DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.7645

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران

جلد ۲۲، شماره ۱، صفحه ۱۰-۱ (۱۳۹۳)

ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره سیاه ایران (*Bunium persicum* Boiss) با توالی‌یابی نواحی ITS از DNA ریبوزومی هسته

مصطفی عظیم‌زاده[1]، رضا امیری[2]، محمد حسن عصاره[*3]، محمد رضا بی‌همتا[4] و مسیح فروتن[5]

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

۲- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

*۳- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه تحقیقاتی زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

پست‌الکترونیک: asareh@rifr-ac.ir

۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

چکیده

زیره سیاه گیاه علفی و چندساله از خانواده چتریان است و رویشگاه طبیعی آن به ایران و تعداد کمی از کشورهای همسایه محدود می‌شود. با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی زیره سیاه ایران، نه اکوتیپ این گیاه از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شد و ناحیه ITS2 و همچنین ناحیه ITS1-5.8s rRNA- ITS2 روی آنها تکثیر و تعیین توالی شد. توالی‌ها به روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign هم‌ردیف‌سازی شده و دندروگرام روابط فیلوژنیک و ماتریس تفاوت و تشابه توالی‌ها ترسیم گردیدند. نتایج، تنوع ژنتیکی کمی را بین اکوتیپ‌ها نشان داد که در مقایسه با مطالعه پیشین نویسندگان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی، تنوع کمتری داشتند. همچنین، در دو اکوتیپ دانشگاه مشهد و کلات نادری، توالی ناحیه ITS1-5.8s rRNA- ITS2 مقایسه شده با توالی‌های پایگاه داده ref-seq genomic در سایت BLAST، با گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، برنج، سورگوم و انگور سیاه بیشترین درصد شباهت را داشتند. باتوجه به عدم شباهت نتایج حاصل از نشانگر ITS با نتایج حاصل از تعداد قابل توجهی از صفات مورفولوژیک و شیمیایی، این تفاوت بین اکوتیپ‌ها قابل توجه نبود. در مجموع، نشانگر ITS2 برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای چندان مناسب به نظر نمی‌رسد و پیشنهاد می‌گردد از سایر نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی زیره سیاه استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: زیره سیاه، تنوع ژنتیکی، ژرم‌پلاسم طبیعی، توالی‌یابیITS.

مقدمه

گیاهان دارویی گونه های ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به‌عنوان مواد اولیه برای تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند (Omidbaigi, 2005). اصلاح گیاهان دارویی با هدف افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان صورت می‌گیرد که در صنایع دارویی، غذایی و عطرسازی اهمیت خاصی دارند. اما در این راه مراحل بسیاری وجود دارد که اولین و مهمترین آنها جمع‌آوری ذخایر ژنتیکی گیاه مورد نظر، حفظ و نگهداری کلکسیون و تعیین خصوصیات و تنوع ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده می‌باشد (Omidbaigi, 2005; Azimzadeh *et al*., 2008).

زیره سیاه دارای نام‌های دیگری مانند "زیره ایرانی"، "زیره کرمانی" و نیز "زیره کوهی" می‌باشد و نام علمی صحیح این گیاه *Bunium persicum* است (Peter, 2004). زیره سیاه گیاهی چندساله، علفی، معتدل‌پسند، بدون کرک، منشعب و دگرگشن از خانواده چتریان می‌باشد. میوه که منبع اصلی استخراج مواد موثره دارویی این گیاه می‌باشد از نوع فندقه دو قسمتی یا دی‌آکن (diachene) می‌باشد (Ghahreman, 1999).

این گیاه در مکان‌هایی می‌روید که دارای آب و هوای معتدل تا گرم و خشک و ارتفاعات ۱۸۰۰ تا ۳۱۰۰ متر از سطح دریا و زمستانی پوشیده از برف داشته باشد، می‌روید. زیرا بذر این گیاه به دوره سرمایی شدید و طولانی برای گذراندن دوره خواب و جوانه‌زدن نیاز دارد. این مناطق عمدتا شامل ایران و بعضی از مناطق کشورهای افغانستان، پاکستان، تاجیکستان و شمال هندوستان می‌باشند (Panda, 2004؛ Hanelt *et al*.,2001؛ Panwar *et al*., 1993؛ Panwar, 2000). پراکنش گیاه در مرکز، شمال شرق، شرق و جنوب ایران و در استان‌های فارس، کرمان، خراسان، سمنان، تهران، اصفهان، آذربایجان‌غربی، قزوین، سیستان و بلوچستان، کردستان، هرمزگان، یزد، منطقه حفاظت‌شده توران و ارتفاعات الوند می‌باشد (Akbarinia, 2004; Jahansooz *et al*., 2008; Asgarzadeh *et al*, 2004).

این گیاه تاکنون مورد اصلاح قرار نگرفته و واریته و رقمی از آن منتشر نشده است و تنها به صورت وحشی و خودرو در رویشگاهای طبیعی خود رشد می‌کند. در اندک مکانهایی که کشت زراعی انجام می‌گیرد نیز منبع تهیه بذر همان رویشگاهای طبیعی گیاه می‌باشد.

زیره سیاه کاربرد دارویی، عطری و ادویه‌ای دارد. خواص دارویی مهم این گیاه شامل درمان زخم معده، درمان شکستگی استخوان، تب‌بر، کاهش چربی و کلسترول خون، ضد آلرژی، کاهش‌دهنده قند خون، خاصیت حشره‌کشی، انگل‌کشی، ضد میکروبی و قارچ‌کشی، برطرف‌کننده سنگ‌های دستگاه ادراری، اشتهاآور، ضد نفخ و اسهال، ضد آسم و دیابت، ضد تشنج، دارای تأثیرات مطلوب بر فعالیت آنزیم‌های خون، کبد و روند متابولیسم این آنزیم‌هاست (Avicenna, 1984; Sekine *et al*., 2007؛ Seyed *et al*., 1986؛ Hanelt *et al*., 2001؛ Peter, 2004؛ Panda, 2004).

از سوی دیگر، اسانس این گیاه خاصیت ضد اکسایشی داشته و در طعم‌دهنده‌های غذا، نوشابه، شکلات و پنیر استفاده شده و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد فراوان دارد (Pourmortazavi *et al*., 2005).

در زمینه ترکیبات اسانس زیره مطالعات انجام شده بیشتر شامل گزارش نوع و مقدار مواد تشکیل‌دهنده عصاره هستند و چون تولید این متابولیت‌های ثانویه به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی می‌باشد، بین گزارش‌های مختلف از مواد مؤثره زیره سیاه اختلافاتی مشاهده می‌شود (Thappa *et al*., 1991؛ Foroumadi *et al*., 2002؛ Ghorbanian, 2009). در هند Majeed و Sharma (۲۰۰۶) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و RAPD تنوع ژنتیکی زیره سیاه را بررسی نمودند. از میان ۴۰ آغازگر تصادفی RAPD، ۳۷ آغازگر الگوی قابل تکثیر نشان داده و ۳۶ آغازگر ۱۶۸ باند چندشکل تولید نمودند. دندروگرام RAPD نشان داد که نمونه‌های مربوط به مکان‌های یکسان در خوشه‌های یکسان دسته‌بندی می‌شوند. نمونه‌هایی که از ۲ ایالت هیماچال پرادش و جامو-کشمیر جمع‌آوری شده بودند در گروه‌های جداگانه تفکیک شدند. بالا بودن ضریب تغییرات برای صفاتی مانند ارتفاع گیاه و تعداد بذر در هر گیاه مشاهده شد که نشان‌دهنده مقدار تنوع بالای این صفات در بین جمعیت‌ها بود. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها را در ۲ گروه عمده جای داد. گروه ۱ شامل جمعیت‌های مناطق Sangla، Gurez و Khrew و گروه ۲ شامل جمعیت‌های مناطق Kapla و Harwan بود.

در تحقیق Pezhmanmehr و همکاران (۲۰۰۸)، با استفاده از نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی ۲۳ اکوتیپ زیره از ایران، یک اکوتیپ از کشور پاکستان و ۳ اکوتیپ زیره سبز بررسی گردید. پانزده آغازگر تصادفی برای بررسی تنوع انتخاب شدند که ۲۳۰ باند چندشکل تولید نمودند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه Jaccard و الگوریتم UPGMA بود که جمعیت‌ها را در ۹ گروه قرار داد. هشت جمعیت از استان کرمان همراه با یک جمعیت از استان سمنان و ۳ جمعیت از استان خراسان در یک

گروه قرار گرفتند. اما ۶ جمعیت دیگر استان کرمان، یک جمعیت از استان اصفهان و یک جمعیت از استان قزوین هرکدام در یک گروه قرار گرفته و ۸ گروه جداگانه تشکیل دادند.

در تحقیق مولکولی دیگری، Jahansooz و همکاران (۲۰۰۸)، با استفاده از نشانگر چند شکلی طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) تنوع ژنتیکی ۲۰ جمعیت زیره سیاه ایران را بررسی کردند. هفده ترکیب آغازگری مورد استفاده باعث تولید ۳۰۳ باند شدند که ۲۲۸ باند (۷۵ درصد از باندها) بین ۲۰ اکوتیپ چندشکل بودند. دندروگرام باساس روش Dice و الگوریتم UPGMA جمعیت‌ها را به ۴ گروه اصلی تقسیم نمود. یک جمعیت از استان کرمان در یک گروه مجزا جای گرفت؛ اما ۸ جمعیت دیگر استان کرمان همراه با تمام جمعیت‌های استان‌های سمنان، خراسان، قزوین و اصفهان در یک گروه دیگر قرار گرفتند. گروه سوم را ۲ جمعیت از استان کرمان تشکیل دادند که نزدیکی زیادی با ۲ جمعیت دیگر از همین استان داشتند که گروه چهارم را تشکیل می‌دادند.

با استفاده از اطلاعات توالی‌یابی ITS در DNA ریبوزومی هسته‌ای و همچنین توالی‌یابی DNA پلاستیدی (نواحی psbA-trnH intergenic spacer) و همچنین نشانگرهای مورفولوژیک (تعداد لپه و پهنای درز میوه)، Degtjareva و همکاران (۲۰۰۹)، روابط فیلوژنتیکی بین ۳۹ گونه از جنس *Bunium* را مطالعه نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که جنس *Bunium* دارای تنها یک زیرشاخه نیست و از دو زیرشاخه اصلی تشکیل شده است. نتایج مطالعات مولکولی، مورفولوژیک و کاریولوژیک در این تحقیق الگوهای مشابهی را در روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها نشان دادند و نتایج یکدیگر را تأیید نمودند. یکی از گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق زیره سیاه بود که از منطقه تاجیکستان جمع‌آوری شده بود.

تعیین تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف زیره جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف این گیاه در کشور و گروه‌بندی آنها براساس صفات قابل توارث، اولین قدم در این راه می‌باشد. به همین دلیل در مطالعه حاضر این گیاه مهم اقتصادی، دارویی و تغذیه‌ای کشور به وسیله یک نشانگر مولکولی مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برگ غده‌های کشت شده زیره سیاه در خزانه مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، در اردیبهشت ماه ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید و بلافاصله به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده در مطالعات مولکولی منتقل گردید. نمونه‌های بررسی شده شامل ۹ اکوتیپ بودند (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات اکوتیپ‌های مورد استفاده در مطالعات مولکولی

ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی		طول جغرافیایی		شرایط آب و هوایی منطقه	استان	نام نمونه (محل جمع‌آوری)	کد نمونه
	دقیقه	درجه	دقیقه	درجه				
۲۰۰۰	۱۷	۵۴	۵۴	۳۱	گرم- خشک	یزد	یزد	۱
۱۶۰۰	۰۵	۵۵	۴۷	۳۳	نیمه گرم - نیمه خشک	اصفهان	ثقفی	۲
۳۲۰۰	۴۱	۵۵	۲۸	۲۹	نیمه گرم – نیمه خشک	کرمان	جوپار	۳
۲۳۰۰	۰۳	۵۰	۱۵	۳۶	سرد- نیمه مرطوب	قزوین	الموت	۴
۲۳۰۰	۳۸	۵۸	۱۵	۳۶	نیمه گرم- نیمه مرطوب	خراسان	عسگری	۵
۲۶۵۰	۳۴	۵۶	۴۸	۳۰	نیمه گرم – نیمه خشک	کرمان	سیرچ	۶
۱۷۰۰	۳۳	۵۳	۳۵	۳۵	نیمه گرم – نیمه خشک	شیراز	شیراز	۷
۲۶۰۰	۳۸	۵۹	۱۶	۳۶	نیمه گرم – نیمه مرطوب	خراسان	کلات نادری	۸
۲۰۰۰	۰۵	۵۵	۴۷	۳۳	نیمه گرم – نیمه خشک	کرمان	کرمان	۹

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج شرکت Promega مدل A1120 انجام شد (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Co, USA.).

پرایمرهای ITS

برای تعیین پرایمرهای مناسب برای واکنش PCR، در سایت پایگاه داده GenBank توالی‌های ITS1 و ITS2 شناخته شده جنس Bunium شناسایی شدند. توالی‌های مزبور به کمک نرم‌افزار آنلاین Primer3 بررسی شده و یک جفت پرایمر رفت و برگشت در هر کدام شناسایی شد. برای تکثیر قطعه ITS1، توالی پرایمر رفت 5′-AAGCCTGCGATAGCAGTACG-3′ و برگشت 5′-TTATTTTCCTTGGCGCATTC-3′ بود.

برای ITS2 توالی پرایمر رفت به صورت 5′-CCAACCATCAACTCCTTGAGA-3′ و برگشت به صورت 5′-TGTGCTATCCAAGGGTCCTC-3′ بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای مطالعه مولکولی از توالی‌یابی ITS2 برای سنجش تنوع ژنتیکی زیره سیاه استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق دستورالعمل Degtjareva و همکاران (۲۰۰۹) انجام گردید. محصولات PCR برای حصول اطمینان از تکثیر موفق، روی ژل آگاروز ۲ درصد جداسازی شدند.

همچنین در این تحقیق با استفاده از پرایمر رفت ITS1 و پرایمر برگشت ITS2، ناحیه میان دو ITS تکثیر شد که شامل نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8 S rRNA می‌باشد. این کار برای تشخیص توالی DNA و جهش‌های احتمالی این ژن در زیره سیاه بود. برای این کار ۲ اکوتیپ (اکوتیپ‌های مشهد و کلات نادری) را انتخاب نموده و DNAی آنها با روش PCR فوق تکثیر گردید.

توالی‌یابی

در این تحقیق توالی‌یابی براساس پروتکل کیت توالی‌یابی سیکلی خاتمه دهنده BigDye (نسخه ۳/۱) از شرکت Applied Biosystems BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing kit) به وسیله دستگاه‌های ژنتیک آنالیزر ۳۱۳۰ و ۳۱۳۰ ایکس ال (Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

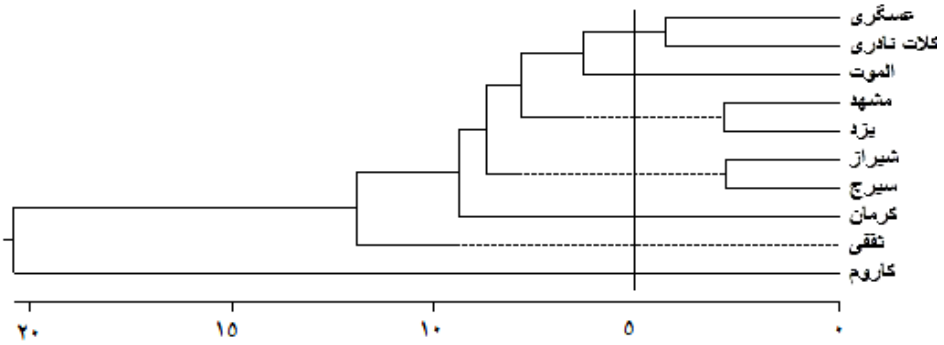
پس از مشاهده چشمی گراف نتایج الکتروفورز موئین توسط نرم‌افزار Sequencing Analysis Software (نسخه ۵/۱) و همچنین نرم‌افزار Chromas (نسخه ۲/۳) و انجام تصحیحات، توالی‌ها به روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign هم‌ردیف‌سازی شدند. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی شامل دندروگرام روابط فیلوژنیک و ماتریس تفاوت و تشابه توالی‌ها بودند.

همچنین، هم‌ردیف‌سازی توالی‌های ۲ اکوتیپ (اکوتیپ‌های مشهد و کلات نادری) با توالی‌های پایگاه داده ref-seq genomic در سایت BLAST (NCBI Genomic Reference Sequences) انجام شد.

نتایج

توالی‌یابی ITS2

پس از به دست‌آمدن توالی ITS2 برای اکوتیپ‌های زیره سیاه ایران، دندروگرام با نرم‌افزار MegAlign با استفاده از روش ClustalW رسم گردید (شکل ۱). در این تجزیه با رسم خط برش، اکوتیپ‌ها به هفت گروه اصلی تقسیم شدند. گروه یک شامل اکوتیپ‌های عسگری (استان خراسان) و کلات نادری (استان خراسان)، گروه دو شامل اکوتیپ الموت (استان قزوین)، گروه سه شامل اکوتیپ‌های دانشگاه مشهد (استان خراسان) و مسیح یزد (استان یزد)، گروه چهار شامل سیرچ (استان کرمان) و شیراز (استان فارس)، گروه پنج تنها اکوتیپ کرمان (جوپار) (استان کرمان)، و گروه شش تنها اکوتیپ ثقفی (استان اصفهان) را شامل شد. گونه *Carum carvi* برای مقایسه با اکوتیپ‌های زیره سیاه در این تجزیه اضافه گردید که در گروهی جداگانه با حداکثر فاصله قرار گرفت.



شکل ۱- دندروگرام مقایسه توالی ITS2 اکوتیپ‌های زیره سیاه ایران به روش ClustalW با نرم‌افزار MegAlign

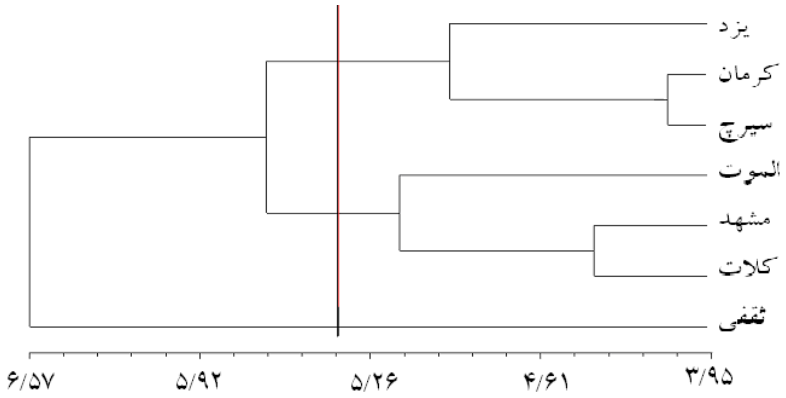
در ماتریس فاصله توالی‌های اکوتیپ‌ها مشاهده می‌شود که یکی از خروجی‌های نرم‌افزار MegAlign است. در این ماتریس برای هر جفت توالی اکوتیپ، اعداد بالای قطر نشان‌دهنده میزان شباهت یا همسانی و اعداد زیر قطر نشان‌دهنده میزان تفاوت یا تنوع است (جدول ۲). شایان ذکر است که مجموع این دو عدد برای هر جفت اکوتیپ همیشه ۱۰۰ نیست.

جدول ۲- ماتریس درصد همسانی و تنوع توالی ناحیه ITS2 برخی اکوتیپ‌های زیره سیاه ایران (درصد تشابه) (نزدیکی)

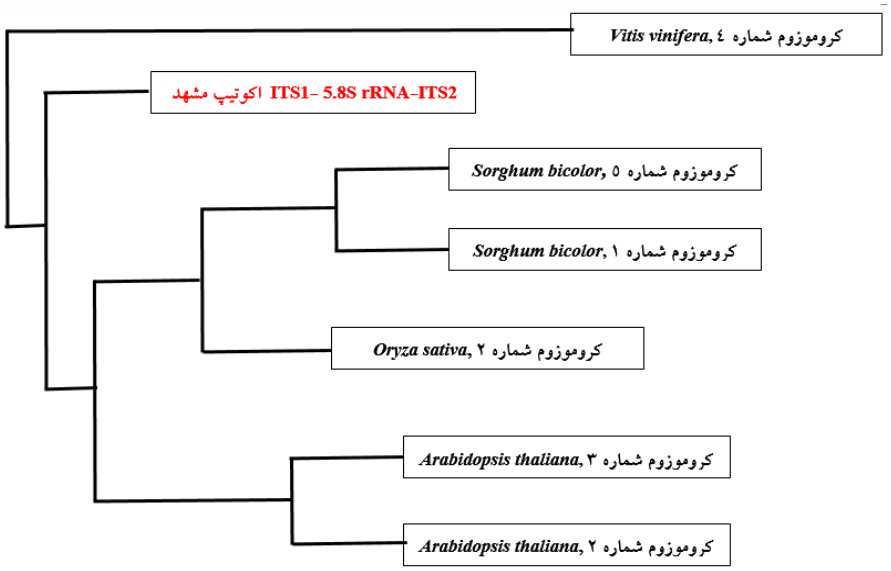
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰		
درصد فاصله (عدم تشابه)	۱		۸۸/۳	۶۹/۴	۸۸/۵	۸۴/۳	۸۸/۵	۸۶/۶	۹۱/۲	۸۵/۵	۸۹/۰	۱	الموت
	۲	۱۲/۷		۷۱/۷	۹۲/۰	۸۵/۸	۸۷/۶	۸۶/۸	۹۶/۵	۸۸/۱	۹۰/۲	۲	عسگری
	۳	۴۱/۶	۳۶/۴		۷۱/۰	۷۱/۱	۷۰/۳	۷۳/۷	۷۳/۶	۷۱/۲	۷۲/۵	۳	کاروم
	۴	۱۲/۵	۸/۵	۳۸/۳		۸۷/۷	۸۹/۷	۸۶/۰	۹۰/۹	۸۶/۳	۸۷/۸	۴	کلات نادری
	۵	۱۷/۶	۱۵/۷	۳۷/۱	۱۳/۶		۸۲/۸	۸۶/۷	۸۸/۸	۸۴/۸	۸۶/۴	۵	کرمان
	۶	۱۲/۵	۱۳/۶	۴۰/۳	۱۱/۱	۱۹/۷		۸۷/۶	۹۰/۸	۸۷/۳	۹۴/۶	۶	مشهد
	۷	۱۴/۸	۱۴/۶	۳۳/۰	۱۵/۵	۱۴/۶	۱۳/۶		۹۲/۰	۹۱/۹	۹۲/۲	۷	ثقفی
	۸	۹/۳	۳/۶	۳۳/۴	۹/۷	۱۲/۲	۹/۹	۸/۵		۹۵/۴	۹۵/۲	۸	شیراز
	۹	۱۶/۱	۱۳/۰	۳۷/۱	۱۵/۲	۱۷/۰	۱۴/۰	۸/۶	۴/۸		۹۴/۱	۹	سیرج
	۱۰	۱۲/۰	۱۰/۵	۳۵/۸	۱۳/۴	۱۵/۱	۵/۷	۸/۳	۵/۰	۶/۲		۱۰	یزد
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰		

توالی‌یابی نواحی ITS1-5.8s rRNA- ITS2

در دو اکوتیپ دانشگاه مشهد و کلات نادری نواحی ITS1، ITS2 و 5.8S rRNA توالی‌یابی گردید. نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های دو اکوتیپ دانشگاه مشهد و کلات نادری بررسی شده زیره سیاه، با توالی‌های پایگاه داده ref-seq genomic در سایت BLAST نشان داد که این دو اکوتیپ روابط نزدیکی با چند توالی در گیاهان دیگر دارند. در شکل‌های ۳ و ۴ به‌ترتیب دندروگرام حاصل از هم‌ردیف‌سازی توالی اکوتیپ‌های دانشگاه مشهد و کلات نادری با توالی چند گیاه یافت شده توسط BLAST نشان داده می‌شود. اطلاعات مربوط به توالی‌های شکل‌های۳ و ۴ شامل نام گونه‌ها، درصد پوشش و درصد شباهت در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است.



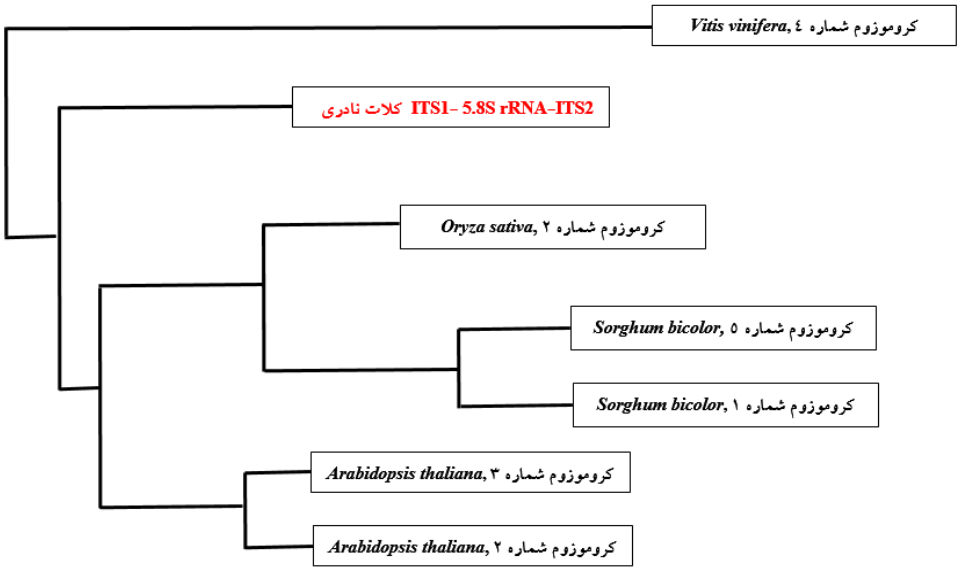
شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده های مورفولوژیک-شیمیایی برای ۷ اکوتیپ زیره سیاه



شکل ۳- هم‌ردیف‌سازی توالی ITS1 -5.8S rRNA- ITS2 اکوتیپ مشهد زیره سیاه با چند گیاه

جدول ۳- ویژگی‌های توالی‌های هم‌ردیف شده با توالی ITS1 - 5.8S rRNA- ITS2 اکوتیپ مشهد که به صورت معنی‌داری هم‌ردیف بودند.

کد اکسشن	نام علمی گیاه و شماره کروموزوم	امتیاز کل	پوشش توالی (درصد)	حداکثر همسانی (درصد)
NC_012874.1	*Sorghum bicolor*, کروموزوم شماره ۵	۱۷۴۳	۲۷	۹۴
NC_008395.1	*Oryza sativa*, کروموزوم شماره ۲	۲۵۵	۲۷	۹۴
NC_003074.8	*Arabidopsis thaliana*, کروموزوم شماره ۳	۲۵۵	۲۷	۹۳
NC_003071.7	*Arabidopsis thaliana*, کروموزوم شماره ۲	۲۵۵	۲۷	۹۳
NC_012870.1	*Sorghum bicolor*, کروموزوم شماره ۱	۲۵۵	۲۷	۹۳
NC_012010.2	*Vitis vinifera*, کروموزوم شماره ۴	۲۲۰	۲۹	۸۸



شکل ۴- هم‌ردیف‌سازی توالی ITS1– 5.8S rRNA– ITS2 اکوتیپ کلات نادری زیره سیاه با چند گیاه

جدول ۴- ویژگی‌های توالی‌هایی که با توالی ITS1 – 5.8S rRNA– ITS2 اکوتیپ کلات نادری به صورت معنی‌داری هم‌ردیف بودند.

حداکثر همسانی (درصد)	پوشش توالی (درصد)	امتیاز کل	نام علمی گیاه و شماره کروموزوم	کد اکسشن
۹۱	۲۸	۱۲۸۸	*Sorghum bicolor*, کروموزوم شماره ۵	NC_012874.1
۹۱	۲۷	۲۲۰	*Arabidopsis thaliana*, کروموزوم شماره ۳	NC_003074.8
۹۱	۲۷	۲۲۰	*Arabidopsis thaliana*, کروموزوم شماره ۲	NC_003071.7
۹۰	۲۸	۲۲۴	*Oryza sativa*, کروموزوم شماره ۲	NC_008395.1
۹۰	۲۸	۲۲۰	*Sorghum bicolor*, کروموزوم شماره ۱	NC_012870.1
۸۶	۲۹	۱۹۶	*Vitis vinifera*, کروموزوم شماره ۴	NC_012010.2

بحث

در نتایج مطالعه پیشین نویسندگان، دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفولوژیک-شیمیایی برای ۷ اکوتیپ، اکوتیپ‌ها را به سه دسته تقسیم نمود. اکوتیپ‌ها در این تجزیه براساس مکان جغرافیایی و شرایط مشابه آب و هوایی در گروه‌های مشابه قرار گرفتند (Azimzadeh *et al.*, 2008). در ضمن ضریب همبستگی کوفنتیک بالا در این دندروگرام بیانگر کارایی بالای روش به کار رفته در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها بود (Romesburg, 1990).

در دندروگرام با نرم‌افزار MegAlign با استفاده از روش ClustalW، همان گونه که در شکل ۲ مشاهده شد، اکوتیپ‌ها نسبت به مقایسه مورفولوژیک و بیوشیمیایی الگوی نسبتا متفاوتی نشان دادند. در مجموع نتایج روش مولکولی فقط تا حدودی شبیه نتایج تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفولوژیک و شیمیایی می‌باشد. البته اکوتیپ‌های شیراز و عسگری در مطالعات مورفولوژیک و بیوشیمیایی حضور نداشتند.

ضریب همبستگی پایین ماتریس‌های تشابه اکوتیپ‌های حاصل از نشانگرهای بیوشیمیایی- مورفولوژیک و نشانگر ITS2، نشان‌دهنده تطابق و هم‌خوانی بسیار کم نشانگرهای مورفولوژیک- شیمیایی و ITS2 بود و می‌توان تفاوت بالای نتایج حاصل از دو روش را استنباط نمود.

الگوی قرارگرفتن اکوتیپ‌ها براساس مناطق جغرافیایی و شرایط اکولوژیک در گروه‌های مشابه که در مقایسات مورفولوژیک و شیمیایی به‌دست آمده بود، در نتایج نشانگر ITS چندان تأیید نشد. این نکته را می‌توان به این دلیل دانست که تفاوت‌های قطعه ITS در ژنوم موجودات، اگرچه توالی حفاظت‌شده‌ای در سطح بین گونه‌ای به‌شمار می‌آید (Degtjareva *et al.*, 2009)، اما تفاوت‌های بین اکوتیپ‌های زیره سیاه (*Bunium persicum*) یا اختلافات درون‌گونه‌ای چندان قابل توجه نیست. با این حال، گزارشها نشان می‌دهند که سایر نشانگرهای مولکولی استفاده شده در مطالعه تنوع درون‌گونه‌ای در زیره سیاه از کارایی قابل قبولی برخوردار بوده‌اند (Majeed & Sharma, 2006; Jahansooz, 2008; Pezhmanmehr *et al.*, 2008). در مجموع با توجه به تعداد بالای صفات مورد بررسی در بخش مورفولوژیک- شیمیایی، می‌توان نتایج این بخش را معتبرتر دانسته و اینگونه نتیجه گرفت که نشانگر ITS2 برای بررسی تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای چندان مناسب نیست. در ضمن Degtjareva و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی روابط فیلوژنیک بین ۴۷ جنس از گونه *Bunium*، در توالی‌یابی ITS2 تعداد جفت‌بازهای آن را بین ۲۰۳ تا ۲۲۶ گزارش کردند. همچنین درصد اختلاف توالی‌ها بین ۰ تا ۳۰/۳ درصد بود. در صورتی که در مطالعه پیش روی، تفاوت بازهای ITS2 بین اکوتیپ‌های *Bunium persicum* بین ۱۵۸ جفت باز (اکوتیپ شیراز) تا ۱۹۳ جفت باز (اکوتیپ ثقفی) بود. همچنین تفاوت‌ها بین ۲/۸ (اکوتیپ‌های مشهد و یزد) و ۱۴/۴ درصد (اکوتیپ‌های عسگری و سیرچ) متغیر بودند.

نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نواحی ITS2 و 5.8S rRNA و ITS1 در دو اکوتیپ دانشگاه مشهد و کلات نادری با یکدیگر نشان داد که این دو اکوتیپ به هم نزدیک بوده و تفاوت زیادی از لحاظ این نواحی با یکدیگر ندارند. درصد پوشش هم‌ردیف‌سازی ۹۹ درصد و میزان شباهت ۹۲ درصد بود. همان گونه که در نتایج مقایسه توالی‌های دو اکوتیپ با توالی‌های پایگاه داده ref-seq genomic در سایت BLAST، با پایگاه داده مشخص است، توالی ITS2 و 5.8S rRNA و ITS1 در این دو اکوتیپ گونه *Bunium persicum* ایران، به گیاهانی مانند آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، برنج (*Oryza sativa*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) و انگور سیاه (*Vitis vinifera*) شبیه می‌باشد. البته این شباهت در اکوتیپ دانشگاه مشهد بیشتر بود.

با توجه به این نکته که در پایگاه داده ref-seq genomic بدون محدودکردن موجودات زنده قابل بررسی به گیاهان، این تجزیه و تحلیل انجام شده، می‌توان از شباهت و نزدیکی توالی قطعات ITS2 و 5.8S rRNA و ITS1 از این چهار گیاه و نزدیک نبودن با سایر حیوانات، انسان و موجودات تک سلولی، این نتیجه را گرفت که این ناحیه در یوکاریوت‌ها بخصوص گیاهان بسیار حفاظت شده و مشابه می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به عدم شباهت نتایج حاصل از نشانگر ITS با نتایج حاصل از تعداد قابل توجهی صفت مورفولوژیک و شیمیایی و این نکته که تفاوت‌های قطعه ITS در ژنوم موجودات، توالی‌های حفاظت شده در سطح بین گونه‌ای بوده و این تفاوت‌ها بین اکوتیپ‌های زیره سیاه (*Bunium persicum*) بسیار قابل توجه نیست، در مجموع می‌توان این گونه نتیجه گرفت که نشانگر ITS2 برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای چندان مناسب نمی‌باشد.

برای نمونه‌گیری برگ گیاه جهت استخراج DNA این گیاه، همیشه از برگ‌های تازه و سبز روشن پایینی گیاه که در ابتدای بهار ظاهر می‌شوند، نمونه‌گیری گردد تا مشکلی در رابطه با کیفیت DNA برای استفاده در پروژه‌های زیست‌شناسی مولکولی پیش نیامده و همیشه بعد از نمونه‌گیری برگ‌ها بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. همچنین، پیشنهاد می‌گردد که از سایر نشانگرها مثل نشانگرهای ISSR و AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی زیره سیاه استفاده نموده و نتایج حاصل را با نتایج این مطالعه مقایسه نمود.

منابع مورد استفاده

– Akbarinia, A., 2004. Evaluation of distribution and essence yield of *Bunium persicum* in Qazvin province. National conference of sustainable medicinal plants, Mashhad, Iran. p. 51-2.
– Avicenna, S.H., 1984. The canon of medicine. Soroush Publication, Tehran, 2455 p.
– Asgarzadeh, M.A., Gholami, B. and Negari, A., 2004. Evaluation of quantitative and qualitative yield of *Bunium persicum* in Mashhad climate. National conference of sustainable medicinal plants, Mashhad, Iran. p. 327-328.
– Azimzadeh, M., Amiri, R., Najafi, M.S., Assareh, M.H., Sefidkon, F., Bihamta, M.R., and Mardi, M., 2008. Assessment genetic diversity of *Bunium persicum* Boiss germplasm by chemical analysis of seed essence.10th International Congress of Crop Science, Tehran, Iran. p.143.
– Degtjareva, G.V., Kljuykov, E.V., Samigullin, T.H., Valiejo-Roman, C.M., and. Pimenov, M.G., 2009. Molecular appraisal of *Bunium* and some related arid and sub-arid geophilic Apiaceae–Apioideae taxa of ancient Mediterranean. Botanical Journal of the Linnean Society, 160: 149-170.
– Foroumadi, A., Asadipour, A., Arabpour, F. and Amanzadeh, Y., 2002. Composition of the essential oil of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. from Iran J. Essential Oil Res. 14: 161-162.
– Ghahreman, A., 1999. Iranian color flora. Research institute of forest and rangelands. Vol 2. 1225 p.
– Ghorbanian, N., 2009. Evaluation and identification of fruit components of *Bunium persicum* Boiss. University of Tehran, Tehran. 81p.
– Hanelt, P., Büttner, R., Mansfeld, R., and Kilian, R., 2001. Mansfield's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Berlin, Springer. 2200 p.
– Jahansooz, F., Najafi, A.A, Sefidkon, F., Ebrahimzadeh, H., and Mardi, M., 2008. Assessment of genetic diversity in ecotypes of *Bunium persicum* using AFLP markers. The 5th national biotechnology congress of Iran, Tehran, Iran. p. 199.
– Majeed, S., and Sharma, D., 2006. Assessment of genetic divergence of kala zira of different geographical races from India. Proceedings of 1st Int. Conference on Biotechnological Approaches for Alleviating Malnutrition and Human Health, Bangalore, India, p. 191.
– Omidbaigi, R., 2005. Production and Processing of medicinal plants. Behnashr Press, Mashhad. 769 p
– Panda, H., 2004. Aromatic Plants Cultivation, Processing and Uses. Chapter 21: *Bunium persicum* (Boiss.) Fedtsch. Published by National Institute of Industrial Research, India. 334 p.
– Panwar, K.S., Sagwal, J.C., Sharma, S.K. and Saroch, K., 1993. Economic viability of Kala Zira cultivation in high altitude dry temperate region of Himachal Pradesh. Agric. Situation in India 48: 151-154.
– Panwar, K., 2000. Black Caraway: Spice Crops of India, Black Caraway. Kalyani Publishers, New Delhi. p. 172-178.
– Peter, K.V., 2004. Handbook of Herbs and Spices. Florida, CRC Press. 3430 pp.
– Pezhmanmehr, M., Hassani, M.E., and Fakhre Tabatabaie, M., 2008. Evaluation of genetic diversity in some ecotypes of Black Cumin (*Bunium persicum*) using RAPD markers. The 5th national biotechnology congress of Iran, Tehran, Iran. p187.
– Pourmortazavi, S.M., Ghadiri, M. and Hajimirsadeghi, S.S., 2005. Supercritical fluid extraction of volatile components from *Bunium persicum* Boiss. (black cumin) and *Mespilus germanica* L. (Medlar) seeds. Journal of Food Composition Analysis, 18: 439–446
– Sekine, T., Sugano, M., Azizi, M., and Fujii, Y., 2007. Antifungal effects of volatile compounds from black Zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. Journal of Chemical Ecology, 33: 2123-2132.
– Seyed, M., Hanif, M., Chaudhary, F.M., and Bhatty, M.K., 1986. Antimicrobial activity of the essential oils of the Umbelliferae family: Part I. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* and *Bunium persicum* oils. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 29: 183-188.
– Thappa, R.K., 1991. Comparative studies on the major volatiles of kala zira (*Bunium persicum*) of wild and cultivated sources. Food Chemistry, 41: 129-134.

Genetic diversity of Iranian *Bunium persicum* Boiss ecotypes using sequencing of the ITS region of nuclear ribosomal DNA

M. Azimzadeh[1], R. Amiri[2], M.H. Assareh*[3], M.R. Bihamta[4] and M. Forootan[5]

1-PhD Student in Nano-Biotechnology, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran
2- Assoc. Prof., College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran.
3- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
Email: asareh@rifr-ac.ir
4- Prof., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran.
5- Assist. Prof., Department of Biotechnology and Plant Breeding, Zabol University, Zabol, I.R.Iran

Received: 29.05. 2011 Accepted: 01.07.2012

Abstract

One of the important perennial herb in Apiaceae family is Black caraway (*Bunium persicum*) which is growing naturally in some regions of Iran and a few neighboring countries. In order to evaluate genetic diversity of Iranian germplasm, nine ecotypes of the species were collected and their ITS2 and ITS1-5.8s rRNA- ITS2 regions were amplified by PCR and sequenced. Sequences were aligned in the ClustalW method by using MegAlign program. Phylogenic dendrogram, identity and divergence matrices were designed. Low genetic diversity was found among the ecotypes in comparison with previous studies via morphological and biochemical markers. Comparison of the sequences of ITS1-5.8s rRNA- ITS2 regions of two ecotypes (Mashhad University and Kalat Naderi) with ref-seq genomic database at NCBI, showed the highest similarity with *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* and *Vitis vinifera* sequences. Considering low similarity between the results of two distinct studies of the authors, results of morphological and biochemical markers are more reliable than molecular markers (ITS2). It could be concluded that the ITS2 molecular marker does not seem to be compatible for intra-species studies. Other convenient molecular markers for assessment of genetic diversity of black caraway are suggested.

Keywords: Black caraway (*Bunium persicum*), Natural germplasm, Genetic diversity, ITS region sequencing.