فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲٤، شمارهٔ ٤ صفحهٔ ٤٢٧-٤١٤ (۱۳۸۷)

بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم زیره [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

سمیه دهقان کوهستانی[۱]، امین باقی‌زاده [۲*]، غلامعلی رنجبر[۳] و نادعلی بابائیان جلودار[٤]

۱- کارشناس ارشد، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، پست الکترونیک: sbiotech2008@gmail.com
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
٤- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۷

چکیده

Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch. یک گیاه دارویی متعلق به خانواده Apiaceae (جعفری) است که به نام زیره کوهی یا زیره پارسی معروف است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم زیره استان کرمان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت. میوه‌های زیره پارسی از ٤۳ رویشگاه مختلف در استان کرمان جمع‌آوری شد. استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته از میوه انجام شد. از ۲۷ آغازگر تصادفی که در واکنش PCR استفاده شد، تعداد ۱۹ آغازگر که نوارهای بهتری تولید کردند، جهت آنالیز انتخاب شدند. از این تعداد آغازگر، ٤٤٦ قطعه چند شکل بدست آمد و امتیازدهی شد. ماتریس صفر و یک حاصل توسط نرم‌افزار NTSYS-pc، با استفاده از ضریب تشابه دایس به ماتریس فاصله تبدیل شد و سپس با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA) دندروگرام مربوطه رسم شد. بر این اساس ٤۳ جمعیت مورد بررسی در ۷ گروه جایابی شدند. کلاستر حاصله تا حدودی با تنوع جغرافیایی همخوانی داشت. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نتایج تجزیه کلاستر تقریباً مشابه بود. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از تکنیک RAPD برای ارزیابی تنوع مولکولی بین این توده‌ها مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.، تنوع ژنتیکی، RAPD، ژرم‌پلاسم، کرمان.

مقدمه

زیره کوهی یا زیره پارسی (*Bunium persicum* [Boiss] B. Fedtsch) گیاهی علفی، دولپه، چندساله و خود گرده افشان با گلهایی هرمافرودیت است که در تیره چتریان (Apiaceae) قرار دارد. از نظر سیتولوژیکی این گیاه دیپلوئید (۲n=۲x=۱٤) می‌باشد (Vasileva *et al.*, 1985؛ Sheidai & Ahmadian, 1996). محصول اقتصادی این گیاه، دانه (میوه شیزوکارپ) است که جهت مصارف دارویی و ادویه‌ای استفاده می‌شود (خسروی، ۱۳۷۲). زیره پارسی دارای ارزش صادراتی بالایی است و سالیانه مبلغ قابل توجهی ارز وارد کشورمان می‌کند. در برنامه‌ریزی کشت چندساله، برای این نوع زیره عملکرد

کمی و کیفی و همچنین اقتصادی بالاتری نسبت به سایر زیره‌ها پیش‌بینی شده است (عسکرزاده و همکاران، ۱۳۸٤). از مهمترین خصوصیات دارویی گیاه می‌توان به اثر افزایش ترشح شیر و اشتهاآوری آن اشاره کرد، همچنین دارای خاصیت ضد نفخ، هضم کننده، رفع اسپاسم‌های معده و بی‌اشتهایی، ضد تشنج و ضد آسم بوده و نیز در جهت رفع اختلالات سیستمهای گوارشی، تناسلی و دفع ادرار استفاده می‌شود (خسروی، ۱۳۷۲). اسانس برخی از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبهای فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند (بامداد و همکاران، ۱۳۸٤). کومین‌آلدهید موجود در اسانس زیره پارسی، مونوترپن اکسیژن‌داری است که به‌دلیل داشتن ساختار فنلی و گروه فعال هیدروکسی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. ترکیبهای ترپنوئیدی موجود در اسانس با گونه‌های فعال اکسیژن ترکیب شده و آنها را غیرفعال می‌کنند و بدین طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند (Dudareva *et al.*, 2004). اثر ضد میکروبی این گیاه (Syed & Hanif, 1986) و ضد قارچی (Sardari *et al.*, 1998) و نیز اثر رقابتی آن روی گیرنده‌های موسکارین که یک نوع از گیرنده‌های استیل کولین دخیل در دستگاه عصبی می‌باشد، به اثبات رسیده است (Boskabady & Moghadas, 2004). میوه‌های زیره پارسی حاوی اسانس هستند و عمده‌ترین ترکیبهای تشکیل‌دهنده آن شامل: گاما-ترپینن، کومین‌آلدهید، لیمونن، پارا-سیمن و بتا-پینن می‌باشند. از آزمایشهایی که بر روی ترکیبهای اسانس زیره پارسی صورت گرفته است، می‌توان به آزمایشهای جداگانه دانشمندان بر روی بذر *B. persicum* از کشورهای هند (Tappa *et al.*, 1991)، پاکستان (Karim *et al.*, 1977)، تاجیکستان (Baser *et al.*, 1997) و ایران (احمدپور، ۱۳۷۸) اشاره کرد. مقایسه نتایج بدست آمده از آنالیز اسانس *B. persicum* در کشورهای مختلف اشاره شده و برخی تحقیقات دیگر، نشان می‌دهد که نوع و میزان ترکیبهای موجود در اسانس زیره‌های کشورهای مختلف با یکدیگر تفاوت دارد. تفاوتهای یادشده که در درون و بین نمونه‌های مورد بررسی دیده می‌شود، به دلیل اثرهای محیطی و ژنتیکی متفاوت ایجاد شده‌است. این گیاه بومی خاورمیانه به‌ویژه جنوب شرقی ایران است و به صورت وحشی در استانهای مختلف ایران ازجمله استان کرمان، خراسان، سمنان و یزد می‌روید (مظفریان، ۱۳۸٦؛ پورسیدی، ۱۳۷٤). تعیین و تأیید هویت گیاه، اولین گام در مطالعه یا استفاده از آن گیاه است. امروزه روشهای زیست‌شناسی مولکولی در تشخیص گیاهان کاربرد فراوانی پیدا کرده است. تشخیص گیاهان از یک گونه یا واریته خاص، از طریق تفاوتهای موجود در مشخصه‌های ژنتیکی آنها با سایر گیاهان امکان‌پذیر است. بررسی تنوع ژنتیکی پیش شرط اصلی تشخیص گیاهان از طریق روشهای مولکولی است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). روشهای مولکولی امکانات ویژه‌ای را برای ارزیابی تنوع حیاتی ارائه می‌دهند و می‌توانند یک روش کلیدی مناسب برای ایجاد راهبردهای حفاظتی ژرم‌پلاسم باشند (Paterson *et al.*, 1995). تنوع ژنتیکی پایه و اساس همه برنامه‌های اصلاحی است و آگاهی از فاصله ژنتیکی گیاهان برای اهداف اصلاحی مهم می‌باشد. نشانگرهای مولکولی امروزه به‌طور گسترده جهت تعیین تنوع ژنتیکی بکار می‌روند. در بین نشانگرهای مولکولی به نظر می‌رسد که نشانگر RAPD که اساس آن تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای تصادفی با استفاده از روش PCR

می‌باشد، توانایی قابل توجهی برای بررسی تنوع ژنتیکی داشته و حداقل آنکه نیاز کمتری به تکنولوژی پیشرفته، میزان کار و هزینه در مقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی دارد (Kumar *et al*., 1994؛ Ipek & Simon, 2003). در زمینه کشت بافت زیره پارسی ولیزاده و همکاران (۱۳۸۵) اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی را بر میزان القاء کالوس و باززایی زیره پارسی بررسی و بهترین محیط جهت جوانه‌زنی بذر را محیط کشت B5 (گامبورگ) بدون هورمون گزارش کردند. در پژوهشی دیگر از ریزنمونه محور جنینی برای باززایی زیره پارسی استفاده شد که بهترین تیمار از لحاظ میانگین تعداد ساقه باززایی شده، تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ mg/l NAA (نفتالین استیک اسید) و ٤ mg/l Kin (کینتین) بود (ولیزاده و همکاران، ۱۳۸۵). در یک تحقیق مراحل فنولوژی، عملکرد و اجزاء عملکرد و وضعیت مورفولوژی توده‌های زیره پارسی بررسی شد که در برخی صفات ازجمله طول بذر، عملکرد بذر در واحد سطح (متر مربع)، وزن هزاردانه، عملکرد اسانس، جوانه‌زدن اکوتیپهای مختلف و تعداد بوته‌های مستقر شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت. اما از نظر برخی صفات آناتومیک و فنولوژیک، بیوماس گیاه و عمق تشکیل غده، اختلاف معنی‌داری بین توده‌ها مشاهده نشد (عسکرزاده و همکاران، ١٣٨٤). در مطالعه‌ای دیگر، تنوع جمعیتهای اهلی زیره سیاه توسط مارکرهای مورفولوژیکی بررسی شد و هتروزیگوسیتی زیادی در داخل جمعیتها از لحاظ عملکرد بذر و وزن غده مشاهده شد (Kapila *et al*.,1997). نادرنژاد و پورسیدی (۱۳۸۲) تنوع زیاد درون گونه‌ای را برای *B. persicum*، از نظر مورفولوژیکی و کاریوتیپی گزارش کردند. Majeed (۲۰۰۵)، تنوع ژنتیکی پنج جمعیت زیره پارسی پاکستان را با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و RAPD بررسی کرد و تنوع زیادی را در صفات مورفولوژیکی و عملکرد مشاهده نمود. به‌طوری‌که از ٤٠ پرایمر آزمایش شده این تحقیق، ٣٦ پرایمر تعداد ١٦٨ نوار پلی‌مورف تولید کردند. کلاستربندی پنج جمعیت را به دو گروه تقسیم کرد. بیشتر نمونه‌های متعلق به یک محل در یک کلاستر قرار گرفتند و خیلی به هم نزدیک بودند. پژمان مهر و همکاران (١٣٨٦) تنوع ژنتیکی ٢٠ اکوتیپ *B. persicum* را با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP و RAPD بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که تنوع بالایی برای *B. persicum* بومی ایران حتی در اکوتیپهای نزدیک به هم (از نظر جغرافیایی) وجود دارد. در یک تحقیق، تنوع ژنتیکی جمعیتهای زیره پارسی ایران، هند، افغانستان و اروپا با استفاده از مارکر مولکولی RAPD بررسی شد. از ٢١ آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ١٥ توده زیره پارسی ایران استفاده شد که از ١٠٨ قطعه تکثیر شده، ٤٥ باند پلی‌مورف بودند. دامنه شباهت بین نمونه‌ها از ٠/٦٦ تا ٠/٩٦ متغیر بود. بیشترین شباهت بین جفت نمونه‌های استان کرمان (بردسیر وکوههای جوپار) و کمترین شباهت بین نمونه‌های جنگل خواجه خراسان و سیاه‌کوه استان مرکزی گزارش شد. نتایج آنالیز مولکولی با فواصل جغرافیایی توده ها منطبق بود و در شباهت ژنتیکی ٨٥٪، نمونه‌های هر استان در شاخه‌های مجزایی قرار گرفته بودند (هاشمی، ١٣٨٦؛ هاشمی و همکاران، ١٣٨٧). هدف اصلی این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای بومی زیره پارسی استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و فراهم آوردن اطلاعات ژنتیکی جهت

برنامه‌های اصلاحی بود که در مورد بیشتر این جمعیتها قبلاً مطالعه‌ای صورت نگرفته و علاوه بر این از پرایمرهای متفاوتی در این تحقیق استفاده شده است.

مواد و روشها

الف) مواد گیاهی

بذر (در واقع میوه) زیره پارسی از ٤٣ رویشگاه مختلف در استان کرمان (به شرح جدول ۱) توسط نویسندگان و به راهنمایی مسئول هرباریوم دانشگاه شهید باهنر کرمان، جمع‌آوری شد.

ب) استخراج DNA

بذر زیره پارسی دارای خواب (dormancy) است و برای جوانه‌زدن نیاز به یک دوره طولانی سرمادهی دارد (Sharifi & Pouresmael, 2006). بنابراین جهت صرفه‌جویی در وقت، به جای برگ که ماده گیاهی آغازین در بیشتر روش‌های استخراجی است، از بذر یا در حقیقت میوه این گیاه برای استخراج DNA استفاده شد. علاوه بر صرفه‌جویی در وقت و هزینه، استفاده از بذر به عنوان ماده گیاهی آغازین در استخراج DNA زمانی که با تعداد زیادی نمونه سرو کار داریم، بسیار مفید است و حجم کار را کاهش می‌دهد. اما میوه‌های زیره پارسی دارای مقدار زیادی اسانس و متابولیتهای ثانویه می‌باشند که استخراج DNA از آنها را با مشکل مواجه می‌کند. چندین پروتوکل استخراج DNA جهت جداسازی DNA مطلوب از میوه زیره پارسی آزمایش شد و در نهایت از روش تغییر یافته‌ای بر پایه CTAB (Krizman *et al*., 2006) جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد. از آنجایی که هدف در این تحقیق بررسی تفاوتهای ژنتیکی بین اکوتیپهای زیره پارسی بود، بنابراین میوه‌های مربوط به هر اکوتیپ جداگانه مخلوط شد و سپس به‌طور کاملاً تصادفی حدود ۳۰ عدد میوه (معادل g ۰/۰۸-۰/۰٦) از هر نمونه که نماینده آن اکوتیپ بود، جهت استخراج DNA استفاده شد. روش استخراج DNA به شرح ذیل بود:

g ۰/۰۸-۰/۰٦ از میوه زیره پارسی (حدوداً ۳۰ عدد میوه) در داخل هاون به کمک ازت مایع به‌صورت پودر در آورده شد، بلافاصله ml ۱/۵ از بافر استخراج [Tris-HCl ۱۰۰mM با pH=۸، NaCl ۲M، ۲۰mM EDTA با pH=۸، ۲ درصد (w/v) CTAB، ۲ درصد (w/v) PVP] به همراه β-mercaptoethanol ۲۰µl به آن اضافه شد و بخوبی مخلوط شد. مخلوط به‌طور مساوی به دو تیوپ اپندروف ۱/۵ml انتقال داده شد. مخلوط داخل تیوپ‌ها با وارونه کردن بخوبی مخلوط شد، سپس تیوپ‌ها در بن ماری ۵۵ ̊C به مدت یک شب قرار داده شد. در مرحله بعد تیوپ‌ها در g ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده شد. هم حجم مایع رویی Chloroform-Isoamylalcohol [٤ درصد (v/v) Isoamylalcohol در Chloroform] اضافه شد و بخوبی ورتکس شد. سپس در g ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد، در این مرحله سه فاز تشکیل شد که مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده شد. این مرحله ۵-٤ بار با توجه به میزان آلودگی تکرار شد. هم حجم مایع رویی Isopropanol اضافه شد و به‌وسیله وارونه کردن مخلوط شد. آنگاه در ۲۵ ̊C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس در g ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت با ml ۱ از بافر شستشو [Ammonium acetate ۱۵mM در Ethanol ۷۵ درصد

[(v/v)] شسته شد. این مرحله دو بار تکرار شد. سپس در ۹۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت در دمای اتاق خشک شد. آنگاه پلت در ۱۰۰µl از بافر TE [Tris-HCl ۱۰mM با pH=۸ و EDTA ۱mM با pH=۸] حل شد، در صورت وجود آلودگی، در ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شده و مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده می‌شد.

ج) تعیین کمیت و کیفیت DNA

جهت مشاهده چشمی وضعیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه‌های DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV در دستگاه Gel Documentation مشاهده شدند. در این روش شکستگی DNA در ژل آگارز قابل بررسی است. DNA شکسته شده بر روی ژل آگارز به‌صورت لکه یا اسمیر و یا به‌صورت قطعه‌هایی با وزن مولکولی کم مشاهده می‌شود. کیفیت و کمیت DNA در انجام PCR اهمیت دارد. ناخالصی و وجود مواد باقیمانده از مرحله استخراج بر عمل و دقت این واکنش اثر می‌گذارد، از این رو از روش اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استفاده شد. برای انجام این کار از دستگاه اسپکتروفتومتر Carry50 ساخت کمپانی Varian استفاده شد. بدین‌ترتیب نمونه‌های با OD 260/280=۱/۸-۲ که خلوص خوبی داشتند، انتخاب شدند. نسبتهای کمتر از ۱/۸ نشان‌دهنده این است که نمونه‌ها از لحاظ پروتئین، فنل و یا دیگر جذب کننده‌های UV ناخالصی دارند و نسبتهای بالاتراز ۲ نشان‌دهنده وجود RNA در محلول است. بنابراین نمونه‌های نامناسب دور ریخته شد و دوباره استخراج DNA در این نمونه‌ها صورت گرفت. برای تعیین غلظت DNA از رابطه ذیر استفاده شد:

غلظت DNA (ng/µl) = $OD_{260(nm)}$ × عکس رقت × ۵۰

د) دستورالعمل RAPD

برای انجام PCR، از دستورالعمل Wanntorp و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. تعداد ۲۷ آغازگر تصادفی محصول شرکت سیناژن در این تحقیق استفاده شد. آنزیم Taq DNA Polymerase، مخلوط $dNTP_s$ به اضافه PCR buffer (۱۰ برابر غلظت) و محلول $MgCl_2$ از شرکت سیناژن تهیه شدند. مخلوط PCR ۲۵µl محتوی: ۱µl از DNA الگوی تهیه شده با غلظت ۵۰ng/µl، ۲µl $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM، ۲/۵µl dNTP با غلظت ۲/۵mM، ۰/۳µl Taq DNA polymerase با غلظت ۵ unit/µl، ۲ µl پرایمر با غلظت ۲ µM، ۲/۵ µl PCR Buffer دارای غلظت ۱۰برابر [۵۰۰ mM KCl و Tris-HCl (pH=۸/۴)] و ۱۴/۷µl آب دو بار تقطیر استریل بود. ترموسایکلرهای مورد استفاده در این تحقیق مدل Mastercycler در نوع ساده و گرادیانت ساخت کمپانی Eppendorf بودند. ابتدا دمای اتصال بهینه هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادیانت (شیب دمایی) بدست آمد. مشاهده شد که این دما به‌طور متوسط ۷-۵ °C کمتر از دمای ذوب (Melting Temperature) هر آغازگر (جدول ۲) است. برنامه دمایی PCR برای همه آغازگرها مانند هم بود و بخش متغیر آن دمای اتصال آغازگر به DNA تک رشته بود. تکثیر بدین صورت انجام گرفت: ۱- واسرشت آغازین DNA در ۹۴ °C به‌مدت ۴ دقیقه (یک سیکل)، ۲- ۴۰ سیکل شامل: تک رشته‌ای شدن DNA در دمای ۹۴ °C

به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر به‌مدت ٤۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۳- تکمیل بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۸ دقیقه (یک سیکل). پس از انجام برنامه در دستگاه PCR، نمونه‌ها بلافاصله خارج شده و تا زمان قرار گرفتن روی ژل جهت بررسی، در دمای ۲۰°C- حداکثر به‌مدت یک ماه نگهداری شدند. به منظور بررسی تکرارپذیری نوارهای RAPD، عمل PCR تحت شرایط یکسان، به‌طور تصادفی بر روی برخی از DNA های مورد نظر در برخی از پرایمرها دوباره انجام شد که تکرارپذیری باندهای واضح تأییدشد.

ه) الکتروفورز فراورده‌های تکثیر شده

قطعات PCR شده برای هر پرایمر روی ژل آگارز ۱/۲درصد (w/v) در بافر TBE(1X) [Tris، Boric acid و ۰/۵M EDTA با pH=۸] جدا شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه با جریان ۸۵ ولت الکتروفورز شدند. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق از نوع الکتروفورز افقی مدل E 132 از شرکت Consort بلژیک بود. ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) به‌مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. آنگاه ژل درون دستگاه Gel Documentaion مدل Syngene تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل با فرمت‌های مختلف توسط نرم‌افزار Genesnap (Ver 6.08.04) عکس تهیه شد (شکل ۱). نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰bp) محصول شرکت Fermentas به میزان ۲ µl در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت.

و) آنالیز داده‌های RAPD

از ۲۷ آغازگر تصادفی تعداد ۱۹ آغازگر که باندهی بهتری داشتند، جهت آنالیز انتخاب شدند (جدول ۲). برای تجزیه آماری داده‌ها، در ابتدا باندهای واضح را مشخص کرده و با توجه به اندازه نشانگر استاندارد ۱۰۰bp اندازه هر کدام از باندهای واضح در هر چاهک را براساس طول و وزن مولکولی استاندارد مشخص شد. این عمل توسط نرم‌افزار Genetools در تمام ژل‌های مربوط به ۱۹ آغازگر انجام پذیرفت. بدین‌ترتیب اندازه باندهای مشاهده شده در ژل تعیین شد و هر کدام از باندهای چند شکل در هر آغازگر به‌عنوان یک متغیر مستقل در نظر گرفته شد. حضور یا عدم حضور هر کدام از باندهای مشاهده شده برای هر یک از ۱۹ آغازگر به‌ترتیب با اعداد ۱ و صفر امتیازدهی شدند و سپس در نرم‌افزار Excel یک ماتریس از اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. سپس داده‌ها به NTedit، بخش ورودی نرم‌افزار NTSYS انتقال داده شد. ماتریس فاصله با استفاده از ضریب تشابه دایس به کمک نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) حاصل شد، تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA)، انجام شد و دندروگرام مربوطه رسم شد. به منظور بررسی همبستگی بین دندروگرام و ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد.همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام گرفت و پلات دو بعدی و سه بعدی حاصل از آن رسم شد.

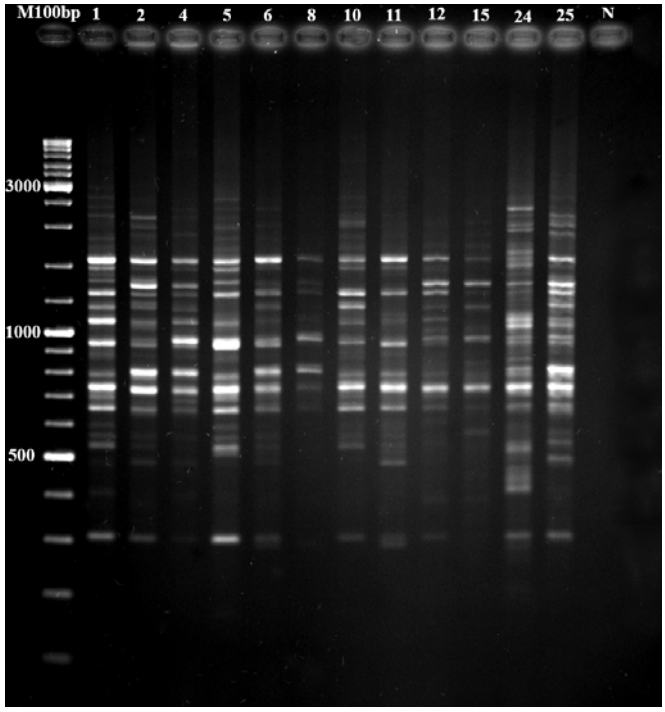
نتایج

مجموعاً ٤۵۲ قطعه DNA توسط ۱۹ آغازگر انتخاب شده برای آنالیز، تکثیر شد که از بین آنها ٦ قطعه در بین تمام ٤۳ توده یک شکل بودند و باقیمانده آنها (٤٤٦ قطعه) چند

شکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چند شکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. نوارهای مونومورف شامل: (53) ۹۴۲، (54) ۶۹۰، (54) ۷۵۴، (54) ۸۲۹، (379) ۶۶۸، (379) ۹۵۰ بودند (اعداد داخل و بیرون پرانتز به‌ترتیب نشان‌دهنده نام آغازگرها و اندازه باندها هستند). تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۳۳ عدد و مربوط به آغازگر ۶۶ و کمترین تعداد ۱۷ عدد و مربوط به آغازگر ۶۳ بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۳۰۰۰-۲۰۰ جفت باز تخمین زده شد. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت بین توده‌های حوتکن- بزنجان (۰/۲۰) و توده‌های ماهان- سیرجان (۰/۲۱) و بیشترین شباهت بین توده‌های کهنوج- راین (۰/۷۷) و راین- دوساری (۰/۷۷) می‌باشد. دامنه وسیع تشابه (۰/۷۷-۰/۲۰) نشان‌دهنده کارایی RAPD در ارزیابی تنوع مولکولی، نشان دادن اختلافات بین جمعیتهای مورد مطالعه و گروه‌بندی آنهاست. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر (شکل ۲) در سطح تشابه (۰/۴۳) ۷ کلاس را نشان می‌دهد؛ کلاس ۱ شامل توده جیرفت، محمدآباد، نرماشیر، کهنوج، راین، دوساری، قلعه گنج، رابر، فهرج، جرجافک، بی‌بی گرامیه، خنامان، گزک، ساردوئیه، دلیجان، لاله‌زار، دره‌در، بروات، خبر، چاه‌کن، رودبار، اسلام‌آباد، درب مزار، فاریاب، سکنج، دلفارد، بی‌بی حیات، قناتغستان، بم و دهبکری می‌باشد که خود این کلاس شامل دو زیر کلاس است. زیر کلاس ۱ شامل همه توده‌های کلاس ۱ به غیر از توده دهبکری و زیر کلاس ۲ مربوط به توده دهبکری است. زیر کلاس ۱ که بیشتر توده‌های مورد بررسی در آن قرار دارند خود دارای انشعابات فرعی زیادی است. کلاس ۲ شامل توده بزنجان، بافت و راور، کلاس ۳ شامل توده سیرجان، کیسکان، بیدخان و رودین، کلاس ٤ شامل توده سرچشمه، کلاس ۵ شامل توده عنبرآباد، گوغر و حوتکن، کلاس ٦ شامل توده جوپار و کلاس ۷ شامل توده ماهان می‌باشد. همه توده‌های جمع‌آوری شده از مناطق مربوط به شهرستان‌های بم، جیرفت و کهنوج، بجز عنبرآباد جیرفت، در گروه یک جای داشتند که این سه شهر از لحاظ اقلیم، هر سه اقلیم بیابانی گرم داشتند. بیشتر توده‌ها در کلاس شماره ۱ متمرکز بودند که تنوع مولکولی اکثر این توده‌ها تا حد زیادی منطبق بر تنوع جغرافیایی بود. اما مواردی نیز وجود داشت که از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کردند. به عنوان مثال دو توده جوپار و ماهان گرچه از نظر جغرافیایی نزدیک به یکدیگرند اما از لحاظ مولکولی در دو کلاس جداگانه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که حتی میان توده‌های نزدیک به هم از لحاظ جغرافیایی تنوع قابل توجهی وجود دارد. مقدار ضریب همبستگی (r) که برابر با ۰/۸۷ بود، نشان داد که دندروگرام بدست‌آمده و ماتریس تشابه با یکدیگر همبستگی خوبی دارند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی که در شکلهای ۳ و ٤ آمده است، با نتایج مربوط به تجزیه کلاستر تا حد زیادی همخوانی داشت، البته در مورد برخی از توده‌ها تفاوتهایی وجود داشت. در پلات دوبعدی ۱۰ کلاس دیده می‌شود که بیشتر توده‌ها در کلاس ۱ تجمع یافته‌اند که خود به ٤ زیر کلاس تقسیم شده که در شکل آمده است. در پلات دو بعدی نیز توده‌های ماهان، جوپار و سرچشمه مشابه دندروگرام به‌تنهایی در گروههای جداگانه قرار گرفته‌اند. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشتند، به‌ترتیب ۹/۷۳، ٦/۷۲ و ٦/۰۵ درصد از میزان کل تنوع را کنترل می‌کردند.

جدول ۱- کد و منطقه جغرافیایی توده‌های جمع‌آوری شده زیره پارسی از استان کرمان

کد	منطقه جغرافیایی	کد	منطقه جغرافیایی	کد	منطقه جغرافیایی	کد	منطقه جغرافیایی	کد	منطقه جغرافیایی
۱	جیرفت	۱۰	قلعه گنج	۱۹	بافت	۲۸	ماهان	۳۷	فاریاب
۲	محمدآباد	۱۱	دوساری	۲۰	گوغر	۲۹	خبر	۳۸	بم
۳	دهبکری	۱۲	فهرج	۲۱	حوتکن	۳۰	سیرجان	۳۹	سکنج
٤	نرماشیر	۱۳	لاله‌زار	۲۲	راور	۳۱	چاه کن	٤۰	رودین
٥	کهنوج	۱٤	سرچشمه	۲۳	دره در	۳۲	رودبار	٤۱	دلفارد
٦	راین	۱٥	بروات	۲٤	جرجافک	۳۳	کیسکان	٤۲	بی‌بی حیات
۷	ساردوئیه	۱٦	عنبرآباد	۲٥	بی‌بی گرامیه	۳٤	اسلام آباد	٤۳	قناتغستان
۸	دلیجان	۱۷	بزنجان	۲٦	خنامان	۳٥	درب مزار		
۹	رابر	۱۸	جوپار	۲۷	گزک	۳٦	بیدخان		

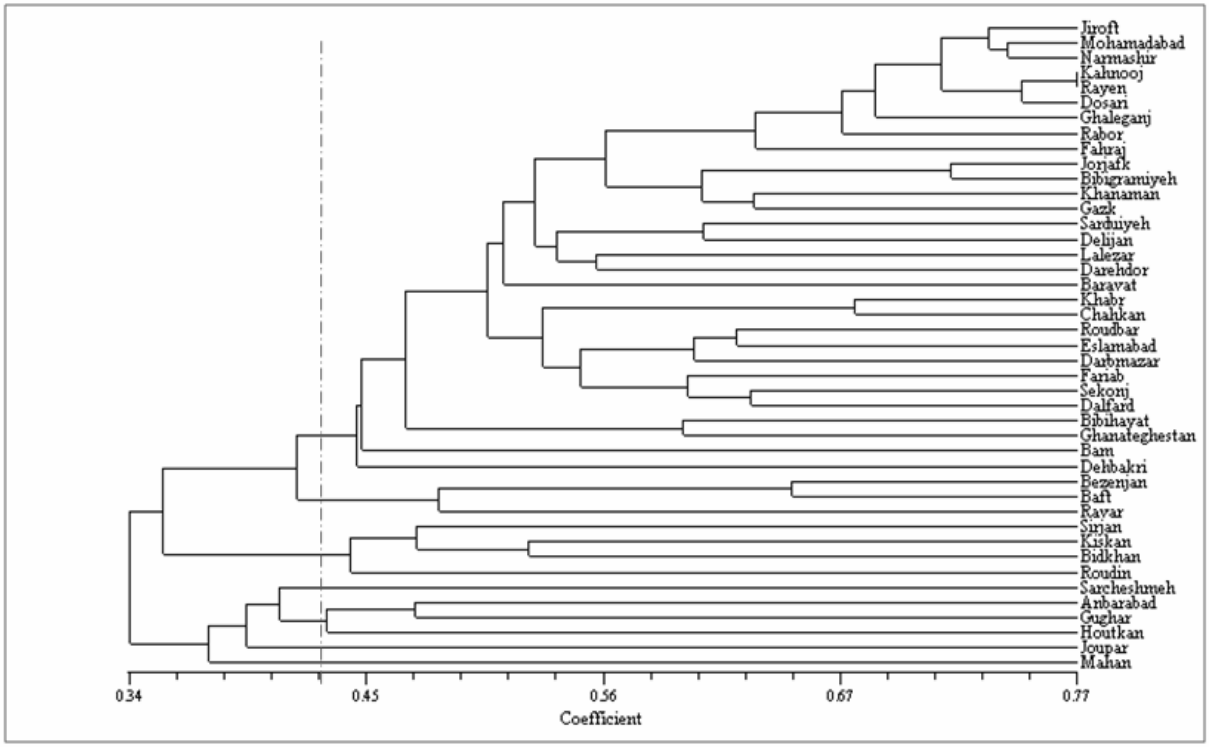


شکل ۱- مشاهده نوارهای چند شکلی با نشانگر ۵۳ در تعدادی از توده‌های بومی زیره پارسی پس از الکتروفورز

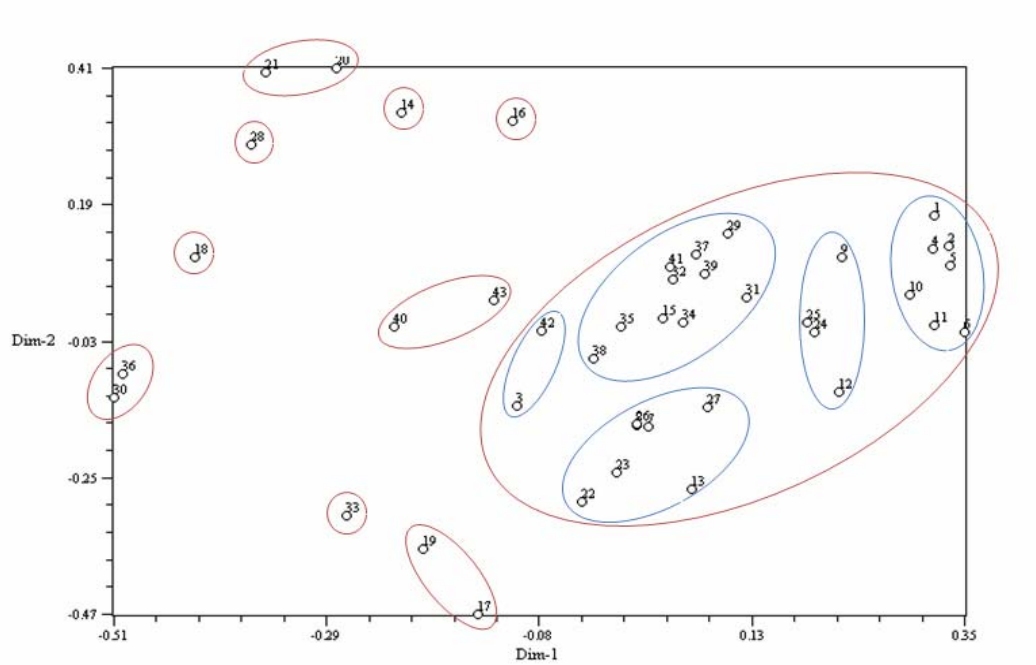
(اعداد چاهک معرف مناطق جمع‌آوری توده‌های زیره پارسی به شرح جدول ۱، N کنترل منفی و M100bp معرف Ladder می‌باشد)

جدول ۲- نام، توالی و دمای ذوب ۱۹ آغازگر RAPD انتخاب شده جهت آنالیز

نام آغازگر	توالی آغازگر (5´-3´)	دمای ذوب (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر (5´-3´)	دمای ذوب (°C)
75 CinnaGen	GAGGTCCAGA	۵۰/۷۵	53 CinnaGen	CTCCCTGAGC	۵۳/۸۸
376 CinnaGen	CAGGACATCG	۵۰/۴۷	54 CinnaGen	GTCCCAGAGC	۵۴/۵۰
377 CinnaGen	GACGGAAGAG	۴۹/۷۳	62 CinnaGen	TTCCCCGTCG	۵۸/۱۷
379 CinnaGen	GGGCTAGGGT	۵۶/۰۳	63 CinnaGen	TTCCCCGCCC	۶۳/۲۵
391 CinnaGen	GCGAACCTCG	۵۶/۷۵	66 CinnaGen	GAGGGCGTGA	۵۸/۱۶
392 CinnaGen	CCTGGTGGTT	۵۳/۱۹	69 CinnaGen	GAGGGCAAGA	۵۲/۸۱
395 CinnaGen	TCACTTGAGG	۴۷/۵۶	70 CinnaGen	GGGCACGCGA	۶۵/۰۴
396 CinnaGen	GAATGCGAGG	۵۱/۸۱	71 CinnaGen	GAGGGCGAGG	۵۹/۰۶
399 CinnaGen	TTGCTGGGCG	۶۰/۶۶	72 CinnaGen	GAGCACGGGA	۵۸/۱۶
74 CinnaGen	GAGCACCTGA	۵۲/۹۱			

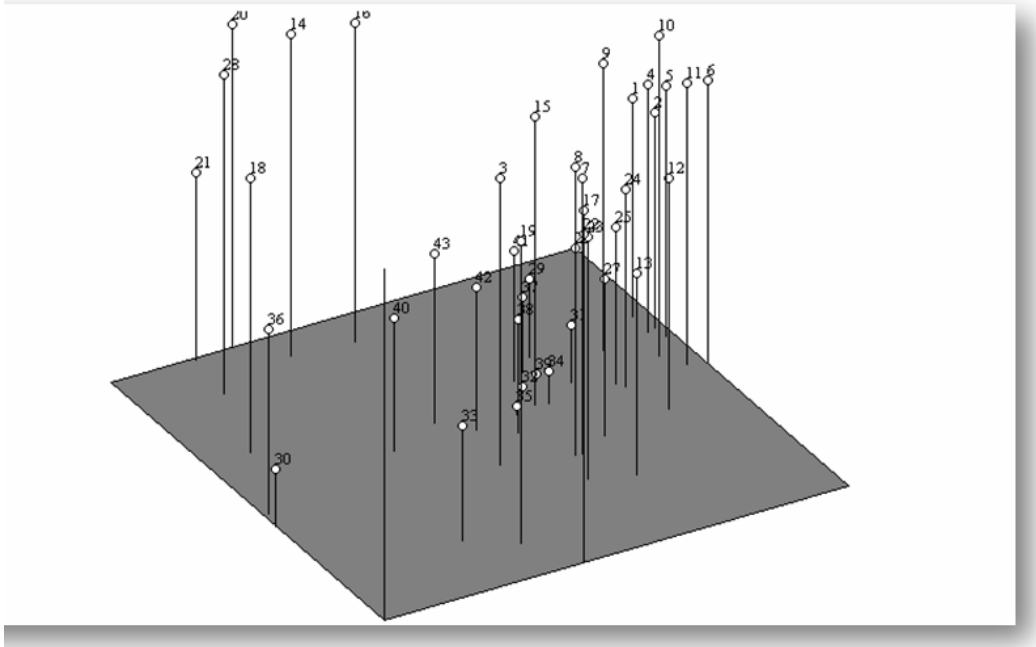


شکل ۲- دندروگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر RAPD، براساس الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA)



شکل ۳- پلات دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

(گروه‌بندی مطابق با کدهای داده شده در جدول شماره ۱ انجام گرفته است)



شکل ٤- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

(گروه‌بندی مطابق با کدهای داده شده در جدول شماره ۱ انجام گرفته است)

بحث

در تحقیق حاضر، تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD و دامنه وسیع تشابه (۰/۷۷-۰/۲۰) در میان توده‌های زیره سیاه، وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در میان جمعیتهای بومی زیره سیاه استان کرمان، حتی میان توده‌های نزدیک به هم از لحاظ جغرافیایی، نشان داد. Majeed (۲۰۰۵) نیز تنوع زیادی را در جمعیتهای زیره پارسی پاکستان هم از لحاظ مورفولوژیکی و هم مولکولی گزارش کرد. پژمان مهر و همکاران (۱۳۸٦) نیز تنوع بالای ژنتیکی را بین ۲۰ اکوتیپ زیره پارسی از نواحی مختلف ایران، با نشانگرهای RAPD و AFLP گزارش کردند و در دندروگرام حاصل از RAPD، تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان کرمان دیده شد. هاشمی و همکاران (۱۳۸۷) تنوع ژنتیکی خوبی را بین ۱۵ توده زیره پارسی ایران با استفاده از آغازگرهای RAPD نشان دادند که از ۱۰۸ قطعه تکثیر شده، ٤٥ باند پلی‌مورف بودند و دامنه شباهت بین نمونه‌ها از ۰/٦٦ تا ۰/۹٦ متغیر بود. در تحقیق انجام شده، با توجه به دندروگرام حاصل تنوع مولکولی بیشتر توده‌ها در کلاس یک منطبق بر تنوع جغرافیایی آنها بود. البته مواردی نیز وجود داشت که از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کردند. در تحقیق پژمان مهر و همکاران (۱۳۸٦)، تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی مطابقت نداشت، به‌طوری که نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان کرمان در دسته‌هایی کاملاً متفاوت و دور از هم قرار داشتند و بعکس نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نسبتاً دور از هم بودند، در دندروگرام در کنار هم و در یک گروه قرار داشتند. اما در تحقیق انجام گرفته توسط هاشمی و همکاران (۱۳۸۷) نتایج آنالیز مولکولی با فواصل جغرافیایی توده‌ها منطبق بود و در شباهت ژنتیکی ۸۵٪، نمونه‌های هر استان در شاخه‌های مجزایی قرار گرفته بودند که در تحقیق حاضر نیز تنوع مولکولی اکثر توده‌ها منطبق بر تنوع جغرافیایی آنها بود. عدم تطابق کامل تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی توده‌های زیره پارسی می‌تواند به دلیل جابجایی ژرم‌پلاسم باشد. انتقال بذر این گیاه از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط افراد می‌تواند سبب مبادله ژرم پلاسم شود. در مجموع نتایج نشان می‌دهد که تنوع بالایی برای گونه‌های *Bunium persicum* بومی استان کرمان حتی در اکوتیپهای نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد که با توجه به تکثیر از طریق بذر در زیره پارسی کاملاً منطقی و مورد انتظار می‌باشد. این تنوع ژنتیکی بالا احتمالاً به آنها اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی آسانتر سازگار شوند. درک چنین تنوع بالایی می‌تواند در مدیریت و حفاظت ژرم‌پلاسم‌های زیره پارسی مفید باشد. مجموع مطالعات انجام شده بر روی توده‌های زیره پارسی نشان می‌دهند که نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین این توده‌ها مناسب بوده و توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان داده و توده‌ها را بخوبی گروه‌بندی نماید.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان به سبب امکاناتی که در اختیار ما قرار دادند، کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- احمدپور، ا. ر.، ۱۳۷۸. بررسی فیتوشیمیایی اسانس زیره سبز و سیاه کرمانی با GC-Mass. پایان‌نامه دکترای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی.

- بامداد، ف.، کدیور، م. و کرامت، ج.، ۱۳۸٤. بررسی مقدار ترکیبات فنولیک موجود در زیره سیاه و میخک و اثر آنتی‌اکسیدانی آنها در مدل سیستمهای شیمیایی. مجموعه مقالات همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی، مشهد، ۷-۵ مرداد: ٤۰٥-٤۰٤.
- پژمان مهر، م.، حسنی، م.ا.، جهانسوز، ف.، نجفی، ع.ا.، سفیدکن، ف.، ابراهیم‌زاده، ح.، مردی، م.، پیرسیدی، م. ا.، نجفی، م. ص.، نقوی، م. ر. و باقی زاده، ا.، ۱۳۸٦. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های مختلف زیره سیاه ایرانی با نشانگرهای AFLP و RAPD. مجموعه مقالات دومین همایش ملی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ایران، کرمان، ۱۰-۹ بهمن: ۸۹-۸٦.
- پورسیدی، ش.، ۱۳۷٤. بررسی زیستگاههای زیره سیاه در استان کرمان. سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی مرکز کرمان.
- خسروی، م.، ۱۳۷۲. زیره سیاه (*Bunium persicum*) گیاهشناسی، اکولوژی و بررسی امکان تولید زراعی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- عسکر زاده، م.ع.، غلامی، ب. و نگاری، ع.، ۱۳۸٤. بررسی عملکرد کمی و کیفی اکوتیپهای زیره کوهی (*Bunium persicum*) کشور در شرایط آب و هوایی مشهد. همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی. مشهد، ۷-۵ مرداد: ۳۲۸-۳۲۷.
- فارسی، م. و ذوالعلی، ج.، ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ٤۹٥ صفحه.
- مظفریان، و.، ۱۳۸٦. فلور ایران، شمار ٥٤: تیره چتریان (Umbelliferae). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ٦۰۰ صفحه.
- نادرنژاد، ن. و پورسیدی، ش.، ۱۳۸۲. تاکسونومی عددی برخی جمعیتهای زیره ایران در جنسهای *Bunium*، *Carum* و *Cuminum* براساس صفات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی. پژوهش و سازندگی (در زراعت و باغبانی)، ۱٦(۱): ۱٥-۱.
- هاشمی، ه.، ۱۳۸٦. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای زیره سیاه *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch با استفاده از مارکر مولکولی RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران.
- هاشمی، ه.، صفرنژاد، ع. و باقری، ع.ر.، ۱۳۸۷. مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زیره پارسی *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch ایران، هند، افغانستان و اروپا با استفاده از مارکر مولکولی RAPD. خلاصه مقالات دهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج، ۳۰-۲۸ مرداد: ۱٤٤.
- ولیزاده، م.، ۱۳۸٥. بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر میزان القاء کالوس و باززایی زیره سبز و پارسی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران.
- ولیزاده، م.، صفرنژاد، ع.، نعمت زاده، ق.ع. و کاظمی تبار، ک.، ۱۳۸٥. باززایی زیره پارسی *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch با استفاده از ریزنمونه محور جنینی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۱(٤۲): ۳۸-۳۳.
- Baser, K.H.C., Ozek, T., Abduganiv, B.E., Abdullaer, U.A. and Aripov, Kh.N., 1997. Composition of the essential oil of *Bunium persicum* (Boiss) B. Fedtsch. from Tajikistan. Journal of Essential Oil Research, 9: 597-598.
- Boskabady, M.H. and Moghadas, A., 2004. Antihistaminic effect of *Bunium persicum* on guinea pig tracheal chains. Iranian Biomedical Journal, 8: 149-155.
- Dudareva, N., Picheresky, E. and Gershenzon, J., 2004. Biochemistry of pant volatiles. Plant Physiology, 134: 1893-1902.
- Ipek, M. and Simon, P.W., 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and Isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. J. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 246-252.
- Kapila, R.K., Panwar, K.S. and Badiyala, D., 1997. Variation and association analysis in domesticated population of black caraway (*Bunium persicum*). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science, 19: 709-711.
- Karim, A., Pervez, M., and M.K., 1977. Studies on the essential of the Pakistan species of the family umbelliferae. Part X. *Bunium persicum* Boiss. (Siah zira) Seed al. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 20(2): 106-108.
- Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B. and Prosek, M., 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta agriculturae Slovenica, 87: 427-433.
- Kumar, A., Prasad, B., Shaha, B.C., Sinha, R.P. and Maurya, K.R., 1994. Phenotypic stability in garlic. Journal of Applied Biology, 4: 23-26.
- Majeed, S., 2005. Assessment of genetic divergence and *in-vitro* conservation in *Bunium persicum* (Boiss.) Fedtsch. PhD Thesis Abstract. www.yspuniversity.ac.in/btc/thesis/H-2001-03-D.htm/

Foeniculum vulgare and *Bunium persicum* oils. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 29: 183-188.
- Thappa, R.K., Ghoshs Agarwal, S.G., Raina, A.K. And Jamwal, P.S., 1991. Comparative studies on the major volatiles of kalazira (*Bunium persicum* seed) of wild and cultivated sources. Food chemistry, 41(2): 129-134.
- Vasileva, M.G., Kljujkov, E.V. and Pimenov, M.G., 1985. Karyotaxonomic analysis of the genus *Bunium* (Umbelliferae). Plant Systematics and Evolution, 149: 71-88.
- Wanntorp, L.A., Kocyan, R., van, D. and Renner, S.S., 2006. Toward a Monophyletic Hoya (Marsdeniease, Apocynaceae): Inferences from the Chloroplasm trnL Region and the rbcL-atpB Spacer. Systematic Botany, 31(3): 586-589.
- Paterson, A., Tanksley, S.D. and Sorreles, M.E., 1995. DNA marker in plant improvement. Advances in agronomy, 46: 39-90.
- Sardari, S., Armin, G.R., Micetich, R.G. and Daneshtalab, M., 1998. Phytopharmaceuticals, Part 1. Antifungal activity of selected Iranian and Canadian plants. Pharmaceutical Biology, 36: 180-188.
- Sharifi, M. and Pouresmael, M., 2006. Breaking seed dormancy in *Bunium persicum by* stratification and chemical substances. Asian Journal of Plant Sciences, 5(4): 695-699.
- Sheidai, M. and Ahmadian, P., 1996. Cytological studies in Iran Zira from three genus: *Bunium*, *Carum* and *Cuminum*. Cytologia Tokyo, 61: 19-25.
- Syed, M. and Hanif, M., 1986**.** Antimicrobial activity of the essential oils of the Umbelliferae family: Part I. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*,

Investigation of genetic diversity in Persian Cumin [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] germplasm from Kerman province using RAPD molecular markers

S. Dehghan Kouhestani[1*], A. Baghizadeh[*2], Gh.A. Ranjbar[3], and N.A. Babaiyan Jelodar[3]

1*- Corresponding author, International Center for Sciences, High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran, E-mail: sbiotech2008@gmail.com
2- International Center for Sciences, High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran
3- Plant Breeding & Agronomy Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: April 2008 Revised: October 2008 Accepted: October 2008

Abstract

Persian Cumin, a medicinal and aromatic plant, belongs to Apiaceae family. The objective of this study was to assess the genetic variation in germplasm of Persian Cumin collected from Kerman province using RAPD molecular markers. The Persian Cumin fruits were collected from 43 various regions in Kerman province. DNA was extracted from fruits using modified CTAB method. From the 27 used primers in PCR, 19 primers with better bands were selected for analysis. The 446 polymorphic bands obtained by these primers were scored. The binary matrix was converted to distance matrix by applying Dice similarity coefficient in NTSYS-pc (Ver 2.02) software. Then, the distance matrix was analyzed using UPGMA and the phyllogenic dendrogram was plotted. Based on the results, investigated populations were clustered in 7 groups. The obtained clusters based on RAPD markers to some extent matched with the geographical origin of the studied populations of Persian Cumin. Furthermore, the obtained results of principal component analysis method were similar to the results of cluster analysis. The results indicated that RAPD technique is an efficient tool for assessing genetic diversity in these populations.

Key words: Persian Cumin [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.], biodiversity, RAPD, germplasm, Kerman.