

Study genetic structure and diversity of Afghanistan Chalghoza pine (*Pinus gerardiana*) populations using SCoT and iPBS molecular markers

A. Motieimehr¹, B. Shiran^{2*} and E. Shahbazi³

1- M.Sc graduated., Shahrekord University, Shahrekord, IR, Iran

2*- Corresponding author, Prof. Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, IR, Iran Email: shiran@sku.ac.ir

3- Assoc.Prof. Dept. Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, IR Iran

Received: 09.02.2022

Accepted: 01.07.2023

Extended Abstract

Background and objective:

The Chalghoza pine (*Pinus gerardiana*) is grown in the eastern and southeastern regions of Afghanistan and has an important role in the socio-economic progress of rural communities. It serves various purposes, such as providing pine nuts, fuel wood, medicinal plants, grazing areas, and shelter for livestock. In this research, the genetic diversity and structure of different Chalghoza pine populations were examined using molecular markers known as start codon targeted (SCoT) and inter primer binding site (iPBS) markers. Due to the excessive harvesting of its nuts and a decline in its population, the IUCN categorizes the Chalghoza pine as a nearing threat.

Methodology:

39 Chalghoza pine genotypes were collected from various regions across five provinces in Afghanistan, namely Khost, Paktia, Laghman, Kunar, and Nuristan. To extract genomic DNA, a modified CTAB procedure was employed, utilizing megagametophyte tissue from 4-5 seeds per genotype. For this research, six primers each for SCoT and iPBS markers were utilized. To analyze the data and determine genetic relationships, cluster analysis was conducted using the unweighted pair-group method arithmetic averages.

Results:

In this study, 12 SCoT and iPBS primers were utilized, resulting in the generation of 48 and 55 bands for SCoT and iPBS markers, respectively. The percentage of polymorphism was estimated at 20.8% for SCoT markers and 29.1% for iPBS markers. The average values of PIC (polymorphic information content) were determined as 0.026 for SCoT markers and 0.045 for iPBS markers, indicating a higher differentiation power of iPBS markers compared to SCoT markers. The genetic similarity coefficient revealed a relatively low genetic diversity among the populations examined. The UPGMA dendrogram, based on the similarity coefficient, demonstrated that the genotypes did not cluster according to their collection sites. This outcome can be attributed to the species' highly cross-pollinating nature and limited distribution range in the studied area. The observed number of alleles (NA) was 1.08 and 1.09, while the effective number of alleles (NE) was determined as 1.075 for both SCoT and iPBS markers. The Shannon's information index (I) was calculated as 0.055 and 0.060 for SCoT and iPBS markers, respectively. The expected heterozygosity (HE) values were estimated as 0.039 for SCoT markers and 0.042 for iPBS markers. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the genetic diversity within populations was higher than among

populations. Through a Bayesian model-based STRUCTURE analysis, two groups ($K=2$) were identified among the five populations of *Pinus gerardiana*, and admixture was observed within individuals.

Conclusion:

The minimal variations observed in total diversities and levels of population differentiation among the five Chalghoza pine populations suggest that the genetic structure of these populations aligns with the species' long-lived perennial nature and regional distribution. These findings have implications for the conservation and cultivation of this economically significant tree, providing valuable insights for its management and preservation.

Keywords: Afghanistan, Chalghoza pine, genetic diversity, SCoT, iPBS.

بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کاج چلغوزه (*Pinus gerardiana*) افغانستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی iPBS و SCoT

علیرضا مطیعی مهر^۱، بهروز شیران^{۲*} و احسان شهبازی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲- نویسنده مسئول، استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد پست الکترونیک: shiran@sku.ac.ir

۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: کاج چلغوزه در نواحی شرق و جنوب شرق افغانستان رشد می‌کند و نقش مهمی در توسعه اجتماعی و اقتصادی جوامع روستایی دارد که در مجاورت جنگل‌های چلغوزه زندگی می‌کنند و از آن به عنوان سوخت، گیاه دارویی، مرتع، پناهگاه دام و آجیلی استفاده می‌شود. در این مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این درخت با نشانگرهای SCoT و iPBS ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۳۹ ژنوتیپ کاج چلغوزه از مناطق مختلف در پنج استان افغانستان به نام‌های خوست، پکتیا، لغمان، کنر و نورستان جمع‌آوری شد. برای استخراج DNA ژنومی، از روش CTAB اصلاح شده استفاده گردید. تعداد ۶ آغازگر از هر نشانگر SCoT و iPBS برای این بررسی استفاده شد که به ترتیب تعداد ۴۸ و ۵۵ نوار SCoT و iPBS تولید کردند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و تعیین روابط ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۱۲ پرایمر SCoT و iPBS استفاده شد که منجر به تولید ۴۸ باند و ۵۵ باند برای نشانگرهای SCoT و iPBS شد. درصد چندشکلی به ترتیب ۲۰/۸ و ۲۹/۱ برای نشانگر SCoT و iPBS برآورد شد. میانگین کل PIC به ترتیب ۰/۰۲۶ و ۰/۰۴۵ برای نشانگر SCoT و iPBS تعیین گردید که نشان‌دهنده تمایز بیشتر نشانگر iPBS نسبت به SCOT است. ضرایب شباهت ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها می‌باشد. دندروگرام UPGMA مبتنی بر ضریب شباهت ژنتیکی نشان داد که در هر دو نشانگر ژنوتیپ‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نشده‌اند که می‌تواند به دلیل ماهیت دگرگرفته‌افشانی بالای این گونه و گستره پراکنش کم آن در این نواحی باشد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها است. تجزیه مدل بیزین STRUCTURE دو گروه (K=2) برای نمونه‌های مورد مطالعه کاج چلغوزه برآورد کرد که نشان‌دهنده هم‌آمیزی درون نمونه‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تفاوت کم بین پنج جمعیت مورد بررسی از نظر تنوع کل و سطوح تمایز جمعیتی با سازوکار رشدی گیاهان چندساله با عمر طولانی و پراکنش منطقه‌ای مطابقت دارد. این نتایج می‌تواند به حفظ و پرورش این درخت مهم اقتصادی کمک کند.

واژه‌های کلیدی: افغانستان، تنوع ژنتیکی، SCoT، iPBS، کاج چلغوزه

مقدمه

کاج چلغوزه (*Pinus gerardiana* Wall.) از خانواده مخروطیان، یکی از بارزترین گونه‌های درختی افغانستان است. این درخت بومی جنگل‌های معتدل خشک منطقه هیمالیا شامل افغانستان، پاکستان، هند و چین می‌باشد. در افغانستان کاج چلغوزه در ولایات شرقی و جنوب‌شرقی از جمله پکتیکا، پکتیا، خوست، ننگرهار، کنر، لغمان، لوگر، نورستان و کاپیسا به صورت پراکنده رشد می‌کند. درختی همیشه سبز کوچک تا متوسط به ارتفاع ۵ تا ۲۷ متر و ضخامت ۰/۳ تا ۱/۳ متر است (Bhattacharyya *et al.*, Alam, 2011; 1988). درخت کاج چلغوزه تک‌پایه می‌باشد و مخروط‌های ماده و نر هر دو در بهار تولید می‌شوند و برای گرده‌افشانی به باد متکی هستند. مخروط‌های ماده در پاییز سال بعد بالغ و دانه‌ها در مهر و آبان‌ماه از مخروط‌ها آزاد می‌شوند. کاج چلغوزه تنها مخروطی است که مغز یا آجیل خوراکی آن به عنوان منبع غنی کربوهیدرات، پروتئین، چربی، رطوبت، فیبر و مواد معدنی می‌باشد. کاج چلغوزه دارای خواص دارویی زیادی مانند خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، کاهش دهنده فشار خون و کلسترول، ضد روماتیسم، ضد سرفه، ضد پلاکت، ضد آسم و غیره است. پوست درخت دارای ماده الثوزین می‌باشد که مصارف متعدد آرایشی، بهداشتی، طب سنتی، روغن پخت و پز و مواد رنگی از آن جمله است.

ازدیاد طبیعی این درخت تحت تأثیر عوامل زیستی و غیر زیستی است. جنگل‌های کاج چلغوزه به طور طبیعی از طریق پراکنندگی بذر تکثیر می‌شوند و بیشتر اوقات، دانه‌ها در اطراف درخت مادری پراکنده می‌گردند. تهدید اصلی شناخته شده برای باززایی طبیعی آن، فعالیت‌های مربوط به انسان است. برداشت بیش از حد مخروط‌ها یکی از بزرگترین تهدیدها برای باززایی طبیعی است (Kumar *et al.*, 2016). این درخت با ارزش به دلیل عواملی مانند برداشت بی‌رویه مخروط‌ها، قطع شاخه‌ها هنگام برداشت، باززایی کم، وجود حشرات انگلی، گرمای شدید، بادهای خشک و کمبود رطوبت خاک در لیست گیاهان در حال

انقراض قرار گرفته است، از این رو حفاظت و بهبود ژنتیکی این گونه درختی نیاز به توجه فوری و شایسته دارد. مطالعات تنوع ژنتیکی روی کاج چلغوزه به منظور شناسایی هر چه بیشتر و دقیق‌تر ژرم‌پلاسم این گونه و ایجاد زمینه‌ای برای بهره‌برداری از این تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت منابع ژنتیکی پیش‌نیاز اساسی و ضروریست.

به منظور شناسایی سطح تنوع ژنتیکی، استفاده از سیستم نشانگرها موضوعی اجتناب‌ناپذیر است. نشانگرهای مورفولوژیکی برای شناسایی ژنوتیپ‌های برگزیده درختی به دلیل بررسی صفات ظاهری دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. نشانگرهای ایزوآنزیمی به دلیل اینکه تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و مراحل نمو گیاه قرار می‌گیرند دارای محدودیت زیادی هستند. از سویی نشانگرهای DNA بسیار قابل اعتماد و برای شناسایی ژرم‌پلاسم ارجح‌ترین انتخاب می‌باشند. اهمیت نشانگرهای مولکولی به این دلیل است که از لحاظ فنوتیپی خنثی بوده و تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند و درجه وراثت‌پذیری بالایی از خود نشان می‌دهند. پس می‌توان تعداد زیادی از آنها را برای تجزیه و تحلیل بکار برد. با معرفی نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) روش‌های قدرتمندی برای تشخیص چند شکلی‌های DNA و بررسی تنوع ژنتیکی توسعه یافته است.

نشانگر SCoT (Start Codon Targeted) یا کدون آغازی هدفمند، روشی جدید برای تولید سیستم نشانگر DNA گیاه بر اساس مناطق حفاظت شده در مجاور مناطق ATG کدون شروع در ژن‌های گیاه می‌باشد که برای اولین بار توسط Collard و Mackill (۲۰۰۹) کشف شد. در روش نشانگر SCoT از تک آغازگرهای ۱۸ جفت بازی استفاده می‌شود که از مناطق محافظت شده کوتاه مجاور کدون شروع ATG طراحی گردیده‌است که در همه ژن‌ها محافظت شده‌است. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز استاندارد از یکدیگر تفکیک می‌شوند. این یک نشانگر هدفمند ژنی است و اطلاعات بیشتری در مقایسه با نشانگرهای تصادفی از قبیل

(Tyagi *et al.*, 2020, Saboori *et al.*, 2020).

با توجه به اهمیت کاج چلغوزه به عنوان گونه با ارزش و در حال انقراض و لزوم شناسایی تنوع ژنتیکی این گونه در افغانستان و از سویی مزایای نشانگرهای مولکولی SCoT و iPBS در بررسی تنوع ژنتیکی، در این تحقیق برای مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های کاج چلغوزه در مناطق مختلف افغانستان در سطح مولکول DNA از نشانگر SCoT و iPBS استفاده شد. این پژوهش در پی آن است تا با شناخت سطح تنوع ژنتیکی کاج چلغوزه افغانستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی، زمینه لازم را برای حفظ و توسعه دامنه تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما محدود آن فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، نمونه‌گیری و استخراج DNA

در این تحقیق نمونه‌های گیاهی از نواحی کنر، پکتیا، خوست، لغمان و نورستان انتخاب و نمونه‌برداری از ۳۹ درخت چلغوزه انجام شد (جدول ۱) و یک مخروط از هر درخت کاج انتخاب گردید. تعداد درختان نمونه‌گیری در هر محل، اطلاعات جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا نواحی مختلف در جدول ۱ مشخص شده است و فاصله هر درخت تقریباً ۵۰۰ متر انتخاب شد.

در این پژوهش از روش CTAB تغییر یافته (Doyle & Doyle, 1987) برای استخراج DNA کل استفاده شد و DNA از بافت مگاسپوریت حدود ۵ تا ۶ بذر از هر ژنوتیپ استخراج شد. برای این منظور، ابتدا بذرها را به مدت ۲۴ ساعت در آب خیس کرده، سپس پوست بذر را جدا نموده و مغز آن را خارج کرده و حدود ۲ گرم بافت بذر در یک هاون چینی به کمک ازت مایع سائیده تا به پودر نرمی تبدیل و DNA از مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بافت سائیده شده استخراج شد. در پایان، DNA حاصل در مقدار مناسبی بافر TE حل و به فریزر -20°C انتقال داده شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه بیوفوتومتر (اپندورف) و ژل الکتروفورز ۱٪ سنجیده شد.

RAPD، ISSR و AFLP فراهم می‌نماید. این سیستم نشانگر نیازی به دانش قبلی در مورد توالی ژنوم مورد مطالعه ندارد (Amom & Nongdam, 2017). این نشانگر اصولاً قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد. SCoT یک نشانگر غالب چندشکلی است که قابلیت تکرارپذیری و کارآمدی بالایی نشان داده است و کاربرد آن آسان است.

نشانگر (Inter-Primer binding site) iPBS یا جایگاه اتصال بین پرایمر که توسط Kalendar و همکاران (۲۰۱۰) توسعه یافت توانایی آشکارسازی LTR (تکرار انتهای بلند) رتروترانسپوزن‌ها را دارد. این روش از PBS (محل اتصال پرایمر) استفاده می‌کند که یک توالی حفظ شده در مجاورت LTR 5 است و در همه رتروترانسپوزن‌ها وجود دارد. در این سیستم نشانگری با استفاده از مناطق حفاظت شده توالی‌های PBS (جایگاه اتصال آغازگر)، چندشکلی بین افراد قابل آشکارسازی است. همچنین روش تکثیر iPBS می‌تواند به عنوان تکنولوژی انگشت‌نگاری DNA قوی و بدون نیاز به اطلاع قبلی از توالی ژنوم و استفاده آسان مورد استفاده قرارگیرد. محصولات PCR حاوی هر دو توالی LTR و PBS به همراه توالی ژنومی بین آنها می‌باشد. در این روش از یک آغازگر منفرد استفاده می‌شود و به دلیل تعداد رونوشت‌های زیاد توالی PBS در ژنوم‌های گیاهی، تکثیر iPBS تعداد زیاد نوار واضح تولید می‌کند که به راحتی بر روی ژل آگارز قابل امتیازدهی است. محصولات تکثیری iPBS به عنوان یک نشانگر غالب عمل می‌کند. نشانگرهای SCoT و iPBS به عنوان یک روش مناسب و کارآمد در بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، ارتباط خویشاوندی و انگشت‌نگاری در بسیار از گونه‌های گیاهی به طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است. (Tabasi *et al.*, 2020, Fang-Yong & Ji-Hong, 2014, Borna, Klobucnik *et al.*, 2022, Amom *et al.*, 2020, Vanijajiva & Zhou *et al.*, 2020, *et al.*, 2017, Vasilyeva *et al.*, 2021, Pornpongrungrueng, 2020).

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌ها، محل و تعداد نمونه مورد استفاده در این مطالعه (کد ژنوتیپ‌ها پس از نام استان‌های محل جمع‌آوری تعیین شد)

Table 1- List of genotypes, their locations and sampled number used in this study. The genotypes code were assigned after the name of their provinces that they were collected

Population/ Province	Collection site	No.	code	Geographical coordinate	Altitude (m)	Seed no
Khost (1)	Mosa Khel	1	Kho1	33.59017 N; 69.76998 E	2804m	28
		2	Kho2	33.57282 N; 69.81542 E	2485m	37
		3	Kho3	33.56554 N; 69.77678 E	2872m	44
		4	Kho4	33.55158 N; 69.76780 E	3044m	45
		5	Kho5	33.53418 N; 69.76052 E	2768m	55
		6	Kho6	33.56028 N; 69.81611 E	2338m	57
		7	Kho7	33.55623 N; 69.75882 E	2962m	47
		8	Kho8	33.58516 N; 69.78018 E	3019m	57
		9	Kho9	33.55623 N; 69.75542 E	2864m	47
		10	Kho10	33.59992 N; 69.79887 E	3330m	40
		11	Kho11	33.53317 N; 69.70589 E	2765m	44
Paktia (2)	Jani khel	12	Pak1	33.54606 N; 69.77249 E	2938m	38
		13	Pak2	33.60321 N; 69.78801 E	3059m	47
		14	Pak3	33.59436 N; 69.77576 E	2985m	55
		15	Pak4	33.58144 N; 69.77086 E	2769m	51
		16	Pak5	33.55763 N; 69.76270 E	3100m	42
		17	Pak6	33.58484 N; 69.80597 E	2563m	73
		18	Pak7	33.57668 N; 69.77984 E	3107m	40
		19	Pak8	33.58960 N; 69.80107 E	2924m	44
Laghman (3)	Alisheng	20	Lag1	34.778000 N; 70.102453 E	1705m	42
		21	Lag2	34.778251 N; 70.103193 E	1684m	50
		22	Lag3	34.778635 N; 70.100805 E	1709m	28
	Alingar	23	Lag4	34.826408 N; 70.433563 E	2724m	41
		24	Lag5	34.823895 N; 70.443566 E	2844m	36
		25	Lag6	34.82658 N; 70.43458 E	2753m	58
		26	Lag7	34.82691 N; 70.42417 E	2433m	45
Kunar (4)	Dangam	27	Knr1	34.99250 N; 71.42531 E	1920m	54
		28	Knr2	34.99268 N; 71.42758 E	1983m	52
		29	Knr3	34.99260 N; 71.42583 E	1933m	30
		30	Knr4	34.99253 N; 71.42533 E	1921m	47
		31	Knr5	34.99277 N; 71.42702 E	1964m	39
		32	Knr6	34.99165 N; 71.42679 E	1947m	43
Nuristan (5)	Waygal	33	Nur1	35.086765 N; 70.905542 E	1915m	31
		34	Nur2	35.086318 N; 70.905462 E	1920m	42
		35	Nur3	35.086169 N; 70.905227 E	1913m	29
		36	Nur4	35.086008 N; 70.905781 E	1937m	40
		37	Nur5	35.086455 N; 70.905584 E	1921m	50
		38	Nur6	35.086517 N; 70.905295 E	1914m	27
		39	Nur7	35.086399 N; 70.905174 E	1911m	46

تکثیر iPBS-PCR و SCoT-PCR

نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از ۱۲ آغازگر مختلف تحت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) قرار گرفت. شش آغازگر از هر نشانگر SCoT (Collard & Mackill, 2009) و iPBS (Kalendar et al., 2010) با غربالگری ۴۰ آغازگر مختلف بر اساس تولید نوارهای متمایز انتخاب شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نشانگرهای SCoT و iPBS در حجم نهایی ۲۰ μl حاوی به ترتیب ۲۵ ng و ۵۰ ng DNA الگو، مخلوط واکنش امپلیکون ۱×، آغازگر ۰/۲ μM (iPBS یا SCoT) انجام شد. واکنش تکثیر در یک دستگاه سیکل دهنده حرارتی (اپندورف) با شرایط چرخه تکثیر و اسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن چرخه و اسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در ۴۸°C به مدت ۱ دقیقه و گسترش در ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE ۰/۵× الکتروفورز شد. ژل پس از رنگ‌آمیزی فلورسنت زیر نور UV در دستگاه Gel doc مشاهده و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

در بررسی نشانگرهای iPBS و SCoT، پس از ثبت اطلاعات ژل به دست آمده امتیازدهی برای هر آغازگر انجام شد و هر نوار چند شکل به عنوان یک نشانگر در نظر گرفته شد و نوارها به صورت حضور نوار (۱) و عدم حضور نوار (۰) امتیازبندی شدند. با استفاده از نرم‌افزار اکسل متغیرهای مربوط به هر آغازگر (نوار) در ردیف‌ها و نام نمونه‌ها در ستون‌ها قرار گرفت. ماتریس دودویی صفر و یک حاصل به عنوان ورودی برای تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف استفاده گردید.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI) به منظور کارایی سیستم نشانگرها محاسبه شد (Shimada et al., 1992; Roldan-Ruiz et al., 2000).

PIC براساس روش Roldan-Ruiz و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از فرمول $PIC = 1 - [f^2 + (1 - f)^2]$ محاسبه شد که در این فرمول f فراوانی هر نشانگر غالب در هر ژنوتیپ است. مقدار PIC برای نشانگر غالب حداکثر ۰/۵ برای $f = ۰/۵$ می‌باشد.

EMR برابر است با تعداد نوارهای چندشکلی × نسبت آلل-های چندشکل به کل نوارها. هر چقدر مقدار EMR بیشتر باشد کارایی آغازگر بیشتر است.

شاخص نشانگر (MI) براساس فرمول $MI = EMR \times PIC$ محاسبه شد که کارایی کلی نشانگر را تخمین می‌زند (Powell et al., 1996; Nagaraju et al., 2001; Varshney et al., 2007).

از ماتریس دودویی برای محاسبه ضریب شباهت جاکارد (Jaccard, 1908) به منظور تعیین شباهت بین نمونه‌های کاج چلغوزه با نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.2 (Rohlf, 2009) استفاده شد. سپس خوشه‌بندی به روش UPGMA برای تعیین ارتباط ژنتیکی بین نمونه‌ها انجام شد. نرم‌افزار POPGENE version 1.32 (Yeh et al., 1997) برای تجزیه پارامترهای تنوع ژنتیکی تحت تعادل هاردی-واینبرگ استفاده گردید. تعداد نوارهای چندشکل (PPB)، تعداد آلل‌های مؤثر (N_E)، هتروزیگوسیتی قابل انتظار (H_E) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) اندازه‌گیری شده ارزیابی تنوع ژنتیکی از قبیل میانگین تنوع ژنی درون جمعیت (H_S)، تنوع ژنی کل (H_T)، ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) یا Wright's F_{ST} و برآورد جریان ژنی (N_M) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) با استفاده از آمار تنوع ژنی برای هر جمعیت آزمون شدند.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) براساس روش Excoffier و همکاران (۱۹۹۲) و با استفاده از نرم‌افزار GenALEX6-5 (Peakall & Smouse, 2012) انجام شد.

به منظور بررسی ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌ها فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) برای همه جفت جمعیت‌ها محاسبه و خوشه‌بندی بین جمعیت‌ها با ۱۰۰۰ جایگشت

۱۵۰ تا بیش از ۱۵۰۰ جفت باز متغیر بود. شش آغازگر SCoT و iPBS به ترتیب ۴۸ و ۵۵ نوار قابل امتیازدهی تولید کردند که در بین آنها به ترتیب تعداد ۱۰ و ۱۶ نوار چندشکل بودند (جدول ۲). تعداد نوارهای امتیازدهی شده به ازای هر آغازگر به ترتیب از ۵ تا ۱۰ و از ۷ تا ۱۱ برای نشانگر SCoT و iPBS متغیر بود. درصد چندشکلی به ازای هر آغازگر به ترتیب از ۲۰/۸ تا ۲۹/۱ برای نشانگر SCoT و iPBS متغیر بود (جدول ۲). مقدار PIC برای نشانگر SCoT از صفر (۳۵ SCoT) تا ۰/۰۵۱ (۱۰ SCoT) با میانگین کل ۰/۰۲۶ متغیر بود. مقدار PIC برای نشانگر iPBS از صفر (۲۱ iPBS) تا ۰/۰۷۴ (۱۷ iPBS) با میانگین کل ۰/۰۴۵ متغیر بود (جدول ۲). برای آغازگرهای SCoT مقدار EMR از صفر (۳۵ SCoT) تا ۰/۹۰۰ (۱۹ SCoT) و برای آغازگر iPBS مقدار EMR از صفر (۲۱ iPBS) تا ۲/۲۸۶ (۱۲ iPBS) متغیر بود. بیشترین مقدار MI برای آغازگرهای SCoT ۱۰ (۰/۰۲۵) و ۱۲ iPBS (۰/۱۵۵) محاسبه شد. شاخص نشانگر (MI) که توانایی هر نشانگر برای آشکارسازی آللهای چندشکل در بین ژنوتیپها را تعیین می‌نماید، برای هر دو نشانگر بسیار پایین ثبت شد. در این مطالعه میانگین مقدار MI برای نشانگر SCoT (۰/۰۱۶) و iPBS (۰/۰۶۶) برآورد گردید.

فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای

ماتریس فاصله ژنتیکی برای داده‌های جمع شده SCoT و iPBS تعیین شد و فاصله ژنتیکی نی بین صفر و ۰/۰۴۷ متغیر می‌باشد که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی پایین در میان نمونه‌های کاج چلغوزه است. بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۴۷ و کمترین فاصله ژنتیکی صفر، به ترتیب بین نمونه‌های خوست ۹ و پکتیا ۵، پکتیا ۷ و کتر ۶ و ۳، نورستان ۱ و ۲ و نیز لقمان ۷ و کتر ۶، ۴ و ۳ و نورستان ۲ و ۱ وجود داشت. ماتریس شباهت ژنتیکی برای داده‌های جمع شده SCoT و iPBS تعیین شد و شباهت ژنتیکی جاکارد بین ۰/۹۱۲ و ۱ متغیر بود که نشان‌دهنده

بوت استرپینگ (Bootstrap replicate) برای نمایش تمایز نسبی بین جمعیت‌ها رسم شد.

خوشه‌بندی افراد براساس ژنوتیپ آنها در مکان‌های ژنی چندگانه با استفاده از رویکرد بیزیان (Bayesian) مبتنی بر مدل توسعه یافته توسط Pritchard و همکاران (۲۰۰۰) بوسیله نرم‌افزار STRUCTURE اجرا شد. این برنامه نرم‌افزاری افراد را در تعداد معینی خوشه‌های ژنتیکی (K) بدون در نظر گرفتن منشأ نمونه‌گیری با فرض اینکه هر خوشه در تعادل هاردی-وینبرگ (H-W) و تعادل لینکاژی (LE) است، گروه بندی می‌نماید.

شاخص ΔK تعداد واقعی خوشه‌ها را متناظر با بالاترین سطح سلسله‌مراتبی پیش‌بینی می‌کند. برای این منظور، تعداد جمعیت‌ها (K) که از ۲ تا ۱۰ متغیر است برای هر جمعیت ۱۰ بار اجرا و برآورد شد. در این روش ساختار ژنتیکی جمعیت براساس فراوانی‌های آللی برای هر مکان ژنی انجام و هر فرد در یک خوشه K جایابی شد. در این روش، زنجیره‌های MCMC با دوره استقرار ۵۰,۰۰۰ تکراری اجرا و به دنبال آن سنجش مدل اختلاط (هم‌آمیزی) و فراوانی‌های آللی همبسته با ۱۰۰,۰۰۰ تکرار انجام شد. بیشترین ارزش قابل انتظار برای شاخص K با روش ΔK Evanno's (Evanno et al., 2005) با استفاده از ابزار تحت وب STRUCTUER Harvester (Earl & VonHoldt, 2012) نتایج استخراج شد.

نتایج

چندشکلی نشانگرهای SCoT و iPBS

تعداد ۲۰ آغازگر از هر یک از نشانگرهای SCoT و iPBS برای ایجاد چندشکلی با استفاده از یک نمونه DNA غربال گردید که بیشتر آغازگرهای SCoT و iPBS محصولات PCR با تعداد نوار متفاوت تولید کردند. در نهایت شش آغازگر از هر یک از نشانگرهای SCoT و iPBS انتخاب گردید که بر روی ۳۹ نمونه DNA متعلق به درخت چلغوزه الگوی نواری مناسب را ایجاد نمودند. اندازه نوارهای قابل امتیازدهی SCoT و iPBS از

جاکارد بین ۳۹ نمونه چلغوزه جمع‌آوری شده از ۵ استان افغانستان برای نشانگر SCoT و iPBS انجام شد. در هر دو نشانگر مولکولی، در سطح جمعیت خوشه‌ها به خوبی بر مبنای منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نشده‌اند (شکل ۱).

مشابهت ژنتیکی بالا بین نمونه‌های کاج چلغوزه است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی ۱ و ۰/۹۱۲ به ترتیب بین نمونه‌های پکتیا ۷ و لغمان ۳،۷، کنر ۳،۴ و ۶، نورستان ۱ و ۲ و خوست ۷ و نورستان ۵، پکتیا ۵ و نورستان ۴ برآورد گردید. تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر شباهت ژنتیکی

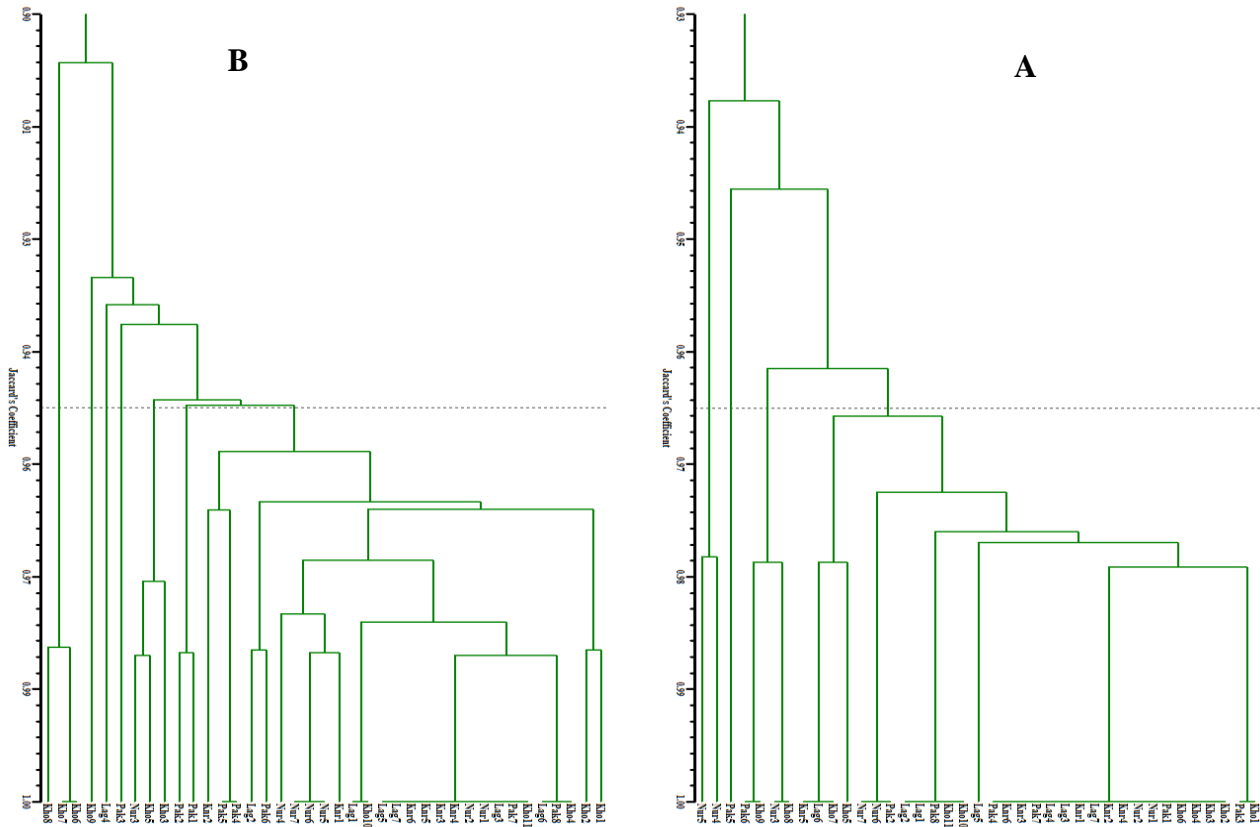
جدول ۲- فهرست آغازگرهای SCoT و iPBS، قطعات تکثیر شده و پارامترهای نشانگر به دست آمده برای هر یک از آغازگرهای

SCoT و iPBS مورد استفاده در این پژوهش

Table 2- List of SCoT and iPBS primers, amplicons generated and the marker parameters obtained for each SCoT and iPBS primer used in the present investigation.

Primer	Sequence (5'-3')	TNoB	Scored band sizes (bp)	NoPB	PoPB	PIC	EMR	MI
SCoT Marker								
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	8	300-1500	2	25	0.051	0.500	0.025
SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	10	250-1500	3	30	0.020	0.900	0.018
SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC	8	200-1500	2	25	0.043	0.500	0.022
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	10	250-1500	2	20	0.028	0.400	0.011
SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	7	150-1500	1	14	0.014	0.143	0.002
SCoT35	CATGGCTACCACCGGCC	5	200-1500	0	0	0.000	0.000	0.016
Total/Mean		48	-	10	20.8	0.026		0.016
iPBS Marker								
iPBS11	ACATCCTTCCCA	11	150-1300	1	9	0.013	0.091	0.001
iPBS 12	GAACTTGCTCCGATGCCA	7	200-1200	4	57	0.068	2.286	0.155
iPBS 17	ACCTGGCGTGCCA	8	200-1500	2	25	0.074	0.500	0.037
iPBS 18	GGCTCGGATGCCA	11	150-1500	4	36	0.071	1.455	0.103
iPBS 20	AGAACGGCTCTGATACCA	11	200-1500	5	45	0.044	2.273	0.099
iPBS 21	GCTCCGATGCCA	7	200-1500	0	0	0.000	0.000	0.000
Total/Mean		55	-	16	29.1	0.045		0.066

TNoB-Total number of bands, NoPB- Number of polymorphic bands, PoPB- Percentage of polymorphic bands (%), PIC- Polymorphic information content, EMR- effective multiplex ratio , MI- marker index



شکل ۱- نمودار خوشه‌ای UPGMA مبتنی بر ضریب شباهت جاکارد بین ۳۹ ژنوتیپ *P. gerardiana* تولید شده از داده‌های SCOT (A) و iPBS (B) کد نمونه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است

Figure 1- UPGMA dendrograms based Jaccard similarity coefficient among 39 genotypes of *Pinus gerardiana* generated with SCOT data (A) and iPBS data (B). The code numbers are indicated in Table 1.

تجزیه تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در این مطالعه ۳۹ نمونه متعلق به پنج جمعیت کاج چلغوزه *P. gerardiana* متعلق به پنج ناحیه از افغانستان در کل ۴۸ و ۵۵ نوار به ترتیب برای شش آغازگر از هر یک نشانگرهای SCOT و iPBS تولید کردند. در سطح جمعیت، نمونه‌های جمعیت‌های خوست، پکتیا، لغمان، کنر و نورستان در کل ۱۰/۴۲ و ۱۰/۱۸ درصد نوارهای چندشکل به ترتیب برای نشانگر SCOT و iPBS تولید نمودند (جدول ۳). تحت تعادل هاردی- واینبرگ تعداد آلل‌های مشاهده شده (NA)، میانگین تعداد آلل‌های مؤثر (NE)، شاخص اطلاعات شانون (I) و میانگین تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی قابل انتقال، HE) در جمعیت‌های خوست، پکتیا، لغمان، کنر و نورستان برای نشانگر SCOT و iPBS تعیین شد (جدول ۳).

تجزیه تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در این مطالعه ۳۹ نمونه متعلق به پنج جمعیت کاج چلغوزه *P. gerardiana* متعلق به پنج ناحیه از افغانستان در کل ۴۸ و ۵۵ نوار به ترتیب برای شش آغازگر از هر یک نشانگرهای SCOT و iPBS تولید کردند. در سطح جمعیت، نمونه‌های جمعیت‌های خوست، پکتیا، لغمان، کنر و نورستان در کل ۱۰/۴۲ و ۱۰/۱۸ درصد نوارهای چندشکل به

جدول ۳- خلاصه تنوع ژنتیکی برای نشانگر SCoT و iPBS در پنج جمعیت (۳۹ نمونه) *Pinus gerardiana* افغانستان

Table 3- Summary of genetic diversity for SCoT and iPBS markers in five populations (39 genotypes) of *Pinus gerardiana* from Afghanistan

Populations	Sample size	Percentage of Polymorphic bands (PPB)		Observed number of alleles (NA)		Effective number of alleles (NE)		Shannon's Information Index (I)		Expected Heterozygosity (HE)	
		SCoT	iPBS	SCoT	iPBS	SCoT	iPBS	SCoT	iPBS	SCoT	iPBS
Khost	11	10.42	16.36	1.104	1.164	1.091	1.114	0.068	0.095	0.048	0.065
Paktia	8	12.50	14.55	1.125	1.145	1.109	1.118	0.082	0.089	0.058	0.063
Laghman	7	6.25	9.09	1.063	1.073	1.058	1.071	0.042	0.056	0.030	0.039
Kunar	6	2.08	5.45	1.021	1.036	1.019	1.042	0.014	0.033	0.010	0.023
Nuristan	7	10.42	5.45	1.104	1.036	1.099	1.032	0.071	0.027	0.051	0.018
Total/Mean	39	10.42	10.18	1.083	1.091	1.075	1.075	0.055	0.060	0.039	0.042

تنوع پایین‌تری بین جمعیت‌ها نسبت به درون جمعیت‌های *P. gerardiana* به طور مشابه برای هر دو نشانگر SCoT و iPBS وجود دارد. مقدار $\Phi_{ST} = 0.005$ برای نشانگر SCoT و $\Phi_{ST} = 0.164$ ($P < 0.001$) برای نشانگر iPBS با استفاده از نرم‌افزار GenALEX برآورد شد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که بخش قابل توجهی از تنوع ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها (۱۰۰ درصد برای نشانگر SCoT و ۸۴ درصد برای نشانگر iPBS) به حساب می‌آید و جزء کمتری از آن (۱ درصد برای SCoT و ۱۶ درصد برای iPBS) (جدول ۴).

مقدار میانگین تنوع ژنی درون جمعیت‌های (H_s) *P. gerardiana* افغانستان برابر 0.394 و 0.415 به ترتیب برای نشانگر SCoT و iPBS تعیین شد. مقدار کل تنوع ژنی (H_T) جمعیت‌های مورد مطالعه چلغوزه افغانستان 0.544 و 0.635 به ترتیب برای نشانگر SCoT و iPBS برآورد گردید. برآورد جریان ژنی (Nm) $1/3166$ و 0.9480 برای نشانگر SCoT و iPBS تعیین شد.

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی درون و بین جمعیت‌ها توسط AMOVA برای جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که تنوع متفاوتی براساس دو نشانگر SCoT و iPBS وجود دارد.

جدول ۴- ارزیابی تنوع درون و بین پنج جمعیت *P. gerardiana* توسط تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تنوع SCoT و iPBS

Table 4- Assessment of genetic intra- and inter population variability of *P. gerardiana* populations based on the analysis of molecular variability (AMOVA) for SCoT and iPBS variation

Molecular marker	SOV	df	SS	MS	Estimated Variance	Variance %	Fixation indices	P value
SCoT	Between pop.	4	2.825	0.706	0.003	0.6%	$\Phi_{ST}=0.005$	**
	Within pop.	34	23.124	0.680	0.680	99.4%		**
	Total	38	25.949		0.684	100%		
iPBS	Between pop.	4	10.956	2.739	0.214	16%	$\Phi_{ST}=0.164$	**
	Within pop.	34	37.096	1.091	1.091	84%		**
	Total	38	48.051		1.305	100%		

**= Significant at 1% probability level

**= معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

(شکل ۲). دندروگرام حاصل از داده‌های SCoT و فاصله ژنتیکی نی نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه دو خوشه اصلی تشکیل می‌دهند. در خوشه اول جمعیت‌های خوست، لغمان، کُنر و پکتیا را شامل می‌شود که نسبت به خوشه سوم (نورستان) در فاصله بیشتری قرار دارند. دندروگرام حاصل از داده‌های iPBS و فاصله ژنتیکی نی با خوشه‌بندی نشانگر SCoT مطابقت نداشت و جمعیت خوست با فاصله بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌ها قرار گرفته است.

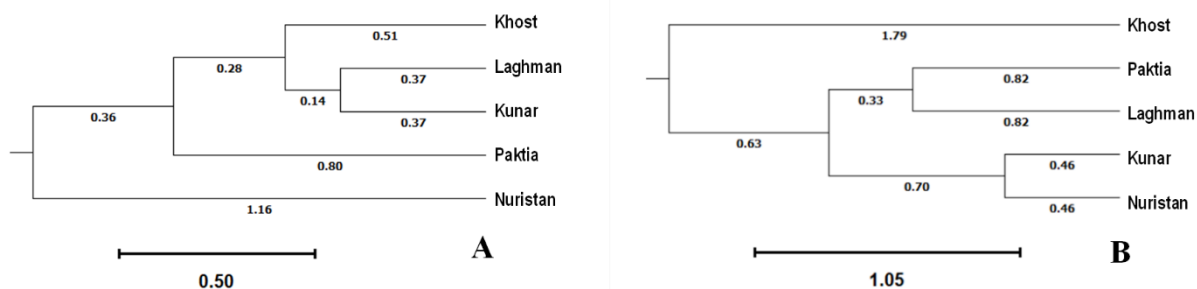
کمترین فاصله ژنتیکی نی بین جمعیت‌های لغمان و کُنر $D=0/009$ و $D=0/017$ به ترتیب برای نشانگر SCoT و iPBS ثبت شد و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های پکتیا و نورستان و لغمان و نورستان $D=0/031$ برای نشانگر SCoT و جمعیت‌های خوست و لغمان $D=0/041$ و خوست و کُنر $D=0/041$ برای نشانگر iPBS برآورد شد (جدول ۵). براساس ماتریس فاصله ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای براساس روش UPGMA رسم شد و دندروگرام منعکس‌کننده درجه شباهت جمعیت‌های مورد مطالعه است

جدول ۵- ماتریس فاصله ژنتیکی نی بین پنج جمعیت *Pinus gerardiana* برای نشانگر SCoT و iPBS

Table 5- Pairwise population matrix of Nei's genetic distance in five populations of *P. gerardiana* for SCoT and iPBS markers

Populations	Khost	Paktia	Laghman	Kunar	Nuristan
Khost	****	0.035	0.041	0.041	0.039
Paktia	0.015	****	0.020	0.027	0.032
Laghman	0.011	0.020	****	0.017	0.027
Kunar	0.014	0.022	0.009	****	0.011
Nuristan	0.022	0.031	0.031	0.022	****

Nei's genetic distance for SCoT (below diagonal) and for iPBS (above diagonal). Nei's Genetic Distance = $D = -\ln(I)$; where: I is Nei's Genetic Identity

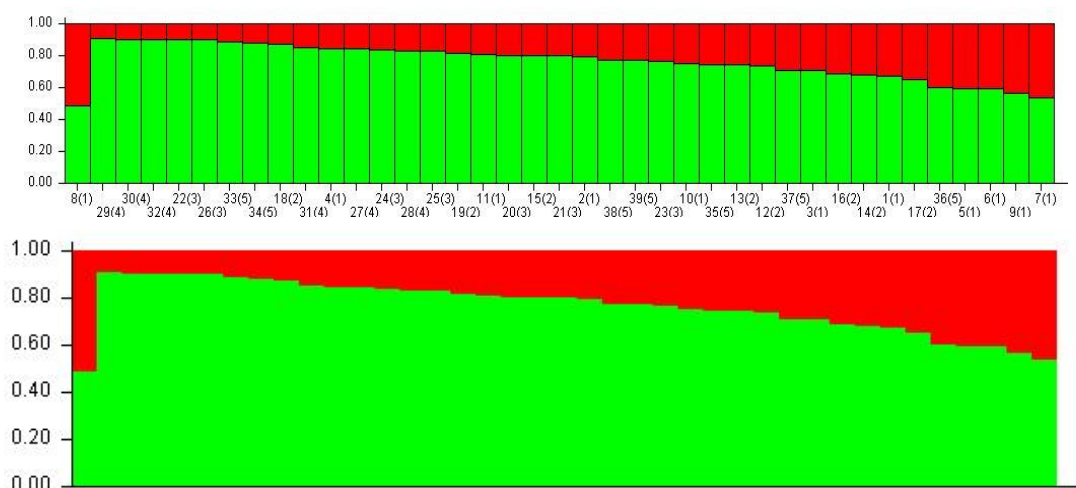


شکل ۲- دندروگرام فاصله ژنتیکی نی پنج جمعیت مطالعه شده *P. gerardiana* ساخته شده بر اساس چندشکلی الگوی SCoT (A) و iPBS (B) توسط روش UPGMA

Figure 2- Dendrogram of Nei's genetic distance of five studied populations of *P. gerardiana*, built based on polymorphism of SCoT (A) and iPBS (B) profiles by UPGMA method

نمونه‌ها که توسط نرم‌افزار STRUCTURE بدست آمد نشان داد که دو خوشه ($K=2$) به احتمال زیاد بهترین بازنمایی ساختار ژنتیکی کل جمعیت‌های کاج چلغوزه مورد بررسی است. کمترین فراوانی خوشه ۱ (با رنگ قرمز مشخص شده است) در جمعیت‌های خوست، پکتیا، لغمان، کنار و نورستان با میانگین به ترتیب $۳۲/۹$ ، $۱۶/۲۵$ ، $۱۲/۵$ و ۲۳ درصد وجود داشت. در حالی که خوشه ۲ (با رنگ سبز نشان داده شده است) شامل جمعیت‌ها با فراوانی بیشتر به ترتیب با میانگین $۶۷/۱$ ، ۷۵ ، $۸۳/۵$ ، $۸۷/۵$ و ۷۷ درصد برای خوست، پکتیا، لغمان، کنار و نورستان می‌باشد. شاخص تنبیت (F_{st}) هر زیرجمعیت برای خوشه ۱ و ۲ به ترتیب $۰/۰۰۷۹$ و $۰/۸۳۷۳$ برآورد شد.

تجزیه و تحلیل STRUCTURE اطلاعات اضافی را در مورد تعداد مخازن ژنی و سطح ترکیب ژنومی و اختلاط بین جمعیت‌ها فراهم می‌نماید. مدل مورد استفاده در این نرم-افزار، هم‌آمیزی (admixture) با آلفا معین برای هر جمعیت در نظر گرفته شد. پارامتر آلفا احتمال جریان ژن‌ها را از سایر جمعیت‌های مورد مطالعه برآورد می‌کند و جریان ژن‌ها از هر جمعیتی را با احتمال متفاوت در نظر می‌گیرد. با استفاده از این مدل، مقدار قابلیت اطمینان برای خوشه‌ها با تعداد احتمالی خوشه‌های K از ۱ تا ۱۰ محاسبه گردید. قابل اعتمادترین انتخاب $K=2$ برآورد شد. برای $K=2$ ، ماتریکس Q -توزیع گروه‌های ژنوتیپ محاسبه و به صورت نمودار بای‌پلات نمایش داده شد (شکل ۳). واگذاری اریبی



شکل ۳- نتایج واگذاری تجزیه STRUCTURE هر نمونه به خوشه ژنتیکی ایجادشده ($K=2$) در دو رنگ قرمز و سبز محور y ضریب عضویت تخمین زده شده (Q) را برای هر فرد در دو خوشه نشان می‌دهد. محور x مربوط به کدهای نمونه‌هایی است که در جدول ۱ مشخص شده است. اعداد داخل پرانتز کد جمعیت را نشان می‌دهد.

Figure 3- The STRUCTURE assignment of each individual to inferred genetic clusters marked in red and green colors. The y-axis presents the estimated membership coefficient (Q) for each individual in the two clusters. The x-axis corresponds to sample codes as identified in Table 1. The numbers in parentheses indicate the population code.

بحث

از زمان توسعه روش قابل کاربرد SCoT و iPBS، این نشانگرها به طور گسترده برای مطالعات ژنتیک جمعیتی و تجزیه ساختار ژنتیکی استفاده شده است (Fang-Yong & Saboori et al., Borna et al., 2017, Ji-Hong, 2014, Vasilyeva et al., 2021, 2020). از مزیت‌های این روش، این است که چند شکلی‌هایی که توسط iPBS آشکارسازی می‌شود تخمین‌های واقعی‌تری از تفاوت‌های ژنتیکی نسبت به تنوع در سطح محصولات زنی برآورد می‌نماید (Kalendar et al., 2018). با توجه به دانش ما، این اولین گزارشی است که تنوع مولکولی نمونه‌های کاج چلغوزه افغانستان را با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT و iPBS توصیف می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو نشانگر SCoT و iPBS ابزار مولکولی قابل اعتمادی برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های کاج چلغوزه هستند، همچنین هر دو نشانگر مولکولی سطح پایین تنوع ژنتیکی را در *P. gerardiana* نشان داد که بسیار کمتر از تنوع ژنتیکی گزارش شده در بیشتر مخروطیان بدون توجه به نشانگرهای استفاده شده است (Zhang, 2005). سطح پایین تنوع ژنتیکی در این مطالعه با نتایج Zhang (۲۰۰۵) در *P. squamata* که توسط RAPD و ISSR برآورد شد مطابقت دارد. تنوع ژنتیکی حفظ شده در یک گونه گیاهی تحت تأثیر ویژگی‌های خاص گونه است (Hamrick and Godt, 1989). بیشتر مخروطیان به عنوان گروهی با دوره زندگی طولانی به همراه گرده‌افشانی با باد، از نظر ژنتیکی متنوع‌ترین گونه‌های گیاهی هستند (Hamrick et al., 1992). در بررسی گونه‌های مختلف کاج که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، به جز کاج قرمز و *P. squamata* (کاج چینی) به نظر می‌رسد الگویی کلی را از تنوع ژنتیکی بالا نشان می‌دهند.

نمونه‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه براساس موقعیت جغرافیایی خود خوشه‌بندی نشدند. به این دلیل که احتمالاً این گونه در نواحی نسبتاً کوچکی پراکنش دارد و درصد بالایی دگرگرده‌افشانی در آنها رخ می‌دهد. هر چند

نواحی نمونه‌گیری در فواصل زیاد و ارتفاعات متفاوت محدود شده‌اند ولی احتمالاً شانس زیاد جابه‌جایی (مهاجرت) دانه‌گرده و بذر بین نواحی وجود دارد. بنابراین باعث می‌گردد کل جمعیت به طور یکنواخت (متجانس) با یکدیگر مخلوط شوند. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Kant و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت. آنان تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *P. gerardiana* متعلق به هیماچال پرادش هند را با استفاده از نشانگر RAPD انجام دادند. آنان در مطالعه خود ۲۴ ژنوتیپ کاج چلغوزه متعلق به مکان‌های مختلف در دامنه پراکنش این گونه را به طور تصادفی انتخاب کردند. خوشه‌بندی UPGMA مبتنی بر ضریب شباهت نشان داد که ژنوتیپ‌ها براساس موقعیت جغرافیایی خود خوشه‌بندی نشده‌اند. نتایج حاصل از گروه‌بندی UPGMA نشان‌دهنده اختلاط ژنتیکی پیوسته بین جمعیت‌های کاج در استان‌های مختلف افغانستان است. تجزیه STRUCTURE برای تأیید نتایج تجزیه خوشه‌بندی انجام شد. نتیجه کلی همه تجزیه و تحلیل‌ها عدم وجود تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های چلغوزه و اختلاط یا هم‌آمیزی بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. در این رابطه، مشخص شده بازدانگان از نظر ژنتیکی گروه متنوعی از گونه‌ها را تشکیل می‌دهند و در این گونه‌ها توافق کلی وجود دارد که بیشتر تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها وجود دارد. البته میزان تنوع درون جمعیتی در بیشتر گونه‌ها به میزان برون‌زایی آنها بستگی دارد.

مقایسه سطح تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای SCoT و iPBS مبتنی بر PPB و N_A و N_E نشان داد که جمعیت‌های مطالعه شده سطح تنوع ژنتیکی نسبی پایین دارند. مشابهت مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) و تنوع ژنی کل (H_T) و شاخص شانن (I) درون جمعیت‌ها بیان می‌کند که میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها بسیار پایین است. سطح بسیار پایین تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص‌های درصد نوارهای چندشکل (PPB)، تعداد آل‌های مؤثر (N_E)، شاخص شانن (I) و هتروزیگوسیتی قابل انتظار (H_E) با مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۰۵) بر روی کاج چینی و در

تنوع ژنتیکی بالاتری درون جمعیت‌ها در مقایسه با بین جمعیت‌های کاج چلغوزه وجود دارد. توزیع کنونی تنوع ژنتیکی در گونه‌ها تحت تأثیر تاریخ طبیعی و تاریخ تکاملی آنهاست (Hamrick and Godt, 1996). کاج‌ها با باد گرده‌افشانی می‌شوند و جمعیت‌های مختلف می‌توانند ژن‌های خود را از طریق پراکندگی گرده مبادله کنند، بنابراین کاج‌ها همیشه تمایز ژنتیکی کمی بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند (mean GST = 0.073; Hamrick et al., 1992). البته تمایز بین جمعیت‌های کاج چلغوزه ($\Phi_{ST} = 0.005$ for SCOT و $\Phi_{ST} = 0.164$ for iPBS) مانند بسیاری از کاج‌های دیگر (Hamrick et al., 1992) بسیار کم برآورد شد. این نشان می‌دهد که جریان ژنی مکرر بین جمعیت‌های *P. gerardiana* وجود دارد. نتایج این تحقیق با برآورد کلی بیشتر گونه‌ها با سیستم تولیدمثلی برون‌زادگیری (out crossing) و گرده‌افشانی با باد مطابقت دارد (Tong et al., 2020). *P. gerardiana* درختی است که گرده‌افشانی آن توسط باد انجام می‌گردد و از نظر سیستم تولیدمثل، آزاد گرده‌افشانی می‌باشد و بذر آن توسط پرندگان و چرندگان پراکنده می‌شود. چنین سیستم تولیدمثل و گرده‌افشانی باعث می‌گردد جریان ژنی بین و درون جمعیت‌ها افزایش یابد (Petit et al., 2005; Nybom, 2004). و از تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها کاسته شود. علاوه بر آن، مقادیر تخمین جریان ژنی بین جمعیت‌های کاج چلغوزه مورد مطالعه ($N_m = 1/317$ و $N_m = 0/948$) برآورد گردید که با تعداد این شاخص برای گیاهان چندساله مناطق معتدله مطابقت دارد.

کاج چلغوزه در مناطق صخره‌ای معتدل خشک افغانستان و در مناطق آب و هوایی سرد و مرتفع در ۱۸۰۰ تا ۳۳۵۰ متر بالای سطح دریا رشد می‌کند. دانه کاج به عنوان آجیل خوراکی و دارو توسط مردم محلی استفاده می‌شود. از سویی به دلیل استخراج بی‌رویه دانه این گیاه توسط مردم محلی باززایی طبیعی این گونه در افغانستان بسیار پایین است. به‌رحال، قسمت اعظم تنوع ژنتیکی این گونه ارزشمند از دست‌رفته است و اگر اقدامات حفاظتی مناسب اتخاذ نشود

حال انقراض *P. squamata* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR کاملاً مطابقت داشت. یکی از شاخص‌های معمول کاربردی برای تخمین میزان تنوع درون جمعیت‌ها، میانگین تنوع ژنی درون جمعیت (H_S) می‌باشد. این مطالعه نشان داد که میانگین H_S درون جمعیت‌ها بسیار پایین است. این احتمالاً به دلیل پراکنش جغرافیایی محدود *P. gerardiana* بومی جنگل‌های معتدله ناحیه هندوکش - هیمالیا شامل شرق و جنوب‌شرق افغانستان، شمال و شمال‌غرب پاکستان، شمال‌غرب هند و تبت و استان‌های شیژانگ چین می‌باشد. این گونه با تعداد بسیار کمی از جمعیت‌های کوچک بسیار پراکنده شناخته شده است و همانطور که انتظار می‌رود تنوع ژنتیکی بسیار پایینی را نشان می‌دهد. در این مطالعه ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) برابر با ۰/۲۷۵۲ و ۰/۳۴۵۳ برای نشانگر SCOT و iPBS برآورد گردید که با Φ_{ST} محاسبه شده مطابقت ندارد. ضریب تمایز ژنی (G_{ST}) در بین جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای غالب مانند RAPD، SCOT و iPBS به‌طور کلی به سمت بالا اریب دارد، به ویژه زمانی که اندازه نمونه‌ها در گونه‌های در معرض انقراض کوچک باشد (Isabel et al., 1999, 1995). بنابراین در چنین مواردی به منظور تخمین دقیقتری از ساختار و تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه از آنالیز غیرپارامتریک واریانس مولکولی (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) استفاده می‌شود که شاخص کل Φ_{ST} محاسبه می‌گردد و اجزای تنوع ژنتیکی بین افراد درون جمعیت‌ها و بین جمعیت‌های مورد مطالعه تقسیم می‌شود. در این مطالعه ضریب تمایز ژنتیکی (Φ_{ST}) برابر ۰/۰۰۵ و ۰/۱۶۴ برای نشانگر SCOT و iPBS محاسبه گردید که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد مطالعه است. به‌علاوه نتایج AMOVA برای هر دو نشانگر مولکولی نشان داد که بخش عمده واریانس ژنتیکی (۱۰۰٪ برای SCOT و ۸۴٪ برای iPBS) درون جمعیت‌های کاج چلغوزه وجود دارد، در حالی که صفر درصد (SCOT) و ۱۶٪ (iPBS) از واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد. این نتایج بیان می‌کند که به‌طور کلی

- diversity in populations of the medicinal plant *Leonurus cardiaca* L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64: 479-492.
- Collard, B.C. and Mackill, D.J., 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant molecular biology reporter*, 27: 86-93.
 - 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.
 - Earl, D.A. and VonHoldt, B.M., 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4: 359-361.
 - Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8): 2611-2620.
 - Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
 - Fang-Yong, C. and Ji-Hong, L., 2014. Germplasm genetic diversity of *Myrica rubra* in Zhejiang Province studied using inter-primer binding site and start codon-targeted polymorphism markers. *Scientia Horticulturae*, 170: 169-175.
 - Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In 'Plant population genetics, breeding and genetic resources'. (Eds AHD Brown, MT Clegg, AL Kahler, BS Weir) pp. 43-63.
 - Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. and Sherman-Broyles, S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In *Population Genetics of Forest Trees: Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees Corvallis, Oregon, USA, July 31-August 2, 1990* (pp. 95-124). Springer Netherlands.
 - Isabel, N., Beaulieu, J. and Bousquet, J., 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14): 6369-6373.
 - Isabel, N., Beaulieu, J., Thériault, P. and Bousquet, J., 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology*, 8(3): 477-483.
 - Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44:

در آینده نزدیک این گونه به طور کامل در خطر انقراض قرار خواهد گرفت. این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی انجام شد. به هر حال، تعداد کم نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه مطلقاً نمی‌تواند به عنوان نماینده تنوع ژنتیکی کاج چلغوزه در نظر گرفته شود و به منظور برآورد صحیح لازم است تعداد نمونه‌های بیشتری جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. در هر صورت، ضرورت دارد به منظور حفظ تنوع ژنتیکی و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی، این گونه گیاهی در جمعیت‌های بزرگ در زیستگاه طبیعی خود حفظ و نگهداری گردد و اقدامات حفاظتی باید به صورت فوری انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولان محترم دانشگاه شهرکرد به دلیل فراهم کردن شرایط و امکانات لازم برای اجرای این پروژه تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از آقای احسان‌الله فضلی (دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهرکرد) که در جمع‌آوری و تهیه مواد گیاهی کمک شایانی کردند، قدردانی ویژه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Alam, M., 2011. Trees and shrubs of Afghanistan: a dendrological guide. Rossolis; Musée botanique cantonal Lausanne, Switzerland. pp. 80-82
- Amom, T. and Nongdam, P., 2017. The use of molecular marker methods in plants: a review. *International Journal of Current Research and Review*, 9: 1-7.
- Amom, T., Tikendra, L., Apana, N., Goutam, M., Sonia, P., Koijam, A.S., Potshangbam, A.M., Rahaman, H. and Nongdam, P., 2020. Efficiency of RAPD, ISSR, iPBS, SCoT and phytochemical markers in the genetic relationship study of five native and economical important bamboos of North-East India. *Phytochemistry*, 174: 112330.
- Bhattacharyya, A., Lamarche, V.C.Jr., Telewski, F.W., 1988. Dendrochronological reconnaissance of the 483 conifers of Northwest India. *Tree Ring Bulletin*, 48: 21-30.
- Borna, F., Luo, S., Ahmad, N.M., Nazeri, V., Shokrpour, M. and Trethowan, R., 2017. Genetic

- genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- Rohlf, F.J., 2009. NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York.
 - Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. and De Loose, M.A.F.L.P., 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular breeding*, 6: 125-134.
 - Saboori, S., Noormohammadi, Z., Sheidai, M. and Marashi, S., 2020. SCoT molecular markers and genetic fingerprinting of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67: 73-82.
 - Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6): 945-948.
 - Tabasi, M., Sheidai, M., Hassani, D. and Koohdar, F., 2020. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis with SCoT markers of Persian walnut populations (*Juglans regia* L.) in Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67: 1437-1447.
 - Tong, Y., Durka, W., Zhou, W., Zhou, L., Yu, D. and Dai, L., 2020. Ex situ conservation of *Pinus koraiensis* can preserve genetic diversity but homogenizes population structure. *Forest Ecology and Management*, 465: 117820.
 - Tyagi, R., Sharma, V., Sureja, A.K., Das Munshi, A., Arya, L., Saha, D. and Verma, M., 2020. Genetic diversity and population structure detection in sponge gourd (*Luffa cylindrica*) using ISSR, SCoT and morphological markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26: 119-131.
 - Vanijajiva, O. and Pornpongrueng, P., 2020. Inter-primer binding site (ipbs) markers reveal the population genetic diversity and structure of tropical climbing cissampelopsis (asteraceae) in Thailand. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(9): 3919-3928.
 - Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E. and Graner, A., 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *theoretical and Applied Genetics*, 114: 1091-1103.
 - Vasilyeva, Y., Chertov, N., Nechaeva, Y., Sboeva, Y., Pystogova, N., Boronnikova, S. and Kalendar, R., 2021. Genetic structure, differentiation and originality of *Pinus sylvestris* L. populations in the east of the East European Plain. *Forests*, 12(8): 999.
 - Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B., Ye, Z.H. and Mao, J.X., 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular* 223-270.
 - Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P. and Schulman, A.H., 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1419-1430.
 - Kalendar, R., Amenov, A. and Daniyarov, A., 2018. Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. *Functional Plant Biology*, 46(1), 15-29.
 - Kant, A., Pattanayak, D., Chakrabarti, S.K., Sharma, R., Thakur, M. and Sharma, D. R., 2006. RAPD analysis of genetic variability in *Pinus gerardiana* Well. In Kinnaur (Himachal Pradesh). *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 52-67
 - Klobucnik, M., Galgoci, M., Gomory, D. and Kormutak, A., 2022. Molecular Insight into Genetic Structure and Diversity of Putative Hybrid Swarms of *Pinus sylvestris* × *P. mugo* in Slovakia. *Forests*, 13(2): 205.
 - Kumar, R., Shamet, G.S., Mehta, H., Alam, N.M., Kaushal, R., Chaturvedi, O.P., Sharma, N., Khaki, B.A. and Gupta, D., 2016. Regeneration complexities of *Pinus gerardiana* in dry temperate forests of Indian Himalaya. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 7732-7743.
 - Nagaraju, J., Kathirvel, M., Kumar, R.R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E., 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9): 5836-5841.
 - Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
 - Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13(5): 1143-1155.
 - Peakall R. and Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539
 - Petit, J.R., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. and Ven-dramin, G.G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689-701.
 - Powell, W.W., Koput, K.W. and Smith-Doerr, L., 1996. Interorganizational collaboration and the locus of innovation: Networks of learning in biotechnology. *Administrative Science Quarterly*, 41(1): 116-145.
 - Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus

- (SCoT) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67: 41-58.
- Zhang, Z.Y., Chen, Y.Y. and Li, D.Z., 2005. Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*, 43: 239-249.
- biology and biotechnology center, University of Alberta, Canada, 10: 295-301.
- Zhou, L., He, X.H., Yu, H.X., Chen, M.Y., Fan, Y., Zhang, X.J., Fang, Z.B. and Luo, C., 2020. Evaluation of the genetic diversity of mango (*Mangifera indica* L.) seedling germplasm resources and their potential parents with start codon targeted