رستنیها ۲۳(۱): ۱۱۳–۱۰۵ (۱۴۰۱) – مقاله پژوهشی Rostaniha 23(1): 105–113 (2022) – Research Article

DOI: 10.22092/BOTANY.2022.358985.1310

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های گیاه اشنان با استفاده از آنالیز RAPD در ایران*

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۰ / پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۸

شیما صدیقی: دانشجوی دکتری زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

علیرضا ایرانبخش✉: استاد گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (iranbakhsh@iau.ac.ir)

سید محمد مهدی حمدی: دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ایرج مهرگان: دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

جنس *Seidlitzia* (تاج‌خروسیان) دارای سه گونه علفی و یک گونه درختچه‌ای است. گیاه اشنان (*Seidlitzia rosmarinus*) یکی از گیاهان مقاوم جوامع شورپسند است که نقش مهمی در حفاظت خاک ایفا می‌کند. در این تحقیق، نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گونه مذکور، ۸۵ نمونه گیاهی از ۱۷ جمعیت، مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد پنج آغازگر تصادفی در انجام واکنش RAPD به کار گرفته شد و در کل ۴۰۰ باند DNA به دست آمد. بیشترین تعداد باندها از دو آغازگر OPM-06 و OPS-07 به دست آمد. در تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها برای تفسیر داده‌های آنالیز RAPD از نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 استفاده شد. ماتریس تشابه ایجاد شده در نرم‌افزار NTSYS با روش UPGMA با استفاده از مدل خوشه‌بندی SAHN به دست آمد. در تحقیق حاضر، جمعیت کاشان (PSE) با بیشترین فاصله، به عنوان گروه خواهری سایر جمعیت‌های موجود در نظر گرفته شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک با کمک نرم‌افزار Gen Alex 6.41، برای تفسیر داده‌های آنالیز RAPD، از نرم‌افزار آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور برآورد تنوع ژنتیکی استفاده شد. از مجموع کل تنوع، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی یعنی ۶۹٪ آن مربوط به تنوع درون جمعیتی، ۳۱٪ تنوع بین جمعیتی محاسبه شد. با توجه به اهداف این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر مولکولی RAPD روشی سودمند برای بررسی پراکندگی ژنتیکی جمعیت اشنان بوده است.

واژه‌های کلیدی: آنالیز واریانس مولکولی، تاج‌خروسیان، تجزیه خوشه‌ای، روش UPGMA، *Seidlitzia rosmarinus*

Investigation of inter and intra population genetic diversity of population in *Seidlitzia rosmarinus* by RAPD marker in Iran

Received: 10.06.2022 / Accepted: 30.07.2022

Shima Sedighi: PhD Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Alireza Iranbakhsh✉: Prof., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (iranbakhsh@iau.ac.ir)

Seyed Mohammad Mehdi Hamdi: Associate Prof., Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Iraj Mehregan: Associate Prof., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Summary

The genus *Sedlitzia* (*Amaranthaceae*) includes four herbaceous and one shrubby species. *Sedlitzia rosmarinus* is resistant to salinity that plays an important role in soil conservation. In this research, RAPD molecular markers were used to evaluate the genetic diversity among 85 plant samples from 17 populations of *S. rosmarinus*. Five primers were used to perform RAPD reactions and a total of 400 DNA bands were obtained. After forming 0 and 1 matrix with the help of GenAlex 6.41 and UPGMA methods using SHAN clustering model, NTSYS Ver. 2.02 software was used to interpret RAPD analysis data. Molecular analysis of variance (AMOVA) was performed to estimate genetic diversity out of 85 individuals. Out of the total diversity, it was calculated that, the highest amount of genetic diversity i.e. 69% was related to intra-population and 31% to inter-population diversity, respectively.

Keywords: *Amaranthaceae*, AMOVA, cluster analysis, salinity, UPGMA method

* بخشی از رساله دکتری نگارنده نخست به راهنمایی دکتر علیرضا ایرانبخش ارایه شده به واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

مقدمه

جنس *Seidlitzia* دارای جنین مارپیچ، دانه افقی، ساقه بندبند و مفصل‌دار و گل‌های سبزفام و کرک‌دار است. گیاهان این جنس علفی یکساله یا درختچه‌ای، کاملا بدون کرک و یا با توده‌هایی از کرک فقط در محور برگ‌ها؛ گل‌ها نرماده یا یک‌جنسی، بدون دمگل، در محور برگ‌ها، معمولا در دسته‌ها (خوشه‌ها)ی ۵-۳ تایی؛ قطعات گلپوش پنج‌تایی، نوک کند، رشدیافته و در حالت میوه با بال غشایی پهن گسترده مشخص؛ پرچم‌ها پنج‌تایی، بساک‌ها بدون زایده؛ بازوهای خامه‌ای دوتایی، خطی؛ میوه افقی، به ندرت عمودی؛ دانه‌ها با جنین حلقوی و بدون اندوسپرم.

گیاه اشنان (*Seidlitzia rosmarinus* Boiss.) که نخستین بار توسط بواسیه (Boissier 1879) معرفی شد، پراکنش وسیعی در آسیای جنوب‌غربی داشته، به طوری که تنوع ریخت‌شناختی گسترده‌ای را نشان می‌دهد (Hedge 1997). اشنان درختچه‌ای پایا با شاخه‌های سفید رنگ است که ارتفاع آن‌ها به ۱/۵ متر می‌رسد. این گونه به افتخار سِدلتیس (Seidlitiz) گیاه‌شناس، با نام علمی *S. rosmarinus* معرفی شده است (Sabeti 1994). در بررسی واکنش گیاه اشنان به تنش شوری، گفته می‌شود که این گیاه برای مقابله با شوری، یون‌های اضافی را در واکوئل‌های مرکزی سلول‌های برگ و واکوئل‌های کوچک سیتوپلاسمی برگ و ریشه ذخیره می‌کند. تجمع بالای یون‌های سدیم، کلر و کلسیم در این گونه در عرصه‌های شور به اثبات رسیده است (Khavazeh 1999, Yasseen 2007)، به طوری که در برخی موارد از این گونه جهت تعیین میزان آلودگی مناطق مختلف به فلزات سنگین استفاده گردیده است (Al-Khateeb & Leilah 2005). ریشه اصلی، ابتدا به طور عمودی در خاک نفوذ می‌کند، اما توسعه ریشه‌های فرعی ناچیز بوده که پس از رسیدن به رطوبت کافی در جهت افقی رشد و افزایش می‌یابد (Baghestani Maybodi 1996).

اشنان درختچه‌ای به بلندی ۲-۱/۵ متر، برگ‌ها به طول ۳۴-۵ میلی‌متر، آبدار، گوشتی، استوانه‌ای یا استوانه‌ای گرزی، در قاعده و در انتها ضخیم‌تر، بدون نیشتر انتهایی، کم و بیش افقی، محتوی املاح فراوان؛ گل‌ها غالبا به تعداد سه عدد در محور برگ‌های بالایی؛ برگه‌ها شامل دو عدد جانبی و تعدادی برگک کوچکتر، به طول تقریبا برابر گلپوش؛ گلپوش‌ها به طول حدود ۱/۶ میلی‌متر در مرحله گل، در مرحله میوه کمی بزرگتر، دایره‌ای-واژتخم‌مرغی، نوک فرورفته، بالدار؛ میوه‌ها پنج باله، قطر میوه با بال ۱۲-۸ میلی‌متر و بال‌ها به رنگ‌های زرد و تا نارنجی و یا ارغوانی (Mozaffarian 2004). این گونه از جمله گونه‌هایی است که چرخه رویشی خود را در محیط‌های با شوری بالا تکمیل و توانایی انباشتن عناصر ریزمغذی را بیش از آنچه که نیاز است دارا می‌باشد (Benlloch-Gonzalez 2005).

جهت تهیه کریا (کربنات سدیم)، شاخه‌های گیاه را در فاصل پاییز قطع نموده و جمع‌آوری و خشک می‌نمایند. پس از آتش زدن شاخه‌ها در اتاقکی حوضچه مانند، ماده مذابی به نام کریا تولید می‌گردد که پس از سرد شدن به صورت جامد در می‌آید. کریا بیشتر در صنعت جهت تهیه سود سوزآور، استفاده در صنایع صابون‌سازی و پودرهای شوینده، شیشه‌سازی و رنگرزی، کاشی و سرامیک سازی، تثبیت‌کننده رنگ، پالایش نفت و عکاسی و نیز به عنوان یک ماده اولیه در تهیه بعضی از داروهای شیمیایی سدیم‌دار مورد مصرف قرار می‌گیرد. گرچه اشنان گیاه شورپسندی است ولی افزایش بیش از حد نمک از رشد آن جلوگیری می‌نماید، به طوری که در مناطق کویری که میزان املاح خیلی زیاد است، دامنه پراکنش گیاه فقط به آبراهه‌هایی محدود می‌شود که به وسیله سیلاب‌های هرساله خودشوری خاک را تا حدی کاهش می‌دهند (Azimi *et al.* 1992).

بخش‌های بزرگی از کشور ایران دارای خاک‌های شور است که تنها برخی گیاهان خاص قادر به رشد در آن شرایط هستند. گیاه اشنان یکی از معدود گیاهانی است که حتی در حاشیه دریاچه‌های آب شور که در آن‌ها نمک به صورت کریستالیزه دیده می‌شود، رویش می‌یابد (Iranbakhsh *et al.* 2008). همچنین، تأثیر شوری بر جوانه‌زنی بذر گیاه اشنان بررسی و مشخص شد که بذر این گیاه می‌تواند نمک‌های KNO3، KCL، NaCL را تا غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار تحمل نماید (Hadi *et al.* 2007). در مورد بذر این گیاه می‌توان گفت که بهترین روش تکثیر گیاه از طریق بذر است (Ghahraman 1994). بالا بودن سطح ایستایی آب‌های زیرزمینی و شوری سطح خاک، دو ویژگی مهم در گسترش این گونه است، به طوری که در منابع مختلف از این گونه به عنوان شاخص خاک و پوشش گیاهی مناطق بیابانی نام برده شده است (Boer & Sargeant 1998). ویژگی‌های تشریحی، فیزیکی و شیمیایی چوب درختچه اشنان نیز مورد مطالعه و بررسی دقیق قرار گرفته است (Safdari 2011). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از جمله ویژگی‌های تشریحی قابل توجه چوب گیاه اشنان را می‌توان در وجود "فلوئم‌های داخل بافت چوبی"، عدم وجود اشعه چوبی، نامشخص بودن دوایر رویشی، وجود صمغ فراوان در

آوندهای بخش چوب درون، تجمع یا به عبارتی گروهی شدن بیش از اندازه آوندها و همچنین ضخامت غیرعادی اجزای سلولی و لیگنینی شدن دیواره‌های پارانشیم طولی دانست که از این جهت به گونه‌های چوبی هم‌تیره خود یعنی سالسولا (*Haloxylon* spp.)، تاغ (*Salsola* spp.) و به ویژه *Atriplex* spp. شبیه است (Fahn *et al.* 1986, Neumann *et al.* 2001).

هدف از تحقیق حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه اشنان در برخی از مناطق ایران با استفاده از روش مولکولی (RAPD) و دقت و تشابه این روش در تفکیک جمعیت‌های این گونه بوده است.

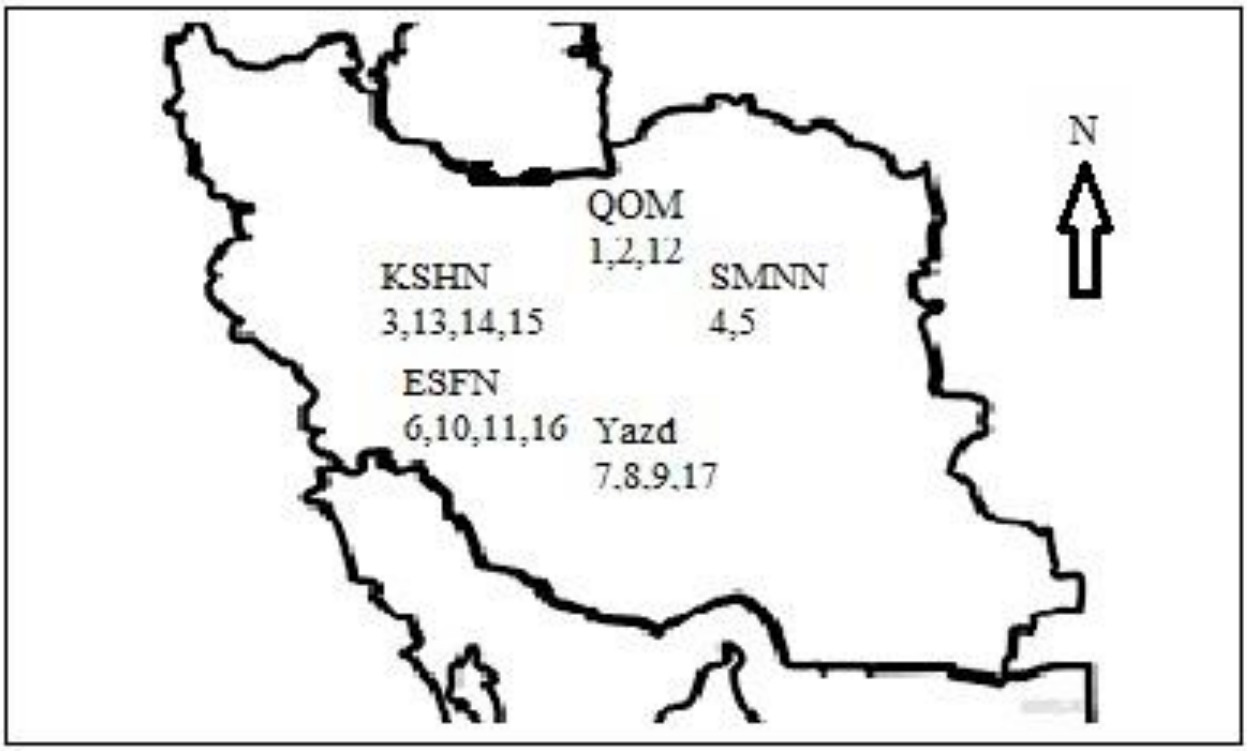
روش بررسی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، شامل ۸۵ نمونه گیاهی از ۱۷ جمعیت مورد استفاده بود. نام، علامت اختصاری و محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در جدول شماره ۱ ارایه شده است. در فصل بهار، نمونه‌های گیاه اشنان جمع‌آوری و در آزمایشگاه مجموعه گیاهان دانشگاه واحد علوم تحقیقات شناسایی شدند. استخراج DNA ژنومی کامل از برگ‌های خشک شده روی سیلیکاژل از ۸۵ نمونه گیاه اشنان (*S. rosmarinus*) به کمک کیت استخراج Zoofast Extract و DNeasy Plant Mini Kit- QIAGEN انجام شد. قبل از PCR، آماده‌سازی پرایمرها انجام شد (جدول ۲). هر مخلوط واکنش PCR شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱X بود. چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت-سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در گام بعد، ۳۵ چرخه به صورت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، ۳۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوسی به مدت ۵ دقیقه برای تکمیل بسط انجام شد. به منظور اطمینان از وجود DNA تکثیر شده، پس از انجام PCR به منظور مشاهده فرآورده‌های حاصل از آن یعنی بخشی از DNA تکثیر یافته، از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد استفاده گردید (Sambrook & Russell 2001). پس از پایان الکتروفورز، ژل حاوی محصولات PCR به دستگاه مخصوص عکس‌برداری (Labnet) منتقل و تحت اشعه UV قرار گرفت تا تک‌باندهای قطعات DNA قابل رویت شوند. محصولات PCR جهت تعیین توالی به کشور آلمان فرستاده شد. کروماتوگراف‌های حاصل از تعیین توالی DNA، با استفاده از نرم‌افزار Sequencher ویرایش و سپس با استفاده از Mac Clade و Mesquite (Ver. 2.74)، هم‌ردیف‌سازی (alignment) شدند (Maddison & Maddison 2002). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک با کمک نرم‌افزار GenAlex (Ver. 6.41)، برای تفسیر داده‌های آنالیز RAPD از نرم‌افزار NTSYS (Ver. 2.02) استفاده شد. ماتریس تشابه ایجاد شده توسط نرم‌افزار Excel در نرم‌افزار NTSYS با روش UPGMA با استفاده از مدل خوشه‌بندی SAHN به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور تفکیک واریانس مولکولی کل به واریانس ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها با کمک نرم‌افزار مذکور (GenAlex Ver. 6.41) انجام شد.

جدول ۱- محل جمعیت‌های گیاه اشنان جمع‌آوری شده از ایران

Table 1. Location of collected populations of *Seidlitzia rosmarinus* in Iran

Code	Code of population	Voucher No.	Collector	Site of sampling	No. of sample	Population
P01	PIF	IAUH 14042	Sh. Sedighi	Qom	1–5	1
P02	PFIF	IAUH 14043	"	Qom	6–10	2
P03	PFO	IAUH 14039	"	Kashan	11–15	3
P04	PON	IAUH 14037	"	Semnan	16–20	4
P05	PTW	IAUH 14038	"	Semnan	21–25	5
P06	PTE	IAUH 14034	"	Isfahan	26–30	6
P07	PTH	IAUH 14032	"	Yazd	31–35	7
P08	PTOU	IAUH 14033	"	Yazd	36–40	8
P09	PTR	IAUH 14028	"	Yazd	41–45	9
P10	PTEN	IAUH 14029	"	Esfahan	46–50	10
P11	PELE	IAUH 14030	"	Esfahan	51–55	11
P12	PSIX	IAUH 14044	"	Qom	56–60	12
P13	PSII	IAUH 14040	"	Kashan	61–65	13
P14	PSEV	IAUH 14041	"	Kashan	66–70	14
P15	PSE	IAUH 14036	"	Kashan	71–75	15
P16	PEI	IAUH 14035	"	Esfahan	76–80	16
P17	PNIN	IAUH 14031	"	Yazd	81–85	17



شکل ۱- نقشه پراکنش جمعیت‌های گیاه اشنان در ایران.

Fig. 1. Distribution of *Seidlitzia rosmarinus* populations in Iran.

جدول ۲- پرایمرهای RAPD مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 2. RAPD primers used in the present study

No.	Primer	Sequence
1	OPQ-20	5'- TCGCCCAGTC -3'
2	OPS-07	5'- TCCGATGCTG -3'
3	OPP-01	5'- GTAGCACTCC -3'
4	OPM-06	5'- CTGGGCAACT -3'
5	OPN-05	5'- ACTGAACGCC -3'

نتیجه و بحث

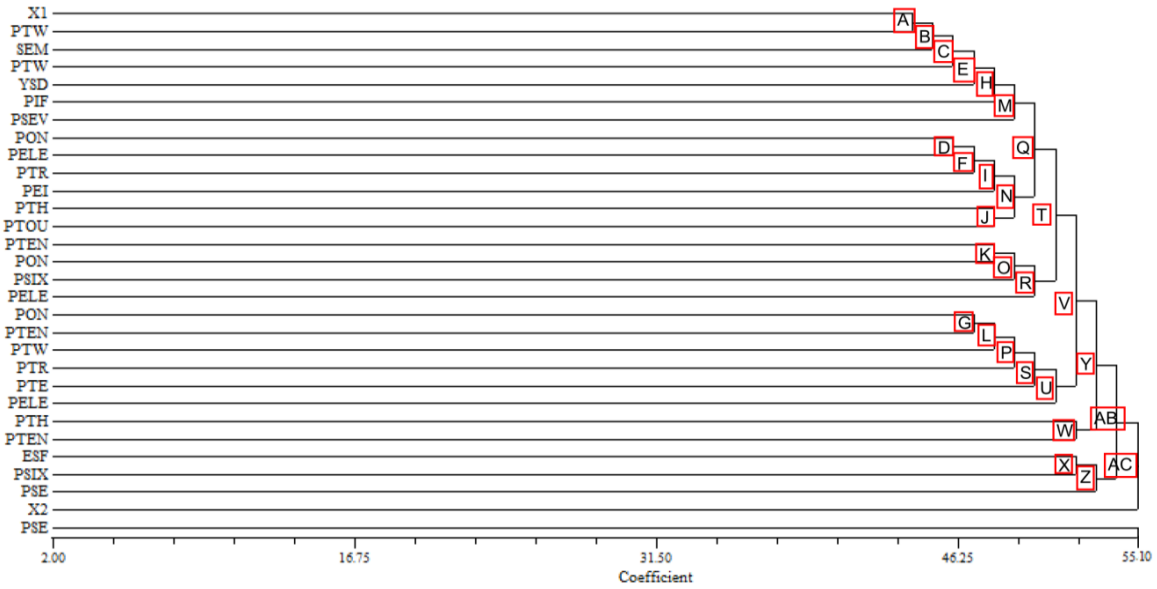
برای تفسیر داده‌های آنالیز RAPD از نرم‌افزار NTSYS (Ver. 2.02) استفاده شد. به این ترتیب ماتریس تشابه ایجاد شده توسط نرم‌افزار Excel در نرم‌افزار NTSYS با روش UPGMA با استفاده از مدل خوشه‌بندی SAHN به دست آمد. به منظور اندازه‌گیری و تعیین فواصل ژنتیکی، دوری یا نزدیکی، خویشاوندی یا عدم خویشاوندی نمونه‌های گیاهی موجود در یک کلکسیون، از روش دسته‌بندی خوشه‌ای استفاده شد.

برای مقایسه مقادیر ماتریس UPGMA از ضریب همبستگی کوفنتیک (Cophenetic correlation) استفاده شد. برای این ضرایب، هرچه فاصله ژنتیکی بین دو دسته از کلاسترها بیشتر بود، نمونه‌هایی که در آن دو دسته قرار داشتند، از هم دورتر قرار می‌گرفتند. این نشانگر مولکولی در شناسایی نواحی چندشکلی (پلی‌مورفیسم) و تخمین فاصله ژنتیکی مفید بود. بیشترین شباهت در ضریب برابر ۴۴ مربوط به افراد X1 و PTW (جمعیت شماره ۵ از سمنان) بود که در نقطه A به هم پیوستند. در نقطه B دو فرد از جمعیت سمنان (PTW) با ضریب کوفنتیک ۴۵/۳۵ در کنار یکدیگر قرار گرفتند. در نقطه‌ای که ضریب برابر با ۴۶/۲۵ بود، دو گروه تشکیل شد: ۱) محل اتصال یکی از افراد جمعیت شماره ۵ سمنان (PTW) به نقطه A (نقطه C) و ۲) نقطه D، محل اتصال دو جمعیت شماره ۴ (PON) و ۱۱ (PELE) به ترتیب از سمنان و اصفهان بودند. در ضریب کوفنتیک برابر با ۴۷/۵ سه گروه تشکیل شد: ۱) نقطه E که محل اتصال جمعیت YSD به نقطه C بود، ۲) نقطه F محل اتصال شاخه مربوط به جمعیت ۹ یزد (PTR) به نقطه D و ۳) در نقطه G با ضریب ۴۵/۵ شاخه‌های مربوط به دو جمعیت شماره ۴ (PON) و ۱۱ (PELE) به ترتیب از سمنان و اصفهان به یکدیگر متصل شدند؛ درست مانند نقطه D. در ضریب برابر با ۴۸/۵ پنج گروه تشکیل شد: ۱) نقطه H که محل اتصال جمعیت شماره ۱ قم (کاشان) با کد PIF به نقطه ۲ بود، ۲) نقطه I که محل تلاقی جمعیت شماره ۱۶ اصفهان (PEI) به نقطه F دربرگیرنده جمعیت‌های یزد، اصفهان و سمنان بود، ۳) در نقطه J دو جمعیت شماره ۷ (PTH) و ۸ (PTOU) هر دو از یزد با یکدیگر تشکیل شاخه دادند، ۴) نقطه K محل تلاقی دو جمعیت ۱۰ اصفهان (PTEN)، ۴ سمنان (PON) بود که ارتباط نزدیک بین جمعیت‌های سمنان و اصفهان مانند نقاط D و F را نشان داد و ۵) نقطه L محل اتصال یک فرد از جمعیت ۵ سمنان (PTW) به نقطه G بود که ارتباط بین جمعیت‌های سمنان و اصفهان را نشان داد. در ضریب کوفنتیک برابر با ۴۹، چهار گروه تشکیل شد: ۱) نقطه M محل اتصال جمعیت ۱۴ کاشان (PSEV) با نقطه H که دربر گیرنده جمعیت‌های قم (کاشان) و سمنان بود، ۲) نقطه N محل اتصال شاخه‌های I و J که ۳ جمعیت از یزد، ۲ جمعیت از اصفهان و یک جمعیت از سمنان در این نقطه به هم متصل شدند، ۳) جمعیت شماره ۱۲ قم (کاشان) با کد (PSIX) در محل نقطه O به نقطه K متصل شد. نقطه K دارای جمعیت‌هایی از اصفهان و سمنان بود که به وفور در این کلادوگرام، نزدیکی و قرابت جمعیت‌های سمنان و اصفهان تایید شد و ۴) در نقطه P جمعیت ۹ یزد (PTR) به نقطه L که ۲ جمعیت از سمنان و یک جمعیت از اصفهان را شامل می‌شد، متصل گردید. شاخه‌های متعددی به همین ترتیب تولید شدند (از M الی AC). جمعیت شماره ۱۵ کاشان (PSE) با بیشترین فاصله، به عنوان گروه خواهری سایر جمعیت‌های موجود در مطالعه حاضر در نظر گرفته شد (نقطه AC).

به دلیل ماهیت نشانگرهای RAPD، فقط وجود یا فقدان یک باند خاص قابل ارزیابی بود. معیارهای انتخاب امتیاز باندها عبارتند بودند از: ۱) تکرارپذیری (نیاز به تکرار آزمایش‌ها)، ۲) ضخامت، ۳) اندازه و ۴) تفکیک پیش‌بینی شده در یک جمعیت مورد بررسی.

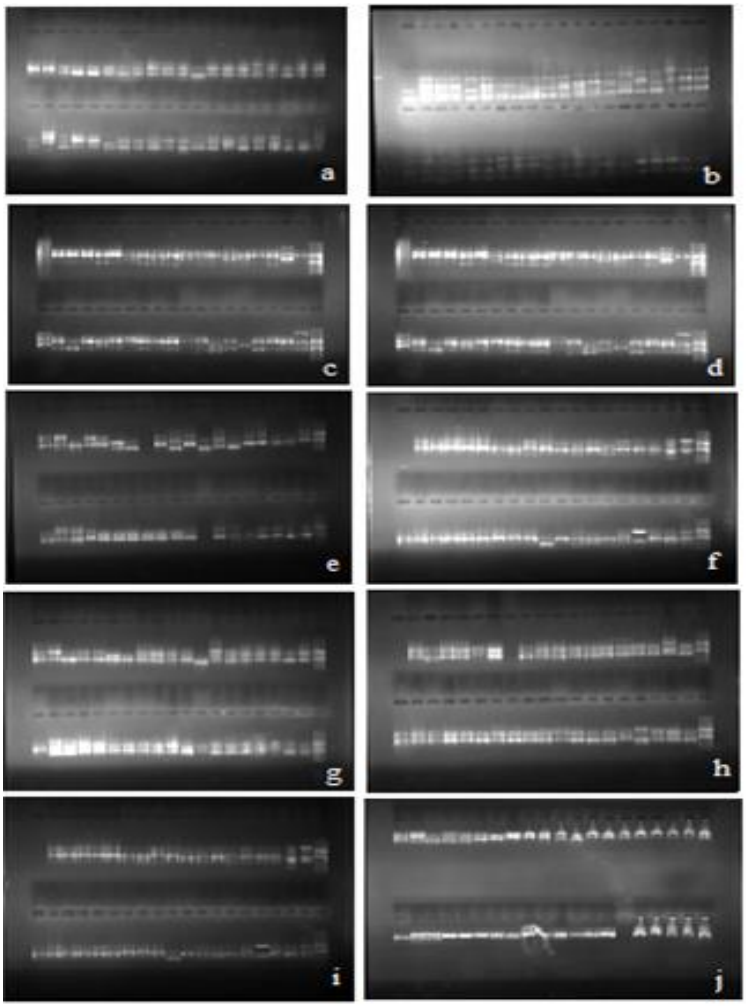
- بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گونه اشنان

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور تفکیک واریانس مولکولی کل به واریانس ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها با کمک نرم‌افزار GenAlex (Ver. 6.41) انجام شد. از مجموع ۸۵ فرد متعلق به ۱۷ جمعیت (دریاچه حوض سلطان، سمنان-گرمسار، یزد-مروست، آران و بیدگل، اصفهان و قم) به منظور برآورد تنوع ژنتیکی انجام گرفت. تعدادی از داده‌ها به دلیل عدم کیفیت یا عدم جواب‌دهی از مجموع کل نمونه‌ها کسر شد. نتایج نشان داد که از مجموع کل تنوع، بیشترین میزان، یعنی ۶۹٪ آن مربوط به تنوع درون جمعیتی و ۳۱٪ مربوط به تنوع بین‌جمعیتی می باشد.



شکل ۲- کلادوگرام به دست آمده از آنالیز RAPD برای جمعیت‌های گیاه اشنان براساس ماتریس تشابه به روش UPGMA.

Fig. 2. The obtained cladogram by RAPD data for *Seidlitzia rosmarinus* populations according to similarity matrix based on UPGMA clustering method.



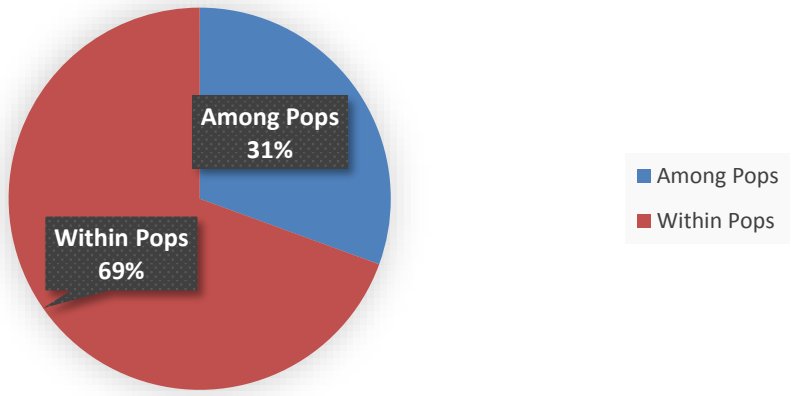
شکل ۳- باندهای تشکیل شده از پرایمرهای اختصاصی (a-j).

Fig. 3. The recorded bands following application of specific primers (a-j).

جدول ۳- نتایج آزمون AMOVA (آنالیز واریانس مولکولی) تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاه اشنان

Table 3. Genetic variation based on molecular analysis in *Seidlitzia rosmarinus* populations

Source of variation	Df	Sum of square	MS	Estimation variance	%
Among populations	3	250.083	85.361	8.803	31
Within populations	20	1338.000	66.900	5.915	69
Total	23	159.083	152.261	14.553	100



شکل ۴- درصد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus*: درون جمعیت‌ها (قرمز با ۶۹٪) و بین جمعیت‌ها (آبی با ۳۱٪).

Fig. 4. The genetic diversity percentages among *Seidlitzia rosmarinus* populations: Within populations (red with 69%) and among populations (blue with 31%).

مارتینوس و همکاران (Martins *et al.* 2003) از مارکرهای ISSR و RAPD به منظور آنالیز تنوع ژنتیکی ارقام پرتغالی بادام (*Prunus dulcis*) و بررسی ارتباط آن‌ها با ارقام خارجی استفاده کردند. آن‌ها به ترتیب از ۱۸ و ۶۰ پرایمر برای ISSR و RAPD استفاده کردند که پنج پرایمر ISSR و شش پرایمر RAPD تکرارپذیری و چندشکلی (پلی‌مورفیسم) بالایی را نشان دادند. از میان ۱۲۴ قطعه‌ای که PCR شدند، ۱۲۰ قطعه (۹۶/۸٪) چندشکلی بودند. استفاده از این مارکرها به خوبی توانست همه نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق را از یکدیگر متمایز سازد. در مطالعه حاضر، تفکیک روی تمام نمونه‌های مورد بررسی به دست نیامد و علت این اختلاف می‌تواند به این دلیل باشد که همه نمونه‌ها که در تحقیق حاضر از ایران جمع‌آوری شدند با یکدیگر قرابت داشتند، در صورتی که در مطالعه مارتینوس و همکاران (۲۰۰۳) نمونه‌ها از کشورهای مختلف (پرتغال، اسپانیا، فرانسه، ایتالیا و آمریکا) جمع‌آوری شدند که بعد فاصله میان نمونه‌ها می‌تواند منجر به تغییرات ژنتیکی در آن‌ها شده باشد و در نهایت درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز آن‌ها، تفکیک بهتری را نشان دهد. فرناندز و همکاران (Fernandez *et al.* 2002) برای تشخیص پلی‌مورفیسم، شناسایی ژنوتیپ‌ها، تعیین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک ۱۶ رقم جو از کشورهای مختلف که منشا همه آن‌ها شناخته شده بود، از ۳۵۳ نشانگر PCR (۱۲۵ نشانگر RAPD و ۲۲۸ نشانگر ISSR) استفاده کردند. بنابراین، تجزیه و تحلیل با استفاده از نشانگرهای PCR مربوط به RAPD و ISSR، یک سیستم سریع، قابل اعتماد و بسیار موثر برای اثر انگشت DNA را فراهم می‌کند که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج به دست آمده از نشانگر ISSR دقت بیشتری داشته و روابط بین جمعیت‌ها را با شفافیت بهتری نشان داد. به عبارت دیگر، توانایی ظاهری نشانگرهای ISSR برای آشکار کردن سطوح بالاتر پلی‌مورفیسم، به جای تقویت باندهای چندشکلی بیشتر است (Godwin *et al.* 1997). دقت و درصد تشابه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر براساس روش RAPD در مقایسه با روش ISSR کمتر بود و برای جمعیت‌های گیاه اشنان در روش ISSR نتیجه بهتری نشان داد. البته در کلادوگرام حاصل از مطالعه حاضر، روابط و قرابت برخی جمعیت‌ها با کلادوگرام حاصل از روش ISSR مشابه بوده و یکدیگر را تایید می‌کنند (Iranbakhsh *et al.* 2021). همچنین، در مطالعه بررسی ویژگی‌های مولکولی ژنوتیپ‌های *Arthrocnemum macrostachyum* (*Chenopodiaceae*) رشد یافته در سواحل غربی سوریه با استفاده از تکنیک‌های RAPD و ISSR که توسط صالح (Saleh 2011) انجام شده است، نتایج به دست آمده از مارکر ISSR در مقایسه با مارکر RAPD از درجه اطمینان بالاتری برخوردار و کارآمدتر بود.

References

Al-Khateeb, S.A. & Leilah. A.A. 2005. Heavy metals accumulation in the natural vegetation of eastern province of Saudi Arabia. Journal of Biological Sciences 5(6): 707–712.

Azimi, S., Sarafraz, K., Kebriaei, M., Eghbali, D. & Borhani, M. 1992. *Seidlitzia rosmarinus* exploitation plan, Afzal Ardakan area, General Department of Natural Resources of Yazd province, Iran.

Baghestani Maybodi, N. 1996. The effect of pruning on growth and development of *Seidlitzia rosmarinus* and the best usage of its annual production. Tehran: Research Institute of Forest and Rangelands.

Benlloch-Gonzalez, M., Fournier, J.M., Ramos, J. & Benlloch, M. 2005. Strategies underlying salt tolerance in halophytes are present in *Cynara cardunculus*. Journal of Plant Sciences 168: 653–659.

Boer, B. & Sargeant, D. 1998. Desert Perennials as soil indicators in Eastern Arabia. Plant and Soil 199: 261–266.

Boissier, E. 1879. *Chenopodium* L. Pp. 900–905. *In*: Flora Orientalis Vol. 4, Geneva.

Fahn, A., Werker, E. & Baas, P. 1986. Wood Anatomy and Identification of Trees and Shrubs from Israel and Adjacent Regions. The Israel Academy of Sciences and Humanities. 214 pp.

Fernandez, M., Figueiras, A. & Benito, C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics 104(5): 845–851.

Ghahreman, A. 1994. Chromophytes of Iran, Tehran University Publishing, Vol. 1 (In Persian).

Godwin, I.D., Aitken, E.A. & Smith, L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18(9): 1524–1528.

Hadi, M.R., Taheri, R. & Sharif, M.S. 2007. Study effects of salinity on the seed germination of *Seidlitzia rosmarinus*. Pajouhesh-va-Sazandegi 67: 151–157 (In Persian with English abstract).

Hedge, I.C., Akhani, H., Freitag, H., Kother-Heinrich, G., Podlech, D., Rilke, S. & Uotila, P. 1997. Chenopodiaceae *In*: Rechinger, K.H. (ed.), Flora Iranica, Lfg. 172. Akad. Druck-und Verlagsanstalt, Graz.

Hulce, D., Li, X. & Snyder-Leiby, T. 2011. Gene Marker Genotyping Software: Tools to Increase the statistical power of DNA fragment Analysis. Journal of Biomolecular Techniques 22: 35–36.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. Mr-Bayes: Bayesian Inference of Phylogeny Bioinformatic17: 754–755.

Iranbakhsh, A.R., Hamdi, S.M.M. & Assadi, M. 2008. Flora, life form and chorotypes of plants of Garmsar region in Semnan province. Pajouhesh-va-Sazandegi 21(2): 179–199 (In Persian with English abstract).

Iranbakhsh, A.R., Sedighi, SH., Hamdi, S.M.M. & Mehregan, I. 2021. Investigation of phylogenetic relationships and genetic diversity of *Seidlitzia rosmarinus* populations by ISSR marker in some regions of Iran. Rostaniha 22(1): 20–29 (In Persian with English summary).

Khavazeh, M. 1999. Effect of salinity on germination, growth and Cl and Na content of four arid and desert species. MSc Thesis. Isfahan University of Technology, Iran.

Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2002. MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Ver. 4.01. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Martins, M., Tenreiro, R. & Oliveira, M.M. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond

cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 22(1): 71–78.

Neumann, K., Schoch, W., Schweingruber, F.H. & Détienn, P. 2001. Woods of the Sahara and the Sahel- An Anatomical Atlas. Paul Haupt, Bern.

Sabeti, H. 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. University of Yazd Press, Yazd, Iran (In Persian).

Safdari, V. 2012. Anatomical, physical and chemical properties of *Seidlitzia rosmarinus* Bunge ex Boiss wood in Irano-Torani region. Iranian Journal of Wood and Paper Science Research 27(2): 212–225 (In Persian).

Saleh, B. 2011. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Arthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 54(5): 859–866.

Salimath, S.S., Oliveira, A.C.D., Bennetzen, J.L. & Godwin, I.D. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. Genome 38(4): 757–763.

Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Swofford, D.L. 2002. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), Ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Yasseen, B.T. & Al-Thani, R.F. 2007. Halophytes and associated properties of natural soils in the doha area, Qatar. Aquatic Ecosystem Health and Management Society 10(3): 320–326.