

کارایی نشانگرهای مولکولی RAPD و SCOT در تمایز جمعیت‌های خارشتر (*Alhagi maurorum*)

محمد ضابط*^۱، سمانه پیش‌قدم^۲ و زهره علیزاده^۲

*^۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، پست الکترونیک: mzabet@birjand.ac.ir

^۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

^۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی اهمیت ویژه‌ای در درک چگونگی ایجاد جمعیت‌ها در طول زمان و مکان‌های جغرافیایی دارند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت خارشتر (*Alhagi maurorum*) با استفاده از ۲۷ آغازگر RAPD و ۲۴ آغازگر SCOT طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ مورد مطالعه قرار گرفت. از ۲۷ آغازگر RAPD، ۱۹ و از ۲۴ آغازگر SCOT، ۱۸ آغازگر چندشکلی بالایی نشان دادند. در مجموع آغازگرهای RAPD، ۱۰۰ درصد چندشکلی و آغازگرهای SCOT، ۹۵/۴۲ درصد چندشکلی نشان دادند. بالاترین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی را آغازگرهای R3 و R11 (۰/۴۲) و S12 (۰/۴۴)، بالاترین شاخص نسبت چندشکلی (EMR) را آغازگرهای R10 (۱۷) و S2، S4، S6، S7 و S10 (۱۳)، بالاترین شاخص نشانگری (MI) را آغازگرهای R13 (۵/۹۲) و S7 (۵/۳۶) و بالاترین شاخص قدرت تفکیک (RP) را آغازگرهای R4 (۹/۵۴) و S14 (۱۱/۷) به خود اختصاص دادند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که در هر دو نشانگر ۱۴ درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و ۸۶ درصد مربوطه به درون گروه‌ها بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگر RAPD، جمعیت‌ها را در سه و بر اساس نشانگر SCOT، جمعیت‌ها را در شش خوشه گروه‌بندی نمود. بررسی خوشه‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی از تلاقی بین جمعیت تهران با جمعیت‌های گناباد، طبس، بشرویه، سریشه و نیلشهر که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند، جهت ایجاد دورگ‌های برتر استفاده شود. کلید پارامترهای ژنتیکی در هر دو نشانگر تقریباً برابر و بر این اساس کارایی هر دو نشانگر در مطالعه کنونی تقریباً یکسان بود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، جریان ژنی، چندشکلی، شاخص‌شانون، هتروزیگوسی

مقدمه

خارشتر گیاهی است چندساله به ارتفاع ۲۱ تا ۱۲۱ سانتی‌متر که دارای شاخه‌های متعدد خاردار به رنگ سبز تا سبز مات می‌باشد. طول خارها، از یک تا شش سانتی‌متر متغیر بوده و زاویه آنها، تقریباً راست است. برگ‌ها، بیضی شکل به طول ۱۱ تا ۱۵ و عرض سه تا پنج میلی‌متر و گل‌ها معمولاً به رنگ قرمز ارغوانی تا جگری بوده و در محور خارها و به تعداد دو تا

جنس خارشتر گیاهانی چندساله از خانواده بقولات هستند. این جنس دارای ۱۲ گونه در دنیا است که تنها دو گونه *Alhagi maurorum* و *Alhagi graceum* در ایران رویش دارد. گونه *Alhagi maurorum* در کشور پراکنش وسیعی داشته و گونه دیگر فقط در نواحی جنوب و جنوب‌غرب کشور می‌روید.

روابط تبارزایی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا تحت تأثیر شرایط محیطی نبوده و در هر مرحله از رشد گیاه قابل استفاده هستند (Manifesto et al., 2001). بررسی دو گونه *Alhagi. graecorum* و *A. pseudoalhagi* از نظر کاربوتیبی و پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان داد که جنس خارشتر ($2n=2x=16$) دیپلوئید بوده و دارای برخی بی‌نظمی‌های میوزی مانند پل آنافازی بوده که این تغییرات ساختاری کروموزومی باعث افزایش تنوع ژنتیکی و سازگاری با شرایط محیطی خارشتر شده است (Sheidai & Rashid, 2007). وجود اختلاف در شکل و اندازه کروموزوم‌ها و نیز رفتار کروموزوم‌ها در مراحل مختلف تقسیم میوز به‌ویژه تشکیل کیاسما می‌تواند بیانگر اختلاف ژنتیکی باشد که در نهایت می‌توان گفت منجر به درک و فهم بهتر فرایندهایی می‌شود که باعث تکامل و تنوع ژنتیکی در این گیاه شده است (Ebrahimipour et al., 2012). در راستای تعیین گروه‌های طبیعی و روشن شدن روابط بین گونه‌های پراکنش یافته خارشتر در ایران، ۴۵ آرایه به عنوان درون‌گروه (شامل ۳۰ ژنوتیپ از جنس خارشتر و ۱۵ گونه از جنس‌های خویشاوند) و دو گونه (*Astragalus arthuri* و *Colutea persica*) به عنوان برون‌گروه انتخاب و از توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده داخلی برای مطالعات تبارزایی استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده *A. maurorum* و *A. graecorum* به عنوان دو گونه متمایز شناخته شدند که در دو ناحیه جغرافیایی گیاهی، ایران-تورانی و صحارا-سندی، پراکنش یافته‌اند (Amirkhosravi et al., 2020).

تنوع ژنتیکی ۱۰ جمعیت خارشتر (*Alhagi pseudoalhagi*) با استفاده از ۱۴ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی نشانگر RAPD، نشان داد که ۱۳ آغازگر چند شکل بودند و درصد چندشکلی ۹۴/۸۵ درصد بود. بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشهد و نیشابور (۵۵/۴ درصد) و کمترین تمایز ژنتیکی بین شاهرود و تربت حیدریه (۱۷ درصد) مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها را در ۴ گروه قرار داد. نتایج حاصل نشان‌دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده بود و نشان داد که تنوع

هشت عدد در هر خار ظاهر می‌شوند. کاسه گل، بدون کُرک است و میوه، به صورت نیام دانه تسبیحی، حاوی چهار تا هفت دانه می‌باشد (Zeinali et al., 2019).

خارشتر (*Alhagi maurorum*) یا علف ترنجبین، یکی از گیاهان شورزی و سازگار با آب‌های با درجه سختی بالاست. خارشتر مختص مناطق نیمه‌مرطوب و نیمه‌خشک بوده و در خاک‌های قلیایی بهترین رشد را دارد (Rashed Mohassel et al., 2009). این گیاه به وسیله اندام رویشی و بذر تکثیر می‌شود و نیاز آبی آن بسیار کم و با توجه به ریشه‌های بسیار عمیق، بارندگی‌های کم می‌تواند پاسخگوی نیاز آبی آن باشد (Zeinali et al., 2019). این گیاه بطور عمده در مناطق بیابانی شوره‌زار ایران، عربستان، صحرای سینا، هند، سوریه، استرالیا و بخش شرقی ایالات متحده آمریکا می‌روید (Zimmerman, 1998). همچنین به صورت علف‌هرز سمج در اراضی زراعی و باغی گسترش دارد (Matin Fard et al., 2009). این گیاه به شرایط خشکی، دمای بالا، یخ‌زدگی، طوفان شن و شوری مقاوم بوده و این قابلیت‌ها باعث شده تا در نواحی کویری و بیابانی، بستر رودخانه‌ها و زمین‌های کشاورزی رشد کند (Bazoobandi et al., 2006; Ambasht, 1963). گونه *Alhagi maurorum* در کشور پراکنش وسیعی داشته و گونه دیگر فقط در نواحی جنوب و جنوب‌غرب کشور می‌روید (Zeinali et al., 2019).

انتخاب ژنتیکی نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود. از سوی دیگر تعیین مشخصات و گروه‌بندی خزانه ژنتیکی به به‌نژادگران امکان می‌دهد تا در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها، از دوباره‌کاری خودداری کنند. هتروزیس یا برتری دورگه‌ها نیز به فاصله ژنتیکی بین والدین، ارقام و وارثه‌ها بستگی دارد که آن خود نیز بر مبنای تنوع ژنتیکی شکل می‌گیرد (Arjmand Ghohestani et al., 2015). برای بررسی تنوع ژنتیکی ابزارهای مختلفی از جمله نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی (ایزوزایم، DNA و ...) وجود دارد (Taghizad et al., 2012). نشانگرهای مولکولی با انواع متعدد و مزایای بسیار، به عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرهای ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی در بررسی

آغازگر در شناسایی تنوع موجود و مشخص کردن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف خارشتر در جهت کمک به مطالعات بعدی به‌نژادی، انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای ۲۲ جمعیت خارشتر از سه استان خراسان رضوی شامل ۸ جمعیت از شهرهای مشهد، تربت‌جام، نیشابور، سرخس، نیشهر، فریمان، تربت‌حیدریه و گناباد، خراسان جنوبی شامل ۱۱ جمعیت از شهرهای نهبندان، سریشه، قائن، زیرکوه، فردوس، بیرجند، خوسف، طبس، بشرویه، سراپان و درمیان و خراسان شمالی شامل ۲ جمعیت از شهرهای شیروان و بجنورد و یک ژنوتیپ از استان تهران طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ به طور تصادفی جمع‌آوری و برای بررسی بیشتر به آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل شد (جدول ۱).

برای انجام آزمایش از ۲۷ آغازگر RAPD و ۲۴ آغازگر SCOT استفاده شد. این آغازگرها به صورت خشک و فرز شده از شرکت سیناکلون خریداری و تهیه گردید. در ابتدای کار برای آزمون آغازگرها نمونه DNA بالک تهیه شد، به این صورت که پنج نمونه DNA به طور تصادفی انتخاب و باهم مخلوط گردید. هدف از این کار، آزمون اولیه آغازگرها بر روی جمعیت‌ها بود تا چنانچه اگر یک نمونه DNA مشکلی داشته باشد آغازگر بتواند بر روی سایر DNAها تکثیر انجام دهد. به عبارت دیگر، هدف بالا بردن دقت در کار بود. میزان DNA در هر واکنش ۳۰ نانوگرم در نظر گرفته شد. مسترمیکس (شرکت سیناکلون) با حجم‌های مشخص آماده و به تیوپ‌های حاوی آغازگر اضافه و بعد PCR انجام گردید. در ادامه کار از ۲۷ آغازگر RAPD و ۲۴ جفت آغازگر SCOT بر روی تک نمونه‌هایی که هر یک نماینده جمعیت مورد نظر بودند، استفاده شد. از ۲۷ آغازگر RAPD تنها ۱۹ و از ۲۴ جفت آغازگر SCOT تنها ۱۸ آغازگر قطعاتی با وضوح بالا تشکیل دادند که برای بررسی بیشتر بر روی جمعیت‌ها استفاده شد (جدول ۲).

استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). از هر نمونه مقداری

ژنتیکی با تنوع جغرافیایی مطابقت نداشت (Matin Fard et al, 2009). در مطالعه‌ای دیگر، برای تعیین مرزهای گونه‌ها و ساختار جمعیتی گونه‌های خارشتر (*A. graecorum* Boiss) از هشت *A. sparsifolia* Shap *A. maurorum* Medik) آغازگر ISSR برای غربالگری ۲۲ جمعیت شامل ۱۱۰ نمونه استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای به وضوح همه جمعیت‌های خارشتر ایران را به دو گونه *A. pseudoalhagi* و *A. maurorum* متمایز کردند. تجزیه و تحلیل‌های بیشتر تفاوت مولکولی قابل توجهی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد و مقدار زیادی از تنوع را در بین جمعیت‌ها (۷۹ درصد) که نشان‌دهنده تبادل‌ات مکرر ژنتیکی است نشان داد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نداشت (Amirkhosravi et al, 2021).

بررسی ساختار ژنتیکی یک جامعه گیاهی می‌تواند برای شناسایی منابع ژنی، اندازه جمعیت گیاهی، ساختار و توزیع جغرافیایی، سازگاری محیطی، منشأ و خاستگاه آنها انجام شود. از آنجایی که به‌نژادی بر پایه ایجاد تنوع با گزینش انواع مطلوب تا رسیدن به هدف نهایی استوار است، از این رو داشتن تنوع و دامنه وسیعی از ذخایر توارثی در به‌نژادی ضروریست (Bagheri et al., 2012). از ابزارهای مولکولی به طور وسیعی در گیاهان مختلف استفاده شده است (Farshadfar et al, 2017; Rahmati et al, 2018; Farshadfar et al, 2018; Moshrefi-Araghi et al, Noorian & Shirvani, 2019; Mirzaei & Salari, 2021). اما در مورد خارشتر با توجه به قابلیت بالای آن به عنوان علوفه مطالعات اندکی چه در داخل و چه در خارج از کشور انجام شده است. با توجه به آنکه خارشتر در بیشتر نقاط سه استان خراسان می‌روید و از سویی با توجه به مطالعات اندکی که در زمینه خارشتر انجام شده است، از این رو این تحقیق برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف و دسته‌بندی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی، تعیین شباهت و تفاوت بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف سه استان خراسان شمالی، رضوی و جنوبی و همچنین بررسی کارایی نشانگرهای مولکولی RAPD و SCOT در متمایز کردن جمعیت‌ها، تعیین بهترین

میکرولیتر DNA الگو، یک میکرولیتر آغازگر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس و هشت میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده بود. الکتروفورز افقی محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد و برای بررسی و مقایسه قطعه‌ها از DNA Ladder (بین ۱۰۰bp تا ۱۵۰۰bp) استفاده شد. قطعات تکثیر شده توسط ژل‌داک زیر نور فرابنفش مشاهده و عکس‌برداری گردید (جدول ۳).

برگ در حضور ازت مایع پودر و برگ‌های پودر شده به تیوپ های حاوی بافر استخراج همراه با مرکاپتواتانول اضافه شد. با محاسبه نسبت جذب نوری (۲۶۰/۲۸۰) به دست آمده از دستگاه نانودراپ (مدل Thermo Scientific 2000) میزان غلظت DNA با استفاده از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز یک درصد کیفیت قطعات تکثیر شده DNA تعیین شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل یک

جدول ۱- مناطق مختلف جمع‌آوری جمعیت‌های خارشتر

Table 1. The different collection regions of *Alhagi maurorum* populations

شماره No.	منشأ بذر	Location	استان Province	عرض شمالی northern latitude	طول شرقی Eastern longitude
1	مشهد	Mashhad	Razavi Khorasan	36.2972° N,	59.6067° E
2	فریمان	Fariman	Razavi Khorasan	35.7014° N,	59.8466° E
3	تربت‌جام	Torbate-Jam	Razavi Khorasan	35.2431° N,	60.6248° E
4	نیل‌شهر	Nilshahr	Razavi Khorasan	34.5774° N,	60.1465° E
5	سرخس	Sarakhs	Razavi Khorasan	36.5372° N,	61.1561° E
6	نیشابور	Neyshabour	Razavi Khorasan	36.2132° N,	58.7943° E
7	تربت‌حیدریه	Torbate-Heydariye	Razavi Khorasan	35.2875° N,	59.2215° E
8	گناباد	Gonabad	Razavi Khorasan	34.3530° N,	58.6838° E
9	نهبندان	Nehbandan	Southern Khorasan	31.5411° N,	60.0372° E
10	سربیشه	Sarbisheh	Southern Khorasan	32.5785° N,	59.7955° E
11	قاین	Qaen	Southern Khorasan	33.7351° N,	59.1798° E
12	زیرکوه	Zirkooh	Southern Khorasan	33.6934° N,	59.9625° E
13	فردوس	Ferdows	Southern Khorasan	34.0186° N,	58.1712° E
14	بیرجند	Birjand	Southern Khorasan	32.8733° N,	59.2163° E
15	خوسف	Khousf	Southern Khorasan	32.7787° N,	58.8882° E
16	طیس	Tabas	Southern Khorasan	33.5961° N,	56.9279° E
17	بشرویه	Boshroye	Southern Khorasan	33.8684° N,	57.4285° E
18	سرایان	Sarayan	Southern Khorasan	33.8606° N,	58.5249° E
19	درمیان	Darmiyan	Southern Khorasan	33.0339° N,	60.1185° E
20	شیروان	Shirvan	Northern Khorasan	37.3968° N,	57.9310° E
21	بجنورد	Bojnurd	Northern Khorasan	37.4745° N,	57.3233° E
22	تهران	Tehran	Tehran	35.7219° N,	51.3347° E

جدول ۲- توالی آغازگرهای RAPD و SCoT مورد استفاده در تمایز جمعیت‌های خارشتر

Table 2. The sequences of RAPD and SCoT primers used in differentiating *Alhagi maurorum* populations

آغازگر RAPD	توالی	آغازگر SCoT	توالی
RAPD Primer	Sequence	SCoT Primer	Sequence
R1	5'-AGGTGACCGT-3'	S1	5'-CCATGGCTACCACCGCCA-3'
R2	5'-GGGCGACTAC-3'	S2	5'-CAACAATGGCTACCACCA-3'
R3	5'-GTGATCGCAG-3'	S3	5'-CAACAATGGCTACCACCC-3'
R4	5'-TCGCATCCAG-3'	S4	5'-CAACAATGGCTACCACCG-3'
R5	5'-AGGGGTCTTG-3'	S5	5'-GCAACAATGGCTACCACC-3'
R6	5'-GGGTAACGCC-3'	S6	5'-CAACAATGGCTACCACGC-3'
R7	5'-CCAGAACGGA-3'	S7	5'-AACCATGGCTACCACCAC-3'
R8	5'-GTTGCCAGCC-3'	S8	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'
R9	5'-GTTACGGACC-3'	S9	5'-CAACAATGGCTACCACGG-3'
R10	5'-ACACCGATGG-3'	S10	5'-ACGACATGGCGACCAACG-3'
R11	5'-GGCACGCGTT-3'	S11	5'-ACGACATGGCGACCATCG-3'
R12	5'-TGCCGAGCTG-3'	S12	5'-ACGACATGGCGACCCACA-3'
R13	5'-ACGATCGGAT-3'	S13	5'-ACCATGGCTACCACCGAG-3'
R14	5'-ACGGGACCCTG-3'	S14	5'-ACGACATGGCGACCACGC-3'
R15	5'-GGAAACCCCT-3'	S15	5'-ACCCATGGCTACCACCGA-3'
R16	5'-TGGGCGCACAC-3'	S16	5'-ACCATGGCTACCACCGCG-3'
R17	5'-GGACCCCTAC-3'	S17	5'-ACCATGGCTACCACCGCC-3'
R18	5'-ACGGAAGTGG-3'	S18	5'-ACCATGGCTACCACCGGG-3'
R19	5'-TGAGTGGGGTG-3'		

جدول ۳- اجزای واکنش و برنامه دمایی PCR

Table 3. The components and the temperature program of PCR

PCR			RAPD			
مواد	غلظت نهایی	اجزای واکنش	مراحل	تعداد چرخه	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه/ثانیه)
Materials	Final concentration	Reaction components	Step	CY No.	Temp (C°)	Time (min/s)
آب دو بار تقطیر شده	-	۸ میکرولیتر	واشرشت‌سازی اولیه	۱	۹۴	۴ دقیقه
Double distilled water		۸μl	Initial denaturation	1	94	4m
مستر میکس	۱ برابر	۱۰ میکرولیتر	واشرشت‌سازی	۴۰	۹۴	۴۵ ثانیه
Master mix	1X	10μl	Denaturation	40	94	45s
آغازگر	۰/۶۷ پیکومول	۱ میکرولیتر	اتصال	۴۰	۳۵	۴۵ ثانیه
Primer	0.67pm	1μl	Annealing	40	35	45s
دی‌ان‌ای	۳۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر	بسط	۴۰	۷۲	۵۵ ثانیه
DNA	30ng/μl	1μl	Extension	40	72	55s
کل		۲۰ میکرولیتر	بسط نهایی	۱	۷۲	۶ دقیقه
Total		20μl	Final extension	1	72	6m

ادامه جدول ۳-۳ Continued table 3

PCR			SCoT			
مواد Materials	غلظت نهایی Final concentration	اجزای واکنش Reaction components	مراحل Step	تعداد چرخه CY No.	درجه حرارت (سانتی گراد) Temp (C°)	زمان (دقیقه/ثانیه) Time (min/s)
آب دو بار تقطیر شده	-	۸ میکرولیتر	واسرشت سازی اولیه	۱	۹۴	۴ دقیقه
Double distilled water		8µl	Initial denaturation	1	94	4m
مسترمیکس	۱ برابر	۱۰ میکرولیتر	واسرشت سازی	۳۵	۹۴	۱ دقیقه
Master mix	1X	10µl	Denaturation	35	94	1m
آغازگر	۰/۶۷ پیکومول	۱ میکرولیتر	اتصال	۳۵	۳۵	۱ دقیقه
Primer	0.67pm	1µl	Annealing	35	35	1m
دی ان ای	۳۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر	بسط	۳۵	۷۲	۲ دقیقه
DNA	30ng/µl	1µl	Extension	35	72	2m
کل		۲۰ میکرولیتر	بسط نهایی	۱	۷۲	۱۰ دقیقه
Total		20µl	Final extension	1	72	10m

هتروزیگوسیتی درون جمعیتها (Hs)،

جریان ژنی (Nm)،

ضریب تمایز ژنی ($Gst = Dst/Ht$).

شاخص Fst یا همبستگی ژنهای افراد مختلف در یک

جمعیت ($Fst = 1 - Hs/Ht$) و

پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی درون جمعیتها

مانند تعداد آللها (Na)، تعداد آللهای مؤثر (Ne)، شاخص

اطلاعاتی شانون (I) و شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) انجام

شد (Rezaie et al., 2011; Agrama and Tuinstra, 2003; Bryan et al.,

1980; Botstein et al., 1972; Lewontin, 1972).

(1997).

برای تعیین تنوع بین و درون جمعیتها تجربه واریانس

مولکولی به منظور تعیین پراکندگی آغازگرها در طول ژنوم

تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) و برای گروه بندی

جمعیتها و همچنین تعیین تشابه ژنتیکی افراد تجزیه

خوشه ای انجام شد. محاسبات با استفاده از نرم

افزارهای GENALEX، POPGEN، NTSYSpc2.2.

6.503 و Excel انجام شد.

اطلاعات حاصل از قطعهها به صورت ماتریس صفر

(عدم حضور قطعه) و یک (حضور قطعه) در Excel وارد

شد. برای ارزیابی آغازگرها از صفات و شاخصهایی مانند:

تعداد آلل تکثیر شده (Na)،

تعداد آلل مؤثر (Ne)،

درصد چندشکلی (PP) (تقسیم تعداد قطعههای چندشکل بر کل

قطعهها)،

شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC): از فرمول $PIC =$

$1 - \sum pi^2$ محاسبه شد که pi فراوانی نشانگر i ام می باشد،

شاخص نسبت چندشکلی مؤثر:

$(EMR) =$ شاخص نسبت چندشکلی مؤثر

تعداد قطعههای چندشکل × درصد چندشکلی،

شاخص نشانگری: $(MI) =$ شاخص نشانگری

$PIC \times$ تعداد قطعههای چندشکل

شاخص قدرت تفکیک: $IB = 1 - RP$ که $RP = \sum IB$

$[2 * (0.5 - Pi)]$

استفاده شد. ارزیابیهای بیشتر با محاسبه پارامترهای

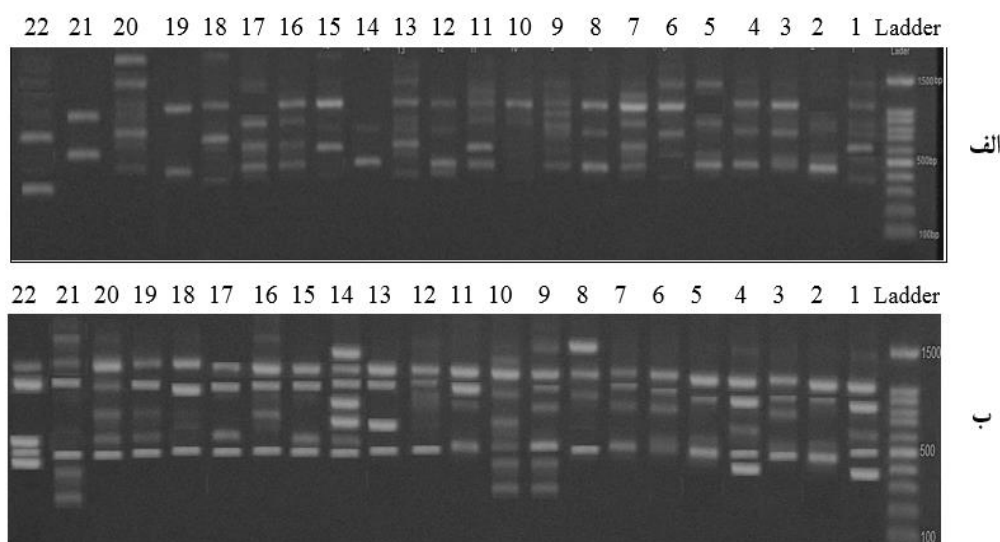
مربوط به ساختار ژنتیکی بین جمعیتها مانند:

میزان هتروزیگوسیتی کل ($Ht = Hs + Dst$).

نتایج

ارزیابی آغازگرها و محاسبه پارامترهای ژنتیکی برای تجزیه داده‌ها ابتدا جمعیت‌ها به ۳ گروه خراسان شمالی، رضوی و جنوبی تقسیم شدند. گروه در اینجا جمعیت‌های مربوط به یک استان بود و هر استان جمعیت‌های مختلفی با توجه به تعداد شهرهای خود داشت. خراسان شمالی ۸ جمعیت، خراسان جنوبی ۱۱ جمعیت و خراسان شمالی ۲ جمعیت داشت. از هر اکوتیپ یا جمعیت ۵ نمونه به طور تصادفی انتخاب و از مخلوط DNA آنها برای

تجزیه‌های بعدی استفاده شد. هدف از این کار، بالا بردن تعداد نماینده جمعیت و بالا بردن دقت بود. از ۲۷ آغازگر RAPD، ۱۹ آغازگر و از ۲۴ آغازگر SCOT، ۱۸ آغازگر چندشکلی و وضوح بالایی را نشان دادند (جدول ۴). در کل، آغازگرهای RAPD، ۲۲۸ قطعه و آغازگرهای SCOT، ۱۹۴ قطعه با وضوح بالا تولید کردند که طول آنها به ترتیب بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز برای هر دو نشانگر متغیر بود. نمونه‌ای از الگوی قطعی تکثیر شده توسط آغازگرهای R1 (RAPD) و S7 (SCOT) در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- الگوی قطعه جمعیت‌های خارشتر توسط آغازگرهای a-R1 -b S7

Figure 1- Band pattern of *Alhagi maurorum* populations by

* آغازگرهای R1 از نشانگر RAPD و آغازگر S7 از نشانگر ScoT با توالی مورد نظر طبق جدول ۲

در نشانگر RAPD شاخص محتوای چندشکلی (PIC) با میانگین ۰/۳۳ بین ۰/۲۶ (آغازگر R6) تا ۰/۴۲ (آغازگرهای R3 و R11) و در SCOT با میانگین ۰/۳۲ بین ۰/۰۳ (آغازگر S1) تا ۰/۴۴ (آغازگر S12) متغیر بود. شاخص نسبت چندشکلی (EMR) در RAPD با میانگین ۱۲ بین ۱۱ (آغازگرهای R1، R2، R3، R4، R5، R6، R7، R8، R11، R12، R16 و R17) تا ۱۷ (آغازگر R10) و در SCOT با میانگین ۱۰/۴۶ بین ۷ (آغازگر S9) تا ۱۳ (آغازگرهای S2، S4، S6، S7 و S10) متغیر بود. در

آغازگرهای RAPD، ۱۰۰ درصد و آغازگرهای SCOT، ۹۵/۴۲ درصد چندشکلی نشان دادند. در نشانگر RAPD کمترین تعداد قطعه تکثیر شده را آغازگرهای R1، R2، R3، R4، R5، R6، R7، R8، R9، R12، R16 و R17 (۱۱ قطعه) و بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده را آغازگر R10 (۱۷ قطعه) و در نشانگر SCOT کمترین تعداد قطعه تکثیر شده را آغازگر S1 (۵ قطعه) و بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده را آغازگرهای S2، S4، S6، S7 و S10 (۱۳ قطعه) به خود اختصاص دادند.

RAPD شاخص نشانگر (MI) با میانگین ۳/۹۱ بین ۲/۸۴ (آغازگر R6) تا ۵/۹۲ (آغازگر R13) و در SCOT با میانگین ۳/۴۵ بین ۰/۰۷ (آغازگر S1) تا ۵/۳۶ (آغازگر S7) متغیر بود. در RAPD شاخص قدرت تفکیک با میانگین ۶/۷۵ بین ۳/۷۶ (آغازگر R7) تا ۹/۵۴ (آغازگر R4) و در SCOT با میانگین ۹/۹۵ بین ۲/۳ (آغازگر S9) تا ۱۱/۷ (آغازگر S14) متغیر بود (جدول ۴).

جدول ۴- شاخص‌های مولکولی برای نشانگر RAPD و SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

Table 4. Molecular indices for RAPD and SCoT markers in Alhagi maurorum populations

RAPD							
آغازگر	تعداد قطعه	تعداد قطعه چندشکل	درصد چندشکلی	شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی	شاخص نسبت چندشکلی مؤثر	شاخص نشانگری	شاخص قدرت تفکیک
Primers	No. of bands	No. of Polymorph bands	PP (Polymorphism Percentage)	PIC (Polymorphism Information Content)	EMR (Effective Multiple Ratios)	MI (Marker Index)	RP (Resolving Power)
R1	11	11	100	0.34	11	3.73	7.06
R2	11	11	100	0.28	11	3.12	7.91
R3	11	11	100	0.42	11	4.62	8.99
R4	11	11	100	0.33	11	3.58	9.54
R5	11	11	100	0.29	11	3.14	7.89
R6	11	11	100	0.26	11	2.84	4.92
R7	11	11	100	0.32	11	3.54	3.76
R8	11	11	100	0.30	11	3.28	5.09
R9	12	12	100	0.27	12	3.18	4.10
R10	17	17	100	0.31	17	5.33	6.26
R11	11	11	100	0.42	11	4.63	6.71
R12	11	11	100	0.30	11	3.26	9.00
R13	16	16	100	0.37	16	5.92	8.17
R14	13	13	100	0.31	13	4.00	6.61
R15	12	12	100	0.32	12	3.79	5.47
R16	11	11	100	0.39	11	4.27	8.74
R17	11	11	100	0.28	11	3.13	4.03
R18	13	13	100	0.33	13	4.28	8.18
R19	13	13	100	0.35	13	4.56	5.89
Mean	12	12	100	0.33	12	3.91	6.75

ادامه جدول ۴- شاخص‌های مولکولی برای نشانگر RAPD و SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

Continued Table 4. Molecular indices for RAPD and SCoT markers in Alhagi maurorum populations

SCoT							
شاخص	شاخص نسبت	شاخص محتوای	درصد	تعداد قطعه	تعداد قطعه	آغازگر	شاخص
قدرت تفکیک	چندشکلی مؤثر	اطلاعات چندشکلی	چندشکلی	چندشکل	چندشکل		قدرت تفکیک
RP (Resolving Power)	EMR (Effective Multiple Ratios)	PIC (Polymorphism Information Content)	PP (Polymorphism Percentage)	No. of Polymorph bands	No. of bands	Primers	RP (Resolving Power)
7.99	8	0.03	40	2	5	S1	7.99
8.90	13	0.33	100	13	13	S2	8.90
8.37	11	0.39	100	11	11	S3	8.37
5.96	13	0.34	100	13	13	S4	5.96
8.54	11	0.41	100	11	11	S5	8.54
10.3	13	0.37	100	13	13	S6	10.3
8.88	13	0.41	100	13	13	S7	8.88
6.11	11	0.35	100	11	11	S8	6.11
2.30	7	0.26	100	7	7	S9	2.30
10.4	13	0.33	100	13	13	S10	10.4
10.2	11	0.32	100	11	11	S11	10.2
7.16	12	0.44	100	12	12	S12	7.16
6.17	10	0.29	100	10	10	S13	6.17
11.7	9	0.28	100	9	9	S14	11.7
4.30	7.10	0.27	88.8	8	9	S15	4.30
7.57	7.10	0.27	88.8	8	9	S16	7.57
8.89	11	0.38	100	11	11	S17	8.89
9.29	8	0.20	100	8	8	S18	9.29
9.95	10.46	0.32	95.42	10.22	10.5	Mean	9.95

بیشترین هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها مربوط به آغازگر R13 (۰/۲۵) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر R9 (۰/۰۷) و در SCoT بیشترین مقدار مربوط به آغازگر S5 و S14 (۰/۲۰) و کمترین آن مربوط به آغازگر S1 (۰/۰۲) بود. در RAPD بیشترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر R13 (۶/۱۹) و کمترین آن مربوط به آغازگر R6 (۱/۲۸) و در SCoT بیشترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر S14 (۸/۷۱) و کمترین آن مربوط به آغازگر S9 (۰/۰۶) بود. در RAPD بیشترین ضریب تمایز ژنی مربوط به آغازگر R9 (۰/۸۴) و کمترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به

نتایج نشان داد که میانگین میزان هتروزیگوسیتی کل (Ht)، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs)، جریان ژنی (Nm)، ضریب تمایز ژنی (Gst) و Fst در نشانگر RAPD به ترتیب برابر با (۰/۴۳، ۰/۱۳، ۰/۳۶، ۰/۷۲ و ۰/۷۱) و در SCoT به ترتیب برابر با (۰/۴۰، ۰/۱۴، ۰/۷۶، ۰/۶۲ و ۰/۶۸) بود (جدول ۵). در نشانگر RAPD بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر R13 (۰/۴۶) و کمترین آن مربوط به آغازگر R1، R6 و R12 (۰/۴۰) و در SCoT بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر S7 و S12 (۰/۴۷) و کمترین آن مربوط به آغازگر S1 (۰/۱۰) بود. در RAPD

آغازگر R3 (۰/۵۳) و در بیشترین SCOT را آغازگر S9 (۰/۴۴) و کمترین میزان Fst را آغازگر S14 (۰/۴۴) داشت (جدول ۵).

آغازگر R3 (۰/۵۴) و در بیشترین ضریب تمایز ژنی مربوط به آغازگر S9 (۰/۸۶) و کمترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به آغازگر S1 (۰/۲۵) بود. در RAPD بیشترین Fst را آغازگر R9 (۰/۸۳) و کمترین میزان Fst را

جدول ۵- پارامترهای ژنتیکی مربوط به ساختار ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای نشانگرهای RAPD و SCOT در جمعیت‌های خارشتر

Table 5. Genetic parameters related to the genetic structure between populations for RAPD and SCoT markers in Alhagi maurorum populations

RAPD						SCoT					
Primer	Ht	Hs	Nm	Gst	Fst	Primer	Ht	Hs	Nm	Gst	Fst
R1	0.40	0.08	3.02	0.71	0.80	S1	0.10	0.02	1.54	0.25	0.80
R2	0.41	0.12	3.58	0.70	0.71	S2	0.45	0.16	4.46	0.64	0.64
R3	0.45	0.21	5.79	0.54	0.53	S3	0.46	0.19	4.47	0.60	0.56
R4	0.42	0.17	5.40	0.60	0.59	S4	0.43	0.11	2.13	0.75	0.74
R5	0.44	0.11	2.74	0.74	0.75	S5	0.46	0.20	5.29	0.58	0.56
R6	0.40	0.08	1.28	0.81	0.80	S6	0.43	0.17	5.37	0.61	0.61
R7	0.43	0.11	2.22	0.77	0.75	S7	0.47	0.19	5.38	0.50	0.58
R8	0.43	0.12	2.61	0.75	0.73	S8	0.43	0.13	3.62	0.69	0.69
R9	0.41	0.07	1.33	0.84	0.83	S9	0.42	0.06	0.60	0.86	0.86
R10	0.44	0.12	3.35	0.75	0.74	S10	0.43	0.16	5.24	0.62	0.62
R11	0.44	0.14	2.94	0.69	0.68	S11	0.41	0.09	2.98	0.75	0.78
R12	0.40	0.13	5.02	0.66	0.67	S12	0.47	0.16	3.31	0.66	0.66
R13	0.46	0.25	6.19	0.81	0.59	S13	0.42	0.12	2.74	0.72	0.71
R14	0.42	0.10	2.41	0.77	0.76	S14	0.36	0.20	8.71	0.42	0.44
R15	0.44	0.11	2.37	0.77	0.75	S15	0.39	0.12	1.99	0.63	0.70
R16	0.44	0.16	3.94	0.65	0.64	S16	0.37	0.13	3.13	0.58	0.64
R17	0.43	0.10	2.10	0.79	0.78	S17	0.41	0.10	1.56	0.79	0.99
R18	0.45	0.14	3.94	0.70	0.69	S18	0.34	0.14	5.20	0.57	0.60
R19	0.43	0.16	3.70	0.64	0.64						
Mean	0.43	0.13	3.36	0.72	0.71	Mean	0.40	0.14	3.76	0.62	0.68

Ht: هتروزیگوسیتی کل، Hs: هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها، Nm: جریان ژنی، Gst: ضریب تمایز ژنی

Ht = Total heterozygosity, Hs= Heterozygosity within populations, Nm= Gene flow, Gst= Gene differentiation coefficient

برای هر دو نشانگر RAPD و SCOT ۱/۴۳ به دست آمد. بیشترین تعداد آلل مؤثر مربوط به آغازگر R3 (۱/۶۹) و S11 (۱/۶۴) و کمترین آن مربوط به R9 (۱/۰۱) و S1 (۰/۴۹) بود. برای ۱۹ آغازگر RAPD و ۱۸ آغازگر SCOT

شاخص‌های درون جمعیتی شامل تعداد آلل‌ها، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص نی و شانون در جدول ۶ آمده دست. میانگین تعداد آلل‌ها (Na) برای ۱۹ آغازگر RAPD و ۱۸ آغازگر SCOT بدست آمد. میانگین تعداد آلل مؤثر (Ne)

(۰/۰۷) بود. بیشترین شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به آغازگر R3 (۰/۵۷) و S14 (۰/۵۷) و کمترین شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به آغازگر R17 (۰/۳۳) و S1 (۰/۱۲) بود (جدول ۶).

میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) ۰/۲۸ و ۰/۲۹ و میانگین شاخص اطلاعاتی شانون (I) به ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۴۶ بدست آمد. بیشترین شاخص تنوع ژنتیکی نی مربوط به آغازگر R3 (۰/۳۹) و S14 (۰/۳۹) و کمترین شاخص تنوع ژنتیکی نی مربوط به آغازگر R9 (۰/۲۰) و S1

جدول ۶- پارامترهای ژنتیکی مربوط به ساختار ژنتیکی درون جمعیت‌ها برای نشانگرهای RAPD و SCoT در جمعیت‌های خارشتر

Table 6. Genetic parameters related to the genetic structure within populations for RAPD and SCoT markers in Alhagi maurorum populations

آغازگر Primer	RAPD				آغازگر Primer	SCoT			
	Na	Ne	H	I		Na	Ne	H	I
R1	2	1.38	0.27	0.43	S1	2	0.49	0.07	0.12
R2	2	1.38	0.26	0.41	S2	2	1.48	0.30	0.46
R3	2	1.69	0.39	0.57	S3	2	1.56	0.34	0.51
R4	2	1.58	0.33	0.50	S4	2	1.37	0.26	0.42
R5	2	1.28	0.24	0.38	S5	2	1.61	0.33	0.54
R6	2	1.33	0.22	0.37	S6	2	1.52	0.33	0.50
R7	2	1.41	0.26	0.42	S7	2	1.58	0.36	0.54
R8	2	1.35	0.31	0.40	S8	2	1.47	0.30	0.46
R9	2	1.01	0.20	0.34	S9	2	1.37	0.25	0.41
R10	2	1.33	0.23	0.39	S10	2	1.51	0.31	0.47
R11	2	1.47	0.30	0.46	S11	2	1.64	0.36	0.53
R12	2	1.55	0.32	0.48	S12	2	1.56	0.35	0.53
R13	2	1.55	0.34	0.52	S13	2	1.40	0.26	0.42
R14	2	1.40	0.26	0.41	S14	2	1.46	0.39	0.57
R15	2	1.37	0.25	0.40	S15	2	1.29	0.21	0.35
R16	2	1.67	0.37	0.55	S16	2	1.41	0.25	0.40
R17	2	1.36	0.24	0.33	S17	2	1.56	0.34	0.51
R18	2	1.48	0.29	0.46	S18	2	1.48	0.29	0.45
R19	2	1.51	0.31	0.48					
Mean	2	1.43	0.28	0.44	Mean	2	1.43	0.29	0.46

Na: تعداد آلل‌ها، Ne: تعداد آلل‌های مؤثر، H: شاخص نی، I: شاخص شانون

Na= Observed number of alleles, Ne= Efficient number of alleles, H= Neis gene diversity index, I= Shannons information index

نشانگر ۱۴ درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و ۸۶ درصد مربوط به درون گروه‌ها بود (جدول ۷).

تجزیه واریانس مولکولی نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که در هر دو

جدول ۷- تجزیه واریانس مولکولی برای ۲۲ ژنوتیپ خارشتر با استفاده از نشانگرهای RAPD و SCoT

Table 7. Molecular analysis of variance of Alhagi maurorum populations for RAPD and SCoT markers

منابع	S.O.V	درجه آزادی D.F	RAPD			SCoT		
			میانگین مربعات	درصد واریانس	Phi PT	میانگین مربعات	درصد واریانس	Phi PT
			MS	Variance (%)		MS	Variance (%)	
بین گروه‌ها	Between group	3	61.51**	14%	0.14	978.51**	14%	0.14
درون گروه‌ها	Within group	18	35.35	86%		698.29	86%	
کل	Total	21		100			100	

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

ns, *, **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد

اساس SCOT بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت خراسان جنوبی با خراسان رضوی و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت خراسان شمالی با خراسان جنوبی بود (جدول ۸).

ماتریس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نشان داد که بر اساس RAPD بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت خراسان جنوبی با خراسان شمالی و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت خراسان شمالی و جنوبی با خراسان رضوی بود.

جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های خارشتر با استفاده از نشانگرهای RAPD

Table 8. Genetic distance matrix between populations of Alhagi maurorum for RAPD markers

جمعیت	Populations	RAPD			
		خراسان رضوی	خراسان جنوبی	خراسان شمالی	تهران
		Razavi Khorasan	Southern Khorasan	Razavi Khorasan	Tehran
خراسان رضوی	Razavi Khorasan	0.000			
خراسان جنوبی	Southern Khorasan	0.091	0.000		
خراسان شمالی	Northern Khorasan	0.087	0.132	0.000	
تهران	Tehran	0.440	0.432	0.054	0.000

ادامه جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های خارشتر با استفاده از نشانگرهای SCoT

Continued Table 8. Genetic distance matrix between populations of Alhagi maurorum for SCoT markers

جمعیت	Populations	SCoT			
		خراسان رضوی	خراسان جنوبی	خراسان شمالی	تهران
		Razavi Khorasan	Southern Khorasan	Razavi Khorasan	Tehran
خراسان رضوی	Razavi Khorasan	0.000			
خراسان جنوبی	Southern Khorasan	0.340	0.000		
خراسان شمالی	Northern Khorasan	0.231	0.142	0.000	
تهران	Tehran	0.430	0.643	0.092	0.000

نشانگر RAPD و SCOT (۰/۹۷ و ۰/۹۴) به عنوان بهترین الگوی خوشه‌بندی است (جدول ۹).

بررسی ضرایب همبستگی کوفنتیک نشان داد که ضریب تشابه UN1 به عنوان بهترین ضریب و الگوریتم UPGMA به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی (r) در هر دو

جدول ۹- ضرایب همبستگی کوفنتیک برای نشانگرهای RAPD و SCOT

Table 9. Cophenetic correlation coefficients for RAPD and SCOT markers

Algorithm	Complete		Flexi		Single		UPGMA	
	RAPD	SCOT	RAPD	SCOT	RAPD	SCOT	RAPD	SCOT
Dice	0.74 **	0.67**	0.80 **	0.71**	0.82 **	0.70**	0.81 **	0.74**
SM	0.94 **	0.90**	0.96 **	0.92**	0.95 **	0.90**	0.96 **	0.93**
Jaccard	0.76 **	0.71**	0.81 **	0.75**	0.84 **	0.73**	0.83 **	0.73**
UN1	0.95 **	0.92**	0.96 **	0.94**	0.96 **	0.92**	0.97 **	0.94**

ns, *, **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

اول جمعیت‌های مشهد، فریمان، تربت‌جام، نیشهر، سرخس، نیشابور، تربت‌حیدریه، گناباد، نهبندان و سریشه قرار گرفتند. در خوشه دوم جمعیت‌های قائن، زیرکوه، فردوس، بیرجند، خوسف، طبس، بشرویه، سرایان، درمیان، شیروان و بجنورد قرار گرفتند. در خوشه سوم که هیچ زیر گروهی نداشت و از همه گروه‌ها مجزا بود جمعیت تهران قرار گرفت (شکل ۲).

بر اساس نشانگر SCOT جمعیت‌ها در شش خوشه قرار گرفتند. در خوشه اول جمعیت‌های شیروان، بجنورد، سرایان، نهبندان، سریشه، درمیان، طبس، بشرویه، گناباد و فردوس بود. در خوشه دوم جمعیت‌های مشهد، نیشابور، فریمان و تربت‌حیدریه بود. در خوشه سوم جمعیت‌های قائن و زیرکوه قرار داشت. در خوشه چهارم جمعیت‌های خوسف و بیرجند بود. در خوشه پنجم جمعیت‌های سرخس، تربت‌جام و نیشهر بود و در خوشه ششم فقط جمعیت تهران قرار گرفت (شکل ۲).

ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای

ماتریس تشابه به دست آمده بر اساس داده‌های RAPD نشان داد (جدول ۱۰) که بیشترین تشابه بین جمعیت‌های زیرکوه با قائن، خوسف با بیرجند (۰/۹۱) و بشرویه با گناباد، سرخس با زیرکوه، بجنورد با شیروان (۰/۸۹) و نیشابور با تربت‌جام، نیشابور با سرخس، طبس با نیشهر و سرایان با گناباد (۰/۸۸) وجود داشت. کمترین تشابه بین جمعیت‌های تهران با گناباد (۰/۳۰)، تهران با طبس (۰/۳۲) و تهران با بشرویه (۰/۳۳) بود. بر اساس داده‌های SCOT (جدول ۱۱) بیشترین تشابه بین جمعیت‌های نیشهر با تربت‌جام (۰/۹۱)، تربت‌جام با مشهد، نیشابور با سرخس (۰/۹۰) و بجنورد با مشهد، بجنورد با شیروان، سرایان با درمیان و زیرکوه با درمیان (۰/۸۹) و کمترین تشابه بین جمعیت‌های تهران با سریشه (۰/۴۳) و تهران با نیشهر (۰/۴۶) وجود داشت.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های بدست آمده از RAPD جمعیت‌ها را در سه خوشه قرار داد. در خوشه

جدول ۱۰- ماتریس تشابه برای نشانگر RAPD در جمعیت‌های خارشتر

Table 10. Similarity matrix for SCOT marker in *Alhagi maurorum* populations

Populations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	1																						
2	0.84	1																					
3	0.84	0.84	1																				
4	0.85	0.83	0.87	1																			
5	0.82	0.80	0.86	0.81	1																		
6	0.84	0.76	0.88	0.87	0.88	1																	
7	0.80	0.79	0.87	0.84	0.86	0.84	1																
8	0.81	0.73	0.86	0.83	0.82	0.84	0.76	1															
9	0.77	0.80	0.75	0.80	0.74	0.71	0.73	0.91	1														
10	0.78	0.81	0.80	0.88	0.76	0.79	0.75	0.79	0.81	1													
11	0.78	0.76	0.78	0.75	0.79	0.80	0.82	0.79	0.79	0.83	1												
12	0.79	0.75	0.74	0.85	0.80	0.78	0.80	0.82	0.79	0.87	0.83	1											
13	0.77	0.78	0.80	0.79	0.76	0.81	0.80	0.78	0.82	0.80	0.79	0.83	1										
14	0.79	0.81	0.82	0.84	0.78	0.80	0.80	0.80	0.78	0.85	0.83	0.89	0.85	1									
15	0.79	0.80	0.78	0.83	0.81	0.83	0.82	0.80	0.80	0.80	0.80	0.88	0.84	0.76	1								
16	0.81	0.85	0.79	0.75	0.83	0.85	0.70	0.77	0.80	0.82	0.83	0.82	0.83	0.73	0.75	1							
17	0.81	0.82	0.80	0.73	0.89	0.83	0.82	0.78	0.77	0.84	0.91	0.80	0.80	0.78	0.79	0.76	1						
18	0.80	0.84	0.86	0.84	0.80	0.83	0.81	0.78	0.70	0.78	0.78	0.81	0.78	0.80	0.82	0.89	0.87	1					
19	0.82	0.83	0.84	0.81	0.86	0.85	0.80	0.73	0.78	0.81	0.79	0.86	0.80	0.85	0.84	0.83	0.81	0.85	1				
20	0.84	0.81	0.83	0.84	0.79	0.83	0.76	0.74	0.73	0.80	0.78	0.83	0.77	0.81	0.80	0.82	0.82	0.85	0.83	1			
21	0.82	0.79	0.82	0.81	0.79	0.78	0.80	0.76	0.74	0.79	0.77	0.82	0.79	0.79	0.81	0.83	0.81	0.83	0.86	0.89	1		
22	0.50	0.47	0.45	0.37	0.51	0.44	0.49	0.49	0.44	0.32	0.41	0.30	0.45	0.33	0.38	0.44	0.42	0.46	0.41	0.48	0.53	1	

۱- مشهد، ۲- فریمان، ۳- تربت جام، ۴- نیل شهر، ۵- سرخس، ۶- نیشابور، ۷- تربت حیدریه، ۸- بیرجند، ۹- خوسف، ۱۰- طبس، ۱۱- قائن، ۱۲- گناباد، ۱۳- فردوس، ۱۴- بشرویه، ۱۵- سرایان، ۱۶- درمیان، ۱۷- زیرکوه، ۱۸- نهبندان، ۱۹- سربیشه، ۲۰- شیروان، ۲۱- بجنورد، ۲۲- تهران.

1-Mashhad 2-Fariman 3-Torbate-Jam 4-Nilshahr 5-Sarakhs 6-Neyshabour 7-Torbate-Heydariye 8-Birjand 9-Khousf 10-Tabas 11-Qaen 12-Gonabad 13-Ferdows 14-Boshroye 15-Sarayan 16-Darman 17-Zirkouh 18-Nehbandan 19-Sarbishe 20-Shirvan 21-Bojnord 22-Tehran

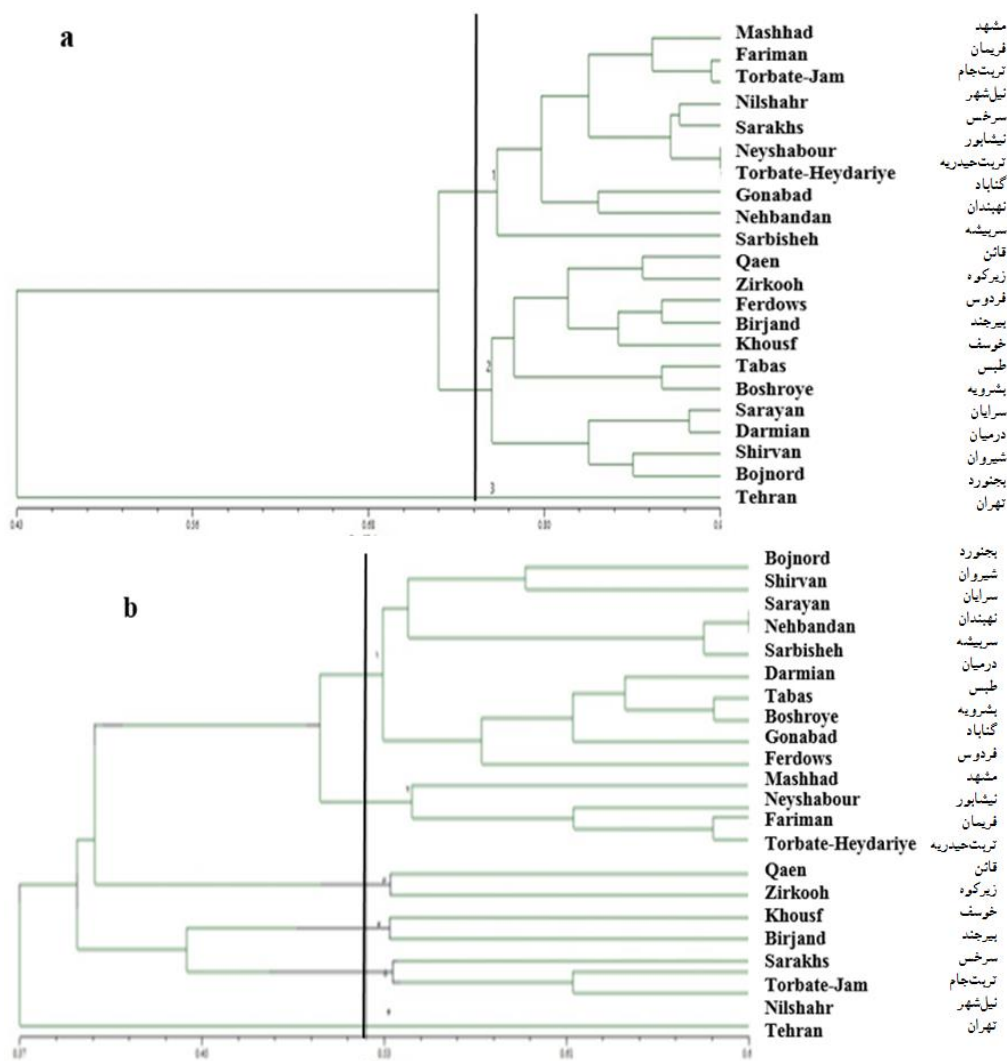
جدول ۱۱- ماتریس تشابه برای نشانگر SCoT در جمعیت‌های خارشتر

Table 11. Similarity matrix for SCoT marker in *Alhagi maurorum* populations

Populations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	1																						
2	0.81	1																					
3	0.90	0.83	1																				
4	0.87	0.81	0.91	1																			
5	0.85	0.79	0.84	0.84	1																		
6	0.83	0.82	0.70	0.86	0.90	1																	
7	0.84	0.85	0.76	0.82	0.81	0.74	1																
8	0.86	0.80	0.75	0.84	0.84	0.83	0.83	1															
9	0.84	0.83	0.82	0.83	0.82	0.81	0.83	0.80	1														
10	0.76	0.77	0.78	0.88	0.78	0.73	0.78	0.76	0.81	1													
11	0.77	0.80	0.79	0.82	0.79	0.76	0.82	0.74	0.81	0.86	1												
12	0.83	0.81	0.85	0.87	0.80	0.71	0.84	0.72	0.82	0.80	0.86	1											
13	0.83	0.79	0.86	0.87	0.83	0.83	0.82	0.78	0.80	0.77	0.83	0.87	1										
14	0.82	0.76	0.83	0.81	0.71	0.82	0.80	0.81	0.79	0.73	0.81	0.85	0.87	1									
15	0.79	0.78	0.80	0.80	0.76	0.80	0.78	0.86	0.77	0.72	0.81	0.82	0.85	0.86	1								
16	0.79	0.80	0.80	0.77	0.80	0.78	0.83	0.80	0.81	0.77	0.83	0.81	0.82	0.82	0.89	1							
17	0.81	0.79	0.79	0.77	0.80	0.77	0.80	0.77	0.78	0.74	0.77	0.81	0.81	0.78	0.82	0.89	1						
18	0.82	0.78	0.82	0.76	0.81	0.80	0.83	0.79	0.77	0.73	0.78	0.80	0.80	0.80	0.78	0.85	0.88	1					
19	0.84	0.80	0.83	0.82	0.82	0.80	0.78	0.79	0.79	0.80	0.73	0.81	0.82	0.85	0.83	0.82	0.78	0.84	1				
20	0.79	0.73	0.78	0.76	0.75	0.77	0.73	0.78	0.76	0.75	0.79	0.77	0.84	0.82	0.79	0.76	0.79	0.79	0.87	1			
21	0.89	0.79	0.79	0.77	0.78	0.79	0.81	0.78	0.81	0.72	0.80	0.78	0.80	0.82	0.78	0.82	0.84	0.85	0.86	0.89	1		
22	0.53	0.64	0.56	0.46	0.55	0.57	0.58	0.61	0.56	0.60	0.52	0.55	0.52	0.52	0.59	0.62	0.61	0.59	0.43	0.57	0.55	1	

۱- مشهد، ۲- فریمان، ۳- تربت جام، ۴- نیل شهر، ۵- سرخس، ۶- نیشابور، ۷- تربت‌حیدریه، ۸- بیرجند، ۹- خوسف، ۱۰- طبس، ۱۱- قائن، ۱۲- گناباد، ۱۳- فردوس، ۱۴- بشرویه، ۱۵- سرایان، ۱۶- درمیان، ۱۷- زیرکوه، ۱۸- نهبندان، ۱۹- سربیشه، ۲۰- شیروان، ۲۱- بجنورد، ۲۲- تهران.

1-Mashhad 2-Fariman 3-Torbate-Jam 4-Nilshahr 5-Sarakhs 6-Neyshabour 7-Torbate-Heydariye 8-Birjand 9-Khousf 10-Tabas 11-Qaen 12-Gonabad 13-Ferdows 14-Boshroye 15-Sarayan 16-Darman 17-Zirkouh 18-Nehbandan 19-Sarbishe 20-Shirvan 21-Bojnord 22-Tehran



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های خارشتر: الف- نشانگر RAPD، ب- SCOT

Figure 3 - Cluster Analysis of *Alhagi maurorum* populations a)-RAPD marker b)-SCOT marker

مؤلفه اول ۲۵/۲۴ درصد، مؤلفه دوم ۲۱/۲۴ و مؤلفه سوم ۱۵/۶۶ درصد از واریانس کل را به خود اختصاص دادند (جدول ۱۲).

نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها به صورت بای پلات در شکل ۴ (الف نشانگر RAPD و ب نشانگر SCOT) نشان داده شده است. پراکنش ژنوتیپ‌ها در فضای مختلف بای پلات نشان-دهنده تنوع ژنتیکی بالای بین آنها می‌باشد، همچنین تجمع افراد در یک ناحیه از پلات، نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد است.

تجزیه به مختصات اصلی

بر اساس داده‌های به دست آمده از نشانگر RAPD سه مؤلفه اول ۶۳/۹۰ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۳۱/۱۱، مؤلفه دوم ۱۷/۶۴ درصد و مؤلفه سوم ۱۵/۱۵ درصد از واریانس کل را به خود اختصاص دادند. بر اساس نشانگر ISSR سه مؤلفه اول ۶۲/۱۴ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۳۱/۹۷ درصد، مؤلفه دوم ۱۶/۴۹ و مؤلفه سوم ۱۴/۰۴ درصد از واریانس کل را به خود اختصاص دادند. بر اساس نشانگر SCOT سه مؤلفه اول ۶۲/۱۴ درصد از واریانس کل را توجیه کردند.

جدول ۱۲- تجزیه به مختصات اصلی در نشانگرهای مختلف در جمعیت‌های خارشتر

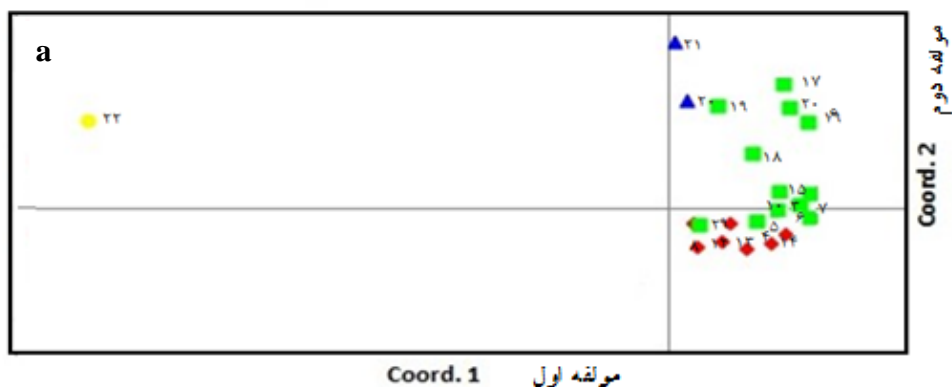
Table 11. PCoA analysis for ISSR and SCoT markers in Alhagi maurorum populations

مؤلفه Component	RAPD			SCoT		
	مقدار ویژه Eigen value	واریانس Variance	واریانس تجمعی Cumulative variance	مقدار ویژه Eigen value	واریانس Variance	واریانس تجمعی Cumulative variance
مؤلفه اول PC1	29.54	31.11	31.11	21.55	25.24	25.24
مؤلفه دوم PC 2	16.74	17.64	48.75	18.13	21.24	46.48
مؤلفه سوم PC 3	14.38	15.15	63.90	13.37	15.66	62.14

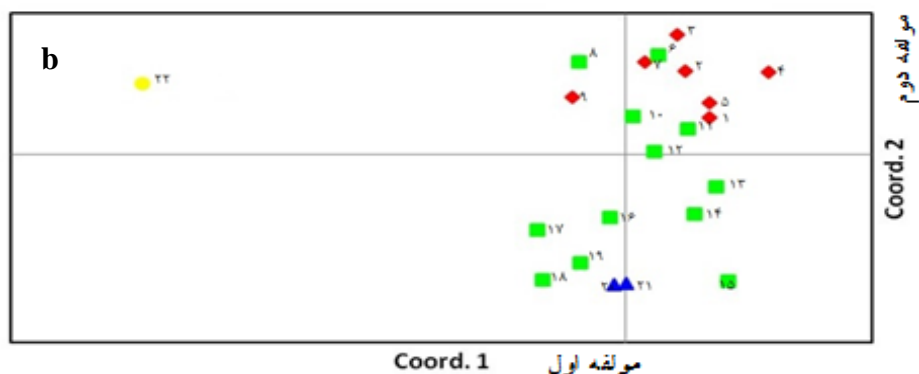
در نظر گرفته شده است، از این رو از تمام تنوع ژنتیکی موجود بین ژنوتیپ‌ها استفاده نشده است، بنابراین تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی کامل‌تر و جامع‌تری را نسبت به این روش ارائه می‌دهد. به بیان دیگر، در روش تجزیه خوشه‌ای از تمام تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود.

بررسی بای‌پلات نشان می‌دهد که جمعیت‌های خارشتر با فاصله جغرافیایی نزدیک در کنار هم و هم‌بند هستند. نتایج حاصل از بای‌پلات، گروه‌بندی به دست آمده از نتایج تجزیه خوشه‌ای را تا حدودی تأیید کرد. با توجه به اینکه در این گروه‌بندی فقط مؤلفه‌های اول و دوم

مختصات اصلی Principal Coordinate



مختصات اصلی Principal Coordinates



شکل ۳- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها به صورت بای‌پلات: الف- RAOD، ب- SCoT

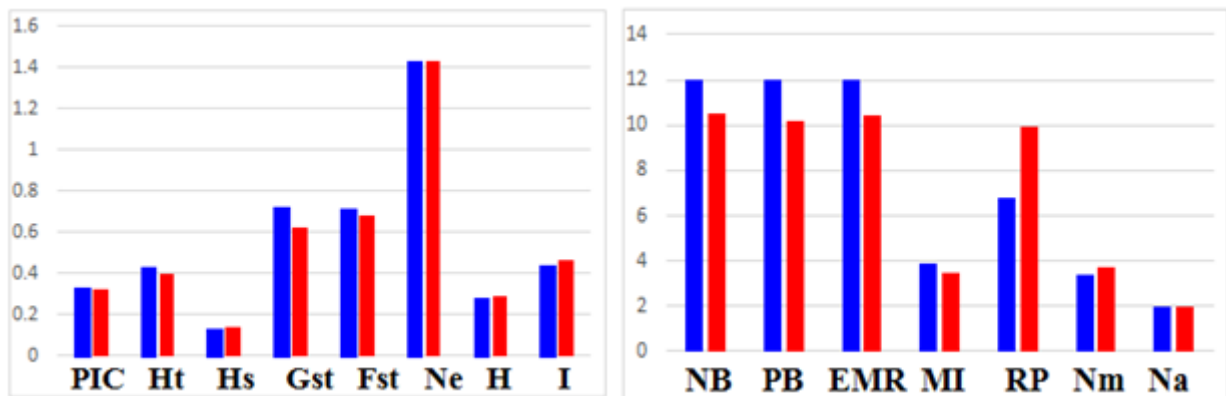
Figure 4. Distribution diagram of genotypes in Biplot form a-RAPD b- SCoT

خراسان رضی ◆ خراسان جنوبی ▲ خراسان شمالی ● تهران ■
◆ Razavi Khoras ■ Southern Khorasan ▲ Northern Khorasan ● Turan

بحث

برای مطالعات مشابه پیشنهاد کرد (Thimmappaiah et al., 2009). شاخص PIC بزرگ‌تر از ۰/۵ نشان‌دهنده نشانگری بسیار کارآمد، PIC بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ نشان‌دهنده نشانگری کارا و PIC کمتر از ۰/۲۵ نشان‌دهنده نشانگری با کارایی کم است (Wei et al., 2005). با توجه به آنکه میانگین این شاخص در هر دو نشانگر (۰/۳۳ و ۰/۳۲) در محدوده ۰/۲۵-۰/۵۰ بود، از این رو در این مطالعه نشانگرها کارآمد بودند. PIC یکی از معیارها برای انتخاب بهترین جایگاه ژنی است. مقدار PIC بالا در یک مکان ژنی بیانگر وجود آلل نادر در آن مکان ژنی می‌باشد که می‌تواند در تمایز مؤثر ژنوتیپ‌ها استفاده شود (Roder et al., 1995).

بررسی آغازگرها نشان داد که نشانگر RAPD درصد چندشکلی بیشتری (۱۰۰ درصد) نسبت به نشانگر SCoT (۹۵/۴۲) داشت، این موضوع با توجه به تکثیر قطعه‌های ناخواسته و یا دقت کمتر نشانگر RAPD نسبت به SCoT دور از انتظار نیست. میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در هر دو نشانگر تقریباً برابر بود (۰/۳۳ و ۰/۳۲) (شکل ۴). آغازگرهای R3 و R11 (RAPD) و S12 (SCoT) با بالاترین مقدار PIC به عنوان بهترین آغازگرها شناخته شدند. مقدار PIC بالا برای یک آغازگر نشان‌دهنده کارایی بالای آنها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده می‌باشد و می‌توان آنها را



شکل ۴- مقایسه پارامترهای مختلف در دو نشانگر RAPD (رنگ آبی) و SCoT (رنگ قرمز)

نام کامل پارامترهای ژنتیکی در جدول ۴ آمده است

Figure 4. Comparison of different parameters in RAPD (blue color) and SCoT (red color) markers
The full names of Molecular indices are shown in Table 4

بالاترین شاخص نشانگری بودند، از این رو این آغازگرها کارایی بالایی در مطالعه اخیر داشتند. شاخص قدرت تفکیک در نشانگر SCoT از RAPD بیشتر بود. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای قطعه و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. قدرت تفکیک، شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد (Kayis et al., 2010). در RAPD آغازگر R4 (۹/۵۴) و در SCoT آغازگر S14 (۱۱/۷) با بالاترین شاخص قدرت تفکیک به عنوان

بررسی سایر شاخص‌ها نشان داد که مقادیر شاخص نسبت چندشکلی (EMR) و شاخص نشانگر (MI) تقریباً در هر دو نشانگر برابر بود. شاخص نشانگر برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد قطعه‌های چندشکلی بدست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود. زیاد بودن شاخص نشانگر بیان‌کننده فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد بیشتر قطعه چندشکل است (Milbourne et al., 1997). با توجه به آنکه آغازگر (RAPD) R13 و آغازگر (SCoT) S7 دارای

تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که در هر دو نشانگر RAPD و SCOT تغییرات مربوط به بین گروه‌ها کمتر از درون گروه‌ها بود. مقدار بالاتر تغییرات درون گروهی نسبت به تغییرات بین گروهی ناشی از عدم شباهت جمعیت‌ها در هر گروه است و نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد بررسی در هر گروه از لحاظ داده‌های مولکولی معنی‌دار یا دارای تنوع هستند. اختلاف کم موجود در بین گروه‌ها نشان می‌دهد که در مقایسه گروه‌ها یا جمعیت‌های مورد بررسی تفاوت زیادی از نظر داده‌های مولکولی جمعیت‌های هر گروه با گروه دیگر وجود نداشته است. این اختلاف کم موجود بین گروه می‌تواند به دلیل جابه‌جایی خزانه‌زنی و شباهت جمعیت‌ها در دو گروه ذکر شده با یکدیگر باشد.

بررسی فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نیز نشان داد که بر اساس نشانگر RAPD بیشترین فاصله مشاهده شده بین جمعیت تهران با جمعیت‌های خراسان جنوبی (۰/۴۳) و خراسان رضوی (۰/۴۴) و بر اساس نشانگر SCOT نیز بیشترین فاصله مشاهده شده بین جمعیت تهران با جمعیت‌های خراسان جنوبی (۰/۴۳۰) و خراسان رضوی (۰/۶۴۳) بود. بر اساس نشانگر RAPD فاصله بین جمعیت‌های خراسان رضوی با شمالی (۰/۰۸۷) و جنوبی (۰/۰۹۰)، خراسان جنوبی با شمالی (۰/۱۳۲) و بر اساس نشانگر SCOT فاصله بین جمعیت‌های خراسان رضوی با شمالی (۰/۲۳۱) و جنوبی (۰/۳۴۰)، خراسان جنوبی با شمالی (۰/۱۴۲) بود. مقایسه این فواصل نشان می‌دهد که جمعیت‌های خراسان بزرگ با یکدیگر تفاوت چندانی نداشتند، اما جمعیت‌های درون هر استان تفاوت‌های بیشتری داشتند که تأییدکننده نتایج تجزیه واریانس مولکولی است. این یافته‌ها با نتایج Matin Fard و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد ولی بر خلاف نتایج Amirkhosravi و همکاران (۲۰۲۱) می‌باشد.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های RAPD نشان داد، به‌طور کلی اگرچه جمعیت‌های خارشر خراسان جنوبی در یک خوشه و جمعیت‌های خراسان رضوی هم در یک خوشه قرار گرفتند، اما در این میان دو جمعیت خراسان

مناسب‌ترین آغازگرها شناخته شدند (شکل ۴). بررسی پارامترهای بین جمعیتی نشان داد که میانگین هتروزیگوسیتی کل (Ht)، جریان ژنی (Nm)، ضریب تمایز ژنی (Gst) و Fst در دو نشانگر RAPD و SCOT تقریباً برابر و از این لحاظ دو نشانگر در مطالعه کنونی برتری چندانی نسبت به یکدیگر نداشتند (شکل ۴). بررسی مقادیر Fst نشان داد که در هر دو نشانگر این پارامتر بالا بود (۰/۷۱ و ۰/۶۸) و اصولاً چنانچه این پارامتر بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ به‌دست آید نشان دهنده Fst بالا می‌باشد و جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند. بالا بودن میزان Fst نشان از تمایز بالای جمعیت‌هاست (Kimura. and Crow, 1963). در مطالعه کنونی نشانگرها به خوبی در سطح ژنوم پراکنده بودند و توانستند جمعیت‌ها را از یکدیگر متمایز کنند. روش‌های زیادی برای محاسبه تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها وجود دارد که یکی از آنها شاخص Fst (همبستگی ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت) است. Fst دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد (Wright, 1951). بالا بودن شاخص Fst نشان دهنده همبستگی بالا بین ژن‌های افراد مورد مطالعه در جمعیت می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر، افراد مورد مطالعه همبستگی بالایی دارند و بین جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد. بالا بودن هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مطلب فوق را تأیید می‌کند و بالا بودن شاخص Fst را مورد تأکید قرار می‌دهد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملاً متفاوت باشند این مقدار برابر با یک می‌شود (Weir, 1996). در این تحقیق Fst محاسبه شده در هر دو آغازگر بالا است که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند. به‌طور معمول مقدار Fst در بیشتر موارد کمتر از یک است، زیرا پلی‌مورفیسم (ناشی از جهش) به‌طور مؤثری میزان Fst را کاهش می‌دهد (Charlesworth, 1998; Headrick, 1999).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نشانگرهای استفاده شده در این مطالعه به طور موفقیت‌آمیزی تنوع ژنتیکی و پراکندگی جمعیت‌ها را نشان داد و از الگوی خوشه‌بندی و روابط ژنتیکی مشاهده شده با استفاده از این نشانگرها می‌توان نسبت به انجام تلاقی بین جمعیت‌های دور به لحاظ ژنتیکی اقدام کرد. نتایج نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی اندکی بین جمعیت‌های خراسان بزرگ (شمالی، رضوی و جنوبی) وجود دارد و این احتمال می‌رود که تمامی این جمعیت‌ها از یک گونه و یک اکوتیپ سرچشمه گرفته باشند. تشابه ژنتیکی این جمعیت‌ها بیانگر آن است که از تلاقی این جمعیت‌ها نمی‌توان به نتایج امیدوارکننده‌ای دلخوش بود. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود از تلاقی بین جمعیت تهران با سایر جمعیت‌ها به‌ویژه گناباد، طبس و بشرویه که بر اساس نشانگر RAPD کمترین تشابه را بر اساس ماتریس تشابه (۰/۳۲)، سربیشه و نیلشهر که بر اساس نشانگر SCoT کمترین تشابه را بر اساس ماتریس تشابه (۰/۴۳ و ۰/۴۶) نشان دادند استفاده شود، زیرا از تلاقی این جمعیت‌های دور برتری هیبرید یا هتروزیس بیشتری مورد انتظار است. بنابراین پیشنهاد می‌شود تا در مطالعات آینده از آغازگرهای R3، R11 و S12 (با بالاترین محتوای اطلاعات چندشکلی)، R13 و S7 (بالاترین شاخص نشانگری) و R4 و S14 (بالاترین شاخص قدرت تفکیک) استفاده گردد. بررسی کلیه پارامترهای ژنتیکی نشان داد که در هر دو نشانگر کلیه پارامترها تقریباً برابر بودند و بر این اساس کارایی هر دو نشانگر در مطالعه کنونی تقریباً یکسان بود، از این رو توصیه می‌گردد که در مطالعات آینده استفاده از هر دو نشانگر در کنار هم بعلاوه سایر نشانگرها و به‌ویژه نشانگرهایی که دقت بیشتری دارند استفاده شود.

منابع مورد استفاده

- Agrama, H. and Tuinstra, M., 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum

شمالی یعنی شیروان و بجنورد با فاصله جغرافیایی تقریباً دور (۶۹۷ و ۶۵۹ کیلومتر با بیرجند) با توجه به تشابه ژنتیکی نسبتاً بالا (۰/۷۴ و ۰/۷۶ با بیرجند) در خوشه خراسان جنوبی و دو جمعیت خراسان جنوبی یعنی نهبندان و سربیشه با فاصله جغرافیایی تقریباً دور (۶۸۳ و ۵۵۷ کیلومتر با مشهد) با توجه به تشابه ژنتیکی بالا (۰/۸۰ و ۰/۸۲ با مشهد) در خوشه خراسان رضوی قرار گرفت و این نشان داد که بُعدفاصله در دوری یا نزدیکی جمعیت‌ها تأثیری نداشته و تنوع ژنتیکی از توزیع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های SCOT نیز نشان داد اگرچه جمعیت‌های نزدیک به هم از لحاظ جغرافیایی در یک خوشه قرار گرفتند، اما قرار گرفتن بعضی از جمعیت‌ها با فاصله بسیار دور در یک خوشه نیز مشاهده شد. قرار گرفتن جمعیت‌های شیروان و بجنورد از خراسان شمالی در کنار جمعیت‌های نهبندان و سربیشه با فواصل جغرافیایی دور و تشابه ژنتیکی بالا (شیروان با نهبندان با فاصله جغرافیایی ۹۲۷ کیلومتر و تشابه ژنتیکی ۰/۷۹، شیروان با سربیشه با فاصله جغرافیایی ۷۶۲ کیلومتر و تشابه ژنتیکی ۰/۸۷، بجنورد با نهبندان با فاصله جغرافیایی ۸۴۶ کیلومتر و تشابه ژنتیکی ۰/۸۵، بجنورد با سربیشه با فاصله جغرافیایی ۸۲۴ کیلومتر و تشابه ژنتیکی ۰/۸۶) در خوشه اول حکایت از آن داشت که دوری جغرافیایی باعث دوری ژنتیکی نشده است؛ به عبارت دیگر، تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. یکی از دلایل این موضوع می‌تواند جابجایی بذرها از یک نقطه به نقطه دیگر باشد. کوچ دامداران از نواحی کم‌علوفه به نواحی با علوفه بیشتر ممکن است باعث جابجایی بذرها از این گیاه مرتعی شده باشد، کما اینکه در حال حاضر نیز این چنین کوچ‌هایی از خراسان جنوبی به سمت خراسان رضوی و شمالی به علت کمبود علوفه در سال‌های با بارندگی کم انجام می‌شود. این نتایج با نتایج Amirkhosravi و همکاران (۲۰۲۱) و Matin Fard و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت.

- Farshadfar, M., Shirvani, H., Amjadian M., Yaghotipoor, A., 2018 .Application of SCoT marker to discriminate *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 6(2): 207 - 220. (In Persian)
- Headrick, P. W, 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution. 53: 313-318.
- Kayis, S. A., Hakki, E. E. and Pinarkara, E., 2010. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research 5(21): 2925-2933.
- Lewontin, R.C. 1972. The Apportionment of Human Diversity. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., and Steere W.C., eds., Evolutionary Biology, vol. 6. New York: Springer, pp. 381–398.
- Kimura, M. and Crow, J. F, 1963. The measurement of effective population number. Evolution. 17: 279-288.
- Manifesto, M. M., Schlatter, A. S., Hopp, H. E., Suarez, E. Y. and Dubcovky, J., 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. Crop. Sci. 41: 682-690.
- Matin Fard, M. M., Bazoobandi, M. and Karimi Shahri, M. R., 2010. Investigation of Genetic diversity of *Alhagi Pseudoalhagi* using RAPD-PCR molecular markers. Third Iranian Weed Science Conference, February 17, 2010, Babolsar, Iran. (In Persian)
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., and Waugh, R., 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3: 127–136.
- Mirzaei, S. and Salari, H., 2021. Study on the genetic diversity of tomato's cultivars via SCoT marker. Agric Biotechnol J 13 (4), 101-120. (In Persian)
- Moshrefi-Araghi, A. R, Nemati, H., Azizi, M., Moshtaghi, N. and Shoor, M., 2020. Study of genetic diversity of some genotypes of Iranian wild mint (*Mentha longifolia* L.) using ISSR marker and its correlation with dry yield and essential oil content. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3): 117-138. (In Persian).
- Noorian, A. M. and Shirvani, H., 2019. Genetic variability of *Malva neglecta* ecotype using ISSR molecular markers. CMR Iranian Journal of Biology, 32(4):984-994. (In Persian)
- Rahmati, H., Farshadfar, M. and Shirvani, H., 2018. Study of Genetic Diversity of *Festuca Arundinacea* Based on ISSR Molecular. J Crop Breed 9(24): 87-100.
- accessions using SSRs and RAPDs. African journal of biotechnology 2: 334-340.
- Ambasht, R. S., 1963. Ecological studies of *Alhagi camelorum* Fisch. Tropical Ecology, 4472-82.
- Amirkhosravi, A., Asri, Y., Assadi, M. and Mehregan, I., 2020. Systematics of *Alhagi*: molecular phylogeny and morphology revisited. Rostaniha, 21(2): 174–184.
- Amirkhosravi, A., Asri, Y., Assadi, M. and Mehregan, I., 2021. Genetic structure of *Alhagi* (*Hedysareae*, *Fabaceae*) populations using ISSR data in Iran. Molecular Biology Reports, 48:5143–5150.
- Arjmand Ghahestani, R., Tavassolian, I. and Mohammadi Nejad, G. H., 2015. Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian Pistachio genotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology, 7 (3): 1 - 17.
- Bagheri, A., Izadi Darbandi, A. and Malboobi, M., 2012 Practical applications of plant molecular biotechnology (translation). Mashhad University Press, Mashhad, Iran, 234 p. (In Persian).
- Bazoobandi, M., Barati, M. and Sadrabadi Haghighi, M.R., 2006. Physiological response of *Alhagi pseudoalhagi* to root exhausting management during fallow season. Iranian Journal of Weed Science, 2(2): 84-95. (In Persian).
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32 (3): 314.
- Bryan, G., Collins, A., Stephenson, P., Orry, A. and Smith, J., Gale, M., 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics 94: 557-563.
- Charlesworth, B, 1998. Measures of divergence between population and the effect of forces that reduce variability. Molecular Biology and Evolution. 15: 538-543.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19:11-15.
- Ebrahimpour Norabadi, M., Yazdanbakhsh, Z. and Keshavarzi, M., 2012. Cytogenetic Study of Two *Alhagi* Species. Journal of Herbal Drugs, 3(3): 167-173.
- Farshadfar, M., Moradzade, N., Farshadfar, E., Shirvani, H., 2017 Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 25(2): 212-231. (In Persian)

- Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W., Zhang, Z. Q., Liu, D. C. and Zhang, Y. L., 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics*. 46: 3-9.
- Weir, B. S., 1996. Intraspecific differentiation. In: D.M. Hillis et al. (Ed). *Molecular systematics*, 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates Pub. pp: 385-403.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of European Genetics*, 15: 323-354.
- Zeinali, H., Tavakoli, M., Kamalion, A. R., Nourzad Moghaddam, M., Ahmadi, K., Pourianejad, F. and Pour-Ali, P., 2019. Introduction to Alhaji medicinal plant and its production method. National Medicinal Plants Plan Center. Available at https://agrilib.areeo.ac.ir/book_7726.pdf. (In Persian)
- Zimmerman, J. A. C., 1998. Ecology and distribution of *Alhagi maurorum* Medikus, Fabaceae. USGS Colorado Plateau Field Station, South West Exotic Plant Mapping Programme. http://www.usgs.nau.edu/swewp/info_pages/plants/Alhagi/alhagititle.htm. 94. (In Persian)
- Rashed Mohassel, M. H., Najafi, H. and Akbarzadeh, M. D., 2009. *Biology and Weed Control*. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad, Iran, 404 P. (In Persian)
- Rezaie, M., Naghavi, M. R. and Maali Amiri, R., 2011. Assessment of genetic diversity in Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers. *IJoCS*, 12, 4(48): 520-532. (In Persian).
- Roder, M. S., Plaschke, J., König, S. U., Börner, A., Sorrells, M. E., Tanksley, S. D. and Ganai, M. W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* MGG 246: 327-333.
- Sheidai, M. and Rashid, S., 2007. Cytogenetic study of some *Hordeum* L. species in Iran. *Acta Biologica Szegediensis*, 51(2): 107-112.
- Taghizad, A., Ahmadi, J., Haddad, R. and Zarrabi M., 2012. Study of genetic diversity in Iranian Pistachio cultivars with Inter- Microsatellite ISSR Markers. *Journal of Horticulture Science*, 25(4):453 - 460.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G. S., 2009. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 120(3): 411-417.

Efficiency of RAPD and SCoT molecular markers in the differentiation of camelthorn (*Alhagi maurorum*) populations

M. Zabet^{1*}, S. Pishghadam², Z. Alizadeh³

1*- Corresponding author, Assoc. Prof., Dept. Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I. R. Iran, Email: mzabet@birjand.ac.ir

2- M.Sc. Graduated of plant breeding, Dept. Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran.

3- Assist. Prof., Dept. Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran.

Received: 25.02.2022 Accepted: 24.08.2022

Abstract

Investigation of genetic diversity is particularly important in understanding how populations are created over time and geographical locations. In this study, the genetic diversity of 22 populations of *Alhagi maurorum* was studied using RAPD and SCOT primers during 2018-2019. From a total of 27 RAPD and 24 SCOT primers, 19 and 18 primers showed high polymorphism, respectively. In overall, the RAPD and SCOT primers showed 100% and 95.42% polymorphism, respectively. The R3, R11 (0.42), and S12 (0.44) primers had the highest Polymorphism Information Content (PIC) index, the R10 (17) and S2, S4, S6, S7 and, S10 (13) primers showed the highest Effective Multiple Ratios (EMR) index, the R13 (5.92) and S7 (5.36) primers had the highest Marker Index (MI) and, the R4 (9.54) and S14 (11.7) primers showed the highest Resolving Power (RP). The results of molecular variance analysis were similar and the both markers showed 14% and 86% of the variations between and within the groups, respectively. Cluster analysis based on the RAPD and SCOT markers, classified the populations into three and six clusters, respectively. The analysis of the clusters showed that there was no correlation between the genetic variation and geographical diversity. It was suggested that in future studies, crossing between Tehran population and Gonabad, Tabas, Beshroieh, Sarbisheh, and Nilshahr populations which have a greater genetic distance, could be effective to create superior hybrids. In this study, all the genetic parameters of both markers were similar and their efficiency was almost the same.

Keywords: Cluster, gene flow, polymorphism, Shannon index, heterozygosity