیعی برای بررسی تنوع ژنتیکی بین افراد خویشاوند در گونه‌های جنگلی و مرتعی و نیز گروه‌بندی آنها استفاده می‌شود (هاشمی و همکاران، ۱۳۸۷، ذوالفقاری و همکاران، ۱۳۸۷).

نشانگرAFLP یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR است که ترکیبی از RFLP و RAPD بوده و شامل هضم DNA ژنومی با آنزیم‌های برشی خاص و اتصال آداپتورهای چند نوکلئوتیدی کوتاه به انتهای قطعات برش یافته و سپس تکثیر قطعات ایجاد شده با کمک PCR

[1] - Internal Transcribed Spacer region

می‌باشد. این تکنیک تفاوت در مکان‌های برشی را آشکار می‌کند و از این نظر شبیه RFLP است؛ با این تفاوت که برای آشکار سازی قطعات بجای ساترن بلاتینگ از تکثیر بوسیله PCR استفاده می‌شود.AFLP حساسیت بسیار زیادی در آشکار سازی چند شکلی در سراسر ژنوم دارد و بدلیل قابلیت تکرار پذیری بالا بر RAPD برتری دارد. همچنین بدلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد مطالعه و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا، این روش امروزه بطور وسیعی برای تهیه نشانگرهای چند شکل استفاده می‌شود (چاولا، ۱۳۸۲). به همین دلیل، در پژوهش حاضر از AFLP برای بررسی تنوع درون و بین نمونه‌های مختلف جنس *Cuminum* و گروه‌بندی آنها استفاده گردید.

مواد و روشها

در این مطالعه از ۱۵ لاین مختلف زیره سبز که توسط خاوری و همکاران طی سالهای ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۰ خالص شده بودند (خاوری خراسانی و باقری، ۱۳۸۱) و نیز ۳ نمونهٔ تصادفی از درون یک جمعیت زیره سفید که از جنگل خواجه کلات واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شده بود، استفاده شد. بذور زیره در بهمن ماه سال ۱۳۸٤ در گلخانه تحقیقاتی در گلدان‌های جداگانه کشت شدند و استخراج DNA ژنومی از گیاهچه‌های ۲–۳ هفته‌ای با استفاده از روش CTAB مخصوص گیاهان دارویی (Michiels و همکاران، ۲۰۰۳) انجام گردید. کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و نیز اسپکتروفتومتری تعیین گردید. تکنیک AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اندکی تغییرات صورت گرفت. پانصد نانوگرم از DNA ژنومی با ۵ واحد از آنزیم‌های محدودگر *Eco*RI و *Tru*9I (ایزوشیزومر آنزیم *Mse*I) تهیه شده از شرکت SibEnzyme روسیه به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷°C هضم گشته و آداپتورهای *Eco*RI و *Mse*I بمدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C به انتهای قطعات برش یافته متصل شدند.

تکثیر قطعات متصل شده به آداپتورها طی دو مرحله انجام گرفت. ابتدا نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت ۱: ۵ رقیق شدند و با آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای '۳ با توالی (5'- GACTGCGTACCAATTC+**A** -3') برای آغازگر *Eco*RI و (5'- GATGAGTCCTGAGTAA+**C** - 3')برای آغازگر *Mse*I مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی در این مرحله به تعداد ۳۰ عدد و با برنامه ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه بود. سپس محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۱: ۲۰ رقیق شدند و با ٦ جفت آغازگر دارای ۳ نوکلئوتید انتخابی در انتهای '۳ (جدول ۱) تحت چرخه حرارتی Touch down که حاوی سه مرحله بود، تکثیر گردیدند. مرحله اول شامل یک چرخه (۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه) ، مرحله دوم شامل ۱۲ چرخه (۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتیگراد از دمای اتصال کاسته می‌شد.) ، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه) و مرحله سوم شامل ۲۳ چرخه (۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه) بود.

جدول ۱- ترکیب‌های آغازگری مورد استفاده در تکثیر انتخابی با ۳ نوکلئوتید انتخابی در انتهای '۳

ترکیب آغازگری	۱	۲	۳	٤	٥	٦
آغازگرهای E+NNN	E+ACG	E+ACG	E+ACT	E+AGT	E+AGC	E+AGT
آغازگرهای M+NNN	M+CAA	M+CGG	M+CGG	M+CTC	M+CCG	M+CCG

(آغازگرهای *EcoR*I با E و آغازگرهای *Mse*I با M نشان داده شده اند).

برای مشاهده الگوی باندی از ژل پلی اکریلامید واسرشت ٦٪ (Vos و همکاران، ۱۹۹۵) و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره (Sanguinetti، ۱۹۹٤) صورت گرفت و از الگوی باندی بدست آمده عکسبرداری شد.

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات DNA، امتیاز دهی باندها به صورت (۱) و (۰) به ترتیب برای حضور و عدم حضور باند انجام شد. باندهای مبهم و داده‌های از دست رفته نیز بصورت نقطه (.) مشخص گردیدند. داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار Popgene32 (Yeh، ۱۹۹۹) منتقل شدند. ماتریس فاصله ژنتیکی با استفاده از فرمول نی (Nei، ۱۹۷۸) بین تمام لاین‌ها محاسبه گردید و تجزیه خوشه‌ای[1] با روش UPGMA[2] صورت گرفت.

نتایج و بحث

آنالیز مولکولی AFLP: تجزیهٔ AFLP ۱۵ لاین زیره سبز به همراه ۳ نمونه از یک جمعیت وحشی زیره سفید با استفاده از ٦ جفت آغازگر، مجموعاً ۱٤۹ باند قابل امتیاز دهی ایجاد کرد که اندازه آنها در محدوده ٤۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز بود (شکل ۱). در این بین ۷۳ باند، چند شکلی نشان دادند (٤۹٪) که ٤٤ عدد (٦۰/۲۷٪) از این باندهای چند شکل توسط زیره سبز و ۱۵ عدد (۲۰/۵۵٪) از آنها توسط زیره سفید ایجاد شد. ۱٤ عدد (۱۹/۱۸٪) از باندهای چند شکل نیز منحصراً در یکی از گونه‌ها ظهور کردند و بنابراین متمایز کنندهٔ دو گونه بودند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۲٤/۸ و میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر جفت آغازگر ۱۲/۱ بود. در این میان، ترکیب آغازگری (E-AGT/ M-CCG) دارای بیشترین تعداد باند چند شکل (۲۰ باند) و ترکیب آغازگری (E-ACT/ M-CGG) دارای کمترین تعداد باند چند شکل (۳ عدد) بود.

محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC[3]) بر اساس داده‌های بدست آمده از ٦ جفت آغازگر برای هر یک از گونه‌ها به تنهایی و همچنین برای هر دو گونه مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین مقدار PIC در زیره سبز برابر با ۰/۲۲ و مربوط به ترکیب آغازگری (E-AGT/ M-CCG) بود. بیشترین مقدار PIC در زیره سفید نیز مربوط به همان ترکیب آغازگری و برابر با۰/۱۲۷ بود. در بین کل نمونه‌ها مقدار PIC از ۰/۳۰ تا ۰/۲۱ متغیر بود که به ترتیب مربوط به ترکیب آغازگری (E-AGC/ M-CCG) و (E-AGT/ M-CTC) می‌شد.

تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها: محاسبه شاخص‌های تنوع که عبارتند از درصد باندهای چند شکل و تنوع

[1] - Cluster Analysis
[2] - Unweighted pair- group method with arithmetic averaging
[3] - Polymorphic Information Content

ژنتیکی نی(h) ، نشان داد که میانگین تنوع ژنتیکی بین لاین‌های مختلف زیره سبز ۰/۱۵ و باندهای چند شکل ۲۹٪ بود. در مورد زیره سفید، تنوع ژنتیکی برابر با ۰/۰۸٤ و باندهای چند شکل ۱۰٪ بود. تقسیم بندی تنوع ژنتیکی درون و بین نمونه‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی کل در بین تمامی نمونه‌ها (H_T) ۰/۲۸ و میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (H_s) ۰/۱۱۷ بود. تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها: تنوع ژنتیکی بین دو گونهٔ مختلف از جنس *Cuminum*،($D_{ST} = H_T - H_S$) برابر با ۰/۱٦۳ بود که نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی بین این دو گونه بیشتر از تنوع ژنتیکی درون این دو گونه است. تجزیه خوشه‌ای: دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA در فاصله ژنتیکی ٤٥٪ توانست این دو گونه را به طور کامل از هم تفکیک کند.

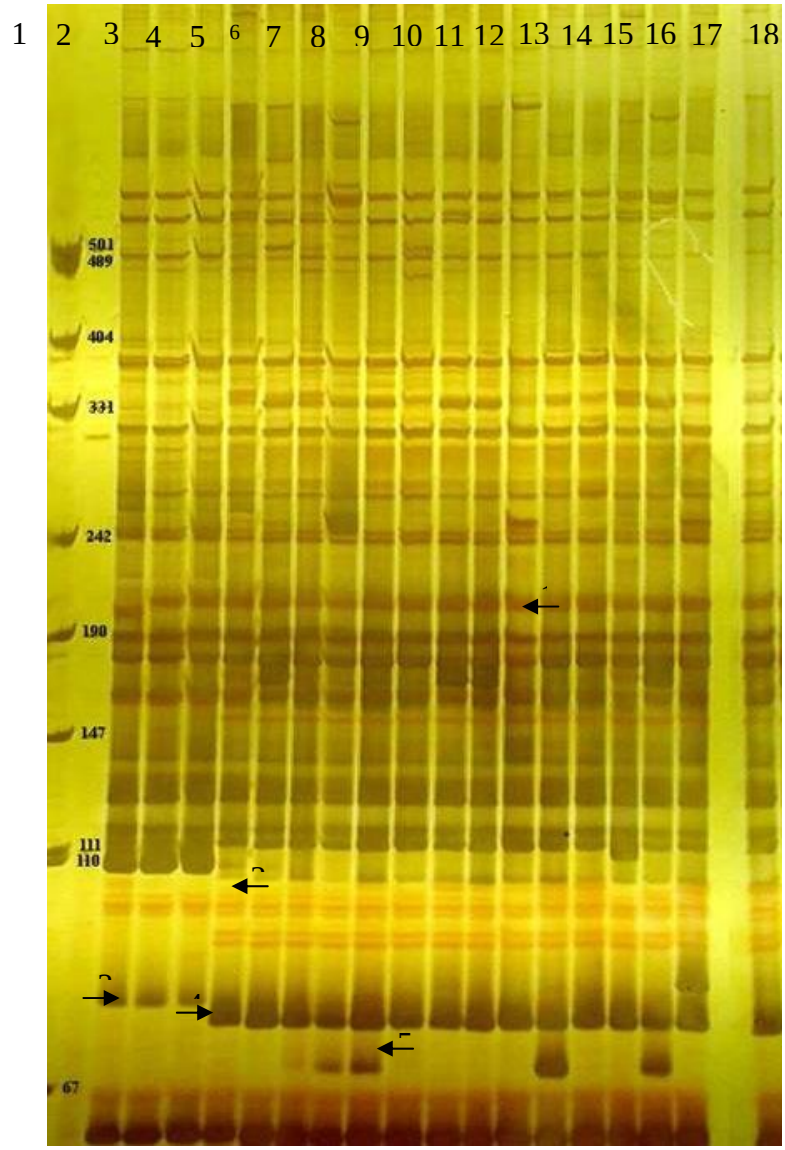
بحث

این پژوهش نشان داد که نشانگر AFLP می‌تواند یک نشانگر مناسب برای جدا کردن گونه‌های مختلف جنس *Cuminum* باشد. در مطالعه‌ای بر روی ۱۲ جمعیت *Eryngium alpinum* (*Apiaceae*) با استفاده از روش AFLP، درصد باندهای چند شکل درون هر جمعیت بین ۳۹/۷ تا ٦٥/۱٪ متغیر بود و تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت بین ۰/۱۳٤ تا ۰/۲۳٤ بود (Gaudeul و همکاران، ۲۰۰٤). همچنین در تحقیق دیگری بر روی ١٤ جمعیت از همین گونه میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۰/۱۹۸ بود (Gaudeul و همکاران، ۲۰۰۰). این مقایسات نشان داد که تنوع ژنتیکی درون هر دو گونه از جنس *Cuminum* نسبتاً پایین بوده، ولی در این میان تنوع درون جمعیتی زیره سفید خیلی کمتر از زیره سبز است. با توجه به اینکه جنس زیره یک گیاه خودگشن با میزان دگرگشنی ۲/۳۵٪ (کافی و همکاران، ۱۳۸۱) است و تنوع ژنتیکی در جمعیتهای دارای حداقل ۸۰٪ خودگشنی، پایین می‌باشد (*Dehaan* و همکاران، ۲۰۰۳) تنوع به نسبت پایین در این مطالعه را می‌توان به طبیعت خودگشن جنس زیره نسبت داد. همچنین یکی از دلایل کمتر بودن تنوع درون جمعیت زیره سفید نسبت به زیره سبز را می‌توان به کم بودن تعداد نمونه‌های گرفته شده از جمعیت زیره سفید مربوط دانست (۳ نمونه).

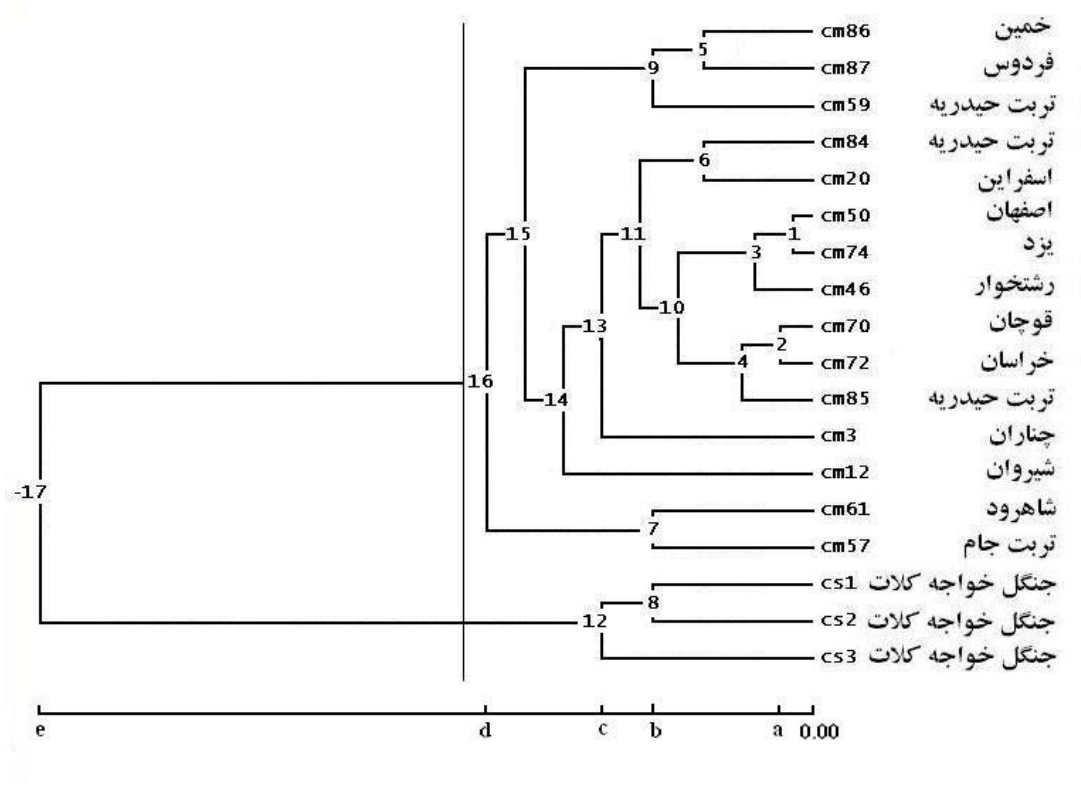
در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای AFLP بر روی ٥۰ جمعیت از یک لگوم علفی (*Desmanthus illinoensis*) که هم خودگشن بوده و هم تعداد نمونه‌های گرفته شده از هر جمعیت آن ۳ عدد بود، تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت بین ۰/۰۱۱ تا ۰/۰۱۸ گزارش شد (*Dehaan* و همکاران، ۲۰۰۳) که با توجه به نتایج پژوهش حاضر (تنوع ژنتیکی ۰/۱٥۰ و ۰/۰۸٤) نشان می‌دهد که جنس زیره می‌تواند در مقایسه با گیاهان خودگشن دیگر، از پتانسیل تنوع نسبتاً قابل قبول‌تری برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی آینده برخوردار باشد.

با توجه به تجزیه خوشه ای، منشأ لاین‌های زیره سبز مورد مطالعه در گروه اول توده‌های بومی‌ای است که از مناطق مختلف جمع آوری شده و با روش انتخاب لاین خالص تولید شده بودند (خاوری خراسانی و باقری، ۱۳۸۱) که در پژوهش ما ارتباط خاصی بین فواصل جغرافیایی و فواصل ژنتیکی بین لاین‌ها مشاهده نشد. اما شاید بتوان یکی دیگر از دلایل تنوع بیشتر نمونه‌های زیره سبز نسبت به زیره سفید را به تنوع در مناطق جغرافیایی که منشأ لاین‌ها بوده است، نسبت داد.

این پژوهش نشان داد که زیره سبز و سفید بدلیل طبیعت خودگشن، تنوع کمتری نسبت به گیاهان دگرگشن دارند (*Dehaan* و همکاران، ۲۰۰۳) و زیره سفید بعنوان گونهٔ وحشی زیره سبز می‌تواند بعنوان یک منبع بالقوه و جدید برای تنوع ژنتیکی به حساب آید که با توجه به شباهتهای زیاد مورفولوژیکی این دو گونه و نیز یکسان بودن تعداد کروموزومهای آنها، ممکن است بتوان از آن جهت تلاقی با زیره سبز و تولید هیبریدهای بین گونه‌ای برای انتقال ژنهای مطلوب بخصوص ژنهای مقاومت به تنشهای زنده استفاده نمود.



شکل ۱- پروفیل AFLP تهیه شده با ترکیب آغازگری E-AGT/M-CCG مربوط به ۳ نمونه زیره سفید (چاهک‌های ۱-۳) و ۱۵ لاین زیره سبز (چاهک‌های ۳- ۱۸) فلش‌های ۱ و ۵ نشان دهنده تنوع درون گونه‌ای و فلش‌های ۲ و ۳ و ٤ نشان دهنده تنوع بین گونه‌ای هستند.



e : ۳٤/٦ d : ۱۳/۷۷ c : ۸/۱۹ b : ۵/۸ a : ۳/۵٤

شکل ۲- دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA برای ۱۸ نمونه زیره سبز و سفید با استفاده از نشانگرهای AFLP (به همراه نام منطقه‌ای که منشأ بدست آمدن این نمونه‌ها بوده است.)

منابع مورد استفاده

- بالندری، ا. ۱۳۷۱. گردآوری و برسی خصوصیات بوتانیکی توده‌های محلی زیره سبز ایران. سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده خراسان.
- حاجیان، م. و جعفرپور، ب. ۱۳۷۵. مبارزه شیمیایی با بیماری سوختگی زیره سبز. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی ارائه شده به سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی خراسان.
- خاوری خراسانی، س. و باقری، ع. ۱۳۸۱. گزارش نهایی طرح "بررسی پتانسیل توده‌های بومی زیره سبز ایران و خالص سازی آنها به منظور دستیابی به ارقام مطلوب". طرح مشترک بین دانشگاه فردوسی مشهد و سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی. ٤۰ صفحه.
- چاولا. اچ. اس. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. (ترجمه فارسی، م. و ذوالعلی، ج.) ۱۳۸۲. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- ذوالفقاری، ر. اکبری نیا، م. مردی م. و فائزه قناتی. ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی بلوط ایرانی *Quercus branti* Lindl. در جوامع مختلف ارتفاعی استان کهکیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره (SSR). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. همین شماره، ۱٦(۲): ۱۸۲-۱۷۳.
- کافی، م. راشد محصل، م. ح. کوچکی، ع. و ملافیلابی، ع. ۱۳۸۱. زیره سبز فناوری تولید و فرآوری. انشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- هاشمی، ه.، صفرنژاد، ع.و باقری، ع. ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی توده های بومی زیره پارسی(*Bunium persicu*m Boiss) ایران با

استفاده از نشانگرهای RAPD's . تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. همین شماره.۱۷(۲): ۲۳۷-۲۲۹.

- Avatar, R. Dashora, S. L. Sharma, R. K. and Sharma, M. M. 1991. Analysis of genetic divergence in cumin (*Cuminum cyminum* L.). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 15: 289-291.
- Baswana, K. S. Pandita, M. L. and Malik, Y. S. 1983. Genetic variability studies in cumin (*Cuminum cyminum* L.). Haryana Agriculture University Journal of Research. 13: 596-598.
- Champawat, R. S. and Pathak, V. N. 1990. Field screening of cumin germplasm against *Fusarium oxysporum* f. sp. Cumini. Journal of Areca nut and Spices. 13:142.
- Dehaan, L. R. Ehlke, N. J. Sheaffer, C. C. Muehlbauer, G. j. and Wyse, D. L. 2003. Illinois bundle flower genetic diversity determined by AFLP analysis. Crop Science. 43: 402-408.
- Dhayal, L. S. Bhargava, S. C. and Mahala, S. C. 1999. Studies on variability in cumin (*Cuminum cyminum* L.) on normal and saline soil. Journal of Spices and Aromatic Crops. 8: 197-199.
- Downie, S. R. Katz-Downie, D. S. and Spalik, K. 2000. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA: internal transcribed spacer sequences. American Journal of Botany. 87: 76-95.
- Gaudeul, M. Taberlet, P. Till-Bottraud, I. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. Molecular Ecology. 9: 1625-1637.
- Gaudeul, M. Till-Bottraud, I. Barjon, F. Manel, S. 2004. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Comparison of AFLP and microsatellite markers. Heredity. 92: 508-518.
- Lee, B. Y., Dowine, S. R. 2000. Phylogenetic analysis of cpDNA restriction sites and rps16 intron sequences reveals relationships among Apiaceae tribes Caucalideae, Scandiceae and related taxa. Plant Systamatics and Evolution. 221: 35-60.
- Michiels, A. Ende, W. V. D. Tucker, M. Riet, L. V. and Laere, A. V. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. Analytical Biochemistry. 315: 85-89.
- Mozaffarian, V. 1983. The family of Umbelliferae in Iran. Pub. Research Institute of Forests and Rangelands. 35: 146-147.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 87: 583-590.
- Rechinger, K. 1981. Flora Iranica. *Apiaceae*. Academische Druck-u-verganstalt, Graz, Austria. 162:140-142.
- Sanguinetti, C. J. Dias Neto, E. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 17: 915-919.
- Sharma, A. K. and Ghosh. 1954. Cytogenetics of some of the Indian Umbelliferes. Genetica 27: 17-44.
- Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. Lee, T. V. D. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407-4414.
- Yeh, F. C. Yang, R. C. and Boyle, T. 1999. POPGENE, the User- Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada. http://www.ulberta.ca/~fyeh/.

Investigation of genetic variation within and among two species of *Cuminum spp.* using AFLP markers.

M. Kermani[1], H. Marashi[2], A. Safarnejad[3]

1- PhD, Ferdowsi University of Mashhad, I.R.Iran.
E-Mail: mansoore_kermani@yahoo.com
2- Assis. Prof., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R.Iran.
3- Assis. Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center of Mashhad, I.R.Iran

Received: 27.07.2008 Accepted: 03.12.2008

Abstract

Green cumin (*Cuminum cyminum*) and white cumin (C. *setifolium*) are two closely related species from *Apiceae* family, native of central and southern Asia. In this study, AFLP markers were used to evaluate the genetic variation within and among 15 lines of green cumin and 3 populations of white cumin. 149 bands were scored using 6 primer combinations (*Eco*RI/*Mse*I) of which 73 (49%) were polymorphic. The largest numbers of polymorphic bands (20 bands) were produced using primer combination *Eco*RI-AGT / *Mse*I-CCG, and the lowest numbers of polymorphic bands (3 bands) were produced by primer combination *Eco*RI-ACT / *Mse*I-CGG. Genetic variation (h) within green cumin (0.150) was higher than that of white cumin (0.084). Whereas, genetic variation among the samples (0.229) was higher than that of within samples. UPGMA based dendrogram, completely distinguished these species in genetic distance of 45%. This study revealed that *Cuminum* genus poses a relatively low level of variation due to its self pollinating nature, and white cumin as a wild type may be used as a new source of genetic variation for interspecific crosses and hybrid production.

Key words: *Cuminum cyminum*, *C. setifolium*, AFLP marker, Genetic variation.