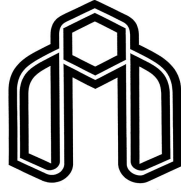


به نام خداوند جان

و

خرد



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده مهندسی کشاورزی

رشته زراعت گرایش بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد

معرفی و ارزیابی تکثیر نشانگر EST-SSR در گیاه کنجد

نگارنده: سحر قاسمی

استاد راهنما

دکتر مهدیه پارسائیان

اساتید مشاور

دکتر جعفر امانی

دکتر ناصر فرخی

شهریور 1395

دانشگاه شاهرود

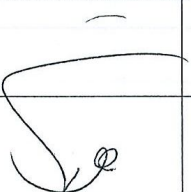

دانشکده کشاورزی

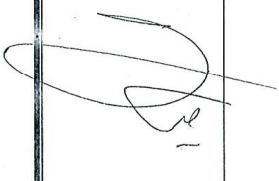
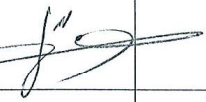

گروه :

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/ خانم سحر قاسمی به شماره دانشجویی: ۹۲۱۱۰۲۴

تحت عنوان: معرفی و ارزیابی تکثیر نشانگر EST-SSR در گیاه کنجد

در تاریخ ... توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد رشته ... مورد ارزیابی و با درجه ... مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی : دکتر جعفر امانی		نام و نام خانوادگی : دکتر مهدیه پارسائیان
	نام و نام خانوادگی : دکتر ناصر فرخی		نام و نام خانوادگی : -

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی : دکتر پرویز حیدری		نام و نام خانوادگی : دکتر شاهرخ قرنجیک
			نام و نام خانوادگی : دکتر شیده موجولو

این اثر را تقدیم می‌کنم به :

پدر فداکارم؛ پشتیبان تمام مراحل زندگی‌ام

و

مادر مهربانم ؛ دلسوز و همراه لحظاتم.

و نیز

تقدیم به پویندگان راه دانش که تلاششان، در جهت آسایش بشر است.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که آفریننده‌ای است بی همتا

منت خدای را عزوجل، که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت.

از دست و زبان که برآید کز عهده شکرش به در آید

پس از دوست، که هر چه دارم از اوست، از خانواده عزیزم که همواره در کنارم و پشتیبانم بودند سپاسگزاری میکنم. از استاد راهنمای گرامی سرکار خانم دکتر مهدیه پارساییان که صمیمانه مرا در این کار یاری کردند و نیز اساتید محترم، آقایان دکتر جعفر امانی و دکتر ناصر فرخی که مشاوره این پایان‌نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم. از داوران گرامی، جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و سرکار خانم شیده موجرلو که پیشنهادات و نکته‌های مهم خود را ارائه کردند سپاسگزارم.

همچنین وظیفه خود می‌دانم از مسئولین آزمایشگاه‌ها، آقایان مهندس شاکری، مهندس مطهری-نژاد، مهندس حسینی و نیز تمامی دوستان عزیزم و نیز خانم مهندس عصمت اشعار قدیم و تمام کسانی که در این راه یاری رسان بوده‌اند قدردانی کنم.

سحر قاسمی

شهریور ۱۳۹۵

تعهد نامه

اینجانب سحر قاسمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه معرفی و ارزیابی تکثیر نشانگر EST-SSR در گیاه کنجد تحت راهنمایی دکتر مهدیه پارسائیان متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

در مطالعه حاضر، تعداد 22 ژنوتیپ کنجد (*Sesamum indicum* L.) جمع‌آوری شده از کشورهای آسیایی مختلف مانند چین، هند، پاکستان، عراق و ایران توسط 15 آغازگر از نشانگر EST-SSR و نیز 10 صفت زراعی-مورفولوژیک و 10 صفت مرتبط با خصوصیات کیفی دانه برای بررسی تنوع ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYSpc2.10 و الگوریتم UPGMA برای میانگین داده‌های استاندارد شده صفات زراعی و کیفی و ماتریس صفر و یک داده‌های مولکولی انجام شد. دندروگرام حاصل از داده‌های زراعی، ژنوتیپ‌ها را به 6 گروه تقسیم نمود. همچنین ژنوتیپ‌ها از نظر خصوصیات کیفی دانه در 3 گروه جداگانه تقسیم‌بندی گردیدند. در بخش مولکولی، در مجموع 48 آلل توسط آغازگرهای مورد استفاده با متوسط 1 تا 6 آلل در هر مکان ژنی تولید شد. 14 آغازگر از 15 آغازگر مورد استفاده در واکنش PCR، 93/33 درصد چندشکلی نشان دادند. میانگین اندازه آلل‌ها از 190 تا 750 جفت باز متغیر بود. دندروگرام حاصل از تجزیه داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌های مورد آزمایش را به پنج گروه تقسیم‌بندی کرد. ضریب تشابه ژنتیکی محاسبه شده توسط روش تطابق ساده، طیفی از 0/510 تا 0/918 را نشان داد. کمترین میزان شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پاکستان و چینی و بیشترین میزان شباهت بین ژنوتیپ‌های پنجاب 89 و TN₂₃₄ بود. آغازگر ZM-45 از بیشترین مقدار شاخص SI برخوردار بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار با میزان 0/67 و نیز بیشترین آلل‌های مؤثر (Ne) با میزان 2/90 به آغازگر SEM-434 تعلق داشت. نظر به تنوع بالای ژنوتیپ‌های مورد آزمایش از لحاظ خصوصیات زراعی-مورفولوژیک، کیفی و مولکولی، توصیه می‌شود استراتژی‌های اصلاحی در جهت بهره‌برداری از این تنوع صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: کنجد، تنوع ژنتیکی، نشانگر EST-SSR

مقاله مستخرج از پایان نامه

بهینه‌سازی استخراج DNA ژنومی از گیاه کنجد (*Sesamum indicum*). دومین کنگره بین‌المللی و چهاردهمین کنگره ملی ژنتیک ایران. تهران. خرداد 95.

سحر قاسمی، مهدیه پارساییان، جعفر امانی، ناصر فرخی

فهرست مطالب

1	فصل اول: مقدمه و کلیات
2	1-1 مقدمه
3	2-1 گیاهشناسی و زیست شناسی
6	3-1 خاستگاه
7	4-1 تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها
9	5-1 نشانگرهای ژنتیکی
10	1-5-1 نشانگرهای مورفولوژیک
10	2-5-1 نشانگرهای مولکولی
11	1-2-5-1 نشانگرهای پروتئینی یا بیوشیمیایی
11	2-2-5-1 نشانگرهای DNA
12	1-2-2-5-1 نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون
13	2-2-2-5-1 نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)
14	6-1 ریزماهورها (میکروستلایت)
15	1-6-1 توالی‌های نشانمند بیان شده (ESTs)
17	2-6-1 نشانگرهای EST-SSR
21	فصل دوم: مروری بر منابع
22	1-2 مطالعات پیشین
31	فصل سوم- مواد و روش‌ها

32	مواد، وسایل و روش‌ها.....
32	1-3 نمونه‌های گیاهی و صفات مورد بررسی.....
34	2-3 مواد و محلول‌ها.....
34	3-3 وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی.....
34	4-3 محلول‌های مورد نیاز.....
34	1-4-3 بافر استخراج.....
35	2-4-3 محلول اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید 0/5 مولار (EDTA, 0.5 M, pH=8).....
35	3-4-3 محلول کلرید سدیم 5 مولار (NaCl, 5 M).....
35	4-4-3 محلول استات سدیم 3/2 مولار (C ₂ H ₃ NaO ₂ , 3.2 M, pH= 5.4).....
35	5-4-3 محلول بافر TBE.....
36	5-3 استخراج DNA از بافت برگ.....
37	6-3 بررسی کمیت و کیفیت DNA.....
37	1-6-3 تعیین کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری.....
37	2-6-3 تعیین کیفیت DNA بر روی ژل آگارز و الکتروفورز افقی.....
38	7-3 واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).....
39	8-3 الگوی دمایی.....
40	9-3 الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید.....
40	1-9-3 آماده‌سازی ژل پلی‌اکریل‌آمید و انجام الکتروفورز.....
40	2-9-3 رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید.....
41	10-3 تجزیه داده‌ها.....

43 فصل چهارم- نتایج و بحث
44 1-4 نتایج
44 1-1-4 بهینه‌سازی استخراج DNA
45 2-1-4 تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیک و زراعی
48 3-1-4 تجزیه و تحلیل داده‌های کیفی
53 4-1-4 نتایج داده‌های مولکولی
53 1-4-1-4 ضریب تشابه ژنتیکی و آنالیز خوشه‌ای
57 2-4-1-4 نتایج حاصل از آزمون منتل
59 2-4-1-4 نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی
63 2-4 بحث و نتیجه‌گیری
67 3-4 پیشنهادات
69 منابع

فهرست اشکال

- شکل 1-1 طراحی آغازگر SEM-428 از نواحی مجاور ریزماهواره..... ۱۸
- شکل 4-1 الکتروفورز DNAهای استخراج شده از نمونه برگي در ژل آگارز 1%..... 45
- شکل 4-2 الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با پرایمر 18SRRNA روی ژل آگارز 1%..... 45
- شکل 4-3 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی بر اساس صفت زراعی و مورفولوژیک..... 46
- شکل 4-4 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی بر اساس صفت کیفی..... 49
- شکل 4-5 دو نمونه از الگوی باندي بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد..... 53
- شکل 4-6 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در نرم افزار NTSYSPC نسخه 2.10..... 57
- شکل 4-7 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مورفولوژیک-زراعی و کیفی..... 58
- شکل 4-8 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مورفولوژیک-زراعی و مولکولی..... 59
- شکل 4-9 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مولکولی و کیفی..... 59
- شکل 4-10 پلات دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی..... 61

فهرست جداول

- جدول 1-1 بیشترین ESTهای ثبت شده بانک اطلاعاتی GENBANK در 13 ژنوم مختلف جانوری و گیاهی تا ماه ژانویه 2013..... 17
- جدول 3-1 ژنوتیپها و محل جمع‌آوری کنجد مورد مطالعه..... 33
- جدول 3-2 توالی جفت آغازگرهای مورد آزمایش..... 39
- جدول 3-3 محلول‌های رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید..... 41
- جدول 4-1 میانگین صفات زراعی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای..... 48
- جدول 4-2 بیشترین و کمترین مقادیر صفات کیفی در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش..... 50
- جدول 4-3 میانگین داده‌های صفات مورفولوژیک-زراعی..... 51
- جدول 4-4 میانگین داده‌های صفات کیفی..... 52
- جدول 4-5 میزان ضریب تشابه ژنتیکی تطابق ساده بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش..... 56
- جدول 4-1 ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مولکولی، مورفولوژیک-زراعی و کیفی..... 58
- جدول 4-7 داده‌های حاصل از تجزیه به مختصات اصلی..... 60
- جدول 4-8 داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد استفاده..... 63

فصل اول

مقدمه و کلیات

1-1 مقدمه

کنجد زراعی (*Sesamum indicum* L.)، یکی از مهمترین گیاهان دانه روغنی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است (Ashri, 1998) که به خاطر کیفیت بالای روغن دانه آن بسیار با ارزش می باشد. دانه کنجد شامل مجموعه ای از مواد مغذی مانند پروتئین ها، کربوهیدرات ها، اسیدهای چرب اشباع نشده (PUFA)¹، آنتی اکسیدان هایی (Namiki, 1995) مانند سزامین، سزامینول، سزامول و سزامولینال و اسکوالن² (Mohamed and Awatif, 1998)، توکوفرول، فیتواسترول ها، فیتات ها و دیگر عناصر ریزمغذی می باشد. حضور این مواد، کیفیت نگهداری روغن را با جلوگیری از فساد اکسیداتیو افزایش می دهد. از مهمترین مزایای مصرف دانه این گیاه می توان به خواص آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد حساسیت های شدید و بازدارندگی تومور آن اشاره نمود که با وجود ارزش غذایی، تاریخی و کشاورزی کنجد، پژوهش های انجام شده بر روی این گیاه ناچیز است.

اطلاعات کافی در زمینه تنوع ژنتیکی و ارتباط بین جمعیت ها جهت پیشرفت برنامه های اصلاحی این گیاه ضروری است (Ganesh and Thangavelu, 1995). تنوع ژنتیکی در گونه های گیاهی را می توان با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، زراعی، آنالیز آیزوزایم ها و نشانگرهای DNA تعیین کرد (Liu, 1997; Reiter *et al.*, 1993). خصوصیات مورفولوژیکی و زراعی تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و بنابراین وابسته به شرایط دوره کشت می باشند. در حالی که، نشانگرهای DNA بر این محدودیت غلبه کرده اند و به طوری که متاثر از محیط نیستند.

منابع محدودی در مورد استفاده از نشانگرهای مولکولی، مانند آیزوزایم (Isshiki and Umezaki, 1997)، RAPD (Bhat *et al.*, 1999)، ISSR (Kim *et al.*, 2002)، AFLP (Uzun *et al.*, 2003) و SSR (Dixit

¹- Polyunsaturated fatty acids

²- Squalene (هیدروکربن غیر اشباع موجود در روغن کبد بسیاری از ماهی های درنده مانند کوسه)

(et al., 2005) در گیاه کنجد در دسترس می‌باشد. تاکنون تلاش‌هایی در زمینه بررسی ویژگی‌های متعدد این گیاه دانه روغنی و ارزیابی تنوع گونه زراعی و خویشاوندان وحشی آن در کشورهای مختلف صورت گرفته است. با این حال، اطلاعات در زمینه تنوع ژنتیکی در این گیاه اندک است. دستکاری ژنتیکی این گیاه به همراه دیگر استراتژی‌ها، توسعه کشت گونه‌های با ارزش غذایی بالا و کاربردی را فراهم خواهد کرد. هدف ما در این مطالعه، یافتن غیر یکنواختی موجود در ارقام زراعی این گیاه و ایجاد انگیزه برای تحقیقات بر روی گیاهان دانه روغنی با ارزش است.

2-1 گیاهشناسی و زیست‌شناسی

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین گیاهان دانه روغنی است (Mabberley, 1997). گیاهی است دولپه، دیپلوئید ($2n=26$)، معمولا خودگشن (Pathirana, 1994) و از خانواده *Pedaliaceae* که شامل 16 جنس و 60 گونه است (Ashri, 1998). مهم‌ترین جنس از این خانواده جنس *Sesamum* می‌باشد. دانه بسیار مغذی کنجد حاوی مقادیر بالایی روغن ($34/4$ تا $63/2$ درصد)، پروتئین (17 تا 32 درصد) و نیز عناصر معدنی و ویتامین‌های محلول در چربی است. تنوع زیادی در *Sesamum indicum* L. از نظر اندازه، شکل و رنگ گل و نیز اندازه، رنگ و ترکیبات دانه وجود دارد. بعضی ارقام دارای شاخه‌های بسیار منشعب و بعضی دیگر بدون انشعاب هستند (Peter, 2004).

ارتفاع گیاه کنجد، بسته به شرایط محیطی، معمولا $0/5$ تا $4/5$ متر و طول برگ‌های این گیاه معمولا بین $2/5$ تا $7/5$ سانتی‌متر، با سطحی صاف و ساده یا سه لوبی است. گل‌ها سفید، صورتی یا صورتی مایل به ارغوانی هستند. در کل ارقام غیر منشعب زودتر وارد فاز گلدهی می‌شوند. رنگ برگ‌های بالغ و ساقه‌ها از سبز به زرد تغییر می‌کند. گل‌های زنگوله‌ای شکل سفید تا سرخ کم‌رنگ 6 تا 8 هفته پس از کاشت، در زاویه برگ‌ها ظاهر شده و این روند تا چند هفته ادامه خواهد داشت. کاسه گل، کوچک و پنج بخشی و

گلبرگ، لوله‌ای و زنگوله‌ای شکل و پنج تایی است و تقریباً 3 سانتی‌متر طول دارد. گلبرگ پایینی بلندتر و به شکل لب پایینی است. سطح خارجی و داخلی گلبرگ رنگی است و رنگ‌هایی از طیف سفید تا صورتی، بنفش و قرمز دارد. در هر گل پنج پرچم وجود دارد که در داخل و بین گلبرگ‌ها هستند. دمای کمتر از 15 و بیشتر از 40 درجه سانتی‌گراد منجر به عقیمی گرده‌ها شده و باروری و تشکیل دانه را کاهش می‌دهد. میوه کنجد از نوع کپسول، دوک مانند، چهارگوش و دارای 4 حجره است و $1/5$ تا 5 سانتی‌متر طول دارد. طول کپسول می‌تواند از $2/5$ تا 8 و قطر آن $0/5$ تا 2 سانتی‌متر و تعداد حجره‌ها از 4 تا 12 باشد. دانه‌های کنجد سیاه، قهوه‌ای یا سفید هستند؛ $2/5$ تا 3 میلی‌متر طول و تقریباً $1/5$ میلی‌متر عرض دارند (Wiley, 2005). کنجد را برای دانه‌اش، روغن با ارزش و شیره آن کشت می‌کنند و همچنین دانه آن در نان و کیک استفاده می‌شود.

کنجد به عنوان یک منبع فوق‌العاده غنی و مفید پروتئین در بسیاری از کشورهای در حال توسعه مورد استفاده می‌باشد (Uzun *et al.*, 2002). دانه‌های کنجد حاوی 50 تا 60 درصد روغن است و به دلیل وجود لیگنان‌های اختصاصی (sesamin, sesamol, sesaminol و sesamolol) آن و نیز کمیت و کیفیت بالای روغن به‌عنوان ملکه دانه‌های روغنی شناخته شده است (Bedigian, 2000). ترکیب رضایت‌بخش اسیدهای چرب به همراه حضور آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و منحصر به فرد، روغن این گیاه را در لیست یکی از پایدارترین و با کیفیت‌ترین روغن‌های خوراکی جهان قرار داده است (Bedigian, 2003; Cheung, 2007). محتوای پروتئین دانه کنجد تقریباً 35% است و غنی از تریپتوفان، متیونین و کلسیم ($1/3\%$) و منبع با ارزش مواد معدنی است (Johnson, *et al.* 1979). بنابراین، دانه‌های کنجد که حاوی مقادیر بالای مواد مغذی هستند، به عنوان یک ماده غذایی سنتی سالم، به دلیل اثرات ضد فشار خون، ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن مصرف می‌شود (Nakano *et al.*, 2008; Yokota *et al.*, 2007; Hsu, *et al.*, 2005; Lee, *et al.*, 2004).

کنجد، علاوه بر اثرات مفیدی که بر روی جانوران دارد، آثار قابل توجهی نیز بر روی میکروارگانیسم‌ها دارد. به‌عنوان مثال کشت کنجد و ارزن مرواریدی در کنار یکدیگر منجر به کاهش تعداد ریشه‌های پارازیت *Striga hermonthica* L. (علف هرز جاروک) می‌شود (Hess and Dodo, 2004). همچنین بر روی باکتری گرم منفی *Klebsiella* sp که موجب بیماری عفونت ادراری در انسان می‌شود، تاثیر ضد میکروبی دارد (Costa, et al. 2007). لئورنتین و همکاران (2007) نیز، اثر ضد قارچی کنجد را بر روی پاتوژن‌های قارچی گیاهی *Fusarium oxysporum* f. sp. و *Macrophomina phaseolina* نشان دادند (Laurentin et al, 2007).

دانه‌های روغنی مانند بادام زمینی، کنجد، سویا و کلزا، منابع خوب روغن، پروتئین، قند، مواد معدنی و حتی ویتامین‌ها هستند. در نتیجه به طور مستقیم و یا به صورت غیر مستقیم به عنوان مواد تشکیل دهنده دیگر مواد غذایی مصرف می‌شوند.

عمدتاً، کنجد در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بیش از 50 کشور جهان از قاره آسیا، آفریقا تا آمریکای جنوبی و اقیانوسیه به صورت تجاری کشت می‌گردد (Ashri, 1998). بر اساس آمار سازمان غذا و کشاورزی (FAO, 2012)، سطح کشت جهانی این گیاه با مساحت تقریبی 7/9 میلیون هکتار و تولید سالانه 4036289 تن بوده است که کشور ما با سطح کشت 40 هزار هکتار و تولید سالانه 28000 تن سهم قابل توجهی را در این تولید به خود اختصاص نداده است. در سال 2011، بزرگترین تولید کننده و صادر کننده دانه کنجد میانمار بود و پس از آن هند، چین، اتیوپی، نیجریه و اوگاندا رتبه‌های بعدی را به خود اختصاص دادند (FAO, 2011). چین بزرگترین مصرف کننده کنجد در جهان است و 70 درصد از محصول کنجد جهان در آسیا و سپس آفریقا کشت می‌شود.

3-1 خاستگاه

خاکستر دانه کنجد متعلق به حدود 5000 سال پیش، در حفاری‌های باستان‌شناسی هاراپا¹ پیدا شد (Fuller, 2003). از زمان‌های قدیم، منشاء کشت کنجد، اجداد و اهلیت‌ش یک موضوع مورد بحث بوده است. در گذشته اعتقاد بر این بود که اکثر گونه‌های وحشی از جنس *Sesamum* و بومی صحرای آفریقا هستند (Ihlenfeldt & Grabow.S, 1979). پس از انجام مطالعات بیشتر و آنالیزهای تنوع لیگنان، این تصور که کنجد دارای اجداد آفریقایی بوده و بر اساس تلاقی بین گونه‌ای اهلی شده است، مورد تایید قرار گرفت و بررسی‌های بیشتر نشان می‌دهد که کشت کنجد از جمعیت‌های وحشی بومی شبه قاره هند، شبه جزیره غربی هند و بخش‌هایی از پاکستان و ایران مشتق شده است (Bedigian, 2003) (Bedigian, 1988; Bedigian, 2003; Khidir, 1980; Mohamed & Awatif, 1998). هند خاستگاه کنجد باشد، چراکه در آنجا حداکثر تنوع این گیاه وجود دارد. تنوع گسترده‌ای در ژرم-پلاسم‌های کنجد برای صفات مختلف مانند ارتفاع بوته، الگوی انشعاب، شکل برگ، تعداد کپسول موجود در زاویه² بین شاخه با برگ، تعداد دانه در کپسول، وزن هزاردانه، درصد روغن، رنگ دانه، مقاومت به آفات و بیماری و غیره وجود دارد. وجود تنوع بالای نمونه‌های کنجد جمع‌آوری شده از مناطق اقلیمی مختلف هند، با استفاده از نشانگر چند شکلی تصادفی DNA تکثیر شده (RAPD)، بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این گیاه در هند و تاییدی بر خاستگاه بودن این کشور دارد. (Bhat, et al., 1999).

بدیجیان² (2003)، در مطالعه‌ای نشان داد که گیاه کنجد اولین بار در هند اهلی شده و شواهد قانع‌کننده‌ای از خویشاوندی نزدیک مورفولوژیکی و سیتولوژیکی بین کنجد اهلی و *S. malabaricum* بومی جنوب هند ارائه کرد. کنجد و شکل وحشی آن، *S. malabaricum*، هر دو دیپلوئید بوده و دارای تعداد

¹ - Harappa

² - Bedigian

کروموزوم‌های (2n=26) مشترک هستند (Kumar & Hiremath, 2008; Hiremath & Patil, 1999;) و تلاقی‌های بین گونه‌ای آن‌ها نیز نتاج هیبرید بارور به همراه داشت (Harlan, 1992). مطالعات مولکولی با استفاده از نشانگر RAPD، رابطه نزدیک *S. indicum* را با این جد وحشی از شبه قاره هند نشان داد (Bhat *et al.*, 1999; Nanthakumar *et al.*, 2000). تحقیقات بیوشیمیایی لیگنان‌های سزامین و سزامولین در ژرم‌پلاسما هندی کنجد میزان لیگنان بالایی را در *S. malabaricum* و رقم کنجد Tamil Nadu, CO-1 نیز قرابت ژنتیکی دو گونه را نشان داد (Pathak *et al.*, 2013).

عملکرد پایین و ناپایدار اکثر دانه‌های روغنی، عدم اطمینان در بازگشت سرمایه و وجود تنش در پوشش گیاهی از دلایل عدم کشت مستمر دانه‌های روغنی به صورت دیم است که خود منجر به ایجاد شکاف زیاد در بازار عرضه و تقاضا می‌شود. تولید ارقام پرمحصول دانه‌های روغنی توسط بازسازی و دستکاری ساختار ژنتیکی برای به دست آوردن بازده اقتصادی از اهمیت زیادی برخوردار است (Pathak *et al.*, 2014). امروزه تلاش‌های فراوانی در کشورهای مختلف جهت گردآوری ذخایر ژنتیکی در حال کاهش این گیاه باستانی صورت گرفته و گام‌های موثری در زمینه‌ی به‌نژادی این گیاه برداشته شده‌است. با این حال روند تحقیقات انجام شده در ایران عمدتاً، به دلیل فقدان اطلاعات کافی در زمینه‌ی تنوع موجود در این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان دانه روغنی نسبتاً کند بوده است.

4-1 تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها

به غیر یکنواختی ساختار ژنوتیپی جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی گفته می‌شود. این غیر یکنواختی باعث واکنش‌های متفاوت جمعیت‌ها در محیط‌های مختلف می‌شود و توانایی زنده‌مانی و سازگاری جمعیت در مقابل شرایط نامساعد را افزایش می‌دهد. تنوع ژنتیکی لازمه برنامه‌های به‌نژادی گیاهی است و ماده اولیه

مطالعات ژنتیک جمعیت، تکامل و فیلوژنتیک می‌باشد. همچنین تعیین سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی، اطلاعات مفیدی برای برنامه‌های اصلاحی آن‌ها فراهم می‌کند (Mehlenbacher *et al.*, 1991). علاوه بر این، در مدیریت و حفاظت گونه‌ها، اطلاع از تنوع ژنتیکی ضروری است. یکنواختی ژنتیکی در گیاهان باعث آسیب‌پذیری آن‌ها در برابر اپیدمی‌ها و عوامل نامساعد محیطی می‌شود که در نتیجه باعث کاهش و افت عملکرد می‌گردد. همچنین شناسایی روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و افراد، امکان شناسایی ژن‌های عامل تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را از خویشاوندان وحشی فراهم می‌کند. بنابراین شرط لازم برای اصلاح و بهبود صفات گیاهی مهم، شناخت ساختار ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌ها است (Wang *et al.*, 2007).

آگاهی از تنوع ژنتیکی گام اولیه برای شناسایی و حفظ ذخایر توارثی، گسترش بازه‌ی ژنتیکی و نیز پایه‌ی اساسی برای تحقیقات ژنتیکی می‌باشد (Lavi *et al.*, 1994). در واقع اساس کار اکثر برنامه‌های به‌نژادی و میزان موفقیت آن‌ها، به وجود تنوع قابل قبول و متعاقب آن، گزینش وابسته است (Kumar, 2007; Schulman, 1999). بررسی تنوع نمونه‌های گیاهی موجود در مجموعه‌ها، اطلاعات مفیدی را در ارتباط با صفات گیاهی آشکار می‌کند که عمدتاً جهت گزینش والدین در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه است و به روش‌های مختلفی از جمله تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مورفولوژیک، زراعی، بیوشیمیایی، متابولیک و یا با استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزار ردیابی ژنوم قابل ارزیابی است (Henry, 2001; Kalendar *et al.*, 2011).

در فرآیند مطالعه تنوع ژنتیکی، تفاوت بین افراد، جمعیت‌ها و یا گروه‌ها با استفاده از روش‌ها و نرم‌افزارهای آماری و براساس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات مختلف، بررسی می‌شود. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده علاوه بر صفات مورفولوژیک، از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای مکمل استفاده می‌شود. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونه‌های گیاهی

می‌تواند اطلاعات اساسی برای برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت منابع ژنتیکی را فراهم کند. برای انتخاب والدین جهت انجام تلاقی‌های مطلوب و انتخاب روش‌های اصلاحی مناسب نیز اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها الزامی است (Kumar et al., 1999).

5-1 نشانگرهای ژنتیکی

تنوع ژنتیکی قابل اندازه‌گیری، برای گزینش، اهلی‌سازی کردن سریع و یا حفاظت جمعیت‌ها و گونه‌ها بسیار سودمند است و نشانگرهای ژنتیکی ابزارهای ضروری برای شناسایی و تشخیص سریع تنوع ژنتیکی هستند. نشانگرهای ژنتیکی، نواحی خاصی بر روی کروموزوم هستند که در آنالیز ژنوم به کار می‌روند. حتی صفاتی که تحت تأثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می‌کنند، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شوند. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسان‌های نخستین، حتی آن‌هایی که هنوز کشاورزی را فرانگرفته بودند و برای ادامه زندگی مجبور به جمع‌آوری بذر و میوه گیاهان بودند، بدون آن‌که خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناخت و تمایز انواع بذر، میوه و جانوران وحشی استفاده کرده و برخی را بر برخی دیگر ترجیح می‌دادند.

اما به صورت علمی، شاید مندل نخستین کسی بود که از نشانگرهای مورفولوژیک یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ¹ برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد (نقوی و همکاران، 1387). نشانگرها به طور کلی شامل دو گروه نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی می‌باشند.

¹ Phenotype based markers

1-5-1 نشانگرهای مورفولوژیک

این نشانگرها شامل صفات قابل مشاهده، مانند شکل برگ، رنگ گل، رنگ کرک، رنگ غلاف، رنگ دانه، شکل دانه، نوع و طول ریشک، شکل میوه، رنگ و نوار پوست، رنگ گوشت، طول ساقه و غیره می‌باشند. این نشانگرها نیز نشان‌دهنده چندشکلی ژنتیکی هستند که به راحتی قابل شناسایی و دستکاری می‌باشند (Jiang, 2013). آن‌ها معایب زیادی از جمله وجود حالت توارث غالب، اثرات اپیستازی¹ و پلیوتروپی² ژن‌های کنترل‌کننده، قرار گرفتن تحت تاثیر شرایط محیطی و مرحله رشد گیاه و پایین بودن فراوانی دارند. گاهی برای مشاهده و ثبت این نشانگرها باید منتظر ظهور آنها ماند، که در گیاهان چند ساله بسیار مشکل است. همچنین این مطلب که اساس ژنتیکی بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیک هنوز مشخص نیست، کاربرد آن‌ها را محدود کرده است (نقوی و همکاران، 1387).

2-5-1 نشانگرهای مولکولی

نشانگرهای مولکولی، به عنوان کاوشگرهای آزمایشگاهی برای یافتن و مشخص کردن یک فرد، بافت، سلول، هسته سلولی، کروموزوم یا ژن به کار می‌روند و به صورت اشکال مختلف آلی معرفی می‌شوند (Jiang, 2013). نشانگرهای مولکولی خود به دو گروه نشانگرهای پروتئینی و DNA تقسیم می‌شوند.

1-2-5-1 نشانگرهای پروتئینی یا بیوشیمیایی

نشانگرهای پروتئینی نیز ممکن است در گروه نشانگرهای مولکولی طبقه‌بندی شوند، هر چند که در سال‌های اخیر، این موضوع بیشتر به نشانگرهای DNA اشاره دارد. ایزوآنزیم‌ها، اشکال دیگر یا انواع ساختاری یک آنزیم هستند که وزن‌های مولکولی مختلف و تحرک الکتروفورتیک متفاوت، اما فعالیت یا

¹ Epistasy

² Pleiotropy

کارکرد کاتالیتیک مشابه دارند. وجود تفاوت در تحرک الکتروفورتیک در اثر جهش نقطه‌ای، به دلیل جایگزینی اسید آمینه می‌باشد (Xu, 2010). نشانگرهای آیزوزایم می‌توانند به طور ژنتیکی، بر روی کروموزوم‌ها نگاشته شوند و در نقشه ژنی ژن‌های دیگر نیز به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. کاربرد آنها در آزمون‌های خلوص ژنتیکی بذر و گاهی اوقات در اصلاح نباتات می‌باشد. تعداد کمی از ایزوآنزیم‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارند و برخی از آنها را می‌توان تنها با یک نژاد خاص شناسایی کرد. بنابراین، استفاده از نشانگرهای آنزیمی محدود است.

1-2-5-2 نشانگرهای DNA

نشانگرهای DNA، قطعاتی از DNA تکثیر شده هستند که جهش‌ها یا تفاوت‌ها را آشکار می‌کنند و می‌توانند برای شناسایی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها و یا آلل‌های مختلف یک ژن برای یک توالی خاص از DNA در یک جمعیت یا منبع ژن، مورد استفاده قرار گیرند. چنین قطعاتی مکان معین در ژنوم دارند و ممکن است با استفاده از برخی تکنولوژی‌های مولکولی شناسایی می‌شوند. به زبان ساده، نشانگر DNA یک ناحیه کوچک از توالی DNA می‌باشد که نشان دهنده چندشکلی بین افراد مختلف است (Jiang, 2013).

نظر به محدودیت تعداد نشانگرها و تاثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر صفات مورفولوژیک و پروتئین‌ها، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA، کاربرد گسترده‌ای در نقشه‌یابی ژن‌های مهم و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی داشته‌اند (Manifesto et al., 2001). این نشانگرها معمولاً تحت تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند، در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند و می‌توانند تفاوت‌های افراد را در سطح توالی-های نوکلئوتیدی مشخص نمایند (Bardakci, 2001). در یوکاریوت‌ها ردیف‌های رمزشونده فقط بخش

محدودی از DNA را تشکیل می‌دهند و بخش عمده DNA را ردیف‌های تکراری غیر رمزشونده تشکیل می‌دهند (نقوی و همکاران، 1387).

روش‌های نشانگری پایه را می‌توان به دو دسته روش‌های غیر مبتنی بر PCR یا روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون و روش‌های مبتنی بر PCR تقسیم کرد (Agrawal *et al.*, 2008).

1-2-2-5-1 نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر هیبریداسیون از اولین نشانگرهایی بودند که در مطالعات گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. چند شکلی طول قطعات برش یافته (RFLP)¹ و تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری (VNTR)²، نمونه‌هایی از نشانگرهای مبتنی بر هضم و هیبریداسیون هستند. این نشانگرها دارای چندشکلی نسبتاً زیادی می‌باشند، توارث هم‌بارز داشته و تکرار پذیری بالایی نشان می‌دهند. با این وجود به دلیل زمان‌بر بودن، نیاز به مواد رادیواکتیویته گران‌قیمت، سمیت و نیاز به DNA با کیفیت بالا، به طور گسترده مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. این محدودیت‌ها سبب شده است که روش‌های با پیچیدگی کمتر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند (Mondini *et al.*, 2009).

1-2-2-5-2 نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

پس از کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط مولیس³ و همکارانش (1987) نشانگرهای زیادی توسعه پیدا کردند. این تکنیک شامل تکثیر چندین قطعه DNA مجزا است که توالی‌های اطراف آنها بسیار مشابه آغازگر می‌باشد و این نواحی باید به قدر کافی به یکدیگر نزدیک باشند تا تکثیر انجام گیرد (Mondini *et al.*, 2009). از نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌توان به موارد

¹- Restriction Fragment Length Polymorphism

²- Variable Number Tandem Repeat

³- Mullis

زیر اشاره کرد:

تفاوت طول قطعات قابل تکثیر یا ¹ALP، تفاوت طول قطعات هضم شده حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز یا ²PBR، تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد یا ³SSCP، نشانگر چند شکلی تصادفی DNA تکثیر شده یا ⁴RAPD، انگشت نگاری با DNA تکثیر شده یا ⁵DAF، تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP)، ریز ماهواره ها⁶ و

نشانگرهای مولکولی بویژه آنهایی که متعلق به این گروه هستند، در بیشتر گیاهان زراعی به کار گرفته شدند. این نشانگرها، DNA ژنومی را در تمام مناطق بیان شونده یا غیر بیان شونده و همچنین بدون توجه به فعالیت بخش های ژنومی، مورد ارزیابی قرار می دهند. با این حال طی سال های اخیر، امکان تهیه نشانگرهای مبتنی بر مناطق شناخته شده ژنوم یا ژن ها فراهم شده است که به عنوان نشانگرهای کارکردی⁷ (Anderson and Lübberstedt 2003; Gupta and Rustgi 2004) نشانگرهای مولکولی وابسته به ژن (Varshney *et al.*, 2007) یا نشانگرهای مبتنی بر بیان ژن (West *et al.*, 2006) خوانده می شوند.

پیشتر، کاربرد نشانگرهای وابسته به ژن محدود به برخی از گونه های زراعی می شد، ولی معرفی فناوری های نسل جدید توالی یابی سبب گسترش نشانگرهای وابسته به ژن حتی در گونه های زراعی کمتر شناخته شده ای شد که فاقد اطلاعات ژنومی بودند (Varshney *et al.* 2009; Varshney 2010).

¹- Amplicon Length Polymorphism

²- PCR-Based RFLP

³- Single Strand Conformation Polymorphism

⁴- Random Amplified Polymorphism DNA

⁵- DNA Amplification Fingerprint

⁶- Microsatellites

⁷- Functional Markers

6-1 ریزماهورها (میکروستلایت)

توالی‌های ساده تکرارشونده یا SSRها¹، از نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشند که ریزماهورها یا ردیف‌های کوتاه تکراری² (STRs)، نقاط ریزماهوره نشانمند از ردیف³ (STMs)، تفاوت طول ردیف‌های ساده⁴ (SSLPs) و یا موتیف‌های با ردیف‌های ساده⁵ (SSMs) نیز نامیده می‌شوند.

از مزایای ریزماهورها، کاربرد و تفسیر نتایج نسبتاً ساده، سیستم چند آلی، تنوع بسیار بالا، وفور بالا در ژنوم یوکاریوت‌ها و هم‌پارز بودنشان است. امروزه ثابت شده است که نشانگرهای SSR، نشانگرهای مناسبی برای شناسایی و تشخیص هویت ارقام می‌باشند و در بین نشانگرهای موجود، انواع SSR مورد توجه‌ترین نشانگر برای شناسایی ژنوتیپ‌ها هستند (Bracci *et al.*, 2009).

در ابتدا عقیده بر این بود که نشانگرهای SSR عمدتاً از نواحی غیر کدشونده به دست می‌آیند، اما امروزه استفاده از توالی‌های نشانمند بیان شده یا ESTها⁶ به عنوان منبعی از نشانگرهای SSR این ایده را تغییر داده است و تکنولوژی ژنومیکس توجه خود را به توالی ژن‌هایی که بیان می‌شوند (ESTs) معطوف نموده است (فارسی و ذوالعلی، 1390). دسترسی به اطلاعات EST در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف، امکان تولید سریع و ارزان نشانگرهای ریزماهوره مبتنی بر ESTها را فراهم نموده است که برای یافتن نشانگرهای مولکولی یک گزینه عملی ارزان قیمت، با کیفیت بالا و در زمان اندک می‌باشد (Bhat, *et al.*, 2003; Gupta, *et al.*, 2005).

¹ - Simple Sequence Repeat

² - Short Tandem Repeats

³ - Sequence Tagged Microsatellite sites

⁴ - Simple Sequence Length Polymorphisms

⁵ - Simple Sequence Motifs

⁶ - Expressed Sequence Tags

1-6-1 توالی‌های نشانمند بیان شده (ESTs)

زمانی که توالی ژنومی یک موجود قابل دسترس باشد، مجموعه توالی‌های cDNA¹ ابزار مناسبی برای تشخیص ژن‌ها در توالی DNA خواهند بود. صدها جفت باز حاصل از توالی انتهای cDNA یا توالی قطعات کوچک همسانه‌سازی شده mRNA به عنوان EST شناخته می‌شوند. طول چنین قطعاتی با استفاده از روش‌های توالی‌یابی به دست می‌آید و در حدود 500 تا 800 نوکلئوتید است. با توجه به اینکه این قطعات DNA همسانه‌سازی شده مکمل mRNA هستند، لذا ESTها را می‌توان بخشی از ژن‌های بیان شده دانست. به طور کلی مشخصات این قطعات به عنوان توالی cDNA/ mRNA یا مکمل معکوس mRNA در بانک‌های اطلاعاتی ثبت می‌شود (Adams *et al.* 1991; Pontius *et al.* 2002).

فن‌آوری توالی‌یابی cDNA با بازدهی بالا از سال 1991 شروع شد. در این فن‌آوری انتخاب تصادفی همسانه‌های cDNA و توالی‌یابی در یک یا دو انتهای قطعات صورت می‌گیرد. بر این اساس واژه EST به گروه جدیدی از قطعات توالی‌یابی شده کوتاه و نسبتاً دقیق (کمتر از دو درصد خطا) اطلاق می‌شود. نیاز به تنها یکبار توالی‌یابی قطعات، از ویژگی‌های بارز و ارزشمند در معرفی این گروه از نشانگرهاست. در بیشتر موارد، نیازی به تشخیص و شناسایی همسانه‌ها وجود ندارد، بلکه تنها با استفاده از مقایسه بخش کوچکی از داده‌های توالی‌یابی شده با توالی‌های ژن‌های شناخته شده ESTهای دیگر، می‌توان اقدام به شناسایی همسانه نمود. همچنین بسیاری از همسانه‌ها به عنوان بخشی از نمونه‌های شناخته شده قبلی بوده و تنها تعداد معدودی از آنها حاوی تفاوت‌های بارزی می‌باشند. توجه به هزینه‌های توالی‌یابی با کیفیت مناسب به منظور تایید همسانه‌ها نیز از موارد قابل تامل است (Pontius *et al.*, 2002).

پس از بررسی‌های اولیه در مورد هزینه‌های تهیه EST و میزان کاربرد آن در ژنوم انسان، پروژه‌های

¹- Complementary DNA

مشابه بسیاری انجام و تعداد متنابهی EST در انسان معرفی شدند (Okubo *et al.*, 1992). علاوه بر آن پروژه‌های گسترده دیگری در مورد تهیه EST در موجودات دیگر نیز آغاز شد. در سال 1992 بانک اطلاعاتی dbEST به منظور جمع‌آوری اطلاعات ESTها ایجاد شد (Boguski *et al.*, 1993; Boguski *et al.*, 1994). ولی بعداً به صورت بخش EST در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شد (Benson *et al.*, 2002; Pontius *et al.*, 2002). بخش EST بانک اطلاعاتی GenBank حاوی حدود دو سوم تمامی ESTهای ثبت شده است. بیشترین ESTهای ثبت شده در این بانک اطلاعاتی تا ماه ژانویه 2013 حدود 74186692 توالی نشانمند بیان شده می‌باشد (جدول 1-1) (شاهین‌نیا و سید طباطبایی، 1392). در پروژه‌های گسترده توالی‌یابی ژنوم که هزاران EST به طور روزانه تولید می‌شوند، داده‌های تولید شده باید در یک فرآیند خودکار، ذخیره، دسته‌بندی و قابل تفسیر شوند. بنابراین باید برای انتقال داده‌ها از دستگاه توالی‌یاب به بانک اطلاعاتی یک دستورالعمل کارا، خودکار و دقیق تهیه و تنظیم شود. در چنین فرآیندی، لازم است ESTها به طور خودکار از بانک داده‌ها یا کروماتوگرام‌های حاصل از دستگاه توالی‌یاب دریافت شوند. پس از حذف توالی‌های نامناسب، داده‌های مطلوب گروه‌بندی شده و در کنار یکدیگر قرار گرفته تا توالی نهایی حاصل شود. در نهایت این توالی‌ها ترجمه شده و عملکرد آنها بر اساس مقایسه با DNAهای مختلف و پروتئین‌های مشابه مشخص می‌شود (Nagaraj *et al.*, 2006). پس از اینکه پلی‌پپتید فرضی به دست آمد، فعالیت آن بر مبنای توالی پروتئین‌های اصلی شناخته شده، موتیف‌ها و پروتئین‌های هم‌خانواده با استفاده از ابزار ترکیبی حاصل از مجموعه اطلاعات مانند (Zdobnov and Apweiler, InterProScan, 2001) پیش‌بینی می‌شود. توالی‌های پروتئینی الگوهای مناسب‌تری در تفسیر عملکردی هستند، به طوری که در تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه، تجزیه و تحلیل چند ژنی، تهیه کتابخانه‌های انگشت‌نگاری پروتئینی به منظور کاربردهای پروتئومیکس مورد استفاده قرار می‌گیرند.

جدول 1-1 بیشترین ESTهای ثبت شده بانک اطلاعاتی GenBank در 13 ژنوم مختلف جانوری و گیاهی تا ماه ژانویه 2013 *

تعداد	نام علمی
8704790	<i>Homo sapiens</i> (human)
4853570	<i>Mus musculus + domesticus</i> (mouse)
2019137	<i>Zea mays</i> (maize)
1669337	<i>Sus scrofa</i> (pig)
1559493	<i>Bos taurus</i> (cattle)
1529700	<i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress)
1488275	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)
1461722	<i>Glycine max</i> (soybean)
1286372	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)
1271480	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> (western clawed frog)
1253557	<i>Oryza sativa</i> (rice)
1205674	<i>Ciona intestinalis</i>
1162136	<i>Rattus norvegicus + sp.</i> (rat)

* (شاهین نیا و سید طباطبایی، 1392)

در این خصوص ابزارهای Pfam و SMART برای تجزیه و تحلیل دُمین و موتیف و همچنین ارائه

الگوی مناسب تفسیر عملکرد توالی‌ها، از کارایی بالایی برخوردارند (Nagaraj *et al.*, 2006).

2-6-1 نشانگرهای EST-SSR

می‌توان آغازگرهای طراحی شده از نواحی مجاور توالی‌های تکراری موجود در بخش ژنی را در تکثیر بخش‌های ریز ماهواره‌ای ژن‌ها مورد استفاده قرار داد (شکل 1-1). نشانگرهای SSR وابسته به ژن نسبت به SSR ژنومی دارای مزایای بسیاری هستند، به طوری که می‌توان با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، در نواحی بیان شونده ژنوم شناسایی و سپس بر اساس نواحی حفاظت شده آن‌ها، آغازگرهای مناسب

طراحی شوند. این نشانگرهای به دست آمده، قابل استفاده در بسیاری از گونه‌ها می‌باشند (Xu, 2008; Varshney, 2010).

```
CGCCACCGAAGGAAGCAACTGAAGAAGAAGTTGCAGAGGGGGAGGAAGCCGCTGCTCCCG
TAGCTGAGCCCGCCGGCAGCTGCAGAGGCTGAGCCCGAGAAAAGTCGTGACTGAAGAGCCAG
CATCAGAAGCGGTGGCCGAGGAGGCTCCAGCTGAAGAGCCCCTGGTGGAAAAGACCGAGG
AAACAACCCCGGAGAAGGCCGGGAGAG

                                Forward Primer
                                →
GAGCCGCTGCTGCTGAGGAGACTCAAGAAAAGGCCACAGAGGAGACGGAGGCTCCAGCTG
CGGTGGAGGAAACCGCGGCGAAAGAAAAGGCAGAGGTGGCGGAGGAATCAGAAGCGGCGCA
AGTTGCAGTGGACAAAGAGTGAGGAGTGAGGAGTGAGGAGCTGAGTTGGTTAATTACGTTTT
TATGTTGCTGTCGAGTTTGTGTTGTGTAT
← Reverse Primer
                                (SSR) ریزماهوره
```

dbEST Id: 14128385
 EST name: MC01006A12
 GenBank Acc: BU667447
 GenBank qi: 40445579

شکل 1-1 طراحی آغازگر (SEM-428) از نواحی مجاور توالی ریزماهوره.

بر این اساس به نظر می‌رسد که بتوان نشانگرهای EST-SSR را برای گونه‌های خویشاوندی که اطلاعات کمی در مورد SSR یا EST آن‌ها در دسترس است، مورد استفاده قرار دارد. بطور مثال از نشانگرهای EST-SSR حاصل از جو، در مقایسه نقشه ژنتیکی گندم، چاودار و برنج استفاده گردید (Yu *et al.*, 2005; Varshney *et al.*, 2004). از سوی دیگر، اگرچه نشانگرهای EST-SSR به عنوان نشانگر-های با کیفیتی شناخته می‌شوند، ولی میزان چندشکلی در آن‌ها کمتر از نشانگرهای SSR ژنومی است (Cho *et al.*, 2000; Eujayl *et al.*, 2002; Thiel *et al.*, 2003).

با این حال در گیاه کنجد، تعداد بسیار محدودی از نشانگر SSR (Dixit *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012) و 40 نشانگر EST-SSR ژنومیک (Wei, *et al.*, 2011) توسعه یافته است که لزوم توسعه‌ی کاربرد این نشانگر را ضروری می‌نماید. کاربرد SSRها و EST-SSRهای ژنومی که مکمل نقشه‌یابی ژنوم گیاهی می‌باشند، تاکنون در برخی گیاهان دانه روغنی مانند کلزا (Kresovich, *et al.*, 1995)، بادام

زمینی (Hopkins *et al.*, 1999) و سویا (Akkaya *et al.*, 1992) گزارش شده است.

بدون شک، کشور ما به لحاظ تنوع کنجدهای زراعی غنی است و دارای وارسته‌ها و ارقام بومی متمایزی است که در پی قرن‌ها زراعت این گیاه در شرایط اقلیمی متفاوت و متنوع ایران از سازگاری‌های زراعی - اکولوژیکی بالایی برخوردارند و می‌توانند مواد ارزشمندی جهت مطالعات ژنتیکی و زمینه‌ساز انتخاب موفقیت آمیز صفات مطلوب در این گیاه باشند.

در این پژوهش، تنوع 22 ژنوتیپ از کنجدهای ایرانی و خارجی که از مناطق مختلف کشت و کار کنجد در ایران (خوزستان، مازندران، بوشهر، کرمان، اصفهان، فارس و اردبیل) و برخی کشورهای آسیایی (چین، هند، پاکستان و عراق) جمع‌آوری شده‌اند، با استفاده از برخی صفات مورفولوژیکی - زراعی، کیفی و 15 نشانگر EST-SSR مورد ارزیابی قرار گرفته است.

فصل دوم

مروری بر منابع

1-2 مطالعات پیشین

مطالعات پیشین در کنجد بیشتر بر ژنتیک کمی، اصلاح مرسوم و درک عمل ژن و نحوه‌ی توارث صفات متمرکز بود و موارد محدودی از کاربرد نشانگرهای مولکولی، اطلاعات ترنسکریپتومی و داده‌های ژنومی در این گیاه منتشر شده است. در این بین، کاربرد نشانگرهای هم‌بارز در بررسی تنوع و مطالعات شناسایی ژرم پلاسما در این گیاه بسیار محدود است.

در مطالعاتی که تا کنون به انجام رسیده است، ژرم‌پلاسماهای مختلف کنجد، تنوع مورفولوژیکی وسیعی را از خود نشان داده‌اند (Bedigian *et al.*, 1986, Baydar *et al.*, 1999; Bisht *et al.*, 1998; Xiurong *et al.*, 2000). به‌عنوان مثال، بیشت¹ و همکاران (1998)، با ارزیابی ژرم‌پلاسمی متشکل از 100 کنجد جمع‌آوری شده از مناطق اگرواکولوژیکی مختلف هند، اظهار داشتند که این ژنوتیپ‌ها از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و زراعی در هفت گروه طبقه‌بندی می‌شوند. همچنین، ارزیابی مشابهی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک در یک ژرم‌پلاسم چینی صورت گرفت (Xiurong *et al.*, 2000).

بدیجیان² و همکاران (1986) نیز تنوع مورفولوژیکی ژرم‌پلاسم کنجد جمع‌آوری شده از 20 کشور مختلف را بررسی کردند که در پایان این ارقام در 8 گروه دسته‌بندی گردیدند. در این ژرم‌پلاسم، بیشتر ارقام ترکی از ژنوتیپ‌های زودرس، پرپشت و کوتاه بودند. نمونه‌های کنجد اصلاح‌شده کره‌ای، اغلب گیاهان غیرمنشعب با برگ‌های نواری شکل بودند. با توجه به وجود برخی اجداد وحشی کنجد و دسته‌بندی آن‌ها در گروه‌های مختلف، نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در شناسایی و اصلاح ژنتیکی این گیاه و نیز برای فراهم کردن اطلاعات درباره تکاملی و تمایز ژنتیکی در این گیاه مورد استفاده قرار گیرند.

¹- Bisht

²- Bedigian

ایشیکی و اومزاکي¹ (1997)، الگوی تنوع آنزیمی را در 68 نمونه کنجد زراعی شامل 12 ژنوتیپ از ژاپن، 15 ژنوتیپ از کره و 41 نمونه از تایلند مطالعه نموده و گزارش کردند که ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز (IDH) تنوع نشان دادند. آیزوزایم‌های IDH، توسط یک مکان ژنی با دو آلل (idh) کنترل می‌شوند که در نمونه ژنوتیپ‌های سه کشور توزیع شده بودند، از این‌رو این آیزوزایم‌های IDH می‌توانند در زمینه اصلاح و ژنتیک کنجد به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرند.

بها² و همکاران (1999) در ارزیابی تنوع ژنتیکی 58 توده کنجد هندی و خارجی از نشانگر RAPD استفاده نمودند. بر این اساس تنوع ژنومی بالایی در کنجدهای هندی به ویژه کنجدهای مربوط به ناحیه شمال شرقی هند نسبت به کنجدهای خارجی جمع‌آوری شده از 22 کشور جهان گزارش گردید.³ سالازار³ و همکاران (2006) نیز جهت بررسی تنوع ژنومی 9 لاین کنجد آزاد شده در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه در ونزوئلا، 12 آغازگر RAPD را مورد استفاده قرار دادند که تنوع ژنومی بالایی با مشاهده 94 باند چند شکل گزارش شد. در بین این آغازگرها، 9 آغازگر قادر به شناسایی و تشخیص 6 ژنوتیپ گردیدند.

همچنین، اکبر⁴ و همکاران (2011) نیز تنوع ژنتیکی را در بین 20 ژنوتیپ کنجد در سطح DNA به‌وسیله آنالیز نشانگر RAPD آزمایش کردند. در این آزمایش تعداد 10 آغازگر مورد استفاده قرار گرفت و 93 قطعه RAPD تولید گردید که 70 قطعه (75%) از آن چند شکل بوده‌اند. هر آغازگر 5 تا 17 قطعه تکثیری با متوسط 9/3 باند در هر آغازگر تولید نمود. از لحاظ ژنتیکی، ژنوتیپ‌ها در دو گروه عمده و شش زیرگروه طبقه‌بندی شدند. بنابراین تکنیک RAPD حتی با استفاده از مجموعه آغازگرهای محدود، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را بین نمونه کنجدهای جمع‌آوری شده از اقلیم‌های مختلف پاکستان مشخص نمود.

¹- Isshiki and Umezaki

²- Bhat

³- Salazar

⁴- Akbar

علی¹ و همکاران (2007) به منظور بررسی سطح تنوع ژنتیکی در ارتباط با نواحی جغرافیایی و خصوصیات مورفولوژیکی، 96 رقم کنجد جمع آوری شده از نواحی مختلف جهان را با 21 جفت آغازگر AFLP بررسی کردند. از 445 باند تولید شده، 157 (35%) باند، چند شکل بودند. این محققین گزارش کردند که ارقام بررسی شده از لحاظ جغرافیایی به دو گروه عمده آسیای شرقی و جنوبی تفکیک می‌شوند. در حالی که در پژوهش لائورنتین و کارلووسکی² (2006) با استفاده از 9 نشانگر AFLP ضمن وجود تنوع ژنتیکی بالا (93 درصد چندشکلی) در ژرم پلاسما ارزیابی شده، ارتباطی بین تنوع ژنوتیپ‌ها و توزیع جغرافیایی گزارش نشد.

کیم³ و همکاران (2002)، چندشکلی توالی‌های تکراری ساده داخلی (ISSR) را برای تعیین روابط ژنتیکی بین 75 ژنوتیپ کنجد کره‌ای و خارجی مورد استفاده قرار دادند. در این مطالعه 14 آغازگر مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی انتخاب و 79 قطعه تکثیری تولید شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، 33% چندشکلی در بین 75 نمونه ژنوتیپ نمایان کرد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس روش UPGMA⁴ به هفت گروه تقسیم شدند که دندروگرام ترسیم شده، تطابق واضحی را با توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها نشان نداد. بعضی لاین‌های اصلاحی کره در امتداد خط دندروگرام پراکنده بودند که نشان دهنده گستردگی تنوع ژنتیکی کنجدهای کره‌ای در این ژرم پلاسما بود.

پارسائیان⁵ و همکاران (2011)، تنوع ژنتیکی 19 لاین کنجد انتخاب شده از نواحی اقلیمی مختلف ایران به همراه 5 لاین خارجی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی توالی‌های تکراری ساده داخلی (ISSR) بررسی و ارتباط آن با تنوع جغرافیایی را با استفاده از آزمون منتل ارزیابی کردند و نشان دادند از مجموع

¹- Ali

²- Laurentin and Karlovsky

³- Kim

⁴- Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Mean

⁵- Parsaeian

150 قطعه DNA تکثیر شده در واکنش PCR با 13 آغازگر ISSR، 130 قطعه در یک یا چند ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند. درصد باندهای چند شکل تکثیر شده از 33/33 درصد تا 100 درصد متفاوت بود. این سطح بالای چندشکلی حتی با کاربرد تعداد محدودی آغازگر ISSR، بیانگر وجود تنوع ژنومی بالا در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده بود.

ژانگ¹ و همکاران (2010)، تنوع ژنومی 404 توده بومی کنجد چینی را توسط 11 نشانگر SRAP² و 3 نشانگر SSR ارزیابی کردند. از 175 قطعه تولید شده 126 قطعه چندشکل با متوسط 72% چندشکلی تولید شد. الگوی دسته‌بندی حاصل از دندروگرام ترسیم شده، ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نواحی اگرواکولوژیکی مختلف را در خوشه‌های متفاوتی نشان داد که بیانگر این واقعیت بود که تفرق جغرافیایی عموماً منجر به فاصله ژنتیکی بیشتر نمی‌شود. نتایج حاصل از دسته‌بندی به روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCOA³) الگوی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تایید نمود. این محققین در مجموع بر کارایی نشانگرهای SSR و SRAP در بررسی تنوع ژنتیکی در کنجد تأیید نمودند (Zhang *et al.*, 2010).

در پژوهشی که توسط دیکسیت⁴ و همکاران (2005) صورت گرفت، پنجاه توالی ریزماهواره (SSR) از یک کتابخانه غنی کنجد (*Sesamum indicum* L.) با استفاده از یک پروتکل تغییر یافته جداسازی شدند. پس از غربالگری، 10 ریزماهواره چندشکل در تجزیه و تحلیل تنوع بین 16 ژنوتیپ کنجد مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد آلل‌ها از 3 تا 6 آلل در هر مکان ژنی با میانگین 4/6 آلل تعیین شد و اندازه قطعات از

¹- Zhang

²- Sequence-Related Amplified Polymorphism

³- Principal Coordinates

⁴- Dixit

150 bp تا 307 bp متفاوت بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) و محتویات اطلاعات چندشکل (PIC)¹ به ترتیب از 0/437 تا 0/858 و 0/34 تا 0/80 تعیین شد.

جبریمیشل و پارزیس² (2011)، با استفاده از 10 نشانگر توالی تکراری ساده (SSR)، الگوی تنوع ژنتیکی درون و بین 50 جمعیت کنجد را به نمایندگی از ژنوتیپ‌های کنجد اتیوپیایی مورد بررسی قرار دادند. تعداد آلل‌ها از 6 تا 17 با میانگین 12/1 آلل در هر مکان ژنی و PIC نشانگرها از 0/393 تا 0/820 تعیین شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) برای توده و ارقام از 0/060 تا 0/440 و 0/120 تا 0/260 به ترتیب با متوسط 0/234 و 0/193 مشخص شد که نشان دهنده وجود هتروزیگوسیتی بالاتر درون توده‌ها نسبت به ارقام می‌باشد.

در پژوهشی دیگر، تغییر در موتیف‌های SSR برای ارزیابی تنوع در 30 ژنوتیپ کنجد نیجریه از نظر تنوع در میزان روغن و ترکیب اسیدهای چرب آن، به عنوان یک گام مهم در جهت بهبود ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محتوی روغن دانه کنجد طیفی از 40 تا 55 درصد (متوسط $47/65 \pm 2/82$ درصد) بود. از 10 جفت آغازگر مورد استفاده، اختلافات زیادی بین ژنوتیپ‌ها با موتیف‌های تکراری (TC12 - TC25) یافت شد که از دو جفت آغازگری (p7-GBssr-sa-123 و GBssr-sa-72) که حاوی اطلاعات مفیدی است به دست آمد و 30 ژنوتیپ موجود به طور واضح به 8 گروه تفکیک شدند. تنوع در ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره با تنوع در میزان روغن و ترکیب اسیدچرب رابطه نزدیکی داشت که این مطلب می‌تواند به طور بالقوه در پروژه‌های بعدی انتخاب به کمک نشانگر در این صفات مفید باشد (Nweke *et al.*, 2011).

اسپاندانا و همکاران (2012) نیز ریزماهواره‌ها را با استفاده از روش‌هایی مانند هضم چند آنزیمی، ریزماهواره چندپروبی و ذره‌های مغناطیسی استرپتاویدین در کنجد جداسازی کردند. بیش از 200 موتیف

¹- Polymorphism Information Contents

²- Gebremichael and Parzies

SSR مشخص شد که در این بین 80 درصد از موتیف‌ها حاوی SSR بودند. از بین 18 نشانگر SSR مشخص شده، 5 نشانگر چندشکلی نشان دادند و برای آنالیز 60 ژنوتیپ کنجد مورد استفاده قرار گرفتند. میانگین ارزش PIC این مطالعه 77 درصد تعیین شد. در این پژوهش SSRها به‌عنوان ابزارهای ارزشمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و آنالیز توسعه تکاملی و تاریخی ارقام در سطح ژنومیک، در برنامه‌های اصلاحی کنجد معرفی گردیدند.

در مطالعه ژانگ و همکاران (2012)، که در راستای توسعه و تایید نشانگرهای SSR ژنی در کنجد به‌وسیله روش RNA-seq انجام شد، 2164 نشانگر SSR ژنی در کنجد با استفاده از توالی‌یابی ترنسکرپتوم تولید شد. 276 جفت آغازگر از 300 جفت آغازگر ارزیابی شده بر روی 24 ژنوتیپ کنجد مورد آزمایش، به طور موفقیت‌آمیزی قطعات تکثیری تولید کردند. در این مطالعه، تطابق کمی بین الگوی تنوع جغرافیایی و ژنومی گزارش گردید.

علاوه بر موارد ذکر شده، نشانگرهای EST-SSR با استفاده از اطلاعات EST کنجد نیز در زمره دیگر نشانگرهای به کار رفته در این گیاه قرار گرفت.

در پژوهش بین و همکاران (2008)، از 3328 EST شناسایی شده در کنجد، 1785 مجموعه EST غیر تکراری گردآوری شد که 155 EST-SSR و 148 توالی ESTها مشخص شد. قطعات تکثیری از توالی‌های EST غیر تکراری در مجموع 774/27 kb با میانگین یک EST در هر 4/99 kb بودند. دی-نوکلئوتید AG/TC با فراوانی 37/42%، از بیشترین فراوانی در بین EST-SSRهای شناخته شده، برخوردار بود. بر اساس این توالی‌های SSR حاوی ESTها، 50 جفت آغازگر طراحی شد که برای تکثیر 36 ژنوتیپ کنجد، 2 ژنوتیپ کتان، 2 ژنوتیپ سویا و 2 ژنوتیپ آفتابگردان روغنی به کار رفت که تعداد کمی از آنها (از جمله 2 تا برای کتان، 3 تا برای سویا و 4 تا برای آفتابگردان روغنی) در واکنش PCR تکثیر گردیدند. همچنین، با استفاده از 44 EST-SSR تکثیر شده در کنجد، 108 مکان با متوسط 2/45 مکان در هر

جفت آغازگر با موفقیت تولید شد. بیست و هفت آغازگر از 44 جفت آغازگر (61/4%) چندشکل و میانگین 0/390 PIC بود. در دندروگرام ترسیم شده با الگوریتم UPGMA بر اساس ضریب شباهت ژنتیکی 36 ژنوتیپ، 91 مکان چندشکل گردید و ژنوتیپ‌ها در چهار گروه مجزا قرار گرفتند. در این پژوهش نیز، هیچ تطابقی بین الگوی جغرافیایی و تنوع ژنومی مشاهده نگردید. در مجموع EST-SSRهای تولید شده برای کنجد در تجزیه و تحلیل ژنتیکی، نقشه‌یابی لینکاژی و مطالعه انتقال‌پذیری با گیاهان دانه روغنی با ارزش بوده است.

در پژوهشی دیگر، رونوشت‌های کنجد از پنج بافت توسط تکنولوژی نوین توالی‌یابی جفت انتهای ایلومینا¹ توالی‌یابی گردیدند. خوانش‌های خام در 86222 ژن بی‌همتا² با میانگین طول 629 bp مرتب و گردآوری شدند. تعداد 46,584 ژن بی‌همتا (54/03%) شباهت قابل توجهی با پروتئین‌ها در پایگاه داده پروتئین غیرتکراری NCBI و پایگاه داده Swiss-Prot داشتند. این ژن‌های بی‌همتای تفسیر شده 10,805 و 27,588 ژن به ترتیب برای دسته‌بندی‌های آنتولوژی ژن³ (GO) و خوشه‌بندی‌های گروه‌های ارتولوگ تعیین شدند. علاوه بر این 44,750 ژن بی‌همتا با 15,460 ژن آراییدوپسیس بر اساس آنالیز BLASTx همولوژی نشان داد و در مقایسه با منبع اطلاعات آراییدوپسیس (TAIR، نسخه 10) پوشش نسبتاً بالایی ژن را مشخص کرده است. در کل 7,702 ژن بی‌همتا به نشانگرهای SSR (EST-SSR) تبدیل شدند و به طور تصادفی 50 EST-SSR برای تایید تکثیر و تعیین درجه چندشکلی ژنومی انتخاب گردیدند. از این بین تعداد 40 جفت آغازگر تکثیر موفقی را انجام داده و میزان قابل توجهی از چندشکلی را در میان 24 نمونه کنجد مورد آزمایش تعیین نمودند. این مطالعه نشان داد که توالی‌یابی به این روش، در یافتن ژن و توسعه نشانگر مولکولی در موجودات غیر مدل کم هزینه و سریع می‌باشد (Wei et al., 2011).

¹ - Illumina paired-end sequencing

² - UniGenes

³ - Gene Ontology (یک فرهنگ لغت کنترل شده برای توصیف بخش‌های سلولی، عملکرد مولکولی و فرآیندهای بیولوژیکی است)

در مطالعه انجام شده توسط ویجای¹ و همکاران (2013)، در کل 16,619 توالی EST کنگد از پایگاه داده GenBank استخراج شد. از بین این توالی‌ها، 156 جفت آغازگر طراحی و برای تعیین تنوع میان 49 ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع 20 جفت آغازگر SSR چندشکل بوده و 2 تا 5 آلل در هر مکان ژنی تکثیر کردند. اندازه آلل‌ها از 101 تا 399 جفت باز (bp) متفاوت بوده و میانگین ارزش PIC از 0/49 تا 0/90 متغیر بود. در مجموع، 49 ژنوتیپ در 5 خوشه مجزا گروه‌بندی گردیدند. این پژوهش بر کارآیی نشانگرهای EST-SSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی در کنگد و نیز شناسایی بهترین والدین جهت برنامه‌های به‌نژادی در این گیاه، تأکید نمود.

همچنین، در پژوهشی که توسط بدری² و همکاران (2014) انجام شد، مجموعه جدیدی از نشانگرهای ریزماهواره مشخص و برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در 16 ژرمپلاسم کنگد استفاده گردید. از 120 SSR معرفی شده، 92 تا چندشکل بودند که شامل 18 SSR از هیبریدهای انتخابی و 74 تا از مجموعه داده‌های EST می‌باشند. تعداد آلل‌های هر مکان ریزماهواره از 2 تا 5 و با میانگین 3/11 آلل مشخص شد. اندازه آلل‌ها در بسیاری موارد 100-510 جفت باز (bp) و شاخص PIC از 0/298 تا 0/912 مشخص شد.

در سال‌های اخیر نیز تلاش‌هایی در جهت تقویت تولید نشانگرهای اختصاصی کنگد آغاز شده است. با این حال، تعداد نشانگرهای ریزماهواره قابل دسترس، هنوز برای توسعه نقشه‌های لینکاژ ژنتیکی با وضوح بالا و مرتبط با صفات زراعی مهم، کافی نبوده و افزایش تعداد نشانگرهای DNA حاوی اطلاعات مفید در کنگد ضروری می‌باشد.

¹- Vijay

²- Badri

نظر به اینکه تا کنون بر روی ژنوتیپ‌های کنجد ایرانی با استفاده از نشانگر EST-SSR هیچ مطالعه-
ای صورت نگرفته است، بنابراین هدف این تحقیق ارزیابی کارایی این نشانگر مولکولی در بیان تنوع ژنومی
ژرم‌پلاسم حاضر می‌باشد تا در پژوهش‌های آینده جهت شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات کمی و کیفی
مطلوب در این گیاه مورد استفاده قرار گیرند.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

مواد، وسایل و روش‌ها

در این فصل تهیه نمونه‌های گیاهی، صفات مورد بررسی، مواد، محلول‌ها، وسایل و روش‌های به کار رفته در این پژوهش نام برده و توضیحات لازم درباره هر کدام داده می‌شود.

3-1 نمونه‌های گیاهی و صفات مورد بررسی

بذور ژنوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شده جهت اجرای این تحقیق شامل 22 ژنوتیپ انتخاب شده از مناطق اقلیمی مختلف ایران بودند که بذور آنها از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و مراکز تحقیقات فارس و دزفول تامین گردید. ژنوتیپ‌های دارای شماره-های موقتی (TN) از مواد ژنتیکی مربوط به بانک ژن کشور می‌باشند. علاوه بر ژنوتیپ‌های داخلی، شش ژنوتیپ خارجی از کشورهای آسیایی هند، چین، پاکستان، عراق و حاشیه مدیترانه نیز در این پژوهش با توجه به داشتن تنوع خصوصیات مورفولوژیک، زراعی و کیفی گزینش شده و در بهار 1394 در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود کشت و نمونه‌های برگ‌ها از گیاه جوان در مرحله 6 تا 8 برگی جمع‌آوری و در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد برای انجام این پروژه ذخیره و مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول 3-1).

صفات زراعی اندازه‌گیری شده شامل، تعداد روز تا گلدهی و رسیدگی، وزن هزاردانه، ارتفاع بوته، ارتفاع تشکیل اولین کپسول، تعداد شاخه میوه دهنده در بوته، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، عملکرد تک بوته که بر روی 10 بوته تصادفی اندازه‌گیری شدند. ردیف‌های میانی پس از حذف اثر حاشیه برای اندازه‌گیری میزان عملکرد در هکتار مورد استفاده قرار گرفتند. صفات کیفی اندازه‌گیری شده عبارت بودند از درصد چربی، پروتئین، خاکستر، اسید استئاریک، اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسید اولئیک، اسید پالمیتیک که بر روی 15 گرم از نمونه‌های بذری آسیاب شده و با استفاده از دستگاه

اسپکتروسکوپی با نور مادون قرمز مدل 8620 A Socb از شرکت پرتن اندازه‌گیری گردید. همچنین میزان فسفر دانه به روش رنگ‌سنجی با دستگاه طیف‌سنج JENWAY مدل 6505 در طول موج 870 نانومتر قرائت گردید و سنجش کلسیم دانه با دستگاه جذب اتمی مدل 3030 ساخت شرکت Perkinelmer انجام شد.

جدول 3-1 ژنوتیپ‌های کنجد مورد مطالعه و محل جمع‌آوری آن‌ها

ژنوتیپ‌ها	محل جمع‌آوری
1	هندی (سیاه) هند
2	ناز تک شاخه ایران - مازندران
3	ناز چندشاخه ایران - مازندران
4	برازجان 1 ایران - بوشهر
5	برازجان 2 ایران - بوشهر
6	پنجاب 89 پاکستان
7	پاکستان پاکستان
8	داراب 1 ایران - فارس
9	داراب 14 ایران - فارس
10	IS حاشیه مدیترانه
11	چینی چین
12	یکتا ناشناخته
13	صفی آبادی ایران - خوزستان
14	TN ₂₄₀ ایران - خوزستان
15	TN ₂₂₃ ایران - خوزستان
16	TN ₂₃₄ ایران - خوزستان
17	TN ₂₃₈ ایران - خوزستان
18	محلی حاجی‌آباد ایران - خوزستان
19	اولتان ایران - اردبیل
20	ورامین 2822 ایران - اصفهان
21	عراقی 22 عراق
22	جیرفت 2 ایران - کرمان

3-2 مواد و محلول‌ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل: DNase Free Deionized Water, Master Mix Red, β - Mercaptoethanol و Boric Acid, EDTA, Tris-HCl, DNA Ladder 100bp, Loading Buffer, که از شرکت Sinaclon (تهران، ایران) تهیه گردید.

Merck, CTAB, PVP, NaCl, Chloroform, IsoAmyl Alcohol, Ethanol و Isopropanole از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری و آگارز از شرکت Invitrogen (کالیفرنیا، آمریکا) تهیه گردید و آغازگرها توسط شرکت تکاپو زیست (تهران، ایران) سنتز شدند.

3-3 وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، ورتکس Labnet (آمریکا)، ترموسایکلر تک‌آرا (اتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، حمام آب گرم Memmert (آلمان)، مایکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژلداک QUANTUM ST4 (سویا، آلمان)، سمپلر $10 \mu\text{l}$ ، $100 \mu\text{l}$ و $1000 \mu\text{l}$ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات‌پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، یخچال هیمالیا RF360 (ایران)، فریزر 30 پارس (تهران، ایران)، ترازو و pH متر SARTORIUS (گوتینگن، آلمان)، الکتروفورز افقی PADIDEH NOJEN PARS (مشهد، ایران) در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت.

3-4 محلول‌های مورد نیاز

3-4-1 بافر استخراج

برای تهیه 100 میلی‌لیتر بافر استخراج، 10 میلی‌لیتر Tris-HCl 1 مولار (pH=8.0)، 4 میلی‌لیتر EDTA 0/5 مولار (pH=8.0) و 28 میلی‌لیتر NaCl 5 مولار را با هم مخلوط کرده، در آخر نیز pH کل را

توسط HCl در 5 تنظیم شد و پس از اتوکلاو شدن، 2 گرم CTAB¹ و 1 گرم PVP-40² به محلول فوق افزوده شده و با آب مقطر استریل، حجم کل به 100 میلی‌لیتر رسانده شد.

3-4-2 محلول اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک اسید 0/5 مولار (EDTA, 0.5 M, pH=8)

به میزان 18/612 گرم EDTA را در 75 میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل کرده و با استفاده از یک هم‌زن مغناطیسی کاملاً مخلوط و حل می‌شود. برای تنظیم pH محلول، می‌توان با استفاده از NaOH آن را به 8 رساند و در نهایت حجم محلول به 100 میلی‌لیتر رسانده شد، محلول پس از اتوکلاو شدن در یخچال نگهداری شد.

3-4-3 محلول کلرید سدیم 5 مولار (NaCl, 5 M)

به میزان 29/2 گرم NaCl را در حدود 70 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از این که به طور کامل حل شد حجم را به 100 میلی‌لیتر رسانده و سپس اتوکلاو می‌شود.

3-4-4 محلول استات سدیم 3/2 مولار (C₂H₃NaO₂, 3.2 M, pH= 5.4)

مقدار 26/24 گرم استات سدیم را در 90 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس pH را با اسیداستیک به 5/4 رسانده و در آخر حجم را به 100 رسانده و اتوکلاو می‌شود.

3-4-5 محلول بافر TBE

بافر TBE (بافر الکتروفورز) به صورت 5x تهیه و نگهداری و به صورت 1x مصرف می‌شود. برای تهیه استوک 5x، به میزان 54 گرم Tris Base، 27/5 گرم اسیدبوریک، 20 میلی‌لیتر از استوک EDTA 0/5

¹- Hexadecyltrimethyl ammonium bromide

²- Polyvinyl pyrrolidone

مولار (pH=8) را با هم مخلوط و به حجم 750 میلی لیتر رسانده و پس از تنظیم pH بر روی 8 حجم محلول با آب مقطر به 1 لیتر می رسد.

3-5 استخراج DNA از بافت برگ

استخراج DNA از بافت برگ جوان و تازه گیاه کنجد (*Sesamum Indicum L.*) به روش CTAB با کمی تغییرات، صورت گرفته است. روش استخراج در ادامه به طور خلاصه آورده شده است.

حدود 0/3 گرم از برگ جوان گیاه کنجد (ترجیحا بدون رگبرگ) را با بافر استخراج، درون هاون چینی کوبیده و کاملا له کرده تا عصاره آن خارج شود. (نکته: بافر CTAB، قبل از استفاده در حمام آب گرم و در دمای 65 تا 70 درجه سانتی گراد گرم می شود).

برگ کوبیده شده به ویال های استریل منتقل و برای حذف RNA به هر کدام از آن ها RNase افزوده شد، سپس خوب مخلوط و به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای حذف پروتئین ها و پلی ساکاریدها که در استخراج DNA اختلال ایجاد می کنند می توان از مرکاپتواتانول، Proteinase K و SDS¹ نیز استفاده کرد. سپس به مدت 30-60 دقیقه و در حمام آب گرم با دمای 65 تا 70 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت زمان، اجازه داده می شود تا به دمای محیط رسیده و سپس هم حجم مایع درون ویال ها کلروفرم-ایزواکلیل الکل سرد (به نسبت 24 به 1) افزوده شد و به مدت 15 دقیقه با دور 12000 rpm و دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. می توان برای شستشوی بهتر، مرحله قبل را مجددا تکرار کرد، سپس مایع رویی به ویال های جدید منتقل می شوند و برای رسوب و غیر فعال کردن باقیمانده پلی ساکاریدها و پروتئین ها، به هر ویال، محلول NaCl 5 مولار و استات سدیم 3/2 مولار و همچنین برای این که DNA ته نشین

¹ - Sodium Dodecyl Sulfate

شود و به صورت غیر محلول درآید و تشکیل کلاف دهد، دو سوم حجم مایع ایزوپروپانول سرد افزود و ویال‌ها به آرامی سر و ته شده، سپس مدتی بر روی یخ قرار می‌گیرند. پس از جداسازی کلاف DNA، یکبار با الکل مطلق و یک یا دوبار با الکل 70% شستشو داده می‌شوند. رسوب سفیدرنگ ته‌نشین شده، در معرض هوا قرار گرفته تا خشک شوند. سپس به هر ویال به نسبت مقدار DNA، 40 تا 70 میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل و یا بافر TE افزوده تا کاملاً حل شوند، سپس نمونه‌ها در دمای 20°C - نگهداری می‌شوند.

3-6 بررسی کمیت و کیفیت DNA

3-6-1 تعیین کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری

برای بررسی کمیت DNA، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود. ابتدا با حلالی که DNA در آن حل شده است (آب مقطر یا بافر TE) دستگاه کالیبره می‌شود. سپس 2 میکرولیتر از نمونه DNA با 198 میکرولیتر آب مقطر درون کووت کوارتز قرار می‌گیرد و میزان جذب نور در 260 نانومتر خوانده می‌شود. سپس مقدار کل DNA بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس معادله زیر محاسبه می‌گردد. جذب برابر یک، برابر با غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای DNA دو رشته‌ای (dsDNA) است که کیفیت DNA استخراجی (نسبت جذب در طول موج 260 نانومتر به طول موج 280 نانومتر) باید برابر با 1/6 تا 1/8 باشد.

3-6-2 تعیین کیفیت DNA بر روی ژل آگارز و الکتروفورز افقی

برای تعیین کیفیت DNA از نظر شکستگی یا وجود آلودگی RNA و پروتئین از روش زیر استفاده می‌شود، به این صورت که مقداری از نمونه‌های DNA را با بافر بارگذاری¹ مخلوط کرده و در ژل آگارز 1% حاوی اتیدیوم بروماید و در کنار یک DNA مقیاس² با اندازه مشخص مورد بررسی قرار می‌گیرد. جریان الکتریکی با ولتاژ 100 ولت و به مدت 30 دقیقه برقرار گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل بر روی دستگاه عکسبرداری³ و تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفته و از آن عکسبرداری می‌شود. وجود باندهای کاملاً واضح⁴ و فاقد کشیدگی⁵ نشان دهنده کیفیت مطلوب DNA می‌باشد.

3-7 واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

در این پژوهش، برای انجام PCR از مستر میکس آماده شرکت ویراژن با ترکیبات (Tris-HCl pH 8.5)، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، MgCl_2 4 mM، Tween20 0.2%، 0.4 mM از هر کدام از dNTPها، Taq 0.2 u/ μl DNA Polymerase و رنگ قرمز خنثی و تثبیت کننده استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت تکاپو زیست سنتز و بر روی هر ویال، مقدار رقیق‌سازی درج شده است که بر همان اساس تمام آغازگرها رقیق شدند. فهرست و توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول 2-3 آورده شده است.

برای تهیه 20 μl مخلوط واکنش PCR، ابتدا مخلوط اولیه‌ای از 10 μl مستر میکس، 1 μl از هر کدام از آغازگرهای F و R، 7 μl آب دیونیزه و 1 μl DNA را در ویال‌های 0/2 ml ریخته و در آخر نیز

¹- Loading Buffer

²- DNA Ladder

³- Gel Documentation

⁴- Sharp

⁵- Smear

چند ثانیه سانتریفیوژ (1000 دور در دقیقه) شده تا تمام مواد با هم مخلوط شوند. سپس ویال‌ها در بلوک‌های ترموسایکلر¹ قرار گرفته و بر اساس دمای اتصال خاص هر آغازگر، تنظیمات لازم انجام شده و عمل PCR انجام می‌شود.

3-8 الگوی دمایی

دمای اتصال بهینه آغازگرها با وارد کردن توالی هر آغازگر در نرم افزار آنالین OligoAnalyzer، و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به دست آمده است. در این پروژه، برنامه دمایی تمام آغازگرها مشابه یکدیگر تنظیم شد و تنها بخش متغیر آن دمای اتصال² آغازگر به DNA تک‌رشته می‌باشد.

جدول 3-2 توالی جفت آغازگرهای مورد آزمایش

منبع	توالی	آغازگر	منبع	توالی	آغازگر
**	F: GCAAACCTAAATGCCCTTGA R: CAGTGCCTGTGTGCCTGTAT	SEM-292	*	F: GGGATGTTGATAGAGATGTTG R: TCTTTCACCTCTCACACACACA	ZM-20
**	F: CTAGGAATGTCGGAGGCGTA R: AATCCGAAACGTTGGCACT	SEM-74	*	F: CTCTCTCTCTCTGCTGTTTCA R: GCCATACGATCTCAAAATCAC	ZM-21
**	F: CATTAGGCCTTGTCCATGCT R: CAATAACCCGTGAGGTGGAG	SEM-249	*	F: GGATTCTCTAGACATGGCTTT R: AACGCAGAATTCTCTCCTACT	ZM-11
**	F: TATCGGCGATTTCTCCAAAC R: CAAATGCACCGTGAATCAAC	SEM-434	*	F: GCAAAATCTCTGTTGTCTCAG R: GTGTTCTTACCCTCAACACA	ZM-45
**	F: CCAACTTTTCTGGGTTGGAA R: ATGGGCGTATCAGTTTCGAC	SEM-100	**	F: GGACCATGTAATCCCAGCAC R: GGGGCACAGAGTGGATGTAG	SEM-10
***	F: GCCCACCCATAGAAAGAAAA R: TTCTGCCTAACCTCTCAACTC	SEM-178	**	F: TTTTCACGCTATCATCAAACC R: CCTCCTCACCTTGAACCTGA	SEM-440
***	F: GAATCCTCGATAACCAAACCTGC R: AAGGGACCTCAACCATAACCTT	SEM-12-27	**	F: TTCCCGGAACATTCTGATTC R: GCTTACCTCCCCAAAAGTC	SEM-9
			**	F: CAAGAAAAGGCCACAGAGGA R: CAACACAAACTCGACAGCACA	SEM-428

*Wei *et al.*, 2011 **Badri *et al.*, 2014 ***Vijay *et al.*, 2013

¹- Termocycler

²- Annealing Temperature

برنامه دمایی PCR با 95 درجه سانتی‌گراد و در مدت 5 دقیقه آغاز گردید و (در ادامه 94 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه؛ 49-54 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه؛ 72 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه) 35 سیکل، 72 درجه سانتی‌گراد، 5 دقیقه و 4 درجه سانتی‌گراد، 2 دقیقه بود.

3-9 الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید

3-9-1 آماده‌سازی ژل پلی‌اکریل آمید¹ و انجام الکتروفورز

پس از نصب و سرهم بندی دستگاه الکتروفورز، ژل پلی‌اکریل آمید با غلظت 8%، متشکل از اکریل-آمید و بیس اکریل‌آمید (با نسبت 29 به 1)، بافر TBE (10x)، تمد²، آمونیوم پر سولفات (10%) و آب مقطر را بر روی سینی مخصوص خالی کرده (باید دقت شود در هنگام ریختن ژل حبابی ایجاد نشود) و شانه قرار گرفته و کمی زمان داده می‌شود تا ژل سفت شود و به اصطلاح ببندد. سینی را داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر 0/5x TBE قرار داده، سپس شانه را به آرامی خارج کرده تا چاهک‌ها ایجاد شود؛ 6 میکرولیتر از محصول PCR درون هر چاهک و یک چاهک نیز با DNA مقیاس بارگذاری می‌شود. در آخر، الکترودها متصل و جریان الکتریکی برقرار می‌شود. پس از گذشت 5 تا 6 ساعت و با ولتاژ 90، جریان الکتریکی قطع شده و سینی از داخل تانک خارج و شیشه متحرک به آرامی و با دقت از شیشه ثابت جدا می‌گردد. ژل از روی سینی جدا شده و برای رنگ‌آمیزی به داخل ظرف مخصوص منتقل می‌شود.

3-9-2 رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید

برای نمایان شدن باندها، از طریق رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، ژل را به ترتیب در محلول‌ها و زمان‌های مختلف قرار داده که در جدول 3-3 نشان داده شده است.

¹- Polyacrylamide

²- Temed

جدول 3-3 محلول‌های رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید

زمان	محلول
10 دقیقه	1 آب مقطر، الکل 96%، اسید استیک
10 دقیقه	2 نیترات نقره، آب مقطر
1 دقیقه	3 NaOH، آب مقطر، فرمالدئید

پس از انجام هر مرحله از رنگ‌آمیزی ژل، یک تا دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده می‌شود و در نهایت بعد از این‌که ژل در زمان‌های معین درون محلول‌های رنگ‌آمیزی قرار گرفته و باندها رنگ‌دار و قابل مشاهده شدند، می‌توان آن‌ها را بر روی یک صفحه پلاستیکی قرار داده تا در مراحل بعد مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند.

3-10 تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از جمع‌آوری و ثبت داده‌ها، جهت انجام تجزیه خوشه‌ای، میانگین صفات زراعی هر ژنوتیپ جهت حذف اثر مقیاس اندازه‌گیری، استاندارد شد و سپس ماتریس فاصله اقلیدسی با استفاده از بسته نرم‌افزاری NTSYSpc نسخه 2.10 (Rohlf, 2000)، محاسبه گردید.

به منظور آنالیز داده‌های مولکولی نشانگر EST-SSR، هر باند به عنوان یک آلل در یک مکان ژنی هم‌بارز مطرح شده و ژنوتیپ هر فرد در هر مکان ژنی ثبت شد. تمام قطعات تولیدی نشانگر EST-SSR با آغازگرهای مورد استفاده در هر جایگاه شمرده و داده‌ها براساس حضور (1) و عدم حضور (0) باند DNA برای هر ترکیب آغازگری، امتیازدهی شدند. ارزیابی تشابه ژنتیکی بین تمام ژنوتیپ‌ها توسط الگوریتم تطابق ساده محاسبه شد. جهت بررسی ارتباط میان ژنوتیپ‌های کنجد، ضرایب تشابه ژنتیکی در تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. الگوریتم UPGMA جهت ترسیم دندروگرام به کار رفت. تمام

محاسبات با استفاده از بسته نرم‌افزاری NTSYSpc نسخه 2.10 (Rohlf, 2000)، برای به‌دست آوردن ضرایب تشابه ژنتیکی، رسم دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی و همچنین با نرم‌افزار POPGENE نسخه 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) برای محاسبه دیگر شاخص‌ها مانند شاخص اطلاعات شانون (SI)، تعداد آلل‌های موثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (*He*)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (*Ho*) و همچنین درصد چندشکلی انجام شد.

فصل چہارم

نتائج و بحث

1-4 نتایج

1-1-4 بهینه‌سازی استخراج DNA

اکثر گونه های گیاهی حاوی سطوح بالایی از پلی ساکاریدها، پلی فنول‌ها، رنگدانه‌های متعدد و دیگر متابولیت های ثانویه می‌باشند (Wen and Deng, 2002)، که DNA را برای کارهای بعدی پژوهش های بیولوژی مولکولی غیر قابل استفاده می‌کند (Levi *et al.*, 1992; Michiels *et al.*, 2003). در این مطالعه با به‌کارگیری و تغییر برخی پروتکل‌ها، DNA مناسب و قابل قبولی از برگ گیاه کنگد که حاوی مقادیر بسیار بالایی از مواد پلی فنولی و پلی ساکاریدی است به‌دست آمده که برای انجام کارهای مولکولی کاربردی است. پلی ساکاریدها DNA را ژله‌ای و چسبنده کرده و در واکنش PCR با ممانعت کردن از فعالیت آنزیم *Taq* و همچنین تداخل در فعالیت درست آنزیم‌های برشی آن را غیر قابل تکثیر می‌کنند (Porebski *et al.*, 1997).

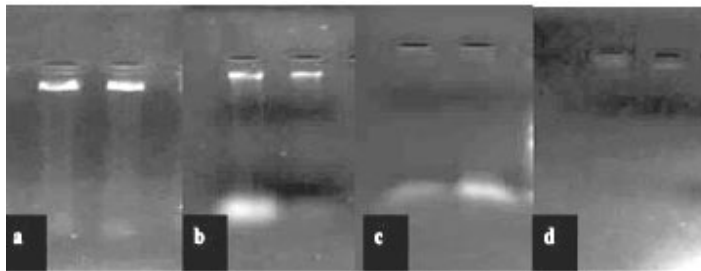
در اینجا، تغییراتی در ترکیب و غلظت برخی مواد به کار رفته در بعضی پروتکل‌ها اعمال شد و نتایج به‌دست آمده با سه روش دیگر (روش دهستانی و کاظمی تبار¹، روش موری و تامپسون² و روش دوایل³) مقایسه شد.

شکل 1-4، DNA استخراج شده از کنگد را در 4 روش مختلف و شکل 2-4، محصول PCR به دست آمده از این‌ها را نشان می‌دهد که وضوح و کیفیت باندها کارآمد بودن این روش را تایید می‌کند.

¹ - Dehestani and Kazemi Tabar (2007)

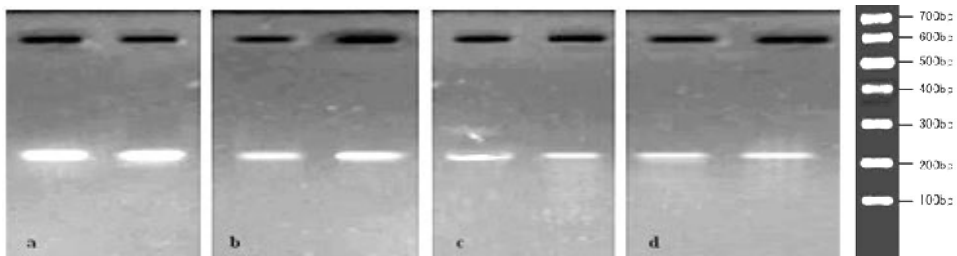
² - Murray and Thompson (1980)

³ - Doyle (1987)



شکل 4-1 الکتروفورز DNAهای استخراج شده از نمونه برگ در ژل آگارز 1%. a: روش جدید تغییر یافته b: روش دهستانی و کاظمی تبار c: روش موری و تامپسون d: روش دوپل.

استفاده از برخی مواد و مقادیر تغییر یافته آن‌ها که در فصل 3 آمده سبب حذف درصد بسیار زیادی از مواد پلی ساکارییدی، پلی فنولی، پروتئین‌ها و رنگدانه‌ها شده و بنابراین DNA با کیفیت و کمیت مناسبی را در اختیار ما قرار داده است. همچنین، از این پروتکل می‌توان برای استخراج DNA دیگر گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه نیز استفاده کرد.

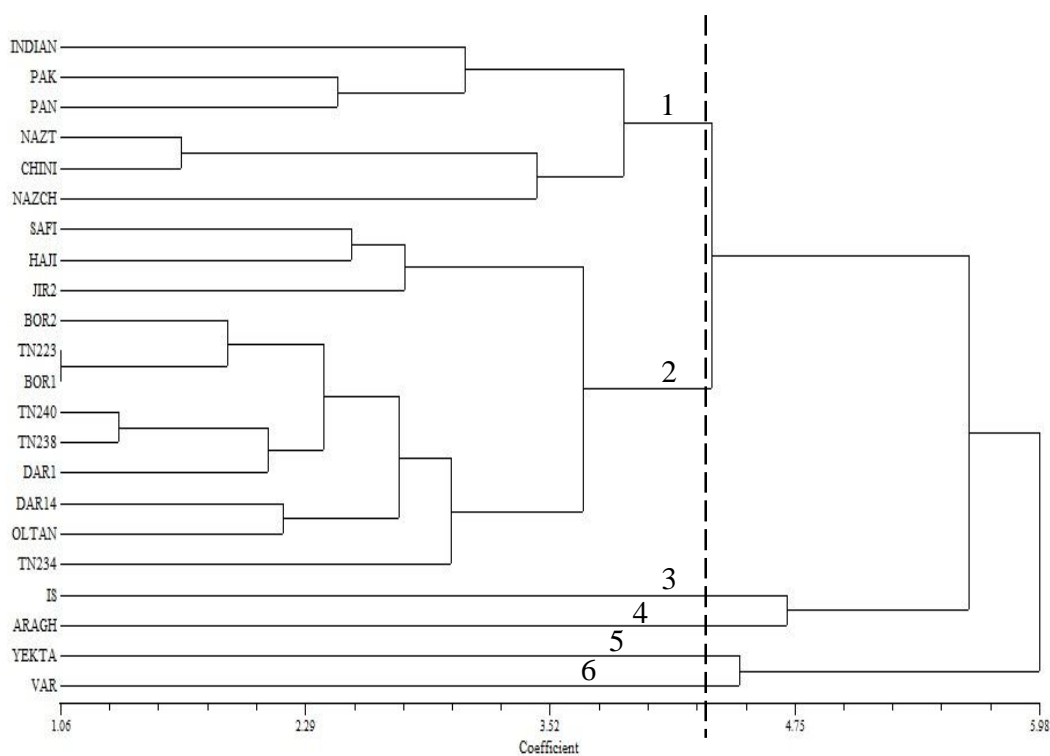


شکل 4-2 الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با پرایمر 18s rRNA روی ژل آگارز 1%. a: روش جدید تغییر یافته b: روش دهستانی و کاظمی تبار c: روش موری و تامپسون d: روش دوپل.

2-1-4 تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیک و زراعی

به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس صفات مورفولوژیک و زراعی از جمله، تعداد روز تا گلدهی و رسیدگی، وزن هزاردانه، ارتفاع بوته، ارتفاع تشکیل اولین کیسول، تعداد شاخه میوه دهنده

در بوته، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، عملکرد تک بوته و عملکرد در هکتار، تجزیه خوشه-ای با استفاده از داده‌های استاندارد شده و ماتریس فاصله اقلیدسی به روش UPGMA انجام شد که دندروگرام حاصل در شکل 3-4 نشان داده شده است. در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها از نظر خصوصیات زراعی در 6 گروه متمایز گروه‌بندی شدند (شکل 3-4 و جدول 3-4). بیشترین ضریب عدم تشابه (کمترین تشابه، 7 درصد) از لحاظ صفات زراعی بین ژنوتیپ‌های ورامین و زودرس (IS) به میزان 93 درصد و کمترین ضریب عدم تشابه (بیشترین تشابه 89/5 درصد) بین ژنوتیپ‌های برازجان 1 و TN₂₂₃ با میزان 10/5 درصد به دست آمد.



شکل 3-4 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی بر اساس 10 صفت زراعی و مورفولوژیک.

بر این اساس، گروه اول شامل ژنوتیپ‌های خارجی هندی از هند، پاکستانی و پنجاب 89 از پاکستان، واقع در مناطق جغرافیایی نزدیک به هم و ژنوتیپ‌های ناز تک‌شاخه و ناز چندشاخه از استان مازندران و چینی، کمترین تعداد دانه در کیسول و میزان عملکرد بسیار پایینی را در واحد سطح و وزن هزار دانه بالایی داشتند. دیگر صفات با میانگین متوسط بودند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های صفی‌آبادی و حاجی‌آباد با منشأ جغرافیایی خوزستان و جیرفت 2 از استان کرمان، ژنوتیپ‌های برازجان 1 و برازجان 2 از بوشهر و TN₂₂₃، TN₂₄₀، TN₂₈₃، TN₂₃₄ از استان خوزستان و داراب 1 و داراب 14 از استان فارس و نیز اولتان از اردبیل، بیشترین تعداد شاخه‌های میوه دهنده و نیز ارتفاع بوته و ارتفاع نسبتاً زیادی تا اولین کیسول را به خود اختصاص دادند. بر اساس برش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، چهار گروه دیگر متشکل از ژنوتیپ‌های زودرس از حاشیه مدیترانه، عراقی، یکتا با منشأ ناشناخته و ورامین 2228 به ترتیب در گروه-های سوم تا ششم و به طور مجزا از هم قرار گرفتند. از گروه سوم رقم زودرس، از حداقل روز تا رسیدگی برخوردار بود و نیز کمترین ارتفاع بوته و کمترین تعداد و ارتفاع را تا اولین کیسول بعد از عراقی دارا می-باشد. رقم زودرس رتبه دوم را در کمترین تعداد روز تا رسیدگی و نیز تعداد شاخه‌های میوه دهنده داشته و میانگین دیگر صفات در سطح متوسطی می‌باشد. همچنین از لحاظ کمترین تعداد دانه در کیسول و کمترین میزان عملکرد در واحد سطح بعد از گروه اول جای می‌گیرد. در گروه بعدی رقم عراقی حداقل تعداد روز تا گلدهی و حداکثر وزن هزاردانه را به خود اختصاص داد. همچنین، این رقم کمترین تعداد شاخه‌های میوه دهنده نسبت به دیگر ژنوتیپ‌های منشعب و کمترین تعداد کیسول در بوته را داشته است. رقم یکتا با منشأ ناشناخته و ورامین 22 از استان اصفهان بدون شاخه‌های جانبی دارای بیشترین تعداد روز تا گلدهی و نیز بیشترین تعداد کیسول و تعداد دانه در کیسول و بنابراین حداکثر میزان عملکرد در واحد سطح بودند. به نظر می‌رسد تمایز موجود در این دو ژنوتیپ از لحاظ صفات زراعی و مورفولوژیکی می‌تواند قرارگیری در گروه‌های مجزا را توجیح کند.

جدول 4-2 میانگین صفات زراعی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه ای

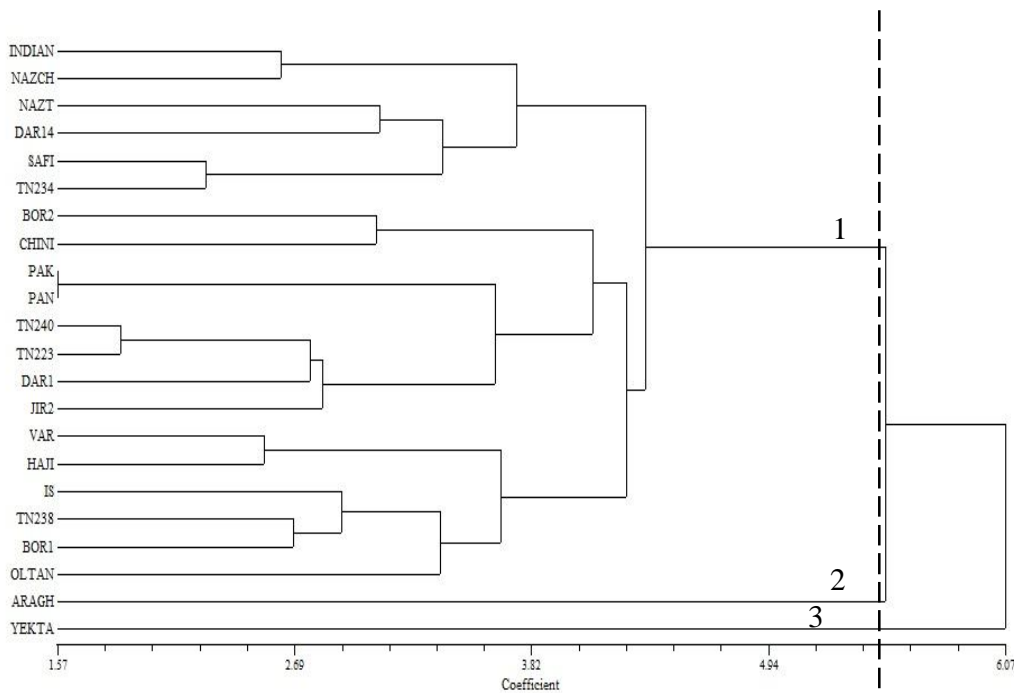
صفت	1	2	3	4	5	6
روز تا گلدهی	45/61	46/52	39/67	39/33	49/00	51/00
روز تا رسیدگی	128/27	134/72	103/66	131/67	110/00	141/00
وزن هزاردانه (گرم)	3/24	3/22	3/03	3/70	2/85	2/90
ارتفاع بوته (سانتی متر)	127/53	151/52	117/66	135/10	132/27	159/33
ارتفاع تا اولین کپسول	45/90	54/37	32/46	31/60	42/87	55/20
تعداد شاخه‌های میوه‌دهنده	1/89	3/09	1/90	0/70	0/00	0/00
تعداد کپسول	40/27	46/12	35/66	34/17	59/00	60/13
تعداد دانه در کپسول	7/09	9/20	7/10	9/21	11/08	12/58
عملکرد در بوته (گرم)	35/48	46/05	64/54	46/04	55/38	62/92
عملکرد (گرم در مترمربع)	199/11	259/77	197/5	263/1	316/4	359/5

4-1-3 تجزیه و تحلیل داده‌های کیفی

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش بر اساس داده‌های کیفی که شامل درصد چربی، پروتئین، خاکستر، اسید استئاریک، اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسید اولئیک، اسید پالمیتیک، میزان فسفر و کلسیم می‌باشند نیز با استفاده از داده‌های استاندارد شده، مبتنی بر فاصله اقلیدسی و رسم دندروگرام با روش UPGMA انجام شد. در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها از نظر خصوصیات کیفی در 3 گروه متمایز گروه بندی شدند (شکل 4-4). بیشترین ضریب عدم تشابه (کمترین تشابه، 15/6 درصد) از لحاظ صفات کیفی بین ژنوتیپ‌های عراقی و یکتا به میزان 84/4 درصد و کمترین ضریب عدم تشابه (بیشترین تشابه 84/4 درصد) بین ژنوتیپ‌های پاکستانی و پنجاب 89 با میزان 15/6 درصد به دست آمد.

در گروه اول تمامی ژنوتیپ‌ها قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های عراقی و یکتا هر یک به‌طور جداگانه گروه‌بندی شدند. با بررسی درصد صفات کیفی در ژنوتیپ‌ها مشخص شد بیشترین و کمترین درصد چربی، به ترتیب متعلق به داراب 14 و عراقی با میزان 42/42 تا 56/37 درصد بود و بیشترین و کمترین درصد پروتئین را به ترتیب ناز چندشاخه و برازجان 2 با میزان 20/23 تا 26/18 درصد داشتند. همچنین

داراب 14 و زودرس با 25/38 درصد پروتئین بعد از ناز چندشاخه قرار گرفتند. حداکثر درصد خاکستر در ژنوتیپ عراقی با مقدار 6/52 درصد و حداقل آن در ژنوتیپ‌های داراب 14، جیرفت 2 و TN223 با مقدار 4/97 درصد حاصل شد.



شکل 4-4 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی بر اساس 10 صفت کیفی

اسیدهای چرب اندازه‌گیری شده شامل اسید استئاریک با 4/33 تا 8/14 درصد بودند که بیشترین و کمترین مقدار را به ترتیب در برازجان 1 و داراب 14 داشتند. اسید لینولئیک با 30/04 تا 45/49 درصد بیشترین و کمترین مقدار را به ترتیب رقم‌های یکتا و عراقی به خود اختصاص دادند اسید لینولئیک با 0/30 تا 3/06 درصد بیشترین و کمترین مقدار را به ترتیب در عراقی و چینی داشتند. بیشترین و کمترین

درصد اسید اولئیک با 39/61 تا 49/61 درصد، به ترتیب متعلق به محلی حاجی‌آباد و یکتا بود و اسید پالمیتیک با 6/15 تا 9/80 درصد بیشترین و کمترین مقدار را به ترتیب TN₂₂₃ و یکتا نشان دادند. میزان فسفر محاسبه شده از 6411/83 میلی‌گرم/کیلوگرم در جیرفت 2 تا 9200/67 میلی‌گرم/کیلوگرم در زودرس و در جایگاه دوم ژنویپ عراقی با میزان 8875/67 میلی‌گرم/کیلوگرم بود. یکی دیگر از صفات کیفی مورد بررسی، میزان کلسیم است که حداکثر مقدار را در رقم یکتا با میزان 804/08 میلی‌گرم/کیلوگرم و پس از آن پنجاب 89 با 800/58 میلی‌گرم/کیلوگرم و حداقل مقدار را رقم ورامین 22 با میزان 406/92 میلی‌گرم/کیلوگرم نشان داد (جدول 4-4). با در نظر گرفتن تفاوت ژنوتیپ‌ها از لحاظ برخورداری از بیشترین و کمترین مقادیر مورد ارزیابی برای اکثر صفات، می‌توان متمایز بودن دو ژنوتیپ عراقی و یکتا در دو گروه مجزای حاصل از دندروگرام خوشه‌ای براساس صفات کیفی و تنوع موجود را توجیح کرد. همچنین ژنوتیپ ناز چندشاخه و داراب 14، از زیرگروه اول از گروه اول بیشترین درصد چربی و داراب 14 درصد بالایی (25/38%) از پروتئین و کمترین میزان خاکستر و اسید استتاریک و هندی بیشترین مقدار خاکستر را داشتند (جدول 4-2).

جدول 4-3 بیشترین و کمترین مقادیر صفات کیفی در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش

مقدار	کمترین	مقدار	بیشترین	صفت
42/42	عراقی	56/37	داراب 14	چربی (درصد)
20/23	برازجان 2	26/18	ناز چندشاخه	پروتئین (درصد)
4/97	داراب 14، جیرفت 2، TN ₂₂₃	6/52	هندی	خاکستر (درصد)
8/14	داراب 14	4/33	برازجان 1	اسید استتاریک (درصد)
45/49	عراقی	30/04	یکتا	اسیدلینولئیک (درصد)
0/30	چینی	3/06	عراقی	اسید لینولنیک (درصد)
49/61	یکتا	39/61	محلی حاجی‌آباد	اسید اولئیک (درصد)
9/80	یکتا	6/15	TN ₂₂₃	اسید پالمیتیک (درصد)
6411/83	جیرفت 2	9200/67	زودرس (IS)	فسفر (میلی‌گرم/کیلوگرم)
406/92	ورامین 2228	804/08	یکتا	کلسیم (میلی‌گرم/کیلوگرم)

جدول 4-4 میانگین داده‌های صفات مورفولوژیک-زراعی

V	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	صفت
45/67	43/67	46	46/33	39/33	49/33	51	46	47	44/67	49	46/33	43/67	47/67	39/67	47	49/67	46/33	47/67	44/67	44/33	45	روز تا گلدهی
133/33	134/33	134/33	129	139/67	135/67	141	133/33	145/67	134/33	110	132	117/33	128	103/67	135	140/33	137/33	129	133/67	127	126/67	روز تا رسیدگی
3/71	2/89	2/94	3/18	3/70	3/11	2/90	3/49	3/71	3/11	2/85	3/01	2/96	2/87	3/03	3/15	3/32	3/33	3/33	3/39	3	3/60	وزن هزاردانه (گرم)
133/63	151/93	164	143/10	135/10	146/83	159/33	147/20	157/40	147/80	132/27	140/27	142/57	114/73	117/67	153/33	150/70	129/67	152/37	163/33	134/43	110/17	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)
47/53	47/37	67	52/60	31/60	55/53	55/20	47/90	55/63	50/73	42/87	47/47	48/50	37/70	32/47	57/57	61/30	50/37	53/80	55/57	46/67	44/63	ارتفاع تا اولین کپسول
2/60	4	4/43	3	0/70	2/33	0/00	2/73	2/73	2/80	0/00	3/50	0/97	2/22	1/90	2/43	1/83	2/53	4/30	3/03	0/00	3/03	تعداد شاخه‌های میوه‌دهنده
46/50	55/23	54/63	47/73	34/17	45/20	60/13	34/50	44/77	46/93	59	37/10	42/83	44/77	35/67	45/07	41/87	37/67	49/30	51/13	38/67	31/23	تعداد کپسول
7/22	11/07	10/24	8/91	9/21	8/35	12/58	7/52	9/61	8/45	11/08	8/10	8/05	6/79	7/11	9/73	8/48	6/56	8/70	11/35	7/35	6/59	تعداد دانه در کپسول
36/13	55/38	51/22	44/57	46/04	41/73	62/92	37/63	48/03	42/27	55/38	40/54	40/24	33/96	35/55	48/67	42/41	32/83	43/49	56/77	36/75	32/97	عملکرد در بوته (گرم)
1991	3082	2925	2482	2631	2344	3595	2090	2745	2396	3164	2257	2237	1920	1975	2770	2417	1874	2424	3241	2042	1883	عملکرد (گرم در مترمربع)

کد ژنوتیپ‌ها: A- هندی B- ناز تک‌شاخه C- صفی‌آباد D- برازجان 2 E- پاکستانی F- TN₂₄₀ G- داراب 1 H- زودرس I- ناز چندشاخه J- چینی K- داراب 14 L- یکتا M-
 O TN₂₃₄ N TN₂₂₃ P- اولتان Q- ورامین R TN₂₃₈ S- عراقی 22 T- جیرفت 2 U- محلی حاجی‌آباد V- پنجاب 89

جدول 4-5 میانگین داده‌های صفات کیفی

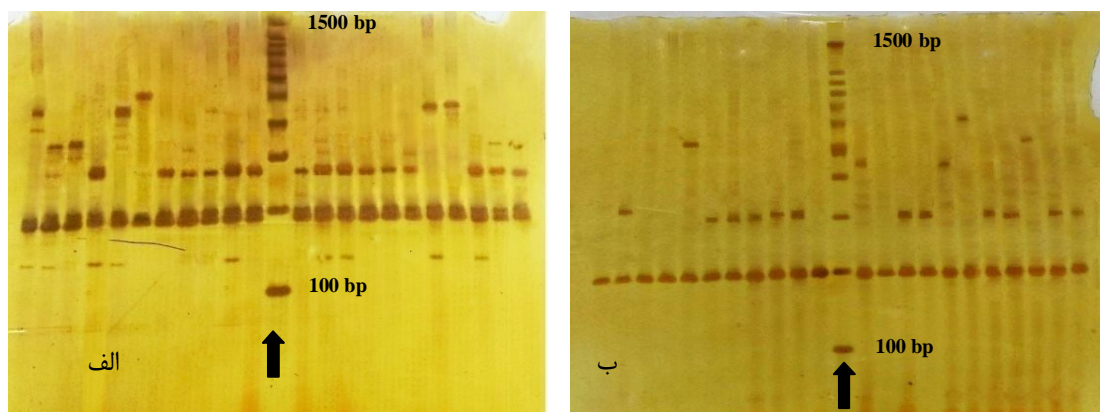
V	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	صفت
48/97	55/02	54/47	49/82	42/42	52/57	47/07	52/17	46/07	48/47	47/32	56/37	47/57	45/77	53/12	54/42	52/92	47/42	49/12	50/77	55/62	44/67	چربی (درصد)
23/53	24/93	21/93	23/78	24/28	22/33	25/18	23/98	24/48	23/23	20/83	25/38	21/58	26/18	25/38	22/08	22/63	23/88	20/23	24/38	23/98	24/58	پروتئین (درصد)
5/92	5/32	4/97	5/77	5/82	5/82	5/52	5/02	5/57	4/97	5/22	4/97	5/12	5/92	5/72	5/02	5/07	5/72	5/62	5/12	5/97	6/52	خاکستر (درصد)
6/08	6/33	6/60	8/14	5/27	7/37	6/73	6/56	6/24	5/48	7/23	4/33	6/78	4/57	7/37	5/83	5/80	6/52	6/33	5/65	5/57	5/04	اسید استئاریک (درصد)
37/85	33/51	34/59	30/17	30/04	34/15	31/37	30/10	40/12	35/67	45/49	38/88	38/06	36/82	35/52	38/93	35/01	34/86	37/93	36/79	35/71	37/60	اسیدلینولئیک (درصد)
1/55	0/70	1/22	1/20	3/06	0/40	0/53	2/01	0/44	1/95	0/88	0/74	0/30	0/99	0/68	1/21	2/09	1/67	1/56	0/97	0/96	0/97	اسید لینولنیک (درصد)
43/50	49/61	44/77	46/64	49/09	46/73	49/10	46/61	45/42	44/01	39/61	46/20	44/40	47/42	45/33	42/54	45/25	43/25	43/23	44/15	46/79	46/98	اسید اولئیک (درصد)
8/81	9/05	9/14	8/46	8/07	8/94	9/72	8/66	6/73	9/80	6/15	8/57	8/35	7/30	9/39	8/69	8/90	9/62	7/29	6/62	7/89	7/65	اسید پالمیتیک (درصد)
8099/33	7174/33	6411/83	8613/17	8875/67	8075/33	7338/17	8688/17	8150/67	7486/83	7787/83	8261/83	8575/33	8113/17	9200/67	6800/67	7250/33	7650/67	7661/83	8511/83	7813/17	6937/83	فسفر (میلی گرم/کیلوگرم)
800/58	546/83	436/83	671/92	469/42	521/58	406/92	546/92	573/17	626/83	804/08	568/08	414/08	629/42	498/17	705/67	524/08	785/67	450/58	640/58	546/92	714/08	کلسیم (میلی گرم/کیلوگرم)

کد ژنوتیپ‌ها: A- هندی B- ناز تک‌شاخه C- صفی‌آباد D- برازجان 2 E- پاکستانی F- TN₂₄₀ G- داراب 1 H- زودرس I- ناز چندشاخه J- چینی K- داراب 14 L- یکتا M-

N TN₂₂₃ O TN₂₃₄ P- ورامین Q- R TN₂₃₈ عراقی 22 S- برازجان 1 T- جیرفت 2 U- محلی حاجی‌آباد V- پنجاب 89

4-1-4 نتایج داده‌های مولکولی

در این مطالعه، تعداد 15 آغازگر بر روی 22 ژنوتیپ کنجد مورد آزمایش قرار گرفتند. باندها بر اساس حضور و یا عدم حضور به صورت 1 و صفر امتیازدهی شدند. تعداد کل باندهای تولید شده توسط آغازگرهای مورد استفاده، 48 باند و تعداد مکان‌های ژنی چندشکل 14 مکان از 15 مکان بوده و درصد چندشکلی کل 93/33% محاسبه شد. میانگین اندازه آلل‌ها از 190 bp در آغازگر ZM-45 تا 750 bp در آغازگر SEM-440 بود و تعداد 1 تا 6 آلل با میانگین تقریباً 3/2 آلل در هر جایگاه تولید شد. الگوی بانندی حاصل از دو آغازگر ZM-11 و ZM-20 بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در شکل 4-5 نشان داده شده است.



شکل 4-5 دو نمونه از الگوی بانندی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 8 درصد. الف) الگوی بانندی آغازگر ZM-11 (ب) الگوی بانندی آغازگر ZM-20.
* پیکان‌ها نشان‌دهنده DNA مقیاس (100 bp) می‌باشند.

1-4-1-4 ضریب تشابه ژنتیکی و آنالیز خوشه‌ای

ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد¹، دایس² و تطابق ساده³ بر اساس داده‌های حاصل از باندهای تولید شده توسط آغازگرهای EST-SSR محاسبه شدند. با مقایسه ضریب کوفنتیک هر سه ماتریس با ضریب کوفنتیک حاصل از مقایسه میزان همبستگی میان ضرایب تشابه، ضریب تشابه تطابق ساده با بیشترین میزان همبستگی $r=0/76758$ ، دامنه بیشتری از شباهت‌ها و تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌ها را نشان داد و بر همین اساس که با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های تشابه و ماتریس خروجی دندروگرام می‌باشد کلاستر بندی بر اساس روش UPGMA انجام شد.

تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده، از 0/510 تا 0/918 متغیر بود (جدول 4-5). بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پنجاب 89 و TN₂₃₄ به میزان 0/918 و کمترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پاکستانی و چینی به میزان 0/510 برآورد شد.

از نتایج به دست آمده بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده و آنالیز خوشه‌ای به روش UPGMA، دندروگرام ترسیم شده، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس داده‌های مولکولی به پنج گروه مجزا تقسیم بندی کرد (شکل 4-6). در گروه یک ژنوتیپ خارجی هندی قرار گرفت. گروه دو شامل ژنوتیپ‌های ایرانی ناز تک‌شاخه و ناز چندشاخه از استان مازندران بودند. این دو ژنوتیپ در بررسی تنوع از لحاظ صفات زراعی نیز در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های صفی‌آباد و TN₂₃₄ و TN₂₃₈ و TN₂₄₀ و محلی حاجی‌آباد از استان خوزستان، یکتا با منشاء ناشناخته، اولتان از استان اردبیل، عراقی از عراق، جیرفت 2 از کرمان، پنجاب 89 از پاکستان، برازجان 1 و برازجان 2 از بوشهر و داراب 1 و داراب 14 از استان فارس و زودرس از حاشیه مدیترانه در گروه سوم جای گرفتند. گروه چهارم متشکل از ژنوتیپ‌های TN₂₂₃ از خوزستان،

¹ Jacard

² Dice

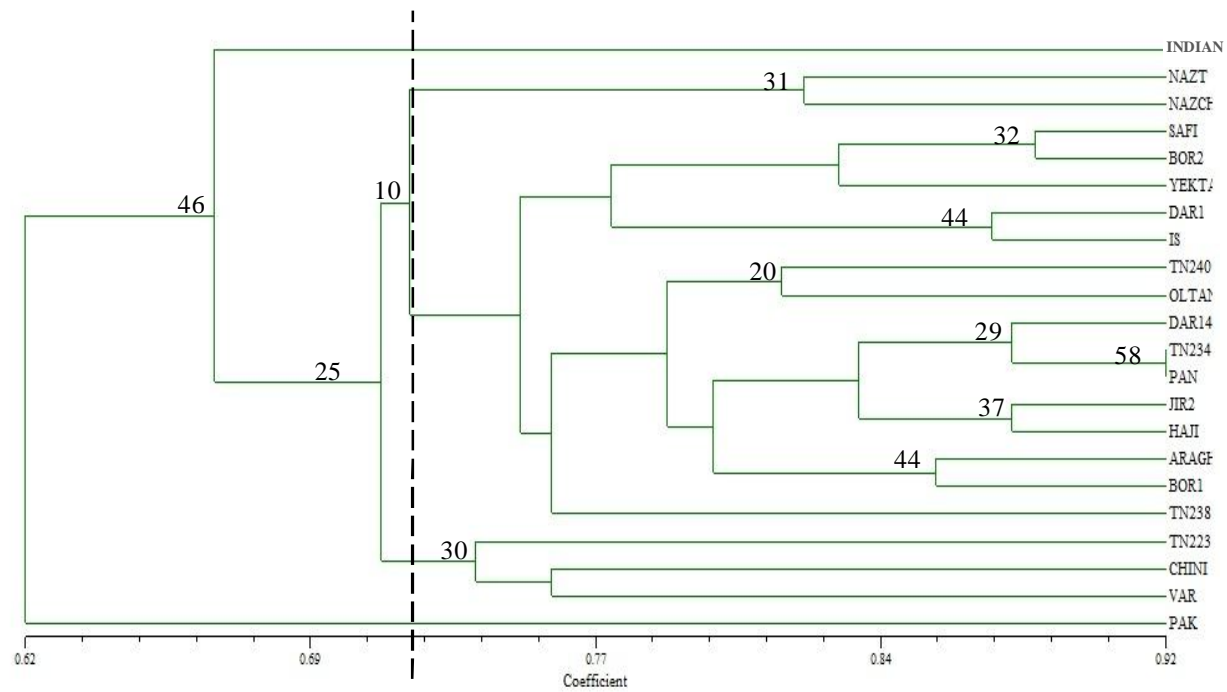
³ Simple Matching

ورامین 2228 از استان اصفهان و چینی می باشد.

ژنوتیپ پاکستانی نیز همانند ژنوتیپ خارجی هندی به طور جداگانه و در گروه پنجم قرار گرفت.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	
A	1/00																						
B	0/622	1/00																					
C	0/595	0/800	1/00																				
D	0/674	0/658	0/883	1/00																			
E	0/571	0/666	0/702	0/604	1/00																		
F	0/755	0/711	0/723	0/674	0/530	1/00																	
G	0/632	0/666	0/787	0/744	0/571	0/673	1/00																
H	0/595	0/711	0/829	0/744	0/659	0/723	0/872	1/00															
I	0/612	0/822	0/787	0/674	0/551	0/693	0/734	0/787	1/00														
J	0/653	0/622	0/680	0/697	0/510	0/693	0/734	0/723	0/795	1/00													
K	0/653	0/733	0/872	0/813	0/673	0/734	0/775	0/829	0/755	0/795	1/00												
L	0/612	0/822	0/872	0/790	0/673	0/693	0/775	0/744	0/755	0/673	0/836	1/00											
M	0/673	0/688	0/723	0/720	0/530	0/673	0/755	0/723	0/693	0/734	0/734	0/734	1/00										
N	0/612	0/711	0/787	0/767	0/673	0/734	0/775	0/829	0/714	0/755	0/872	0/795	0/734	1/00									
O	0/653	0/733	0/787	0/697	0/632	0/816	0/775	0/829	0/714	0/673	0/795	0/795	0/693	0/795	1/00								
P	0/734	0/622	0/680	0/651	0/591	0/653	0/680	0/714	0/755	0/795	0/714	0/734	0/714	0/622	1/00								
Q	0/653	0/622	0/765	0/697	0/632	0/734	0/612	0/680	0/673	0/673	0/795	0/673	0/612	0/714	0/755	0/755	1/00						
R	0/734	0/688	0/787	0/744	0/673	0/775	0/693	0/744	0/673	0/714	0/755	0/755	0/653	0/755	0/836	0/632	0/755	1/00					
S	0/755	0/622	0/680	0/697	0/612	0/755	0/673	0/723	0/693	0/775	0/816	0/693	0/714	0/816	0/775	0/693	0/693	0/857	1/00				
T	0/653	0/733	0/787	0/674	0/673	0/693	0/734	0/787	0/795	0/714	0/836	0/795	0/693	0/755	0/795	0/755	0/795	0/795	0/795	0/734	1/00		
U	0/734	0/688	0/702	0/674	0/551	0/816	0/775	0/787	0/755	0/795	0/836	0/755	0/775	0/836	0/836	0/755	0/755	0/795	0/816	0/872	1/00		
V	0/693	0/688	0/744	0/720	0/632	0/816	0/734	0/787	0/714	0/795	0/872	0/775	0/795	0/693	0/918	0/836	0/755	0/795	0/836	0/857	0/836	0/917	1/00

جدول 4-6 میزان ضریب تشابه ژنتیکی تطابق ساده بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش. کد ژنوتیپ‌ها: A- هندی B- ناز تک‌شاخه C- صفی‌آباد D- برازجان 2 E- پاکستان F- TN₂₄₀ G- داراب 1 H- زودرس I- ناز چندشاخه J- چینی K- داراب 14 L- یکتا M- TN₂₂₃ N- TN₂₃₄ O- اولتان P- ورامین Q- TN₂₃₈ R- عراقی ساده S- برازجان 1 T- جیرفت 2 U- محلی حاجی‌آباد V- پنجاب 89



شکل 4-6 دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در نرم افزار NTSYSpc نسخه 2.10. در این دندروگرام، ارقام در پنج گروه قرار داده شدند. ژنوتیپ‌ها: هندی، ناز تک‌شاخه، صفی‌آباد، برازجان 2، پاکستان، TN₂₄₀، داراب 1، زودرس، ناز چندشاخه، چینی، داراب 14، یکتا، TN₂₂₃، TN₂₃₄، اولتان، ورامین، TN₂₃₈، عراقی ساده، برازجان 1، جیرفت 2، محلی حاجی‌آباد، پنجاب 89

2-4-1-4 نتایج حاصل از آزمون منتل¹

در پژوهش حاضر، با استفاده از آزمون منتل همبستگی‌های کوفنتیک ضعیف و غیر معنی‌داری

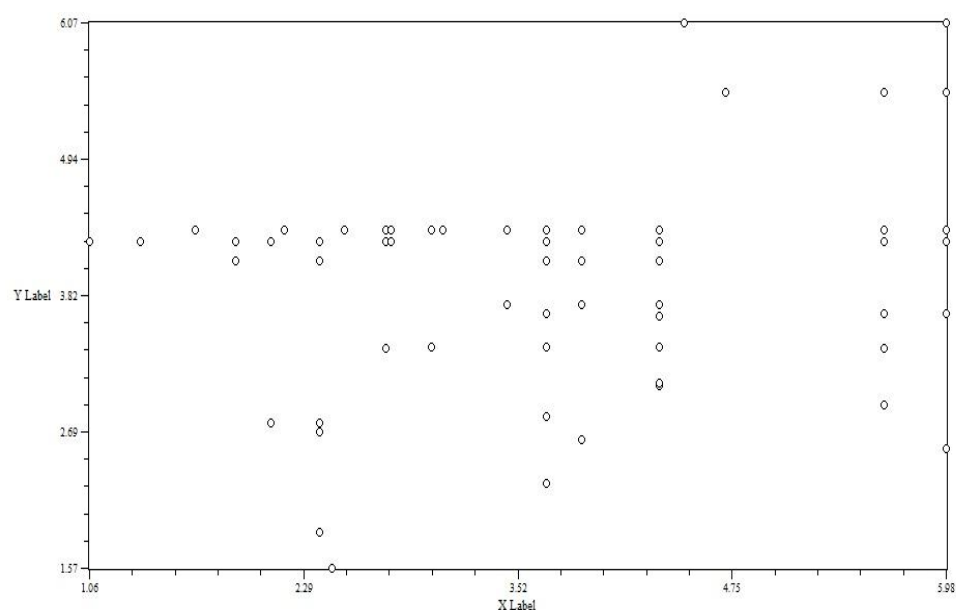
بین الگوهای تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی-زراعی و کیفی ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (جدول 4-6)(شکل 4-

7)(شکل 4-8)(شکل 4-9) .

جدول 4-7 ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مولکولی، مورفولوژیکی-زراعی و کیفی

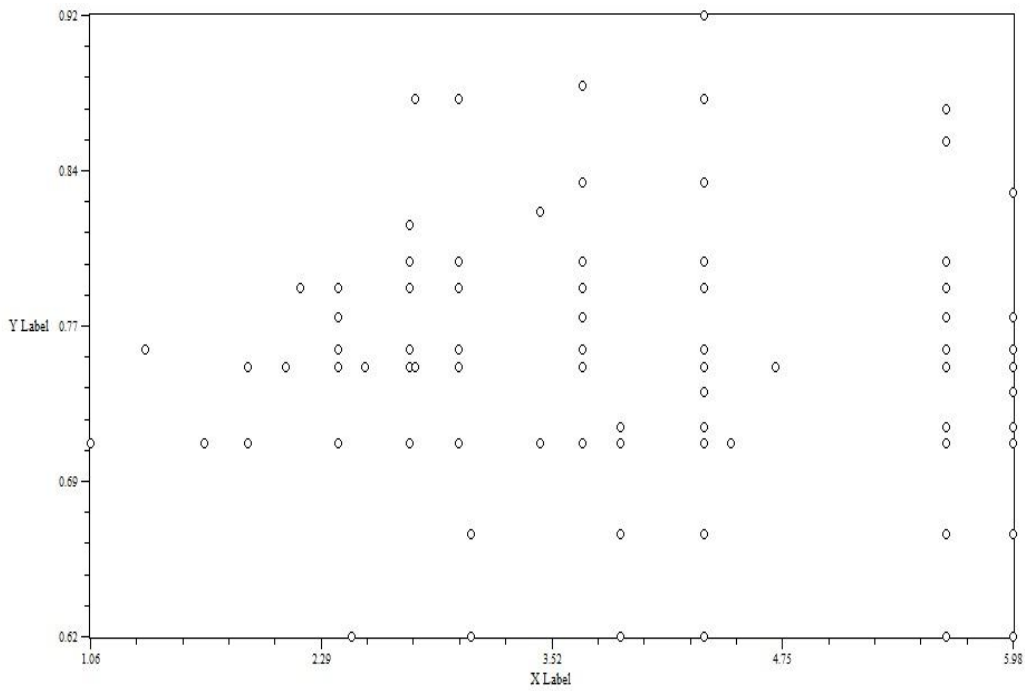
مولکولی	کیفی	مورفولوژیکی-زراعی	ضرایب همبستگی کوفنتیک
		1	مورفولوژیکی-زراعی
	1	0/47 ns	کیفی
1	0/11 ns	0/09 ns	مولکولی

ns : غیر معنی داری

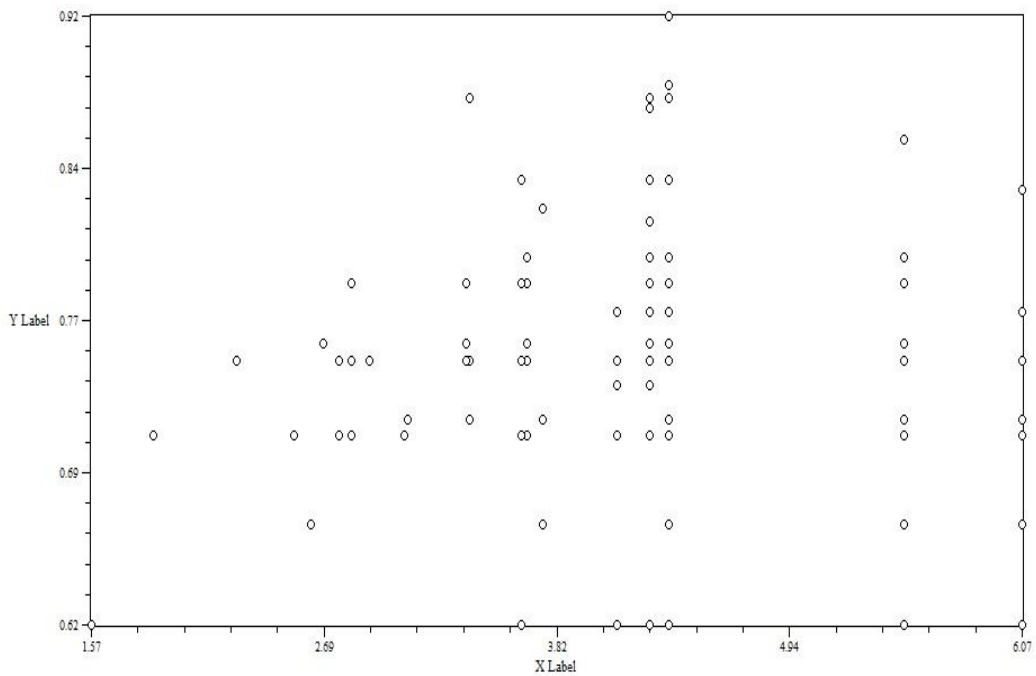


شکل 4-7 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مورفولوژیکی-زراعی و کیفی

¹ Mantel Test



شکل 4-8 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مورفولوژیک-زراعی و مولکولی



شکل 4-9 پلات حاصل از مقایسه ضرایب همبستگی کوفنتیک بین الگوهای تنوع مولکولی و کیفی

3-4-1-4 نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)¹، تبدیلی در فضای برداری است که بیشتر برای کاهش ابعاد مجموعه داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سال 1901 توسط کارل پیرسون² ارائه شد. این آنالیز شامل تجزیه مقادیر ویژه ماتریس کواریانس می‌باشد. این تکنیک بر اساس داده‌های مولکولی در آنالیز تنوع ژنتیکی نیز کاربرد دارد و می‌توان از آن برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد. همچنین این آنالیز نشان‌دهنده نحوه توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشد.

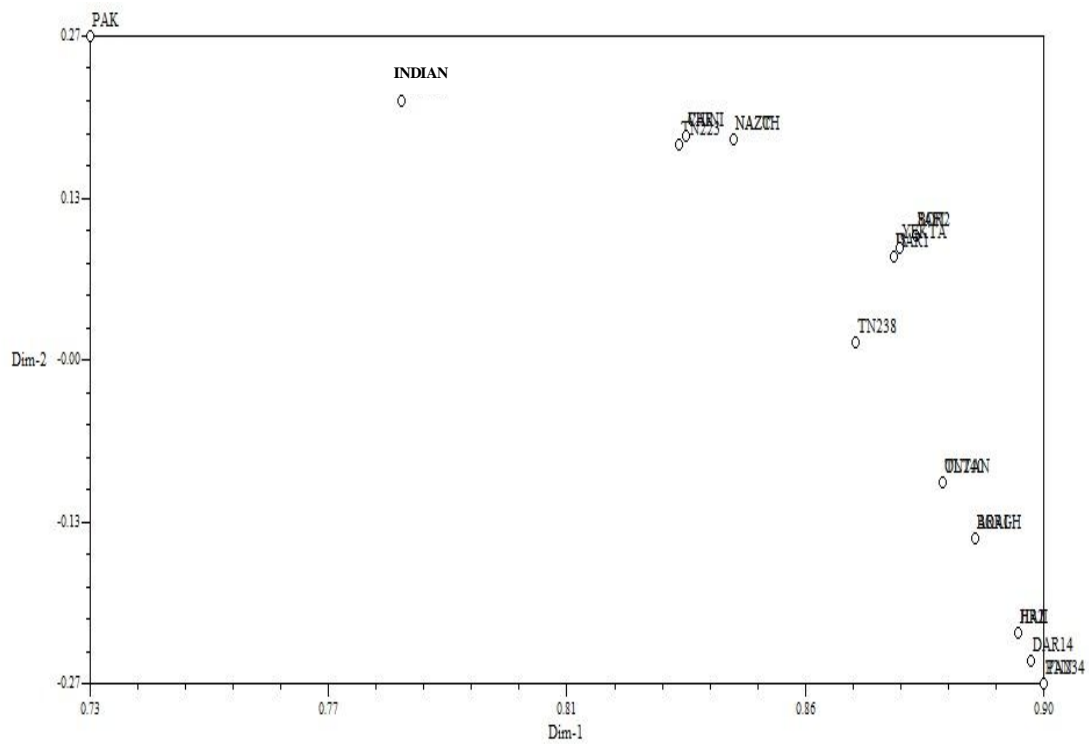
بر اساس نتایج به دست آمده، درصد مقادیر ویژه دو مؤلفه اول یا PCoA1 و PCoA2 به ترتیب 74/27 و 3/21 (در مجموع 77/48) از واریانس کل را نشان دادند. این مقدار به دست آمده نشان‌دهنده این می‌باشد که نشانگرهای مورد استفاده توزیع ارقام در نمودارهای حاصل، انطباق نسبی با خوشه‌های دندروگرام را نشان می‌دهد (جدول 4-7).

جدول 4-8 داده‌های حاصل از تجزیه به مختصات اصلی

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
1	16/34	74/27	74/27
2	0/70	3/21	77/48
3	0/54	2/45	79/94

¹ Principal Coordinant Aanalysis

² Karl Pearson



شکل 4-10 پلات دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی. ژنوتیپ‌ها: هندی، ناز تک‌شاخه، صفی‌آباد، برازجان 2، پاکستان، TN₂₄₀، داراب 1، زودرس، ناز چندشاخه، چینی، داراب 14، یکتا، TN₂₂₃، TN₂₃₄، اولتان، ورامین، TN₂₃₈، عراقی ساده، برازجان 1، جیرفت 2، محلی حاجی‌آباد، پنجاب 89

شاخص تنوع شانون یک معیار ریاضی برای نشان دادن تنوع گونه‌ها می‌باشد که به زیست‌شناسان برای پی بردن به ساختار جامعه و تنوع موجود در آن کمک می‌کند. جامعه با تنوع بالا دارای شاخص تنوع شانون بالا و جامعه با تنوع کم تنوع شانون پایین دارد (Begon *et al.*, 1996).

بیشترین مقدار SI (شاخص اطلاعات شانون¹)، مربوط به آغازگر ZM-20 و کمترین آن مربوط به آغازگر ZM-45، با متوسط مقدار 0/78 بود. همچنین، بیشترین تعداد آل‌های موثر² (Ne) در آغازگر SEM-434 با مقدار 2/90 و کمترین آن در آغازگر ZM-45 با مقدار 1/00 و متوسط 1/97 محاسبه شد. از نظر هتروزیگوسیتی مشاهده شده، آغازگر ZM-11 با 0/95 بیشترین مقدار و آغازگر ZM-45 و SEM-9 با میزان صفر کمترین و متوسط مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده 0/49 به دست آمد (جدول 4-8).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، نسبت برآورد شده افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که به صورت تصادفی انتخاب شده است. یک جایگاه ژنی اگر دارای هتروزیگوسیتی بیشتر از 0/1 باشد، چند شکل است و اگر این مقدار بیشتر از 0/7 باشد، به شدت چند شکل می‌باشد (Jothi, 2008).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار نیز در آغازگر SES-434 با میزان 0/67 بیشترین مقدار و آغازگر ZM-45 با میزان 0/00 کمترین مقدار و متوسط مقدار 0/46 به دست آمد (جدول 4-8). این نتایج نشان دادند که آغازگر SES-434 با بیشترین میزان چند شکلی، توانسته است بهتر از دیگر آغازگرها تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های کنجد مورد آزمایش را نشان دهد.

¹ Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

² Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

جدول 4-9 داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد استفاده

آغازگرها	شاخص اطلاعات شانون (SI)	تعداد آل‌های موثر (Ne)	تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)
SEM-10	0/63	1/52	3	0/40	0/35
ZM-20	1/21	2/53	6	0/86	0/61
ZM-11	1/01	2/41	4	0/95	0/59
SEM-292	0/96	2/29	4	0/90	0/57
ZM-45	0/00	1/00	1	0/00	0/00
SEM-12-27	0/94	2/13	4	0/63	0/54
SEM-74	0/57	1/63	2	0/52	0/39
SEM-249	0/87	2/02	3	0/50	0/51
SEM-440	0/59	1/67	2	0/22	0/41
SEM-434	1/08	2/90	3	0/50	0/67
SEM-178	0/61	1/51	3	0/40	0/34
SEM-100	0/73	1/68	3	0/18	0/41
SEM-428	1/16	2/73	4	0/63	0/64
ZM-21	0/99	2/16	4	0/63	0/55
SEM-9	0/41	1/32	2	0/00	0/25
میانگین کل	0/78	1/97	3/2	0/49	0/46

2-4 بحث و نتیجه‌گیری

اولین گام برای ایجاد ژرم‌پلاسم، تعیین تنوع ژنتیکی است. میزان تنوع ژنتیکی، به گياه اجازه سازگاري به تغييرات محيطي مانند آفات و بيماري‌هاي جديد و شرايط آب و هوايي را مي‌دهد. بنا بر اين حفاظت از تنوع ژنتيكي بسيار مهم است. بانك‌هاي ژرم‌پلاسم حاوي انواع گياهان كشت شده و وحشي براي حفاظت از تنوع ژنتيكي هستند. از آنجايي كه كه نشانگرهاي ژنتيكي در سطح ژنوم پراكنده هستند و تحت تاثير شرايط محيطي قرار نمي‌گيرند، ابزارهاي مهمي براي تعيين و شناسايي تنوع ژنتيكي مي‌باشند. نشانگرهاي ريزماهواره، يكي از نشانگرهاي هستند كه در سال‌هاي اخير بيشترين کاربرد را داشته و از ديگر نشانگرها ارجح‌تر هستند.

طبقه‌بندي ژنوتپ‌ها بر اساس خصوصيات زراعي و نشانگرهاي مولكولي از روش‌هاي متداول ارزايي تنوع ژنتيكي در گياهان است. هنگامي كه اطلاعات نشانگرهاي مولكولي و غير مولكولي در دسترس باشد، معمولاً از هر دوسري از داده‌ها به طور جداگانه استفاده مي‌شود. در اين مطالعه، علاوه بر استفاده از نشانگر EST-SSR، برخي صفات زراعي- مورفولوژيكي و كيفي نيز براي ارزايي سطوح تنوع ژنتيكي 22 ژنوتپ كنجد گردآوري شده از نواحي مختلف جغرافيايي آسيا، مورد بررسي قرار گرفت. براساس نتايج به‌دست آمده از تجزيه خوشه‌اي با داده‌هاي زراعي، كيفي و مولكولي و مقايسه آن‌ها اين‌طور به نظر مي‌رسد كه ژنوتپ‌هاي مناطق مختلف تمايل به قرارگيري در گروه‌هاي مشابه و در نتيجه عدم تطابق تنوع ژنتيكي و جغرافيايي وجود دارد. لائورنتين و كارلوسكي (2006) با بررسي نمونه‌هاي كنجد با استفاده از نشانگر مولكولي AFLP گزارش نمودند هيچ ارتباطي بين نواحي جغرافيايي و گروه‌بندي براساس شباهت ژنتيكي وجود ندارد. پارسائيان و همكاران (2011) نيز توسط نشانگر مولكولي ISSR بر روي ژنوتپ‌هاي كنجد مشابه ژنوتپ‌هاي مورد استفاده در اين مطالعه، همبستگي كوفنتيك ضعيف و غيرمعني‌داري بين الگوي تنوع ژنتيكي و فواصل جغرافيايي ژنوتپ‌ها مشاهده كردند. ساير محققين نيز

یافته‌های مشابهی را در بررسی تنوع ژنتیکی در کنجد با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD (Gulhan *et al.*, 2004) و ISSR (Kim *et al.*, 2004) گزارش نمودند. تبادل مواد گیاهی بین مناطق مختلف، طی تاریخ زراعت کنجد در آن مناطق به همراه فرآیندهایی چون موتاسیون، انتخاب و دگرگشی که در کنجد بسته به وجود حشرات در زمان گل‌دهی به 60 درصد نیز می‌رسد (and Karlovsky, 2006) می‌توانند منجر به ایجاد تنوع در کنجدهای یک ناحیه و گروه‌بندی ناقص ژنوتیپ‌ها بر اساس توزیع جغرافیایی گردند (Kumar *et al.*, 2006). همچنین، گیاهانی که از لحاظ مورفولوژیکی شبیه هم هستند، لزوماً از لحاظ ژنتیکی مشابه نیستند (Khan *et al.*, 2008). بنابراین، منابع ژنی متفاوت می‌تواند منجر به فنوتیپ‌های مشابه شود. از آنجایی‌که نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم پراکنده هستند و نیز تحت تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند، بنابراین انتخاب ژنوتیپ‌ها برای اجرای برنامه‌های اصلاحی در کنجد باید بر اساس تنوع ژنتیکی صورت گیرد. بر اساس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی مورد استفاده در این مطالعه و نیز نشانگر ISSR در پژوهشی که توسط پارساییان و همکاران (2011) بر روی ژنوتیپ‌های تقریباً مشابه صورت گرفت، انتظار بر این بود که ژنوتیپ‌های پاکستان و پنجاب 89، از مناطق جغرافیایی مشابه، در یک گروه قرار گیرند، ولی بر خلاف انتظار، این دو ژنوتیپ در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند. از سوی دیگر ژنوتیپ‌های ناز تک‌شاخه و ناز چندشاخه که هر دو از مناطق جغرافیایی مشابهی هستند، از لحاظ صفات زراعی-مورفولوژیکی با هم هم‌گروه بوده و نیز از لحاظ الگوی ژنتیکی در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. این نتایج در مطالعه انجام شده با نشانگر ISSR (پارساییان و همکاران، 2011) نیز مشهود می‌باشد. همچنین، می‌توان ارتباط بین دو ژنوتیپ پاکستان و چینی را با میزان تشابه ژنتیکی کم و فاصله جغرافیایی زیاد نسبت داد. پیشتر نیز در مطالعه‌ای که توسط علی و همکاران (2007) به منظور بررسی سطح تنوع ژنتیکی در ارتباط با نواحی جغرافیایی و خصوصیات مورفولوژیکی، 96 رقم کنجد جمع‌آوری شده از نواحی مختلف جهان با 21 جفت آغازگر AFLP انجام

شد، نشان دادند که ارقام مورد مطالعه از لحاظ جغرافیایی به دو گروه عمده آسیای شرقی و جنوبی تفکیک شدند. دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی نشانگرهای EST-SSR و ISSR به نکته قابل توجه-ای اشاره دارد و آن این است که ژنوتیپ‌های پاکستانی و هندی در هر دو، به صورت جداگانه و متمایز از دیگر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند که حاکی از تفاوت ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. با توجه به خصوصیات زراعی بسیار مختلف ژنوتیپ هندی، شاید این ژنوتیپ مربوط به گونه دیگری باشد.

انتخاب این نشانگر به این دلیل است که تعداد نشانگرهای SSR قابل دسترس در این گیاه برای مطالعه آنالیز تنوع بسیار محدود می‌باشد. اولین گزارشی که در مورد EST-SSRها منتشر شد توسط Wei و همکاران در سال 2008 صورت گرفت. آن‌ها بیان کردند که استفاده از ESTهای مشتق شده از SSRها هزینه کمی در بر خواهد داشت و نیز به این دلیل که آن‌ها از رونوشت‌ها مشتق شده‌اند به طور بالقوه، از اهمیت بیشتری در آنالیز تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی مقایسه‌ای، اصلاح و انتخاب به کمک نشانگر در مراحل مختلف رشدی و برای اهداف خاص (مانند افزایش عملکرد و بهبود خصوصیات کیفی بویژه میزان روغن) برخوردار هستند.

با وجود محدود بودن تعداد نمونه‌های مورد آزمایش و همچنین نشانگرها، چندشکلی 93/33 درصدی به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده تنوع نسبتاً بالایی در ژرم‌پلاسم حاضر است. زمانی که تنوع بین ژنوتیپ‌ها بالا باشد، استفاده از تعداد کم آغازگر کافی خواهد بود (Li and Midmore, 1999). میلان و همکاران (1996)، ژنوتیپ‌های رز را با تنها 10 آغازگر RAPD تعیین کردند. همچنین پاول و همکاران (1996)، گزارش کردند حتی در مواردی که تعداد کمی مکان ژنی به کار رفته باشد نشانگرهای SSR تمایز خوبی را بین افراد با قرابت بیشتر نشان می‌دهند.

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت تنوع موجود در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در

سطح مطلوبی است و می‌توان از این موضوع برای اهداف مختلف به‌نژادی در کنج‌د استفاده کرد و نیز نشان دهنده میزان مطلوب کارآیی استفاده از نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد.

3-4 پیشنهادات

- باتوجه به ویژگی‌های دارویی، خوراکی و صنعتی منحصر به فرد دانه گیاه کنجد، مطالعات و بررسی‌های بیشتری در زمینه‌های مختلف بر روی این گیاه ارزشمند انجام شود.
- تعداد آغازگرهای بیشتری مورد استفاده قرار گیرند تا بتوانند قسمت‌های بیشتری از ژنوم را پوشش دهند.
- بر روی ژنوتیپ‌هایی که به‌طور برجسته تفاوت‌های آشکاری نشان دادند، که احتمال می‌رود از گونه‌ای متفاوت‌تر باشند، مطالعات بیشتری صورت گیرد.
- برای به‌دست آوردن بالاترین هتروزیس و عملکرد بین ژنوتیپ‌هایی که بیشترین تفاوت را چه در سطح زراعی - مورفولوژیکی و کیفی و چه در سطح مولکولی نشان دادند تلاقی انجام شود.
- بررسی ارتباط بین صفات مهم به‌ویژه عملکرد، روغن، درصد اسیدهای چرب غیراشباع و آنتی-اکسیدان‌های کنجد با هر یک از آغازگرها، برای یافتن وجود یا عدم وجود ارتباط بین نشانگر با صفت مطلوب مورد نظر به‌منظور بهره‌مندی از مزایای انتخاب به کمک نشانگر.

منابع

شاهین‌نیا ف. و سید طباطبایی ب. ا. (1392) "ابداع نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های بیان شده (ESTs) و غربال ژنتیکی برای چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژنوم گیاهان " ژنتیک نوین، دوره هشتم، شماره 2، ص 117-130.

فارسی، م و ذوالعلی ج. سال 1390. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه). 552 صفحه.

نقوی، م. ر. قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. 3117. نشانگرهای مولکولی مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. 342 صفحه.

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, R.F., Moreno, R.F. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252:1651 - 1656.

Agrawal, A.F. and Wang, A.D. 2008. Increased transmission of mutations by low-condition females: Evidence for condition-dependent DNA repair. *PLoS Biol.*, 6: e30.

Akbar, F., Rabbani, M.A., Masood, M.S. and Shinwari, Z.K. 2011. Genetic diversity of sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. *Pak J Bot*, 43(4), pp.2153-2160.

Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132(4), pp.1131-1139.

Ali GM, Yasumoto S, Seki-Katsuka, M. 2007. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Electron J Biotechnol* 10(1):12–23.

Anderson, J.R., Lübberstedt, T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.

Ashri, A. 1998. Sesame breeding. *Plant Breeding Review*, 16:179–228.

- Badri, J., Yepuri, V., Ghanta, A., Siva, S. and Siddiq, E.A. 2014.** Development of microsatellite markers in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(5), pp.603-614.
- Bardakci, F. 2001.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol*, 25(1), 2185-96.
- Baydar, H., Turgut İ., Turgut, K. 1999.** Variation of Certain Characters and Line Selection for Yield, Oil, Oleic and Linoleic Acids in the Turkish Sesame (*Sesamum indicum* L.) Populations. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*. 23: 431-441.
- Bedigian, D., Smyth, C.A. and Harlan, J.R. 1986.** Patterns of morphological variation in *Sesamum indicum*. *Economic Botany*, 40(3), pp.353-365.
- Bedigian, D. 1988.** *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae): Ethnobotany in Sudan, Crop Diversity, Lignans, Origin, and Related Taxa. In: Goldblatt, P. and Lowry, P.P., Eds., *Modern Systematic Studies in African Botany (MSB 25)*, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 315-321.
- Bedigian, D., Kiple, K.F. and Ornelas-Kiple, C.K. 2000.** ‘Sesame’ The Cambridge World History of Food. New York. Cambridge University Press. 1: 411–421.
- Bedigian, D. 2003.** Evolution of sesame revisited: Domestication, diversity and prospects. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50 : 779 – 787 .
- Bedigian, D. 2003.** Sesame in Africa: Origin and Dispersals. In: Neumann, K., Butler, A. and Kahlheber, S., Eds., *Food, Fuel and Fields: Progress in African Archaeobotany*. Heinrich Berth Institute, Cologne, 17-36.
- Bedigian, D. 2010.** Characterization of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Germplasm: A Critique. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 641-647.
- Begon, M., Harper, J.L., and Townsend, C.R. 1996.** Ecology: Individuals, Populations, and Communities, 3rd edition, Blackwell Science Ltd., Cambridge, MA.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. and Rapp,**

- B.A. 2002.** GenBank. *Nucleic Acids Research*, 30:17 -20.
- Bhat, K.V., Babrekar, P.P. and Lakhanpaul, S. 1999.** Study of Genetic Diversity in Indian and Exotic Sesame (*Sesamum indicum* L.) Germplasm Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Euphytica*, 110, 21-34.
- Bhat, P.R., Krishnakumar, V., Hendre, P.S., Rajendrakumar, P., Varshney, R.K. and Aggarwal, R.K. 2005.** Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats, markers from robusta coffee variety 'C_R' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora*_ *Coffea congensis*). *Mol Ecol Notes* 5: 80–83.
- Bin, W.L., Yang, Z.L., Zhan, Z.Y., Zhen, G.W. and Zhen. Z.T. 2008.** Developing EST-Derived Microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Agron. Sin.* 34: 2077-2084.
- Bisht, I.S., Mahajan, R.K. Loknathan T.R. and Agrawal, R.C. 1998.** Diversity in Indian sesame collection and stratification of germplasm accessions in different diversity groups. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 45: 325-335.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., & Trujillo, I. 2009.** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122(2), 209-215.
- Boguski, M.S., Lowe, T.M., Tolstoshev, C.M. 1993.** dbEST: database for “expressed sequence tags”. *Nature Genetics*, 4:332-333.
- Boguski, M.S., Tolstoshev, C.M. and Bassett, D.E. 1994.** Gene discovery in dbEST. *Science*, 265: 1993-1994.
- Cheung, S.C., Szeto, Y.T., Benzie, I.F. 2007.** Antioxidant protection of edible oils. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 62, 39–42.
- Cho, YG., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, SR., Park, W.D., Ayres, N. and Cartinhour, S. 2000.** Diversity of microsatellites derived from genomic

- libraries and GeneBank sequences in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 713-722.
- Costa, F.T., S.M. Neto, C. Bloch, O.L. Franco. 2007.** Susceptibility of Human Pathogenic Bacteria to Antimicrobial Peptides from Sesame Kernels. *Current Microbiology* 55: 162–166.
- Dehestani, A. and Kazemi Tabar, S.K. 2007.** A Rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian J. Plant Sci.*, 6(6): 977-981, 2007.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Dixit, A., Jin, M.H., Chung, J.W., Yu, J.W., Chung, H.K., Ma, K. -H., Park, Y.-J., Cho, E.-G. 2005.** Development of polymorphic microsatellite markers in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Mol. Ecol. Notes*, 5, 736–738.
- El-Adawy, T.A. and Mansour, E.H. 2000.** Nutritional and Physicochemical Evaluations of Tahina (Sesame Butter) Prepared from Heat-Treated Sesame Seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2005-2011.
- Eujayl, I., Sorrels, M.E., Baum, M., Wolters, P., Powell, W. 2002.** Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 399-407.
- FAOSTAT. 2011.** Food and Agricultural Organization of the United Nations. Statistical Database.
- Fuller, D.Q. 2003.** Further Evidence on the Prehistory of Sesame. *Asian Agr-History Journal*, 7, 127-137.
- Ganesh, S.K. and Thangavelu, S. 1995.** Genetic divergence in sesame (*Sesamum indicum*). *Madras Agric. J.*, 82: 263–265.

- Gebremichael, D.E. and Parzies, H.K. (2011). Genetic variability among landraces of sesame in Ethiopia. *African Crop Science Journal*, 19(1).
- Gulhan, E.A., Taskin, M., Turgut, K. 2004.** Analysis of genetic diversity in Turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) populations using RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51:599-607.
- Gupta P.K, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan H.S. 2003.** Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Gen Genet*, 270:315–323.
- Gupta P.K, Rustgi S. 2004.** Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional and Integrated Genomics* 4:139-162.
- Hopkins, M.S., Casa, A.M., Wang, T., Mitchell, S.E., Dean, R.E., Kochert, G.D. and Kresovich, S. 1999.** Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop science*, 39(4), pp.1243-1247.
- Harlan, J.R. 1992.** American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison. Crops and Man. 2nd Edition, Hiremath, S.C. and Patil, C.G. (1999) Genome Homology and the Putative Progenitor of Sesame. *Journal of Cytology and Genetics*, 34, 69-74.
- Hess, D.E. and Dodo, H. 2004.** Potential for sesame to contribute to integrated control of *Striga hermonthica* in the West African Sahel. *Crop Protection*. 23: 515–522.
- Hsu, D.Z., Su, S.B., Chien, S.P., Chiang, P.J., Li, Y.H. and Lo, Y.J. 2005.** Effect of Sesame Oil on Oxidative-Stress- Associated Renal Injury in Endotoxemic Rats: Involvement of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines. *Shock*, 24, 276-280.
- Ihlenfeldt, H.D. and Grabow-Seidensticker, U. 1979.** The Genus *Sesamum* L. and the Origin of the Cultivated Sesame. In: Kunkel, G., Ed., *Taxonomic Aspects of African Economic Botany: Proceedings of the IX Plenary Meeting of A.E.T.F.A.T.*, 18-23 March 1978, Las Palmas de Gran Canaria, 53-60.

- Isshiki, S. and Umezaki, T. 1997.** Genetic Variations of Isozymes in Cultivated Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Euphytica*, 93, 375-377.
- Jiang, G. L. 2013.** Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, 45-83.
- Johnson, L.A., Suleiman, T.M. and Lusas, E.W. (1979). Sesame protein: A review and prospectus. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56: 463-468.
- Jothi, M.P. 2008.** Genetic distance and phylogenetic inference, Course notes, University of Putra Malaysia.
- Kalendar, R., Flavell, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman, A.H. 2011.** Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106, 520–530.
- Kawase, M. 2000.** Genetic Relationships of the Ruderal Weed Type and the Associated Weed Type of *Sesamum mulayanum* Nair Distributed in the Indian Subcontinent to Cultivated Sesame, *S. indicum* L. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 44, 115-122.
- Khan, M. A., von Witzke-Ehbrecht, S., Maass, B. L., & Becker, H. C. 2009.** Relationships among different geographical groups, agro-morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in safflower (*Carthamus tinctorius*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), 19-30.
- Khidir, M.O. 1980.** Harvesting of Sesame. In: Mati, J.K.G., Ed., *Appropriate Mechanization for Small Farms in Africa: Proceedings of the Workshop of AAASA/KNAAAS*, City Printing Works Ltd., Nairobi, 44.
- Kim, D.H., Zur, G., Danin-Poleg, Y., Lee, S.W., Shim, K.B., Kang, C.W. and Kashi, Y. 2002.** Genetic relationships of sesame germplasm collection as revealed by inter-simple sequence repeats. *Plant Breeding*, 121(3); 259-262.
- Kresovich, S., Szewc-McFadden, A.K., Bliet, S.M. and McFerson, J.R. 1995.** Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-

fractionated genomic library of *Brassica napus* L.(rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics*, 91(2); 206-211.

Kumar, S. 1999. DNA markers in plant improvement, An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.

Kumar, S., Ramesh, R., Singh, S.P. 2006. Multivariate analysis and clustering of *Cuphea procumbens* inbred lines. *Genetika*. 38:23-30

Kumar, M.S.A.K. and Hiremath, S.C. 2008. Cytological Analysis of Interspecific Hybrid between *Sesamum indicum* L. X *S. orientale* L. Var. *malabaricum*. *Karnataka Journal of Agricultural Science*, 21, 498-502.

Laurentin, H.E. and Karlovsky, P. 2006. Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *BMC genetics*, 7(1), p.10.

Laurentin, H. 2007. Genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.): molecular markers, metabolic profiles and effect of plant extracts on soil-borne pathogenic fungi.

Lavi, U., Akkaya, M., Bhagwat, A., Lahav, E. and Cregan, P.B. 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M.). *Euphytica*.80: 171-177.

Lee, C.C., Chen, P.R., Lin, S., Tsai, S.C., Wang, B.W. and Chen, W.W. 2004. Sesamin Induces Nitric Oxide and Decreases Endothelium-1 Production in HUVECs: Possible Implications for Its Antihypertensive Effect. *Journal of Hypertension*, 22: 2329-2338.

Li M. and Midmore D.J. 1999. Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Hensch) cultivated in Australia, using Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*,74: 224–231.

Liu, C. J. 1997. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra*

- revealed by RAPD analysis. *Euphytica*, 98: 21–27.
- Mabberley, D. J. 1997.** The Plant-book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants
Second Edition.
- Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Suarez, E.Y. and Dubcivsky, J. 2001.**
Quantitative evaluation of diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop
Sci.* 41:682-690.
- Mehlenbacher, S.A., Cociu, V. and Hough, L.F. 1991.** Apricots (*Prunus*). In: Moore,
J.N., J.R. Ballington (eds) Genetic Resources of Temprate Fruit and Nut Crops.
International Society for Horticulture Science 65-107.
- Millan, T., Osuna, F., Cobos, S., Torres, A.M. and Cubero, A.M. 1996.** Using RAPDs
to study phylogenetic relationships in rosa. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 273–
277.
- Mohamed, H.M.A. and Awatif, I.I. 1998.** The Use of Sesame Oil Unsaponifiable Matter
as a Natural Antioxidant. *Food Chemistry*, 62, 269-276.
- Mondini, L., Noorani, A. and Pagnotta, M. 2009.** Assessing Plant Genetic Diversity by
Molecular Tools. *Diversity*, 1:19-35.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant
DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4325.
- Nagaraj, H.S., Gasser, R.B. and Ranganathan, S. 2006.** A hitchhiker’s guide to
expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 8 : 6-21.
- Nakano, D., Kurumazuka, D., Nagai, Y., Nishiyama, A., Kiso, Y. and Matsumura, Y.
2008.** Dietary Sesamin Suppresses Aortic NADPH Oxidase in DOCA Salt Hypertensive
Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35: 324-326.
- Namiki, M. 1995.** The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Rev. Int.*,
11: 281-239.
- Nanthakumar, G., Singh, K.N. and Vaidynathan, P. 2000.** Relationships between Culti-

vated Sesame (*Sesamum* sp.) and the Wild Relatives Based on Morphological Characters, Isozymes and RAPD Markers. *Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54: 5-12.

Nweke, F.N., Ubi, B.E. and Kunert, K. 2011. Simple Sequence Repeat Polymorphisms in Nigerian Sesame Cultivars and its Relationship with Morpho-Agronomic Traits. *Journal of Crop Improvement*, 25(5): 572-596.

Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsuba, K. 1992. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genetics* 2:173 -179.

Pontius, J.U., Wagner, L. and Schuler, G.D. 2002. Unigene: A unified view of the transcriptome. In: McEntyre J, Ostell J (eds.) *The NCBI Handbook, National Center for Biotechnology Information USA*.

Parsaeian, M., Mirlohi, A. and Saeidi, G. 2011. Study of genetic variation in sesame (*Sesamum indicum* L.) using agro-morphological traits and ISSR markers. *Russian journal of genetics*, 47(3): 314-321.

Pathak, N., Rai, A. K., Saha, S., Walia, S., Sen, S. K., & Bhat, K. V. 2014. Quantitative dissection of antioxidative bioactive components in cultivated and wild sesame germplasm reveals potentially exploitable wide genetic variability. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(3), 127-139.

Pathak, N., Rai, A.K., Kumari, R., Thapa, A. and Bhat, K.V. 2014. Sesame Crop: An Underexploited Oilseed Holds Tremendous Potential for Enhanced Food Value. *Agricultural Sciences*, 5, 519-529.

Pathirana, R. 1994. Natural cross-pollination in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Breed.* 112(2): 167-170.

Peter, K.V. 2004. Woodhead Publishing in Food Science and Technology: *Handbook of spices*. 2.

- Reiter, R. S., Young, R. M., Scolnik, P. A., Koncz, C., Chua, N. H., & Schell, J. 1992.** Genetic linkage of the Arabidopsis genome: methods for mapping with recombinant inbreds and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Methods in Arabidopsis research.*, 170-190.
- Rohlf, F.J. 2000.** NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. *Applied Biostatistics, Exerter Publishing Ltd., New York, USA. Software.* ISBN 0-925031-18-6.
- Salazar, B., Laurentín, H., Castillo, M.A. and Dávila, M. 2006.** Reliability of the rapid technique for germplasm analysis of sesame (*Sesamum indicum* L) from Venezuela. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31(6): 456-460.
- Schulman, A.H. 2007.** Molecular markers to assess genetic diversity, *Euphytica*, 158: 313-321.
- Spandana, B., Reddy, V.P., Prasanna, G.J., Anuradha, G. and Sivaramakrishnan, S. 2012.** Development and characterization of microsatellite markers (SSR) in Sesamum (*Sesamum indicum* L.) species. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(6): 1594-1607.
- Thangavelu, S. 1994.** Diversity in Wild and Cultivated Species of *Sesamum* and Its Use. *Sesame Biodiversity in Asia Conservation, Evaluation and Improvement*, IPGRI, New Delhi, 13-23.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K. and Graner, A. 2003.** Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106:411-422.
- UN Food & Agriculture Organization (FAO). 2012.** "Major Food And Agricultural Commodities And Producers Countries By Commodity". Fao.org..
- Uzun, B., Lee, D. and Donini, P. 2003.** Identification of a molecular marker linked to the closed capsule mutant trait in sesame using AFLP. *Plant Breed.*,122:95–97.
- Uzun, B., Ülger, S. and Çağiran, M.İ. 2002.** Comparison of Determinate and

Indeterminate Types of Sesame for Oil Content and Fatty Acid Composition. *Turk J Agric For.* 26: 269-274.

Varshney, R.K., Mahender, T., Aggrawal, R.K. and Borner, A. 2007. Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney RK, Tuberosa R (eds.) *Genomics-Assisted Crop Improvement*, Vol I: Genomics Approaches and Platforms. Springer The Netherlands, pp13-30.

Varshney, R.K., Nayak, S.N., May, G.D. and Jackson, S.A. 2009. Next generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27: 522-530.

Varshney, R.K. 2010. Gene-Based Marker Systems in Plants: High Throughput Approaches for Marker Discovery and Genotyping. In: Varshney RK, Jain SM, Brar DS (eds.) *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Springer Science+Business Media BV pp. 119-142.

Vijay, Y., Malathi, S., Rao, K.V.S., Vemireddy, L.R., Jyothi, B., Dineshkumar, V., Anuradha, G., Siddiq, E.A. 2013. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes using EST derived SSR markers. *J Crop Sci Biotechnol*, 16: 93–103.

Wang, Z., Jia, Y., Rutger, J.N. and Xia, Y. 2007. Rapid survey for presence of a blast resistance gene *Pi-ta* in rice cultivars using the dominant DNA markers derived from portions of the *Pi-ta* gene. *Plant Breeding*, 126, 36-42.

Wei, L.B., Zhang, H.Y., Zheng, Y.Z., Guo, W.Z. and Zhang, T.Z. 2008. Development and utilization of EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 34(12): 2077-2084.

Wei, W., Qi, X., Wang, L., Zhang, Y., Hua, W., Li, D., Lv, H., Zhang, X. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC*

Genomics, 12: 451.

- West, M.A.L., van, Leeuwen. H., Kozil, A., Kliebenstein, D.J., Doerge, R.W., St. Clair D.A. and Michelmore, R.W. 2006.** Highdensity haplotyping with microarray-based expression and single feature polymorphism markers in *Arabidopsis*. *Genome Research*, 16: 787-795.
- Wiley. John. and Janick, J. ed. 2005.** Plant Breeding Reviews, 25. New Jersey.
- Xiurong, Z., Yingzhong¹, Z., Yong, C., Xiangyun, F., Qingyuan¹, G., Mingdeand, Z. and Hodgkin, T. 2000.** Establishment of sesame germplasm core collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 47: 273–279.
- Xu, Y. 2010.** Molecular plant breeding. CABI International. Wallingford, UK.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.B.J., Ye, Z. and Mao, J.X. 1997.** POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University Of Alberta, Canada, 10.
- Yokota, T., Matsuzaki, Y., Koyama, M., Hitomi, T., Kawanaka, M. and Enoki-Konishi, M. 2007.** Sesamin, a Lignan of Sesame, Down-Regulates Cyclin D1 Protein Expression in Human Tumor Cells. *Cancer Science*, 98, 1447-1453.
- Yu, J.K., La, Rota, M., Kantety, R.V. and Sorrells, M.E. 2004.** ESTderived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Moleclar Genetics and Genomics*, 271: 742-751.
- Zdobnov, E.M. and Apweiler, A. 2001.** InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17:847-8.
- Zhang, H., Wei, L., Miao, H., Zhang, T. and Wang, C. 2012.** Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. *BMC Genomics*, 13: 316.
- Zhang, Y.X., Zhang, X.R., Hua, W., Wang, L.H. and Che, Z. 2010.** Analysis of genetic diversity among indigenous landraces from sesame (*Sesamum indicum* L.) core

collection in China as revealed by SRAP and SSR markers. *Genes and Genomics*, 32(3): 207-215.

Abstract

In this study, genetic diversity of 22 genotypes of sesame (*Sesamum indicum* L.) collected from different Asian countries such as China, India, Pakistan, Iraq and Iran were evaluated by 15 primers of EST-SSR markers and 10 agro-morphological and seed qualitative traits. Cluster analysis was performed using NTSYSpc2.10 software and UPGMA algorithm for the average standardized agro-morphological, qualitative data and also binary molecular matrix. Genotypes were divided into 6 groups by dendrogram of agronomic data. Also based on grain quality, genotypes were classified in three groups. A total of 48 alleles with the average of 1 to 6 alleles per locus were generated by 15 primers in molecular studies. 14 primers showed 93.33% polymorphism in PCR reaction. Average alleles size varied from 190 to 750 base pairs. Genotypes were divided into five groups by molecular data analysis. The genetic similarity coefficient calculated by the simple matching (SM) method, ranged from 0.510 to 0.918. The lowest genetic similarity was observed between Chinese and Pakistani genotypes and the highest one was between Punjab 89 and TN234 genotype. Primer Z-45 showed the maximum SI index. The highest value of heterozygosity (0.67) and also the number of effective alleles (N_e) (2.90) belonged to SEM-434 primer. Due to the high diversity of genotypes in terms of agro-morphological characteristics, quality traits and molecular data, it is recommended modification strategies used to take advantage of this diversity.

Key words: Sesame, genetic diversity, EST-SSR markers.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

MSc thesis in Biotechnology

Introducing and Amplification Assessment of EST-SSR Marker in Sesame

By: Sahar Ghasemi

Supervisor:
Dr. M. Parsaeian

Advisors:
Dr. J. Amani
Dr. N. Farrokhi

September 2016