

## Investigating the Efficiency of ISSR and ScoT Markers in Studying the Genetic Diversity of Some Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Populations

Mohammad Zabet<sup>1,\*</sup> , Maryam Akbari<sup>2</sup>  and Ali Izanloo<sup>1</sup> 

- 1- Associate Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
- 2- Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

\*Corresponding author ✉: [mzabet@birjand.ac.ir](mailto:mzabet@birjand.ac.ir)

**Citation:** Zabet, M., Akbari, M. and Izanloo, A. (2025). Investigating the efficiency of ISSR and ScoT markers in studying the genetic diversity of some coriander (*Coriandrum sativum* L.) populations. *Plant Genetic Researches*, **11(2)**: 83-98. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.6>

(Received: January 05, 2025; Final Revised: March 01, 2025; Accepted: Revised: March 10, 2025; Published online: March 17, 2025)

### Extended abstract

#### Introduction

Coriander (*Coriandrum sativum* L.), is one of the four important medicinal plants in Iran. Iran ranks as the world's fourth largest coriander producer and eighth largest coriander exporter. Coriander seeds are considered one of Iran's main export commodities, demonstrating competitive advantages comparable to cumin (*Cuminum cyminum* L.) and saffron (*Crocus sativus* L.) in international markets. Since breeding desirable genotypes is only possible with selecting superior genetic materials, plant breeders must use appropriate genetic diversity to achieve high performance breeding lines. Using markers to gain knowledge about genetic diversity can be beneficial in plant breeding programs. This study aimed to investigate genetic diversity, assess similarity and differences among coriander populations, and determine the genetic structure of different coriander populations using ISSR and SCoT markers.

#### Materials and methods

To evaluate the genetic diversity of a number of coriander populations, 16 populations were collected from three provinces, including South Khorasan (four populations from Khusf, Birjand, Nehbandan and Sarbishe cities), Yazd (four populations from the Yazd, Taft, Abarkoh, and Bahabad cities), and Kerman (eight populations from Kerman, Sirjan, Bam, Zarand, Shahr Babak, Baft, Ravar and Mahan cities). This study was conducted in 2019-2020 in the Molecular Plant Breeding Laboratory, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, University of Birjand. Ten ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) and 15 SCoT (Start codon targeted) primers were used for molecular diversity analysis. DNA was extracted from coriander leaves using the CTAB method and the quantity of extracted DNA was determined using a Nanodrop device (Thermo Scientific model 2000). Present and absent of bands were scored as binary data (0: absent and 1: present) and represented as a data matrix in an excel sheet. To evaluate the primers, the indices of the number of amplified alleles (Na), the number of effective alleles (Ne), the percentage of polymorphism (PP), the polymorphic information content (PIC), the effective multiplex ratio (EMR), the marker index (MI) and the resolving power (RP) were calculated. In order to cluster populations, first the genetic similarity of individuals was calculated and then cluster analysis (Ward's method) was performed. Data was analyzed using NTSYSpc2.2, SPSS v26, and Excel 2020 software packages.



©2025 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

## Results and discussion

In total, the ISSR and SCoT primers showed 95.91% and 97.67% polymorphism, respectively. The 10 ISSR primers and 15 SCoT primers produced 49 and 86 high resolution bands, respectively. Among all primers analyzed, IS1 and SC11/SC13 demonstrated the highest amplification efficiency, generating 8 and 9 bands, respectively. In contrast, primers IS2, IS7, and SC4 revealed the lowest productivity, each producing only 3 bands. The average values of the PIC, MI, EMR, and RP for ISSR and SCoT markers were calculated as 0.43, 2.07, 4.55, 3.56 and 0.38, 2.09, 5.49, 3.38, respectively. Based on ISSR and SCoT analysis, the highest genetic similarity was observed between Baft-Ravar, Baft-Mahan, Yazd-Taft, and Baft-Ravar, Kerman-Baft populations, respectively. Furthermore, the lowest genetic similarity was recorded between Khusf-Zarand, Nehbandan-Zarand, Birjand-Zarand, and Birjand-Bahabad, Khusf-Zarand, Birjand-Yazd populations, respectively. Cluster analysis of ISSR and SCoT data categorized the populations into four and three distinct clusters, respectively. Based on PCoA (Principal Coordinates Analysis) analysis of ISSR data, the first four components explained 50.44% of the total variance. The 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> components explained the 14.25%, 12.84%, 12.45% and 10.90% of total variance. Based on PCoA analysis of SCoT data, the first five components explained 52.97% of the total variance. The 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> components explained 14.16%, 11.34%, 10.85%, 8.63%, and 7.99% of the total variance, respectively. The low percentage of variation explained by the components suggests that the primers were well distributed across the coriander genome and also the choice of primers has been made correctly.

## Conclusion

High levels of polymorphism were observed for ISSR and SCoT markers, suggesting their efficacy in evaluating genetic diversity among coriander populations. In present study, the primers were effective in distinguishing the populations and exhibited a reliable performance. The ISSR markers had a better efficiency compared to that of SCoT markers. Correlation analysis of two matrices obtained from the molecular data for both markers did not significantly correlate, presumably due to their different natures. This study found a general correspondence between the genetic and the geographical distances, however, in some cases certain exceptions were noted, presumably due to factors such as seed mixing, gene pool migrations between geographical regions or gene flow among different populations, or even a common ancestral origin. According to the results of this study, among different populations, Khusf and Zarand populations exhibited the greatest genetic divergence, while Baft and Rawar populations were the most genetically similar populations. Consequently, crossing Khusf and Zarand populations is highly recommended to benefit from heterosis. Future breeding studies should incorporate a broader range of molecular markers and explore the associations between genetic markers and morphological, phenological, and quantitative traits.

**Keywords:** Primer, Cluster Analysis, Genetic similarity, Medicinal plants



## بررسی کارایی نشانگرهای ISSR و SCoT در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های گشنیز (*Coriandrum sativum* L.)

محمد ضابط<sup>۱\*</sup>، مریم اکبری<sup>۲</sup> و علی ایزانلو<sup>۱</sup>

۱- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

### چکیده

گشنیز یکی از چهار گیاه دارویی اصلی ایران است. ایران چهارمین تولیدکننده و هشتمین صادرکننده گشنیز در جهان است. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی، ۱۶ جمعیت گشنیز از سه استان خراسان جنوبی، یزد و کرمان با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR و ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که، در مجموع، آغازگرهای ISSR، ۹۵/۹۱ و آغازگرهای SCoT، ۹۷/۶۷ درصد چندشکلی نشان دادند و به ترتیب ۴۹ و ۸۶ باند با وضوح بالا تکثیر گردید. آغازگرهای IS1 و SC11، SC13 بیشترین تعداد باند (۸ و ۹ باند) و آغازگرهای IS2، IS7 و SC4 کمترین تعداد باند (۳ باند) را تکثیر نمودند. مقدار شاخص‌های EMR، MI، PIC و RP برای نشانگر ISSR، به ترتیب ۰/۴۳، ۲/۰۷، ۴/۵۵ و ۳/۵۶ و برای نشانگر SCoT، به ترتیب ۰/۳۸، ۲/۰۹، ۵/۴۹ و ۳/۳۸ برآورد گردید. بر اساس داده‌های نشانگر ISSR، بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های بافت-راور، بافت-ماهان و یزد-تفت و بر اساس نشانگر SCoT، بیشترین شباهت ژنتیکی بین بافت-راور و کرمان - بافت مشاهده شد. بر اساس داده‌های نشانگر ISSR، کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های خوسف - زرنده، نهبندان-زرنده و بیرجند-زرنده و بر اساس نشانگر SCoT، کمترین شباهت ژنتیکی بین بیرجند-بهباد، خوسف-زرنده و بیرجند-یزد به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگر ISSR و SCoT، جمعیت‌ها را به ترتیب در چهار و سه خوشه گروه‌بندی نمود. درصد بالای چندشکلی در داده‌های به دست آمده از نشانگرهای ISSR و SCoT نشان داد که این نشانگرها برای تجزیه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گشنیز کارآمد است. توجه درصد کمی از تغییرات کل داده‌ها توسط مؤلفه‌های اصلی نشان داد که آغازگرها پراکندگی مناسبی بر روی ژنوم داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که درون جمعیت‌های هر استان تشابه ژنتیکی نسبتاً بالا و بین جمعیت‌های استان‌های مختلف، تشابه ژنتیکی کمتری وجود داشت. به منظور ایجاد حداکثر هتروزیس، تلاقی خوسف × زرنده پیشنهاد می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** آغازگر، تجزیه خوشه‌ای، تشابه ژنتیکی، گیاهان دارویی

## مقدمه

تقاضا و مقدار استقبال از گیاهان دارویی به تدریج در حال افزایش است (Verma *et al.*, 2008) و بیش از ۵۰ درصد داروهای موجود در بازار به نوعی از گیاهان دارویی تهیه می‌شوند (Harvey, 2008). تخم گشنیز (*Coriandrum sativum*) در کنار زیره سبز و زعفران دارای مزیت رقابتی جهت صادرات است (Shemshadi, 2017). با وجود آنکه از لحاظ تولید، ایران در جایگاه چهارم دنیا قرار دارد، اما از نظر مقدار صادرات جایگاه هشتم را دارد (Aghaei, 2021). شهرستان نهاوند حدود یک‌پنجم تولید گشنیز را به خود اختصاص داده و پس از آن جیرفت، ورامین، تهران و مازندران بخش اعظم گشنیز برگی کشور را تولید می‌کنند.

حفاظت و استفاده پایدار از ذخایر ژنتیکی گیاهی برای اطمینان از تولید محصول ضروری است (Pullaiah *et al.*, 2015). انتخاب صحیح مواد ژنتیکی مستلزم به‌کارگیری درست تنوع است (Rao and Hodgkin, 2002) و تولید ژنوتیپ‌های مطلوب تنها از طریق انتخاب صحیح مواد ژنتیکی امکان‌پذیر است (Garrido-Cardenas *et al.*, 2018). آگاهی از تنوع ژنتیکی، می‌تواند نقش مفیدی در استفاده‌ی بهینه از گیاهان ایفا کند (Cole, 2003). به‌علت تأثیر زیاد شرایط محیطی بر نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، استفاده از نشانگرهای مولکولی تصویر درستی از تنوع ژنتیکی را در اختیار قرار می‌دهد (Tomar Rukam *et al.*, 2014). نشانگر ISSR با وجود غالب بودن با مزایایی مانند سادگی، چندشکلی بالا، پایدارتر بودن نسبت به بعضی نشانگرهای غالب (مانند RAPD)، صرف زمان اندک، اطلاعات بسیار مفیدی را در اختیار محققان قرار می‌دهد (Daneshmand *et al.*, 2017). نشانگر ISSR برخی از معایب نشانگرهای دیگر مانند تکرارپذیری پایین (تکرارپذیرتر نسبت به بعضی نشانگرها)، دشواری استفاده و هزینه بالا را ندارد (Mao *et al.*, 2018). SCoT نشانگر دیگری است که نیازی به دانش قبلی در مورد توالی هدف ندارد؛ تکرارپذیرتر، قابل اعتمادتر و کارآمدتر نسبت به سایر نشانگرهای غالب و کاربرد آن آسان است (Collard and Mackill, 2009). به‌طور کلی نشانگر SCoT با

ژن‌های عملکردی و صفات مربوط به آن‌ها ارتباط دارد. با توجه به آن‌که اطلاعات به‌دست آمده توسط SCoT از خود ژن یا نواحی حفاظت‌شده‌ی اطراف آن به‌دست می‌آید از اهمیت بالایی برخوردار است (Sankhla *et al.*, 2015).

در زمینه‌ی کارایی نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی گشنیز مطالعات اندکی در دنیا وجود دارد و سهم ایران از این مطالعات انگشت‌شمار و بسیار ناچیز است. از نشانگر ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان مختلفی (Shiri Rostami *et al.*, 2019; Zabet *et al.*, 2023; Keykhosravi *et al.*, 2017; Khorshidi *et al.*, 2018; Eghlima *et al.*, 2021; Hosseini *et al.*, 2022; Khodayari *et al.*, 2017) استفاده شده است. در ارزیابی تنوع ژنتیکی ده رقم گشنیز توسط پاریک و همکاران (Pareek *et al.*, 2013) با استفاده از نشانگر ISSR، ۱۸ باند چندشکل تکثیر شدند. ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۷۹-۱ متغیر بود و تجزیه خوشه‌ای ارقام را در دو خوشه متمایز کرد. در این مطالعه فاصله ژنتیکی ناچیزی درون گونه ملاحظه شد و ISSR نشانگری کارآمد در ارزیابی تنوع ژنتیکی در گشنیز بود. در بررسی تنوع ژنتیکی شش رقم گشنیز ترکی با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR توسط فوران و جبول اوغلو (Furan and Gebologlu, 2017) ۲۷۱ باند قابل نمره‌دهی به‌دست آمد و حداکثر مقدار PIC، ۰/۴۴ تعیین شد. دندروگرام ژنوتیپ‌ها را در دو خوشه گروه‌بندی نمود. مطالعه واگرایی ژنتیکی در ۴۸ ژنوتیپ گشنیز (Shivaprasad, 2017) با استفاده از ۳۹ آغازگر ISSR نشان داد که از مجموع ۳۸۷ باند، ۳۳۵ باند (۸۶٪ درصد) چندشکل بودند. بررسی ساختار ۲۰ جمعیت گشنیز ایران (Nadi *et al.*, 2024) با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR در مجموع تعداد ۱۱۱ باند ایجاد کردند که از این تعداد، ۸۰ باند چندشکل بوده و میانگین چندشکلی از ۰/۲ تا ۰/۳۵ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها را در سه گروه طبقه‌بندی نمود. بر اساس نتایج این تحقیق، گشنیزهای ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشد.

از نشانگر SCoT در گیاهان مختلفی استفاده شده است (Ahmed *et al.*, 2021; Vais Karami *et al.*, 2016; Pakray *et al.*, 2023; Mishra *et al.*, 2020; Zabet *et al.*, 2017). اما در گشنیز مطالعات بسیار اندکی وجود دارد. در بررسی تنوع

جهت بررسی بیشتر به آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی پردیس کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه بیرجند منتقل شدند (جدول ۱).

**روش کار:** ابتدا بذرها با تعداد بالا در گلدان کشت و بعد از استقرار، حدود پنج بوته که نماینده جمعیت بود، نگه داشته شدند. آبیاری گلدان‌ها تا زمان رسیدن بوته‌ها به مرحله‌ی پنج‌برگی ادامه یافت. از هر گلدان پنج نمونه به صورت تصادفی انتخاب و درون فویل آلومینیومی قرار گرفت و سپس در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- آزمایشگاه منتقل شد. استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد (Doyle and Doyle, 1987). برای استخراج DNA، ۰/۲ گرم از هر نمونه در داخل هاون چینی استریل و در حضور نیتروژن مایع پودر و سپس نمونه‌های پودر شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی ۶۸۶ میکرولیتر بافر استخراج CTAB سه درصد، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA (۲۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۱/۴ میلی‌مولار) به همراه ۱۴ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر تیوب اضافه شد. کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل Thermo Scientific 2000) تعیین گردید.

در ابتدا صحت تکثیر آغازگرها مورد آزمون قرار گرفت. برای این کار نمونه‌ای بالک از DNA تهیه شد. پنج نمونه‌ی DNA به‌طور تصادفی انتخاب و باهم مخلوط (بالک) و تک تک آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از ۱۵ آغازگر ISSR و ۲۰ آغازگر SCoT استفاده شد (Choudhary et al., 2019; Melo et al., 2011; Pishghadam Nilabad, 2019) (جدول ۲). به‌منظور تعیین بهترین دمای اتصال آغازگرها گرادیان دمایی روی نمونه‌های بالک صورت گرفت. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (مدل Thermal-Cycler T100 نمایندگی BIORAD) صورت گرفت. الکتروفورز افقی محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد در بافر (TAEIX) انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل قطعات تکثیر یافته‌ی DNA توسط دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری گردید. برای بررسی و مقایسه باندها از پنج میکرولیتر نشانگر با قطعات مشخص (DNA Ladder) بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت‌باز استفاده شد (جدول ۳ و ۴).

ژنتیکی جمعیت‌های گشنیز (Etesami et al., 2020) با استفاده از نشانگر SCoT، تعداد باندها بین ۲۷-۵، بالاترین شاخص نشانگری ۸/۹۳، میانگین قدرت تفکیک نشانگری ۲۱/۳۰ و بیشترین شاخص تنوع ژنی نی و شانون به ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۷۲ گزارش شد. کمترین و بیشترین یکنواختی به ترتیب مربوط به جمعیت لرستان و خراسان جنوبی بود. کمترین درصد چندشکلی در لرستان و بیشترین درصد چندشکلی در خراسان جنوبی گزارش شد. تنوع بین جمعیت‌ها ۲۰ و درون جمعیت‌ها ۸۰ درصد برآورد شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های کرمان-آذربایجان غربی، خراسان جنوبی-یزد و گلستان-یزد و کمترین فاصله ژنتیکی بین خراسان جنوبی-کرمان، گلستان-کرمان، گلستان-خراسان جنوبی و آذربایجان غربی-گلستان مشاهده شد.

کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی میان افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های موردنظر در برنامه‌های به‌نژادی، امکان سازماندهی خزانه‌ی ژنی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. هرچه تنوع موجود بیشتر باشد، زمینه برای توسعه واریته‌ها/ژنوتیپ‌های برتر بهتر است و این تنوع بر غنای خزانه‌ی ژنی می‌افزاید. در کشور ایران تحقیقات انجام شده در زمینه به‌نژادی گشنیز به نسبت اهمیت آن محدود می‌باشد و هنوز رقم تجاری رسمی از گشنیز ثبت نشده است. با توجه به این امر بررسی دقیق جمعیت‌های بومی گشنیز از دیدگاه ژنتیکی و بررسی در سطح DNA ضروری به‌نظر می‌رسد. تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گشنیز انجام شد. با استفاده از اطلاعات این تحقیق می‌توان نمونه‌های متنوع‌تر را انتخاب نمود و هم‌چنین می‌توان از اطلاعات حاصل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک خزانه‌ی ژنتیکی استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** بذور ۱۶ جمعیت گشنیز از سه استان خراسان جنوبی شامل چهار جمعیت از شهرهای بیرجند، خوسف، نهبندان، سربیشه، استان یزد شامل چهار جمعیت از شهرهای یزد، تفت، ابرکوه و بهاباد و استان کرمان شامل ۸ جمعیت از شهرهای کرمان، سیرجان، بم، زرنند، شهرابک، بافت، راور و ماهان طی سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ به‌طور تصادفی جمع‌آوری و

جدول ۱- ویژگی‌های جغرافیایی جمعیت‌های مختلف گشنیز جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

Table 1. Geographical attributes of different coriander populations collected from different regions across Iran

شماره	منطقه	استان	عرض شمالی	طول شرقی
Number	Location	Province	Northern latitude	Eastern longitude
1	Birjand	Southern Khorasan Province	32° 53' N	59° 13' E
2	Khusf	Southern Khorasan Province	31° 40' N	56° 06' E
3	Nehbandan	Southern Khorasan Province	30° 32' N	58° 35' E
4	Sarbishe	Southern Khorasan Province	59° 32' N	59° 49' E
5	Yazd	Yazd province	29° 22' N	52° 55' E
6	Taft	Yazd province	31° 45' N	54° 12' E
7	Abarkoh	Yazd province	53° 16' N	31° 07' E
8	Bahabad	Yazd province	31° 33' N	55° 36' E
9	Kerman	Yazd province	25° 55' N	53° 26' E
10	Sirjan	Kerman province	29° 28' N	55° 34' E
11	Bam	Kerman province	29° 06' N	58° 21' E
12	Zarand	Kerman province	30° 49' N	56° 34' E
13	Shahre Babak	Kerman province	30° 06' N	55° 07' E
14	Baft	Kerman province	28° 06' N	55° 15' E
15	Ravar	Kerman province	31° 16' N	56° 49' E
16	Mahan	Kerman province	30° 04' N	57° 17' E

جدول ۲- آغازگرهای ISSR و SCoT به همراه توالی و دمای اتصال (R=A/T, Y=C/G)

Table 2. ISSR and SCoT primers, their sequences and annealing temperatures (R=A/T, Y=C/G)

آغازگر	توالی	دمای اتصال	آغازگر	توالی	دمای اتصال
Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)	Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)
IS1	5'-CTCTCTCTCTCTCTTG-3'	58	SC1	5'-CAACAATGGCTACCACCA-3'	53
IS2	5'-CACACACACARY-3'	53	SC2	5'-CAACAATGGCTACCACCC-3'	55
IS3	5'-GAGAGAGAGAGAGAAC-3'	59	SC3	5'-CAACAATGGCTACCACGG-3'	55
IS4	5'-GAGAGAGAGAGAGAYA-3'	57	SC4	5'-ACGACATGGCGACCAACG-3'	58
IS5	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3'	58	SC5	3'-ACGACATGGCGACCATCG-3'	58
IS6	5'-TCTCTCTCTCTCTCG-3'	52	SC6	5'-ACGACATGGCGACCACGC-3'	59
IS7	5'-GAGAGAGAGAGAAAYT-3'	53	SC7	5'-ACGACATGGCGACCGCGA-3'	58
IS8	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	52	SC8	5'-ACGACATGGCGACCCACA-3'	57
IS9	5'-AGAGAGAGAGAGAGT-3'	56	SC9	5'-AACCATGGCTACCACCAC-3'	55
IS10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGYT-3'		SC10	5'-CACCATGGCTACCACCAG-3'	57
			SC11	5'-CACCATGGCTACCACCA-3'	52
			SC12	53'-CCATGGCTACCACCGCG-3'	59
			SC13	5'-CCATGGCTACCACCGCAG-3'	55
			SC14	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	59
			SC15	5'-GCAACAATGGCTACCACC-3'	54

جدول ۳- اجزای واکنش و برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3. Polymerase chain reaction (PCR) components and cycle program to amplify ISSR and SCoT markers

مواد	غلظت نهایی	اجزای واکنش	مراحل	تعداد چرخه	دما	زمان
Materials	Final concentration	Reaction components	Step	Cycle Number	(سانتی‌گراد)	(دقیقه/ثانیه)
					Temp (°C)	Time (min/s)
Double distilled water	-	8 µl	Initial denaturation	1	94	4m
Master mix	1X (SCoT), 2X (ISSR)	10 µl	Denaturation	40	94	45S
Primer	0.67 pm	1 µl	Annealing	40	MT-5	45S
DNA	20ng/µl	1 µl	Extension	40	72	1m
Total	-	20 µl	Final extension	1	72	5m

آغازگرهای IS2 و IS7 کمترین تعداد باند (۳ باند) را تکثیر کردند. در نشانگر SCoT دو آغازگر SC11 و SC13 بیشترین باند (۹ عدد) و آغازگر SC4 کمترین تعداد باند (۳ باند) را تکثیر نمودند. در نشانگر ISSR دو آغازگر IS7 و IS5 با ۶۶/۶۷ و ۸۳/۳۳ درصد کمترین چندشکلی را نشان دادند و بقیه آغازگرها ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند؛ اما در نشانگر SCoT دو آغازگر SC1 و SC14 به ترتیب با ۷۵ و ۸۷/۵ درصد کمترین درصد چندشکلی را نشان دادند و در باقی آغازگرها ۱۰۰ درصد چندشکلی مشاهده شد. مقدار متوسط PIC برای نشانگر ISSR برابر با ۰/۴۳ و برای نشانگر SCoT برابر با ۰/۳۸ به دست آمد (جدول ۵ و ۶).

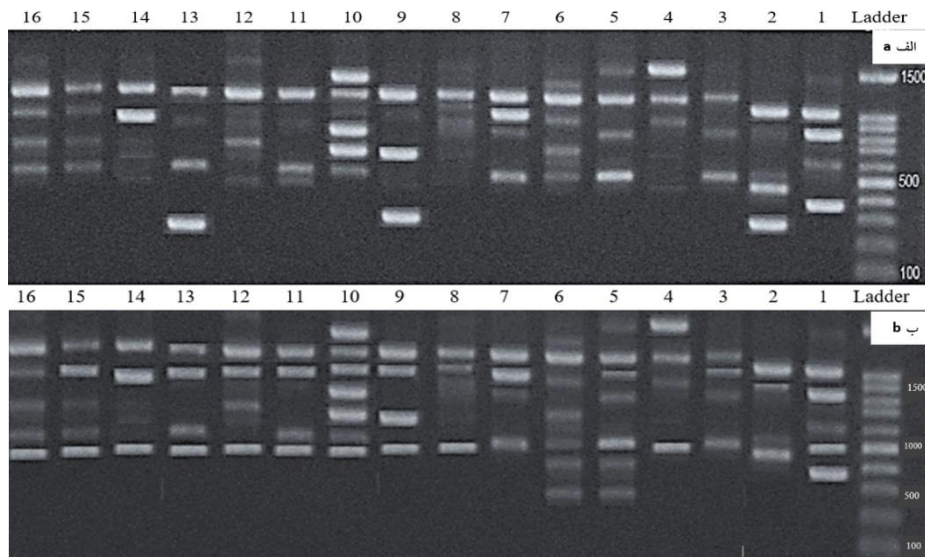
مقدار متوسط شاخص نسبت چندشکلی مؤثر در نشانگر ISSR برابر با ۴/۵۵ و در نشانگر SCoT برابر با ۵/۴۹ به دست آمد. در نشانگر ISSR بیشترین مقدار شاخص نسبت چندشکلی مؤثر (۸) را آغازگر IS1 و کمترین مقدار (۱/۳۳) را آغازگر IS7 و در نشانگر SCoT بیشترین مقدار شاخص نسبت چندشکلی مؤثر (۹) را آغازگرهای SC11 و SC13 و کمترین مقدار (۲/۲۵) را آغازگر SC1 به خود اختصاص دادند. مقدار متوسط شاخص نشانگری (MI) برای نشانگر ISSR برابر با ۲/۰۷ و نشانگر SCoT برابر با ۲/۰۹ بود. در نشانگر ISSR بیشترین مقدار شاخص نشانگری (۳/۴۴) را آغازگر IS1 و کمترین مقدار شاخص نشانگری (۰/۶۴) را آغازگر IS7 و در نشانگر SCoT، بیشترین مقدار شاخص نشانگری (۳/۸۰) را آغازگر SC11، و کمترین مقدار شاخص نشانگری (۰/۴۶) را آغازگر SC1، را به خود اختصاص دادند. مقدار متوسط قدرت تفکیک RP برای نشانگرهای ISSR و SCoT به ترتیب برابر با ۳/۵۶ و ۳/۳۸ برآورد گردید. بیشینه و کمینه مقدار این شاخص در نشانگر ISSR برابر با ۵/۷۵ در آغازگر IS1 و ۱/۷۵ در آغازگر IS7 و در نشانگر SCoT بیشینه و کمینه مقدار این شاخص برابر با ۶/۲۵ در آغازگر SC11 و ۱ در آغازگر SC1 متغیر بود (جدول ۴ و ۵).

اطلاعات حاصل از باندها به صورت ماتریس صفر (عدم باند) و یک (حضور باند) در نرم افزار Excel وارد شدند. برای ارزیابی آغازگرها، شاخص‌های تعداد آلل تکثیر شده (No. of Different Alleles: NA)، تعداد آلل مؤثر (No. of Effective Alleles: NE)، درصد چندشکلی (Percent polymorphism: PP): تعداد کل باندها/تعداد باندهای چندشکل، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (Polymorphic information content: PIC=1-∑p<sub>i</sub><sup>2</sup>) (p<sub>i</sub> فراوانی نشانگر iام)، شاخص نسبت چندشکلی مؤثر (Effective multiplex ratio: EMR): درصد چندشکلی × تعداد باندهای چندشکل، شاخص نشانگری (Marker Index: MI): تعداد باندهای چندشکل × PIC و شاخص قدرت تفکیک (RP)= ∑IB که (Agrama and Tuinstra, 2003; Botstein, 1972; Lewontin, 1972; et al., 1980). به منظور تعیین پراکندگی آغازگرها در طول ژنوم تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinates Analysis: PCoA) و به منظور گروه‌بندی جمعیت‌ها ابتدا تشابه ژنتیکی افراد محاسبه و سپس تجزیه خوشه‌ای (روش وارد) انجام شد. در تجزیه داده‌ها از نرم‌افزارهای NTSYS (نسخه ۲/۲)، SPSS (نسخه ۲۶) و Excel (نسخه ۲۰۲۰) استفاده شد.

## نتایج و بحث

ارزیابی کارایی آغازگرها و بررسی چندشکلی: از ۱۵ آغازگر ISSR، ۱۰ و از ۲۰ آغازگر SCoT، ۱۵ مورد چندشکلی و وضوح بالایی را نشان دادند. پنج آغازگر در هر دو نشانگر به دلیل عدم تکثیر و یا ایجاد باندهای با وضوح نامناسب کنار گذاشته شدند. در کل آغازگرهای ISSR، ۴۹ باند (به‌طور متوسط ۴/۹ باند به ازای هر آغازگر) و آغازگرهای SCoT، ۸۶ باند (به‌طور متوسط ۵/۷ باند به ازای هر آغازگر) با وضوح بالا تکثیر نمودند (شکل ۱).

درصد چندشکلی در نشانگر ISSR، ۹۵/۹۱ درصد و در نشانگر SCoT، ۹۷/۶۷ درصد به دست آمد. در نشانگر ISSR آغازگر IS1 بیشترین تعداد باند (۸ باند) و



شکل ۱- الگوی باندهای جمعیت‌های گشنیز: الف- آغازگر IS1 از نشانگر ISSR، ب- آغازگر SC7 از نشانگر SCoT  
 ۱- بیرجند، ۲- خوسف، ۳- نهبندان، ۴- سریشه، ۵- یزد، ۶- تفت، ۷- ابرکوه، ۸- بهاباد، ۹- کرمان، ۱۰- سیرجان، ۱۱- بم،  
 ۱۲- زرنند، ۱۳- شهر بابک، ۱۴- بافت، ۱۵- راور، ۱۶- ماهان

Figure 1. Band pattern of coriander populations: a- IS1 (ISSR), b- SC7 (SCoT) primer. 1-Birjand, 2- Khusf, 3- Nehbandan, 4- Sarbishe, 5- Yazd, 6- Taft, 7- Abarkoh, 8- Bahabad, 9- Kerman, 10- Sirjan, 11- Bam, 12- Zarand, 13- Shahr Babak, 14- Baft, 15- Ravar, 16- Mahan.

جدول ۴- شاخص‌های نشانگر ISSR

Table 4. ISSR marker indices

آغازگر Primer	تعداد کل باندها No. of bands	تعداد باندهای چندشکل No. of polymorph bands	درصد چندشکلی Polymorphism percent	شاخص محتوای چندشکلی PIC	نسبت چندشکلی مؤثر EMR	شاخص نشانگر MI	شاخص قدرت تفکیک RP
IS1	8.00	8.00	100.00	0.43	8.00	3.44	5.75
IS2	3.00	3.00	100.00	0.41	3.00	1.23	1.88
IS3	4.00	4.00	100.00	0.47	4.00	1.88	3.13
IS4	6.00	6.00	100.00	0.45	6.00	2.70	4.50
IS5	6.00	5.00	83.33	0.36	4.17	1.80	3.63
IS6	6.00	6.00	100.00	0.49	6.00	2.94	4.38
IS7	3.00	2.00	66.67	0.32	1.33	0.64	1.75
IS8	4.00	4.00	100.00	0.50	4.00	2.00	3.75
IS9	4.00	4.00	100.00	0.48	4.00	1.92	3.25
IS10	5.00	5.00	100.00	0.43	5.00	2.15	3.56
Mean	4.90	4.70	95.91	0.43	4.55	2.07	3.56

جدول ۵- شاخص‌های نشانگر SCoT

Table 5. SCoT marker indices

آغازگر Primer	تعداد کل باندها No. of bands	تعداد باندهای چندشکل No. of polymorph bands	درصد چندشکلی Polymorphism percent	شاخص محتوای چندشکلی PIC	نسبت چندشکلی مؤثر EMR	شاخص نشانگر MI	شاخص قدرت تفکیک RP
SC1	4.00	3.00	75.00	0.20	2.25	0.46	1.00
SC2	6.00	6.00	100.00	0.33	6.00	1.98	3.13
SC3	6.00	6.00	100.00	0.37	6.00	2.23	3.50
SC4	3.00	3.00	100.00	0.48	3.00	1.43	2.38
SC5	4.00	4.00	100.00	0.44	4.00	1.77	3.00
SC6	6.00	6.00	100.00	0.34	6.00	2.03	3.00
SC7	5.00	5.00	100.00	0.33	5.00	1.63	2.13
SC8	6.00	6.00	100.00	0.48	6.00	2.88	5.13
SC9	3.00	3.00	100.00	0.47	3.00	1.41	2.38
SC10	5.00	5.00	100.00	0.46	5.00	2.31	3.75
SC11	9.00	9.00	100.00	0.42	9.00	3.80	6.25
SC12	6.00	6.00	100.00	0.39	6.00	2.32	3.63
SC13	9.00	9.00	100.00	0.30	9.00	2.71	3.63
SC14	8.00	7.00	87.50	0.25	6.13	1.50	2.63
SC15	6.00	6.00	100.00	0.48	6.00	2.91	5.25
Mean	5.73	5.60	97.67	0.38	5.49	2.09	3.38

PIC: Polymorphic information content, EMR: Effective multiplex ratio, MI: Marker Index, RP: Resolving Power

(۸) و یزد (۵) جای گرفتند. در خوشه‌ی سوم جمعیت‌های راور (۱۵)، بافت (۱۴)، شهرابک (۱۳)، بم (۱۱)، سربیشه (۴)، ماهان (۱۶)، تفت (۶)، نهبندان (۳)، بیرجند (۲) و خوسف (۱) قرار گرفتند (شکل ۳).

**تجزیه به مختصات اصلی:** بر اساس داده‌های نشانگر ISSR، چهار مؤلفه اول ۵۰/۴۴ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۱۴/۲۵ درصد، مؤلفه دوم ۱۲/۸۴ درصد، مؤلفه سوم ۱۲/۴۵ درصد و مؤلفه چهارم ۱۰/۹۰ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. بر اساس نشانگر SCoT پنج مؤلفه اول ۵۲/۹۷ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۱۴/۱۶ درصد، مؤلفه دوم ۱۱/۳۴ درصد، مؤلفه سوم ۱۰/۸۵ درصد، مؤلفه چهارم ۸/۶۳ درصد و مؤلفه پنجم ۷/۹۹ درصد از واریانس کل را به خود اختصاص دادند (جدول ۷).

نمودار پراکنش جمعیت‌ها بر اساس دو مؤلفه اصلی در شکل ۴ نشان داده شده است. نمودار پراکنش جمعیت‌ها نشان می‌دهد که جمعیت‌های گشنیز پراکنندگی مناسبی داشته؛ از این‌رو تنوع ژنتیکی کافی در بین آن‌ها وجود دارد. در این نمودار چنانچه جمعیت‌ها در یک ناحیه‌ی خاص از نمودار پراکنش داشته باشند، نشان‌دهنده‌ی نزدیکی بین آن جمعیت‌ها و در نتیجه تشابه ژنتیکی آن‌ها است و بنابراین تنوع زیادی بین آن‌ها وجود ندارد، اما چنانچه جمعیت‌ها در نواحی مختلف نمودار پراکنده شوند، نشان‌دهنده دور بودن جمعیت‌ها از لحاظ داده‌های مولکولی مورد بررسی است و لذا تنوع ژنتیکی بالایی بین آن‌ها وجود دارد. جدا افتادن جمعیت زرنند (شکل ۴ الف و ب) از سایر جمعیت‌ها در نمودارها قابل تشخیص است و با توجه به آنکه کمترین تشابه ژنتیکی بر اساس ماتریس تشابه داده‌های نشانگر ISSR بین جمعیت‌های نهبندان با زرنند، خوسف با زرنند و بیرجند با زرنند و بر اساس ماتریس تشابه داده‌های نشانگر SCoT بین بهاباد و زرنند مشاهده شد، لذا این نمودار نیز نتایج حاصل از ماتریس تشابه را تأیید نمود.

**فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و تجزیه خوشه‌ای:** بررسی ضرایب همبستگی کوفنتیک نشان داد که ضریب تشابه دایس و جاکارد و الگوریتم UPGMA به دلیل داشتن بالاترین ضریب همبستگی در هر دو نشانگر ISSR و SCoT (به ترتیب ۰/۸۱ و ۰/۸۳) به عنوان بهترین ضریب و بهترین الگوی خوشه‌بندی شناخته شدند؛ بر اساس این الگو ماتریس تشابه به دست آمد و تجزیه خوشه‌ای انجام شد. بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از داده‌های نشانگر ISSR مقدار تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها بین ۰/۳۴ تا ۰/۶۸ با متوسط ۰/۵۵ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های بافت - راور (۰/۶۸) و بافت - ماهان (۰/۶۸) و کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های خوسف - زرنند (۰/۳۳) به دست آمد. بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از داده‌های نشانگر SCoT مقدار تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها بین ۰/۳۰ تا ۰/۶۹ با متوسط ۰/۵۳ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های بافت - راور (۰/۶۹) و کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های بیرجند - بهاباد (۰/۳۰) به دست آمد (جدول نیامده است).

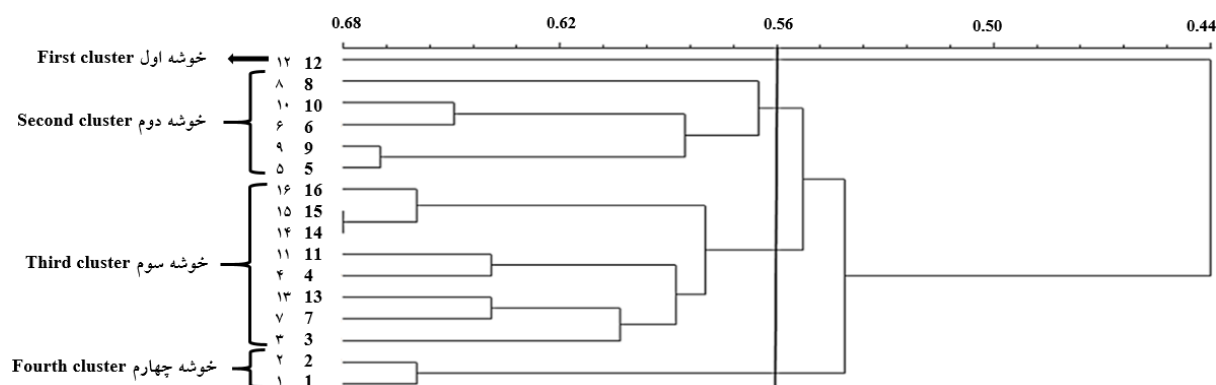
تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگر ISSR جمعیت‌های مختلف را در چهار خوشه دسته‌بندی نمود. در خوشه‌ی اول جمعیت زرنند (۱۲) قرار گرفت. در خوشه‌ی دوم جمعیت‌های بهاباد (۸)، سیرجان (۱۰)، تفت (۶)، کرمان (۹) و یزد (۵) قرار گرفت. در خوشه‌ی سوم جمعیت‌های ماهان (۱۶)، راور (۱۵)، بافت (۱۴)، بم (۱۱)، سربیشه (۴)، شهرابک (۱۳)، ابرکوه (۷)، و نهبندان (۳) جای گرفتند. در خوشه‌ی چهارم جمعیت‌های خوسف (۲) و بیرجند (۱) قرار گرفتند (شکل ۲).

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگر SCoT، جمعیت‌ها در ۳ خوشه قرار گرفتند. در خوشه‌ی اول جمعیت زرنند (۱۲) قرار گرفت. در خوشه‌ی دوم جمعیت‌های سیرجان (۱۰)، ابرکوه (۷)، کرمان (۹)، بهاباد

جدول ۶- تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای نشانگرهای ISSR و SCoT در جمعیت‌های گشنیز

Table 6. PCoA analysis for ISSR and SCoT markers in coriander populations

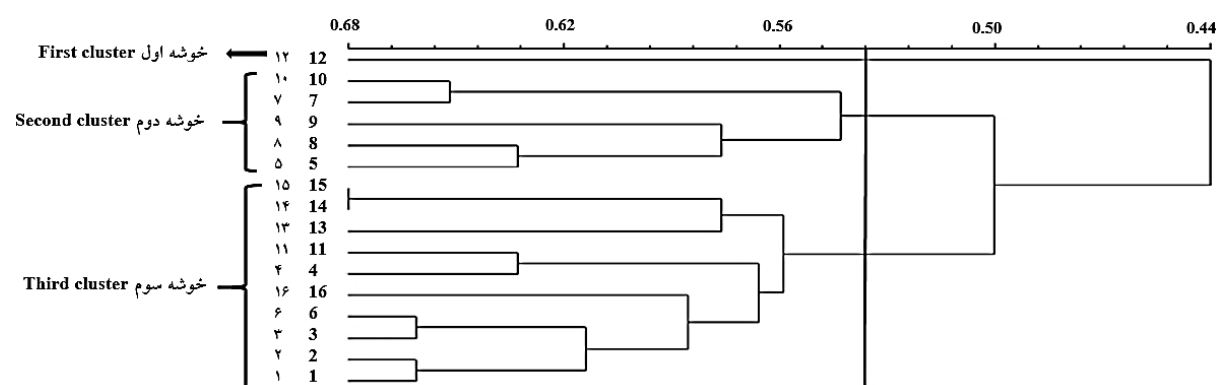
مؤلفه Component	ISSR			SCoT		
	مقدار ویژه Eigen Value	درصد واریانس Variance (%)	درصد واریانس تجمعی Cumulative variance (%)	مقدار ویژه Eigen value	درصد واریانس Variance (%)	درصد واریانس تجمعی Cumulative variance (%)
PC <sub>1</sub>	0.89	14.25	14.25	0.96	14.16	14.16
PC <sub>2</sub>	0.80	12.84	27.09	0.77	11.34	25.50
PC <sub>3</sub>	0.78	12.45	39.54	0.73	10.85	36.35
PC <sub>4</sub>	0.68	10.90	50.44	0.58	8.63	44.98
PC <sub>5</sub>	-	-	-	0.54	7.99	52.97



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مختلف گشنیز بر اساس نشانگر ISSR

۱- بیرجند، ۲- خوسف، ۳- نهبندان، ۴- سریشه، ۵- یزد، ۶- تفت، ۷- ابرکوه، ۸- بهاباد، ۹- کرمان، ۱۰- سیرجان، ۱۱- بم، ۱۲- زرنند، ۱۳- شهر بابک، ۱۴- بافت، ۱۵- راور، ۱۶- ماهان

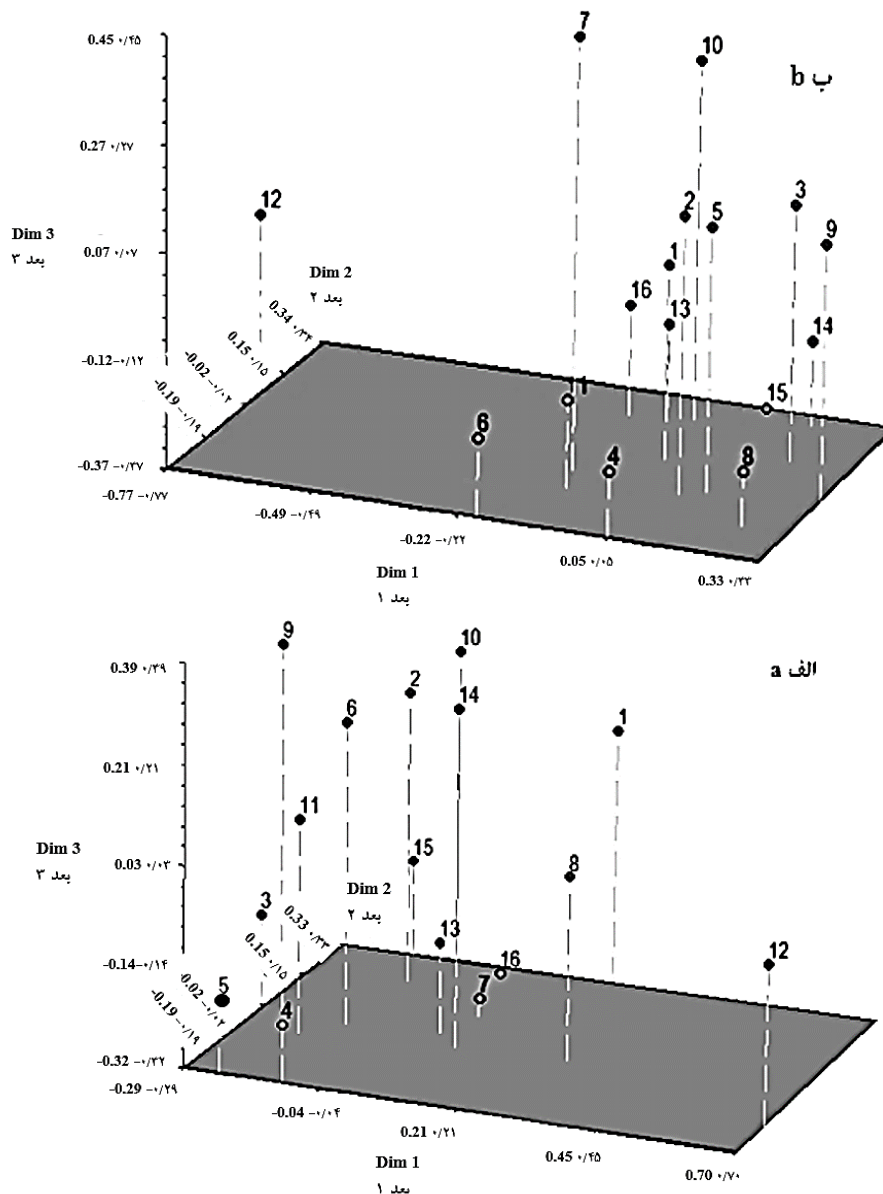
Figure 2. Cluster analysis of different coriander populations based on ISSR marker. 1- Birjand, 2- Khusf, 3- Nehbandan, 4- Sarbishe, 5- Yazd, 6- Taft, 7- Abarkoh, 8- Bahabad, 9- Kerman, 10- Sirjan, 11- Bam, 12- Zarand, 13- Shahr Babak, 14- Baft, 15- Ravar, 16- Mahan.



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مختلف گشنیز بر اساس نشانگر SCoT

۱- بیرجند، ۲- خوسف، ۳- نهبندان، ۴- سریشه، ۵- یزد، ۶- تفت، ۷- ابرکوه، ۸- بهاباد، ۹- کرمان، ۱۰- سیرجان، ۱۱- بم، ۱۲- زرنند، ۱۳- شهر بابک، ۱۴- بافت، ۱۵- راور، ۱۶- ماهان

Figure 3. Cluster analysis of different coriander populations based on SCoT marker. 1-Birjand, 2- Khusf, 3- Nehbandan, 4- Sarbishe, 5- Yazd, 6- Taft, 7- Abarkoh, 8- Bahabad, 9- Kerman, 10- Sirjan, 11- Bam, 12- Zarand, 13- Shahr Babak, 14- Baft, 15- Ravar, 16- Mahan.



شکل ۴- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها گشنیز برای نشانگرهای الف- ISSR؛ ب- SCoT

۱- بیرجند، ۲- خوسف، ۳- نهبندان، ۴- سریشنه، ۵- یزد، ۶- تفت، ۷- ابرکوه، ۸- بهاباد، ۹- کرمان، ۱۰- سیرجان، ۱۱- بم، ۱۲- زرنند، ۱۳- شهر بابک، ۱۴- بافت، ۱۵- راور، ۱۶- ماهان

Figure 4. Distribution diagram of coriander genotypes: a- ISSR, b- SCoT markers. 1- Birjand, 2- Khusf, 3- Nehbandan, 4- Sarbishe, 5- Yazd, 6- Taft, 7- Abarkoh, 8- Bahabad, 9- Kerman, 10- Sirjan, 11- Bam, 12- Zarand, 13- Shahr Babak, 14- Baft, 15- Ravar, 16- Mahan.

جمعیت‌های مطالعه‌شده‌ی کنونی بیشتر از ارقام، واریته‌ها و اکوتیپ‌های خارجی بود. به‌عنوان مثال در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ واریته گشنیز هند (Pareek *et al.*, 2011)، ۴۳/۲ درصد چندشکلی، ارزیابی ۲۳ ژنوتیپ گشنیز (Sharma *et al.*, 2019)، ۶۴/۳۴ درصد چندشکلی، سه جمعیت گشنیز (Al-Kordy *et al.*, 2013)، ۳۰/۳ درصد چندشکلی، ۲۴

بررسی آغازگرها نشان داد که نشانگر ISSR درصد چندشکلی کمتری نسبت به نشانگر SCoT داشت که این امر با توجه به تعداد باندهای چندشکل کمتر نشانگر ISSR دور از انتظار نیست. متوسط تعداد باند چندشکل در نشانگر ISSR نسبت به SCoT کمتر بود. مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی موجود در

نشانگر ISSR در اکثر شاخص‌ها بهتر از SCoT عمل نمود، لذا توانایی بیشتری در تفکیک و تمایز جمعیت‌های گشنیز از یکدیگر را داشتند و به‌عنوان نشانگر مطلوب‌تر در این مطالعه شناخته شد.

بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از داده‌های نشانگر ISSR، کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های خوسف-زرنند، نهبندان-زرنند و بیرجند-زرنند و بر اساس SCoT، کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های بیرجند-بهباباد، خوسف-زرنند و بیرجند-یزد به‌دست آمد. این امر نشان می‌دهد فاصله‌ی ژنتیکی از فاصله‌ی جغرافیایی تبعیت نموده است. بر اساس نشانگر ISSR متوسط ضریب تشابه در درون جمعیت‌های یک استان (خراسان جنوبی) = ۰/۶۱، کرمان = ۰/۵۷ و یزد = ۰/۶۰ بیشتر از متوسط ضریب تشابه بین جمعیت‌های دو استان (خراسان جنوبی-کرمان = ۰/۵۴، خراسان جنوبی-یزد = ۰/۵۲، کرمان-یزد = ۰/۵۵) بود. بر اساس نشانگر SCoT نیز متوسط ضریب تشابه درون جمعیت‌های یک استان (خراسان جنوبی) = ۰/۶۲، کرمان = ۰/۵۵ و یزد = ۰/۵۷ بیشتر از متوسط ضریب تشابه بین جمعیت‌های دو استان (خراسان جنوبی-کرمان = ۰/۵۶، خراسان جنوبی-یزد = ۰/۳۸، کرمان-یزد = ۰/۵۳) بود. به‌طور کل مقدار تشابه درون استان‌ها بر اساس هر دو نشانگر بیشتر از مقدار تشابه بین استان‌ها بود و این به نوعی تبعیت فاصله ژنتیکی از جغرافیایی را تأیید نمود. در کل نشانگر ISSR در مقایسه SCoT، مقدار شباهت در جمعیت‌های درون هر استان را بیشتر برآورد نمود و لذا نشانگر بهتری از این حیث به نظر می‌رسند. تجزیه‌ی خوشه‌ای، جمعیت‌های گشنیز مورد مطالعه را به سه و چهار خوشه گروه‌بندی نمود. به‌طور کل جمعیت‌های متعلق به یک استان در یک خوشه و حتی یک زیرخوشه قرار گرفتند. البته موارد اندکی نیز دیده می‌شود که جمعیت‌های متعلق به استان‌های مختلف در خوشه‌های مشابه و جمعیت‌های متعلق به یک استان در خوشه‌های متفاوت قرار گرفتند. قرارگرفتن یک یا دو جمعیت از دو استان متفاوت در یک زیرخوشه بسیار اندک است. قرارگرفتن جمعیت‌های با

ژنوتیپ گشنیز (Choudhary et al., 2022)، ۷۰/۴۶ درصد چندشکلی و ۱۸ رقم گشنیز (Singh et al., 2013)، ۸۱/۱ درصد چندشکلی به‌دست آمد. تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر در مطالعات مختلف (Sharma et al., 2011; Pareek et al., 2019)، بیشتر از مطالعه‌ی کنونی گزارش شده است. شاخص PIC بزرگتر از ۰/۵ نشان‌دهنده‌ی نشانگری بسیار کارآمد، بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ نشانگری کارآمد و کمتر از ۰/۲۵ نشانگری با کارآمدی کم است (Wei et al., 2005). با توجه به آن‌که متوسط این شاخص در هر دو نشانگر در محدوده ۰/۲۵-۰/۵۰ بود، لذا در این مطالعه نشانگرها کارآمد بودند، اما بسیار کارآمد نبودند. آغازگرهایی که بیشترین مقدار PIC را ایجاد کنند، توانایی بیشتری در مشخص کردن فواصل ژنتیکی دارند و با توجه به اینکه شاخص PIC در آغازگرهای ISSR اندکی بیشتر از SCoT بود، لذا این نشانگر کارایی بالاتری در تمایز جمعیت‌ها داشت و آغازگر SC8، SC4، SC15 و SC15 بهترین آغازگرها در بین تمامی آغازگرها شناخته شدند (Thimmappaiah et al., 2009). مقادیر MI و RP در نشانگر ISSR نسبت به SCoT بیشتر بود. همه‌ی این شاخص‌ها به نوعی کارایی آغازگرهای به‌کاررفته در آزمایش و در نتیجه کارایی نشانگرها را نشان می‌دهند. MI برآوردی مناسبی از کارایی آغازگرها است که به تعداد باندهای چندشکل به‌دست آمده بستگی دارد و مقدار بالای آن نشان‌دهنده‌ی پوشش زیاد ژنوم با آغازگرهای به‌کاررفته است. زیاد بودن MI بیان‌کننده‌ی اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد بیشتر باند چندشکل است (Milbourne et al., 1997). بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص RP است، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. RP توانایی یک نشانگر در تفکیک جمعیت‌ها از هم را نشان می‌دهد و هر چه مقدار این شاخص بالاتر باشد، یعنی توانایی بیشتری در تمییز جمعیت‌ها از هم را دارد (Kayis et al., 2010). آغازگر IS17 و آغازگر SC11 با بالاترین شاخص RP به عنوان مناسب‌ترین آغازگرها شناخته شدند. با توجه به آن‌که

کارهای به‌نژادی آتی توصیه می‌گردد. در کل بهترین تلاقی جهت حصول حداکثر هتروزیس خوسف × زرنند شناخته شد. بر اساس داده‌های به‌دست آمده از دو نشانگر ISSR و SCoT، به‌ترتیب چهار و پنج مؤلفه در حدود ۵۰ درصد از واریانس کل را توجیه کردند که درستی انتخاب آغازگرها را مورد تایید قرار داد. در بررسی داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که آغازگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در سطح کل ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را پوشش دهند. در صورتی که آغازگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه به مؤلفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرات کل نیاز است (Mohammadi, 2006). نمودار پراکنش جمعیت‌ها نشان داد که توزیع جمعیت‌ها مشابه با توزیع آن‌ها در تحزیه خوشه‌ای و منطبق بر ماتریس تشابه بود. به‌عبارت دیگر نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی تا حد زیادی تأییدکننده‌ی هم بودند. پراکنده‌ی جمعیت‌ها در نواحی مختلف نمودار بار دیگر وجود تنوع ژنتیکی در گشنیز را تأیید نمود، لیکن با توجه به اینکه این نمودار بر اساس تمامی مؤلفه‌ها ترسیم نمی‌گردد، لذا از تمامی اطلاعات داده‌ها استفاده نمی‌نماید و بنابراین تجزیه خوشه‌ای که از تمامی اطلاعات استفاده می‌کند، گروه‌بندی کامل‌تر و جامع‌تری را نسبت به پراکنش داده‌ها (بر اساس دو مؤلفه) ارائه می‌دهد.

به‌طور کلی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه توانستند جمعیت‌ها را به خوبی از یکدیگر متمایز کنند و از نظر ویژگی‌های نشانگری کارایی مطلوبی نشان دادند. نشانگرهای ISSR کارایی بهتری در مقایسه با نشانگر SCoT داشتند. بررسی ماتریس‌های تشابه نشان داد که بین دو ماتریس حاصل از داده‌های دو نشانگر ارتباطی وجود نداشت که علت این امر شاید در تفاوت ماهیت نشانگرهای مورد استفاده باشد. نشانگرهای ISSR از نواحی تکراری ژنوم منشأ می‌گیرند، در حالی که نشانگرهای SCoT با بخش کدشونده‌ی ژنوم در ارتباط هستند. نشانگرهای حاضر تا حد زیادی از نظر تمایز جمعیت‌ها متناسب با موقعیت جغرافیایی آن‌ها موفق بودند و فاصله‌ی ژنتیکی تا

منشاء جغرافیایی مختلف در یک خوشه می‌تواند نشانه‌ای از تبادلات ژنتیکی بین مناطق مختلف (جابجایی بذور، اختلاط بذور و یا خاستگاه مشترک جمعیت‌ها) باشد که با توجه به ماهیت مصرفی گیاه گشنیز دور از انتظار نیست. در کل دوری و نزدیکی جغرافیایی باعث تبعیت قرابت ژنتیکی جمعیت‌های گشنیز از نزدیکی جغرافیایی گشته است (Pareek et al., 2011; Sharma et al., 2019; Choudhary et al., 2022; Al-Kordy et al., 2013). مجموع این نتایج نشان می‌دهند که نشانگرهای حاضر فواصل ژنتیکی را مطابق با فاصله جغرافیایی تخمین زده‌اند و بنابراین فرض جدایش به واسطه‌ی فاصله که توسط رایب مطرح گردید در تحقیق کنونی صدق می‌کند. مطالعه‌ی کنونی نشان داد که تنوع بین جمعیت‌های گشنیز بیشتر از درون جمعیت‌ها است و در این مورد نیز گزارش‌هایی وجود دارد که مطابق با نتایج مطالعه‌ی کنونی است (Diederichsen et al., 1996; Etesami et al., 2020). لیکن پژوهش‌هایی نیز وجود دارد که تنوع کمتری را بین جمعیت‌های گشنیز گزارش کرده‌اند (Pareek et al., 2011; López et al., 2009; Sharma et al., 2019; Al-Kordy et al., 2013). کمتر بودن تنوع درون جمعیت‌ها نسبت به بین جمعیت‌های گشنیز را با پایه ژنتیکی مشترک، تجارت بذر، دگرگشتی و مهارجرت (توسط انسان) این گیاه مرتبط دانسته‌اند (López et al., 2009).

یکی از روش‌های دستیابی به قدرت هتروزیس بالا استفاده از والدینی است که دارای کمترین خویشاوندی (مثل جمعیت‌های دو استان مختلف) باشند، زیرا والدین با فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر ایجاد کنند. با این توضیحات و بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان تلاقی اولیه‌ی جمعیت‌های نهپندان × زرنند، خوسف × زرنند، بیرجند × زرنند (بر اساس نشانگر ISSR) و بیرجند × بهاباد، خوسف × زرنند و بیرجند × یزد (بر اساس نشانگر SCoT) را به‌منظور ایجاد تنوع و بهره جستن از هتروزیس توصیه کرد. با دقت در نتایج فوق آشکار است که جمعیت زرنند کمترین شباهت ژنتیکی را در اکثر مواقع نسبت به سایر جمعیت‌ها دارد و لذا استفاده از این جمعیت در

جمعیت‌ها شناخته شدند. به این ترتیب می‌توان تلاقی جمعیت خوسف × زرنند را به‌منظور ایجاد تنوع و بهره‌جستن از هتروزیس توصیه نمود. پیشنهاد می‌گردد تا در مطالعات آینده جمعیت‌های استفاده شده با نشانگرهای بیشتری مورد مطالعه قرار گیرند و ارتباط بین صفات مورفولوژیکی، فنولوژیکی و کمی با نشانگرها مورد واکاوی قرار گیرد.

حد زیادی منطبق با فواصل جغرافیایی بود؛ لیکن در بعضی موارد این موضوع رعایت نشد که علت آن می‌تواند اختلاط بذور، انتقال خزانه‌زنی بین مکان‌ها یا همان جریان ژنی بین جمعیت‌ها و همچنین خاستگاه مشترک جمعیت‌ها باشد. بر اساس تمامی نتایج، جمعیت‌های خوسف و زرنند به عنوان دورترین و جمعیت‌های بافت و راور به عنوان نزدیک‌ترین

## References

- Aghaei, M.G.** (2021). *Cultivation and Production of Coriander Plant*. Publication of Agricultural Education. Karaj, IR (In Persian).
- Agrama, H. and Tuinstra, M.** (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology*, **2**: 334-340.
- Agriculture Jihad Organization.** (2024). *Nahavand Coriander has the Capacity to Register Nationally and Internationally*. Agricultural Jihad Organization of Hamadan Province, Agricultural Jihad of Nahavand. (In Persian).
- Ahmed, D.A., Tahir, N.A., Salih, S.H. and Talebi, R.** (2021). Genome diversity and population structure analysis of Iranian landrace and improved barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using arbitrary functional gene-based molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **68(3)**: 1045-1060.
- Al-Kordy, M., Abou El-Nasr, T. and Mahfouze, S.** (2013). Assessing phenotypic and molecular variability in coriander (*Coriandrum sativum* L.) cultivars. *Journal of Applied Sciences Research*, **9(6)**: 3880-3889.
- Botstein, D., White, R.L. and Skolnick, M.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**:314-322.
- Choudhary, S., Sharma, R., Jethra, G., Vishal, M.K and Tripathi, A.** (2019). Molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum*) using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, **89(2)**: 193-198.
- Choudhary, V., Verma, P., Sharma, S.C., Yadav, D.L. and Narolia, R.S.** (2022). Genetic divergence studies in coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes. *The Pharma Innovation Journal*, **11(12)**: 141-143.
- Cole, C.T.** (2003). Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**: 213-237.
- 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)**: 86-93.
- Daneshmand, H., Etmian, A. and Qaderi, A.** (2017). Diversity evaluation of *Trigonella foenum-graecum* populations using DNA markers and phytochemical characteristics. *Journal of Medicinal Plants*, **16(63)**: 119-132.
- Diederichsen, A., Heller, J. and Engels, J.** (1996). *Coriander. Coriandrum sativum* L. *Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 3. The International Plant Genetic Resource Institute (IPGRI) Publication, Via di San Domenico, Rome, IT.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*, **19**: 11-15.
- Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J. and Aelaie, M.** (2021). study of genetic diversity of *Glycyrrhiza glabra* L. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **8(1)**: 81-94 (In Persian).
- Etesami, M.J, Naji, A.M. and Rezazadeh, A.R.** (2020). Study of genetic diversity of coriander indigenous populations using SCoT molecular marker. *7<sup>th</sup> National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran*, Tehran, Iran (In Persian).
- Furan, M.A. and Gebologlu, M.D.** (2017). Assessment of genetic variation on some cultivated Turkish coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties based on ISSR and SRAP markers. *Journal of Agriculture Science*, **27(2)**: 245-251.
- Garrido-Cardenas, J.A., Mesa-Valle, C. and Manzano-Agugliaro, F.** (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, **247(3)**: 543 -557.
- Harvey, A.L.** (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **13(19-20)**: 894-901.
- Hosseini, S., Rahgozar, M.R. and Badakhshan, H.** (2022). Study of genetic diversity of some *Allium* L. species based on ISSR markers in Kurdistan province. *Plant Genetic Researches*, **8(2)**: 57-68 (In Persian).

- Kayis, S.A., Hakki, E.E. and Pinarkara, E.** (2010). Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, **5(21)**: 2925-2933.
- Keykhosravi, H., Dehdari, M. and Masoumiasl, A.** (2017). Evaluation of genetic diversity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes using ISSR markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **9(2)**: 127-141.
- Khodayari, H., Dolatian, L. and Mohammadi, A.** (2017). The genetic diversity survey of the *Ficus* L. genus in Iran using inter simple sequence repeats markers. *Plant Genetic Researches*, **4(1)**: 51-62 (In Persian).
- Khorshidi, J., Shokrpour, M. and Nazeri, V.** (2018). Assessment of genetic diversity in different populations of *Thymus daenensis* Celak. using ISSR marker. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **10(2)**: 59-74.
- Lewontin, R.C.** (1972). The Apportionment of Human Diversity. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., and Steere W.C., Eds., *Evolutionary Biology*, pp. 381-398, Springer, New York, NY, USA.
- López, P., Widrlechner, M., Simon, P., Rai, S., Bailey, T. and Gardner, C.** (2009). Applying molecular markers in coriander populations with diverse geographical origins. *Paper presented at the Proceedings of the XIII National Congress of Mexican Society of Horticultural Sciences*, Torreon, Coahuila, MX.
- Mao, R., Xia, P., Liu, J., Li, X., Han, R., Liu, F. and Liang, Z.** (2018). Genetic diversity and population structure assessment of Chinese *Senna obtusifolia* L. by molecular markers and morphological traits of seed. *Acta Physiologiae Plantarum*, **40(1)**: 1-14.
- Melo, R.A., Resende, L.V., Menezes, D., Beck, A.P.A., Costa, J.C., Coutinho, A.E. and Nascimento, A.V.S.** (2011). Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers. *Horticultura Brasileira*, **29**: 526-530.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R.** (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Plant Breeding*, **3**: 127-136.
- Mishra, M.K., Huded, A.K.C. and Jingade, P.** (2020). Assessment of the suitability of molecular SCoT markers for genetic analysis of coffee species. *Botanica*, **26(2)**: 184-196.
- Mohammadi, S.A.** (2006). The analysis of molecular data from the point of view of studying genetic diversity. *9<sup>th</sup> Iranian Congress of Crop Science and Plant Breeding*, University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian).
- Nadi, S., Saba, J., Jafaraghae, M. and Andalibi, B.** (2024). Study of genetic diversity among coriander populations (*Coriandrum sativum* L.) using ISSR markers. *Modern Genetics Journal*, **18(4)**: 397-405 (In Persian).
- Pakray, S., Mehras Mehrabi, A. and Etminan, A.R.** (2017). Study of genetic diversity of native population and 17 different bean cultivars using CBDP, ISSR and SCOT molecular markers. *National Conference on Modern Research in Agricultural Engineering, Environment and Natural Resources*, Karaj, Iran (In Persian).
- Pareek, N., Jakhar, M.L. and 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*, **1(4)**: 206-215.
- Pareek, N., Jakhar, M.L. and Malik, C.P.** (2013). A comparative analysis of RAPD and ISSR markers for studying genetic diversity among coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Phytomorphology*, **63(2)**: 1-9.
- Pishghadam Nilabad, S.** (2019). The use of molecular markers to evaluate genetic diversity of camelthorn (*Alhagi maurorum*) ecotypes in Razavi, Northern and Southern Khorasan provinces. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Master of Science in Engineering of plant breeding. University of Birjand, Birjand, IR (In Persian).
- Pullaiah, T., Bahadur, B. and Krishnamurthy, K.** (2015). *Plant Biodiversity*. In: Bahadur, B., Rajam, M.V., Sahijram, L. and Krishnamurthy, K.V., Eds., *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, Springer. pp. 177-195. Springer New Delhi, IN.
- Rao, V.R. and Hodgkin, T.** (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **68(1)**: 1-19.
- Sankhla, A.K., Malik, C. and Parashar, M.** (2015). A review on start codon targeted (SCoT) marker. *Journal of Plant Science Research*, **31(2)**: 153-160.
- Sharma, A., Rajpurohit, D., Jain, D., Verma, P. and Joshi, A.** (2019). Molecular characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **8(3)**: 4770-4775.
- Shemshadi, A.** (2017). Investigating Iran's position in the trade of medicinal plants and their products with emphasis on competitive advantage. *International Conference on Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine*, Mashhad, Payam Noor University of Khorasan Razavi, Mashhad, Iran (In Persian).
- Shiri Rostami, K., Moradi, H. and Haddani Nejad, M.** (2019). Evaluation of genetic diversity of a number of thornless black raspberry genotypes using ISSR molecular markers. *2nd international and 6<sup>th</sup> national Conference on Organic va. Conventional Agriculture*, Ardabil, Iran (In Persian).

- Shivaprasad, M.K.** (2017). Genetic divergence studies in coriander (*Coriandrum sativum* L.) Ph.D. Thesis. Department of Vegetable Science. Chaudhary Charan Singh Harayana Agricultural University, Hisar, Rajasthan, India.
- Singh, R.K., Verma, S.S., Meena, R.S. and Kumar, R.** (2013). Characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties using SDS-PAGE and RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, **12(11)**: 1189-1195.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S.** (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120(3)**: 411-417.
- Tomar Rukam, S., Kulkarni, G.U., Parakhia M.V., Thakkar, J.R., Rathod, V.M., Solanki, R.K. and Golakiya, B.A.** (2014). Genetic diversity analysis in coriander (*Coriandrum sativum*) genotypes through morphological and molecular characterization. *Research Journal Biotechnology*, **9**:1-11.
- Vais Karami, S., Badakhshan, H. and Pezekshpour, P.** (2016). Study of genetic diversity of lentil genotypes (*Lens culinaris* Medik) using SCoT molecular markers. *6<sup>th</sup> National Conference on Iranian Beans*, Khorramabad, Iran (In Persian).
- Verma, S. and Singh, S.** (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, **2(2)**: 347-350.
- Wei, Y.M., Hou, Y.C. and Yan, Z.H.** (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, **46**: 3-9.
- Zabet, M., Pishghadam, S. and Alizadeh, Z.** (2023). Evaluation of genetic diversity of *Alhagi maurorum* ecotypes using ISSR and SCoT markers in Razavi, Northern and Southern Khorasan provinces. *Agricultural Biotechnology Journal*, **15(1)**: 81-106 (In Persian).