

DOI: 10.22092/BOTANY.2021.351400.1213

بررسی روابط فیلوژنی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus* با استفاده از نشانگر ISSR

در برخی مناطق ایران*

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰ / پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷

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

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

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

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

چکیده

جنس *Seidlitzia* دارای چهار گونه در ایران است. گونه *S. rosmarinus* به شکل درختچه‌ای و سه گونه دیگر علفی هستند. هدف از این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ۸۵ نمونه گیاهی ۱۷ جمعیت گونه *S. rosmarinus* و پی بردن به شناسایی احتمالی فرم‌های تاکسونومیک پایین‌تر از سطح گونه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بود. از ۱۶ پرایمر عمومی و چهار پرایمر اختصاصی استفاده شد که در مجموع ۲۲۱ باند ایجاد کردند. دندروگرام داده‌های ISSR مربوط به ۱۷ جمعیت براساس ماتریس تشابه به روش UPGMA و ضریب تشابه Dice از ۰/۴۰ تا ۰/۹۶ متغیر بود. براساس آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، بیشترین تنوع (۶۸٪) تنوع درون جمعیتی، ۲۸٪ تنوع بین جمعیتی و ۴٪ مربوط به تنوع بین مناطق بود. آنالیز MCMC به منظور بررسی ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های گونه *S. rosmarinus* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، آنالیز مختصات اصلی به روش PCOA براساس محور مختصات اصلی اول و دوم برای نشانگر ISSR انجام شد که این روش به عنوان روش مکمل برای تجزیه خوشه‌ای با هدف استفاده بهینه و استخراج حداکثری اطلاعات از داده‌های مولکولی ارایه شد. نتایج به دست آمده از نشانگر ISSR از درجه اطمینان بالایی برخوردار بود. نتایج به دست آمده با استفاده از نشانگر ISSR نشان داد که نسبت به سایر نشانگرها دقت بیشتری داشته و روابط بین جمعیت‌ها را با وضوح بهتری نمایان ساخت. از طرفی، فرم‌های تاکسونومیک احتمالی پایین‌تر از سطح گونه با توجه به اختلافات کم بین جمعیت‌ها مشاهده نشد.

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

Investigation of phylogenetic relationships and genetic diversity of *Seidlitzia rosmarinus* populations by ISSR marker in some regions of Iran

Received: 08.02.2021 / Accepted: 07.06.2021

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 Mahdi 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 *Seidlitzia* has four herbaceous species viz. *S. florida* (M.B.) Bge. ex Boiss., *S. cinerea* (Moq.) Bge. ex Botsch., and *S. stokii* that are herbaceous, and *S. rosmarinus* (Ehrenb.) Bge. ex Boiss. is shrubby belong to the family *Amaranthaceae*. In the present study, ISSR molecular markers were used to evaluate the genetic diversity among 85 plant samples from 17 populations of *S. rosmarinus*. Four random primers were used to perform ISSR reactions and in total 221 DNA bands were obtained. After forming 0 and 1 matrix with the help of GenAlex and NTSYS software, it was used to interpret ISSR analysis data. Molecular analysis of variance (AMOVA) was performed to estimate genetic diversity out of 85 individuals. Of total diversity, the highest amount of genetic diversity (68%) was related to intra-population diversity, 28% of inter-population diversity, and 4% of inter areas was calculated. MCMC analysis using Structure 2.3.4 software was used to investigate the genetic diversity populations of *S. rosmarinus*. Main coordinates analysis by the PCOA method was also used for extract maximum information from molecular data.

Keywords: *Amaranthaceae*, cluster analysis, molecular analysis of variance, UPGMA method

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

مقدمه

با انشعابات زیاد است و در برابر خشکی و محدوده دمایی گسترده از چندین درجه زیر صفر تا بیش از ۴۰ درجه سلسیوس بالای صفر مقاوم است (Hadi 2009). *S. rosmarinus* هالوفیت چندساله‌ای است که در مناطق بیابانی تا نیمه‌بیابانی آسیای میانه و غرب آسیا انتشار دارد (Bhaat et al. 2019). گونه مذکور در خاک‌های با میزان شوری بالا مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهد. *S. rosmarinus* گیاهی هالوفیت بوده که برخی آن را هالوفیت‌های اختیاری (Latifi 1998) و برخی هالوفیت اجباری (Khavazeh 1999) می‌دانند. مقاومت به شوری در این گیاه از نوع بردباری بوده و املاح موجود در خاک را جذب و در اندام‌های هوایی به ویژه در برگ‌های خود ذخیره می‌کند و به این وسیله با فشار اسمزی بالا می‌تواند آب مورد نیاز خود را جذب کند. لذا، بالا بودن سفره آب زیرزمینی و شوری خاک دو ویژگی بارز اراضی مساعد برای گسترش این گونه است (Baghestani & Mybodi 1996). تاثیر شوری بر جوانه‌زنی بذر این گونه بررسی شده و مشخص شد که بذر گونه *S. rosmarinus* می‌تواند نمک‌های KNO₃، KCL، NaCL را تا غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار تحمل نماید. در خاک‌های شور، بذر گیاه از نظر جذب آب و اثرات سمی غلظت بالای نمک‌ها با استرس روبرو می‌گردد (Hayder et al. 1972). بهترین روش تکثیر گیاه از طریق بذر آن می‌باشد (Hadi et al. 2007).

زمان گل‌دهی: از اوایل تا اواسط پاییز

پراکنش جغرافیایی: ایران، فلسطین، اردن، سوریه، عراق، عربستان سعودی، کویت، بحرین، عمان، امارات متحده عربی، قطر، افغانستان و آسیای مرکزی (Mozaffarian 2004).

هدف از تحقیق حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ۱۷ جمعیت از جمعیت‌های *S. rosmarinus* (اشنان) جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و پی بردن به شناسایی احتمالی فرم‌های تاکسونومیکی احتمالی پایین‌تر از سطح گونه است.

روش بررسی

- جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

در بهار سال ۱۳۹۷، ۸۵ نمونه گیاهی از ۱۷ جمعیت از نقاط مختلف کشور توسط نگارنده نخست جمع‌آوری شدند. پس از شناسایی با استفاده از فلور ایران (Assadi 2000) و ثبت کد هرباریومی، نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات (IAUH) قرار داده شدند. نام، علامت اختصاری و محل جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول ۱ ارایه شده است.

جنس *Seidlitzia* دارای چهار گونه شامل *S. stocksii* (Boiss.) Assadi، *S. cinerea* (Moq.) Bge. ex Botsch.، *S. floridana* (M.B.) Bge. ex Boiss. (Ehrenb.) Bge. ex و *S. rosmarinus* (Boiss.) Assadi از تیره تاج‌خروسیان (*Amaranthaceae*) (APG IV 2016) در ایران است که گونه *S. rosmarinus* درختچه‌ای و سه گونه دیگر، علفی هستند. گونه اشنان (*S. rosmarinus*) در غرب و مرکز ایران انتشار دارد (Iranbakhsh et al. 2008, Assadi 2001) و یکی از گیاهان مقاوم جوامع شورپسند در ایران است که در نواحی خشک، نیمه‌خشک، بیابانی، شور و لب‌شور یافت می‌شود (Hedge 1997). این گونه که نخستین بار توسط بواسیه (Boissier 1879) معرفی شد، پراکنش وسیعی در آسیای جنوب غربی دارد و تنوع ریخت‌شناختی گسترده‌ای را نشان می‌دهد (Hedge 1997).

S. rosmarinus درختچه‌ای به بلندی ۱/۵ تا ۲ متر، از پایین منشعب، با انشعابات متقابل و به رنگ سفید شیری، به استثنای محور برگ‌ها که دارای کرک بلند است، بقیه گیاه کم و بیش فاقد پوشش کرکی می‌باشد. برگ‌ها به طول ۵ تا ۳۴ میلی‌متر، گوشتی، استوانه‌ای یا استوانه‌ای گریزی، در قاعده و در انتها ضخیم‌تر، بدون نیشت انتهای، کم و بیش افقی که محتوی املاح فراوان می‌باشد. گل‌ها غالباً ۳ عدد، در محور برگ‌های بالایی، برگه‌ها شامل ۲ عدد جانبی و تعدادی برگک کوچک‌تر، به طول تقریباً برابر گلپوش. گلپوش‌ها به طول حدود ۱/۶ میلی‌متر در مرحله گل، در مرحله میوه کمی بزرگتر، دایره‌ای-واژتخم‌مرغی، نوک فرورفته، در مرحله میوه همگی بالدار. میوه‌ها ۵ باله‌ای، قطر میوه با بال ۸ تا ۱۲ میلی‌متر. باله‌ها به رنگ‌های زرد و تا نارنجی و یا ارغوانی. (Mozaffarian 2004)

این گونه گیاهی هالوفیت بوده و نقش مهمی در حفاظت و نگهداری خاک ایفا می‌نماید. در جنگ جهانی دوم، از این گیاه فرآورده‌ای به نام "شقار" به دست می‌آمد که به جای صابون در شست و شوی البسه به کار می‌رفته است (Karimi et al. 2012). فاکتورهای خاک شامل شوری، تغییرات ظرفیت کاتیونی، رس، سیات، شن، یون‌های کلسیم، منیزیم و سدیم، گچی بودن خاک، رسوبات آهکی شامل کربنات‌ها و بی‌کربنات‌ها، سولفات‌ها و سطح آب در تثبیت و انتشار جمعیت گونه‌های *S. rosmarinus* نقش داشته و فاکتورهای موثری روی اختلاف جوامع این گونه محسوب می‌شوند. خاک این مناطق عموماً رسی و لومی بوده، EC و میزان شوری این خاک‌ها بالا است (Mousavi Kouhi et al. 2019). این گونه، دارای بوته‌ای پربرگ

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 شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل حاوی محصولات PCR به دستگاه عکس‌برداری (Labnet) منتقل شده و تحت اشعه UV قرار گرفته و تک باندهای قطعات DNA قابل رویت شدند. در ابتدا، ۱۶ پرایمر عمومی مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت، چهار پرایمر اختصاصی برای روش ISSR استفاده گردید (جدول ۳).

محصولات PCR جهت تعیین توالی به کشور آلمان فرستاده شدند. 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 به کمک نرم‌افزار (Ver. 6.41) GenAlex، برای تفسیر داده‌های آنالیز ISSR، از نرم‌افزار AMOVA استفاده شد.

ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی با استفاده از نرم‌افزار PAUP 4.0 سوفورد (Swofford 2002) و نیز با روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.12 با روش هولسنبک و رانکوویست (Huelsenbeck & Ronquist 2001) آنالیز شدند.

- مطالعات مولکولی نمونه‌ها

استخراج DNA ژنومی کامل از برگ‌های خشک شده روی سیلیکاژل از ۸۵ نمونه *S. rosmarinus* به کمک کیت استخراج DNeasy Plant Mini Kit- و Zoofast Extract و QIAGEN انجام شد. قبل از انجام PCR، آماده‌سازی پرایمرها براساس جدول ۲ صورت گرفت. 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 واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در گام بعد، ۳۵ چرخه به ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، ۳۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و در نهایت، یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس 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 ۱٪ استفاده گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل حاوی محصولات PCR به دستگاه عکس‌برداری (Labnet) منتقل و تحت اشعه UV، باندهای قطعات DNA قابل رویت شدند.

جدول ۱- فهرست جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus* جمع‌آوری شده از ایران

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

Code	Code of population	Herbarium name	Herbarium code	Collector	Site of sampling	No. of sample	Population
P01	PIF	IAUH	14042	Shima 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

جدول ۲- پرایمرهای عمومی مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 2. General primers used in the present study

Sequence (5' 3')	Scale (OD)	Purification	Number of nucleotide	No.
(GACA)4	4	MOPC	16	1
(AG)8T	4	MOPC	17	2
(AC)8YT	4	MOPC	18	3
(CA)8RG	4	MOPC	18	4
(ATG)6	4	MOPC	18	5
(CTC)6	4	MOPC	18	6
(GA)8YT	4	MOPC	18	7
(AG)8G	4	MOPC	17	8
(AG)8C	4	MOPC	17	9
(GA)8T	4	MOPC	17	10
(AC)8T	4	MOPC	17	11
(CAG)5	4	MOPC	15	12
(CAA)5	4	MOPC	15	13
(CA)6GC	4	MOPC	14	14
(CT)8AC	4	MOPC	18	15
(CT)8TG	4	MOPC	18	16

جدول ۳- پرایمرهای اختصاصی به کار رفته در ISSR

Table 3. The applied ISSR exclusive primers

Sequence	Primer	No.
5'-CAACAACAACAACA-3'	ISSR 1 6FAM	1
5'-AGAGAGAGAAGAGT-3'	ISSR2 NED	2
5'-ACACACACACACACT-3'	ISSR 3 PET	3
5'-CACACACACACAGC-3'	ISSR 4 VIC	4

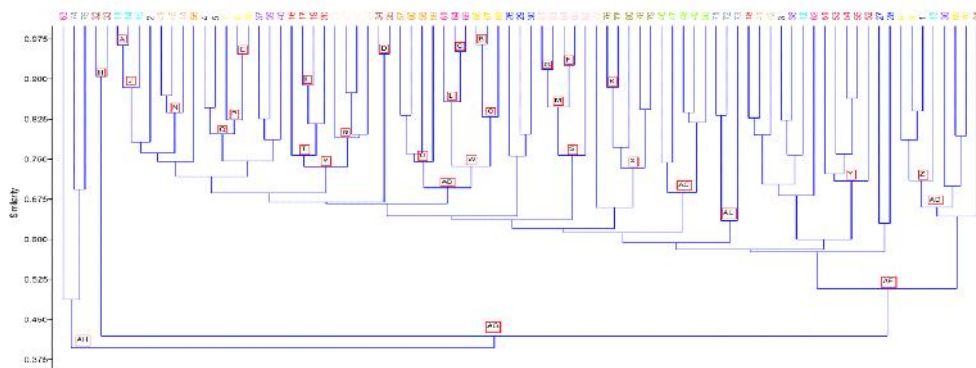
نتیجه

قرار گرفتند. افراد شماره ۳۲ و ۳۳ که به جمعیت شماره ۷ (یزد) با کد PTH) تعلق دارند، در نقطه H با فاصله تشابه ۰/۹۰ جدا شدند. در نقطه I افراد شماره ۱۷ و ۱۹ از جمعیت شماره ۴ (سمنان با کد PON) با فاصله تشابه ۰/۸۸ قرار گرفتند. نقطه J محل اتصال فرد شماره ۱۵ با نقطه A است که متعلق به جمعیت شماره ۳ (کاشان با کد PFO) می‌باشد. تشابه در نقطه J برابر با ۰/۸۷ است. نقطه K با تشابه ۰/۸۶ محل اتصال افراد شماره ۷۶ و ۷۷ از جمعیت شماره ۱۶ (اصفهان با کد PEI) می‌باشد. فرد شماره ۶۱ از جمعیت ۱۳ کاشان با کد PSII در نقطه L با تشابه ۰/۸۵ به دو فرد دیگر این جمعیت (نقطه C) متصل شده است. نقطه M با تشابه ۰/۸۴ محل اتصال دو شاخه F و G از جمعیت ۱۷ یزد می‌باشد. فرد شماره ۸۲ از این جمعیت با تشابه ۰/۷۵ به چهار فرد دیگر در نقطه S می‌پیوندد. سه فرد از جمعیت شماره ۹ یزد با کد PTR در نقطه N با تشابه ۰/۸۳ به هم می‌پیوندند. شاخه O محل تلاقی فرد شماره ۶۸ با شاخه B با تشابه ۰/۸۲۵ است که متعلق به جمعیت شماره ۱۴ (کاشان با کد PSEV) می‌باشد. نقطه P محل اتصال شاخه E به فرد شماره ۷ می‌باشد که همه آن‌ها به جمعیت شماره ۲ قم

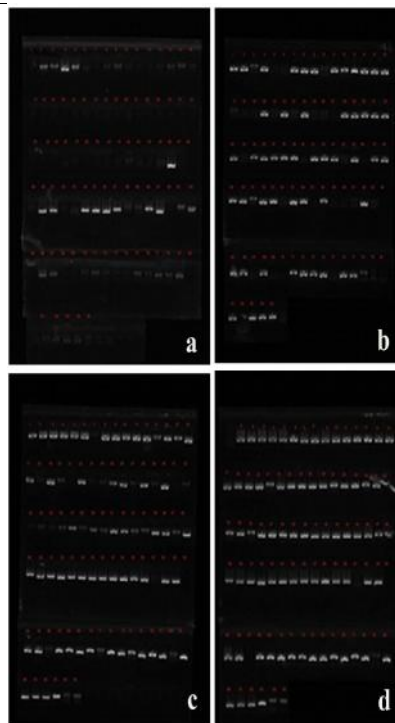
دندروگرام داده‌های ISSR مربوط به ۸۵ نمونه از ۱۷ جمعیت براساس ماتریس تشابه به روش UPGMA و ضریب تشابه Dice که از ۰/۴۰ تا ۰/۹۶ متغیر بودند (شکل ۲). عدد نشان داده شده روی محور سمت چپ دندروگرام، نشان‌دهنده تشابه بین افراد می‌باشد. هرچه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد، تشابه بیشتر و هر چه به صفر نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده اختلاف بیشتر بین افراد است. کلاسترهایی که به خوبی از یکدیگر جدا شدند، محور عمودی بلندتری دارند. در فاصله تشابه ۰/۹۶ دو گروه از جمعیت‌ها از هم جدا می‌شوند و بیشترین تشابه را نشان می‌دهند که در نقطه A شامل افراد شماره ۱۱ و ۱۴ (جمعیت شماره ۳، کاشان با کد PFO) و در نقطه B شامل نمونه‌های ۶۶ و ۶۷ (جمعیت شماره ۱۴، کاشان با کد PSEV) می‌باشد. در فاصله تشابه ۰/۹۴ سه گروه از هم مجزا می‌شوند که هر کدام دو فرد از جمعیت‌های ۱۳ با کد PSII (نقطه C)، ۷ با کد PTH (نقطه D) و ۲ با کد PFIF (نقطه E) را شامل می‌شوند. چهار فرد از جمعیت شماره ۱۷ (یزد با کد PNIN) در دو شاخه مجزا (F و G) هر یک متشکل از دو فرد، در فاصله تشابه ۰/۹۲

Z با تشابه ۰/۷ قرار گرفتند که این شاخه با تشابه ۰/۶۵ در کنار سه فرد از جمعیت‌های ۸ یزد (PTOU) و ۱۴ کاشان (PSEV) در نقطه AD واقع شده است. شصت درصد افراد جمعیت شماره ۱۵ کاشان (PSE) در نقطه AE با تشابه ۰/۶۳ قرار گرفتند. شاخه AF دربرگیرنده ۹۴٪ افراد مورد آنالیز در بررسی حاضر می‌باشد که با تشابه ۰/۵۰ در کنار هم قرار گرفتند. شاخه H که مربوط به ۲ فرد از جمعیت شماره ۷ یزد (PTH) است، به عنوان گروه خواهری شاخه AF با تشابه ۰/۴۳ در نقطه AG مشاهده شده است. کمترین مشابهت در نقطه AH با تشابه ۰/۴ موقعیت سه فرد از ۸۵ مورد بررسی در این مطالعه را نشان می‌دهد که به عنوان گروه ۹۷٪ از افراد این مطالعه در نظر گرفته می‌شود. این سه فرد، متعلق به دو جمعیت ۱۳ (PSII) و ۱۵ (PSE) جمع‌آوری شده از کاشان می‌باشند که بیشترین فاصله را نسبت به سایر افراد مورد بررسی در مطالعه حاضر داشتند. در مجموع، براساس دندروگرام به دست آمده از مطالعه حاضر، جمعیت‌هایی که منشأ جغرافیایی مشابه داشتند، بیشتر در کنار یکدیگر قرار گرفتند. با توجه به تشابه بالا، می‌توان این گونه بیان کرد که نشانگر استفاده شده، به خوبی توانست تنوع ژنتیکی میان افراد مورد بررسی را آشکار سازند.

(کاشان با کد PFIF) می‌باشند. تشابه این سه فرد برابر با ۰/۸۲ می‌باشد. شاخه Q محل اتصال دو فرد شماره‌های ۴ و ۵ از جمعیت شماره ۱ قم (کاشان با کد PIF) با شاخه P با تشابه ۰/۸ است که شامل سه فرد از جمعیت شماره ۲ قم (کاشان با کد PFIF) می‌باشد. این شاخه نزدیکی دو جمعیت اشنان قم (کاشان) را نشان می‌دهد. شاخه R با تشابه ۰/۷۹ دربرگیرنده چهار فرد از پنج تکرار جمعیت سمنان با کد PTW می‌باشد. شاخه T با تشابه تقریباً برابر با ۰/۷۵ شامل چهار فرد از پنج فرد جمعیت سمنان با کد PON است. چهار فرد از جمعیت ۱۲ قم (کاشان با کد PSIX) در شاخه U با تشابه ۰/۷۴ قرار گرفتند. هشتاد درصد افراد جمعیت‌های شماره ۴ (PON) و ۵ (PTW) که هر دو از سمنان جمع‌آوری شدند، در شاخه V با تشابه ۰/۷۴ در کنار هم قرار گرفتند. شاخه W دربرگیرنده ۶۰٪ از افراد دو جمعیت ۱۳ (PSII) و ۱۴ (PSEV) کاشان می‌باشد که ضریب تشابه به دست آمده براساس دندروگرام حاصل از این تحقیق برابر با ۰/۷۴ می‌باشد. شاخه AB با تشابه ۰/۶۹ دو شاخه U و W را دربر می‌گیرد که بیانگر تشابه جمعیت‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴ جمع‌آوری شده از کاشان می‌باشد. شاخه Y هر پنج فرد جمعیت شماره ۱۱ از اصفهان (با کد PELE) را شامل می‌شود که تشابه آن‌ها در سطح ۰/۷ است. تقریباً ۲۷٪ افراد متعلق به جمعیت‌های ۱ الی ۳ (جمع‌آوری شده از قم و کاشان)، در شاخه



شکل ۱- درخت (دندروگرام) حاصل از داده‌های ISSR برای جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus* براساس ماتریس تشابه به روش UPGMA.
Fig. 1. The obtained phylogram by ISSR data for *Seidlitzia rosmarinus* populations according to similarity matrix based on UPGMA clustering method.



شکل ۲- باندهای ثبت شده حاصل از پرایمرهای اختصاصی (a-d).

Fig. 2. The recorded bands following application of specific primers (a-d).

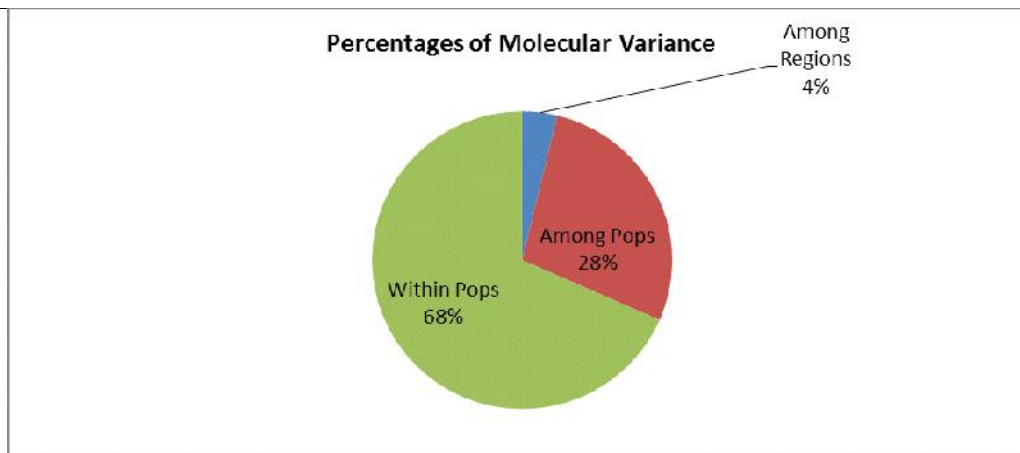
در مرحله بعد، آنالیز MCMC با فرض تعداد کل $K = 2$ و دور انداختن ۵۰۰۰۰۰ دور ابتدایی برای $K = 2$ برای کل داده‌ها انجام شد. ساختار ژنتیکی افراد در شکل ۳ نشان داده شده است. همچنین، نقشه‌ای از روابط ژنتیکی بین ۸۵ نمونه از گونه *S. rosmarinus* توسط روش ISSR ترسیم شده که ۲ نوع ژنوتیپ متفاوت را نشان می‌دهد (شکل ۴).

از طرفی، در شکل ۵، روابط ژنتیکی بین ۸۵ نمونه مطالعه شده با استفاده از نشانگر ISSR آورده شده است. جمعیت‌های یزد (۹-۷)، جمعیت‌های اصفهان (۱۰ و ۱۱)، جمعیت‌های قم (۱ و ۲) و جمعیت‌های سمنان (۴ و ۵) کنار یکدیگر قرار گرفتند.

این روش به عنوان روش مکمل برای تجزیه خوشه‌ای با هدف استفاده بهینه و استخراج حداکثری اطلاعات از داده‌های مولکولی کاربرد دارد. تجزیه به مختصات اصلی برای محور مختصات اول و دوم به ترتیب با $۱۶/۲۰$ و $۱۲/۱۶$ ٪ از واریانس موجود را تبیین و در مجموع، مولفه‌های اول و دوم $۲۸/۳۶$ ٪ از واریانس موجود را توجیه کردند. دیاگرام پراکنش جمعیت‌ها براساس مختصات اول و دوم در شکل ۶ ارائه شده است که با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت دارد.

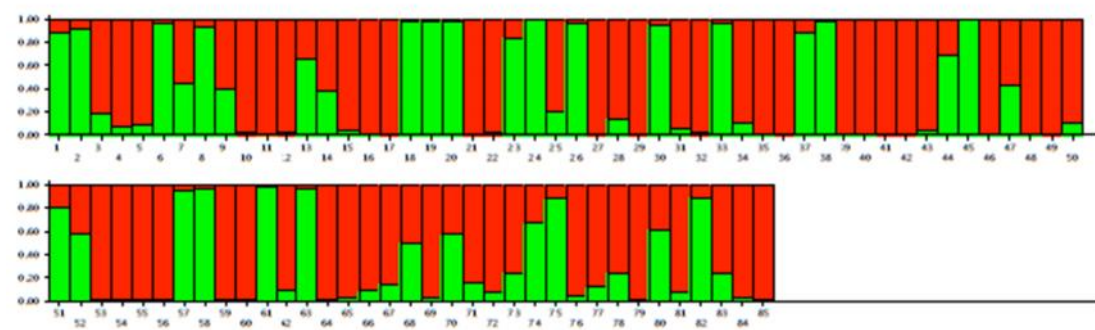
آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) از مجموع ۸۵ فرد متعلق به ۱۷ جمعیت (دریاچه حوض سلطان، سمنان- گرمسار، یزد-مروست، آران و بیدگل، اصفهان و قم) به منظور برآورد تنوع ژنتیکی انجام گرفت. تعدادی از داده‌ها به دلیل عدم کیفیت یا عدم جواب‌دهی از جمع کل نمونه‌ها کسر شده است. نتایج نشان داد که از مجموع کل تنوع، بیشترین میزان، یعنی ۶۸ ٪ آن مربوط به تنوع درون جمعیتی، ۲۸ ٪ مربوط به تنوع بین جمعیتی و ۴ ٪ مربوط به تنوع بین مناطق می‌باشد (جدول ۴).

درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها، بین جمعیت‌ها، بین مناطق مختلف مربوط به جمعیت‌های مورد بررسی در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از انجام ۲۰ تکرار از روند MCMC برای تعداد فرضی جمعیت از ۱ تا ۵ نتایج حاصل از نرم‌افزار Structure 2.3.4 برای یافتن K واقعی به SPSS و EXCEL منتقل شد که نتایج در جدول مذکور قابل مشاهده است. بیشترین میزان ΔK بیانگر تعداد واقعی جمعیت‌ها می‌باشد. بر این اساس، برای داده‌های این مطالعه، بیشترین مقدار ΔK زمانی است که تعداد جمعیت‌ها (تیپ‌ها) برابر ۲ در نظر گرفته شود.



شکل ۳- درصد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus*: درون جمعیت‌ها (۶۸٪)، بین جمعیت‌ها (۲۸٪) و بین مناطق مختلف (۴٪).

Fig. 3. The genetic diversity percentages among *Seidlitzia rosmarinus* populations: within populations (68%), among populations (28%) and among regions (4%).



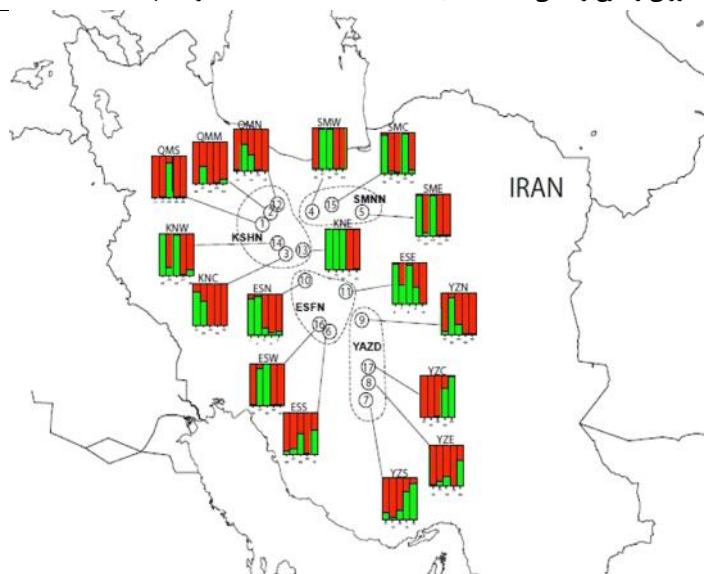
شکل ۴- تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های مربوط به آلل‌ها، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطوح جمعیت و منطقه.

Fig. 4. Data variance analysis related to alleles showed significant difference both at the population and at regions level.

جدول ۴- نتایج آزمون AMOVA (آنالیز واریانس مولکولی) تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Seidlitzia rosmarinus*

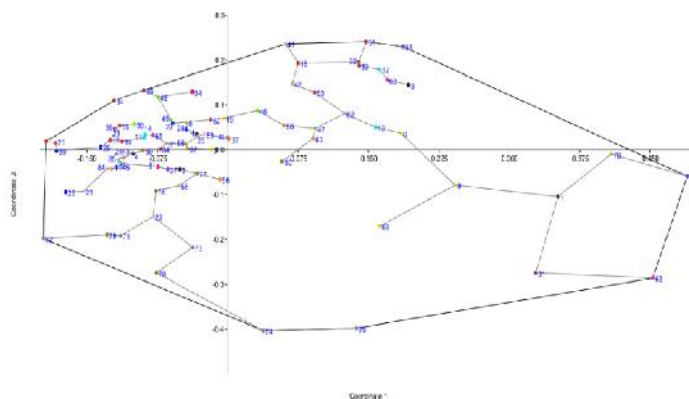
Table 4. Genetic variation based on molecular analysis in *Seidlitzia rosmarinus* populations

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of Square	Estimation of variance	Percentage
Among region	3	182.434	60.811	0.803	4
Among pops	13	573.683	44.129	5.915	28
Within pops	68	989.600	14.553	14.553	68
Total	84	1745.718	-	21.271	100



شکل ۵- روابط ژنتیکی بین ۸۵ نمونه مطالعه شده با استفاده از نشانگرهای ISSR.

Fig. 5. Genetic relatedness among 85 samples of the studied species by using ISSR markers.



شکل ۶- آنالیز شاخص اصلی با روش PCOA براساس محور مختصات اصلی اول و دوم برگرفته از نشانگر ISSR در نمونه‌های هر جمعیت.

Fig. 6. The chart analyze of the main coordinates by PCOA method. First and second axes are the main coordinate obtained by ISSR for samples of each studied population.

بحث

نتایج به دست آمده از نشانگر ISSR دقت بیشتری داشته و روابط بین جمعیت‌ها را با وضوح بهتری نشان داده است. به عبارتی، توانایی ظاهری نشانگرهای ISSR برای آشکار کردن سطوح بالاتر پلی‌مورفیسم، به جای تقویت باندهای چندشکلی بیشتر می‌باشد (Godwin *et al.* 1997). نشانگرهای ISSR، سطح پلی‌مورفیسم قابل ملاحظه بالاتری را نسبت به نشانگرهای RFLP در ذرت (Kantety *et al.* 1995) و ارزن (Salimath *et al.* 1995) و همچنین، نشانگرهای RAPD در ارزن انگستی (Salimath *et al.* 1995) و سورگوم (Yang *et al.* 2000) داشته و نشان می‌دهند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارند. از طرف دیگر، این نشانگر، علیرغم مناسب بودن برای تفکیک جمعیت‌ها، اگر نتیجه مورد نظر را در مطالعه حاضر نشان نمی‌دهد، دلیل آن به خاطر عدم اختلاف بین جمعیت‌ها است، ولی با این وجود، حداقل اختلاف را می‌توان در آن‌ها مشاهده نمود. علت آن شاید به دلیل هالوفیت بودن گونه است که جمعیت‌های آن، مقاومت زیادی نسبت به عوامل محیطی از خود نشان داده‌اند، در حالی که در گونه‌های مشابه و دیگر غیرهالوفیت، میزان پلی‌مورفیسم را می‌توان به وضوح مشاهده نمود.

نتایج به دست آمده از نشانگر ISSR دقت بیشتری داشته و روابط بین جمعیت‌ها را با وضوح بهتری نشان داده است. به عبارتی، توانایی ظاهری نشانگرهای ISSR برای آشکار کردن سطوح بالاتر پلی‌مورفیسم، به جای تقویت باندهای چندشکلی بیشتر می‌باشد (Godwin *et al.* 1997). نشانگرهای ISSR، سطح پلی‌مورفیسم قابل ملاحظه بالاتری را نسبت به نشانگرهای RFLP در ذرت (Kantety *et al.* 1995) و ارزن (Salimath *et al.* 1995) و همچنین، نشانگرهای RAPD در ارزن انگستی (Salimath *et al.* 1995) و سورگوم (Yang *et al.* 2000) داشته و نشان می‌دهند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارند. از طرف دیگر، این نشانگر، علیرغم مناسب بودن برای تفکیک جمعیت‌ها، اگر نتیجه مورد نظر را در مطالعه حاضر نشان نمی‌دهد، دلیل آن به خاطر عدم اختلاف بین جمعیت‌ها است، ولی با این وجود، حداقل اختلاف را می‌توان در آن‌ها مشاهده نمود. علت آن شاید به دلیل هالوفیت بودن گونه است که جمعیت‌های آن، مقاومت زیادی نسبت به عوامل محیطی از خود نشان داده‌اند، در حالی که در گونه‌های مشابه و دیگر غیرهالوفیت، میزان پلی‌مورفیسم را می‌توان به وضوح مشاهده نمود.

References

- Assadi, M. 2001. Chenopodiaceae. Pp. 27–65. In: Assadi, M. (ed.), Flora of Iran Vol. 38. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran (In Persian).
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. Botanical Journal of the Linnean Society 181(1): 1–20.
- Baghestani, A. & 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 Rangeland. Doyle, J.J. (ed.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry 19: 11–15.
- Bhatt, A., Bhatt, N.R. & Marutimuttill, T. 2019. Germination behavior of *Seidlitzia rosmarinus* Boiss., a perennial halophyte of Arabian deserts. Agriculture and Natural Resources 53: 348–354.
- Boissier, E. 1879. *Chenopodium* L. In: Flora Orientalis 4. Genevae & Basileae.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A. & Smith, L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeat ISSR markers to plant genetics. Electrophoresis 189: 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).
- Hadi, M. 2009. Biotechnological potentials of *Seidlitzia rosmarinus*. African Journal of Biotechnology 811: 2429–2431.
- Hayder, S.Z. & Yasmin, S. 1972. Salt tolerance and cation interaction in alkali staccato at germination. Journal of Range Management Archives 25(5): 390–392.
- Hedge, I.C., Akhiani, H., Freitag, H., Kother-Heinrich, G., Podlech, D., Rilke, S. & Uotila, P. 1997. Chenopodiaceae, Flora Iranica, Akad, Druck-und Verlagsanstalt, Graz.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian Inference of Phylogeny Bioinformatic 17: 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).
- Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L. & Zehr, B.E. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn *Zea mays* L. inbred lines using inter-simple sequence repeat ISSR amplification. Molecular Breeding 14: 365–373.
- Karimi, M., Pormajidian, M.R., Jalilvand, H. & Safari, A. 2012. Preliminary study for application of O-ring function in determination of small-scale spatial pattern and interaction species Case study: Bayangan forests, Kermanshah. Iranian Journal of Forest and Poplar Research 204: 608–621.
- 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, Isfahan, Iran (In Persian with English summary).
- Latifi, J. 1998. *Siedlitzia rosmarinus*, a suitable plant for desertification control in Dashtabad. In: Proceedings of the 20th National Conference on Desertification and Desertification Control Methods. Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, pp. 419–428.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2002. MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, ver. 4.01. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.
- Mousavi Kouhi, S.M., Moudi, M., Soltani Moghadam, E. & Sarchahi Moghadam, H. 2019. The investigating of sodium accumulation in some halophytic species of Zygophyllaceae, Polygonaceae, Asteraceae and Amaranthaceae. Nova Biologica Reperta 6: 96–105.

- Kianian, M.K., Ravanbakhsh, H., Ara, H. & Nikou, Sh. 2019. International Journal of Agriculture and Environmental Research 5(2): 56–70.
- Sabeti, H. 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. University of Science and Technology Press, Tehran (In Persian).
- Salimath, S.S., Oliveira, A., 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.
- Yang, C., Everitt, J.H., Bradford, J.M. & Escobar, D.E. 2000. Mapping Grain Sorghum Growth and Yield Variations Using Airborne Multispectral Digital Imagery. *Transactions of the ASAE* 43(6): 1927.