

بررسی تنوع ژنتیکی و واکنش گونه‌های آرتیمیزیا به تنش شوری

Study of genetic diversity and response of *Artemisia* species to salt stress

مریم ریاحی^{۱*}، حسین دشتی^۱، اصغر رحیمی^۱، الهام دهقان^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، مربی، دانشگاه ولی عصر (عج)

Ryahi M^{*1}, Dashti H¹, Rahimi A¹, Dehghan E¹

1. MSc Student, Associate Professors, Instructor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: maryamryahi1368@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

درمنا از مهمترین گیاهان بوته‌ای در جوامع گیاهی طبیعی است. این گیاه به دلیل داشتن ترکیبات دارویی و اسانس‌های معطر دارای ارزش اقتصادی زیادی است. در آزمایش اول، تنوع ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ درمنا متعلق به ۴ گونه آرتیمیزیا با استفاده از ۱۵ آغازگر RAPD بررسی شد. ۱۰۸ مکان ژنی تکثیر و ۹۹۸ باند تولید شد. بیشترین متوسط شاخص تنوع ژنتیک توسط آغازگر F (۰/۵۸) بدست آمد. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه Dice و روش Complete Linkage، دامنه تشابه از ۰/۴ تا ۰/۸ را نشان داد که دو گونه *A. sieberi* (nodoshan) و *A. khorassanica* (678) بیشترین تشابه (۰/۸۰) بودند. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در تشابه ۰/۴۶ به سه گروه اصلی طبقه‌بندی کرد و گروه‌بندی ژنتیکی به دست آمده با توزیع جغرافیایی مطابقت ضعیفی داشت. نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌های درمنا بود. در آزمایش دوم، خصوصیات جوانه‌زنی پنج نمونه از دو گونه آرتیمیزیا با چهار سطح شوری شامل صفر، ۳، ۶ و ۹ دسی زیمنس بر متر به صورت فاکتوریل انجام شد و درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و میانگین زمان جوانه‌زنی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که شوری اثر معنی داری بر صفات جوانه‌زنی بذر دارد. افزایش شوری درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را کاهش داد. گونه *A. sieberi* دارای بیشترین درصد جوانه‌زنی و مقاوم‌ترین ژنوتیپ به شوری تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه کلاستر
تنوع ژنتیکی
جوانه‌زنی
Artemisia
RAPD

مقدمه

یکی از گیاهان مهم مراتع ایران جنس درمنه (*Artemisia*) است و ۳۴ گونه از آن در ایران شناسایی شده‌است. گونه‌ها و زیر گونه‌های مختلف این جنس معمولاً جهت طبقه‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا هر کدام شاخص شرایط محیطی ویژه‌ای هستند. درمنه خراسانی، گیاهی چندساله است که به صورت وحشی در بخش‌های شمال شرق ایران رشد می‌کند و ارزش و مصارف دارویی بالایی دارد (Azarnivand et al. 2003).

تنش شوری از عوامل کاهش جوانه‌زنی و صدمه به گیاه در مرحله ظهور گیاهچه می‌باشد که باعث کاهش تعداد بوته در واحد سطح و در نهایت کاهش محصول نهایی می‌شود. از این رو شناسایی گیاهانی با خصوصیت تحمل شوری در این مرحله از رشد حائز اهمیت می‌باشد (Ramezani et al. 2005; Gangju and Bozorgmehr 2010). گیاهانی که بتوانند در مرحله جوانه‌زنی مقاومت بیشتری نشان دهند خواهند توانست دوره اول رویش را موفق‌تر طی کنند. از این رو محققان به دنبال افزایش استقرار گیاهچه‌ها در شرایط تنش هستند (Kafy and Rahimi 2010). جوانه‌زنی و رشد گیاهچه از مراحل بحرانی برای تحمل جمعیت گیاه تحت شرایط شوری است. شوری خاک یکی از مهمترین تنش‌های غیرزنده برای استقرار گیاه آرتمیسیا در مراتع است (Ghanavati and Sengul 2010). یکی از یافته‌های مهم، طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات شناسایی سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان بوده‌است، بر اساس بررسی‌های انجام شده تعداد محدودی از گونه‌های موجود تا به حال از نظر تنوع ژنتیکی به روش علمی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Braun and Virchow 1996). زیاد بودن تنوع ژنتیکی در یک گونه امکان انجام برنامه‌های اصلاحی در آن گونه را بیشتر می‌کند (Mousavi et al. 2010). اهمیت مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان از دو دیدگاه مورد توجه است، از یک سو شرط لازم برای رسیدن به محصول بیشتر و پایداری عملکرد بوده و از سوی دیگر منابع ژنتیکی مفید را برای برنامه‌های اصلاحی شناسایی کرده و باعث حفظ آن‌ها می‌شود (Gepts and Papa 2003). RAPD¹ یکی از ساده‌ترین و

سریع‌ترین تکنیک‌های مبتنی بر PCR برای مطالعه طیف وسیعی از تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی است. در این روش هیچ نیازی به اطلاع قبلی از توالی ژنوم نیست و تنها مقدار کمی DNA نیاز دارد (Hasan et al. 2009). در مطالعه انجام شده توسط Sangwan et al. (1999)، تنوع ژنتیکی در *Artemisia annua* با استفاده از روش RAPD از ۱۰۱ مکان، حدود ۹۷ مکان پلی‌مورفیسم نشان دادند و متوسط عدم تشابه ۰/۶۳ بدست آمد که نشان دهنده سطح بالای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های هندی است. در تحقیقی بر روی *A. judaica* گزارش شده که تجزیه RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های دیگر درمنه دارای قابلیت خوبی است (Rawashde 2011). در این بررسی از ۱۰۷۳ باند تشکیل شده حدود ۱۶۵ باند چند شکلی نشان دادند و متوسط شاخص تشابه ۰/۶۱ بدست آمد. تنوع ژنتیکی گونه *A. tridentatae* با استفاده از ۵۷ آغازگر RAPD بررسی کردند و مشخص شد که نشانگر RAPD در اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در سطوح مختلف سیستماتیک موثر بوده و گیاهان داخل یک جمعیت تقریباً ۵۵ درصد تا بیش از ۸۰ درصد تشابه نشان دادند و در نهایت اظهار کردند که ترکیب RAPD با روش‌های دیگر می‌تواند برای انتخاب در گونه *A. Tridentatae* مفید باشد (Mcarthur et al. 1998). تنوع ژنتیکی گیاه دارویی *Ziziphora tenuior* با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک و نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد. در این پژوهش هر دو نشانگر مولکولی و مورفولوژیکی درجه بالایی از چند شکلی را در بین نمونه‌ها نشان دادند. با این وجود همبستگی بین این دو نشانگر معنی‌دار نبود. بر اساس نتایج، این گونه گیاهی می‌تواند منبع ژنتیکی ارزشمندی برای به نژادی گیاه کاکوتی در آینده باشد (Hatari et al. 2013). در خصوص تنوع ژنتیکی موجود در گونه *A. khorassanica* پژوهشی صورت نگرفته و اطلاعی از آن در دست نیست. لذا این بررسی جهت تعیین تنوع ژنتیکی درون این گونه و همچنین میزان تشابه آن با گونه *A. Vulgar* و گونه‌های دیگر جنس آرتمیسیا (*A. sieberi*, *A. aucheri*) که از مناطق مختلف استان یزد جمع‌آوری شده‌اند انجام شد، همچنین اثر شوری بر جوانه‌زنی گونه‌های *A. sieberi* و *A. aucheri* در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

¹ Randomly amplified polymorphic DNA

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۱۳ ژنوتیپ از گونه *Artemisia khorassanica*، یک ژنوتیپ از گونه *Artemisia vulgaris* (که بذر آن‌ها از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شده) و ۵ ژنوتیپ از گونه‌های *Artemisia. Sieberi* و *Artemisia. Aucheri* (که از مناطق مختلف استان یزد جمع‌آوری شده‌بود) (جدول ۱). استخراج DNA به روش Dellaporta (1983)¹، ۱۹۸۳ با اندکی تغییر انجام شد و کمیت و کیفیت DNA به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR

۱۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی از بین ۴۰ آغازگر انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱/۹ میکرولیتر $MgCl_2$ (25 mM)، یک میکرولیتر dNTP (10 mM) یک میکرولیتر آغازگر (۱۰ $\mu g/ml$)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۵ میکرولیتر DNA الگو (25 ng)، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* پلی‌مراز و ۱۲/۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (CORBET RESEARCH) مطابق برنامه زیر انجام شد: طبع برگشته شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و برای ۴۵ چرخه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت جهت بسط تکمیلی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TAE 1X تحت ولتاژ ۸۰ به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد سپس جهت رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و پس از شستشو توسط Gel doc عکس برداری شد.

محاسبات آماری

برای بررسی چند شکلی و تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای، باندهای قوی بر اساس حضور یا عدم حضور باند، به کد صفر و یک تبدیل شد. ماتریس تشابه توسط نرم‌افزار NTSYS, Ve r.2.02e بر اساس ضریب تشابه Dice محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به روش Complete انجام شده و دندروگرام رسم شد. علاوه بر تجزیه کلاستر از تجزیه به مختصات اصلی *PcoA* برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد (Mohammadi and Prasanna 2003).

¹ Dellaporta

برای بررسی رابطه تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی، گروه‌بندی محل جمع‌آوری نمونه‌ها بر اساس طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا بروش وارد^۲ پس از استاندارد کردن آنها انجام و دندروگرام توسط نرم‌افزار MINITAB14 رسم شد و با دندروگرام گروه‌بندی ژنتیکی مقایسه شد. همچنین همبستگی ماتریس تشابه ژنتیکی و ماتریس فاصله جغرافیایی محاسبه و آزمون شد. شاخص‌های تنوع و قدرت تفکیک^۳ برای هر آغازگر محاسبه شد. شاخص تنوع یک باند (Di) به صورت $1 - \sum p_i^2$ تعریف می‌شود که در آن p_i فراوانی i مین آلل (باند) می‌باشد (Milbourne et al 1997) و شاخص تنوع برای آغازگر عبارت است از مجموع Di ‌های باندهای آن آغازگر ($\sum Di$) و DI ، متوسط شاخص تنوع برای هر آغازگر می‌باشد که از فرمول زیر حساب می‌شود، n تعداد باندهای هر آغازگر است.

$$DI = (\sum Di) / n$$

شاخص قدرت تفکیک، توانایی یک آغازگر برای تشخیص تفکیک بین تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها عبارت است از مجموع میزان اطلاع رسانی^۴ جایگاه‌های مورد شناسایی آن آغازگر است که این توانایی به عنوان قدرت تفکیک آغازگر شناخته می‌شود

$$R_p = \sum Ibi$$

Ibi عبارت است از میزان اطلاع رسانی هر باند یا جایگاه که از فرمول $Ibi = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ محاسبه می‌شود، P نسبت ژنوتیپ هایی است که باند مورد نظر را دارند.

به‌منظور بررسی جوانه‌زنی بذور گیاه درمنه، آزمایشی با ۵ نمونه از: *A. aucheri* (taft)، *A. aucheri* (nasrabad)، *A. sieberi* (nodoshan)، *A. sieberi* (harat) و *A. sieberi* (tabas) و چهار سطح شوری (صفر، ۳، ۶ و ۹ دسی زیمنس بر متر) در سه تکرار (پتری دیش) انجام شد. ۵۰ عدد بذر ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم در هر پتری قرار داده شده و پتری‌دیش‌ها در طول اجرای آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. صفات درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و میانگین زمان جوانه‌زنی اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری این صفات، تعداد بذور جوانه‌زده در هر روز شمارش شد.

² Ward³ Resolving power⁴ Band informativeness

جدول ۱- گونه‌ها و ژنوتیپ‌های درمنه مورد مطالعه

کد	گونه یا رقم	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
A۱	<i>A. sieberi</i> (tabas)*	هودر طبس	۵۵° ۵۴' ۲۴/۶"	۳۴° ۲۳' ۴۲/۲"	۷۴۹
A۲	<i>A. aucheri</i> (taft)	تفت یزد	۵۴° ۱۴' ۰۷/۶"	۳۱° ۴۴' ۳۹/۳"	۱۵۲۱
A۳	<i>A. aucheri</i> . (nasrabad)	نصرآباد یزد	۵۳° ۵۰' ۴۶/۳"	۳۱° ۴۴' ۱۴/۸"	۲۳۷۳
A۴	<i>A. sieberi</i> (nodoshn)	ندوشن یزد	۵۳° ۳۲' ۱۶/۱"	۳۲° ۰۲' ۱۸/۷"	۱۹۷۵
A۵	<i>A. sieberi</i> (harat)	هرات یزد	۵۴° ۲۲' ۲۵/۵"	۳۰° ۰۱' ۲۲/۴"	۱۶۳۶
A۶	<i>A. khorassanica</i> (703)	دره کلاک دره گز	۵۹° ۱۸' ۰۰/۸"	۳۷° ۱۵' ۴۱/۸"	۶۱۲
A۷	<i>A. khorassanica</i> (728)	بینالودنیشابور	۵۹° ۳۸' ۱۹/۹"	۳۶° ۰۰' ۵۱/۵"	۱۲۲۶
A۸	<i>A. khorassanica</i> (695)	دره گز	۵۸° ۳۸' ۰۲/۸"	۳۷° ۳۶' ۳۷/۸"	۱۰۰۸
A۹	<i>A. khorassanica</i> (298)	هشتادکیلومتری آزادشهر گرگا	۵۵° ۱۷' ۱۵/۴"	۳۶° ۴۵' ۱۷/۶"	۱۶۸۶
A۱۰	<i>A. khorassanica</i> (284)	بیست کیلومتر به شاهرود	۵۵° ۰۸' ۳۷/۶"	۳۵° ۵۴' ۰۹/۸"	۱۰۸۰
A۱۱	<i>A. khorassanica</i> (750)	سرایان-ده‌بستاق	۵۸° ۳۲' ۵۰/۲"	۳۳° ۴۵' ۳۲/۸"	۱۳۸۰
A۱۲	<i>A. khorassanica</i> (292)	شاهرود	۵۴° ۵۸' ۳۷/۸"	۳۶° ۲۶' ۴۵/۸"	۱۴۱۲
A۱۳	<i>A. khorassanica</i> (272)	چشمه‌علی-سمنان	۵۴° ۰۵' ۰۳/۸"	۳۶° ۱۶' ۳۱/۲"	۱۵۱۷
A۱۴	<i>A. khorassanica</i> (690)	قوچان	۵۸° ۱۶' ۳۵/۶"	۳۶° ۳۸' ۰۹/۷"	۱۳۸۵
A۱۵	<i>A. khorassanica</i> (630)	بجنورد	۵۶° ۵۵' ۴۲/۶"	۳۷° ۵۵' ۴۹/۳"	۱۰۳۰
A۱۶	<i>A. khorassanica</i> (678)	چناران	۵۸° ۵۶' ۳۱/۷"	۳۶° ۵۲' ۲۵/۲"	۱۲۶۶
A۱۷	<i>A. khorassanica</i> (699)	لطف‌آباد دره گز	۵۹° ۱۳' ۲۲/۲"	۳۷° ۳۰' ۲۵/۶"	۳۳۷
A۱۸	<i>A. khorassanica</i> (654)	اسفراین	۵۷° ۳۸' ۰۶/۶"	۳۷° ۰۵' ۲۳/۴"	۱۵۲۴
A۱۹	<i>A. vulgar</i>	فشکور مازندران	۵۳° ۰۹' ۳۲/۲"	۳۶° ۳۶' ۴۷/۷"	۸

* داخل پرانتز نام محل جمع‌آوری و یا شماره نمونه در بانک ژن است

نتایج و بحث

نمونه‌ها از ۵ تا ۱۱ باند متغیر بود که بیانگر قدرت متفاوت نشانگرها در شناسایی چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی بوده، آغازگر UBC-400-915 با تکثیر ۱۱ مکان که همگی چند شکل بودند بالاترین تعداد مکان چند شکل را به خود اختصاص داد و آغازگرهای J و UBC-3488-915 دارای کمترین مکان چند شکل بودند. در بررسی تنوع ژنتیکی گونه *Artemisia annua* به وسیله نشانگر RAPD و ISSR میزان چند شکلی برای نشانگر RAPD 9/96 درصد و برای نشانگر ISSR ۸۶/۰۲ درصد گزارش شده (Kumar et al. 2011). در بررسی به عمل آمده بر روی تنوع ژنتیکی گیاه *Artemisia capillary* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بیان کردند که RAPD به میزان ۶۷ درصد و ISSR به میزان ۶۳/۱۶ درصد چند شکلی نشان دادند و ضرایب تشابه برای

درصد جوانه‌زنی از فرمول زیر بدست آمد.

تعداد کل بذور /N (تعداد بذور جوانه زده شده) ۱۰۰ = DGP

سرعت جوانه‌زنی از فرمول زیر محاسبه شد.

D / (تعداد بذور جوانه زده تا روز D) 100 = DGR

میانگین زمان جوانه‌زنی از فرمول

() /D +... (N2T2) + (N1T1) = MGT

N1 و N2....تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز اول و دوم و.... است. T1، T2 و.... شمارش روز اول و دوم و.... بوده و N' تعداد کل بذرهای جوانه‌زده می‌باشد (Hassibi et al. 2008).

داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار Minitab تجزیه شد.

آغازگرهای مورد استفاده در کل ژنوتیپ‌ها، ۹۹۸ باند را در ۱۰۸ مکان تولید کردند. تمام مکان‌های تکثیر شده چند شکل بودند. تعداد باندهای چندشکل حاصل از آغازگرهای RAPD در بین

جدول ۲- نتایج تجزیه ژنوم ۱۹ نمونه درمنه با استفاده از ۱۵ آغازگر تصادفی در روش RAPD

نام آغازگر	توالی (۵'-۳')	کل باند تولید شده	مکان تکثیر شده	مکان چند شکل	نسبت چند شکلی	قدرت تفکیک (Rb)	شاخص تنوع	متوسط شاخص تنوع (DI)
UBC-296-915	CCGCTGGGAG	۵۱	۷	۷	۱	۲/۸	۲/۹۶	۰/۴۲
UBC-388-915	CTGTGGCGGT	۴۷	۵	۵	۱	۲/۹	۲/۲	۰/۴۴
UBC-400-915	GCCCTGATAT	۹۶	۱۱	۱۱	۱	۶/۲۸	۵/۰۶	۰/۴۶
UBC-401-915	TAGGACAGTC	۶۹	۶	۶	۱	۲/۸۶	۲/۴۵	۰/۴۰
UBC-502-915	GCATGGTAGC	۵۸	۷	۷	۱	۴/۱۲	۳/۴	۰/۴۸
UBC-548-915	GTACATGGGC	۹۵	۹	۹	۱	۷/۱	۵/۰۲	۰/۵۵
UBC-577-915	GTCTGATGTG	۷۸	۸	۸	۱	۶/۲۴	۴/۵۷	۰/۵۷
UBC-582-915	GGTATAGACG	۶۵	۸	۸	۱	۳/۹۸	۳/۸۳	۰/۴۷
UBC-611-915	CCATCGTACC	۹۰	۸	۸	۱	۶/۳۸	۴/۳	۰/۴۳
I	GCGGGAGACC	۷۹	۷	۷	۱	۴/۶	۳/۴۸	۰/۴۹
B	GCGTCACAAG	۶۲	۶	۶	۱	۳/۵	۲/۹۳	۰/۴۸
E	ACTTGTGCGG	۴۴	۷	۷	۱	۳/۱۸	۳/۵۲	۰/۵۰
F	CCCACTGACG	۷۷	۸	۸	۱	۶/۹۶	۴/۷	۰/۵۸
J	-CCTCACCTGT	۵۰	۵	۵	۱	۲/۶۴	۲/۴۶	۰/۴۹
G	CTGAGGAGTG	۳۶	۶	۶	۱	۲/۵۸	۲/۷۱	۰/۴۵
جمع		۹۹۸	۱۰۸	۱۰۸	۱۵	—	—	—

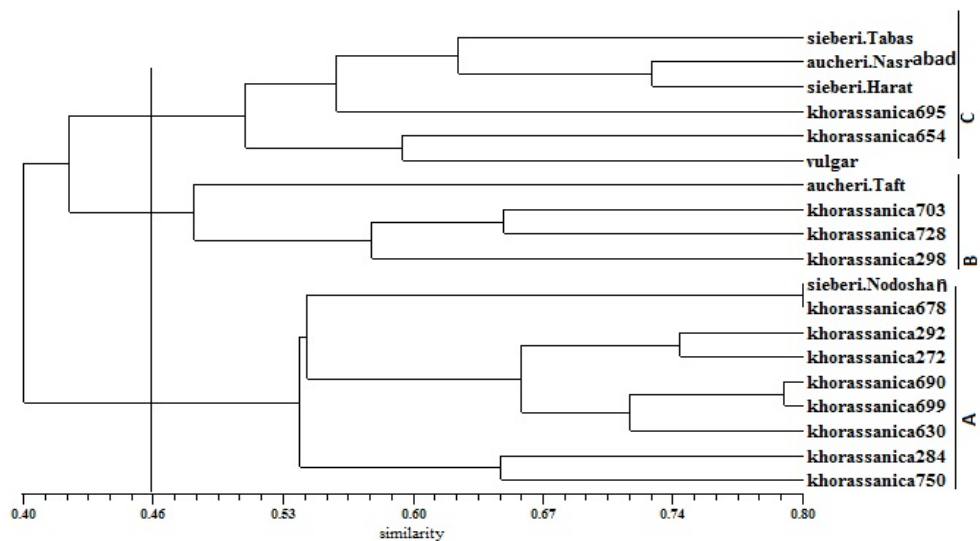
RAPD از ۰/۶۶ تا ۰/۹۲ و برای ISSR از ۰/۶۶ تا ۰/۹۳ متغیر بود (Shafie et al. 2011). آغازگرهای F و G به ترتیب دارای بیشترین Rb (۶/۹۶) و کمترین Rb (۲/۵۸) بودند. هرچه Rb و Ibi مربوط به آغازگر بیشتر باشند، کارایی آغازگر در تفکیک و جداسازی ژنوتیپ‌های تحت مطالعه بیشتر است (Prevost et al 1999; Dhief et al 2011). مقدار Rb و Ibi برای یک آغازگر رابطه مستقیمی با تعداد جایگاه تکثیر شده و تعداد افرادی از جمعیت که دارای باند مورد نظر می‌باشند، وجود دارد. شاخص متوسط تنوع ژنتیکی (DI) هر آغازگر نیز می‌تواند نشان‌دهنده قدرت تفکیک ژنوتیپ‌ها باشد. بنابراین Ibi و DI هر دو یک مفهوم و کاربرد را دارند. برای تعیین کارایی هر آغازگر از نسبت تعداد باندهای چند شکل به تعداد باندهای تکثیر شده توسط هر آغازگر به عنوان شاخصی به نام نسبت چندشکلی استفاده شد. بر اساس این شاخص همه آغازگرها نسبت چند شکلی یکسانی داشتند (جدول ۲).

تجزیه خوشه‌ای دامنه تشابه ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ درمنه را از ۰/۸۰ تا ۰/۴۰ نشان داد که حاصل تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای

است. در ضریب تشابه ۰/۸ یک نمونه از گونه *Khorassanica* با گونه *Sieberi* (nodoshan) در یک گروه قرار گرفتند. این دو ژنوتیپ تشابه زیادی را نشان دادند گرچه مربوط به دو گونه مختلف می‌باشند (جدول ۳) که احتمالاً علت آن وجود خویشاوندی نزدیک آنها می‌باشد. نمونه‌های *Khorassanica* (690) و *Khorassanica* (699) در ضریب تشابه ۰/۷۹ در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۱). کمترین تشابه بین گونه *Khorassanica*-750 و گونه *taft* (*aucheri*) (۰/۴۰) مشاهده شد (جدول ۳).

در نهایت در ضریب تشابه ۰/۴۶ تمام گونه‌ها و نمونه‌های مورد مطالعه در سه گروه A، B و C قرار گرفتند. این گروه‌بندی براساس AMOVA انجام شد (جدول ۴). گروه A شامل ۸ نمونه از گونه خراسانیکا (شماره‌های ۷۵۰، ۲۸۴، ۶۳۰، ۶۹۹، ۶۹۰، ۲۷۲، جمع‌آوری شده می‌باشد).

¹ Analysis of molecular variance



شکل ۱- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش Complete linkage با استفاده از ضریب تشابه Dice

جدول ۳- ماتریس شباهت ژنتیکی ۱۹ نمونه درمنه براساس ضریب Dice (قطر بالا) و فاصله جغرافیایی مکان‌های جمع‌آوری شده براساس فاصله اقلیدسی (قطر پایین). ($r = 0.0015$)

	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	a ₁₀	a ₁₁	a ₁₂	a ₁₃	a ₁₄	a ₁₅	a ₁₆	a ₁₇	a ₁₈	a ₁₉
۱		۰/۵۳	۰/۶۶	۰/۴۶	۰/۶۲	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۵۶	۰/۴۹	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۵۹	۰/۶	۰/۵	۰/۵۲	۰/۶۳	۰/۵۴	۰/۵۱
۲	۱۵/۴		۰/۵۹	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵	۰/۵۸	۰/۴	۰/۵۱	۰/۴۳	۰/۵	۰/۴۲	۰/۴۵	۰/۴۷	۰/۵۲	۰/۴۳
۳	۳۲/۵	۱۷		۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۴۹	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۶	۰/۶۴	۰/۶	۰/۶
۴	۲۴/۵	۹/۰۸	۷/۹۶		۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۵۷	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۵۴	۰/۵۷	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۶۲	۰/۵۴	۰/۸	۰/۶۵	۰/۵۲	۰/۵۶
۵	۱۷/۷	۲/۳	۱۴/۷	۶/۷۸		۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۵۲	۰/۵۵	۰/۶۲	۰/۶۶	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۶۳	۰/۶۴	۰/۵۴	۰/۶۴
۶	۲/۷۴	۱۸/۲	۳۵/۲	۲۷/۳	۲۰/۵		۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۸	۰/۵۴	۰/۴۸	۰/۵۸	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۶۲	۰/۵۶	۰/۴۷	۰/۵۳
۷	۹/۵۴	۵/۹	۲۲/۹	۱۵	۸/۲	۱۲/۳		۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۵	۰/۵۵	۰/۵۶	۰/۴۵	۰/۵۷	۰/۶	۰/۵۶	۰/۵۴	۰/۶۴	۰/۴۹
۸	۵/۱۸	۱۰/۳	۲۷/۳	۱۹/۳	۱۲/۶	۷/۹۲	۴/۳۶		۰/۵۳	۰/۵۳	۰/۵۶	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/۵۳	۰/۶۱	۰/۵۳	۰/۵۷
۹	۱۸/۷	۳/۳	۱۳/۷	۵/۷۸	۱/۰۱	۲۱/۵	۹/۲	۱۳/۶		۰/۵۵	۰/۴۷	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۱	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۴۸
۱۰	۶/۶۲	۸/۸۲	۲۵/۹	۱۷/۹	۱۱/۱	۹/۳۶	۲/۹۲	۱/۴۴	۱۲/۱		۰/۶۵	۰/۶۱	۰/۶۲	۰/۶	۰/۶۳	۰/۵۹	۰/۵۵	۰/۶۱	۰/۴۸
۱۱	۱۲/۶	۲/۸۲	۱۹/۹	۱۱/۹	۵/۱۲	۱۵/۴	۳/۰۸	۷/۴۴	۶/۱۲	۶		۰/۶۸	۰/۶	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۶۲	۰/۵۴	۰/۵۸	۰/۴
۱۲	۱۳/۳	۲/۱۸	۱۹/۲	۱۱/۳	۴/۴۸	۱۶	۳/۷۲	۸/۰۸	۵/۴۸	۶/۶۴	۰/۶۵		۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۶	۰/۶۱	۰/۶۱
۱۳	۱۵/۴	۰/۱۲	۱۷/۱	۹/۱۶	۲/۳۸	۱۸/۱	۵/۸۲	۱۰/۲	۳/۳۸	۸/۷۴	۲/۷۴	۲/۱		۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۶۲	۰/۷۲	۰/۵۹	۰/۵۵
۱۴	۱۲/۷	۲/۷۲	۱۹/۸	۱۱/۸	۵/۰۲	۱۵/۵	۳/۱۸	۷/۵۴	۶/۰۲	۶/۱	۰/۱۱	۰/۵۴	۲/۶۴		۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۷۹	۰/۶۲	۰/۵۳
۱۵	۵/۶۲	۹/۸۲	۲۶/۹	۱۸/۹	۱۲/۱	۸/۳۶	۳/۹۲	۰/۴۴	۱۳/۱	۱/۰۰	۷	۷/۶۴	۹/۷۴	۷/۱		۰/۶۵	۰/۷۱	۰/۶۵	۰/۴۹
۱۶	۱۰/۳	۵/۱	۲۲/۱	۱۴/۲	۷/۴	۱۳/۱	۰/۸	۵/۱۶	۸/۴	۳/۷۲	۲/۲۸	۲/۹۲	۵/۰۲	۲/۳۸	۴/۷۲		۰/۷۶	۰/۵۵	۰/۴۹
۱۷	۸/۲۴	۲۳/۷	۴۰/۷	۳۲/۸	۲۶	۵/۵	۱۷/۸	۱۳/۴	۲۷	۱۴/۹	۲۰/۹	۲۱/۵	۲۳/۶	۲۱	۱۳/۹	۱۸/۶		۰/۵۹	۰/۵۷
۱۸	۱۵/۵	۰/۱۴	۱۷	۹/۰۲	۲/۲۴	۱۸/۲	۵/۹۶	۱۰/۳	۳/۲۴	۸/۸۸	۲/۸۸	۲/۲۴	۰/۱۶	۲/۷۸	۹/۸۸	۵/۱۶	۲۳/۷		۰/۵۹
۱۹	۱۴/۸	۳۰/۳	۴۷/۳	۳۹/۳	۳۲/۶	۱۲/۱	۲۴/۴	۲۰	۳۳/۶	۲۱/۴	۲۷/۴	۲۸/۱	۳۰/۲	۲۷/۵	۲۰/۴	۲۵/۲	۶/۵۸	۳۰/۳	

(a₁) *A. sieberi* tabas (a₂) *A. aucheri* taft (a₃) *A. aucheri* nasr (a₄) *A. sieberi* nodoshan (a₅) *A. sieberi* harat (a₆) *A. khorassanica* 703 (a₇) *A. khorassanica* 728 (a₈) *A. khorassanica* 695 (a₉) *A. khorassanica* 298 (a₁₀) *A. khorassanica* 284 (a₁₁) *A. khorassanica* 750 (a₁₂) *A. khorassanica* 292 (a₁₃) *A. khorassanica* 272 (a₁₄) *A. khorassanica* 690 (a₁₅) *A. khorassanica* 630 (a₁₆) *A. khorassanica* 678 (a₁₇) *A. khorassanica* 699 (a₁₈) *A. khorassanica* 654 (a₁₉) *A. vulgar*

گروه B شامل سه نمونه از گونه خراسانیکا (شماره‌های ۷۰۳، ۷۲۸ و ۲۹۸) و گونه *A. aucheri* از تفت (یزد) می‌باشد. همچنین دو نمونه از خراسانیکا (شماره‌های ۶۹۵ و ۶۵۴) و گونه *A. aucheri* که از نصرآباد یزد جمع‌آوری شده و دو نمونه از گونه *A. sieberi* مربوط به طبس و هرات به اضافه گونه *A. vulgar* در گروه C قرار گرفتند. این مشاهدات بیانگر شباهت گونه‌های *sieberi*، *aucheri* و *vulgar* با گونه خراسانیکا و تنوع درون گونه خراسانیکا و شباهت گونه‌ها با یکدیگر است. باندهای تولید شده توسط ۱۵ آغازگر نتوانسته گونه‌ها را از یکدیگر جدا کند. برای بررسی تنوع در گونه‌های آرتمیزی‌ها از آغازگرهای بسیار بیشتری توسط دیگران استفاده شده و یا استفاده از نشانگرهای دیگر مانند ISSR در ترکیب با اطلاعات RAPD نتوانسته گونه‌ها و افراد داخل گونه را تفکیک کند (Carthur et al. 1999; Badr et al. 2012). شناسایی و تفکیک گونه‌ها در گیاه‌شناسی عمدتاً بر اساس خصوصیات مورفولوژیک گیاه انجام شده که این خصوصیات حاصل مناطق کد کننده ژنوم است ولی باندهای RAPD بیانگر تنوع مناطق کد کننده و غیرکد کننده هر دو می‌باشد. علاوه بر این حرکت یکسان بعضی از باندها روی ژل ضرورتاً توالی یکسانی ندارند لذا این می‌تواند از ضعف‌های RAPD در جداسازی گونه‌ها و افراد یگ گونه باشد (Badr et al. 2012). جهت بررسی رابطه تنوع ژنتیکی و جغرافیایی گروه‌بندی براساس مناطق جمع‌آوری نمونه‌ها انجام شد. دندروگرام مربوطه مکان‌ها را در فاصله ۱۷/۵ در سه گروه قرار داد (شکل ۲). این گروه‌بندی با گروه‌بندی ژنتیکی مطابقت ندارد به طوری که دو گونه *A. sieberi* (nodushan) که از ندوشن جمع‌آوری شده و گونه *A. khorassanica* 678 از نظر تشابه ژنتیکی ۰/۸ در کنار هم قرار گرفتند (شکل ۱) ولی از نظر جغرافیایی فاصله زیادی دارند و در دو گروه با فاصله ۵۳/۲۶ قرار دارند (شکل ۲). همچنین دو نمونه از گونه خراسانیکا (۲۸۴ و ۲۹۸) از نظر فاصله جغرافیایی در فاصله صفرند ولی از نظر ژنتیکی در دو گروه متفاوت A و B قرار دارند. همچنین شماره‌های ۷۰۳ و ۶۹۹ از گونه خراسانیکا در فاصله صفرند ولی از نظر ژنتیکی در دو گروه دور از هم قرار گرفته‌اند. مکان‌های مربوط به گونه‌های استان یزد همگی در یک گروه با فاصله بسیار کم (گروه ۳ شکل ۲) قرار دارند ولی از نظر ژنتیکی (*aucheri* (taft)

(*sieberi* (nodoshan) از آن‌ها جدا شده و در دو گروه مجزای دیگر (B و A) قرار گرفته‌اند. این عدم تطابق نیز توسط ضریب همبستگی غیر معنی‌دار بین دو ماتریس فاصله جغرافیایی و ماتریس تشابه ژنتیکی تایید می‌شود (جدول ۵) در پژوهشی که روی تنوع گونه *A. herba-alba* با استفاده از ISSR انجام شده رابطه روشن و ثابتی بین تنوع ژنتیکی و فاصله‌های جغرافیایی مشاهده نشده بود (Haouari and Ferchichi 2008). علت اصلی تشابه زیاد افراد گونه‌های مختلف و یا افراد یک گونه که فاصله جغرافیایی زیادی از هم دارند احتمالاً انتقال بذر گونه‌های جنس آرتمیزی‌ها به مناطق مختلف از طریق مهاجرت‌ها و بادهای شدید و همچنین تلاقی با یکدیگر می‌باشد. محققانی نظیر Nebauer et al. (1999) و De Masi et al. (2006) در مطالعاتشان به ترتیب بر روی تنوع ژنتیکی گل انگشتانه و ریحان با استفاده از نشانگرهای RAPD گزارش کردند که ارتباط ضعیفی بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی حاصل از مطالعات ژنتیکی در بین توده‌های مورد مطالعه وجود دارد که با نتایج این آزمایش مشابه است. ضریب همبستگی کوفتیک ($r_{Coph} = 0.77$) نشان داد که دندروگرام حاصل از روش Complete linkage با ماتریس تشابه تطابق مطلوبی دارد (Mohammadi and Prasanna 2003). علاوه بر تجزیه کلاستر به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها و تعیین کارایی نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی، از تجزیه به مختصات اصلی^۱ PCoA استفاده شد. PCoA نشان داد که ۱۰ مولفه، ۷۸/۴۲ درصد از تغییرات کل موجود در جمعیت را توجیه می‌کنند که نشان می‌دهد باندهای تولید شده توسط این آغازگرها توزیع یکنواخت و خوبی را در سراسر ژنوم آرتمیزی‌ها دارند. گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس سه مولفه اول و دوم و سوم که مجموعاً ۳۳/۳۸ درصد واریانس را توجیه کرده (جدول ۶) انجام شد. این گروه‌بندی با نتایج تجزیه کلاستر در سه گروه تقریباً مطابقت داشت (شکل ۴). تجزیه RAPD تنوع ژنتیکی بالایی را در بین گونه‌ها و درون گونه‌ها نشان داد یعنی بین ژنوتیپ‌های گونه *A. khorassanica* تنوع زیادی وجود داشت. از نظر تشابه بین گونه‌ای، گونه *khorassanica* و گونه *sieberi* تشابه زیادی نشان دادند و تفاوت زیادی بین *khorassanica* و گونه‌های

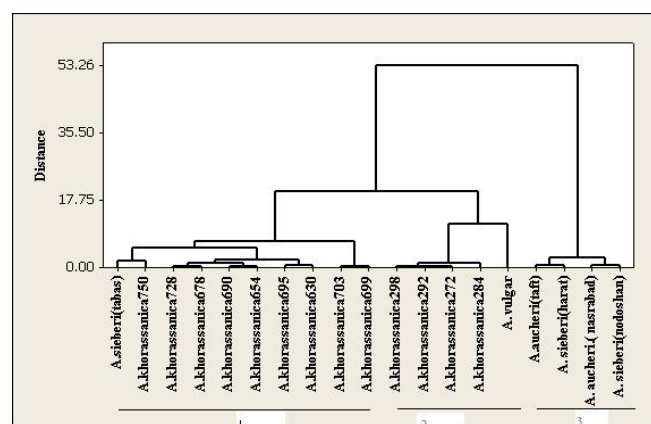
¹ Principle coordinate analysis

vulgar و *aucheri* مشاهده شد. لذا نشانگر RAPD کارایی بالایی را در نشان دادن تنوع درون و بین گونه‌ای جنس آرتمیزیا دارد. نتایج مشابهی را نیز دیگران در گونه‌های *Artemisia. annua* و *Artemisia. capillary* توسط نشانگر RAPD گرفته‌اند (Shafie et al. 2011; Kumar et al. 2011). نتایج حاصل از تجزیه واریانس

داده‌ها نشان داد که در صفت درصد جوانه‌زنی، اثر شوری و ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ و شوری معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۷). گونه *A. sieberi* (nodushan) با ۳۷ درصد بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشته و گونه *A. ucheri* (nodushan) با ۱۲/۸۳ درصد کمترین درصد جوانه‌زنی را داشت (جدول ۸).

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی برای سه گروه (A، B و C).

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	امید ریاضی	درصد واریانس	Phipt
بین گروه‌ها	۲	۶۲/۶۰۵	۳۱/۳۰۳	۱،۶۶	۷	۰/۰۷۲
درون گروه‌ها	۱۶	۳۴۱/۵۰۰	۲۱/۳۴۴	۲۱/۳۴۴	۹۳	
کل	۱۸	۴۰۴/۱۰۵		۲۳/۰۰۴	۱۰۰	



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای محل جمع‌آوری ۱۹ نمونه به روش وارد و مربع فاصله اقلیدسی با استفاده از طول، عرض و ارتفاع از سطح دریا، توام با استاندارد کردن آنها

جدول ۵- آزمون همبستگی (r) بین ماتریس شباهت ژنتیکی و ماتریس فاصله جغرافیایی

P	r	T مانیتل
۰/۵۴۳	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۹۸

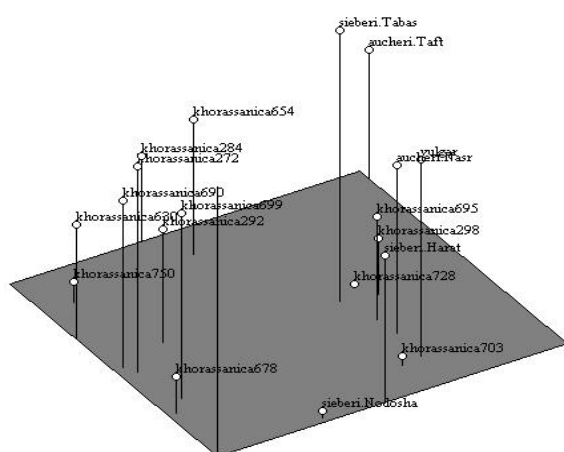
جدول ۶- سه برادر و ریشه‌های مشخصه آنها و درصد واریانس توجیه شده از کل واریانس در تجزیه مختصات اصلی

بردار	ریشه مشخصه	سهام واریانس توجیه شده	سهام تجمعی واریانس توجیه شده
۱	۰/۹۵۹	۱۲/۵۷	۱۲/۵۷
۲	۰/۸۲۴	۱۰/۸۰	۲۳/۳۸
۳	۰/۷۴۱	۹/۷۲	۳۳/۰۱

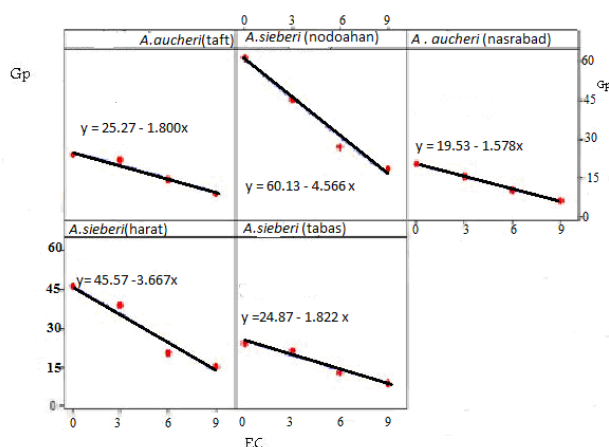
جدول ۷- تجزیه واریانس صفات جوانه‌زنی بذر گیاه درمنه تحت شرایط تنش شوری

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی
ژنوتیپ	۴	۱۳۴۶/۶۰*	۰/۰۰۰۱۳	۴/۰۹
شوری	۳	۱۷۵۳/۷۷*	۰/۰۰۲۰*	۴۲/۵۸*
شوری × ژنوتیپ	۱۲	۱۰۶/۵۵*	۰/۰۰۰۰۸	۱/۰۱
خطای آزمایش	۴۰	۱۰/۳۳	۰/۰۰۰۰۷۴	۲/۰۴
ضریب تغییرات		۱۴/۰۱	۱۰/۸	۱۱/۳۴

از مهمترین شاخص‌های ارزیابی ژنوتیپ‌ها در تحمل به تنش می‌باشد، به گونه‌ای که در شرایط تنش شوری امکان سبز شدن سریعتری نسبت به سایر ارقام داشته باشند (Kafy et al. 2005). ژنوتیپ‌ها در این مطالعه تفاوتی را نشان ندادند که می‌تواند بدلیل کم بودن تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باشد. در صفت میانگین زمان جوانه‌زنی فقط تنش شوری بر میانگین زمان جوانه‌زنی معنی‌دار است (جدول ۷). بیشترین میانگین زمان جوانه‌زنی در شوری ۹ دسی زیمنس بر متر رخ داد (جدول ۸).



شکل ۳- پلات سه بعدی مختصات اصلی ۱۹ ژنوتیپ



شکل ۴- رگرسیون درصد جوانه‌زنی (GP) روی سطوح مختلف شوری (EC) در گونه‌ها و نمونه‌های مورد مطالعه

از لحاظ درصد جوانه‌زنی نمونه‌های *A. sieberi* (tabas) و *A. aucheri* (taft) مشابه بودند اما از نظر ژنتیکی دور از هم قرار گرفتند، همچنین نمونه‌های *A. sieberi* (nodoshan) با *A. aucheri* (nasrabad) و *A. sieberi* (nodoshan) با *A. sieberi* (nodoshan) و *A. aucheri* (nasrabad) با *A. sieberi* (harat) از لحاظ درصد

بالاترین غلظت شوری، کمترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد زیرا، شوری بر کارایی، نفوذپذیری غشاء پلاسمایی و دیواره سلولی تاثیر منفی گذاشته و ورود و خروج یون‌ها به سلول را مختل می‌کند که سبب سخت شدن دیواره سلولی شده و کاهش هدایت آب از غشاء پلاسمایی را ایجاد می‌کند (Mahdavi et al. 2007). با افزایش میزان شوری، درصد جوانه‌زنی در داخل هر رقم کاهش یافت. رگرسیون درصد جوانه‌زنی روی شوری گونه‌های مورد مطالعه (شکل ۵) نشان داد که با افزایش شوری، درصد جوانه‌زنی کاهش یافته ولی شدت کاهش در همه ژنوتیپ‌ها یکسان نبود که بیانگر اثر متقابل ژنوتیپ و شوری می‌باشد.

جدول ۸- میانگین اثرات اصلی برای صفات جوانه‌زنی در نمونه‌های درم

تحت شرایط شوری			
سطوح شوری (dS/m)	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی
۰	۳۵/۰۶۷a	۰/۰۹۵a	۱۱/۰۰۸c
۳	۲۸/۵۳۳b	۰/۰۸۲b	۱۱/۶۰۸c
۶	۱۶/۸۰۰c	۰/۰۷۵c	۱۳/۰۴۱b
۹	۱۱/۳۳۳d	۰/۰۶۷d	۱۴/۷۹۲a
ژنوتیپ			
<i>A. sieberi</i> (nodoshan)	۳۷/۸۳۳a	۰/۰۸۰	۱۲/۶۷
<i>A. sieberi</i> (harat)	۳۰/۱۶۷b	۰/۰۸۲	۱۱/۸۶
<i>A. sieberi</i> (tabas)	۱۶/۶۶۷c	۰/۰۸۳	۱۲/۱۹
<i>A. aucheri</i> (taft)	۱۷/۱۶۷c	۰/۰۷۸	۱۳/۰۶
<i>A. aucheri</i> (nasrabad)	۱۲/۸۳۳d	۰/۰۷۴	۱۳/۲۶

میزان شیب مقدار حساسیت نمونه را نسبت به افزایش شوری نشان می‌دهد به‌طوری‌که ژنوتیپی که شیب بیشتری داشته حساسیت بیشتری دارد و بالعکس. در مطالعه‌ای که در گیاه دارویی شوید توسط Hassanpour dervishi (2010) انجام گرفت، با افزایش شوری درصد جوانه‌زنی نیز کاهش یافت. بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد با ۷۹ درصد و کمترین مربوط به سطح شوری ۱۰ دسی زیمنس بر متر با ۱۸/۳ درصد بود. در سرعت جوانه‌زنی فقط شوری معنی‌دار بود و ژنوتیپ و اثر متقابل معنی‌دار نبود (جدول ۷). با افزایش میزان شوری سرعت جوانه‌زنی نیز کاهش یافته و کمترین سرعت جوانه‌زنی به میزان ۰/۰۶۷ مربوط به شوری ۹ بود (جدول ۸). سرعت جوانه‌زنی یکی

در اینجا گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها فقط بر اساس یک صفت کمی (درصد جوانه‌زنی) انجام شده ولی اطلاعات RAPD حاصل از کل ژنوم می‌باشد.

جوانه‌زنی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. در حالی که در تجزیه کلاستر این نمونه‌ها نزدیک به هم مشاهده شدند، به نظر می‌رسد باندهایی که توسط RAPD شناسایی شده اند مربوط به مناطقی از ژنوم نباشند که جوانه‌زنی را کنترل می‌کنند و یا اینکه

منابع

Azarnivand H, Qorbani M, Joneidi jafari H (2003) Effect of NaCl on germination of grassland species *Artemisia scoparia*, *Artemisia vulgaris*. Journal-Iranian Desert Grassland and Research 4: 352-358 (In Farsi).

Badr A, Abol El- khier, Ghada A, EL-kawiadd A, EL-sawy A (2012) Genetic variation in seven natural population of *Artemisia judaica* L.in south Sinai using RAPD markers. World Applied Science Journal 18:1475-1480

Dellaporta SL, wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini-preparation. Plant Molecular Biology:1-19.

De Masi L, Esposito C, Castaldo D, Siano F, Laratta B (2006) Assessment of agronomic chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L). Food Research Technology 223:273-281.

Dhief A, Ferdaws G, Tibra T, Neffati M, Samir A (2011) Natural genetic variation in *Calligonum* Tunisian genus analyzed by RAPD markers. African Journal of Biotechnology 48: 9766-9778.

Gangju M, Bozorgmehr A (2010) Red *Artemisia* ecology of individual species of sagebrush (*Artemisia turanicakrasch*) go to winter pastures in northern khorasan. Journal of Range Management 4: 540-551 (In Farsi).

Gepts P, Papa R (2003) Possible effects of gene flow crops on the genetic diversity from landraces and wild relative. Environ Biosafety 2: 89-103.

Hasan MZ, Shafie MB, Shafie RM (2009) Analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaries* (wormwood capillary) in East coast of peninsular Malaysia. World Applied Sciences 7:976-986.

Hassanpour dervishi H (2010) Effect of salt water on the quantity and quality of *Anethum graveolens* medicinal plant seeds. Journal of Agronomy 6:13-20 (In Farsi).

Hassibi N, Manochehri kalantari KH, Mazaheri V, Ahmedi mousavi A, Tahernezhad A (2008) Effect methyl zhasmunat ethylene and their interaction on seed germination and som biochemical parameters of *Brassica napus* seedlings. Journal of Biology 21: 206-215 (In Farsi).

Hatari Z, Zamani Z, Nazeri V, Tabrizi L (2013) Genetic diversity of medicinal plants *Ziziphora tenuior* using morphological features and molecular marker RAPD. Modern Genetics Journal 8: 19-28 (In Farsi).

Haouari M, Ferchichi A (2008) Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR Markers. African journal of Biotechnology 7:44-50

Kumar J, Mishra GP, Singh H, Srivastava RB, Naik PK (2011) Congruence of inter simple sequence repeat (ISSR)

and random amplification of polymorphic deoxyribonucleic acid (RAPD) marker in genetic characterization of *Artemisia annua* in the Trans-Himalayan region. Medicinal Plant Research 23: 5568-5576.

Kafy M, Nezamy A, Hosseini H, Masumi A (2005) Physiological effects of drought stress induced by polyethylene glycol on germination of Lentil genotypes. Iranian Journal of Agricultural Research 1: 69-79 (In Farsi).

Kafy M, Rahimi Z (2010) Effect of different levels of salinity on seed germination of *Portulaca*. Iranian Journal of Agricultural Research 8: 615-621 (In Farsi).

Mahdavi B, Mdres sanvy AM, Baluchi HR (2007) Effect of sodium chloride on germination and seedling of *Lathyrus sativus*. Iranian Journal of Biology 2: 363-374 (In Farsi).

Mcarthur ED, Mudge J, Buren RV, Andersen WR, Sanderson SC, Babbcl DG (1998) Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Artemisia subgenus tridentatae* species and hybrids. Great Basin Naturalist 1: 12-27.

Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R (2010) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. Crop Breeding and Applied Biotechnology 10:204-210.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-silent statistical tools and considerations. Crop Science 43:1235-1248.

Mousavi Z, Tahernezhad Z, Zamani MJ, Imamjome (2010) Glutenin subunits variation in mass iihcsuat spolige A using EGAP-SDS. Journal of Agronomy 6: 65-73 (In Farsi).

Nebaur SG, Del Castillo-Agudo L, Segura J (1999) RAPD variation within and among natural population of out crossing willow-leaved foxglobo (*Digitalis obscura* L.). Theoretical and Applied Genetics 105:985-994.

Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical Applied Sciences 98:107-112.

Ramezani M, Behravan J, Yazdinezhad A (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the volativ oil of *Artemisia khorassanica*. Pharmaceutical Biology 8: 599-602.

Rawashdeh IM (2011) Genetic variability in a medicinal plant *Artemisia judaica* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. International of Agriculture Biotechnology 13: 279-282.

Sangwan RS, Sagwan NS, Jain DC, Kumar S, Ranade SA (1999) RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L. Biochemistry and Molecular Biology 6: 935-944.

Shafie MB, Hasan MZ, Shah RM (2009) Study of genetic variability of Woormwood capillary (*Artemisia capillary*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang Region Malaysia. Plant Omics Journal 3: 127-134.

Von Braun J, Virchow D (1996) Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. Plant Research and Development 43: 50-61.