بررسی تنوع ژنتیکی توده های بومی گشنیز با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT

محمدجواد اعتصامی[1]، دکتر امیر محمد ناجی،[2] دکتر علیرضا رضا زاده[2]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد

۲-استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد

Email: m.j.etesami@shahed.ac.ir

چکیده

گشنیز گیاهی معطر با نام علمی *Coriandrum sativum L.* یک ساله و دگرگشن می باشد. یکی از ادویه مهم آشپزی و همچنین یکی از داروهای مهم در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰ توده بومی گشنیز انجام شد. جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی توده های گشنیز از ۱۰ نشانگر SCoT استفاده شد. تعداد نوارهای مشاهده شده از ۵ (SCoT1) تا ۲۷ نوار (SCoT13) متغیر بود. بیشترین(۳۶٪) و کمترین(۳۰٪) میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به SCoT36 و SCoT3 بود. بالاترین(۸/۹۳) مقدار شاخص نشانگر[1] SCoT13 و میانگین قدرت تفکیک نشانگر SCoT در این پژوهش برابر با ۲۱/۳۰ گزارش شد. بیشترین شاخص تنوع ژنی نی (۰/۴۶) و شانون (۰/۷۲) مربوط به نشانگر SCoT2 بود. کمترین(۱/۶۴) و بیشترین(۱/۳) یکنواختی مربوط به توده های لرستان الف و خراسان جنوبی الف بود. بیشترین تنوع ژنتیکی(۰/۳۴)، (۰/۵۲) و درصد چندشکلی (۸۱/۸۸ درصد) مربوط به توده لرستان الف و کمترین(۰/۱۶)، (۰/۲۴) و (۳۹/۳۸) آنها متعلق به توده خراسان جنوبی الف بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین و درون جمعیت ها به ترتیب ۲۰ و ۸۰ درصد بود. براساس ماتریس تشابه و فاصله بیشترین فاصله به ترتیب مربوط به توده های کرمان و آذربایجان غربی، خراسان جنوبی ب و یزد، گلستان و یزد و کمترین فاصله مربوط به توده های خراسان جنوبی ب و کرمان، گلستان و کرمان، گلستان و خراسان جنوبی ب، آذربایجان غربی و گلستان بود. تجزیه خوشه ای توده‌های گشنیز به همراه ۵۰ ژنوتیپ با ترسیم خط برش، توده ها به ۳ گروه تقسیم که تجزیه به مولفه های اصلی این گروه بندی را تایید کرد.

کلمات کلیدی: گشنیز، تنوع ژنتیکی، SCoT، شاخص نشانگر

۱. مقدمه

گشنیز با نام علمی *Coriandrum sativum L.* گیاهی معطر و یکساله از خانواده چتریان[2] دارای 2n=2x= 22 کروموزوم بوده که کاربردهای وسیعی دارد(۵). گشنیز دگرگشن بوده که میزان آن بستگی به وجود حشرات و باد بین ۶۰ تا ۷۰ درصد متغیر است(۱۴). منشا آن مدیترانه شرقی و در آفریقای شمالی، اروپای مرکزی و آسیا به طور گسترده تولید و مصرف می‌شود(۱). به نقل از خدادادی و همکاران کشت گشنیز در ایران در بسیاری از مناطق از جمله: همدان، قزوین، کرمان بوشهر و یزد صورت می‌گیرد. تولید گشنیز در ایران سالیانه حدود ۵۸۰۰ تن که بیشترین تولید آن در شهرستان نهاوند صورت می‌گیرد. قسمت مورد استفاده گیاه، برگ و دانه آن می‌باشد. دانه گشنیز دارای۰/۳ تا ۱/۲ درصد اسانس و ۱۹ تا ۲۱ درصد روغن می‌باشد(۱۱). گشنیز علاوه برمصرف خوراکی، در رفع مشکلات دستگاه گوارش، کاهش اشتها، تشنج، بی‌خوابی و اضطراب استفاده می‌شود. همچنین خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد دیابت، ضد سرطان شناسایی شده است(۵). هدف از کشت گشنیز علاوه بر مصرف سبزی عمدتاً برداشت دانه می‌باشد. به همین

[1] Marker Index
[2] Apiaceae

دلیل ارقامی که دارای عملکرد دانه بیشتر باشند، بسیار مطلوب هستند(۸). تنوع در منابع ژنتیکی گیاهی فرصتی را برای بهنژادگران گیاهی ایجاد می‌کند که ارقام جدید و بهبود یافته‌ای با خصوصیات مطلوب ایجاد کنند(۱۰). در واقع تنوع ژنتیکی پایه‌ای برای بقای گیاهان در طبیعت و بهبود محصول در برنامه های بهنژادی است. وجود تنوع ژنتیکی در داخل و بین گونه‌های گیاه زراعی به پرورش دهندگان این امکان را می‌دهد که ژنوتیپ‌های برتر را مستقیماً به عنوان گونه جدید مورد استفاده قرار دهند یا در برنامه بهنژادی به عنوان والد مورد استفاده قرار گیرند. تنوع ژنتیکی بین دو والد برای تحقق هتروزیس ضروری است(۶). هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی بین برخی از توده‌های بومی گشنیز ایران برای استفاده از نتایج آن در برنامه های اصلاحی بعدی می‌باشد. بررسی تنوع ژنتیکی Dyulgerov و همکاران(۲۰۱۳) در ۴۳ ژنوتیپ گشنیز بر اساس صفات ریخت شناختی مانند (ارتفاع گیاه، تعداد شاخهٔ جانبی، تعداد چتر در بوته، تعداد میوه در چتر و وزن هزار دانه) نشان دادند که در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه تنوع ریختی معنی داری وجود دارد(۷). Pareek و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه توده‌های مختلف گشنیز با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبنتی بر DNA و آنالیز خوشه‌ای، ضمن تقسیم توده ها به دو گروه تنوع ژنتیکی معنی داری در بین توده ها گزارش نمودند(۱۵). قنبری و همکاران(۲۰۱۱) در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی SRAP چند شکلی قابل قبولی در بین توده‌های گشنیز جمع آوری شده از چند منطقهٔ ایران را نشان دادند(۹).

۲. مواد و روش ها

مواد گیاهی شامل ۱۰ توده گشنیز بومی ایران بود که از بانک ژن گیاهی ملی ایران واقع در موسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. این پژوهش در سال زراعی ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد انجام شد. آزمایش در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۲ تکرار انجام شد. جامعه آماری شامل ۵۰ ژنوتیپ از ۱۰ توده بومی بود. توده‌های مورد استفاده عبارتند از: TN-55-90(گلستان)، TN-55-161(مازندران)، TN-55-185(خراسان جنوبی ب)، TN-55-218(یزد ب)، TN-55-305(آذربایجان شرقی)، TN-55-418(کرمان)،TN-55-235(لرستان ب)، TN-55-219(یزد الف)، TN-55-233(لرستان الف)، TN-55-86(خراسان جنوبی الف)(جدول۱). نمونه برگی از ژنوتیپ های هر توده که در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی کشت شده بود برداشت و تا زمان استخراج DNA در یخچال ۸۰- °C نگهداری شد.

جدول۱: شماره نگهداری، نام منطقه، طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا محل جمع آوری هر یک از توده‌ها

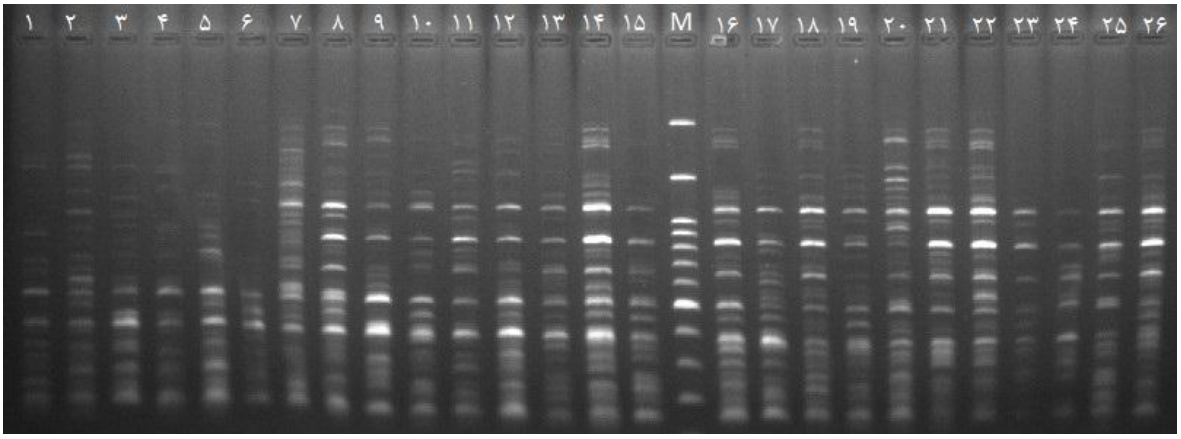
ردیف	شماره نگهداری	منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا(متر)
۱	TN-55-86	خراسان جنوبی الف	۵۹° ۱۳' ۰"	۳۲° ۵۲' ۲۴"	۱۴۵۲
۳	TN-55-219	یزد الف	۵۴° ۲۱' ۲۰"	۳۱° ۵۳' ۱۵"	۱۲۲۲
۳	TN-55-161	مازندران	۵۳° ۳' ۳۱"	۳۶° ۳۳' ۵۸"	۴۲
۴	TN-55-233	لرستان الف	۴۸° ۲۱' ۳۳"	۳۳° ۲۹' ۱۹"	۱۱۸۸
۵	TN-55-235	لرستان ب	۴۸° ۲۱' ۳۳"	۳۳° ۲۹' ۱۹"	۱۱۸۸
۶	TN-55-418	کرمان	۵۷° ۴' ۲۱"	۳۰° ۱۷' ۴"	۱۷۶۴
۷	TN-55-185	خراسان جنوبی ب	۵۹° ۱۳' ۰"	۳۲° ۵۲' ۲۴"	۱۴۵۲
۸	TN-55-90	گلستان	۵۴° ۲۵' ۵۹"	۳۶° ۵۰' "۳۱	۱۳۳
۹	TN-55-305	آذربایجان غربی	۴۵° ۴' ۳۴"	۳۷° ۳۳' ۱۱"	۱۳۴۸
۱۰	TN-55-218	یزد ب	۵۴° ۲۱' ۲۰"	۳۱° ۵۳' ۱۵"	۱۲۲۲

استخراج DNA با روش CTAB (Saghai-Maroof et al.,1984) با اندکی تغییرات انجام شد(۱۲). تعیین کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ انجام شد. به منظور بررسی تنوع زنتیکی توده های بومی گشنیز از نشانگر مولکولی SCoT استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر به DNA الگو به مدت ۴۵ ثانیه که دمای اتصال هر آغازگر از ۵۰ تا ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد متناسب با آغازگر متغیر بود، گسترش رشته جدید به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه دنبال شد. مواد و مقدار مواد استفاده شده واکنش زنجیره ای پلی مراز طبق جدول ۲ استفاده شد.

جدول۲: مواد لازم و مقدار هر یک از آن‌ها برای تهیه محلول پایه PCR با استفاده ازMaster mix.

مواد	غلظت محلول اصلی	مقدار(µl)
Master mix	۲X	۵µl
DNA Template	۰/۵ng/µl	۱/۵µl
Primer	۱۰۰Pmoles/µl	۱µl
H_2O		۲/۵µl
Total Volum	۱۰µ	

جهت اندازه گیری طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه DNA (ساخت شرکت Solis Biodyne) که دارای قطعات DNA ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ جفت باز بود، استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها به‌مدت ۱۳۵ دقیقه با جریان ۹۰ ولت صورت گرفت. و پس از رنگ‌آمیزی با ژل رد ۵X (ساخت شرکت Biotium) قطعات DNA تکثیر شده بوسیله نشانگر با نور UV توسط دستگاه ژل داک مشاهده شد و عکس‌برداری از ژل انجام شد.



شکل۱: الگوی نوارهای تکثیر شده با استفاده از نشانگرهای SCoT

نوارهای تکثیر شده در واکنش های ژنجیره ای پلی مراز پس از تفکیک در الکتروفورز و رنگ آمیزی به صورت اعداد صفر و یک برای تمامی نمونه ها و نشانگرها در یک فایل اکسل امتیازدهی و به شکل ماتریس داده آماده گردید. پس از تشکیل ماتریس، تعداد نوار تکثیر(n)، تعداد نوار چندشکل(np)، درصد نوارهای چندشکل(p٪) با استفاده از رابطه $\%P= n_p/n \times 100$، محتوای اطلاعات چندشکل(PIC) نیز از طریق رابطه $PIC = 2fi(1-fi)$(۱۶) و نیز شاخص نشانگر(MI) با رابطه $MI=EMR\times PIC$ که نسبت سهم

موثر(EMR) از طریق EMR= β × ŋ (در اینجا ŋ میانگین تعداد نوارهای تکثیر شده در هر فرد به وسیله هر یک از نشانگرها می‌باشد و $\beta = n_p/n$ است) برای هر یک از نشانگرها محاسبه گردید. جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی توده ها ماتریس داده های مولکولی با استفاده از نرم افزار POPGENE version 1.31 تجزیه و تحلیل شدند.

۳. نتایج و بحث

آگاهی از تنوع مولکولی و ارتباط آن بین افراد، جمعیت، گونه های گیاهی برای اصلاح گیاهان مهم است. بررسی تنوع مولکولی می تواند مکان های ژنی مرتبط با سازگاری موجود زنده با محیط اطراف خود را شناسایی کند.

جدول ۳: عملکرد ۱۰ آغازگر SCoT در تجزیه و تحلیل تنوع مولکولی ژنوتیپ گشنیز

Primer*	Sequence 5’ to 3’	TGA	TB	PB	%P	PIC	GD	MI	Rp
SCoT1	5'-AACCATGGCTACCACCAC-3'	۵۰	۵	۵	۱۰۰	۰/۳۳	۰/۴۲	۱/۶۶	۶/۶۸
SCoT2	5'-CCATGGCTACCACCGCCA-3'	۵۰	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۳۵	۰/۴۶	۳/۵۴	۱۲/۲۴
SCoT3	5'-GCAACAATGGCTACCACC-3'	۵۰	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۰	۰/۳۸	۳/۸۷	۱۸/۲۰
SCoT4	5'-CAACAATGGCTACCACCC-3'	۵۰	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۳۰	۰/۳۸	۴/۱۴	۱۹/۸۸
SCoT9	5'-ACGACATGGCGACCATCG-3'	۵۰	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۳۲	۰/۴۱	۶/۱۱	۲۵/۸۰
SCoT10	5'-CAACAATGGCTACCACGC-3'	۵۰	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۳۳	۰/۴۲	۶/۲۰	۲۴/۹۶
SCoT11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۵۰	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۳۵	۰/۴۶	۵/۳۲	۱۸/۶۸
SCoT13	5'-ACGACATGGCGACCATCG-3'	۵۰	۲۷	۲۷	۱۰۰	۰/۳۳	۰/۴۲	۸/۹۳	۳۶/۳۶
SCoT28	5'-CCATGGCTACCACCGCCA-3'	۵۰	۱۸	۱۸	۱۰۰	۰/۳۵	۰/۴۳	۶/۳۱	۲۴/۴۰
SCoT36	5'-GCAACAATGGCTACCACC-3'	۵۰	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۶	۰/۴۵	۷/۲۳	۲۵/۸۴
Average			۱۶	۱۶		۰/۳۳	۰/۴۲	۵/۳۳	۲۱/۳۰

(به ترتیب از راست به چپ (علائم اختصاری): شاخص قدرت تفکیکRP، شاخص نشانگر MI، تنوع ژنتیکی GD، محتوی اطلاعات چند شکلی PIC، درصد چندشکلی P% ، نوار چندشکل PB، تعداد کل نوار TB، تعداد کل ژنوتیپ های تکثیر شده TAG)

در این پژوهش ۱۰ نشانگر مولکولی SCoT با محتوای GC ۶۵ تا ۷۰ درصد استفاده شد(جدول۳). همه نشانگرهای مورد استفاده چند شکلی را نشان دادند. تعداد کل نوارهای تکثیر شده به وسیله این نشانگرها ۱۶۰ نوار چندشکل بود. تعداد نوارهای مشاهده شده از ۵ نوار برای SCoT1 و ۲۷ برای SCoT13 متغیر بود. به دلیل اینکه تعداد زیادی از این ژن ها در نواحی مختلفی از ژنوم موجود قرار دارند، نوارهای تکثیری متفاوتی نیز برای هر نشانگر به دست می آید(۴). تعداد نوارهای تکثیر شده و همچنین نرخ چندشکلی بین ژنوتیپ های گشنیز مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. تعداد کل نوارهای تکثیر شده برای هر نشانگر نیز در این جدول ذکر شده است. همچنین بیشترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به نشانگرهای SCoT36 و SCoT3 و SCoT4 با میزان ۳۶ درصد و ۳۰ درصد بود. به همین دلیل نشانگر SCoT36 نسبت به سایر نشانگرها به خوبی توانست فاصله ژنتیکی در جمعیت ها را نشان دهد. شاخص نشانگری در این پژوهش بین ۱/۶۶ و ۸/۹۳ متغیر بود. نشانگرهای SCoT13 دارای بالاترین مقدار شاخص نشانگر بودند که نشان دهنده کارایی بسیار بالای این نشانگرها در آشکار کردن میزان چندشکلی جمعیت‌های مورد مطالعه بود. همچنین کمترین مقدار شاخص مارکری نیز مربوط به نشانگر SCoT1 با مقدار ۱/۶۶ بود. شاخص قدرت تفکیک(RP) کارایی هر نشانگر جهت جداسازی و تفکیک نوارهای تکثیری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نشان می دهد(۲). میانگین قدرت تفکیک نشانگر SCoT در این پژوهش برابر با ۲۱/۳۰ بود. بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به نشانگر SCoT13 برابر با ۳۶/۳۶ بود که این مقدار نشان دهنده کارایی بالای این نشانگر نسبت به سایر نشانگرهای استفاده شده در این مطالعه بود(جدول۳). در پژوهشی که به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۶ جمعیت گونه ای دارویی از گیاه ارکیده(*Dandrobum nobil*) با استفاده از ۱۶ نشانگر SCoT انجام شد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی با مقدار ۰/۷۸ و مقدار شاخص قدرت تفکیک در محدوده ی ۴/۴ تا ۷/۵ محاسبه شد(۳). تعیین یکنواختی جمعیت‌ها از طریق محاسبه نسبت آلل های موثر به تعداد آلل های مشاهده شده انجام می‌گردد. هر چه این نسبت کمتر باشد یکنواختی ژنتیکی جمعیت نیز بیشتر می‌شود. تعداد آلل‌های موثر در بین نشانگرهای SCoT از ۱/۶۸ تا ۱/۸۸ متغیر

بود(جدول۴). بیشترین تعداد آلل موثر (۱/۸۸) در نشانگر SCoT2 و کمترین مقدار (۱/۶۸) در نشانگر SCoT3 مشاهده شد. بیشترین شاخص تنوع ژنی نی (۰/۴۶) و شانون (۰/۷۲) مربوط به نشانگر SCoT2 بود. این نتایج نشان می‌دهد نشانگر SCoT2 با فراوانی آلل مناسب و بیشترین تنوع ژنتیکی قادر به ارزیابی بهتر تنوع ژنتیکی نسبت به سایر نشانگرها تنوع بین جمعیت‌ها را ارزیابی کند(جدول۴).

جدول۴ : فراوانی آلل ها و شاخص های تنوع ژنتیکی مربوط به نشانگرهای SCoT

SCoT	na	ne	ne/na×100	h	I
SCoT1	۲	۱/۷۶	۸۸	۰/۴۲	۰/۶۱
SCoT2	۲	۱/۸۸	۹۴	۰/۴۶	۰/۷۲
SCoT3	۲	۱/۶۸	۸۴	۰/۳۸	۰/۵۵
SCOT4	۲	۱/۷۹	۸۹/۵	۰/۳۸	۰/۵۵
SCOT9	۲	۱/۸۳	۹۱/۵	۰/۴۱	۰/۶۰
SCoT10	۲	۱/۷۷	۸۸/۵	۰/۴۲	۰/۶۰
SCoT11	۲	۱/۸۶	۹۳	۰/۴۶	۰/۶۵
SCoT13	۲	۱/۷۵	۸۷/۵	۰/۴۲	۰/۶۱
SCoT28	۲	۱/۷۹	۸۹/۵	۰/۴۳	۰/۶۸
SCoT36	۲	۱/۸۶	۹۳	۰/۴۵	۰/۷۰
Mean	۲	۱/۸۰	۹۰	۰/۴۲	۰/۶۳

تعداد آلل های موثر (ne) در توده لرستان الف با مقدار ۱/۶۴ دارای بیشترین و توده خراسان جنوبی الف با مقدار ۱/۳ دارای کمترین مقدار نسبت به سایر توده‌ها بود. ارزیابی تنوع ژنتیکی در توده های گشنیز با استفاده از شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) و شاخص اطلاعاتی شانون(I) انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به توده لرستان الف با مقادیر ۰/۳۴ و ۰/۵۲ همچنین کمترین متعلق به توده خراسان جنوبی الف با مقادیر ۰/۱۶ و ۰/۲۴ بود(جدول۵).

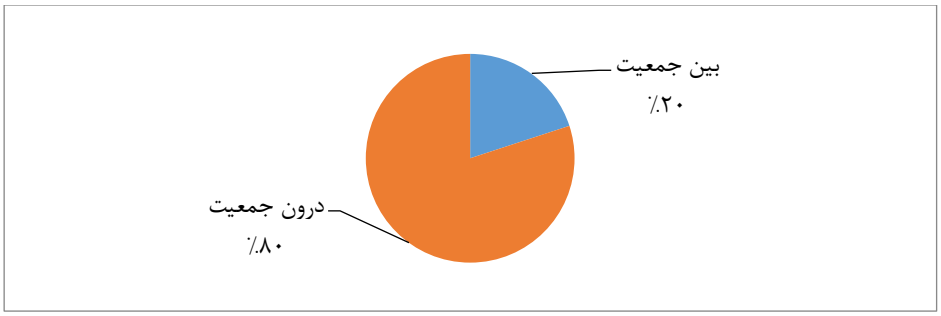
جدول۵: شاخص های تنوع ژنتیکی در ۱۰ جمعیت گشنیز با استفاده از نشانگر SCoT

توده	اندازه جمعیت	درصد چندشکلی	na	ne	ne/na×100	h	I
خراسان جنوبی الف	۵	۳۹/۳۸	۲	۱/۳	۶۵	۰/۱۶	۰/۲۴
یزد الف	۵	۷۰	۲	۱/۵۲	۷۶	۰/۲۹	۰/۴۲
مازندران	۵	۶۹/۳۸	۲	۱/۵۱	۷۵	۰/۲۹	۰/۴۲
لرستان الف	۵	۸۱/۸۸	۲	۱/۶۴	۸۲	۰/۳۴	۰/۵۲
لرستان ب	۵	۶۹/۳۸	۲	۱/۵۴	۷۷	۰/۲۹	۰/۴۳
کرمان	۵	۷۳/۱۲	۲	۱/۵۸	۷۹	۰/۳۱	۰/۴۵
خراسان جنوبی ب	۵	۶۶/۸۸	۲	۱/۵	۷۵	۰/۲۸	۰/۴۰
گلستان	۵	۷۳/۷۵	۲	۱/۵۸	۷۹	۰/۳۲	۰/۴۶
آذربایجان غربی	۵	۶۶/۸۸	۲	۱/۴۹	۷۴	۰/۲۷	۰/۴۰
یزد ب	۵	۵۳/۷۵	۲	۱/۴۱	۷۰	۰/۲۲	۰/۳۳
میانگین	۵	۶۶/۴۴	۲	۱/۵۰	۷۵/۲	۰/۲۷	۰/۴۰

بالاترین و پایین ترین درصد چندشکلی، مربوط به توده‌های لرستان الف و خراسان جنوبی الف با مقادیر ۸۱/۸۸ و ۳۹/۳۸ درصد مشاهده شد(جدول۵). بالا بودن میزان چندشکلی به معنای عدم یکنواختی جمعیت‌ها نسبت به سایر جمعیت‌ها می‌باشد. جهت تعیین تنوع درون و بین جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر SCoT تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۲۰ درصد از تنوع ژنتیکی کل در بین توده‌ها وجود داشت، در حالی که مقدار تنوع ژنتیکی درون توده ها ۸۰ درصد بود(جدول۶).

جدول۶: تجزیه واریانس مولکولی توده های گشنیز به وسیله نشانگر SCoT

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس تخمینی	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۹	۵۶۲/۴۶	۶۲/۴۹	۶۹/۳۷	۲۰
درون جمعیت‌ها	۴۰	۱۱۱۲	۲۷/۸۰	۲۷/۸۰	۸۰
کل	۴۹	۱۶۷۴/۴۶		۳۴/۷۳	۱۰۰



شکل۲: تجزیه واریانس مولکولی توده‌های گشنیز به وسیله نشانگر SCoT

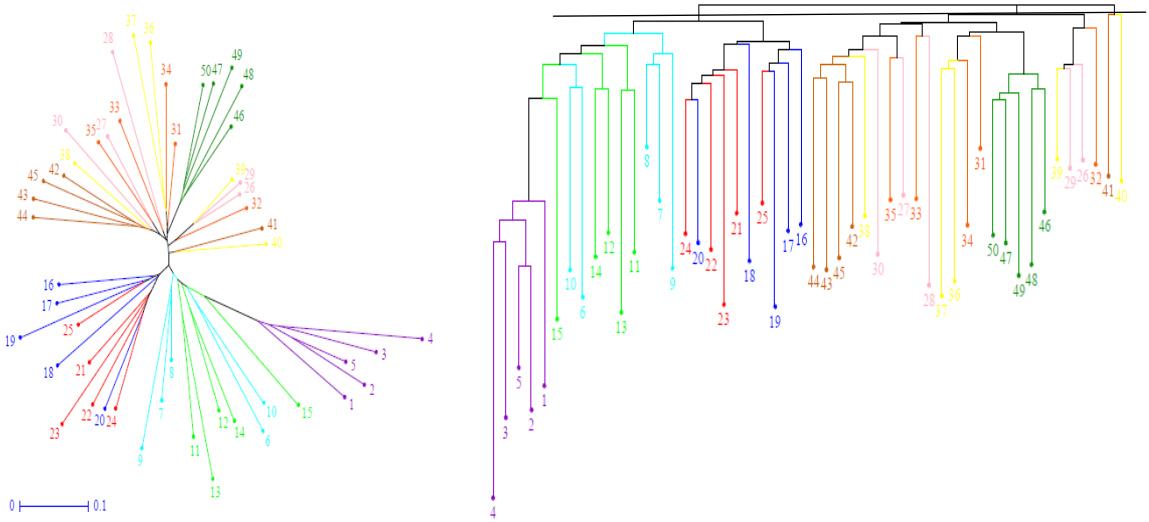
میزان شباهت یا تفاوت در بین توده ها با استفاده از ماتریس فاصله براساس شاخص ژنی نی تعیین شد. هر چه میزان شباهت کمتر باشد، نشان دهنده این است که دو جمعیت از نظر ژنتیکی دارای اختلاف زیادی می باشند، نتایج نشان داد که بیشترین فاصله به ترتیب مربوط به توده های کرمان و آذربایجان غربی، خراسان جنوبی ب و یزد، گلستان و یزد و همچنین کمترین فاصله مربوط به توده های خراسان جنوبی ب و کرمان، گلستان و کرمان، گلستان و خراسان جنوبی ب، آذربایجان غربی و گلستان بود(جدول۷).

جدول ۷: ضرایب تشابه و فاصله بین ۱۰ توده گیاه گشنیز براساس نشانگر SCoT

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	***	۰/۷۵	۰/۸۲	۰/۷۰	۰/۵۹	۰/۶۴	۰/۶۹	۰/۷۳	۰/۷۴	۰/۷۵
[illegible]	۰/۲۷	****	۰/ ۸۸	۰/۸۵	۰/۷۷	۰/۸۶	۰/۸۵	۰/ ۷۸	۰/۸۵	۰/۷۶
[illegible]	۰/۱۹	۰/۱۱	****	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۸۱	۰/۸۳	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۷۹
[illegible]	۰/۳۵	۰/۱۵	۰/۱۵	****	۰/۸۹	۰/۸۴	۰/۸۳	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۸۰
[illegible]	۰/۵۱	۰/ ۴۲	۰/ ۸۲	۰/۱۰	****	۰/۸۲	۰/۸۱	۰/۸۰	۰/۷۶	۰/۷۸
[illegible]	۰/۴۴	۰/۱۴	۰/۲۰	۰/۱۶	۰/۱۹	***	۰/۹۳	۰/۹۱	**۰/۹۷**	۰/۸۳
[illegible]	۰/۳۶	۰/۱۵	۰/ ۸۱	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۰۶	****	۰/۹۴	۰/۸۹	**۰/۹۷**
[illegible]	۰/۳۰	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۲۱	۰/۰۸	۰/۰۵	***	۰/۹۱	**۰/۹۷**
[illegible]	۰/۲۹	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲۰	۰/۲۶	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۰۸	***	۰/۸۲
[illegible]	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۲۲	۰/۲۱	۰/۲۴	۰/۱۷	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۹	***

۱-۳. تجزیه خوشه ای

به منظور گروه بندی ژنوتیپ های گشنیز از روش های مختلفی استفاده شد که در نهایت به دلیل بالا بودن ضریب کوفنتیک و کمترین میانگین خطا روش Neighbor-joining برای خوشه بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. تجزیه خوشه ای ۱۰ توده گشنیز به همراه ۵۰ فرد با ترسیم خط برش، توده ها به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل ۲۵ ژنوتیپ، گروه دوم ۲۳ ژنوتیپ و گروه سوم شامل دو ژنوتیپ بود.

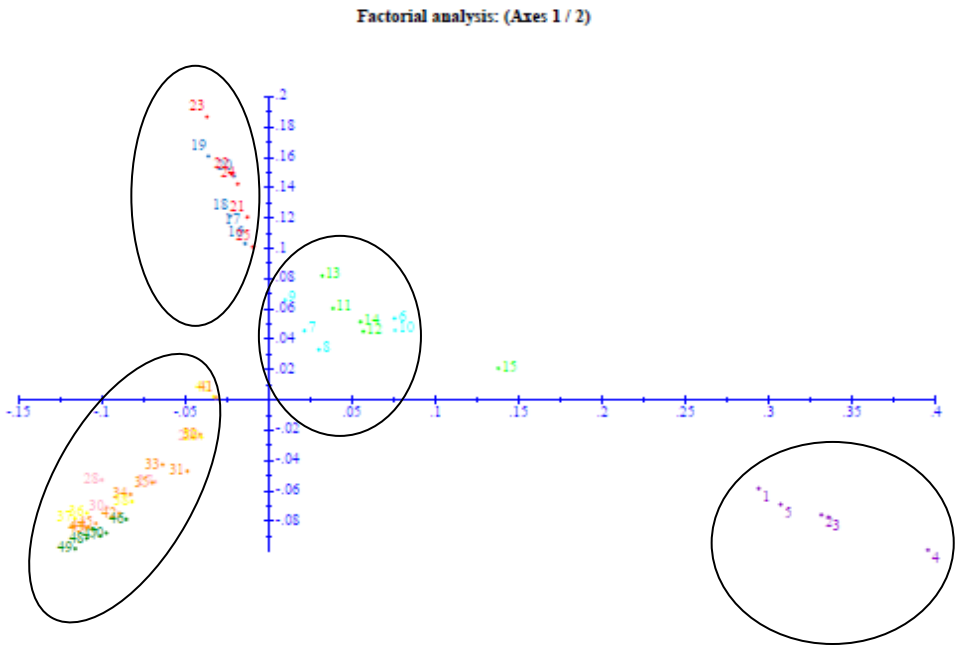


شکل۳: دندروگرام حاصل از آنالیز خوشه ای توده های گیاه گشنیز براساس روش neighbor-joining

(رنگ بنفش= خراسان جنوبی الف، رنگ فیروزه ای= یزد الف، رنگ سبز= مازندران، رنگ آبی لرستان الف، رنگ قرمز= استان لرستان ب، رنگ صورتی= صورتی، رنگ نارنجی= خراسان جنوبی ب، رنگ زرد= گلستان، رنگ قهوه ای= آذربایجان غربی، رنگ سبز زیتونی= یزد ب)

۲-۳. تجزیه به مولفه های اصلی

در بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها یکی از روش های آماری چند متغیره که در کنار تجزیه‌ی خوشه ای استفاده می شود، تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) است. در این روش مانند روش تجزیه خوشه ای گروه بندی ژنوتیپ‌ها یا توده‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی انجام می شود. در این پژوهش تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های مولکولی بر اساس ضریب فاصله جاکارد انجام گردید. پراکنش ژنوتیپ های مورد بررسی بر اساس دو مولفه اول در (شکل۴) قابل مشاهده است. همچنین در تجزیه به مولفه های اصلی نیز با تقسیم ژنوتیپ های مورد مطالعه به ۴ گروه،گروه بندی تجزیه خوشه ای مورد تایید قرار گرفت.



شکل۴: نمودار دوبعدی تجزیه PCOA در ۵۰ ژنوتیپ گشنیز

(رنگ بنفش= خراسان جنوبی الف، رنگ فیروزه ای= یزد الف، رنگ سبز= مازندران، رنگ آبی لرستان الف، رنگ قرمز= استان لرستان ب، رنگ صورتی= صورتی، رنگ نارنجی= خراسان جنوبی ب، رنگ زرد= گلستان، رنگ قهوه ای= آذربایجان غربی، رنگ سبز زیتونی= یزد ب)

۴.نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنوع ژنتیکی معنی داری در بین توده های بومی گشنیز وجود دارد. همچنین سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در درون توده های بومی گشنیز مشاهده شد که نوید بخش امکان گزینش درون توده ای همراه با گزینش بین توده ای است.

مراجع

1. Abdelkader M.A., Gendy A.S., Bardisi I.A., Elakkad H.A., 2018, The impact of NPK fertilization level and Lithovit concentration on productivity and active ingredients of *Coriandrum sativum* plants, Sciences, 8, 827-836.
2. Altıntaş, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and Özkan, H., 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, *127*(1), pp.9-14.
3. Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Kumar, S. and Tandon, P., 2013. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of Dendrobium nobile Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene*, *529*(1), pp.21-26.
4. Collard, B.C. and Mackill, D.J., 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant molecular biology reporter*, *27*(1), p.86.
5. Diederichsen, A. 1996. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 3: Coriander *(Coriandrum sativum)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
6. DIRECTORATE OF WHEAT RESEARCH (Indian Council of Agricultural Research) Karnal-132001, India, 2014.
7. Dyulgerov, N. & Dyulgerova, B. (2013). Genetic divergence among accesions of coriander (Coriandrum sativum L.). Agricultural science and technology, 5(1), 13 -15.

8. Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. and Frankham, R. 1996. Introduction to quantitative genetics (4th edn). Trends Genet. 12: 280.
9. Ghanbari, K. H., Shojaeiyan, K., Nasrollah Nezhad, A. & Fahim, S. (2011). Special Issue on of the twelfth Iranian Genetics Congress, 1-5.
10. mendelian inheritance, chromosomal location, and dynamics," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 24, pp. 8014–8018, 1984.
11. Indian Institute of Pulse Resaecrh 25 Years of Pulses Research at IIPR, 2009. India.
12. Khodadadi, M., Dehghani, H., Javaran, M.J. and Christopher, J.T. 2016. Seed yield, fatty and essential oils content genetics in coriander. Ind. Crop. Prod. 94: 72-81.
13. M. A. Saghai-Maroof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 24, pp. 8014–8018, 1984.
14. Msaada K K, Hosni M B, Taarit O, Ouchikh and Marzouk B. 2009. Variations in essential oil composition during maturation of coriander (Coriandrum sativum L.). fruits. Journal Food Biochemistry 33: 603–12.
15. Pareek, N., Jakhar, M.L. & Malik, C.P. (2011). Analysis of genetic diversity in coriander (*Coriandrum sativum L.*) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1 (4), 206-215.
16. Roldàn-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. and De Loose, M., 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). Molecular Breeding, 6(2), pp.125-134.